

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DÂN LẬP VĂN LANG
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
NGHIÊN CỨU TẦM SOÁT, KHUẾCH ĐẠI VÀ GIẢI
TRÌNH TỰ VÙNG GENE TẠO HƯƠNG AAT CỦA LAN
VANDA

Giảng viên hướng dẫn: TS. Trần Hoàng Dũng

Sinh viên thực tập: Đặng Thị Hồng Oanh (Trưởng nhóm)
Nguyễn Thị Kim Oanh
Đặng Hoàng Nhi
Nguyễn Văn Vạn

Tháng 09/2013

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DÂN LẬP VĨN LANG
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
NGHIÊN CỨU TẦM SOÁT, KHUẾCH ĐẠI VÀ GIẢI
TRÌNH TỰ VÙNG GENE TẠO HƯƠNG AAT CỦA LAN
VANDA

Giảng viên hướng dẫn: TS. Trần Hoàng Dũng

Sinh viên thực tập: Đặng Thị Hồng Oanh (Trưởng nhóm)
Nguyễn Thị Kim Oanh
Đặng Hoàng Nhi
Nguyễn Văn Vạn

Tháng 09/2013

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ABI	Applied Biosystems Incorporated
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
cDNA	complementary Acid Deoxyribo Nucleic
CSDL	cơ sở dữ liệu
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
ddNTP	dideoxynucleotide
dNTP	deoxynucleotide
DNA	Acid Deoxyribo Nucleic
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
EST	Expressed Sequence Tag
F	Forward
GDPS	gene genaryl diphosphate synthase
ITS	Internal transcribed spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MMDB	Molecular Modeling Database
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	open reading frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Reverse

RNA	Ribonucleic acid
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
T _m	Melting Temperature
VMPAAT	<i>Vada mini palmer</i> alcohol acyltransferase
UV	Ultraviolet

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 2.1. Một số loại lan <i>Vanda</i>	7
Hình 2.2. <i>Vanda</i> có lá hình trụ tròn	8
Hình 2.3. <i>Vanda</i> có lá dẹp phẳng.....	8
Hình 2.4. Sơ đồ tóm tắt phương pháp hóa học của Maxam và Gilbert	15
Hình Error! No text of specified style in document..5. Hình ảnh mô tả cấu trúc của dNTP và ddNTP	16
Hình 2.6. Nguyên lý của phương pháp dideoxynucleotide	17
Hình 2.7. Sơ đồ tóm tắt quy trình giải trình tự bằng máy tự động	18
Hình 3.1. Các mẫu lan <i>Vanda</i> được thu thập trong nghiên cứu	23
Hình 4.1. Mẫu lá lan <i>Vanda</i> sau khi xử lý	34
Hình 4.2. Kết quả điện di DNA tổng số của 10 mẫu lan <i>Vanda</i>	36
Hình 4.3. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT của các mẫu lan <i>Vanda</i>	37
Hình 4.4. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT của các mẫu lan <i>Vanda</i>	37
Hình 4.5. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu <i>Vanda</i>	38
Hình 4.6. Trường hợp trình tự DNA có thể hiệu chỉnh trên cả 2 mạch.....	39
Hình 4.7. Trường hợp trình tự DNA chỉ có thể hiệu chỉnh trên một mạch.....	40
Hình 4.8. Trường hợp trình tự DNA không thể hiệu chỉnh trên cả hai mạch.....	41
Hình 4.9. Kết quả giống cột thẳng hàng trên SeaView	42
Hình 4.10. Kết quả so sánh trình tự trên Genebank.....	42
Hình 4.11. Kết quả dò tìm trình tự tương đồng bằng công cụ Blast.....	43
Hình 4.12. Cây phát sinh loài xây dựng bằng phần mềm MEGA 5.2.2.....	43

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Các dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu	25
Bảng 3.2. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	26
Bảng 3.3. Các dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu	27
Bảng 3.4. Thông tin về môi được sử dụng trong phản ứng PCR.....	30
Bảng 3.5. Các thành phần trong phản ứng PCR	31
Bảng 3.6. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR.....	31
Bảng 4.1. Thông tin về các mẫu lan được thu thập.....	33
Bảng 4.2. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại vùng VMP-AAT.....	37
Bảng 4.3. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại vùng VMP-AAT.....	38

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích nghiên cứu.....	3
1.3. Yêu cầu.....	3
1.4. Giới hạn đề tài.....	3
CHƯƠNG 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
2.1. Giới thiệu chung về phong lan.....	4
2.2. <i>Vanda</i>	4
2.3. Tổng quan về vùng VMP-AAT.....	9
2.4. Kỹ thuật PCR.....	10
2.5. Kỹ thuật giải trình tự.....	14
2.6. Kỹ thuật hiệu chỉnh trình tự.....	19
2.7. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	20
2.7.1. Các nghiên cứu ngoài nước.....	20
2.7.2. Các nghiên cứu trong nước.....	21
CHƯƠNG 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
3.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	23
3.2. Vật liệu nghiên cứu.....	23
3.3. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất.....	25
3.4. Phương pháp nghiên cứu.....	28
3.4.1. Phương pháp xử lý mẫu lá lan.....	28

3.4.2. Tách chiết DNA tổng số	28
3.5. Định tính DNA	29
3.6. Phản ứng khuếch đại.....	30
3.7. Hiệu chỉnh trình tự.....	31
3.8. So sánh với cơ sở dữ liệu GeneBank.....	32
CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN.....	33
4.1. Thu thập và xử lý mẫu.....	33
4.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	35
4.3. Khuếch đại vùng VMPAAT bằng kỹ thuật PCR	36
4.3.1. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu <i>Vanda</i> , bằng kỹ thuật PCR lần 1	36
4.3.2. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu <i>Vanda</i> bằng kỹ thuật PCR lần 2.	38
4.4. Kết quả giải trình tự.....	
4.5. Phân tích kết quả	
4.5.1. So sánh trình tự của mẫu nghiên cứu với ngân hàng GenBank	
4.5.2. Trình tự đoạn gene có hương.....	
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	
5.1. Kết luận.....	
5.2. Kiến nghị	

CHƯƠNG 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây kinh tế nước ta dần dần đi lên để hội nhập vào nền kinh tế trong khu vực và thế giới. Hiện nay với nhiều mặt hàng nông nghiệp xuất khẩu như: cà phê, tiêu, điều, cao su, gạo... sản xuất nông nghiệp đã đóng góp một phần quan trọng trong nền kinh tế quốc dân, cùng với những thành tựu to lớn đạt được trong sản xuất nông nghiệp, ngành sản xuất hoa lan cũng có những bước tiến đáng kể. Ở một số nước trên thế giới ngành trồng hoa cây cảnh nói chung và hoa lan nói riêng được sản xuất quy mô công nghiệp đã đem lại hiệu quả kinh tế cao. Hoa lan thực sự trở thành sản phẩm nông nghiệp có giá trị kinh tế cao, nó thúc đẩy ngành sản xuất kinh doanh phát triển mạnh mẽ ở một số nước như: Thái Lan, Singapore, Malaysia, Indonesia... trong đó Thái Lan có kim ngạch xuất khẩu hoa lan cắt cành năm 1987 là 21 triệu USD, năm 1990 26 triệu USD, năm 1991 là 30 triệu USD, Singapore thu lợi nhuận từ hoa cắt cành mỗi năm là 10 triệu USD. Việt Nam trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển nhanh chóng của nền kinh tế, xã hội... Nhu cầu sử dụng hoa nói chung và hoa lan nói riêng cũng tăng nhanh, không chỉ dừng trong những dịp lễ tết như trước đây mà nhu cầu về hoa trong cuộc sống thường ngày của người dân cũng rất lớn, bên cạnh nhu cầu về số lượng, chất lượng cành hoa cũng đòi hỏi ngày càng cao, số liệu thống kê cho thấy các loài hoa có chất lượng cao xuất hiện trên thị trường chủ yếu nhập từ Đài Loan, Thái Lan, Trung Quốc và chủ yếu được tiêu thụ nhiều nhất ở các đô thị, thành phố lớn. Điều này cho thấy sản xuất hoa ở Việt Nam chưa đáp ứng được nhu cầu thị hiếu của người dân. Trong những năm gần đây, một số loài lan lai được nhập nội ngày càng nhiều vào nước ta (*Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Vanda*...) với chất lượng ngày càng cao, màu sắc đa dạng đang được tiêu thụ mạnh. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển của nền kinh tế, nhu cầu hoa lan của người thưởng thức không chỉ phải đẹp về vẻ bên ngoài nữa mà hiện nay người ta còn chú ý đến mùi hương và sự đa dạng của hương hoa.

Thực tế việc đánh giá hoa lan cho mùi hương của nó đã được thực hiện trong năm 1989 tại Liên hoan hoa lan quốc tế Grand Prix, Nhật Bản. Kể từ đó, các lễ hội hoa lan khác ở châu Âu, New Zealand, và Bắc Mỹ đã tiến hành theo hướng đánh giá bao gồm cả hương thơm vào trong lĩnh vực của họ trong đánh giá phong lan. Thông qua các hội nghị và lễ hội, người ta tìm kiếm để chọn các giống hoa lan cho mùi hương hấp dẫn đi cùng với vẻ đẹp hình ảnh của chúng. Vì thế trong những năm trở lại đây, có sự quan tâm trở lại về việc tìm những loài hoa lan toàn mỹ: nhìn phải đẹp và ngửi cũng thơm. Vấn đề này đã thu hút sự chú ý của các nhà sản xuất nước hoa và những người yêu hoa lan - trong việc tìm kiếm những mùi hương mới.

Ở những loài lan có hương, hoa của chúng thường có nhược điểm là đường kính hoa nhỏ và mau tàn. Hiện nay, các giống lan thương phẩm hầu hết đã được lai tạo nên cho kích thước hoa to và màu sắc rực rỡ khi nở.

Khi vẻ đẹp của những cánh hoa lan ngày càng trở nên hấp dẫn người thưởng thức thì mùi hương nguyên thủy của chúng lại dần biến mất. Ở nơi hoang dã, tinh dầu của những loài hoa lan có hương được lưu trữ trên các cánh và đài của hoa. Tinh dầu này sẽ được giải phóng ra môi trường khi nó tiếp xúc với không khí. Mùi hương này được chúng sử dụng để thu hút những côn trùng thụ phấn. Một điều đáng tiếc là trong quá trình lai giống các nhà trồng lan thương mại chỉ chú trọng mục đích muốn tăng kích thước của hoa và để giữ cho lâu tàn nên chúng được đưa vào trồng và chăm sóc trong nhà kính, chính vì thế chúng dần dần mất đi mùi hương thiên nhiên đặc trưng mặc dù vẫn giữ được đầy đủ màu sắc.

Điều đáng lưu ý là ở các loài lan có hương, phần lớn chúng chỉ tỏa hương ở hoa nhưng lại không biểu hiện ở những bộ phận khác. Vậy trong bộ gen của những loài lan này, đoạn gen nào quy định sự biểu hiện mùi hương của chúng?

Với đề tài: ***“Nghiên cứu tầm soát, khuếch đại và giải trình tự vùng gene tạo hương AAT của lan Vanda”***. Chúng tôi tin rằng đề tài này sẽ là một bước đột phá rất lớn của lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, từ đó tạo tiền đề cho các hướng nghiên cứu mới, khai thác ứng dụng các đặc tính quý của các loài thực vật nói chung và ở lan nói riêng để áp dụng vào các lĩnh vực khác của đời sống. Chẳng hạn như việc cung cấp cơ sở dữ liệu cho người chơi lan về đặc tính tạo hương của lan...

1.2. Mục đích nghiên cứu:

“Nghiên cứu tầm soát, khuếch đại và giải trình tự vùng gene tạo hương AAT của lan *Vanda*”.

1.3. Yêu cầu:

Phương pháp thu thập mẫu

Ly trích DNA tổng số.

Kỹ thuật điện di.

Nắm vững kỹ thuật PCR, hạn chế sai sót trong quá trình thực hiện.

Biết cách hiệu chỉnh trình tự DNA và kiểm tra kết quả cơ sở dữ liệu nucleotide trên Genbank bằng công cụ BLAST.

1.4. Giới hạn đề tài:

Đề tài được thực hiện từ ngày 23-7-2013 đến 31-9-2013 tại phòng Genome & Bioformatic – Viện kỹ thuật công nghệ cao NTT – ĐH Nguyễn Tất Thành. Thời gian tiến hành tương đối ngắn nên phạm vi nghiên cứu chưa bao quát hết mà chỉ tập trung ở một số loài lan *Vanda*.

CHƯƠNG 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu chung về phong lan:

Trên khắp trái đất, hầu như nơi nào có thực vật, nơi đó có lan. Số lượng nhiều hay ít phụ thuộc khá nhiều về điều kiện khí hậu, độ cao,... của mỗi khu vực. Mỗi loài đều có cách phân bố và cách phát triển rất riêng biệt về kiểu dáng, màu sắc, hương thơm,...

Họ Phong lan chiếm vị trí thứ 2 sau họ Cúc trong ngành thực vật hạt kín và là họ lớn nhất trong lớp một lá mầm với 750 chi và 20000 -25000 loài. Hoa lan mọc khắp nơi trên thế giới trừ Châu Nam Cực, chúng ta có thể tìm thấy chúng tại các vùng có khí hậu nhiệt đới như rừng già Brazil đến các vùng có tuyết phủ trong mùa đông như ở Canada (Trần Hợp, 1998).

Hoa lan được người tiêu dùng ưa chuộng vì vẻ đẹp đặc sắc và các hình thức đa dạng của chúng. Hình dáng thực có khác nhau, dù rằng phần lớn chỉ là 5 cánh hoa bao bọc chung quanh một cái môi nhưng mỗi thứ hoa lại có những dị biệt khác thường. Hoa lan có những hoa nhỏ như đầu chiếc kim gút nhưng cũng có bụi lan *Grammatophyllum speciosum*.

Tại Thái lan có một loại *Vanda* được giấu tên và được bảo vệ rất nghiêm ngặt, hương thơm dành riêng dùng cung cấp cho một nhà sản xuất nước hoa danh tiếng. Hoa lan nếu được giữ đúng nhiệt độ và ẩm độ có thể còn giữ nguyên hương, nguyên sắc. Đa số các loại hoa lan được bán rộng rãi trên thị trường thường không có hương thơm nhưng trong tự nhiên có rất nhiều loại hoa lan có mùi thơm đặc trưng. *Vanilla* là một loại hoa lan mà hương thơm được dùng trong các loại ẩm thực của thế giới và có nguồn gốc từ Mexico, trong khi đó có các loại hoa lan tỏa ra mùi như thịt bị hong để hấp dẫn các côn trùng.

