

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

..... ***

Hoàng Đăng Sáng

**NGHIÊN CỨU TẠO *CHŨNG BACILLUS SUBTILIS* ĐỘT BIẾN CÓ
KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CAO BẰNG CHIẾU XẠ GAMMA KẾT
HỢP VỚI XỬ LÝ KHÁNG SINH**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. ĐỖ THỊ HUYỀN

ThS. TRẦN BĂNG DIỆP

Hà Nội - 2018

Để hoàn thành nghiên cứu và hoàn thiện luận văn này, lời đầu tiên tôi xin chân thành cảm ơn sâu sắc đến người thầy trực tiếp hướng dẫn khoa học, người thầy đã chỉ bảo và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình nghiên cứu - ThS. Trần Băng Diệp và người thầy cho tôi những ý kiến quý báu - TS. Đỗ Thị Huyền, các cô đã giúp tôi trong quá trình hoàn thiện luận văn. Ngoài ra tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy, Cô giảng dạy đã cho tôi nhiều kiến thức cũng như kinh nghiệm nghiên cứu quý báu.

Nhân dịp này, tôi cũng xin cảm ơn lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Phòng Đào tạo sau đại học, viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin gửi lời trân trọng cảm ơn tới lãnh đạo Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội, Viện Năng lượng nguyên tử Việt Nam và anh chị em đồng nghiệp tại phòng Nghiên cứu Công nghệ bức xạ đã tạo điều kiện và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình làm việc, học tập và hoàn thiện luận văn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè đã luôn động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành quá trình học tập và nghiên cứu.

Đề tài “Nghiên cứu tạo chủng *Bacillus subtilis* đột biến có khả năng sinh protease cao bằng chiếu xạ gamma kết hợp với xử lý kháng sinh” đã nhận được sự hỗ trợ rất lớn từ đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ cấp Bộ, mã số ĐTCB/01/15/TTCX, do Ths. Trần Băng Diệp làm chủ nhiệm./.

Hà Nội, tháng 11 năm 2018

Hoàng Đăng Sáng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn này là kết quả nghiên cứu của cá nhân tôi. Các số liệu và tài liệu được trích dẫn trong luận văn là trung thực. Kết quả nghiên cứu này không trùng với bất cứ công trình nào đã được công bố trước đó.

Tôi xin chịu trách nhiệm với lời cam đoan của mình.

Hà Nội, tháng 11 năm 2018
Học viên

Hoàng Đăng Sáng

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATP	: Adenosine triphosphate
Khuẩn lạc KKS- 0,2	: Các khuẩn lạc mọc trên môi trường bổ sung rifampicin nồng độ 0,2 µg/ml
Khuẩn lạc KKS- 2	: Các khuẩn lạc mọc trên môi trường bổ sung rifampicin nồng độ 2 µg/ml
Khuẩn lạc KKS- 20	: Các khuẩn lạc mọc trên môi trường bổ sung streptomycin nồng độ 20 µg/ml
Khuẩn lạc KKS- 200	: Các khuẩn lạc mọc trên môi trường bổ sung streptomycin nồng độ 200 µg/ml
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EDTA	: Ethylendiamin tetraacetic acid
GLP – 1	: Glucagon – like peptide – 1
KS	: Kháng sinh
MMP	: Matrix metallo protease
MT	: Môi trường
PCR	: Polymerase chain reaction
ppGpp	: Guanosine – 5' diphosphate – 3' diphosphat
RNA	: Ribonucleic acid
RNAP	: RNA polymerase
sp.	: Species
TB	: Tế bào
tRNA	: RNA vận chuyển
VK	: Vi khuẩn
VSV	: Vi sinh vật

MỤC LỤC

Trang	
	MỞ ĐẦU.....1
	PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU4
	1.1. PROTEASE.....4
	1.1.1. Giới thiệu chung4
	1.1.2. Phân loại protease.....4
	1.1.3. Nguồn thu protease.....6
	1.1.4. Ứng dụng của protease8
	1.1.4.1. Ứng dụng trong công nghiệp 8
	1.1.4.2. Trong nghiên cứu và trị liệu..... 10
	1.1.4.3. Trong nông nghiệp 11
	1.2. <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VÀ PROTEASE CỦA <i>BACILLUS</i> 12
	1.2.1. Tổng quan về <i>Bacillus subtilis</i>12
	1.2.1.1. Lịch sử phát hiện và phân loại 12
	1.2.1.2. Đặc điểm sinh thái học và phân bố trong tự nhiên 12
	1.2.1.3. Đặc điểm hình thái 12
	1.2.1.4. Đặc điểm sinh hóa và đặc điểm nuôi cấy 13
	1.2.1.5. Bào tử và khả năng tạo bào tử 14
	1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp protease ở <i>Bacillus subtilis</i> 15
	1.2.2.1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dinh dưỡng..... 15
	1.2.2.2. Ảnh hưởng của yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp protease 17
	1.2.2.3. Ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy 18
	1.3. PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SẢN XUẤT SẢN PHẨM THỨ CẤP (PROTEASE) VÀ CÔNG NGHỆ RIBOSOME 18
	1.3.1. Công nghệ đáp ứng lại của VSV18
	1.3.2. Công nghệ gen19

