

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**THIẾT LẬP QUY TRÌNH ĐIỆN DI PROTEIN SDS– PAGE
VÀ ỨNG DỤNG ĐÁNH GIÁ PHẢN ỨNG CỦA CÂY LÚA
ĐỐI VỚI THUỐC SINH HỌC KÍCH KHÁNG**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 – 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ NGUYỄN PHÚC SƠN

Thành Phố Hồ Chí Minh
9/2007

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000**

**THIẾT LẬP QUY TRÌNH ĐIỆN DI PROTEIN SDS- PAGE
VÀ ỨNG DỤNG ĐÁNH GIÁ PHẢN ỨNG CỦA CÂY LÚA
ĐỐI VỚI THUỐC SINH HỌC KÍCH KHÁNG**

**Giáo viên hướng dẫn:
TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN**

**Sinh viên thực hiện:
LÊ NGUYỄN PHÚC SƠN**

Thành Phố Hồ Chí Minh
9/2007

LỜI CẢM TẠ



Để có được thành quả ngày hôm nay, trước tiên, con xin cảm ơn bố mẹ và gia đình đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để con có thể yên tâm học tập, nghiên cứu và hoàn thành tốt luận văn này.

TÔI CHÂN THÀNH CẢM ƠN

Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh
Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh
Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh
Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

Đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian thực tập để hoàn thành khóa luận tốt nghiệp này.

TÔI TRÂN TRỌNG BIẾT ƠN

Thầy Lê Đình Đôn đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện giúp đỡ chúng tôi hoàn thành khóa luận này.

Thầy Bùi Cách Tuyên, thầy Bùi Minh Trí đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực tập tại Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường.

Anh Nguyễn Văn Lãm đã nhiệt tình chỉ dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Các anh chị ở, Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường.

Các anh chị ở Bộ môn Bảo vệ Thực vật, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Các thành viên lớp Công nghệ Sinh học 29 đã đồng viên, giúp đỡ chúng tôi trong thời gian thực tập.

TÓM TẮT

Đề tài “Thiết lập quy trình điện di protein SDS- PAGE và ứng dụng đánh giá phản ứng của cây lúa đối với thuốc sinh học kích kháng” do Lê Nguyễn Phúc Sơn thực hiện từ 15/03/2007 đến 31/08/2007 tại bộ môn Bảo vệ Thực vật, khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh và phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Đề tài là một hướng nghiên cứu phát triển của phương pháp sinh học phân tử trong điều kiện phòng thí nghiệm, mà bước đầu là hoàn thiện phương pháp SDS- PAGE áp dụng trên protein của lá lúa.

Quy trình trải qua các giai đoạn:

1. Chuẩn bị mẫu lá lúa
2. Ly trích protein của lá lúa
3. Điện di SDS- PAGE mẫu protein ly trích được từ lá lúa.

Tóm lại, đề tài này đã thiết lập được quy trình SDS- PAGE trên đối tượng là protein của lá lúa nhưng vẫn chưa hoàn thiện được quy trình ở mức độ protein có độ tinh sạch cao. Kết quả trong đề tài này là cơ sở ban đầu trong việc hoàn thiện phương pháp phân tích proteomics để phục vụ cho những nghiên cứu ứng dụng trong công tác bảo vệ thực vật.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	iii
TÓM TẮT	iv
MỤC LỤC	v
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	viii
DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ CÁC BẢNG.....	ix
Chương 1 MỞ ĐẦU.....	1
1.1 Đặt vấn đề	1
1.2 Mục đích.....	2
1.3 Yêu cầu.....	2
Chương 2 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1 Vài điều sơ lược về cây lúa.....	3
2.1.1 Nguồn gốc và phân bố.....	3
2.1.2 Đặc điểm hình thái của lúa.....	3
2.1.3 Đặc điểm hạt lúa.....	5
2.1.4 Điều kiện để hạt lúa nảy mầm.....	5
2.1.4.1 Nước.....	5
2.1.4.2 Nhiệt độ.....	5
2.1.4.3 Không khí.....	6
2.2 Một số phương pháp tách chiết protein tổng số từ thực vật.....	6
2.2.1 Quy trình có sử dụng SDS	7
2.2.2 Quy trình có sử dụng phenol.....	7
2.2.3 Quy trình có sử dụng PMSF.....	8
2.3 Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide	8
2.3.1 Sơ lược về lịch sử gel polyacrylamide và sự phát triển của phương pháp điện di trên gel polyacrylamide.....	8
2.3.2 Gel polyacrylamide	9
2.3.3 Phương pháp SDS- PAGE	10

2.3.4 Nhuộm gel sau khi điện di	11
2.3.5 Một số yếu tố cần quan tâm trong điện di trên gel polyacrylamide.....	13
2.3.6 Phương pháp điện di hai chiều.....	14
2.4 Một số nghiên cứu liên quan đến điện di protein SDS- PAGE	16
2.4.1 Nghiên cứu trong nước	16
2.4.2 Nghiên cứu ngoài nước	17
Chương 3 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH.....	18
3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài.....	18
3.2 Hóa chất và vật liệu dùng trong thí nghiệm	18
3.2.1 Thuốc sinh học	18
3.2.2 Hóa chất dùng trong ly trích.....	18
3.2.3 Hóa chất điện di	19
3.2.4 Trang thiết bị thí nghiệm.....	19
3.3 Phương pháp tiến hành nghiên cứu.....	19
3.3.1 Chuẩn bị mẫu và lấy mẫu.....	19
3.3.1.1 Chuẩn bị mẫu lúa	19
3.3.1.2 Xử lý thuốc và lấy mẫu	20
3.3.2 Ly trích protein tổng số từ lá lúa.....	21
3.3.2.1 Các bước ly trích protein theo quy trình có sử dụng SDS	21
3.3.2.2 Các bước ly trích protein theo quy trình có sử dụng phenol.....	21
3.3.2.3 Các bước ly trích protein theo quy trình cải tiến có dụng SDS	22
3.3.3 Điện di kiểm tra mẫu protein đã ly trích	23
3.3.3.1 Chuẩn bị hóa chất.....	23
3.3.3.2 Chuẩn bị mẫu và chạy điện di	24
3.3.3.3 Tiến hành điện di và xem kết quả	24
3.3.4 Thí nghiệm khảo sát chọn điều kiện điện di	25
3.3.5 Khảo sát nồng độ gel.....	25
3.3.6 Điện di các mẫu protein để kiểm tra phản ứng của cây lúa đối với thuốc sinh học kích kháng.....	26

Chương 4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27
4.1 Kết quả ly trích protein tổng số.....	27
4.2 Kết quả khảo sát chọn điều kiện điện di	29
4.3 Ảnh hưởng của nồng độ gel đến kết quả điện di.....	30
4.4 Đánh giá phản ứng của lúa đối với thuốc sinh học	32
4.4.1 Kết quả điện di của tất cả các mẫu protein trong 12 nghiệm thức.....	32
4.4.2 Kết quả điện di mẫu protein của lúa ở lô II.....	33
4.4.3 Kết quả điện di mẫu protein của lúa ở lô III	34
Chương 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	35
5.1 Kết luận	35
5.2 Đề nghị	35
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	36

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

2- DE	Two- dimensional electrophoresis
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	ammonium persulfate
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DTT	Dithiotheitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IEF	Isoelectric focusing
KDa	kilo Dalton
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RADP	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS– PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STS	Sequence Tagged Site
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamide
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TE	Tris – EDTA
w/v	Weight for volume

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ CÁC BẢNG

Hình 2.1 Hình thái cây lúa (<i>Oryza sativa</i> L.).....	4
Hình 2.2 Cấu trúc protein trước và sau khi làm biến tính bởi SDS	11
Hình 3.1 Lúa mầm trong hộp nhựa 2 ngày	20
Hình 4.1 Kết quả điện di SDS– PAGE mẫu protein ly trích của các quy trình	28
Hình 4.2 Kết quả khảo sát điều kiện điện di phù hợp với protein lá lúa.....	30
Hình 4.3 Kết quả điện di SDS– PAGE các mẫu protein khảo sát nồng độ gel.....	31
Hình 4.4 Kết quả điện di SDS– PAGE các mẫu protein của lúa trong 6 nghiệm thức (<i>nghiệm thức 1, 2, 3, 4, 5 và 6</i>).....	32
Hình 4.5 Kết quả điện di SDS– PAGE các mẫu protein của lúa trong 6 nghiệm thức (<i>nghiệm thức 4, 5, 6, 7, 10 và 11</i>).....	32
Hình 4.6 Kết quả điện di SDS– PAGE các mẫu protein của lúa trong 5 nghiệm thức (<i>nghiệm thức 5, 8, 9, 10 và 12</i>).....	32
Hình 4.7 Kết quả điện di SDS– PAGE mẫu protein ly trích từ lô II.....	33
Hình 4.8 Kết quả điện di SDS– PAGE mẫu protein ly trích từ lô III	34
Bảng 3.1 Bảng bố trí phân lô thí nghiệm theo nghiệm thức	20
Bảng 3.2 Thời gian xử lý thuốc trước khi lấy mẫu theo từng nghiệm thức	21
Bảng 3.3 Thí nghiệm khảo sát điều kiện điện di.....	25

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Lúa là cây lương thực quan trọng, là nhu cầu không thể thiếu đối với con người, đặc biệt ở các nước Châu Á. Việt Nam với đặc điểm khí hậu nhiệt đới gió mùa, mưa nhiều, ẩm độ cao, rất thích hợp cho việc trồng lúa. Mặt khác người Việt Nam còn có truyền thống canh tác cây lúa từ rất lâu đời. Trước đây, với điều kiện vật chất còn thiếu thốn, lương thực không đủ ăn người ta chỉ có nhu cầu được ăn no. Hiện nay với mức sống người dân ngày càng được nâng cao thì ngoài nhu cầu ăn no, việc ăn ngon, có dinh dưỡng cao đã dần trở nên là nhu cầu quan trọng đối với mọi người. Nhưng hiện nay các bệnh trên cây trồng ngày càng hoành hành dữ dội, gây cản trở trong sản xuất và phát triển ngành nông nghiệp.

Ngày nay, với những thành công lớn trong công nghệ sinh học trên thế giới cũng như trong nước, định hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong công tác bảo vệ thực vật đã có sự chuyển hướng rõ rệt. Trước hết là những đầu tư rất lớn để khai thác và ứng dụng công nghệ sinh học trong việc phòng trừ nấm bệnh, sâu rầy hại, virus, cỏ dại và các loại côn trùng gây hại trong sản xuất nông nghiệp. Theo đó hướng ứng dụng công nghệ sinh học trong nghiên cứu các chế phẩm sinh học có bản chất là các polyamin đang ngày càng phát triển. Đây là một hướng nghiên cứu mới có thể trở thành một công nghệ sạch trong phòng trừ sâu bệnh hại ở nước ta nếu được đầu tư phát triển.

Cùng với những thành công lớn trong công nghệ sinh học thì các kỹ thuật về sinh học phân tử đã ra đời như phương pháp Southern blot, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RADP (Randomly Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), STS (Sequence Tagged Site), PCR (Polymerase Chain Reaction), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tạo nên một sự chuyển biến rõ rệt trong các hướng nghiên cứu về acid nucleic. Tuy nhiên các phương pháp sinh học phân tử

trên chỉ có thể tập trung nghiên cứu về gen và cấu trúc gen mà không thể cho ta biết được sự biểu hiện của gen. Đó là nguyên nhân dẫn đến sự ra đời của các phương pháp như sắc ký lỏng cao áp (HPLC), SDS- PAGE, Western blot, 2- D PAGE. Về nguyên tắc thì chúng có mối liên hệ với nhau và là cầu nối cho nhau. Trong đó, phương pháp SDS- PAGE được xem là một kỹ thuật đơn giản mà đem lại hiệu quả cao và có nhiều ứng dụng trong sinh học phân tử.

Trong phạm vi cho phép chúng tôi thực hiện đề tài: **“Thiết lập quy trình điện di protein SDS- PAGE và ứng dụng đánh giá phản ứng của cây lúa đối với thuốc sinh học kích kháng”**.

1.2 Mục đích

Thiết lập quy trình ly trích protein tổng số từ lá lúa.

Sử dụng phương pháp điện di protein SDS- PAGE xác định phản ứng của cây lúa đối với thuốc sinh học kích kháng.

1.3 Yêu cầu

Ly trích được protein tổng số từ lá lúa.

Hoàn thiện kỹ thuật điện di SDS- PAGE trên protein của lúa.

So sánh xem sự khác biệt về protein tổng số giữa mẫu lúa không xử lý thuốc polyamin với mẫu lúa xử lý thuốc polyamin ở nồng độ khác nhau.

So sánh sự khác biệt về protein của các mẫu lúa có xử lý thuốc polyamin với nồng độ và thời gian tác động khác nhau.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Vài điều sơ lược về cây lúa

2.1.1 Nguồn gốc và phân bố

Lúa là loại thực vật được canh tác từ rất lâu đời. Về nguồn gốc của lúa trồng chưa được hiểu rõ ràng và có nhiều ý kiến khác nhau. Hiện nay trên thế giới có hai cây lúa trồng. Lúa trồng *Oryza sativa* được thuần hóa ở Châu Á, nên được gọi là lúa trồng Châu Á. Lúa trồng *Oryza glaberrima* được thuần hóa ở Châu Phi nên được gọi là lúa trồng Châu Phi (Bùi Huy Đáp, 1999).

