

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

**Tangmany SYSOMEPHONE**

**THIẾT KẾ CẤU TRÚC VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN MÃ  
HÓA ENZYME COLUMBAMINE O- METHYLTRANSFERASE  
Ở CÂY BÌNH VÔI (*Stephania spp.*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN, NĂM 2020**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

**Tangmany SYSOMEPHONE**

**THIẾT KẾ CẤU TRÚC VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN MÃ  
HÓA ENZYME COLUMBAMINE O- METHYLTRANSFERASE  
Ở CÂY BÌNH VÔI (*Stephania* spp.)**

**Chuyên ngành: Di truyền học**

**Mã số: 8 42 01 21**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Giảng viên hướng dẫn: TS. Phạm Thị Thanh Nhàn**

**THÁI NGUYÊN, NĂM 2020**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan luận văn: “Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa enzyme columbamine O-methyltransferase ở cây Bình vôi (*Stephania* spp.)” là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Mọi kết quả thu được là trung thực, không sao chép từ kết quả nghiên cứu khác. Tất cả những tham khảo và kế thừa đều được trích dẫn đầy đủ.

*Thái Nguyên, tháng 11 năm 2020*

**Tác giả luận văn**

**Tangmany SYSOMEPHONE**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn chính phủ hai nước Lào và Việt Nam đã dành cho tôi học bổng học tập, để tôi có thể bước chân vào học tập và nghiên cứu tại Khoa Sinh học, Trường Đại học sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phạm Thị Thanh Nhân, người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn. Tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Đề tài cấp Bộ mã số B2019-TNA-09.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Sinh học, bộ phận Sau đại học của Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã trang bị cho tôi những kiến thức, kinh nghiệm quý giá về các môn học liên quan đến chuyên ngành của tôi và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học.

Tôi xin cảm ơn ThS. Trần Thị Hồng, cán bộ phòng thí nghiệm Công nghệ gen và Công nghệ tế bào của Khoa Sinh học, Trường Đại học sư phạm – Đại học Thái Nguyên, đã giúp đỡ, hướng dẫn tôi trong quá trình thực hiện thí nghiệm.

Tôi xin cảm ơn những ý kiến nhận xét của các thầy cô trong Hội đồng đánh giá luận văn ngày 16 tháng 11 năm 2020.

Tôi xin cảm ơn toàn thể đồng nghiệp, gia đình, bạn bè đã động viên, giúp tôi vượt qua những khó khăn trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và sinh sống tại Thái Nguyên, Việt Nam.

*Thái Nguyên, tháng 11 năm 2020*

**Tác giả luận văn**

**Tangmany SYSOMEPHONE**

## MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC.....	iii
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
MỞ ĐẦU .....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Cây Bình vôi .....	3
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm sinh học cơ bản của cây Bình vôi	3
1.1.2. Giá trị của cây Bình vôi .....	7
1.1.3. Hiện trạng khai thác và bảo tồn nguồn gen cây bình vôi .....	12
1.2. Gen <i>CoOMT</i> ở cây Bình vôi và bộ Mao lương.....	13
1.3. Vector biểu hiện gen và ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong cải thiện hàm lượng dược chất có hoạt tính ở cây thuốc .....	15
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	22
2.2. Hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu.....	23
2.2.1. Hóa chất nghiên cứu.....	23
2.2.2. Thiết bị nghiên cứu.....	24
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu.....	24
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	24
2.3.1. Nhóm phương pháp tạo dòng gen.....	24
2.3.1.1. Thiết kế mỗi colony- PCR.....	24

2.3.1.2. Tạo vector pUC19_1113bp tái tổ hợp.....	25
2.3.1.3. Tạo dòng vi khuẩn tái tổ hợp mang vector pUC19_1113bp.....	25
2.3.1.4. Tách chiết và tinh sạch plasmid.....	26
2.3.2. Nhóm phương pháp thiết kế vector biểu hiện mang gen đích .....	27
2.3.2.1. Xử lý enzyme cắt giới hạn.....	27
2.3.2.2. Thôi gel và tinh sạch sản phẩm PCR .....	28
2.3.2.3. Gắn gen <i>CoOMT</i> 1113 bp vào vector pBI121.....	28
2.3.2.4. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào <i>E.coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt.....	29
2.3.2.5. Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony-PCR).....	29
2.3.2.6. Tách chiết plasmid từ tế bào <i>E.coli</i> .....	30
2.3.2.7. Phương pháp kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn.....	31
2.3.2.8. Phương pháp biến nạp vào <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bằng xung điện.....	31
2.3.2.9. Chọn dòng <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp.....	32
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	33
3.1. Nghiên cứu lý thuyết về đặc điểm trình tự gen và protein CoOMT ....	33
3.2. Kết quả tạo dòng tế bào vi khuẩn tái tổ hợp mang gen nhân tạo <i>CoOMT</i> .....	35
3.3. Kết quả thiết kế vector pBI121-1113 và tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> tái tổ hợp mang gen <i>CoOMT</i> .....	36
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....	40
CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG BỐ .....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	42

## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên tiếng Anh</b>	<b>Nghĩa tiếng Việt</b>
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	ADN bổ sung
CoOMT	Columbamine O- Methyltransferase	
Cs/cs		Cộng sự
EB	Extraction buffer	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
EST	expressed sequence tag	
Fw	Primer forward	Môi xuôi
LB	Lysogeny Broth	Môi trường nuôi cấy vi khuẩn
OMT	O-Methyltransferase	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
Rv	Primer reverse	Môi ngược
SDS	Sodium doecyl sulfat	
SMT	S-adenosyl-L- methionine:scoulerine 9-O- methyltransferase	
SOC	Soil organic carbon	môi trường giàu dinh dưỡng (dùng để tạo dòng vi khuẩn)

## DANH MỤC CÁC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Hình ảnh về cây Bình vôi.....	6
Hình 1.2. Công thức cấu tạo của palmatin và L-tetrahydropalmatin (rotundin)...	11
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp tetrahydropalmatine và palmatine .....	14
Hình 1.4. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121.....	16
Hình 1.5. Sự tương tác của <i>Agrobacterium</i> và cơ chế chuyển T-DNA.....	18
Hình 1.6. Cấu trúc Ri-plasmid của <i>A. rhizogenes</i> .....	19
Hình 2.1. Sơ đồ cấu trúc vector pUC19.....	22
Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc vector pBI121.....	23
Hình 3.1. So sánh trình tự amino acid suy diễn của các enzyme OMT trong con đường tổng hợp palmatine .....	34
Hình 3.2. Mô hình cấu trúc không gian 3D của protein CoOMT.....	34
Hình 3.3. Cấu trúc thứ cấp của protein CoOMT.....	35
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm colony- PCR.....	36
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm cắt xử lý vector PUC-1113 và vector pBI121 với enzyme <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I .....	37
Hình 3.6. Kết quả chọn dòng plasmid tái tổ hợp pBI121-1113 trong <i>E. Coli</i>	37
Hình 3.7. Kết quả chọn dòng plasmid tái tổ hợp pBI121-1113 trong <i>A.tumefaciens</i> .....	38



## DANH MỤC CÁC BẢNG

*Trang*

Bảng 1.1. Hoạt tính sinh học của alkaloid phân lập từ một số loài thuộc chi Bình vôi <i>Stephania</i> .....	10
Bảng 2.1. Cặp môi đặc trưng của phản ứng colony- PCR.....	24
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng nối ghép gen.....	25
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng colony-PCR.....	26
Bảng 2.4. Thành phần dung dịch tách plasmid .....	27
Bảng 2.5. Thành phần của phản ứng cắt enzyme giới hạn.....	28
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng nối ghép gen.....	28
Bảng 2.7. Thành phần của phản ứng cắt enzyme giới hạn.....	31
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng PCR.....	32

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Bình vôi có tên khoa học là *Stephanta* spp., họ Tiết dê (*Menispermaceae*), là một loài cây thân thảo dạng dây leo, phần rễ phát triển thành củ to, bám vào núi đá, có củ nặng tới hơn 40kg. Vỏ thân củ màu đen, xù xì giống như hòn đá. Củ còn được gọi là “củ một”, “củ mối trôn”, “ngải tượng”, “tử nhiên”... Cây Bình vôi thường ưa mọc ở những vùng có núi đá tại tỉnh Hà Giang, Tuyên Quang, Hòa Bình, Hà Tây (cũ) ... Trong củ Bình vôi chứa một lượng chất alkaloid: *L-tetrahydropalmatin (rotundin)*, *stepharin*, *roemerin*, *cycleanin*. Những hợp chất này được sử dụng phổ biến để điều chế các loại thuốc quý có tác dụng an thần, dưỡng huyết, thanh nhiệt, giải độc, giảm đau, sốt nóng, đau dạ dày, trị ho có đờm, hen suyễn, khó thở... Hiện nay, cây Bình vôi đang bị khai thác nhiều, số lượng cây Bình vôi tự nhiên ngày càng giảm mạnh. Bình vôi đã được ghi trong Sách đỏ Việt Nam (1996) với cấp đánh giá “sẽ nguy cấp” (V) và Danh mục Thực vật rừng quý hiếm (nhóm 2) của Nghị định số 32/2006/NĐ - CP ngày 30/3/2006 của Chính phủ.

Chi Bình vôi (*Stephanta*) có khoảng trên 45 loài, còn ở Việt Nam có từ 14 đến 16 loài, trong đó một số loài như Bình vôi hoa đầu (*Stephania cepharantha* Hayata), Bình vôi tím (*Stephania rotunada* Lour), Thiên kim đằng (*Stephania japonica* Miers) đang được khai thác, và nhìn chung hàm lượng rotundin của các loài Bình vôi là thấp và rất thấp, tùy thuộc từng loài và điều kiện sinh thái. Do vậy, định hướng nghiên cứu nhằm tăng hàm lượng rotundin ở cây Bình vôi được quan tâm, trong đó xác định việc tăng cường biểu hiện enzyme chìa khóa tham gia trong quá trình chuyển hóa tổng hợp rotundin là rất quan trọng. Columbamine O-methyltransferase (CoOMT) mới được phát hiện là một enzyme chìa khóa trong chuỗi chuyển hóa tổng hợp rotundin ở cây thuộc bộ Mao lương, trong đó có cây Bình vôi [77]. Biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme CoOMT sẽ làm tăng các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp và hàm lượng