2.2. *Vanda*

Tên "*Vanda*" do W.Jones đặt tên vào năm 1795, và được Robert Brown bổ sung, có nguồn gốc từ chữ Phạn là Vệ Đà. Vì vậy, *Vanda* hay còn gọi là Vân Lan là cái tên

có nguồn gốc từ Ấn Độ gồm khoảng 60 -70 loài nguyên thủy, mọc ở Đông Nam châu Á, Trung Quốc, Himalaya,... cho đến bắc Úc châu. Giống này mọc ở nhiều độ cao khác nhau cho nên điều kiện trồng có khác nhau: các loài ở đồng bằng thích khí hậu nóng trong khi các loài ở núi cao chỉ ưa nhiệt độ lạnh.

Lan *Vanda* rất đẹp, đa dạng về hình dáng, có loại có hương thơm nhẹ nên được nhiều người ưa thích trồng và thưởng thức. Hoa *Vanda* thường tươi lâu từ 30 - 45 ngày, tùy theo cách trồng, giống, khí hậu. Lan *Vanda* có thể ra hoa 2 hoặc 3 lần trong một năm với điều kiện chăm sóc tốt.

Cùng chung một nhóm với *Vanda* là *Ascocentrum*, *Ascocenda* lai giống giữa *Asocentrum* và *Vanda*. Nhiều nhà sinh vật học chuyên về hoa lan trên thế giới (có khoảng 21 người) đã chia *Vanda* làm 4 loại khác:

- 1 - *Euanthe* căn cứ vào cây *Vanda sanderina* của Philippines.
- 2 - *Trudelia* căn cứ vào những cây mọc ở Himalaya.
- 3 - *Holcoglossum* thuộc loại *semi teres* mọc tại Trung Quốc và Đông Dương.
- 4 - *Papilionathe* cho những cây thuộc dạng *Teres*.

Đây là một giống có sự phân bố rất rộng từ Trung Quốc đến Himalaya và trải dài từ Indônêxia đến Niu Ghine và Bắc Úc châu. *Vanda* gồm hơn 45 loài được biết và trên 1.000 loài cây lai tạo thành bộ sưu tập về lan khá quan trọng.

Ở Việt Nam có 5 loài *Vanda* rừng được biết là: *Vanda concolor*, *Vanda liouvillei*, *Vanda lilacina*, *Vanda denisonaliana* và *Vanda pumila*, tuy nhiên chỉ có một loài cho hoa đẹp bền là loài *Vanda denisonaliana*. *Vanda* có sự biến đổi rất lớn về tính chất thực vật và sự xuất hiện của hoa, nhưng hầu hết chúng đều là những cây lan có giá trị vì có chồi loa dài mang nhiều hoa to.

Về phương diện thương mại, *Vanda* là một giống tương đối đồng nhất về dạng hoa, dạng cây và cả về điều kiện sinh thái. Hầu hết các loài thuộc giống *Vanda* lại là cây lan ưa nóng.

Một điều mà bất cứ người nào cũng có thể nhìn thấy ở cây *Vanda* lai là đài hoa luôn luôn lớn hơn hoặc bằng cánh hoa, nhất là cặp đài hoa dưới đây cũng là một điều giúp các người mới chơi lan có thể phân biệt giống *Vanda* với bất cứ một giống lan nào khác. Các cánh hoa của các loài thuộc giống này rất mỏng nhưng rất bền. Đây là điều đặc biệt khác thường vì độ bền của hoa vốn đã tỷ lệ với bề dày của cánh.

Tên khoa học và vị trí của *Vanda* trong hệ thống phân loại

Giới : *Plantae*

Ngành : *Magnoliophyta*

Lớp : *Liliopsida*

Bộ : *Orchidales*

Họ : *Orchidaceae*

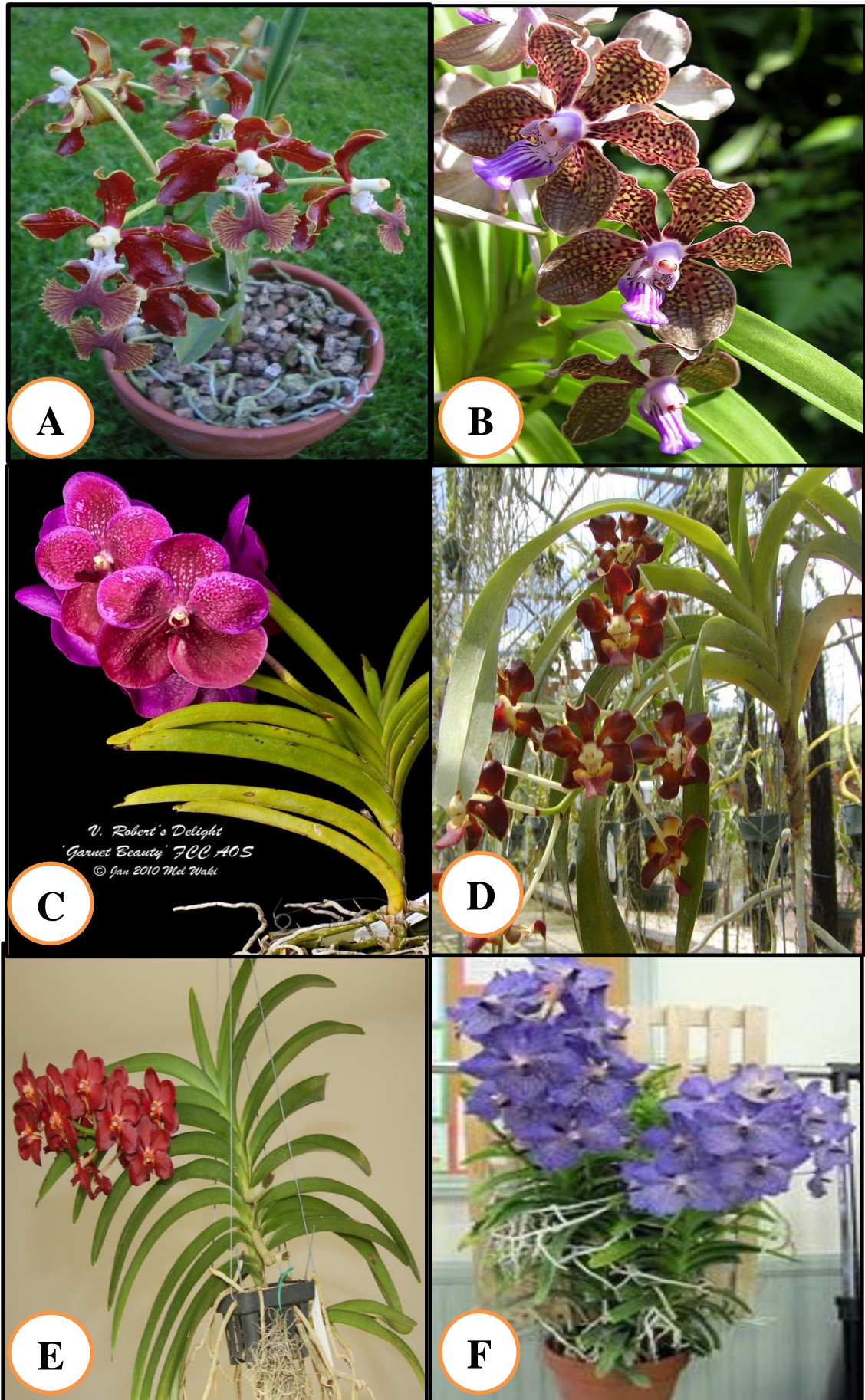
Chi : *Vanda*

Vanda có các loài: *Vanda bidupensis*, *Vanda concolor*, *Vanda denisoniana*, *Vanda fuscoviridis*, *Vanda lilacina*, *Vanda liouvillei*, *Vanda micholitzii*, *Vanda pumila*...

Một số loài có hương như: *Vanda tricolor*, *Vanda tricolor var suavis*, *Vanda amesiana*, *Vanda dearie*, *Vanda insignis*, *Vanda lamellate*, *Vanda luzonica*, *Vanda merrillii*...

Đặc điểm hình thái của *Vanda*

Vanda là loại lan đơn thân. Thân hình trụ dài với các lông khá dài, không có giả hành, lá hình trụ tròn hay dẹp thẳng. Lá dẹp phẳng ở tận cùng thường có 2 thùy không bằng nhau và có răng nhọn không đều. Phát hoa đứng thẳng và không phân nhánh, hoa khá lớn và khá bền. Lá đài và cánh hoa gần như nhau, bờ mép hơi co vào. Môi gắn chắc vào trụ ngắn, có cựa ngắn và hơi dẹp, trong cựa không có phụ bộ hay có vách hoặc cục u. Môi có 3 thùy, thùy giữa có sọc dọc và 2 cục u ở đáy ngay nơi miệng cựa. Trụ ngắn và mập, trên đầu trụ có nắp che 2 phần khối với vĩ phân ngắn mà to và gót đĩa lớn.



Hình 2.1. Một số loại lan *Vanda* (<http://www.vuonhoalan.net>)

(a) - *Vanda roeblingiana*, (b) - *Vanda Mini Palmer*, (c) – *Vanda Robert's Delight*
'*Garnet Beauty*' FCC AOS, (d) - *Vanda merrillii* (*Vanda caerulea*), (e) - *Vanda* 'Wild
Cherry', (f) - *Vanda Chindawat*.

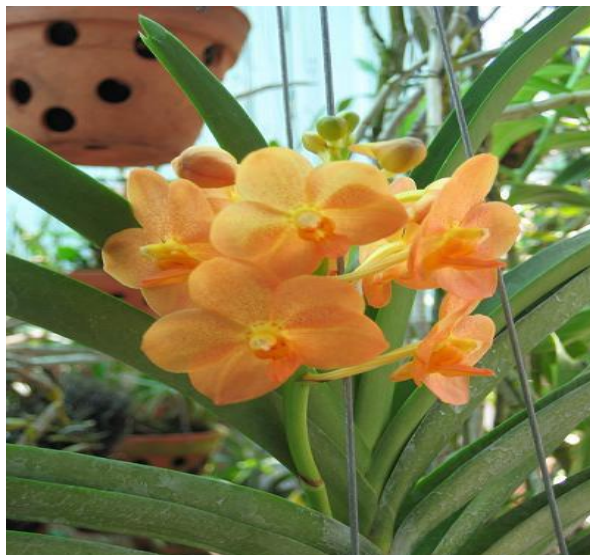
Thường người ta chia *Vanda* ra 2 nhóm dựa vào đặc điểm của lá:



Hình 2.2. *Vanda* có lá hình trụ tròn.

(<http://www.vuonhoalan.net>)

Nhóm có lá hình trụ tròn thường là cây leo bò, lá trụ tròn gắn thưa trên thân cũng hình trụ tròn, đòi hỏi ánh sáng nhiều nên phải trồng nơi có sáng hoàn toàn, không che chắn, thuận tiện cho vùng nóng.



Hình 2.3. *Vanda* có lá dẹp phẳng.

(<http://www.vuonhoalan.net>)

Nhóm có lá dẹp phẳng, thường là cây phụ sinh trên gỗ, bám trên cành cây cao, lá trải ra, xếp khít nhau che kín thân, đòi hỏi ít ánh sáng hơn nên có thể trồng ở các vùng khác và phải làm giàn che.

Cây lai giữa 2 dạng này cho ra dạng lá thay đổi ở khoảng giữa lá hình lòng máng đến hình trụ tròn, gọi là *Vanda* nửa-trụ tròn (*semi-terete Vanda*) cần ánh sáng cao hơn dạng lá hẹp phẳng nhưng thấp hơn dạng lá hình trụ tròn.

Cây lai giữa *Vanda* lá dẹp phẳng với *Vanda* nửa trụ tròn cho ra nhóm thứ tư gọi là *Vanda* phân tư trụ tròn, chúng có “máu” 3 phần lá dẹp phẳng, 1 phần lá trụ tròn.

Điều kiện sinh thái:

Vanda là một giống lan phụ sinh của vùng nóng, có một số rất ít mọc trên đá hay trên đất. Phần lớn *Vanda* đều thích sống trên thân gỗ mục vì điều này giúp rễ của cây hút được hơi ẩm trong không khí tốt hơn. Trong vườn nhà, nên trồng *Vanda* trong giỏ có nhiều lỗ thoáng khí lớn, treo cao và thả rễ thòng xuống bên dưới.

2.3. Tổng quan vùng VMPAAT

Nghiên cứu vùng gene VMPAAT là một ORF có khoảng 1343bp để mã hóa một polypeptide có 448 acid amin có khối lượng phân tử là 48,8kDa và điểm đẳng điện là 8,64. Các nghiên cứu sự biểu hiện của vùng VMPAAT cho thấy mùi hương được ưu tiên biểu hiện trong các mô thực vật như cánh hoa, đài hoa và thân nhưng tương đối thấp trong các mô thực vật (rễ và lá). Biểu hiện của VMPAAT ở các giai đoạn phát triển của hoa cũng khác nhau nhưng nó biểu hiện cao nhất trong giai đoạn nở hoa, tiếp theo là hoa nở hoàn toàn và nụ hoa. Ngoài ra, nó cũng biểu hiện khác biệt ở các thời điểm khác nhau trong vòng 24h: xu hướng tăng bắt đầu từ rất sớm vào buổi sáng và giảm về sau vào buổi chiều và đến đêm lại tăng dần.

2.4. Kỹ thuật PCR

Phản ứng PCR

PCR là chữ viết tắt của cụm từ Polymerase Chain Reaction, được dịch ở một vài sách là Phản ứng chuỗi trùng hợp cũng có sách gọi là "phản ứng khuếch đại gen". PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA mà không cần sử dụng các sinh vật sống như *E.coli* hay nấm men. PCR được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng, chẩn đoán những bệnh nhiễm trùng, tách dòng gene, và xác định huyết thống.

PCR được dùng để khuếch đại một đoạn DNA ngắn, đã xác định được một phần. Đó có thể là một gen đơn, hay một phần của gen. Trái với sinh vật sống, quy trình PCR có thể copy một mảnh DNA ngắn, có thể lên đến 10kb (kb = 1 kilobasepair = kilo cặp base = 1000 cặp base). DNA là một sợi đôi, và vì vậy nó được đo với DNA bổ sung ... gọi là cặp base. Một vài phương pháp có thể copy một mảnh kích thước lên đến 40kb ít hơn nhiều so với nhiễm sắc thể DNA trong tế bào eukaryote – ví dụ như tế bào người chứa hơn 3 tỉ cặp base.

Như đã thực hành hiện nay, PCR cần rất nhiều thành phần. Những thành phần đó là:

- DNA mẫu (template) chứa mảnh DNA cần khuếch đại.
- Cặp mồi (primer), để xác định điểm bắt đầu và kết thúc vùng cần khuếch đại (xem phần tiếp theo về mồi).
- DNA - polymerase enzym xúc tác cho việc nhân lên của DNA.
- Nucleotides (ví dụ dNTP) là nguyên liệu cho DNA - polymerase để xây dựng DNA mới.
- Dung dịch đệm, cung cấp môi trường hóa học cho DNA - polymerase.