Các nhà khảo cổ học Mỹ cho rằng lúa trồng xuất hiện rất sớm cách đây khoảng hơn 9 – 10 nghìn năm. Nhiều nhà khảo cổ học khác cho là lúa trồng xuất hiện cách đây 6.000 năm, lúa trồng châu Phi (*Oryza glaberrima*) đã xuất hiện cách đây 3.500 năm. Còn một số tác giả khác cho là lúa trồng châu Phi xuất hiện rất muộn, chỉ sau công nguyên, cách đây khoảng 1.800 – 1.900 năm. (Bùi Huy Đáp, 1999)

Về mặt phân bố thì cây lúa là loài thực vật có diện tích phân bố khá rộng, loài *O. sativa* phân bố kéo dài từ vĩ độ 35 độ Nam đến 50 độ Bắc trên 110 quốc gia. Diện tích gieo trồng chiếm khoảng 10% diện tích đất nông nghiệp trên thế giới (144 triệu ha). Lúa gạo được trồng từ độ cao bằng mực nước biển đến độ cao 3.000 m so với mực nước biển. Lúa được trồng từ vùng ôn đới đến vùng nhiệt đới. Lúa gạo có thể được trồng trên nhiều loại đất khác nhau đất chua, đất kiềm, đất nhiễm phèn.

Những dòng lúa có thể được phân chia thành 3 nhóm sinh thái, Indica (ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới), Javanica (được trồng ở Indonesia) và Japonica (vùng ôn đới). Có hai dòng được canh tác nhiều nhất là Indica và Japonica. (Bùi Huy Đáp, 1999).

2.1.2 Đặc điểm hình thái của lúa

Lúa trồng là cây thân thảo, hệ thống rễ chùm, sống hằng năm, có thời gian sinh trưởng thay đổi tùy theo giống lúa, vụ trồng, nơi trồng và các điều kiện sinh thái thời gian trồng kéo dài trong khoảng từ 75 – 250 ngày.

Thân cao từ 70 – 150 cm, một số giống lúa nổi có thân cao 2 – 3 m, hay 5 – 6 m (lúa nổi ở Bangladesh). Đốt thân nhẵn và cách nhau bởi những lóng dài, ngắn khác nhau. Phiến lá thẳng hình đều, đầu lá nhọn, bề mặt phiến lá và mép lá đều ráp. Bẹ lá có thìa lia, lá địa hình mũi mác hay chẻ đôi, các đầu chẻ đều nhọn.

Lúa thường tạo ra thành nhiều nhánh (dảnh lúa: tillers), bao gồm cọng và lá có hoặc không có bông (panical). Nhánh bậc 1 xuất hiện từ những đốt gần thân chính và nhánh bậc hai, bậc ba xuất hiện từ những nhánh bậc một này. Lá mọc liên tiếp trên thân bao gồm bẹ lá bao lấy thân và phiến lá. Cổ lá nối giữa phiến lá và bẹ lá có một lưỡi bẹ và 2 thìa lia từ cổ lá. Bông mọc trên đốt trên cùng của thân từ bên trong lá cò và mang nhiều hoa trong một bông con. Cụm hoa là một chùm thưa, thẳng, hẹp, đầu hơi cong xuống, dài 15 – 30 cm hoặc dài hơn. Hoa nhỏ hình thuôn dài, mày hoa thuôn dài hình mũi mác, hoa màu hồng vàng hay màu tím, có hoa lưỡng tính, tự thụ phấn. Hoa có 6 nhị đực mảnh, bao phấn dài, bầu hoa có vòi, nhụy ngắn và hai đầu nhụy có lông tơ [11].



Hình 2.1: Hình thái cây lúa (*Oryza sativa* L.)

Về cơ bản, lúa là cây thích nghi với điều kiện có nước. Ba giai đoạn chính trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa theo viện nghiên cứu quốc tế IRRI là: (i) Giai đoạn tăng trưởng: từ khi gieo hạt cho đến khi cây lúa làm đòng. (ii)

Giai đoạn sinh sản: từ khi lúa làm đòng đến khi lúa trở bông. (iii) Giai đoạn lúa chín: từ khi lúa trở bông đến khi lúa chín. (Võ Tòng Xuân, 1986)

2.1.3 Đặc điểm hạt lúa

Hạt lúa là một loại quả, thuộc loại quả dĩnh. Hình thái và màu sắc của hạt lúa tùy giống lúa. Lúa tiên (Indica) có hạt dài còn lúa cánh (Japonica) thì có hạt tròn. Đa số hạt lúa có màu vàng sáng, một số có màu vàng sẫm hoặc nâu đen như nếp cẩm. (Lê Minh Triết, 2003)

Về cơ bản thì cấu trúc hạt lúa gồm: Vỏ trấu gồm trấu trên và trấu dưới. Cám gồm biểu bì, quả bì và chủng bì (nucellus). Phôi nhũ gồm có lớp aleuron và phôi nhũ tích tụ tinh bột. Mầm cây gồm có phôi (mầm) lá, phôi rễ và trụ phôi giữa ở phần dưới của hạt.

Hạt lúa là noãn sào thụ tinh đã chín, có hai mày trấu nhỏ trên và dưới, hai vỏ trấu trên và dưới, cuống trấu ở phần dưới của hạt và đuôi ở chót hạt (ngắn hoặc dài). Một hạt lúa có trọng lượng từ 12 – 44 mg ở 0% ẩm độ.

2.1.4 Điều kiện để hạt lúa nảy mầm

2.1.4.1 Nước

Hạt lúa sau khi thu hoạch và phơi khô tồn trữ, có chứa một lượng nước nhất định, dưới 14% trọng lượng khô. Hạt muốn nảy mầm được thì lượng nước trong hạt phải đạt khoảng 22 – 25%. Do đó cần phải ngâm hạt trước khi ủ giống để hạt hút đủ lượng nước cần thiết. Thời gian ngâm hạt lâu hay mau tùy thuộc vào nhiệt độ của nước ngâm và không khí, tùy hạt giống mới hay cũ. Nhiệt độ không khí cao, nước ấm và vỏ hạt mỏng thì hạt hút nước nhanh, không cần ngâm quá lâu, hạt hút nhiều nước, hòa tan, làm tiêu hao chất dự trữ trong hạt, đồng thời làm hạt bị chua, nấm bệnh dễ phát triển, hạt dễ bị thối và nảy mầm yếu. (Võ Tòng Xuân và ctv, 1986)

2.1.4.2 Nhiệt độ

Hạt lúa nảy mầm thích hợp ở nhiệt độ 30 – 35⁰C. Nhiệt độ cao trên 40⁰C hoặc thấp hơn 17⁰C hạt khó nảy mầm, nếu kéo dài có thể làm hư mầm. Vì vậy sau khi ngâm, cần ủ hạt ở nhiệt độ thích hợp. Mưa dầm hoặc mùa lạnh hạt khó nảy mầm nên cần ủ kỹ. Có thể tưới thêm nước ấm để làm tăng nhiệt độ ủ nếu cần thiết. Trong

quá trình ủ cần trộn đều đồng ủ hoặc xóc trở cho nhiệt độ phân phối đều thì hạt mới mọc đều. (Võ Tòng Xuân và ctv, 1986)

2.1.4.3 Không khí

So với nhiều loại hạt giống khác thì hạt lúa khi nảy mầm cần ít oxi hơn, nhưng không thể thiếu. Nếu để ngập trong nước sâu 15 cm, hạt lúa cũng có thể nảy mầm được. Nhưng trong điều kiện thiếu oxi thì mầm lúa nhú ra trước và vươn dài hơn, rễ sẽ ít và mọc chậm. Vì sự phát triển của rễ lúa cần nhiều oxi hơn, do đó, muốn điều khiển không cho rễ ra dài, ta cứ đem hạt ngâm trong nước, ngược lại, ta tiếp tục ủ và thường xuyên trộn cho hạt đủ oxi, rễ sẽ ra đều và khỏe. Ngâm ủ giống không tốt thì tỉ lệ mọc mầm thấp, mọc mầm không đều, ảnh hưởng xấu đến sự phát triển cây lúa ngay từ đầu, lúa phát triển không tốt. (Võ Tòng Xuân và ctv, 1986)

2.2 Một số phương pháp tách chiết protein tổng số từ thực vật

Trong các nghiên cứu sinh học phân tử về protein bước đầu đều phải tách chiết cho được protein tổng số để tiến hành những thí nghiệm tiếp theo. Vấn đề quan tâm ở đây là làm sao thu nhận được đủ lượng protein và các protein thu được giữ được trạng thái nguyên vẹn, không bị ảnh hưởng bởi các tác nhân lý hóa.

Thường thì việc tách chiết protein trải qua một số bước cơ bản sau.

1. Phá vỡ vách tế bào và giải phóng protein. Protein nằm trong tế bào chất của tế bào nên phải phá vỡ màng tế bào để giải phóng protein. Bước này thông thường được thực hiện bằng cách nghiền mẫu đồng thời thêm một số hóa chất xúc tác phá vỡ màng tế bào như 2–mecaptoethanol.

2. Loại bỏ thành phần không mong muốn trong mẫu. Ở bước này thường là thêm một số muối để làm dung môi hòa tan protein như sodium chlorid, sodium phosphate.

3. Tủa protein và thu nhận protein ở dạng khô. Bước này thường được tiến hành khi đã thực hiện xong các bước cơ bản trong ly trích. Lúc này protein đang được hòa tan trong dung môi, khi thêm các chất tủa protein như acetone, amonium sulfate sau đó đem ly tâm sẽ thu được protein dưới dạng cô đặc. Phơi khô và thêm chất bảo quản để giữ protein tránh khỏi sự phân hủy của các enzyme.

Về cơ bản thì việc tách chiết protein tổng số phải trải qua những bước trên. Nhưng với những đối tượng khác nhau thì sẽ có những quy trình tách chiết cụ thể khác nhau. Vì vậy, trong nghiên cứu để có được quy trình tách chiết protein tổng số ổn định, cần tiến hành nhiều thử nghiệm khác nhau từ đó rút ra quy trình thích hợp với đối tượng cần nghiên cứu. Dưới đây là một số quy trình tách chiết protein.

2.2.1 Quy trình có sử dụng SDS (Samuel S.M.Sun, 1994)

1. Nghiền 0,2 g mẫu lá với 1 ml dung dịch ly trích (0,25 M NaCl, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 0,05M sodium phosphate pH 7,5) thành dịch lỏng.
2. Chuyển dịch nghiền vào một eppendorf 1,5 ml, và ly tâm với tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.
3. Sử dụng pipette hút dịch nổi vào một eppendorf 1,5 ml mới; tránh hút lớp lipid ở trên cùng.
4. Ly tâm dịch nổi với tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.
5. Tiếp tục hút dịch nổi vào một eppendorf khác.
6. Thêm vào 500 μ l acetone 80%, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4⁰C.
7. Đổ bỏ dịch thu nhận kết tủa, trữ mẫu protein ở độ 4⁰C cho tới khi sử dụng.

2.2.2 Quy trình sử dụng phenol (Hurkman và Tanaka, 1986)

1. Nghiền 1g mẫu lá tươi trong nitơ lỏng thành bột mịn.
2. Thêm 2,5 ml Tris- phenol pH 8,8 và 2,5 ml dịch ly trích (0,1 M Tris-HCl pH8,8, 10 mM EDTA, 0,4% 2- mercaptoethanol, 0,9 M sucrose). Tiếp tục nghiền mẫu trong 30 giây, sao đó chuyển dịch nghiền vào trong ống Falcon 15 ml. Pha loãng dịch mẫu với tỉ lệ 1:5 trong dịch ly trích và phenol pH 8,8.
3. Vortex hỗn hợp dung dịch trong ống Falcon đến khi đồng nhất.
4. Ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4⁰C.
5. Loại bỏ phenol và thêm vào 2,5 ml dịch ly trích và 2,5 ml phenol. Vortex cho hỗn hợp đồng nhất. Ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4⁰C.
6. Loại bỏ phenol, thêm 5 ml 0,1 M amonium acetate trong methanol 100% (trữ mẫu ở -20⁰C).

7. Vortex và ủ mẫu ở -20°C trong 1 giờ hoặc qua đêm. Thu kết tủa bằng cách ly tâm 20.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C .

8. Rửa kết tủa với 0,1 M amonium acetate trong methanol, tiếp tục rửa với acetone 80%, và cuối cùng là rửa với ethanol 70%. Mỗi lần rửa như vậy thì ủ mẫu ở -20°C trong 15 phút. Sau đó đổ bỏ dịch và thu kết tủa.

9. Thêm acetone 80% chứa 10 mM DTT. Trữ -80°C cho tới khi sử dụng.

2.2.3 Quy trình có sử dụng PMSF (Fan shuguo, 2002)

1. 1 g mẫu được nghiền trong cối, lọc và giấy lọc.

