

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LA THỊ SINH

**NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN  
MÃ HÓA PROTEIN AZURIN TỪ MỘT SỐ CHỦNG  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**Thái Nguyên, 2020**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LA THỊ SINH

**NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN  
MÃ HÓA PROTEIN AZURIN TỪ MỘT SỐ CHỦNG  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học**

**Mã số: 8 42 02 01**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. Trịnh Đình Khá**

**Thái Nguyên, 2020**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ của các Thầy Cô, bạn bè và người thân. Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới:

Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo – QLKH&HTQT, Khoa Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ tạo điều kiện cho tôi trong qua trình học tập.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Trịnh Đình Khá, người Thầy đã tận tình chỉ bảo và cung cấp cho tôi những kiến thức quý báu về phương pháp nghiên cứu cũng như kiến thức chuyên ngành.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy Cô trong Hội đồng chấm luận văn đã đóng góp cho tôi nhiều ý kiến quý báu, đã đánh giá và ghi nhận sự nỗ lực của tôi trong học tập.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp bộ Giáo dục và Đào tạo “Nghiên cứu tạo chủng *Escherichia coli* sản xuất protein Azurin có hoạt tính ức chế tế bào ung thư vú”, mã số B2019-TNA-16.

*Thái nguyên, tháng 10 năm 2020*

**Học viên**

**La Thị Sinh**

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN .....	i
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vi
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới về protein azurin.....	3
1.2. Tình hình nghiên cứu protein azurin tại Việt Nam.....	6
1.3. Khái quát về trực khuẩn mũ xanh ( <i>P. aeruginosa</i> ) .....	7
1.3.1. Các tính chất sinh học chính.....	7
1.3.2. Các yếu tố độc lực .....	10
1.3.3. Sức đề kháng.....	12
1.3.4. Dịch tễ học.....	12
1.4. Tổng quan về protein azurin.....	13
1.4.1. Sơ lược về protein azurin.....	13
1.4.2. Cấu trúc của gen <i>azurin</i> .....	14
1.4.3. Khả năng chống ung thư.....	16
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	21
2.1. Vật liệu, trang thiết bị, dụng cụ nghiên cứu .....	21
2.1.1. Chủng vi sinh vật và plasmid .....	21
2.1.2. Thiết bị dụng cụ và hóa chất.....	21
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	23
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	23
2.3.1. Nuôi cấy vi sinh vật.....	23
2.3.2. Tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn.....	23
2.3.3. Điện di trên gel agarose.....	24

2.3.4. PCR phân lập gen <i>azurin</i> .....	24
2.3.5. Phương pháp tạo dòng gen .....	25
2.3.6. Phương pháp giải trình tự gen .....	26
2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu .....	28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Tách chiết DNA tổng số của chủng <i>Pseudomonas</i> .....	29
3.2. Phân lập gen <i>azurin</i> .....	30
3.3. Gắn gen vào vector nhân dòng và chọn dòng .....	30
3.4. Phân tích trình tự gen <i>azurin</i> .....	32
3.4.1. Phân tích trình tự gen <i>azurin</i> của chủng VTCC-B-657 .....	32
3.4.2. Phân tích trình tự gen <i>azurin</i> của chủng QN1.....	34
3.4.3. So sánh trình tự amino acid suy diễn .....	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	38
1. Kết luận .....	38
2. Đề nghị .....	38
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	39

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
1	DNA	Deoxyribonucleic Acid
2	dNTP	Deoxyribonucleic triphosphate
3	EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
4	ETA	Exotoxin A
5	HIV	Human Immunodeficiency Virus
6	kDa	Kilo Dalton
7	LB	Luria and Bertani
8	PCR	Polymerase Chain Reaction
9	PTD	Miền tải nạp protein
10	TAE	Tris – Acetic acid - EDTA
11	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12	NXB	Nhà xuất bản

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

Bảng 2.1. Các thiết bị được sử dụng trong thí nghiệm .....	21
Bảng 2.2. Các dung dịch và đệm sử dụng.....	22
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR.....	24
Bảng 2.4. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR .....	25

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1 Cấu trúc của protein azurin .....	15
Hình 1.2 Cơ chế azurin gây ra quá trình apoptosis và ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư ở người.....	17
Hình 2.1. Cấu trúc vector tách dòng pTZ57R/T .....	26
Hình 2.2. Hình ảnh mô tả quá trình giải trình tự thể hệ mới theo nguyên lý Sanger sử dụng các ddNTP có đánh dấu huỳnh quang.....	28
Hình 3.1. Hình ảnh điện di DNA tổng số của các chủng nghiên cứu .....	29
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>azurin</i> .....	30
Hình 3.3. Hình ảnh điện di plasmid tách chiết từ các khuẩn lạc sau biến nạp.....	31
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt.....	32
Hình 3.5. Trình tự gen <i>azurin</i> của chủng <i>P. aeruginosa</i> VTCC-B-657.....	33
Hình 3.6. Hình ảnh kết quả so sánh trình tự gen <i>azurin</i> của chủng <i>P. aeruginosa</i> VTCC-B-657 trên phần mềm Blast .....	33
Hình 3.7. Trình tự gen <i>azurin</i> của chủng QN1. ....	34
Hình 3.8. Hình ảnh kết quả so sánh trình tự gen <i>azurin</i> của chủng <i>P. aeruginosa</i> QN1 trên phần mềm Blast.....	35
Hình 3.9. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>azurin</i> chủng VTCC-B-657, chủng QN1 với trình tự gen <i>azurin</i> của <i>P. aeruginosa</i> mã số M30389 trên GenBank.....	35
Hình 3.10. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein azurin chủng VTCC-B-657, chủng QN1 với trình tự amino acid của <i>P. aeruginosa</i> mã số M30389 trên GenBank .....	37



## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Hiện nay, bệnh ung thư và sức khỏe cộng đồng là những vấn đề ngày càng được quan tâm ở hầu hết các quốc gia trên thế giới. Bởi lẽ, ung thư là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở các nước kinh tế phát triển và là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai ở các nước đang phát triển [27].

Theo WHO, năm 2008 thế giới có 12,6 triệu người mắc ung thư, trong đó có 7,5 triệu người tử vong. Năm 2015, có khoảng 90,5 triệu người bị ung thư. Mỗi năm có 14,1 triệu ca mắc mới, trong đó tử vong 8,8 triệu ca (15,7%). Ở Mỹ và các nước phát triển tử vong do ung thư chiếm khoảng 25% và hàng năm có khoảng 0,5% dân số được chẩn đoán ung thư [6], [20]. Tính đến năm 2018, ước tính trên toàn thế giới có khoảng 18,1 triệu trường hợp ung thư mới (17 triệu không bao gồm ung thư da không phải u ác tính) và 9,6 triệu ca tử vong do ung thư (9,5 triệu không bao gồm ung thư da không hắc tố) [18].

Việt Nam cũng là một trong số nước có tỉ lệ mắc ung thư cao trên thế giới, WHO xếp Việt Nam nằm trong 50 nước thuộc top 2 của bản đồ ung thư (50 nước cao nhất thuộc top 1). Mỗi năm có khoảng 115.000 người chết vì ung thư, tương ứng 315 người/ngày. Trong đó, ung thư vú với tỷ lệ mắc là 15.000 ca/năm. Tỷ lệ tử vong 35% và 70% người bệnh đến khám ở giai đoạn muộn [6].

Hiện nay, phương pháp điều trị ung thư chủ yếu sử dụng phương pháp hóa trị, xạ trị và phẫu thuật. Các liệu pháp điều trị ung thư mới đang được các nhà khoa học nghiên cứu. Trong đó những hoạt chất sinh học từ thực vật, vi sinh vật đang được quan tâm nghiên cứu.

Trên thế giới các nghiên cứu được chứng minh hoạt tính chống ung thư giữa azurin và exotoxin A (ETA) từ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), Pep27anal2 từ *Streptococcus pneumoniae*, độc tố bạch hầu từ *Corynebacterium diphtheriae*, và gần đây đã phát hiện Entap từ *Enterococcus sp.* [29]. Các chất này ngăn chặn quá trình tổng hợp protein và gây ra quá trình tự chết ở tế bào ung thư. Vào năm 2012, các nhà khoa học Trung Quốc đã nghiên cứu đặc tính nhắm mục

tiêu khối u của *E. coli* Nissle 1917 ức chế khối u ác tính B16 ở chuột và khối u vú 4T1 thông qua sự biểu hiện của protein azurin. Kết quả của họ đã chứng minh được rằng sự phát triển khối u ác tính B16 và khối u vú 4T1 trực tiếp được hạn chế đáng kể và di căn phổi đã được ngăn chặn ở những con chuột có khả năng miễn dịch [51]. Việc nghiên cứu tách chọn dòng, biểu hiện và tinh sạch protein azurin sẽ giúp con người có thể tiến đến gần việc nghiên cứu điều trị ung thư một cách hiệu quả và không gây hại đến các tế bào bình thường khác. Bởi lẽ, sản phẩm protein azurin từ chủng *P. aeruginosa* đã được chứng minh là có khả năng đặc biệt nhắm vào các tế bào ung thư mà không gây bất kỳ tác động có hại nào đến các tế bào bình thường [43].

Ở Việt Nam, những nghiên cứu về azurin và gen mã hóa azurin chưa có công bố. Chính vì vậy, tôi đã tiến hành thực hiện đề tài **“Nhân dòng và phân tích trình tự gen mã hóa cho protein azurin từ một số chủng *P. aeruginosa*”**.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

Tách dòng gen mã hóa protein azurin từ chủng *P. aeruginosa* để tiến hành tạo protein azurin tái tổ hợp ứng dụng trong ức chế tế bào ung thư vú.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

- ❖ Tuyển chọn chủng *P. aeruginosa* mang gen mã hóa azurin.
- ❖ Tách dòng gen mã hóa protein azurin từ chủng đã tuyển chọn.
- ❖ Phân tích trình tự gen mã hóa cho protein azurin.