Phản ứng PCR được thực hiện trong chu kỳ nhiệt. Đây là máy đun nóng và làm nguội trong ống phản ứng ở nhiệt độ chính xác cho mỗi phản ứng.

Nguyên tắc và mục đích thiết kế mồi

Mồi là gì

Mồi là một trình tự DNA hay RNA ngắn, bắt cặp với một mạch của DNA khuôn mẫu và có mang một đầu 3'-OH tự do giúp DNA – polymerase bắt đầu tổng hợp một chuỗi DNA mới.

Mồi trong phản ứng sao chép DNA là những trình tự RNA ngắn được tổng hợp bởi enzyme Primase.

Mồi trong sinh học phân tử là những đoạn oligonucleotide ngắn được tổng hợp hóa học

Primer ở bên trái tác động trên sợi DNA 3'-5' được gọi là primer thuận (forward - primer, kí hiệu là F). Primer ở bên phải tác động trên sợi DNA 5'-3' được gọi là primer ngược (reverse - primer, kí hiệu là R).

Ứng dụng: phản ứng PCR, lai phân tử,...

Đặc điểm của mồi

Tính duy nhất: Mỗi primer chỉ có duy nhất một trình tự trên sợi DNA đích và không bắt cặp trên các trình tự DNA khác.

Chiều dài mồi: Chiều dài của mồi ảnh hưởng tới tính duy nhất và nhiệt độ nóng chảy cũng như nhiệt độ bắt cặp của nó. Nói cách khác, primer càng dài thì tính duy nhất và nhiệt độ nóng chảy cũng như nhiệt độ bắt cặp của nó càng cao.

Chiều dài của mồi không được thấp hơn 14 bases để đảm bảo tính duy nhất của mồi thích hợp.

Chiều dài phù hợp là từ 18 – 28 bases.

Thành phần base: Ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của quá trình bắt cặp, nhiệt độ nóng chảy, nhiệt độ bắt cặp và sự ổn định cấu trúc phân tử của primer.

Các trình tự được sắp xếp ngẫu nhiên sẽ tốt hơn trình tự chứa những vùng giàu (A + T) hoặc (G + C) đảm bảo cho việc bắt cặp đặc hiệu

Tỷ lệ trung bình (G + C) là 50 - 60% sẽ cho nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ bắt cặp phù hợp cho phản ứng PCR thông thường.

Nhiệt độ nóng chảy, T_m là nhiệt độ mà tại đó một nửa sợi DNA là sợi đơn và một nửa còn lại là sợi đôi. T_m tùy thuộc vào thành phần base. Tỷ lệ (G + C) cao trong sợi DNA sẽ dẫn tới nhiệt độ nóng chảy cao vì chứa nhiều liên kết hydro.

Tính toán nhiệt độ nóng chảy

$$T_m = [59.9 + 0.41 * (\%GC) - 600] / \text{chiều dài}$$

$$\text{Với những primer } \leq 20 \text{ bases, } T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Ngoài ra còn có những phương pháp tính toán khác với độ chính xác cao hơn.

Nhiệt độ bắt cặp, T_a là nhiệt độ mà tại đó primer bắt cặp với DNA mục tiêu. T_a có thể được tính toán từ T_m

$$T_a = T_m - \text{primer} - 4^{\circ}\text{C}$$

Để đảm bảo primer bắt cặp vào DNA mạch khuôn trước khi hai sợi của DNA mạch khuôn hồi tính, cần đảm bảo yêu cầu $T_m - \text{sản phẩm} - T_a \geq 30^{\circ}\text{C}$

Tính ổn định: Môi với đầu 5' ổn định sẽ cho kết quả khuếch đại tốt nhất: giảm thiểu sự bắt cặp sai trên các đoạn đích chưa được biết đến.

Tính ổn định thấp của đầu 3' khó hình thành sợi đôi, không khởi đầu sự tổng hợp DNA. Trong khi đó, đầu 5' phải có khả năng hình thành sợi đôi bền vững.

Nguyên tắc

Trình tự của môi được thiết kế sao cho không có sự bắt cặp giữa môi xuôi và môi ngược, kể cả cấu trúc kẹp tóc.

Nhiệt độ gắn môi của môi xuôi và môi ngược không được chênh lệch quá xa (Không nên quá nhiều G hoặc C nối tiếp nhau thường tỷ lệ G, C nằm trong khoảng $30\% < (G + C) < 70\%$).

Không nên nhiều bắt cặp sai với DNA khuôn.

Các môi được chọn phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại không trùng với các trình tự lặp lại trên DNA.

Trình tự nằm giữa mỗi xuôi và mỗi ngược không quá lớn (< 3000 tốt nhất là dưới 1000 bp).

Mục đích thiết kế mỗi

Thiết kế mỗi dòng hóa (Cloning).

Thiết kế mỗi phát hiện (Detecting).

Thiết kế mỗi dòng hóa

Mỗi dòng hóa nhằm mục đích nhân bản một đoạn gen mục tiêu.

Sản phẩm của phản ứng PCR được giới hạn bởi 2 mỗi xuôi và ngược.

Vùng mở đầu và kết thúc của một gen phải được đảm bảo.

Yêu cầu đối với mỗi dòng hóa

Mỗi xuôi và mỗi ngược phải đảm bảo cho sản phẩm tối ưu nhất, đặc biệt đầu 3'.

Phải lưu ý đến nhiệt độ tách mạch trình tự, nhiệt độ giữa 2 mỗi không quá khác biệt và nhiệt độ của sản phẩm.

Thời gian của các chu trình phải đảm bảo sản phẩm được tổng hợp hoàn toàn.

Thiết kế mỗi phát hiện

Mỗi phát hiện nhằm mục đích phát hiện sự tồn tại của một trình tự nào đó.

Mỗi phát hiện phải được thiết kế trên một trình tự chuyên biệt cho một loài hay một nhóm loài quan tâm.

Yêu cầu đối với mỗi phát hiện

Tính chuyên biệt.

Thời gian của các chu trình vừa đủ để tổng hợp sản phẩm cần thiết.

Trình tự của sản phẩm phải vừa đủ cho sự chuyên biệt nhưng không quá dài.

Giải trình tự sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR sau khi thu nhận sẽ được gửi đi giải trình tự cả 2 chiều (chiều xuôi và chiều ngược) tại công ty Nam Khoa.

Sản phẩm PCR: ít nhất 10 μL mỗi sản phẩm PCR đối với một cặp mồi giải trình tự.

Mồi: cả 3 cặp mồi đều được sử dụng để giải trình tự. Mồi phải được pha trong nước cất 2 lần khử ion, không có muối, EDTA hay bất kỳ nhiễm tạp khác. Nồng độ của mỗi mồi là 10 μM với thể tích tối thiểu là 5 μL cho mỗi mẫu giải trình tự.

2.5. Kỹ thuật giải trình tự:

Dù chỉ mới được nghiên cứu từ thập niên 70 của thế kỉ XX, giải trình tự (sequencing – kỹ thuật xác định một phần hay toàn bộ trình tự nucleic acid của phân tử DNA) đã có những ứng dụng rộng rãi, đặc biệt trong dự đoán chức năng gene, các nghiên cứu nhân dòng phân tử hay các mối liên hệ tiến hoá, đa dạng sinh học cho công nghệ sinh học phân tử nói riêng và công nghệ sinh học nói chung.

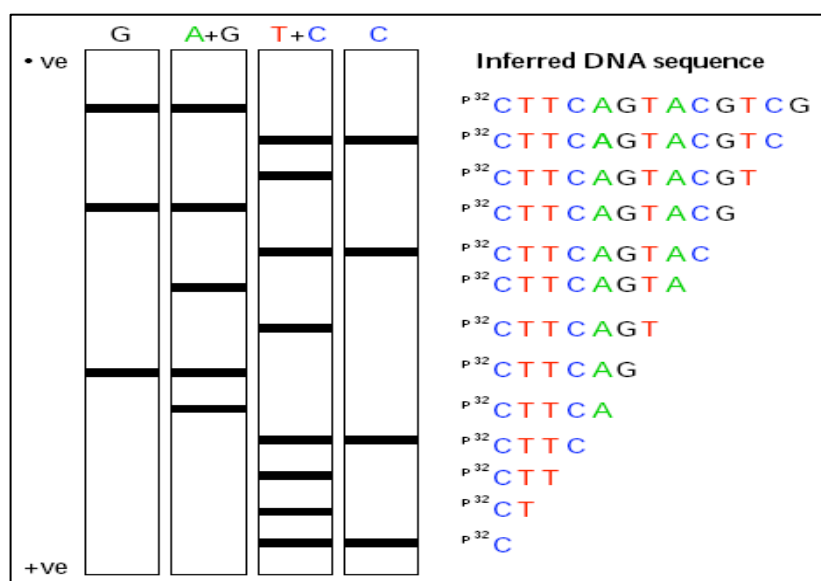
Xác định trình tự một đoạn DNA không chỉ là một bước quan trọng trong chiến lược giải mã toàn bộ gene mà còn được ứng dụng nhiều trong các nghiên cứu khác. Trong lĩnh vực định danh phân tử, nghiên cứu phát sinh loài thì chỉ cần phân tích xác định trình tự một vài gene chỉ thị (marker) giữa các loài cần khảo sát mà không cần thiết phải xác định trình tự toàn bộ bộ gene. Từ hai phương pháp giải trình tự chính là phương pháp hoá học của Maxam-Gilbert và enzyme học của Sanger (1977), các kỹ thuật giải trình tự dần được cải tiến cho đến ngày nay. Mặc dù có nhiều sự khác biệt giữa các phương pháp, nhưng cơ bản vẫn là thực hiện các phản ứng (dùng tác nhân hoá học hay enzyme xúc tác...) tạo ra tập hợp các đoạn oligonucleotide có chiều dài khác nhau mà nucleotide tận cùng các đoạn này có thể xác định được, sau đó phân tách các đoạn oligonucleotide bằng điện di trên gel polyacrylamide (PAGE) hay điện di mao quản (capillary electrophoresis) và xác định trình tự dựa trên tín hiệu huỳnh quang hay đánh dấu phóng xạ.

Phương pháp Maxam – Gilbert

Năm 1977, Maxam và Gilbert đã tìm ra cách giải trình tự DNA bằng phương pháp hoá học. Phương pháp này dựa vào sự thủy giải đặc trưng phân tử DNA cần xác định trình tự bằng phương pháp hoá học.

Đây là phương pháp sử dụng các tác nhân hoá học nhằm biến đổi các base xác định (mỗi chất được tiến hành trong một phân đoạn riêng) và cắt phân tử DNA đã được đánh dấu phóng xạ một đầu tại những vị trí đó. Tổ hợp các đoạn oligonucleotide có kích thước khác nhau sau khi cắt được điện di trên gel có độ phân giải cao (gel polyacrylamide), từ đó xác định vị trí của nucleotide đã đánh dấu trên phân tử DNA. Trình tự DNA hoàn chỉnh thu được sau khi tổng hợp kết quả tất cả các phân đoạn.

Để đọc kết quả trên bản phóng xạ tự ghi, đoạn DNA cần được đánh dấu một đầu (3' hoặc 5') bằng phóng xạ ^{32}P . Cả DNA mạch đôi hay mạch đơn đều có thể được giải trình tự theo phương pháp này, tuy nhiên cần đảm bảo chỉ một mạch được đánh dấu phóng xạ để đảm bảo kết quả đọc trình tự sau này.



Hình 2.4. Sơ đồ tóm tắt phương pháp hóa học của Maxam và Gilbert
(Brian Golding; Dick Morton, 2005)

Phương pháp Sanger (Dideoxynucleotide)

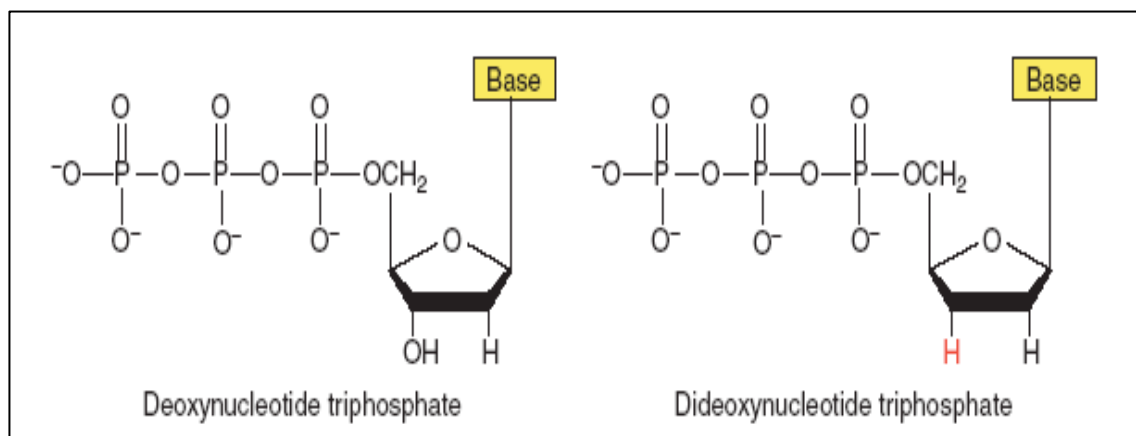
Cơ sở của phương pháp này là dựa vào sự tổng hợp mạch bổ sung *in vitro* cho một DNA mạch đơn bởi DNA polymerase (không có hoạt tính sửa sai).

Trong công bố năm 1975, Sanger và Coulson đã đề nghị phương pháp “plus and minus” dựa trên việc so sánh đồng thời hai loại phản ứng: bỏ bớt 1 loại nucleotide (minus) hay chỉ sử dụng 1 loại nucleotide cho phản ứng kéo dài mạch (plus). Về sau,

dideoxynucleotide (ddNTP) được phát minh và ông đã ứng dụng vào kỹ thuật giải trình tự (1977).

Phương pháp dideoxynucleotide sử dụng các ddNTP cùng với các dNTP thông thường làm cho quá trình tổng hợp dừng lại nếu ddNTP được sử dụng làm nguyên liệu tổng hợp mạch bổ sung. Bốn loại ddNTP được tiến hành độc lập trong bốn phân đoạn riêng, một trong bốn dNTP thường sẽ được đánh dấu phóng xạ để nhận biết mạch bổ sung. Kết quả thu được các đoạn oligonucleotide mà tận cùng đều cùng một loại ddNTP đã sử dụng. Các đoạn này được điện di trên gel polyacrylamide và đọc kết quả cả bốn phân đoạn trên bản phóng xạ tự ghi để xác định trình tự.