2. Đưa vào dung dịch như sau (100 mM/l Tris- HCl , 4 M/l EDTA, 0,5 M/l DTT và 1 M/l PMSF).

3. Mẫu được chuyển sang ống Falcon 15 ml và ly tâm với vận tốc 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút.

4. Hút lấy dịch nổi chuyển sang ống Falcon 50 ml và thêm vào 40 ml acetone.

5. Ly tâm để loại bỏ EDTA, lipid, đường saccharide.

6. Ly tâm mẫu với vận tốc 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. Loại bỏ acetone, thêm vào 40 ml acetone khác. (*Chú ý có thể thêm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để cho kết tủa*).

7. Lặp lại 3 lần loại bỏ acetone như trên sau đó lấy phần tủa.

8. Thêm acetone vào trộn đều.

9. Hút dịch và chuyển vào eppendorf 1,5 ml sau đó ly tâm vận tốc 16.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 20 phút.

10. Loại bỏ acetone, giữ kết tủa trong tủ ẩm 37°C trong 5 phút để phơi khô.

11. Pha kết tủa lại với 1x TE và sử dụng.

2.3 Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide

2.3.1 Sơ lược về lịch sử gel polyacrylamide và sự phát triển của phương pháp điện di trên gel polyacrylamide

Điện di là một phương pháp được sử dụng chủ yếu trong nghiên cứu sinh học phân tử. Nó cho phép phân tách trọng lượng của các phân tử sinh học, từ đó ta có thể xác định được trọng lượng phân tử của chúng.

Vào khoảng thập niên 1930 phương pháp điện di trên gel đầu tiên được biết đến. Raymond và Winstraub (1959) lần đầu tiên giới thiệu về gel polyacrylamide. Ornstein và Davis (1964) thực hiện điện di trên gel polyacrylamide không liên tục. Beber và Osborn (1969) đã giới thiệu về tác nhân gây biến tính protein và sodium dodecyl sulfate. Laemmli (1970) phát triển phương pháp SDS- PAGE trong phân tách 28 thành phần của T4- phage.

2.3.2 Gel polyacrylamide

Acrylamide là một đơn phân tử có cấu trúc: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ và bis-acrylamide có cấu trúc: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$.

Acrylamide là một độc tố thần kinh mạnh, khi hít phải sẽ làm mê mết. Nó có khả năng thấm qua da khi tiếp xúc trực tiếp. Hiệu quả độc tố sẽ tích tụ dần. Vì vậy khi thực hiện làm thí nghiệm với acrylamide nên đeo khẩu trang và găng tay. Tuy nhiên ở dạng đã được polymer hóa thành polyacrylamide thì lại không độc. Nhưng khi tiếp xúc trực tiếp với nó vẫn nên mang găng tay bảo vệ vì có thể sẽ còn một lượng nhỏ acrylamide vẫn chưa được polymer hóa. (Sambrook và ctv, 2001)

Gel polyacrylamide là gel được tạo thành do sự polymer hóa các đơn phân tử acrylamide và N,N'-methylene-bis-acrylamide. Kích thước lỗ gel phụ thuộc vào chiều dài của chuỗi polymer và mức độ polymer hóa. Gel polyacrylamide được mô tả qua 2 đặc điểm: %C và %T.

1. Tổng lượng đơn phân tử acrylamide chứa trong gel (%T)

$$\%T = \frac{(\text{g acrylamide} + \text{g bis-acrylamide}) \times 100\%}{\text{Tổng thể tích (ml)}}$$

2. Lượng bis-acrylamide chứa trong gel (%C)

$$\%C = \frac{\text{g bis-acrylamide} \times 100\%}{\text{g acrylamide} + \text{g bis-acrylamide}}$$

Quá trình polymer hóa được xúc tác bởi ammoniumpersulfate (APS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). Sử dụng gel polyacrylamide chạy điện di thì việc chuẩn bị gặp nhiều khó khăn hơn so với chạy điện di trên gel agarose.

Sự di chuyển của các phân tử sinh học trên gel phụ thuộc vào kích thước của lỗ gel, điện tích của phân tử cần phân tách và điện trường. Giới hạn trọng lượng phân tử của các phân tử sinh học mà gel có thể phân tách tùy thuộc vào nồng độ acrylamide và bis-acrylamide: nếu nồng độ gel thấp sẽ tạo ra lỗ gel lớn, cho phép phân tách các phân tử sinh học có kích thước lớn và ngược lại nếu nồng độ gel cao sẽ tạo ra lỗ gel nhỏ, cho phép phân tách các phân tử sinh học có kích thước nhỏ (xem phụ lục 2).

2.3.3 Phương pháp SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Phương pháp SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) còn được gọi là phương pháp điện di trên gel acrylamide không liên tục và mẫu protein được gây biến tính (discontinuous and denaturing). SDS là một tác nhân làm biến tính và âm tính hóa các phân tử protein. Trong kỹ thuật này protein được xử lý với chất tẩy SDS và tác nhân khử cầu nối disulfite là 2-mercaptoethanol hoặc dithiothreitol (DTT). Khi xử lý protein với 2-mercaptoethanol hay dithiothreitol thì các tác nhân này sẽ cắt đứt các cầu nối disulfite (S – S) của protein, vì vậy protein từ cấu trúc bậc 2, 3, 4 được biến đổi thành chuỗi polypeptide bậc một và nhờ sự có mặt của SDS tất cả các protein đều được tích điện âm. Nhờ đó, dưới tác động của điện trường sự di chuyển trong gel của các phân tử protein chỉ phụ thuộc vào kích thước, những phân tử có kích thước lớn sẽ di chuyển chậm hơn những phân tử có kích thước nhỏ khi đi qua một lỗ gel có kích thước nhất định. Dưới tác dụng của điện trường các phân tử tích điện âm sẽ di chuyển về cực dương.

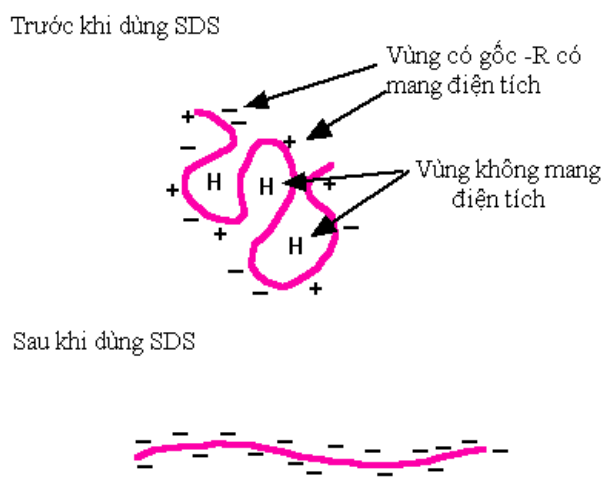
Để đưa các protein trong mẫu về cùng một vạch xuất phát đồng thời tạo ra sự phân tách tốt hơn, người ta thường sử dụng phương pháp điện di trên gel không liên tục (discontinuous gel). Trong phương pháp này gel gồm 2 lớp:

–Lớp gel gom (stacking gel): Thông thường lớp gel này có nồng độ gel thấp vào khoảng 4 – 5%, và nằm phía trên nơi tạo giếng bơm mẫu. Khi có tác động của điện trường các protein có trong mẫu sẽ bắt đầu di chuyển từ những giếng mẫu qua lớp gel này. Nhờ đó, các protein trong mẫu được dồn lại và tạo một lớp băng mỏng

nằm ngay phía trên lớp gel phân tách, tạo điều kiện thuận lợi hơn trong việc phân tách protein [5].

–Lớp gel phân tách (separating gel) (lớp dưới): Lớp gel này có nồng độ gel cao hơn so với lớp gel gom, và nằm phía dưới. Có tác dụng chính trong việc tạo ra các băng protein có trọng lượng phân tử, kích thước khác nhau từ một hỗn hợp protein xuất phát ban đầu [5].

Kỹ thuật SDS- PAGE có thể xác định được những phân tử protein có trọng lượng phân tử từ 10.000 – 200.000 Daltons. Những phân tử protein có trọng lượng lớn hơn 200.000 Daltons thường được xác định trên gel có nồng độ acrylamide ít hơn 2,5% [5].



Hình 2.3 Cấu trúc protein trước và sau khi biến tính bởi SDS

2.3.4 Nhuộm gel sau khi điện di

Nếu protein không được đánh dấu phóng xạ, thì sau khi điện di để thấy được sự phân tách của các băng protein trên gel chúng ta cần phải tiến hành nhuộm gel. Sự lựa chọn phương pháp nhuộm được xác định dựa trên nhiều yếu tố bao gồm độ nhạy, giải nhuộm, tiện dụng, tính kinh tế, thiết bị nhuộm, thiết bị đọc sẵn có. Coomassie Brilliant Blue R- 250 thích hợp dùng để nhuộm cho hầu hết các protein và thường được sử dụng. Đối với Coomassie Brilliant Blue G- 250 nên sử dụng để nhuộm đối với những protein có trọng lượng phân tử polypeptide thấp. Nhuộm bạc

(Rabilloud, 1990) là phương pháp rất nhạy đối với protein và nên sử dụng nhuộm gel khi điện di để đánh giá sự tinh khiết của mẫu protein. Nhuộm bạc cho phép phát hiện một cách nhanh chóng và nhạy các băng protein trên gel ngoại trừ những protein không được phân tách trên gel.

a) Nhuộm Coomassie Brilliant Blue

Nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R- 250 là phương pháp nhuộm phổ biến nhất thường được sử dụng phát hiện protein trên gel polyacrylamide (Wilson, 1983). Rất dễ phát hiện khi có khoảng 0,1 – 1 μg protein trên băng. Dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần như: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R- 250 (w/v), 40% methanol (v/v), 10% acid acetic (v/v). Tùy theo hàm lượng protein mà ta có thể thay đổi tỉ lệ thành phần các chất cũng như chất nhuộm.

Nếu trên gel chứa polypeptide có trọng lượng phân tử thấp thì ta có thể nhuộm trong hỗn hợp dung dịch 0,1% Coomassie Brilliant Blue R- 250 (w/v), 50% methanol (v/v), 10% acid acetic (v/v) khoảng một giờ. Ngoài ra, chúng cũng có thể được nhuộm với 0,025% Coomassie Brilliant Blue G- 250 (w/v) trong methanol và acid acetic từ 1 – 2 giờ.

b) Nhuộm bạc

Phương pháp này có thể phát hiện protein nhạy gấp trăm lần so với phương pháp nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (Merril, 1990). Những băng chứa khoảng 10 – 100 ng protein hay nucleic acid có thể dễ dàng được nhìn thấy. Thông thường người ta sử dụng muối bạc nitrate. Các bước tiến hành nhuộm bạc phức tạp hơn rất nhiều so với nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue [9].

Các bước nhuộm (Kyle Coachman, Jeff Ranish và Steve Hahn, 2002)

1. Ngâm gel trong acid acetic 7% khoảng 10 phút.
2. Ngâm gel trong methanol 50% khoảng 20 phút.
3. Rửa gel trong nước siêu sạch khoảng 10 phút.
4. Chuẩn bị dung dịch nhuộm: Chuẩn bị dung dịch A gồm: 0,8 g bạc nitrate, 4 ml nước siêu sạch. Chuẩn bị dung dịch B gồm: 21 ml nước siêu sạch, 250 μl NaOH 30%, 1,4 ml NH_4OH 14,8 M.

5. Nhỏ từ từ từng giọt dung dịch A vào dung dịch B. Ngay lập tức thêm vào hỗn hợp dung dịch 76 ml nước siêu sạch.
6. Ngâm gel trong dịch nhuộm khoảng 15 phút.
7. Rửa gel thật kỹ lại với nước siêu sạch.
8. Ngâm gel trong dịch giải nhuộm (200 ml nước siêu sạch, 1 ml citric acid 1%, 100 μ l formaldehyde 37%) cho tới khi có thể thấy rõ các băng protein. Thông thường từ 2 – 15 phút.

2.3.5 Một số yếu tố cần quan tâm trong điện di trên gel polyacrylamide

a) Hệ đệm điện di và các tác nhân gây biến tính protein

Hệ đệm quyết định nhu cầu về năng lượng và ảnh hưởng đến sự phân tách protein. Hệ đệm bao gồm đệm dùng để pha gel và đệm dùng để chạy điện di. Hệ đệm của gel không liên tục đầu tiên được phát triển bởi Ornstein (1964) và Davis (1964). Họ đã ứng dụng để phân tách protein nguyên thể, tức là những protein chưa bị biến tính. Hệ đệm họ sử dụng gồm bốn yếu tố: (i) gel gom dùng đệm Tris– HCl pH 6,8; (ii) gel phân tách dùng đệm Tris– HCl pH 8,8, (iii) đệm điện di Tris– glycine pH 8,3; (iv) mẫu cần phân tách dùng đệm Tris– HCl pH 6,8. Nhưng với hệ đệm được sử dụng như vậy thì trong mô hình này họ không thể tiến hành phân tách được một khoảng rộng về trọng lượng protein.