1.3.2.1. Phương pháp gây đột biến	19
1.3.2.2. Tái tổ hợp di truyền	20
1.3.3. Công nghệ trao đổi chất	20
1.3.4. Công nghệ ribosome.....	21
1.4. TƯƠNG TÁC CỦA BỨC XẠ ION HÓA VỚI TẾ BÀO – ỨNG DỤNG BỨC XẠ ION HÓA TRONG GÂY TẠO ĐỘT BIẾN VI SINH VẬT	24
1.4.1. Quá trình gây hiệu ứng sinh học của bức xạ ion hóa.....	24
1.4.1.1. Các quá trình xảy ra sau khi bức xạ đi vào tổ chức sinh học	24
1.4.1.2. Hiệu ứng sinh học gây bởi bức xạ ion hóa.....	26
1.4.2 Ứng dụng bức xạ ion hóa trong gây tạo đột biến ở vi sinh vật.....	27
PHẦN II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ.....	30
2.1.1. Nguyên vật liệu	30
2.1.2. Hóa chất.....	30
2.1.3. Thiết bị.....	31
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.2.1. Bảo quản và giữ giống.....	31
2.2.2. Xử lý chiếu xạ.....	32
2.2.2.1. Nuôi cấy huyền dịch tế bào	32
2.2.2.2. Chiếu xạ dung dịch nuôi cấy:	32
2.2.3. Xác định số lượng tế bào vi sinh vật.....	32
2.2.4. Định tính và định lượng protease	33
2.2.4.1. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch	33
2.2.4.2. Phương pháp Anson cải tiến.....	34
2.2.5. Sàng lọc các đột biến sinh protease cao từ <i>Bacillus subtilis</i> bằng xử lý chiếu xạ..	
.....	36

2.2.6. Sàng lọc các đột biến sinh protease cao từ <i>Bacillus subtilis</i> bằng xử lý chiếu xạ kết hợp với kháng sinh.....	36
2.2.7. Xác định đột biến	37
2.2.7.1. Thiết kế môi và xử lý số liệu	37
2.2.7.2. Khuếch đại trình tự gen <i>rpoB</i> và <i>rpsL12</i>	38
2.2.7.3. Tinh sạch sản phẩm PCR.....	38
2.2.7.4. Phương pháp điện di DNA	38
2.2.7.5. Giải trình tự	39
PHẦN III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	40
3.1. TUYỂN CHỌN CHỦNG <i>Bacillus subtilis</i> CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CAO LÀM NGUYÊN LIỆU GÂY TẠO ĐỘT BIẾN.....	40
3.1.1. Tuyển chọn các chủng <i>Bacillus subtilis</i> có hoạt tính cao và ổn định	40
3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới khả năng sinh protease của các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	42
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA XỬ LÝ CHIẾU XẠ TỚI CHỦNG VK <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP PROTEASE CỦA CHÚNG	44
3.2.1. Đánh giá quá trình sinh trưởng của các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	44
3.2.2. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sống sót của các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	45
3.2.3. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sinh protease của các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	47
3.3. XỬ LÝ CHIẾU XẠ KẾT HỢP SỬ DỤNG KS GÂY ĐỘT BIẾN ĐỊNH HƯỚNG TỚI CÁC GEN MÃ CHO SẢN PHẨM LIÊN QUAN TỚI QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP PROTEASE CỦA CHỦNG <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	49
3.3.1.1. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng kháng streptomycin ở các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	50
3.3.1.2. Sàng lọc các khuẩn lạc <i>Bacillus subtilis</i> có khả năng sinh protease cao từ các chủng kháng xạ và kháng streptomycin	51
3.3.2. Xử lý chiếu xạ kết hợp với rifampicin	55

3.3.2.1. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng kháng rifampicin ở các chủng <i>Bacillus subtilis</i>	55
3.3.2.2. Sàng lọc các khuẩn lạc <i>Bacillus subtilis</i> có khả năng sinh protease cao từ các khuẩn lạc kháng xạ và kháng rifampicin.....	56
3.4. XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN TRÊN CÁC GEN <i>rpoB</i> , <i>rpsL</i> Ở CÁC CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CAO HƠN CHỦNG GỐC	59
3.4.1. Khuếch đại các gen <i>rpoB</i> và <i>rpsL</i> ở các chủng gốc, các khuẩn lạc sinh protease cao hơn chủng gốc	59
3.4.2.1. Tách chiết DNA tổng số từ các chủng gốc và khuẩn lạc sinh protease cao	59
3.4.2.2. Khuếch đại các gen <i>rpoB</i> và <i>rpsL</i> từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR	61
3.4.2.3. Tinh sạch sản phẩm PCR khuếch đại các gen <i>rpoB</i> và <i>rpsL</i> để giải trình tự xác định đột biến	61
3.4.2.4. Giải trình tự gen <i>rpoB</i> của 2 chủng thuần và các khuẩn lạc sinh protease vượt trội.....	62
3.4.2.5. Giải trình tự gen <i>rpsL</i> của 2 chủng thuần và các chủng đột biến	66
3.4.2.6. Phân tích so sánh kết quả giữa kiểu đột biến, vị trí đột biến với khả năng sinh protease	68
PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	70
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	73
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	73
PHỤ LỤC	81