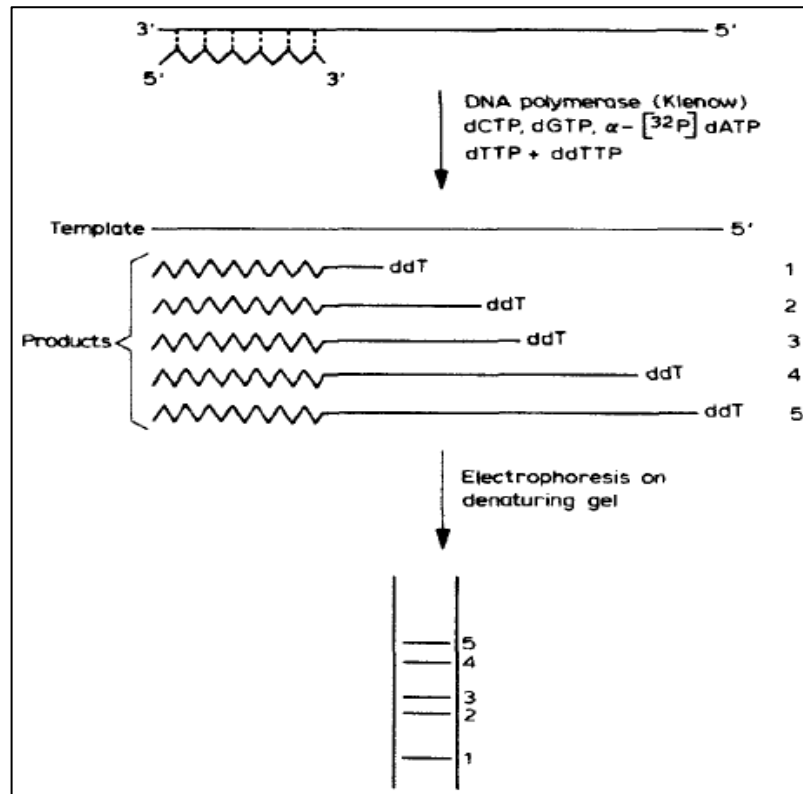
Dideoxynucleotide: là những nucleotide mà nhóm 3'-OH được thay thế bằng. Do không có nhóm 3'-hydroxyl nên nucleotide kế tiếp không thể gắn và tiếp tục kéo dài mạch, sự tổng hợp được dừng lại. Bởi vì ddNTP hiện diện chung với một lượng lớn các dNTP thông thường nên trước khi sự tổng hợp dừng do ddNTP, một số các dNTP đã được sử dụng trước, tạo nên một tập hợp các oligonucleotide với đầy đủ kích thước khác nhau để có thể đọc kết quả sau này.



Hình Error! No text of specified style in document..5. Hình ảnh mô tả cấu trúc của

dNTP và ddNTP

(Richard, 2004)



Hình 2.6. Nguyên lý của phương pháp dideoxynucleotide
(J. Hindley –DNA Sequencing)

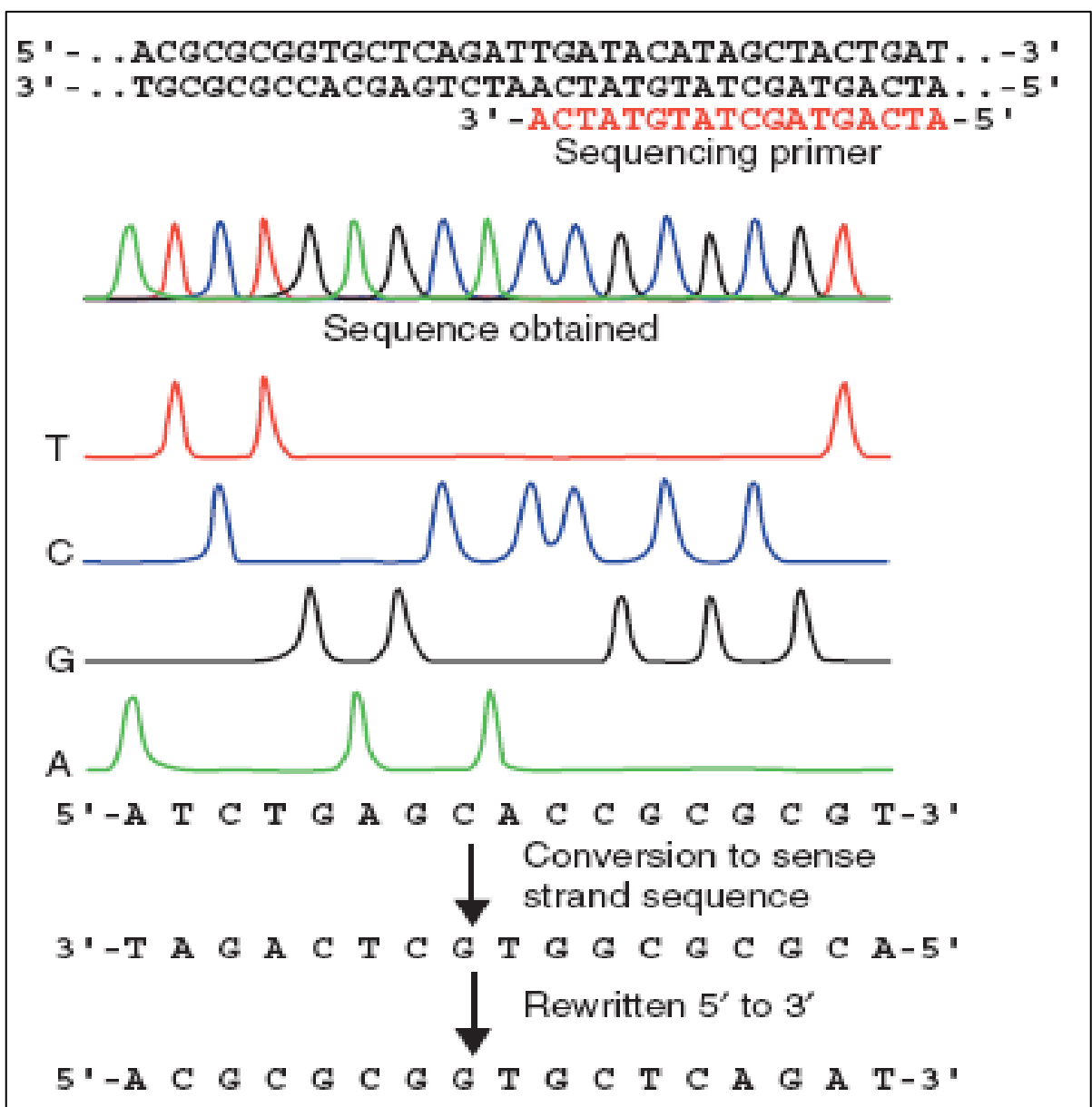
Một trong 4 loại dNTP được đánh dấu phóng xạ, bổ sung 1 loại ddNTP (ddTTP) cùng với các dNTP thường, sự tổng hợp sẽ dừng lại nếu ddTTP được sử dụng để kéo dài mạch. Bốn loại ddNTP được tiến hành ở bốn phân đoạn riêng.

Phương pháp đang được sử dụng phổ biến nhất hiện nay trong việc giải trình tự hiện nay đó là phương pháp giải trình tự bằng máy tự động. Cơ sở của những phương pháp này vẫn sử dụng các dideoxynucleotide, việc đánh dấu phóng xạ được thay bằng đánh dấu huỳnh quang trên các ddNTP hay môi (primer), và kết quả được đọc thông qua một hệ thống máy tính.

Khác với các phương pháp khác khi mà kết quả được đọc sau khi tiến hành xong điện di, phương pháp sử dụng máy tự động có một thiết bị thu nhận tín hiệu được đặt ở vị trí gần cuối bản điện di và tín hiệu huỳnh quang sẽ được thu nhận ngay khi phân tử DNA di chuyển qua vị trí đó. Phương pháp này có thể sử dụng kết hợp với PCR. Trong hệ thống giải trình tự tự động bằng ABI (Applied Biosystems Incorporated) mỗi loại ddNTP được đánh dấu với một loại thuốc nhuộm khác nhau (dye - labeled terminator), do đó chỉ cần chuẩn bị một hỗn hợp phản ứng, hay nhuộm cho môi (dye -

labeled primer), khi đó cần chuẩn bị bốn phản ứng cho mỗi loại mồi đã đánh dấu. Điện di trên gel polyacrylamide cũng chỉ cần chạy một lần. Với trường hợp hợp dùng thuốc nhuộm cho mồi, các phản ứng được gộp chung và vẫn chạy trên một lần duy nhất.

Mặc dù những cải tiến về mặt kỹ thuật và thuật toán nhằm cải thiện độ chính xác trong việc đọc trình tự tự động của máy đang được nghiên cứu tích cực, tuy nhiên tỷ lệ sai sót vẫn có thể xảy ra và khó có thể đọc chính xác tuyệt đối bằng phương pháp tự động. Khi một base bị đọc sai có thể dẫn đến nhiều sai lầm nghiêm trọng trong việc phân tích sau này. Do vậy, những biện pháp hiệu chỉnh lại trình tự cần được chính con người trực tiếp thực hiện nhằm khắc phục tối đa việc xác định sai trình tự.



Hình 2.7. Sơ đồ tóm tắt quy trình giải trình tự bằng máy tự động

(Richard, 2004)

2.6. Kỹ thuật hiệu chỉnh trình tự

Trình tự sau khi được xác định bằng hệ thống máy tự động (như ABI...) chưa thể sử dụng ngay cho việc phân tích. Việc đọc base tự động do các máy thực hiện (automated base - calling) có một tỷ lệ sai sót nhất định tùy theo phương pháp và loại máy sử dụng. Sự sai sót này xảy ra bởi cường độ tín hiệu huỳnh quang thu được không phải lúc nào cũng rõ ràng. Khoảng cách không đồng đều giữa các mũi tín hiệu cũng như sự chồng lấp các tín hiệu dẫn đến việc máy tính nhận và hiển thị sai kết quả. Hiện tượng này xảy ra do nhiều nguyên nhân như bản chất của trình tự khảo sát, sự nhiễm các mẫu DNA khi thực hiện, thao tác và loại phương pháp giải trình tự sử dụng.

Loại bỏ những tín hiệu không chính xác ở hai đầu trình tự

Đối với các tín hiệu ở đầu gần môi, tín hiệu thường lớn và biên độ không ổn định, các tín hiệu không rõ ràng. Với các tín hiệu gần cuối trình tự, cường độ rất thấp và không thể phân biệt rõ ràng các đỉnh. Việc đọc base ở vùng này hoàn toàn không đảm bảo được độ tin cậy và cần được loại bỏ.

Kiểm tra các sai lệch giữa hai kết quả giải trình tự

Thông thường, đoạn DNA khảo sát sẽ được giải trình tự hai chiều bởi mỗi xuôi và mỗi ngược. Việc này giúp giảm thiểu việc đọc sai base, những tín hiệu không rõ ràng trong trình tự khi đọc với mỗi xuôi có thể được giải quyết trong việc đọc với mỗi ngược và ngược lại. Do được đọc theo hai chiều nên một trong hai kết quả cần được chuyển đổi lại (reverse - complement) bằng phần mềm FinchTV trước khi tiến hành so sánh. Mức độ tương đồng và tìm sai lệch giữa hai kết quả giải trình tự (mỗi xuôi và mỗi ngược) được thực hiện bằng công cụ Dot plot trên phần mềm Sea View. Hai trình tự sau khi được sắp cột thẳng hàng (alignment) cần phải tương đồng nhau, những sai lệch thu được cho thấy các sai sót trong khi đọc base bằng máy tự động và cần được kiểm tra trực tiếp tại biểu đồ phát huỳnh quang (hiển thị nhờ phần mềm ChromaPro).

So sánh tín hiệu huỳnh quang ngay tại vị trí sai lệch giữa hai kết quả giải trình tự có thể xác định được đúng loại base nào tương ứng ở vị trí đó. Trong một vài trường hợp, các tín hiệu vẫn không thể phân biệt, những vị trí này sẽ được ghi nhận và xác nhận lại hoặc viết dưới dạng ký hiệu chung theo tiêu chuẩn IUPAC (IUPAC ambiguous nucleotide code).

Với những kết quả mà sự khác biệt khi sắp cột thẳng hàng quá lớn (sự tương đồng dưới 50%) do tín hiệu huỳnh quang ở rất nhiều vị trí không thể phân biệt được

(thường là do mẫu bị nhiễm các DNA khác làm cho nhiều trình tự được xác định cùng trên một thí nghiệm) khi đó các trình tự không thể được sử dụng để phân tích, việc hiệu chỉnh các trình tự này không còn ý nghĩa và độ tin cậy.

Các phần mềm và nguồn cơ sở dữ liệu được sử dụng hỗ trợ xử lý kết quả giải trình tự

Phần mềm Finch TV

FinchTV Geospiza là cách phổ biến để xem dấu hiệu các DNA tuần tự trên Linux, Mac OSX, Windows, và Solaris. FinchTV bắt đầu như việc chiếu sắc phổ có thể hiển thị toàn bộ bản vẽ trong nhiều khung hình chữ nhật. Phiên bản 1.4 của FinchTV cho biết thêm khả năng có thể vẽ biểu đồ bao gồm thiết lập hiệu chỉnh và trình chiếu đồ thị đã được hiệu chỉnh đó.

Phần mềm Seaview

SeaView: Phiên bản 4.2.12 (Manolo Gouy). SeaView là phần mềm miễn phí có tính năng hỗ trợ cho các phân tích tương đồng, sắp xếp cột thẳng hàng các trình tự.

2.7. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

2.7.1. Các nghiên cứu ngoài nước

Hướng nghiên cứu tìm kiếm các gene tạo mùi hương của hoa lan đã được một nhóm khoa học Đài Loan khởi xướng đầu tiên trên loài *Phaelenopsis* (Lan Hồ Điệp). Theo đó các tác giả đã dùng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, kết hợp genomics và bioinformatics để giải quyết bài toán. Họ đã tìm thấy gene genaryl diphosphate synthase (GDPS) liên quan chính đến việc sinh tổng hợp geraniol, linalool (là những chất tạo mùi hương chính trên cây khác. Hơn nữa gen này cũng được tìm thấy trên các loài thực vật khác như bạc hà, hoa mồm chó,...

Phát hiện ra gen sinh tổng hợp hương thơm từ Vanda Mimi Palmer bằng cách sử dụng phương pháp tiếp cận Expressed Sequence Tag (EST) (Seow - Ling Teh và cs, 2012) cho thấy các dữ liệu Vanda Mimi Palmer Expressed Sequence Tag (*VMPEST*) có giá trị tiềm năng trong việc thúc đẩy sinh học phân tử và tạo dòng nhiều gen trong việc sinh tổng hợp hương thơm và xúc tiến sự nghiên cứu mối liên hệ về gen tạo hương giữa Vanda với các loài lan khác.