Dựa trên mô hình và hệ đệm của Ornstein và Davis, Laemmli đã phát triển trong việc sử dụng thêm tác nhân khử cầu nối disulfite và SDS. Nhờ đó, việc phân tách protein trên gel chỉ phụ thuộc vào trọng lượng phân tử của protein. Do đó việc phân tách protein trở nên dễ thực hiện hơn và không bị phụ thuộc vào điện tích của các phân tử sinh học. Tuy nhiên mô hình của ông cũng gặp một số khó khăn. Nhiều protein không được phân tách theo mong muốn khi sử dụng SDS– PAGE (Andrews, 1986; Hames, 1990; See và Jackowski, 1989). Hiện tượng này xảy ra là do: (i) cấu trúc disulfite của protein không bị tác động, và protein không bị âm tính hóa bão hòa bởi SDS. (ii) Những glycoprotein và lipoprotein trong mẫu không bị âm tính hóa bão hòa bởi SDS, bởi vì thành phần không phải protein của chúng không tương tác với SDS.

b) Điều kiện năng lượng

Năng lượng cung cấp trong điện di là điện năng. Có rất nhiều thiết bị nguồn điện khác nhau được sản xuất phục vụ trong điện di. Một số thiết bị cho phép chạy tự động sau khi ta chỉnh các thông số mong muốn (hiệu điện thế, cường độ dòng điện, thời gian điện di) và cũng có một số thiết bị đòi hỏi phải có sự giám sát về thời gian (Allen và ctv, 1984).

Giới hạn chính của các mô hình điện di là khả năng làm thất thoát năng lượng khi điện năng chuyển hóa thành năng lượng điện trường. Sự thất thoát là do một phần năng lượng điện đã được chuyển hóa thành nhiệt năng (Woolley, 1987). Nhiệt năng này có thể gây ra một số ảnh hưởng xấu đến kết quả điện di như: băng protein bị méo, cong; tăng sự khuếch tán; sự hoạt động trở lại của enzyme trong mẫu; sự biến tính protein. Do đó một thiết bị điện di tốt phải đảm bảo được sự chuyển nhiệt từ gel ra môi trường ngoài. Thông thường, điện di nên chỉnh hiệu điện thế (volt) và cường độ dòng điện (ampe) sao cho quá trình điện di xảy ra nhanh chóng mà vẫn đảm bảo được sự phân tách protein mẫu.

2.3.6 Phương pháp điện di hai chiều

Kỹ thuật điện di hai chiều trên gel polyacrylamide (2-DE) là một kỹ thuật có khả năng phân tích hơn 1.800 protein trên cùng một bản gel, nó là một công cụ quan trọng cơ bản trong những thí nghiệm mà các protein phức tạp được tách ra để phân tích đồng thời. Các bước cơ bản trong kỹ thuật 2-DE:

Chuẩn bị mẫu và làm hòa tan mẫu: Phương pháp chuẩn bị mẫu tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu. Các yếu tố như độ tan, điện tích, kích thước và điểm đẳng điện của protein đều được lưu ý trong quá trình chuẩn bị mẫu. Việc chuẩn bị mẫu cũng giúp làm giảm bớt sự phức tạp của một hỗn hợp protein. Các đoạn protein được dùng trong chạy điện di hai chiều phải được duy trì trong dung dịch đệm biến tính có lực ion thấp để duy trì tính nguyên vẹn của protein và giữ chúng ở trạng thái hòa tan.

Điện di theo chiều thứ nhất: Protein được tách ra dựa trên điểm đẳng điện pI của chúng, ở pH mà protein không tích điện và không di chuyển trong điện trường.

Kỹ thuật này được gọi là isoelectric focusing (IEF). Đối với điện di hai chiều, IEF là công cụ tốt nhất để thực hiện phân tích protein theo nồng độ pH. Protein là một phân tử ion lưỡng tính. Khi mà protein được đặt trong môi trường với gradient pH và bị phụ thuộc vào một trường điện từ, ban đầu nó sẽ di chuyển đến điện cực trái dấu với nó. Trong suốt quá trình tồn tại của chúng qua gradient pH, protein sẽ có thể nhận hay mất proton.

Cân bằng trạng thái của protein: Ở trạng thái bình thường protein có thể mang điện tích âm, điện tích dương hay cân bằng về điện tích. Điều đó phụ thuộc vào số lượng nhóm ($-NH_2$) và ($-COO^-$) của các phân tử amino acid cấu tạo nên protein. Do đó, trước khi thực hiện điện di theo chiều thứ hai, các phân tử protein cần phải được gây biến tính và đồng nhất về điện tích. Ở bước này người ta xử lý protein với 2-mercaptoethanol hay dithiothreitol, các tác nhân này sẽ cắt đứt các cầu nối disulfite (S-S) của protein, vì vậy protein từ cấu trúc bậc 2, 3, 4 trở thành chuỗi polypeptide và nhờ sự có mặt của SDS tất cả các protein đều được tích điện âm.

Phân tách protein theo chiều thứ hai: Dưới tác dụng của điện trường do protein mang điện tích âm sau khi cân bằng trạng thái nên protein sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương. Khi protein di chuyển qua gel polyacrylamide, sự cọ sát của các hạt acrylamide với phân tử protein tạo ra lực kháng làm ngăn cản sự di chuyển của protein. Protein có trọng lượng phân tử càng lớn thì lực cản càng mạnh.

Nhuộm protein: Để có thể nhìn thấy được protein sau khi điện di, gel phải được nhuộm, trừ khi chúng ta đã đánh dấu protein. Sự lựa chọn phương pháp nhuộm được xác định dựa trên nhiều yếu tố bao gồm độ nhạy, dải nhuộm, tiện dụng, tính kinh tế, và thiết bị nhuộm, thiết bị đọc sẵn có.

Thu nhận và phân tích hình ảnh protein: Việc thu nhận hình ảnh theo kỹ thuật số là một trong những yếu tố quan trọng làm cho phương pháp 2-DE là phương tiện thực tế trong việc thu nhận dữ liệu trong nghiên cứu. Phần mềm phân tích protein PDQuest (Bio-Rad) cho phép chúng ta phân tích được các hình ảnh gel, chú giải các điểm protein và thu nhận dữ liệu. Phần mềm PDQuest cũng tham

gia điều khiển các thiết bị ghi nhận hình ảnh và hệ thống thu thập protein điểm của hệ thống thiết bị phân tích protein Spot Cutter.

2.4 Một số nghiên cứu ứng dụng điện di protein SDS- PAGE

2.4.1 Nghiên cứu trong nước ứng dụng điện di protein SDS- PAGE

Năm 2005, Trần Linh Thước (Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh) đã sử dụng phương pháp SDS- PAGE trong đề tài “Nghiên cứu các hệ thống biểu hiện gen trong *E.Coli* để sản xuất protein tái tổ hợp” để chứng minh sự biểu hiện của gen và sự hiện diện của protein tái tổ hợp.

Năm 2005, nhóm nghiên cứu (Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, trường Đại học Cần Thơ) đã nghiên cứu ứng dụng phương pháp điện di protein SDS-PAGE để đánh giá độ thuần của một số bộ hạt giống rau các loại. Hạt giống rau đưa vào đánh giá là loại hạt lai F1 được sản xuất trong nước và nhập khẩu.

Năm 2005, Võ Thị Hoàng Mi (Đại học Mở Bán công Thành phố Hồ Chí Minh) đã sử dụng phương pháp SDS- PAGE kết hợp với phương pháp Western blot trong đề tài “Các phương pháp chuẩn đoán thương hàn thông dụng” với mục đích phân tách các thành phần protein kháng nguyên *S. typhi*.

Năm 2007, Võ Công Thành và ctv (Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng trường Đại học Cần Thơ) đã ứng dụng kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE để cải thiện thành công phẩm chất nhiều giống lúa đặc sản đang bị thoái hóa của Đồng bằng sông Cửu Long. Trong chọn tạo giống lúa, kỹ thuật này giúp phát hiện nhanh những tính chất nổi bật như mùi thơm, protein, amylose để các nhà khoa học chọn lọc được những dòng, giống có phẩm chất tốt. Một số giống lúa đặc sản được cải thiện phẩm chất thành công và nhiều giống lúa triển vọng ra đời bằng kỹ thuật này.

Năm 2007, Phạm Văn Phụng (Đại học Cần Thơ) đã ứng dụng kỹ thuật điện di SDS-PAGE protein để nghiên cứu đặc điểm di truyền và chọn giống lúa. Kỹ thuật điện di SDS-PAGE protein đã giúp nhà chọn giống sớm tuyển chọn chính xác những cá thể mong muốn ngay từ thế hệ đầu của các tổ hợp lai nên đã rút ngắn ½ thời gian tuyển chọn so với phương pháp truyền thống. Kỹ thuật điện di SDS-PAGE protein giúp đánh giá đa dạng di truyền và phân biệt hai loài lúa hoang ở Đồng bằng

sông Cửu Long dựa vào mức độ ăn màu Coomassie của băng protein chỉ thị dạng basic glutelin.

2.4.2 Nghiên cứu ngoài nước ứng dụng điện di protein

Fan Shuguo (1999) ứng dụng điện di protein để đánh giá tính chịu mặn khác nhau của một số loại cây trồng.

Nazrul Islam, M. Lonsdale, N. M. Upadhyaya, T. J. Higgins, H. Hirano và R. Akhurst (2004) đã thực hiện nghiên cứu đề tài ly trích protein từ lá lúa cho điện di hai chiều và ứng dụng nó trong phân tích hệ protein của lúa.

Scott A. Young và ctv (1995) đã thực hiện nghiên cứu sự tích lũy peroxidase trong mạch gỗ của lúa trong suốt quá trình phản ứng không tương thích với *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Họ bắt đầu chủng *X. oryzae* pv *oryzae* cho lúa khi lúa được 2 – 3 lá. Sau đó cắt lấy những mẫu lá khi đã chủng được 48 giờ, tiến hành ly trích protein của lá sau đó tiến hành điện di trên gel polyacrylamide trong điều kiện protein mẫu không bị biến tính (Discontinuous and nondenaturing). Chọn lấy băng protein có kích thước tương ứng với peroxidase (42 kD), tiếp tục tiến hành điện di SDS- PAGE và lai trên màng PVDF. Vạch protein sẽ được phát hiện trên màng nhờ nhuộm CBB. Sau đó rửa và thu mẫu để giải trình tự.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài

Thời gian: Đề tài được thực hiện từ ngày 15 tháng 03 năm 2007 đến ngày 31 tháng 08 năm 2007.

Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông học, Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật – Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

3.2 Hóa chất và vật liệu dùng trong thí nghiệm

3.2.1 Thuốc sinh học

Chế phẩm sinh học sử dụng để xử lý cho lúa là thuốc sinh học trừ sâu rầy và virus có tên thương hiệu là AMINO 15SL, được sản xuất tại công ty Hợp Danh Sinh học Nông nghiệp Sinh Thành.

Thành phần gồm có polyamid + polyamin 15%, humic acid 5%. Liều lượng sử dụng theo hướng dẫn: pha 50 ml chế phẩm với 16 lít nước phun cho 500 m² cây trồng. Phun lần 2 sau lần thứ nhất 1 tuần.

Công dụng theo nhà sản xuất đưa ra: (i) ức chế men tiêu hóa của sâu rầy gây chết triệt để kể cả thành trùng của bướm, rầy cánh dài; (ii) kiểm hãm sự nhân bản của virus trong tế bào cây trồng; (iii) cung cấp chất dinh dưỡng đặc hiệu cho cây trồng mau phục hồi, duy trì năng suất.