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Vị trí hoạt động và phân loại protease	4
Hình 1.2. Vai trò protease trong nghiên cứu ung thư	10
Hình 1.3. Thị phần sử dụng proteinase trong nghiên cứu - trị liệu	11
Hình 1.4. Tế bào VK <i>Bacillus subtilis</i> quan sát dưới kính hiển vi	13
Hình 1.5. Quá trình <i>Bacillus subtilis</i> sinh nội bào tử quan sát dưới kính hiển vi	14
Hình 1.6. Cơ chế tác động ppGpp làm tăng lượng sản phẩm thứ cấp của ribosome	21
Hình 1.7. Công nghệ ribosome.	22
Hình 1.8. Cấu trúc tiểu phân β của RNAP ở <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i>	23
Hình 1.9. Tác dụng trực tiếp và gián tiếp của bức xạ ion hóa tới DNA	24
Hình 1.10. Các loại tổn thương do tác động của bức xạ ion hóa trên DNA.....	26
Hình 2.1. Sơ đồ các bước thử hoạt tính protease	34
Hình 3.1. Vòng phân giải casein của 09 chủng <i>Bacillus subtilis</i> có khả năng sinh protease.....	40
Hình 3.2. Vòng phân giải casein của 05 chủng có khả năng sinh protease cao.....	41
Hình 3.3. Hoạt độ protease của các chủng <i>Bacillus subtilis</i> tuyển chọn	41
Hình 3.4. Kích thước vòng phân giải casein bởi protease của các chủng <i>Bacillus subtilis</i> tạo ra tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau	42
Hình 3.5. Hoạt tính protease của các chủng <i>Bacillus subtilis</i> được kiểm tra ngay sau khi thu và sau bảo quản 48 giờ.....	43
Hình 3.6. Đường cong sinh trưởng của các chủng <i>Bacillus subtilis</i> tiềm năng	44
Hình 3.7. Mối tương quan giữa số lượng VK <i>Bacillus subtilis</i> sống sót trong dịch nuôi cấy và liều chiếu xạ	46

Hình 3.8. Tần số đột biến kháng streptomycin 20 µg/ml của 03 chủng <i>Bacillus subtilis</i> B5, H12 và VI ở các liều chiếu xạ khác nhau	50
Hình 3.9. Kích thước vòng phân giải casein của chủng <i>Bacillus subtilis</i> B5 thuần và của các khuẩn lạc kháng streptomycin xuất phát từ chủng thuần chiếu xạ liều 300 Gy	53
Hình 3.10. Kích thước vòng phân giải casein của chủng <i>Bacillus subtilis</i> B5 thuần và của các khuẩn lạc kháng streptomycin xuất phát từ chủng thuần chiếu xạ liều 500 Gy	54
Hình 3.11. Tần số đột biến kháng rifampicin 0,2 µg/ml của 03 chủng <i>Bacillus subtilis</i> B5, H12 và VI ở các liều chiếu xạ khác nhau	55
Hình 3.12. Kích thước vòng phân giải casein của chủng <i>Bacillus subtilis</i> B5 thuần và của các khuẩn lạc kháng rifampicin	57
Hình 3.13. Vòng phân giải casein của một số khuẩn lạc <i>Bacillus subtilis</i> H12 kháng xạ và kháng rifampicin.....	58
Hình 3.14. Kết quả điện di DNA tổng số tách chiết từ các chủng <i>B.subtilis</i> trên gel agarose 0,8 %	60
Hình 3.15. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>rpoB</i> (A) và gen <i>rpsL</i> (B) từ các chủng <i>B.subtilis</i> trên gel agarose 1,5 %	61
Hình 3.16. Kết quả điện di sản phẩm PCR tinh sạch tương ứng với đoạn gen <i>rpoB</i> và <i>rpsL</i> trên gel agarose 1,5 %	62
Hình 3.17. So sánh trình tự amino acid của tiểu phần β – RNA polymerase được mã hóa từ gen <i>rpoB</i> ở 2 chủng thuần <i>Bacillus subtilis</i> B5 và <i>Bacillus subtilis</i> H12.	63
Hình 3.18. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>rpoB</i> ở 2 chủng thuần <i>Bacillus subtilis</i> B5 và <i>Bacillus subtilis</i> H12.	63
Hình 3.19. Trình tự gen <i>rpoB</i> của chủng thuần (B5_ <i>rpoB</i>) với chủng đột biến 609 (<i>rpoB-M</i>).....	64
Hình 3.20. Trình tự gen <i>rpoB</i> của chủng thuần (H12) với chủng đột biến 2, chủng 6 và chủng 1379	65