Việc phân lập và mô tả đặc điểm phân tử của HMGRs thực vật đã được thực hiện trong cả hai cây một lá mầm và cây hai lá mầm chẳng hạn như *Arabidopsis thaliana*

(Dudareva et al., 2005), gạo (Ha, Lee, Kim, & Hwang, 2001), *Camptotheca acuminata* (Maldonado-Mendoza, Vincent, và Nessler, 1997), *Ganoderma lucidum* (Shang et al., 2008), và Hazel (Wang et al., 2007).

Phân lập, tạo dòng và phân loại hương thơm liên quan đến các sản phẩm phiên mã mã từ Vanda Mimi Palmer (Wai-Sun Chan và cs, 2011) nghiên cứu về việc phân lập các sản phẩm phiên mã có mùi hương từ Vanda Mimi Palmer (VMP) và xây dựng thông tin về gen tạo hương cho các loài lan thuộc loài Vanda đồng thời xây dựng việc xác định các hợp chất dễ bay hơi có mùi hương trong các chủng loại phong lan khác trong tương lai.

2.7.2. Các nghiên cứu trong nước

Nghiên cứu phá hệ các giống, loài lan (Orchidaceae) dựa trên phân tích các trình tự vùng ITS (Duyên, Ngôn, & Dũng, 2010), kết quả nghiên cứu cho thấy 5 loài Lan Hải *P. delenatii*, *P. concolor*, *P. paishii*, *P. hirsutissimu*, *P. primulium* có quan hệ họ hàng xa nhau về phân tích kiểu gene, mặc dù về hình thái chúng được xếp trong cùng một nhóm.

Nghiên cứu định danh phân tử cho Lan Hải Việt Nam dựa trên trình tự vùng ITS (Khuất Hữu Trung, 2013). Nghiên cứu này cho thấy mặc dù những giống có hình thái đặc trưng khác nhau, nhưng ở mức độ phân tử thì không khác biệt trong một loài. Tuy nhiên, còn quá sớm để đưa ra kết luận về khả năng sử dụng vùng ITS cho việc phân loại dưới mức loài.

Phương pháp nhân giống một số loại lan quý (TS Dương Tấn Nhựt). Lan hải và lan hồ điệp là hai loại lan khó nhân giống hiện nay trên thế giới. Các nhà khoa học đã và đang bước đầu đạt những kết quả khả quan. Kỹ thuật nuôi cấy bằng phương pháp tạo vết thương đối với cây lan hải và tạo mô sẹo đối với lan hồ điệp là những kỹ thuật mới tiên tiến, hy vọng nhiều, được ứng dụng trong thương mại nhân giống hai loại lan quý trên.

Hiện nay ở Việt Nam chưa có nhóm nghiên cứu nào đặt vấn đề nghiên cứu dò tìm các gen tạo hương ở loài lan. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho những hướng nghiên cứu tiếp theo. Căn cứ trên năng lực và cơ sở vật chất hiện có, chúng tôi tin tưởng rằng đề xuất của chúng tôi hoàn toàn khả thi cả về mặt khoa học và ý nghĩa kinh tế.

CHƯƠNG 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

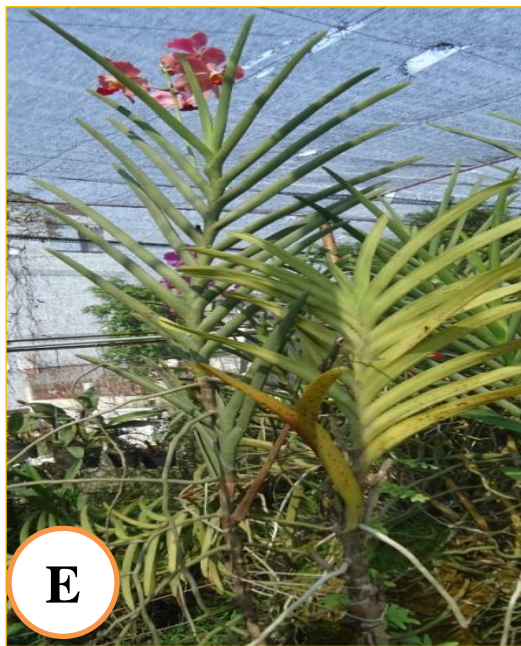
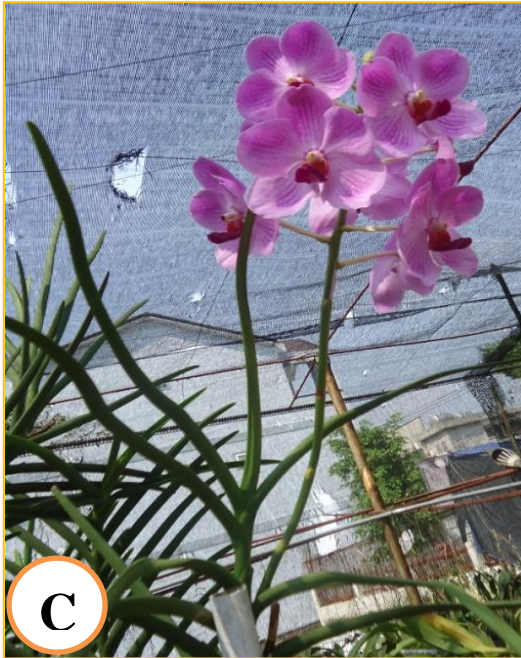
3.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ tháng 7 năm 2013 đến tháng 9 năm 2013 tại phòng Genome & Bioformatic – Viện kỹ thuật công nghệ cao NTT – ĐH Nguyễn Tất Thành.

3.2. Vật liệu nghiên cứu

Hình ảnh của một số loài lan sử dụng trong nghiên cứu thu thập được tại các vườn lan ở thành phố Hồ Chí Minh







Hình 3.1. Các mẫu lan *Vanda* được thu thập trong nghiên cứu

- (A) – *Vanda* Thủ Đức 1, (B) – *Vanda* Thủ Đức 2, (C) – *Vanda* Thủ Đức 3,
 (D) – *Vanda* Thủ Đức 4, (E) – *Vanda* Thủ Đức 5, (F) – *Vanda* Thủ Đức 6,
 (G) – *Vanda* Thủ Đức 7, (H) – *Vanda Tan Chay Yan*, (I) – *Vanda* Nhà Bè 1,
 (J) – *Vanda* Nhà Bè 2

3.3. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

Dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 3.1. Các dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

STT	Dụng cụ	STT	Dụng cụ
1	Kẹp gấp mẫu.	7	Ống đong 100mL và 1000mL.
2	Eppendorf 0.2, 0.3, 0.5, 1.5, 2mL.	8	Micropipette (pipetteman) các loại.
3	Cối, chày sứ hay thủy tinh.	9	Bình thủy tinh trung tính.
4	Ống Falcon.	10	Túi nylon chịu nhiệt.
5	Cốc thủy tinh các loại.	11	Bông thấm.
6	Khay đựng Eppendorf.	12	Hộp đựng đầu tuýp.

Thiết bị**Bảng 3.2.** Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Thiết bị	Hãng sản xuất	Code No
1	Tủ đông	ALASKA	BD_2099
2	Máy vortex	BIOCOTE	R800003199
3	Lò vi sóng	CANDY	38000179 11474340
4	Bộ điện di	CONSORT	102384EV245
5	Bàn đọc gel	CONSORT	E2723
6	Máy PCR	ESCO HEALTHCASE	MTP 022112509
7	Máy ủ nhiệt khô	HEATINGBLOCK	0402160127B008
8	Tủ cấy	HUY HOANG	475
9	Tủ sấy	LANGSHAN	0513-86511077
10	Cân kỹ thuật	OHAUS	B222969314
11	Nồi hấp vô trùng	STURDY	120718010-006
12	Tủ lạnh	TATUNG	TRA 0410A210142
13	Máy ly tâm	WISD	4039671240106

Hóa chất**Bảng 3.3.** Các dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Code No
1	CTBA	Bio Basic Inc	111028S108
2	Tris-HCl	Bio Basic Inc	10098SHLS0708B121L
3	EDTA	Bio Basic Inc	1101SHLS1206B110L
4	NaCl	Bio Basic Inc	1107NBUC21E2B1
5	β -mercaptoethanol	India	115616
6	Phenol	Scharlau	12403702
7	Chloroform	Chemsol	1010312
8	Isoamyl alcohol	Merck	1105
9	Isopropanol	Merck	UN1219
10	Nước cất 2 lần khử ion	CTCP DP TW2	60542
11	Taq DNA pol 2x-preMix	GeneOn	S113
12	TBE	Bio Basic Inc	111031BB024
13	Agarose	Bio Basic Inc	B0107BB013
14	Thang DNA (ladder)	Bio Basic Inc	M107R-1/M107-2
15	Loading buffer 6X	GeneOn	306-205
16	EtBr	Merck K GaA	1118850001

3.4. Phương pháp nghiên cứu

3.4.1. Phương pháp xử lý mẫu lá lan

Mẫu lá sau khi thu thập được rửa dưới vòi nước máy để loại bỏ bụi bẩn, sau đó rửa lại với nước cất. Tiếp theo mẫu được rửa bằng cồn 70⁰ để diệt khuẩn

3.4.2. Tách chiết DNA tổng số

Quy trình tách chiết

Các mẫu lan thu thập được sẽ được tách DNA tổng số bằng phương pháp có sử dụng CTAB và có một số cải tiến nhỏ. Sau đó DNA tổng hợp sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di trên gel agarose 1%. Mẫu DNA được yêu cầu sẽ được bảo quản trong điều kiện lạnh sâu (- 20°C) cho các nghiên cứu về sau.

Bước 1: Rửa mẫu:

- Dùng kẹp sắt gấp mẫu rửa dưới vòi nước máy.
- Lau thật kỹ mẫu bằng cồn 70%.
- Cho mẫu vào Falcon, có đánh kí hiệu rõ ràng.

Bước 2: Nghiền khoảng 1g mẫu lá trong 1.5mL đệm tách chiết đã được ủ ở 65°C trước đó và 2 μ L β -mercaptoethanol.

Bước 3: Chuyển dịch nghiền vào epp 1.5mL và đem ủ ở 65°C trong 20 phút (cứ 5 phút vortex 1 lần).

Bước 4: Li tâm tốc độ 13.000rpm (vòng/ phút) khoảng 10 phút.

Bước 5: Hút dịch nổi (khoảng 1mL) chuyển qua ống ep 2mL và thêm một lượng thể tích tương đương Phenol: Chlorofom: Isoamyl alcohol (25:24:1) và trộn đều khoảng 5 phút.

Bước 6: Li tâm tốc độ 13,000 rpm khoảng 10 phút.

Bước 7: Chuyển pha lỏng (khoảng 500mL) phía trên ống mới, thêm một lượng thể tích tương đương Chlorofom: Isoamyl alcohol (24:1) và trộn đều khoảng 5 phút.

Bước 8: Li tâm 13,000 rpm khoảng 10 phút.

Bước 9: Chuyển pha lỏng (khoảng 500mL) phía trên qua ống mới, thêm isopropanol lạnh với thể tích bằng 2/3 thể tích dịch nổi.

Bước 10: Ủ qua đêm ở -20°C .

Bước 11: Li tâm ở 13,000 rpm khoảng 30 phút và loại bỏ dịch nổi.

Bước 12: Cặn tủa được rửa lần lượt với 0.5mL ethanol 70% đến 100%.

Bước 13: Cặn tủa được để khô ở nhiệt độ phòng hoặc 37°C trong 30 phút.

Bước 14: Hòa cặn tủa trong 50mL nước cất 2 lần khử ion.

Bước 15: DNA tổng điện di cùng với thang chuẩn 100bp (1kb DNA ladder) trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 120V, cường độ dòng điện 65 mA trong 30 phút. Kết quả sẽ được hiển thị khi xem dưới tia UV có bước sóng 365 nm. Bằng cách chạy này, ta có thể kiểm tra sự có mặt của các băng DNA và chất lượng DNA của từng mẫu.

Bước 16: Trữ mẫu ở -20°C đến khi sử dụng.

3.5. Định tính DNA

DNA được định tính bằng phương pháp điện di

Điện di:

Nguyên tắc của phương pháp điện di dựa vào đặc tính cấu trúc của các nucleic acid. Nucleic acid là các đại phân tử tích điện âm, nên dưới tác động của dòng điện một chiều các đoạn DNA có khối lượng và kích thước khác nhau sẽ di chuyển trong điện trường từ cực âm sang cực dương.

Qui trình:

Bước 1: Cân 0.5g agarose cho vào 50mL TBE 0.5X, đặc vào lò vi sóng trong 2 - 3 phút.

Bước 2: Để nguội 45 - 50°C bổ sung Ethidium Bromide đạt nồng độ cuối là $1\mu\text{g}/\text{mL}$, đổ vào khuôn gel đã chuẩn bị sẵn.

Bước 3: Sau 20 - 30 phút, khi gel đã nguội và đông cứng thì chuyển khay chứa bản gel vào bể điện di và cho đệm chạy TBE 0.5X vào buồng điện di sao cho đệm ngập bản gel khoảng 0.5 - 1 cm, giằng lược bản gel quay về phía cực âm.

Bước 4: Tra mẫu: Sản phẩm DNA tổng số hay sản phẩm PCR được trộn với 1 μ L loading buffer và tra vào các giếng trên gel.

Bước 5: Chạy điện di: sau khi tra mẫu điện di xong, máy điện di kết nối với bộ nguồn. Đặt ở 120V, 30 - 60 phút.

Bước 6: Quan sát các DNA trên bản đọc gel bước sóng 365nm.

3.6. Phản ứng khuếch đại

Nguyên tắc

Phản ứng PCR được thực hiện trên cơ sở phản ứng sinh tổng hợp DNA, là phản ứng gồm nhiều chu kỳ nối tiếp nhau.

Mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

Bước 1: là giai đoạn biến tính (denaturation), nhiệt độ thường sử dụng là 94⁰C – 95⁰C.

Bước 2: là giai đoạn lai (hybridization), nhiệt độ dao động trong khoảng 40⁰C – 70⁰C.

Bước 3: là giai đoạn kéo dài (elongation hay extension), thường ở nhiệt độ 72⁰C.