3.2.2 Hóa chất dùng trong ly trích protein

Nitor lỏng	Dithiothreitol (Bio- Rad)
Acetone (Merck)	Sodium dodecyl sulfate (Merck)
NaCl (Merck)	2- mercaptoethanol (Merck)
Sodium phosphate (Merck)	Ethanol (Merck)
Sucrose (Merck)	EDTA
TE 1x	Tris- HCl (Merck)

Amonium acetate (Merck)

Methanol (Merck)

3.2.3 Hóa chất điện di

Ammonium persulfate (Merck)

Sodium Dodecyl Sulfate (Merck)

Methanol (Merck)

Tris- HCl (Merck)

Axit acetic (Merck)

Bromophenol blue (Merck)

2- mercaptoethanol (Merck)

Dithiothreitol (Bio- Rad)

Glycerol (Merck)

Glycine (Merck)

CBB R- 250 (Bio- Rad)

TEMED (Bio- Rad)

Acrylamide và N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bio- Rad)

3.2.4 Trang thiết bị thí nghiệm

Hộp nhựa

Becher 50 ml

Ổng đong 100 ml

Găng tay

Máy hút và tủ cấy vô trùng (Anh Quốc)

Chén sứ và chày (Đức)

Eppendorf 0,2 ml; 1,5 ml

Cân phân tích 4 số (Ohaus - Mỹ)

Pipet các loại (Bio- Rad)

Đầu típ các loại (Đức)

Máy ly tâm lạnh (Hettich -Đức)

Máy vortex

Nồi hấp (Autoclave- Tomy)

Máy đo pH

Bộ nguồn điện di (Bio- Rad)

Bồn điện di đứng Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio- Rad)

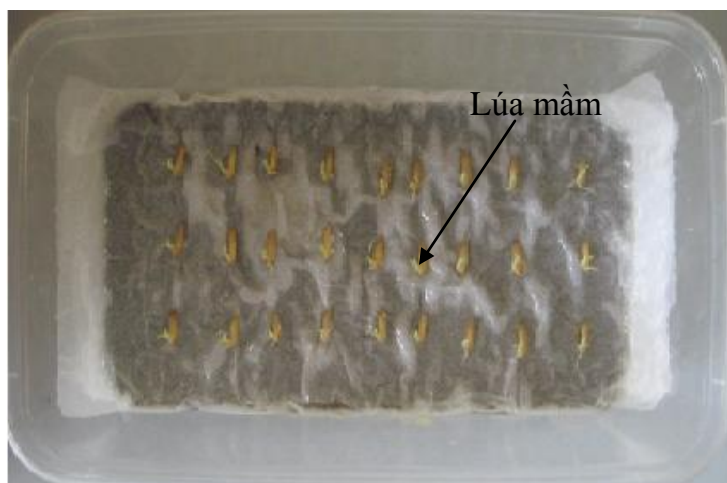
Tủ lạnh 4⁰C, tủ lạnh -20⁰C và tủ lạnh -70⁰C (Sanyo- Nhật)

3.3 Phương pháp tiến hành nghiên cứu

3.3.1 Chuẩn bị mẫu và lấy mẫu lúa

3.3.1.1 Chuẩn bị mẫu lúa

Hạt lúa được ngâm 36 giờ trong nước. Ủ hạt ở nhiệt độ 30 – 35⁰C, 9 giờ, trong tối. Khi hạt đã nứt nanh, chọn những hạt nứt nanh đều nhau, gieo trong các hộp nhựa (hình 3.1). Thí nghiệm được bố trí 3 lô, gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 3 hộp và được đánh dấu như bảng 3.1. Sau khi gieo, tiếp tục ủ tối trong 6 giờ hoặc cho tới khi hạt lên mầm trắng dài 1 – 2 mm. Bắt đầu cung cấp ánh sáng, nước, phân bón đầy đủ để cây mạ phát triển mạnh, khỏe đến giai đoạn 4 lá.



Hình 3.1 Lúa mầm sau khi gieo trong hộp nhựa 2

3.3.1.2 Xử lý thuốc và lấy mẫu lúa

Khi cây mạ phát triển đến giai đoạn 4 lá, bắt đầu tiến hành xử lý thuốc sinh học kích kháng theo bố trí bảng 3.2.

- Lô I: Lô đối chứng, không xử lý thuốc sinh học kích kháng.
- Lô II: Xử lý nồng độ thuốc theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lô III: Xử lý nồng độ thuốc gấp 2 lần so với hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 3.1 Bảng bố trí phân lô thí nghiệm theo nghiệm thức

Lô	Nghiệm thức											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
II	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
III	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12

Chú thích: C: Mẫu đối chứng, X: Mẫu xử lý nồng độ thuốc theo hướng dẫn của nhà sản xuất, Y: Mẫu xử lý nồng độ thuốc gấp 2 lần so với hướng dẫn của nhà sản xuất

Bảng 3.2 Thời gian xử lý thuốc trước khi lấy mẫu theo từng nghiệm thức

Nghiệm thức	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Thời gian xử lý thuốc trước khi lấy mẫu	6 giờ	12 giờ	18 giờ	24 giờ	30 giờ	36 giờ	42 giờ	48 giờ	54 giờ	60 giờ	66 giờ	72 giờ

3.3.2 Ly trích protein tổng số từ lá lúa

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thực hiện khảo sát 3 quy trình ly trích protein tổng số: quy trình có sử dụng SDS (Samuel S.M. Sun, 1994), quy trình có sử dụng phenol (Hurkman và Tanaka, 1986) và quy trình cải tiến. Sau khi ly trích tiến hành điện di các mẫu protein ly trích được để chọn ra quy trình tốt nhất ly trích tất cả mẫu lúa còn lại cho các thí nghiệm sau.

3.3.2.1 Các bước ly trích protein theo quy trình có sử dụng SDS

1. Nghiền 0,2 g mẫu lá với 1 ml dung dịch ly trích (0,25 M NaCl, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 0,05 M sodium phosphate pH 7,5) trong cối thành dịch.
2. Chuyển dịch nghiền vào một eppendorf 1,5 ml, và ly tâm với tốc độ 14.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 20⁰C.
3. Sử dụng pipette hút dịch nổi vào một eppendorf 1,5 ml mới; tránh hút lớp lipid ở trên cùng.
4. Ly tâm dịch nổi vừa hút với tốc độ 14.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 20⁰C.
5. Tiếp tục hút dịch nổi vào một eppendorf khác.
6. Thêm acetone 80%, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4⁰C. Thu kết tủa, phơi khô và thêm vào eppendorf 100 µl 1x TE, trữ ở nhiệt độ 4⁰C tới khi dùng.

3.3.2.2 Các bước ly trích protein theo quy trình có sử dụng phenol

1. Nghiền 0,5 g mẫu lá tươi trong nitor lỏng bằng cối và chày thành bột mịn, cho vào eppendorf 1,5 ml.

2. Thêm vào eppendorf chứa mẫu 0,5 ml Tris- phenol pH 8,8 và 0,5 ml dịch ly trích (0,1 M Tris-HCl pH 8,8, 10 mM EDTA, 0,4% 2- mercaptoethanol, 0,9 M sucrose).

3. Vortex đều hỗn hợp dung dịch trong eppendorf. (*Lưu ý bước này nên thực hiện nhanh vì phenol có thể gây biến tính protein*)

4. Ly tâm 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4⁰C.

5. Thu dịch nổi vào eppendorf 1,5 ml khác, thêm vào 1 ml dịch ly trích. Vortex cho hỗn hợp đồng nhất. Ủ mẫu ở nhiệt độ -20⁰C trong một giờ. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4⁰C.

6. Hút dịch nổi vào eppendorf 1,5 ml khác. Thêm 1 ml 0,1 M amonium acetate trong methanol 100%.

7. Vortex và ủ mẫu ở nhiệt độ -20⁰C trong 1 giờ hoặc qua đêm. Thu kết tủa bằng cách ly tâm 12.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4⁰C.

8. Rửa kết tủa với 0,1 M amonium acetate trong methanol, tiếp tục rửa với acetone 80%, và cuối cùng là rửa với ethanol 70%. Mỗi lần rửa như vậy thì ủ mẫu ở -20⁰C trong 15 phút. Sau đó đổ bỏ dịch và thu kết tủa.

9. Thêm acetone 80% chứa 10 mM DTT. Trữ -80⁰C cho tới khi sử dụng.

3.3.2.3 Các bước ly trích protein theo quy trình có sử dụng SDS cải tiến

1. Nghiền 0,5 g mẫu lá lúa trong nitơ lỏng thành bột mịn, cho vào eppendorf 1,5 ml.

2. Thêm 1ml dịch ly trích (0,5 M EDTA, 0,05 M sodium phosphate 1% SDS, 0,25 M NaCl , 1% 2- mercaptoethanol, 1 M Tris- HCl pH 8,0) vào eppendorf, vortex cho đồng nhất. Ủ mẫu ở nhiệt độ -20⁰C trong một giờ.

3. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4⁰C.

4. Hút dịch nổi vào eppendorf khác. Thêm 400 µl (acetone 80%, 0,2 M DTT), vortex hoặc lắc đều. Tủa protein ở nhiệt độ -20⁰C trong một giờ hoặc qua đêm.

5. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 4⁰C.

6. Đổ dịch trong. Thêm 100 µl 1x TE, ủ 37⁰C trong 1 giờ.

7. Thêm 400 µl ethanol 70%. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4⁰C.

8. Đổ dịch trong, lặp lại tương tự bước 7.

9. Đổ dịch trong, phơi khô mẫu, sau đó pha mẫu với 100 μ l 1x TE trừ mẫu ở nhiệt độ -70°C đến khi sử dụng.

3.3.3 Điện di kiểm tra mẫu protein đã ly trích

3.3.3.1 Chuẩn bị hóa chất

a) Hóa chất đổ gel

❖ Pha gel phân tách (separating gel) có nồng độ 12%T

Cho các thành phần sau theo thứ tự vào ống Falcon 15 ml sạch : 4 ml 30% Acrylamide/Bis (29:1), 2,5 ml Tris– HCl 1,5 M pH 8,8, 3,4 ml nước cất 2 lần khử ion, 0,1 ml 10% SDS. Sau khi cho đầy đủ các thành phần trên theo đúng thể tích vào ống Falcon. Tiếp tục thêm vào ống Falcon 50 μ l ammonium persulfate 10%, 10 μ l TEMED và lắc nhẹ ống Falcon vài lần (*tránh tạo bọt khí*), dùng pipette loại 100 – 1000 μ l bơm từ từ dung dịch gel vào khuôn, đổ gel sao cho mức dung dịch gel cao hơn 7 cm (*tránh tạo bọt khí trong khuôn gel*). Sau đó, nhẹ nhàng đặt một lớp nước cất lên trên lớp gel để mặt gel được phẳng. Chờ gel đông (*khoảng 20 – 30 phút*). Với 10 ml dung dịch gel có thể đổ được 2 gel 100 x 100 x 0,75 mm.

❖ Pha gel gom (Stacking gel) có nồng độ 4%T

Cho các thành phần sau theo thứ tự vào ống Falcon 15 ml khác: 1,3 ml Acrylamide/Bis (29:1) 30%, 2,5 ml Tris– HCl 0,5 M pH 6,8, 6,1 ml nước cất 2 lần khử ion, 0,1 ml SDS 10%. Sau khi gel phân tách đã trùng ngưng hoàn toàn, đổ hết nước bên trên. Tiến hành đổ lớp gel gom bằng cách dùng pipette loại 100 – 1000 μ l hút 2 ml dung dịch gel gom vào becher 50 ml, thêm vào dung dịch 10 μ l ammonium persulfate 10%, 2 μ l TEMED. Dùng pipette trộn đều và bơm vào khuôn gel. Đồng thời đưa lược vào gel để tạo các giếng mẫu (*Lưu ý: tránh tạo bọt khí trong khuôn gel*). Sau khi gel gom đã trùng ngưng hoàn toàn, ta tiến hành tháo lược ra khỏi khuôn gel cẩn thận tránh tạo bọt khí trong các giếng (*Lưu ý: nếu có bọt khí trong giếng ta dùng pipette loại 100 – 1000 μ l bơm khí mạnh vào giếng để làm vỡ bọt khí*). Tiếp theo ta lắp đĩa gel vào bộ phận điện di, cho dung dịch điện di vào bồn.

b) Chuẩn bị dung dịch nạp mẫu (*sample buffer*) và dung dịch đệm điện di (*electrode buffer*)

Pha dịch nạp mẫu gồm: 3,55 ml nước cất 2 lần khử ion; 1,25 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 2,5 ml glycerol; 2 ml SDS 10% (w/v); 0,2 ml bromophenol blue 0,5%(w/v). Khi dùng thêm vào 50 µl 2- Mercaptoethanol hoặc 0,5 ml dithiothreitol 2 M (DTT).

Dung dịch đệm điện di là Tris– glycine, pH 8,3. Pha 1l Tris– glycine (196mM glycine, 0,1% SDS, 50 mM Tris– HCl pH 8,3).

c) Chuẩn bị dung dịch nhuộm và dung dịch giải nhuộm

❖ Dung dịch nhuộm Coomassie Brilliant Blue R- 250

Pha hỗn hợp theo tỉ lệ như sau vào một hộp nhựa có nắp: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R- 250 (w/v), 45% methanol (v/v), 45% nước cất hai lần khử ion (v/v), 10% acid acetic (v/v). Đậy kín lại và giữ trong tối đến khi sử dụng.

❖ Dung dịch giải nhuộm

Pha hỗn hợp sau theo đúng tỉ lệ vào một hộp nhựa khác: 25% methanol (v/v), 65% nước cất hai lần khử ion (v/v), 10% acid acetic (v/v). Đậy kín, giữ trong tối đến khi sử dụng.

3.3.3.2 Chuẩn bị mẫu và chạy điện di

Dùng pipette loại 0,5 – 10 µl hút 3 µl dung dịch nạp mẫu và 7 µl mẫu protein vào một eppendorf 0,2 ml sạch, trộn đều, đậy nắp và gia nhiệt ở 95⁰C từ 3 – 5 phút gây biến tính protein. Sau khi gia nhiệt có thể ly tâm 10.000 vòng/phút trong 3 phút.