Khếch đại vùng VMP-AAT

Mọi sử dụng trong phản ứng khuếch đại được cung cấp bởi hãng hăng SIGMA

Bảng 3.4. Thông tin về môi được sử dụng trong phản ứng PCR

Tên	Trình tự môi theo chiều 5'-3'	Đoạn DNA đích	Chiều phản ứng	Chiều dài sản phẩm khuếch đại dự kiến (bp)
VMPAAT Forward	5'-TCCTACATGGCCTCCTCTACACTCCAC-3'	AAT	Xuôi	1408
VMPAAT Reverse	5'-AGACGCATTAGAGAGCAGATTGAGCGCAG-3'	AAT	Ngược	1408
ATT-924-F	5'-ACACTAGGCGATGACGATCC-3'	AAT	Xuôi	170
ATT-1094-R	5'-AAGCTCCGCCGTACTIONAACA-3'	AAT	Ngược	170
ATT-227-F	5'-CAACGATTCCCTTTTCTCCA-3'	AAT	Xuôi	176
ATT-403-R	5'-CTGTGGTGCGGACTTATGTG-3'	AAT	Ngược	176

Các thành phần có trong phản ứng khuếch đại dùng môi AAT**Bảng 3.5.** Các thành phần trong phản ứng PCR

STT	Thành phần	Thể tích(μ L)
1	Taq DNA pol 2x-preMix	10
2	Môi AAT-F (5μ M)	0.5
3	Môi AAT-R (5μ M)	0.5
4	H ₂ O	8
5	DNA khuôn	Hiệu chỉnh
Tổng thể tích		20

Chu trình nhiệt

Bảng 3.6. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Tiền biến tính	95°C	1 phút	1
Biến tính	95°C	30 giây	} 30
Bắt cặp	67°C	2 phút	
Kéo dài	67°C	5 phút	1
Kết thúc	72°C	3 phút	1
Làm mát	4°C	∞	

Giải trình tự sản phẩm PCR

- Sản phẩm PCR sau khi thu nhận sẽ được gửi đi giải trình tự cả 2 chiều (chiều xuôi và chiều ngược) tại công ty Nam Khoa.

3.7. Hiệu chỉnh trình tự

Loại bỏ những tín hiệu không chính xác ở hai đầu trình tự.

Kiểm tra sai lệch giữa hai kết quả trình tự.

3.8. So sánh với cơ sở dữ liệu GeneBank

Sau khi hiệu chỉnh các sai lệch, trình tự liên ứng (consensus) được rút ra từ hai kết quả giải trình tự và kiểm tra các sai lệch. Trình tự liên ứng là trình tự chính xác cho đoạn DNA khảo sát. Tuy nhiên, kết quả này cần được kiểm tra một lần nữa trên cơ sở dữ liệu Nucleotide trên GeneBank bằng công cụ BLAST. Nếu có sai lệch giữa trình tự trên cơ sở dữ liệu và trình tự truy vấn thì cần được xem xét và kiểm tra lần nữa để xác nhận kết quả giải trình tự. Ngoài ra, việc thực hiện BLAST còn giúp kiểm tra sự nhiễm mẫu và đánh giá quá trình thu nhận và bảo quản mẫu.

CHƯƠNG 4

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

4.1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu sau khi thu thập tại vườn lan Thủ Đức về phòng thí nghiệm được xử lý với nước cất và cồn 70%, sau đó bảo quản ở 0 - 5°C để phục vụ cho việc tách DNA.

Dưới đây là bảng tổng kết chi tiết về các loài lan đã thu thập được

Bảng 4.1. Thông tin về các mẫu lan được thu thập

STT	Tên mẫu	Kí hiệu	Địa điểm thu thập
1	<i>Vanda</i> Thủ Đức 1	V1	Vườn lan Thủ Đức
2	<i>Vanda</i> Thủ Đức 2	V2	Vườn lan Thủ Đức
3	<i>Vanda</i> Thủ Đức 3	V3	Vườn lan Thủ Đức
4	<i>Vanda</i> Thủ Đức 4	V4	Vườn lan Thủ Đức
5	<i>Vanda</i> Thủ Đức 5	V5	Vườn lan Thủ Đức
6	<i>Vanda</i> Thủ Đức 6	V6	Vườn lan Thủ Đức
7	<i>Vanda</i> Thủ Đức 7	V7	Vườn lan Thủ Đức
8	<i>Vanda Tan Chay Yan</i>	V8	Vườn lan Nhà Bè
9	<i>Vanda</i> Nhà Bè 1	V9	Vườn lan Nhà Bè
10	<i>Vanda</i> Nhà Bè 2	V10	Vườn lan Nhà Bè

Trên đây là bảng thông tin chi tiết về các mẫu lan đã thu thập. Bên dưới là hình ảnh mẫu lá đã xử lý của 10 mẫu lan *Vanda* thu thập được tại thành phố Hồ Chí Minh.



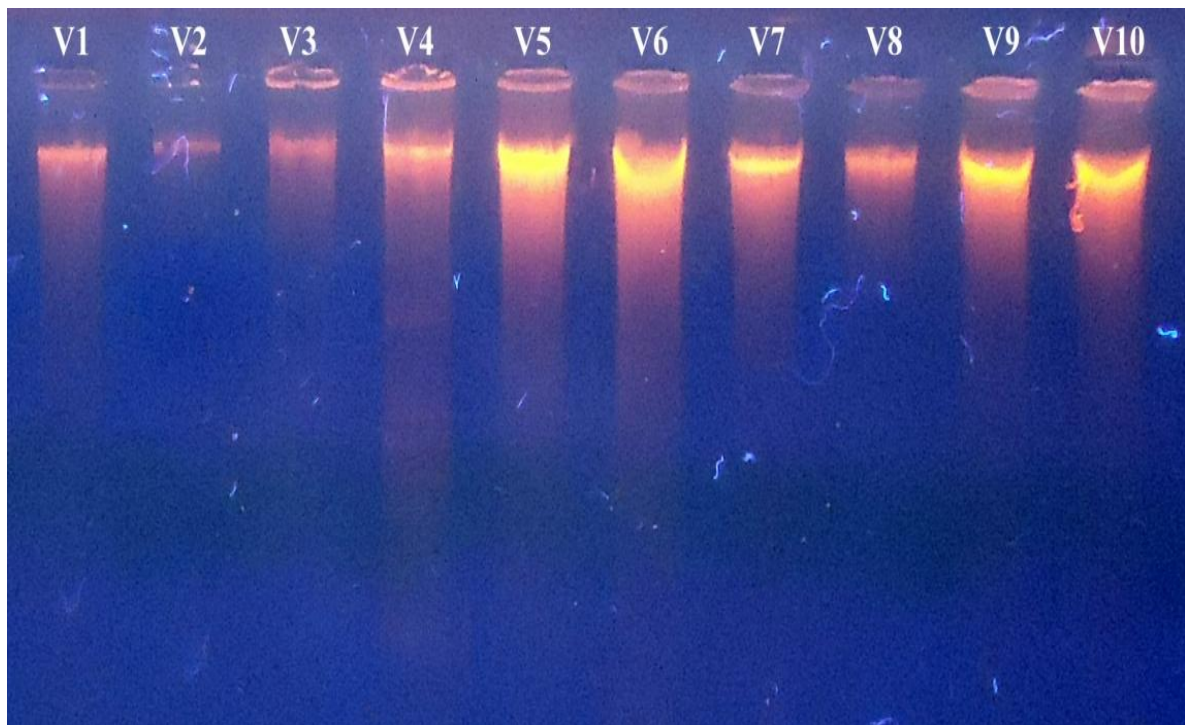


Hình 4.1. Mẫu lá lan *Vanda* sau khi xử lý

(A) – *Vanda* Thủ Đức 1, (B) – *Vanda* Thủ Đức 2, (C) – *Vanda* Thủ Đức 3,
 (D) – *Vanda* Thủ Đức 4, (E) – *Vanda* Thủ Đức 5, (F) – *Vanda* Thủ Đức 6,
 (G) – *Vanda* Thủ Đức 7, (H) – *Vanda* Tan Chay Yan, (I) – *Vanda* Nhà Bè 1,
 (J) – *Vanda* Nhà Bè 2

4.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số.

Kết quả tách chiết DNA tổng số của các mẫu lan được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% thể hiện ở hình 4.2 cho thấy quá trình tách chiết DNA tổng số của 10 mẫu đều dương tính. Các băng của từng mẫu có độ sáng khác nhau trên bản gel khi soi dưới tia UV.



Hình 4.2. Kết quả điện di DNA tổng số của 10 mẫu lan *Vanda*

Băng DNA của các mẫu lan từ V1 đến V10 có vệt sáng đậm chứng tỏ lượng DNA thu được nhiều. Đồng thời, băng DNA kéo dài trên băng điện di cho thấy DNA thu được bị đứt gãy khá nhiều. Lượng DNA trong các mẫu trên không tương đồng với nhau và bị smear nhiều. Để các nghiên cứu tiếp theo được thuận lợi, chúng tôi pha loãng các mẫu DNA sao cho kết quả ở tất cả các mẫu tương ứng với nhau, có sự tương đương về kích thước và độ sáng và dùng làm mẫu cho các phản ứng khuếch đại trong bước nghiên cứu tiếp theo.

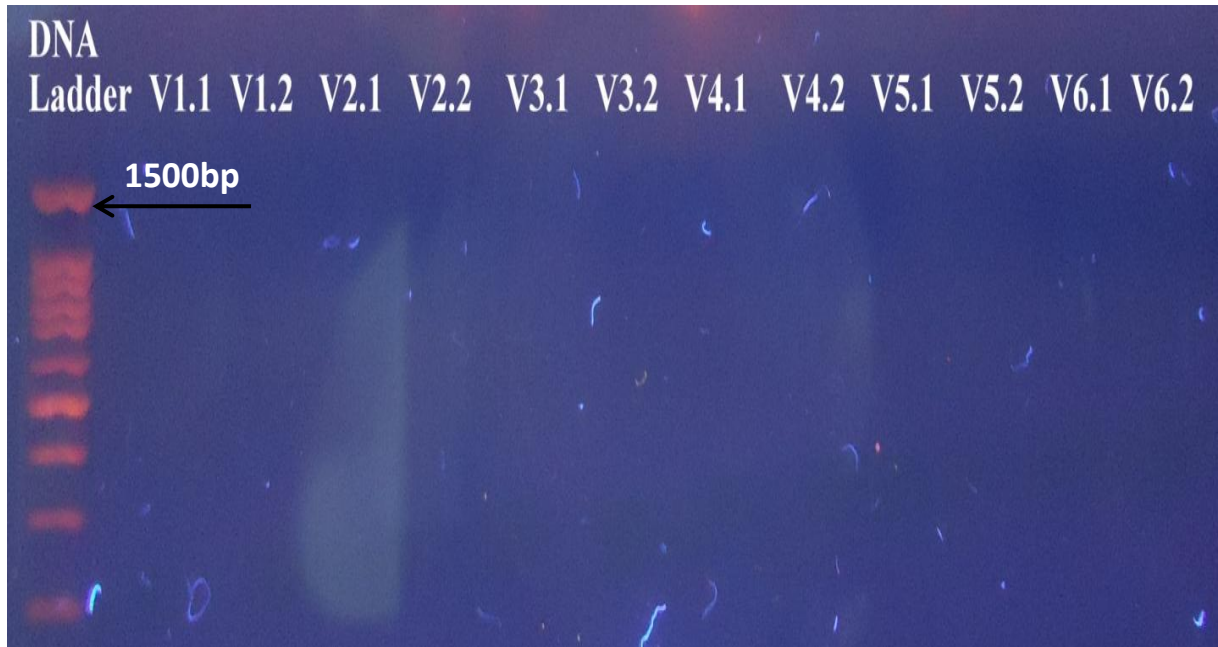
4.3. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT bằng kỹ thuật PCR

4.3.1. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu lan *Vanda* bằng kỹ thuật PCR lần 1

Kết quả tiến hành khuếch đại vùng VMP-AAT với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được như sau:

Bảng 4.2. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại vùng VMP-AAT

STT	Thành phần	Thể tích (μL)
1	Taq DNA pol 2x-preMix	10
2	Môi AAT-F (10 μM)	0.5
3	Môi AAT-R (10 μM)	0.5
4	H ₂ O	8
5	DNA khuôn	1
Tổng thể tích		20

**Hình 4.3.** Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT của các mẫu lan *Vanda* (V1- V6)**Hình 4.4.** Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT của các mẫu lan *Vanda* (V7 – V10)

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện trên gel agarose 1% qua sự xuất hiện các băng DNA với kích thước mong muốn khi đặt trên bản soi UV. Sản phẩm PCR của các mẫu sẽ được tải vào các giếng cùng với một giếng chứa DNA ladder. Sau điện di, các băng sáng xuất hiện trên giếng tải DNA marker sẽ dùng làm thang đo cho các sản phẩm PCR. Mỗi băng sáng sẽ biểu diễn cho các đoạn DNA có khối lượng phân tử khác nhau. Hai băng sáng liên tiếp cách nhau khoảng 100 bp, băng nhỏ nhất (nằm dưới cùng) có kích thước 100 bp, băng lớn nhất có kích thước 1500 bp (1,5 kb).

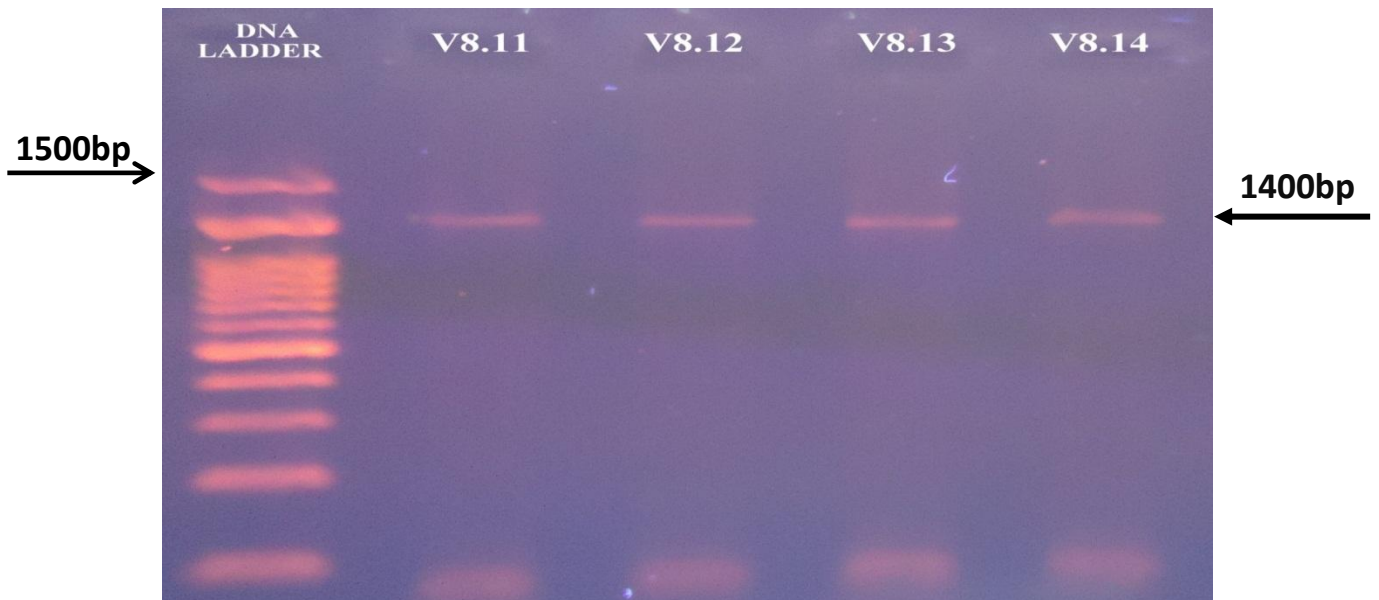
Sau khi chạy phản ứng PCR của 10 mẫu *Vanda* với cặp mồi VMP-AAT ta thấy V8.1 và V8.2 xuất hiện vệt sáng ở khoảng 1400bp chứng tỏ trong DNA của V8.1 và V8.2 có chứa đoạn gen tạo hương. Tuy nhiên, có thể do DNA mẫu của V8.2 được pha loãng 10 lần nên xuất hiện vệt sáng mờ hơn V8.1 (mẫu DNA gốc). Các mẫu còn lại không xuất hiện vệt sáng, chứng tỏ trong các DNA đó không mang đoạn gen tạo hương. Do đó, chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR lần 2 của mẫu V8.1.

4.3.2. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu *Vanda* bằng kỹ thuật PCR lần 2

Kết quả tiến hành khuếch đại vùng VMP-AAT với chu trình nhiệt và thành phần phản ứng được như sau.

Bảng 4.3. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại vùng VMP-AAT

STT	Thành phần	Thể tích (μL)
1	Taq DNA pol 2x-preMix	10
2	Mồi AAT-F (10 μM)	0.5
3	Mồi AAT-R (10 μM)	0.5
4	H ₂ O	8
5	DNA khuôn	1
Tổng thể tích		20

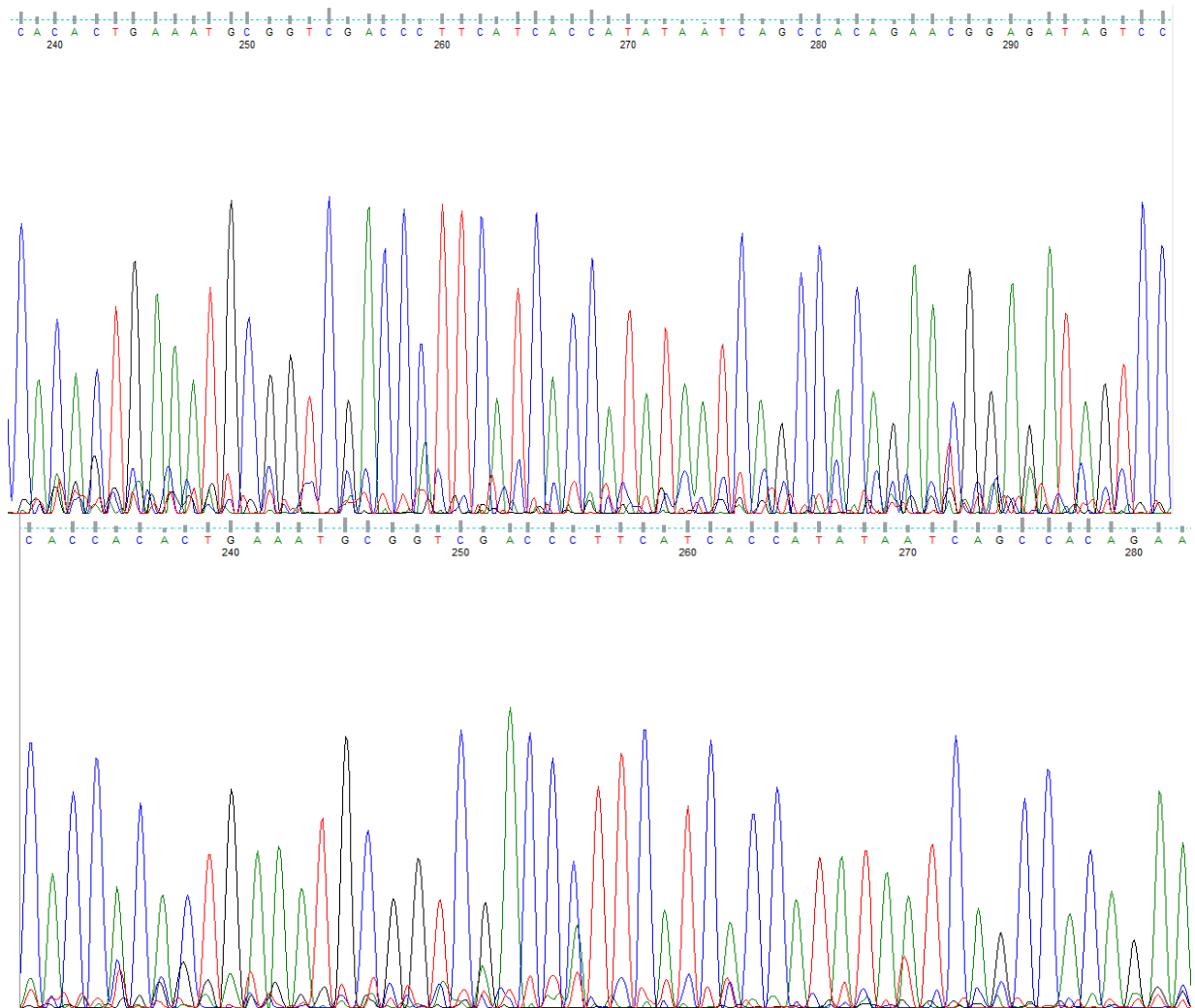


Hình4.5. Kết quả khuếch đại vùng VMP-AAT các mẫu *Vanda*

Kích thước vùng gen AAT được khuếch đại với cặp mồi VMPAAT-F và VMPAAT-R khoảng 1400bp nên khi đối chiếu với DNA marker, nếu sản phẩm nằm ngang với băng DNA có kích thước 1400bp trên DNA marker và băng DNA sáng rõ, chiều rộng của băng lớn thì xem như phản ứng khuếch đại thành công và có thể sử dụng các sản phẩm PCR để giải trình tự.

Kết quả giải trình tự 1 mẫu lan *Vanda* được nhận dưới dạng các biểu đồ huỳnh quang. Dựa vào biểu đồ huỳnh quang trình tự vùng VMP-AAT, có thể chia thành ba nhóm trường hợp sau:

Trường hợp 1: Cả 2 mạch DNA đều có thể sử dụng để hiệu chỉnh.

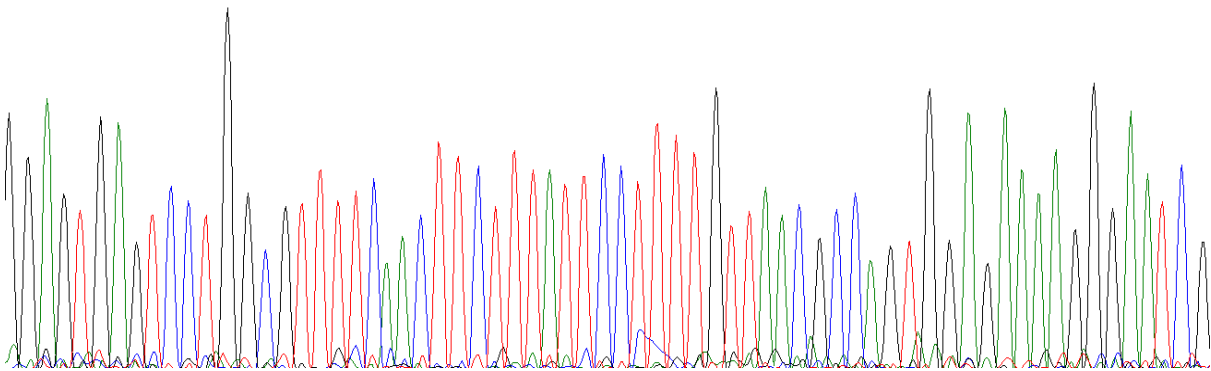
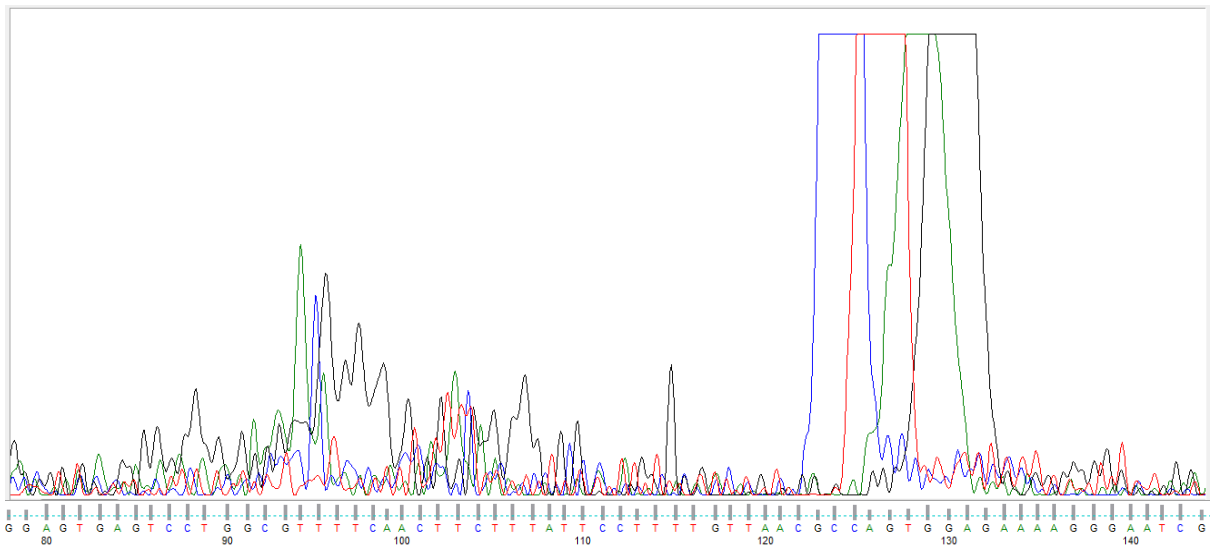


A = adenine, T = Thymine, C = Cytosine, G = Guanine

Hình 4.6. Trường hợp trình tự DNA có thể hiệu chỉnh trên cả 2 mạch

Đây là nhóm có tín hiệu huỳnh quang rõ trên cả hai kết quả đọc bằng mỗi xuôi và mỗi ngược và có thể hỗ trợ nhau để suy ra trình tự chính xác nhất cho đoạn DNA đã khuếch đại (Hình 4.6)

Trường hợp 2: Chỉ một mạch có thể sử dụng để hiệu chỉnh.

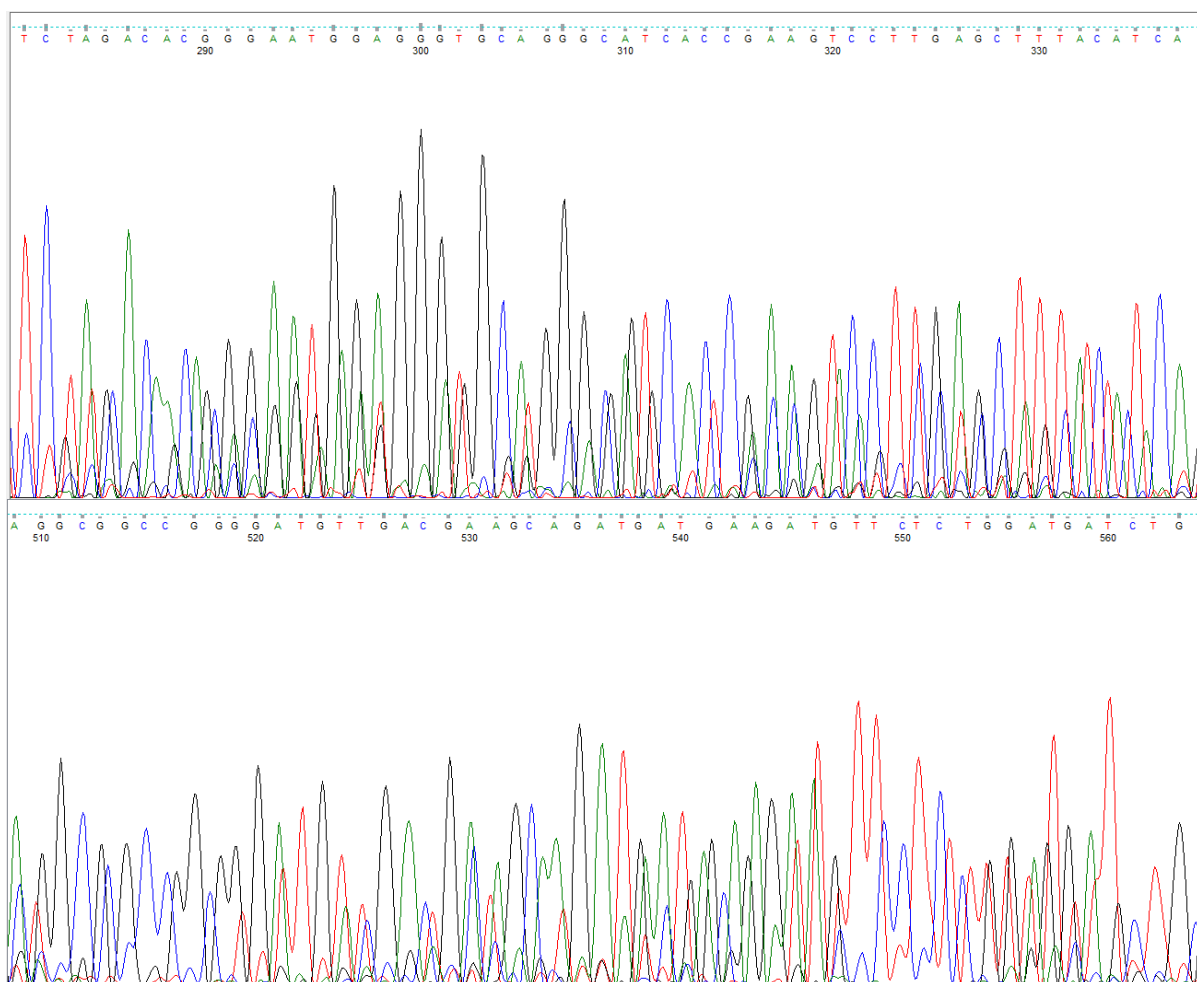


A = Adenine, T = Thymine, C = Cytosine, G = Guanine

Hình 4.7. Trường hợp trình tự DNA chỉ có thể hiệu chỉnh trên một mạch

Nhóm này có tín hiệu rõ trong kết quả đọc với một môi nhưng lại có tín hiệu xấu trong kết quả đối với môi còn lại (Hình 4.7). Ví dụ, mạch giải trình tự với môi xuôi có các đỉnh huỳnh quang không thể phân biệt được, tín hiệu trùng lấp lên nhau nhưng mạch được giải bằng môi ngược lại cho tín hiệu rất rõ ràng nên vẫn có thể thu được trình tự chính xác nhờ vào hiệu chỉnh trên mạch này. Để có thể thu được một cách chính xác, cần giải lại trình tự cho mạch tín hiệu huỳnh quang xấu.