3.3.3.3 Tiến hành điện di và xem kết quả

1. Dùng pipette loại 0,5 – 10 µl nạp mẫu vào các giếng (10 µl/giếng).
2. Tiến hành chạy điện di ở hiệu điện thế 100 V, cường độ dòng điện 15 mA, trong thời gian 120 phút hoặc điện di cho tới khi vạch màu của dịch nạp mẫu cách đáy gel khoảng 0,5 – 1cm.
3. Sau khi điện di, tháo gel ra khỏi khuôn, rửa sạch gel bằng nước 5 phút (*cẩn thận tránh làm đứt gel*). Nhuộm gel trong thời gian 30 – 45 phút.
4. Sau khi nhuộm xong, rửa gel với nước 5 phút. Tiến hành giải nhuộm bằng cách ngâm gel trong dung dịch giải nhuộm cho đến khi nền gel trở nên trong suốt

không màu. Sau khi giải nhuộm xong, protein được phát hiện nhờ các vạch màu xanh lam trên nền gel trong suốt.

3.3.4 Thí nghiệm khảo sát chọn điều kiện điện di

Điều kiện điện di ảnh hưởng lớn đến kết quả điện di. Nếu điều kiện điện di không phù hợp với protein thì rất có thể sẽ làm các băng protein bị cong, hoặc các protein bị biến tính do sự hoạt động trở lại của các enzyme. Đồng thời nó cũng có thể làm cho các băng protein không phân tách rõ ràng. Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khảo sát điều kiện điện di cho phù hợp với protein của lá lúa nhằm chọn ra điều kiện điện di thích hợp.

Bố trí 3 thí nghiệm khác nhau (bảng 3.3)

Bảng 3.3 Thí nghiệm khảo sát điều kiện điện di

Thí nghiệm	Điều kiện điện di	
	Gel gom	Gel phân tách
1	200 V, 13 mA, 20 phút	200 V, 18 mA, 100 phút
2	100 V, 20 mA, 10 phút	100 V, 20 mA, 80 phút
3	100 V, 15 mA, 20 phút	100 V, 15 mA, 100 phút

Mẫu sử dụng trong thí nghiệm này là mẫu protein ly trích theo quy trình tốt nhất trong 3 quy trình khảo sát.

Chỉ tiêu theo dõi: hình dạng các băng protein và sự phân tách của các băng trên gel.

3.3.5 Khảo sát nồng độ gel

Nồng độ gel ảnh hưởng rất lớn đến độ phân tách của các băng protein trên gel. Vì nếu nồng độ gel càng cao thì kích thước lỗ gel càng nhỏ lại và sẽ cản trở sự di chuyển của các protein có kích thước càng lớn. Nói cách khác là với mỗi một nồng độ gel thì cho phép phân tách protein ở một khoảng trọng lượng phân tử xác định.

Để thấy được một cách rõ ràng các băng protein của lúa trên gel, cần khảo sát nồng độ của gel phân tách cho phù hợp với protein tổng số được ly trích từ lá lúa. Phải lựa chọn nồng độ gel sao cho các băng protein trên gel được phân tách rõ ràng.

Tiến hành thử nghiệm bằng cách đổ các miếng gel có nồng độ gel phân tách khác nhau và thử nghiệm trên các mẫu protein. Nồng độ của gel gom được giữ nguyên là 4% T, nồng độ của gel phân tách được thay đổi 12% T, 13% T, 14% T. Ta tiến hành chạy điện di cùng điều kiện với hiệu điện thế ổn định ở 100 V, cường độ dòng điện 15 mA, thời gian điện di là 120 phút, nhuộm gel trong 0,2% CBB (w/v) ở nhiệt độ phòng 25°C.

3.3.6 Điện di các mẫu protein để kiểm tra phản ứng của cây lúa đối với thuốc sinh học kích kháng

Thí nghiệm 1: Tiến hành điện di tất cả các mẫu protein ly trích được từ tất cả các mẫu lúa và so sánh qua lại giữa 12 nghiệm thức mẫu protein của lúa.

Cách tiến hành

1. Chuẩn bị đổ 6 miếng gel có nồng độ gel phân tách là 12%, nồng độ gel gom là 4%. Chuẩn bị sẵn tất cả các mẫu protein đã ly trích của 12 nghiệm thức.

2. Dùng micropipette nạp mẫu vào các giếng với tỉ lệ 3 µl dịch nạp mẫu và 7 µl mẫu. Trước khi nạp mẫu vào giếng, hỗn hợp mẫu và dịch nạp mẫu được gia nhiệt ở 95°C trong thời gian 5 phút.

3. Tiến hành điện di tất cả các miếng gel ở hiệu điện thế 100 V, cường độ dòng điện 15 mA, thời gian 120 phút.

4. Sau khi điện di xong, cẩn thận lấy các gel ra khỏi khuôn. Nhuộm gel trong dung dịch nhuộm CBB 0,2% (w/v) trong thời gian 30 phút. Sau khi nhuộm xong, cẩn thận lấy gel ra, rửa sạch gel bằng nước và ngâm gel trong dung dịch giải nhuộm cho đến khi xuất hiện các băng protein trên gel hay cho tới khi nền gel trở nên trong suốt. Nếu có protein trong mẫu thì sẽ xuất hiện các băng màu lam trên gel.

Thí nghiệm 2: Điện di kiểm tra kết quả của mẫu protein được ly trích từ lô II. Thực hiện điện di 2 miếng gel theo điều kiện giống thí nghiệm 1.

- Gel 1: nạp các mẫu từ X1 – X9 hình 4.11.
- Gel 2: nạp các mẫu từ X4 – X12 hình 4.12.

Thí nghiệm 3: Điện di kiểm tra kết quả của mẫu protein được ly trích từ lô III. Tiến hành như thí nghiệm 2 đối với các mẫu Y1 – Y12.

Chương 4

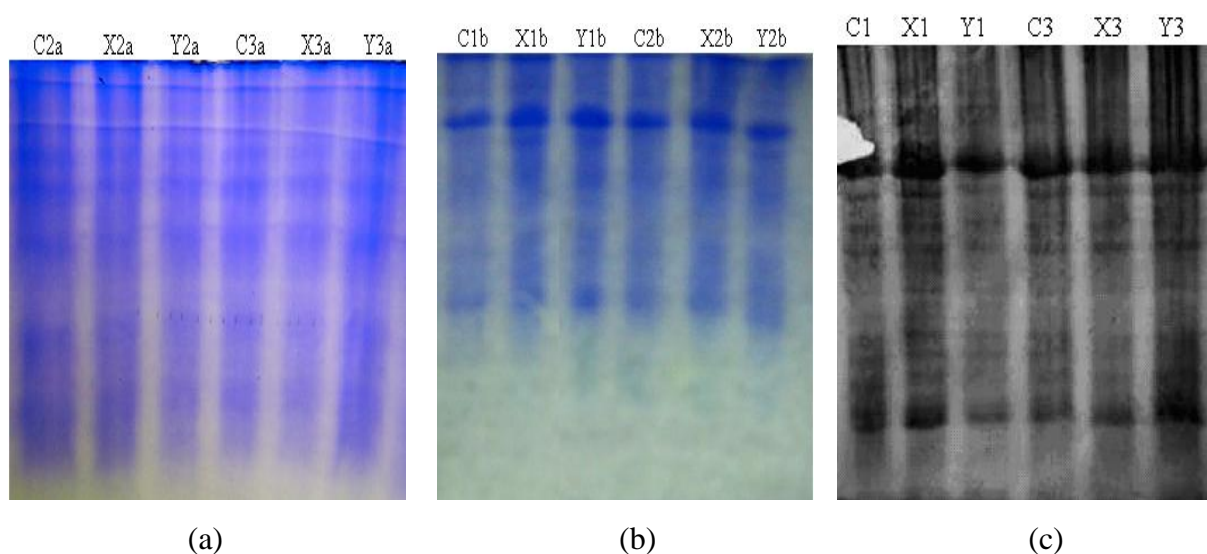
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả thử nghiệm các quy trình ly trích protein

Giai đoạn tách chiết protein tổng số là một giai đoạn tuy dễ thực hiện nhưng không phải là đơn giản. Giai đoạn này rất quan trọng vì nó là yếu tố hàng đầu quyết định sự thành công của thí nghiệm. Có nhiều phương pháp ly trích protein khác nhau nhưng mục đích cuối cùng của các phương pháp là làm sao thu được lượng protein có độ tinh khiết cao phục vụ cho nghiên cứu. Muốn vậy, ngoài việc có được một phương pháp ly trích thì kinh nghiệm trong thao tác cũng đóng vai trò quan trọng. Việc tách chiết phải đảm bảo sao cho protein không bị biến tính, đứt gãy hoặc thất thoát.

Tiến hành khảo sát các quy trình ly trích để chọn ra quy trình tối ưu trong việc ly trích protein tổng số từ lá lúa. Đối với quy trình có sử dụng SDS tiến hành ly trích thử nghiệm 6 mẫu lúa. Kết quả (hình 4.1a) cho thấy, mẫu protein ly trích được sau khi tiến hành điện di SDS- PAGE cho ít băng protein, và các băng protein rất mờ. Điều này có thể do các mẫu protein tổng số ly trích được theo quy trình này còn lẫn nhiều tạp lipid, polysaccharide nên khi điện di các băng không phân tách được rõ ràng. Hoặc do protein bị biến tính trong quá trình ly trích, đặc biệt là khi bảo quản mẫu ở 4⁰C các protein là enzyme có thể sẽ hoạt động được trong nhiệt độ này và phân hủy các protein trong mẫu.

Quá trình nghiền mẫu lúa với dịch ly trích nên thực hiện nhanh, vì trong dịch ly trích có 2- mercaptoethanol có khả năng cắt đứt cầu nối (S – S) trong protein và làm protein biến tính. Khi protein biến tính nếu tiếp tục nghiền có khả năng sẽ làm đứt gãy protein. Bước rửa protein nên thực hiện ở nhiệt độ âm sâu sẽ giúp rửa tối đa protein và làm giảm tối thiểu lượng protein bị biến tính do chính enzyme nội bào gây ra. Các muối giúp hòa tan protein trong dung dịch cần được giữ ở pH 8.0, vì ở pH này protein ổn định.



Hình 4.1 Kết quả điện di SDS– PAGE mẫu protein ly trích của các quy trình

(a) Mẫu protein được ly trích theo quy trình 1

(b) Mẫu protein được ly trích theo quy trình 2

(c) Mẫu protein được ly trích theo quy trình 3

Để khảo sát quy trình ly trích có sử dụng phenol, tiến hành ly trích thử nghiệm 6 mẫu lúa. Tất cả 6 mẫu được ly trích trong quy trình này đều cho kết quả không tốt (hình 4.1b). Mỗi mẫu chỉ cho từ 2 – 4 băng protein trên gel, các băng không phân tách rõ. Để giải thích cho kết quả này chúng tôi cho rằng là do phenol có khả năng phá hủy hợp chất polysaccharide và nó cũng có khả năng phá hủy cả protein. Khi thực hiện bước này nên tiến hành nhanh, tránh đến mức tối đa sự phân hủy protein do phenol gây ra. Trong quy trình này có một số ưu điểm: (i) EDTA được sử dụng trong dịch ly trích với mục đích khá quan trọng là ngăn cản sự hoạt động của các enzyme nội bào bằng cách tham gia gắn các ion Mg^{++} , Ca^{++} . Vì các enzyme nội bào muốn hoạt động mạnh phải gắn với các cation hóa trị II đặc biệt là với Mg^{++} . (ii) Amonium acetate được sử dụng trong bước rửa protein với mục đích là đậm làm tăng khả năng rửa protein.

Sau khi tiến hành thử nghiệm 2 quy trình ly trích trên, mẫu protein thu được trong 2 quy trình không tốt và không đủ điều kiện tiến hành điện di. Do đó, sau khi

rút ra một số kinh nghiệm chúng tôi đã thí nghiệm cải tiến quy trình có sử dụng SDS để ly trích 6 mẫu lúa. Kết quả ly trích 6 mẫu đạt được là khá tốt (hình 4.1c). Mẫu protein sau khi điện di SDS- PAGE có sự phân tách các băng khá rõ ràng, ít bị tạp (smear rất mờ). Kết quả tốt đạt được ở trong quy trình này so với 2 quy trình trước là tổng hợp của nhiều yếu tố: (i) khi nghiền mẫu với nitơ lỏng các mô sẽ mềm hơn và các tế bào dễ dàng tách rời nhau hơn; khi đó với tác động của 2-mercaptoethanol màng tế bào sẽ bị phá vỡ và phóng thích protein; (ii) việc sử dụng EDTA trong quy trình đã ngăn cản các enzyme nội bào hoạt động trong dịch ly trích. (iii) các muối trong dịch ly trích kết hợp với Tris- HCl ở pH 8,0 đã giữ ổn định protein hòa tan trong dung dịch; (iv) khi rửa protein bằng acetone ở -20°C sẽ ngăn cản những enzyme nội bào hoạt động.