Trường hợp 3: Cả 2 môi đều không giải được.



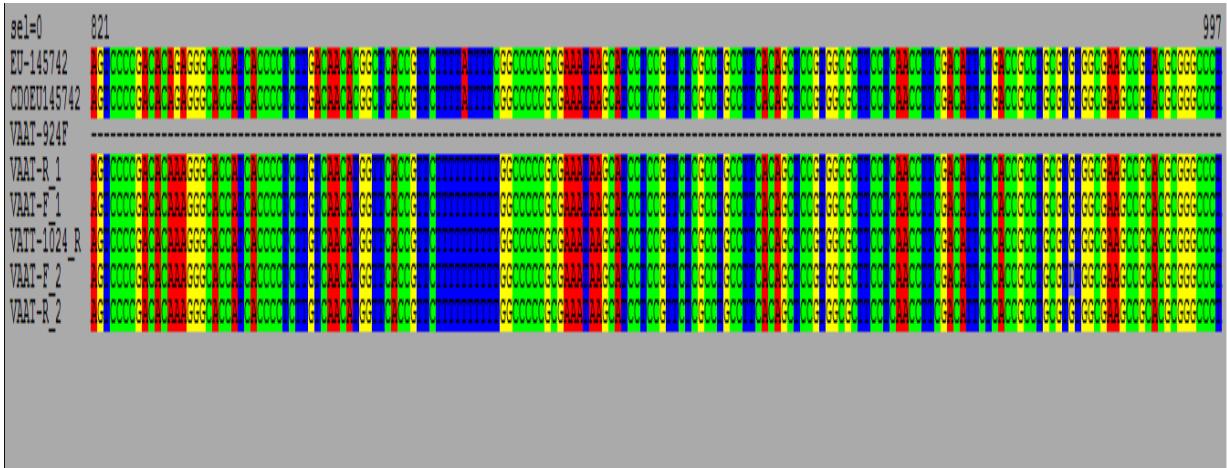
A = Adenine, T = Thymine, C = Cytosine, G = Guanine

Hình 4.8. Trường hợp trình tự DNA không thể hiệu chỉnh trên cả hai mạch

Nhóm này có các tín hiệu huỳnh quang không rõ ràng ở cả hai kết quả đọc trên môi xuôi và môi ngược (Hình 4.8). Các đỉnh tín hiệu chồng lấp lên nhau trên toàn bộ trình tự nên không thể phân biệt được các base. Đồ thị Dot plot không tạo được đường chéo phản ánh sự tương đồng giữa hai kết quả giải trình tự. Với các mẫu này hoàn toàn không thể hiệu chỉnh được, do đó không thể dùng để phân tích và cần được loại bỏ. Các mẫu rơi vào trường hợp này phải cho giải lại trình tự bằng cả hai môi xuôi và ngược. Nếu cần thiết phải thực hiện lại phản ứng PCR để thu thêm sản phẩm mới. Đối với trường hợp này, mẫu phải được đem gửi để giải trình tự lại với cả hai môi xuôi và ngược và cũng cần cẩn thận hơn trong thao tác lấy mẫu trước khi đem giải trình tự để kết quả được tốt hơn.

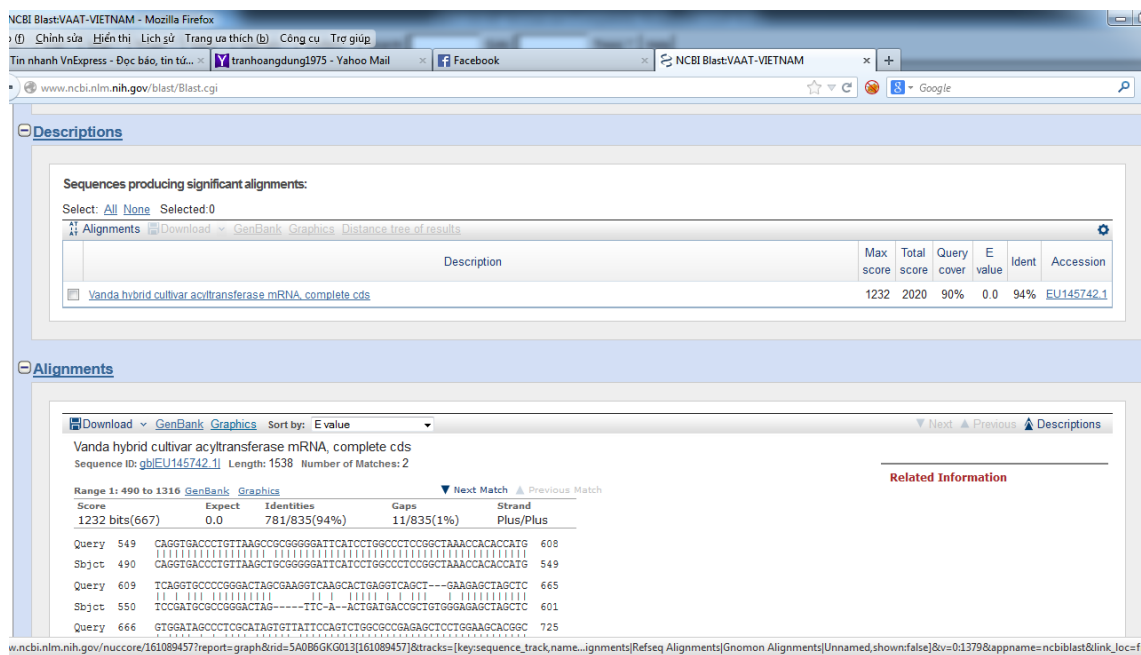
Nguyên nhân các trường hợp tín hiệu bị nhiễu có thể do sản phẩm PCR bị nhiễm tạp hoặc do môi không được tinh sạch.

Kết quả sau khi chỉnh trình tự, từ 4 phản ứng, thu được trình tự liên ứng dài 1408 nucleotide. Các trình tự được sắp giống cột thẳng hàng bằng phần mềm SeaView.



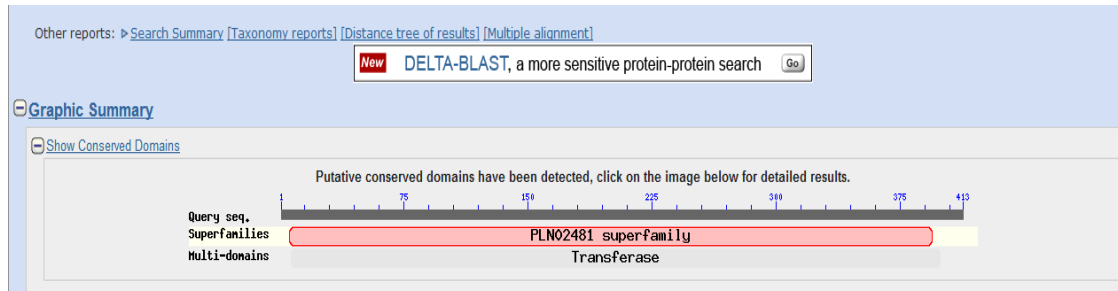
Hình 4.9. Kết quả giống cột thẳng hàng trên SeaView

So sánh trình tự tương đồng trên Genbank bằng công cụ Blast cho thấy gene khuếch đại và giải mã thuật sự là gene AAT của *Vanda*.



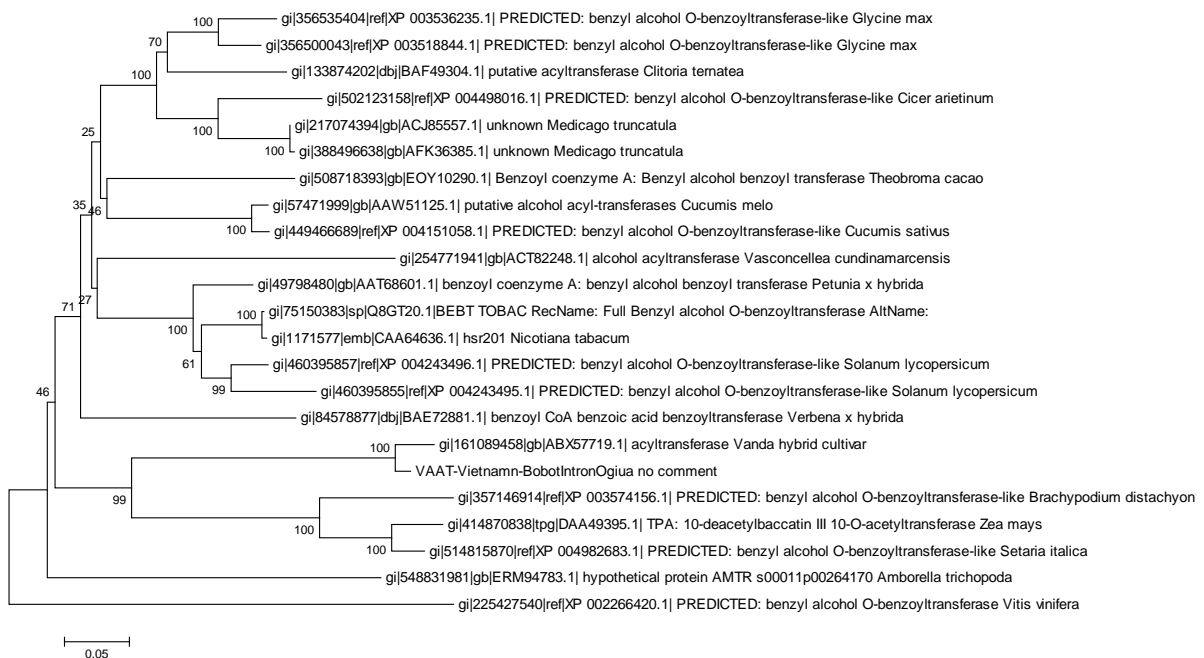
Hình 4.10. Kết quả so sánh trình tự trên Genebank

Sử dụng trình tự nucleotides thu được, chúng tôi dịch mã sang protein sử dụng bảng mã tiêu chuẩn, trình tự amino acid thu được được dò tìm trình tự tương đồng bằng công cụ Blast cho thấy trình tự thu được mã hóa cho 1 protein giả định thuộc họ transferrase



Hình 4.11. Kết quả dò tìm trình tự tương đồng bằng công cụ Blast

Phân tích phát sinh chủng loài dựa trên trình tự amino acid cho thấy trình tự của chúng tôi thật sự là AAT của *Vanda*. Cây phát sinh chủng loài dựng bằng trình tự amino acid suy luận từ trình tự nucleotides thu được bằng phần mềm MEGA 5.2.2.



Hình 4.12. Cây phát sinh chủng loài xây dựng bằng phần mềm MEGA 5.2.2

CHƯƠNG 5

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ kết quả thu được chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

- Thành thạo một số thao tác cơ bản trong sinh học phân tử như: kỹ thuật lấy mẫu và bảo quản mẫu, tách chiết DNA, điện di, kỹ thuật PCR, một số phương pháp giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự.
- Đã tách và thu nhận được DNA tổng số của 10 mẫu lan
- Nhân bản thành công một phần đoạn gene AAT của lan *Vanda Tan Chay Yan* bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi VMPAAT-F/VMPAAT-R.
- Giải trình tự hai chiều thành công đối với mẫu *Vanda Tan Chay Yan*
- Phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy trình tự gene đi giải thực sự là gene AAT của *Vanda*

5.2. Kiến nghị

- Vì đề tài chỉ thực hiện trong thời gian ngắn nên chỉ giải thành công trình tự của lan *Vanda Tan Chay Yan*. Nếu có thêm thời gian sẽ giải lại trình tự của lan *Vanda Tan Chay Yan* để có kết quả tốt hơn và giải trình tự của 9 mẫu lan còn lại.
- Nếu có thời gian sẽ thu thập thêm mẫu lá của nhiều loại lan khác nhau để nghiên cứu nhiều hơn về đoạn gene tạo hương ở lan.
- Nên tách chiết DNA từ mẫu lá ngay sau khi thu nhận được để đảm bảo chất lượng DNA thu được là tốt nhất.
- Cần cẩn thận hơn và hạn chế sai sót trong các thao tác thực hiện để hạn chế tối đa việc nhiễm bẩn và lẫn tạp trong sản phẩm thu được.
- Mở rộng thêm các hướng nghiên cứu khác về ứng dụng gene có hương của lan như: cấy ghép đoạn gene có hương vào vi sinh vật, thực hiện nhân dòng thu sinh khối để phục vụ cho công nghiệp mỹ phẩm, công nghiệp chế tạo mùi hương nhân tạo...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, 279 trang.
2. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo dục, 301 trang.
3. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2011. *Thực hành Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Đại học Khoa Học Tự Nhiên Tp. Hồ Chí Minh, 36 trang.
4. Khuất Hữu Thanh, 2006. *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 221 trang.
5. Nguyễn Hoàng Lộc, Lê Việt Dũng và Trần Quốc Dung, 2009. *Giáo trình công nghệ DNA tái tổ hợp*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh, 243 trang.
6. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, 219 trang.
7. Trần Hợp, 1993. *Phong lan có hương thơm*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
8. PGS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc, TS. Trần Thị Lệ - ThS. Hà Thị Minh Thi, 2007. *Giáo trình Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Đại học Huế.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

1. Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D, 2004. *Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds*. Plant Physiol 136:2641-2651.
2. Ha SB, Lee BC, Lee DE, Kuk YI, Lee AY, Han O, Backm K, 2002. *Molecular characterization of the gene encoding rice allene oxide synthase and its expression*. Biosci Biotechnol Biochem,66:2719-2722.
3. Tijet N, Schneider C, Muller BL, Brash AR, 2001. *Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids*. Arch Biochem Biophys,386:281-289.
4. Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC, 2005. *Odorant regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers*. Plant Cell, 17:1612-1624.
5. Tholl D, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, Pichersky E, Dudareva N, 2004. *Formation of monoterpenes in Antirrhinum majus and Clarkia breweri*

flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. Plant Cell, 16(4):977-992.

6. Uniprot [<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>]
7. TAIR [http://www.arabidopsis.org/help/helppages/go_slim_help.jsp]
8. taiwanorchid_1 [<http://bioinfo.taiwanorchid.net/~paxton/est/keyword.php>]
9. taiwanorchid_2 [<http://bioinfo.taiwanorchid.net/~paxton/est/index2.html>]
10. Interpro [<http://www.ebi.ac.uk/interpro>]
11. PaL [<http://www.taiwanorchid.net/PaL/>]