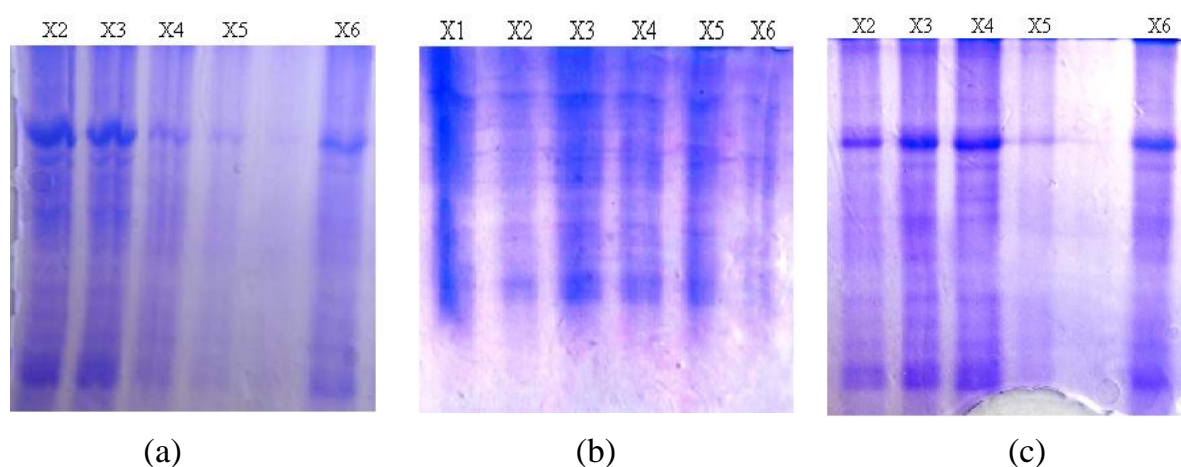
Từ kết quả ly trích của quy trình cải tiến, nhận thấy mẫu protein được ly trích theo quy trình này đủ điều kiện để tiến hành điện di. Thực hiện ly trích tất cả mẫu lúa còn lại theo quy trình này để làm thí nghiệm. Sau đây là một số điểm cần lưu ý khi tiến hành ly trích protein tổng số lá lúa chúng tôi rút ra từ thực nghiệm:

1. Dụng cụ cần khử trùng cẩn thận phòng ngừa tạp nhiễm.
2. Mang bao tay để bảo vệ và khử trùng bằng cồn 70% cẩn thận tránh tạp nhiễm.
3. Mẫu sau khi lấy ra khỏi tủ -20°C phải được cắt và ngâm ngay trong nitơ lỏng.
4. Thao tác nhẹ nhàng khi nghiền mẫu lá lúa thật nhuyễn thành bột mịn.
5. Bước rửa protein trong acetone nên thực hiện ở nhiệt độ âm sâu.
6. Nếu có sử dụng phenol trong ly trích thì nên thao tác nhanh, tránh sự phân hủy protein
7. Khi trữ mẫu nên trữ ở nhiệt độ dưới -70°C . Nhưng tốt nhất là sử dụng ngay sau khi ly trích.

4.2 Kết quả thí nghiệm khảo sát chọn điều kiện điện di

Kết quả điện di ở điều kiện thí nghiệm 1 (hình 4.2a) cho thấy các băng protein bị cong, méo. Hiện tượng này có thể là do thời gian điện di lâu 120 phút trong hiệu điện thế 200 V làm nhiệt độ môi trường điện di tăng. Do đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm 2 tăng Ampe lên 20 mA và giảm hiệu điện thế xuống còn 100 V. Kết quả

đạt được trong thí nghiệm này là sự phân tách các băng protein không rõ ràng, điều này là do quá trình điện di xảy ra nhanh các băng protein chưa thể phân tách. Rút kinh nghiệm từ 2 thí nghiệm trên chúng tôi tiến hành thí nghiệm 3. Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành giảm Ampe xuống còn 15 mA và vẫn giữ hiệu điện thế là 100 V. Kết quả (hình 4.2c) cho thấy các băng protein phân tách rõ ràng và không bị cong, méo. Từ kết quả đó chúng lựa chọn điều kiện điện di theo thí nghiệm 3 để tiến hành các thí nghiệm sau.



Hình 4.2 Kết quả khảo sát điều kiện điện di phù hợp với protein lá lúa

- (a) Kết quả điện di với điều kiện thí nghiệm 1
- (b) Kết quả điện di với điều kiện thí nghiệm 2
- (c) Kết quả điện di với điều kiện thí nghiệm 3

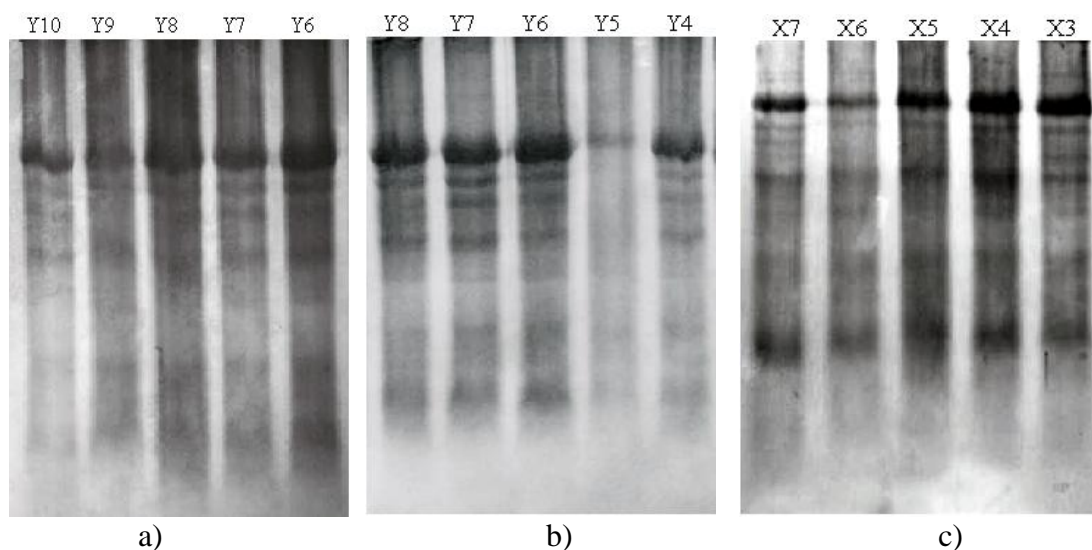
4.3 Kết quả thí nghiệm khảo sát chọn nồng độ gel

Các miếng gel được chạy điện di với hiệu điện thế ổn định ở 100V, 15mA, trong thời gian 120 phút. Kết quả điện di (hình 4.3) cho thấy mức độ phân tách các mẫu protein trên gel 12% T, 13% T, 14% T là khá giống nhau. Thể hiện rõ ở mẫu Y6, Y7 và Y8 ở trên gel 13% T và trên gel 12% T được phân tách rõ. Mẫu protein Y5 ở gel 13% T chỉ thấy rất ít băng có thể không phải do ảnh hưởng của nồng độ gel. Hiện tượng đó có thể là do protein trong mẫu ít (ít hơn 0,1 μ g) không đủ để ăn màu Coomassie Brilliant Blue. Hàm lượng protein ít có thể là do quá trình bảo quản mẫu không tốt, ly trích mẫu không đạt hoặc do khi gia nhiệt biến tính trước khi nạp

mẫu protein đã bị đứt gãy. Những mẫu Y6, Y8 ở gel 12% T và X4, X5 ở gel 14% T ăn màu CBB đậm có thể do hàm lượng protein trong mẫu nhiều hơn 1 μg .

Ngoài ra ta còn thấy ở nồng độ gel 14% T, khoảng cách phân tách giữa các băng hẹp hơn so với khoảng cách phân tách giữa các băng của gel 13% T, và khoảng cách đó đối với gel 12% T là rộng nhất. Như vậy, ở điều kiện hiệu điện thế ổn định và cường độ dòng điện không đổi, nếu nồng độ gel càng cao thì khoảng thời gian chạy điện di phải càng nhiều, sự phân tách các băng protein tốt hơn và rõ hơn.

Từ kết quả trên chứng tỏ nồng độ gel từ 12% T – 14% T không ảnh hưởng nhiều đến kết quả điện di. Do đó chúng tôi quyết định sử dụng gel 12% T để tiến hành điện di cho các thí nghiệm sau nhằm tiết kiệm kinh phí.

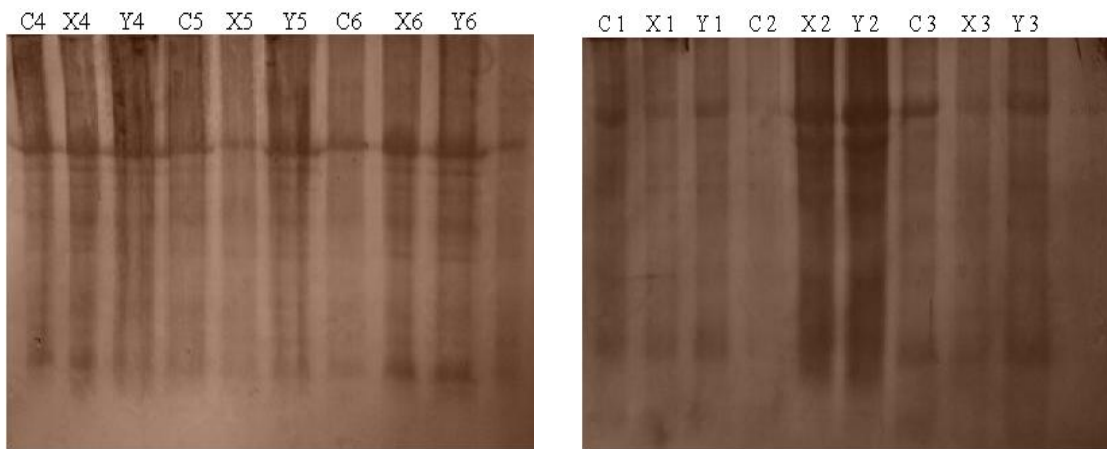


Hình 4.3 Kết quả điện di SDS– PAGE các mẫu protein khảo sát nồng độ gel

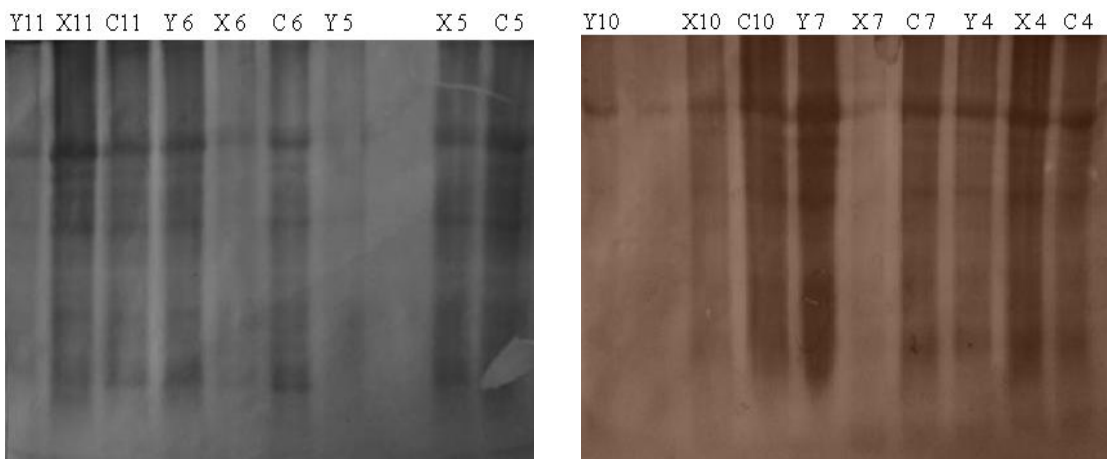
- a) Là hình điện di protein lá lúa trên gel có nồng độ 12% T
- b) Là hình điện di protein lá lúa trên gel có nồng độ 13% T
- c) Là hình điện di protein lá lúa trên gel có nồng độ 14% T

4.4 Đánh giá phản ứng của lúa đối với thuốc sinh học

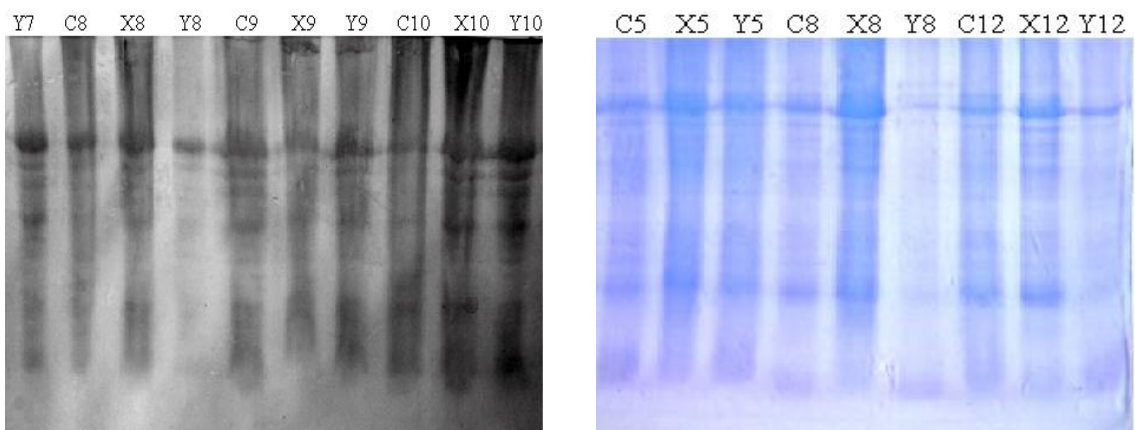
4.4.1 Kết quả điện di của tất cả các mẫu protein trong 12 nghiệm thức



Hình 4.4 Kết quả điện di so sánh mẫu protein của 6 nghiệm thức
(nghiệm thức 1, 2, 3, 4, 5 và 6)



Hình 4.5 Kết quả điện di so sánh mẫu protein của 6 nghiệm thức
(nghiệm thức 4, 5, 6, 7, 10 và 11)

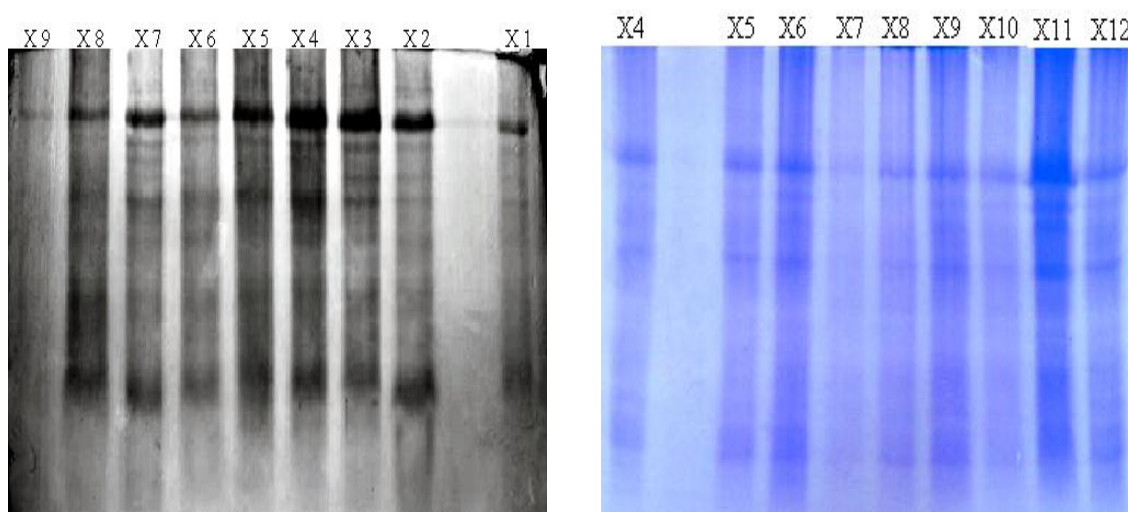


Hình 4.6 Kết quả điện di so sánh mẫu protein của 5 nghiệm thức
(nghiệm thức 5, 8, 9, 10 và 12)

Từ kết quả điện di SDS- PAGE tất cả các mẫu protein trong 12 nghiệm thức (hình 4.4, hình 4.5, hình 4.6) so sánh các hình chúng tôi nhận thấy rằng tất cả các mẫu protein đều cho một dải băng đồng hình. Không có sự khác biệt nào về các dải băng đồng hình đó. Có thể là do thuốc chưa kịp tác động lên sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa do thời gian tác động còn ít (sau 72 giờ), hoặc do thời điểm xử lý thuốc còn sớm (giai đoạn lúa 4 lá) nên hệ protein của lúa có thể chưa có sự biến đổi. Ngoài ra có thể với điều kiện trồng lúa dưới ánh sáng đèn neon, và ở trong phòng sẽ gây ra một số hạn chế về sinh trưởng và phát triển dẫn đến lúa không thể hấp thu được thuốc. Cũng không loại trừ khả năng phương pháp SDS- PAGE chưa đủ nhạy để phát hiện sự khác biệt.

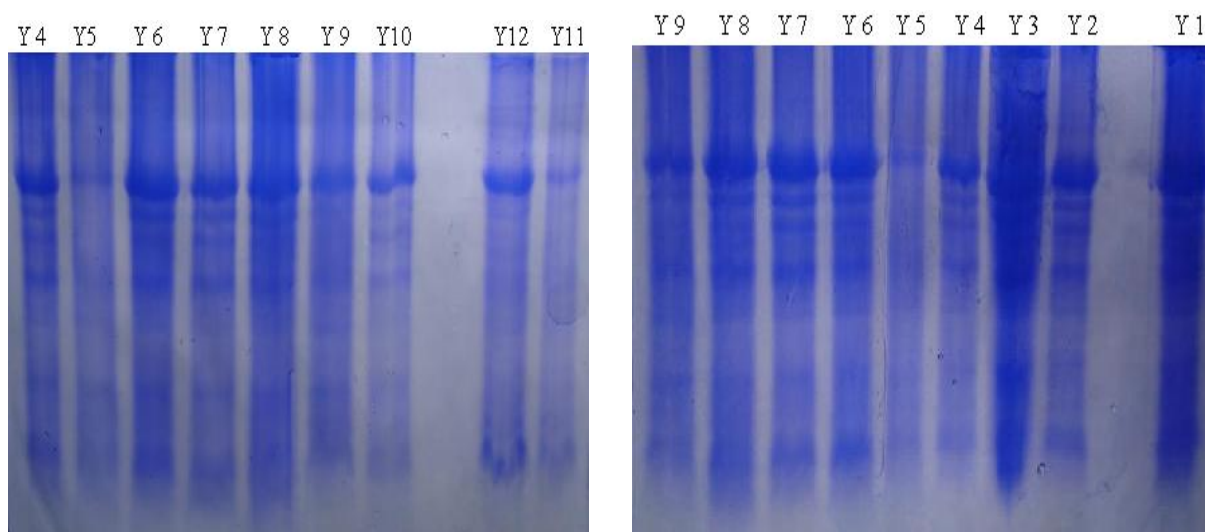
4.4.2 Kết quả điện di mẫu protein của lúa ở lô II

Tiến hành điện di 12 mẫu protein của lô 2, kết quả (hình 4.7) không tìm thấy sự khác biệt về băng protein giữa các mẫu protein của lúa được xử lý thuốc theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu protein ly trích được trong lô lúa này cho kết quả là một dải băng protein đồng hình. Điều này xảy ra có thể là do thời gian tác dụng thuốc không đủ, lúa chưa kịp phản ứng với thuốc nên hệ protein của lúa chưa có thay đổi đáng kể. Tuy nhiên nếu có xảy ra sự thay đổi nhỏ trong hệ protein của lúa thì cũng rất khó để phát hiện: có thể lượng protein khác biệt quan tâm trong quá trình ly trích không nhận được, hoặc lượng protein đó quá ít không thể phát hiện bằng nhuộm CBB. Ngoài ra không loại trừ khả năng với phương pháp SDS- PAGE thì chưa đủ nhạy để phát hiện sự khác biệt.



Hình 4.7 Kết quả điện di SDS- PAGE mẫu protein ly trích từ lô II
Thực hiện điện di ở nồng độ gel 12% T, hiệu điện thế ổn định ở 100V
cường độ dòng điện 15 mA, thời gian điện di 120 phút.

4.4.3 Kết quả điện di mẫu protein của lúa ở lô III



Hình 4.8 Kết quả điện di SDS– PAGE mẫu protein ly trích từ lô III

Thực hiện điện di ở nồng độ gel 12% T, hiệu điện thế ổn định ở 100V, cường độ dòng điện 15 mA, thời gian điện di 120 phút.

Kết quả thu được trong hình 4.8 cũng không cho sự khác biệt nào dù trong thí nghiệm này ta đã tác dụng thuốc với liều lượng gấp đôi so với hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ kết quả này ta có thể giải thích rằng thời gian tác dụng thuốc chưa đủ ảnh hưởng lên sinh lý của cây mạ. Do thời gian ta tác dụng thuốc và lấy mẫu còn ngắn, chỉ trong vòng 72 giờ đồng hồ. Ngoài ra với điều kiện trồng lúa trong phòng như vậy thì khả năng hấp thụ thuốc càng khó xảy ra nhanh chóng do sinh lý của cây không bình thường.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận

Trong đề tài này chúng tôi đã hoàn thành được một số nội dung:

1. Thiết lập được quy trình ly trích protein trên lá lúa.
2. Thiết lập được phương pháp điện di SDS- PAGE trên mẫu protein lá lúa.
3. Ở điều kiện trồng lúa trong phòng với ánh sáng đèn neon, khi xử lý thuốc sinh học AMINO 15SL lên lúa trong thời gian từ 6 – 72 giờ thì chưa tìm thấy sự khác biệt nào về protein tổng số khi phân tích bằng kỹ thuật SDS- PAGE.

5.2 Đề nghị

1. Tiếp tục thử nghiệm chế phẩm sinh học đó nhưng tăng thời gian tác dụng thuốc và tăng liều lượng thuốc
2. Mở rộng thử nghiệm thuốc khi lúa được trồng trong nhà lưới và trên điều kiện thí nghiệm ngoài đồng ruộng để khẳng định rõ hiệu quả của thuốc.
3. Tiếp tục nghiên cứu hệ protein của cây lúa bằng các phương pháp phân tích proteomics khác như điện di 2 chiều, sắc kí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. **Biện Tuấn An**, 2006. *Khảo sát hệ vi khuẩn methylobacterium sp. trên lúa (oryza sativa L.) ở Tây Ninh*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
2. **Bùi Huy Đáp**, 1999. Một số vấn đề về cây lúa, NXB Nông Nghiệp.
3. **Chu Lý Hải Anh**, 2006. *Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn methylobacterium sp. lên sự phát sinh cơ quan ở cây lúa (oryza sativa L.) nuôi cấy in vitro*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
4. **Lê Minh Triết**, 2003. *Bài Giảng Môn Học Cây Lúa*. Khoa Nông Học, Đại Học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
5. **Nguyễn Thị Lang**, 2002. *Phương Pháp Cơ Bản Trong Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp TP. Hồ Chí Minh.
6. **Nguyễn Tiến Thắng**, 2004. *Tài liệu hướng dẫn thực tập: Công Nghệ Enzyme và Protein*. Viện Sinh Học Nhiệt Đới, TP. Hồ Chí Minh.
7. **Võ Tòng Xuân, Trần Thanh Bé, Nguyễn Ngọc Đệ, Dương Ngọc Thành và Đỗ Văn Xê**, 1986. *Trồng lúa năng suất cao*. Nhà xuất bản Thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh. 83 trang.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

8. **Allen R. C., Saravis C. A. and Maurer H. R.**, 1984. Gel electrophoresis and Isoelectrics Focusing of protein: Selected Techniques. De Gruyter, Berlin.
9. **Davis B. J.**, 1964. Disc electrophoresis. II. Method and appication to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 – 427.
10. **David E. Garfin, Jay A. Glasel and Murray P. Deutscher**, 1995. Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research. Electrophoretic Method. pp. 53 – 109.

11. **Department of health and ageing office of the gene technology regulator**, 2005. The biology and ecology of rice (*O. sativa*) in Australia.
12. **Hurkman and Tanaka**, 1986. “*Phenol extraction followed by methanolic ammonium acetate precipitation – an effective protocol for sample preparation from protein-poor, recalcitrant tissues such as plants*”. *Plant Physiology*, Vol. 81, pp. 802-806.
13. **IRRI**, 2002. *IRRI rice almanac*, Third edition, Manila, Philippine, IRRI. p. 253.
14. **Laemmli U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London. 227, 680 – 685.
15. **Nazrul Islam, Lonsdale M., Upadhyaya N.M., Higgins T. J., Hirano H. and Akhurst R.**, 2004. *Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis*. *Proteomics*, Vol. 4, pp. 1903-1908.
16. **Ornstein L.**, 1964. Disc electrophoresis. I . Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321 – 349.
17. **Sambrook and Russell**. *Molecular cloning-A laboratory manual*. Volume 2, 3rd edition, 2001. Cold spring harbor laboratory press, New York.
18. **Samuel S.M.Sun**, 1994. *Methods in plant molecular biology and agricultural biotechnology: a laboratory training manual*. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan (ROC). 94 p.
19. **Scott A. Young, Ailan Cuo, James A. Cuikema, Frank F. White, và Jan E. Leach**, 1995. Department of Plant Pathology, Throckmorton Hall (S.A.Y., F.F.W., J.E.L.), and Division of Biological Sciences (J.A.G.), Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506-5502; and Waksman Institute, Rutgers University, Piscataway, New Jersey 08855 (A.G.)
20. **Woolley P.**, 1987. Thermal instability of electrophoresis gel. *Electrophoresis* 8, 339 – 345.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Bảng pha gel theo các nồng độ khác nhau

Phần trăm gel	Nước khử ion (ml)	30% acrylamide/ bis (29:1) (ml)	*Đệm điện di (ml)	10% w/v SDS (ml)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

* Đệm gel phân tách: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Đệm gel gom: 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8

Phụ lục 2: Khoảng phân tách protein theo nồng độ gel polyacrylamide

Acrylamide (%)	Khoảng phân tách protein (kDa)
15	12 – 43
10	16 – 68
7,5	36 – 94
5,0	57 – 212