

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

DƯƠNG TRUNG THÀNH

**NHÂN DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN
GEN MÃ HÓA ANTHOCYANIDIN REDUCTASE
CỦA CÂY CHÈ (*Camellia sinensis*)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

DƯƠNG TRUNG THÀNH

**NHÂN DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN
GEN MÃ HÓA ANTHOCYANIDIN REDUCTASE
CỦA CÂY CHÈ (*Camellia sinensis*)**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 8420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Huỳnh Thị Thu Huệ
2. TS. Hoàng Thị Thu Yến

THÁI NGUYÊN - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Dương Trung Thành

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS. Huỳnh Thị Thu Huệ** - Phòng đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; **TS. Hoàng Thị Thu Yến** - Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Khoa học - người đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và tập thể cán bộ Khoa Công nghệ Sinh học, cảm ơn lãnh đạo Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên và các cán bộ công tác tại Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Cử nhân Phạm Thị Hằng - Phòng đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã tận tình chỉ dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này.

Nhân dịp này tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Dương Trung Dũng – Khoa Nông học – Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong thời gian tôi thu thập vật liệu nghiên cứu làm đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn cổ vũ, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Tác giả

Dương Trung Thành

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu đề tài	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. SƠ LƯỢC VỀ CÂY CHÈ.....	3
1.1.1. Nguồn gốc, lịch sử phát triển của cây chè	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây chè	4
1.1.3. Giá trị của cây chè	7
1.2. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VÀ NGHIÊN CỨU CHÈ TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.....	9
1.2.1. Tình hình sản xuất chè trên thế giới và Việt Nam	9
1.2.1.1. Tình hình sản xuất chè trên thế giới.....	9
1.2.1.2. Tình hình sản xuất chè ở Việt Nam	11
1.2.2. Tình hình nghiên cứu chè trên thế giới và ở Việt Nam.....	14
1.3. CATECHIN VÀ ANTHOCYANIDIN REDUCTASE Ở CHÈ	16
1.3.1. Catechin và tác dụng của catechin	16
1.3.2. Cơ chế sinh tổng hợp catechin ở chè.....	19
1.3.3. Anthocyanidin reductase và gen <i>ANR</i> quy định tổng hợp anthocyanidin reductase.....	20

Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Vật liệu nghiên cứu	23
2.1.1. Nguyên liệu	23
2.1.2. Hóa chất	23
2.1.3. Thiết bị	24
2.2. Phương pháp nghiên cứu	24
2.2.1. Phương pháp tách chiết RNA tổng số.....	24
2.2.2. Điện di RNA tổng số.....	25
2.2.3. Tổng hợp cDNA.....	26
2.2.4. Nhân gen <i>ANR</i> bằng kỹ thuật PCR	26
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR.....	28
2.2.6. Tách dòng gen <i>ANR</i>	29
2.2.7. Xác định trình tự gen.....	32
2.2.8. Xử lý số liệu bằng các phần mềm chuyên dụng.....	33
2.2.9. Thiết kế vector biểu hiện.....	33
2.3. Sơ đồ nghiên cứu.....	34
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	35
3.1. Khuếch đại gen <i>ANR</i> từ mẫu chè nghiên cứu.....	35
3.2. Tạo dòng gen, xác định và phân tích trình tự gen mã hóa anthocyanidin reductase.....	37
3.3. Thiết kế vector biểu hiện vi khuẩn mang gen <i>ANR</i>	45
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	48
KẾT LUẬN	48
KIẾN NGHỊ	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	49

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
ANR	Anthocyanidin reductase	Anthocyanidin reductase
cDNA	DNA bổ sung	Complementary DNA
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
C	Catechin	Catechin
<i>CsANR</i>	Gen <i>ANR</i> của chè	<i>ANR</i> gene of <i>Camellia sinensis</i>
DNA	Axit Deoxiribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
Đtg	Đồng tác giả	et al.
EC	Epicatechin	Epicatechin
ECG	Epicatechin-3-O-gallate	Epicatechin-3-O-gallate
EDTA	Axit ethylene diamin tetraaxetic	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGC	Epigallocatechin	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-O-gallate	Epigallocatechin-3-O-gallate
EtBr	Ethidium Bromide	Ethidium Bromide
GC	Gallocatechin	Gallocatechin
Kb	Kilô bazơ	Kilo base
LAR	Leucoanthocyanidin reductase	Leucoanthocyanidin reductase
LB	Môi trường LB	Luria Bertani
NAD	Nicotinamid adenine dinucleotide	Nicotinamid adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate

ORF	Khung đọc mở	Open reading frame
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp	Polymerase Chain Reaction
Primer F	Mồi xuôi	Primer forward
Primer R	Mồi ngược	Primer reverse
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic Acid
RNase	Enzyme phân hủy RNA	Ribonuclease
TAE	TAE	Tris Acetate EDTA
<i>Taq</i>	Vi khuẩn chịu nhiệt	<i>Thermus aquaticus</i>
UTR	Vùng không dịch mã	untranslated region

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Diện tích, năng suất, sản lượng chè trên thế giới giai đoạn 2010 - 2016	9
Bảng 1.2. Diện tích, năng suất, sản lượng một số nước trên thế giới năm 2016.....	10
Bảng 1.3. Tình hình diện tích, năng suất, sản lượng chè ở Việt Nam trong những năm gần đây	13
Bảng 1.4. Thành phần amino acid của CsANR	21
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	26
Bảng 2.2. Chu trình nhiệt thực hiện phản ứng tổng hợp cDNA	26
Bảng 2.3. Trình tự các đoạn môi sử dụng nhân gen <i>ANR</i>	27
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>ANR</i>	27
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng tạo đầu bằng sản phẩm PCR.....	29
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối giữa đoạn gen <i>ANR</i> và vector pJET1.2	29
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt plasmid	32
Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra nồng độ RNA tổng số	36
Bảng 3.2. Sự sai khác trình tự nucleotide gen <i>ANR</i> của chè Trung du xanh với các trình tự đã công bố trên Genbank	41
Bảng 3.3. Sự sai khác trình tự amino acid của gen mã hóa anthocyanidin reductase ở giống chè Trung du xanh với các trình tự đã công bố trên Genbank	44

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Công thức tổng quát của catechin	16
Hình 1.2. Các con đường sinh tổng hợp catechin ở chè	19
Hình 1.3. Cấu trúc không gian 3 chiều của protein CsANR	22
Hình 2.1. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng nhân gen <i>ANR</i>	27
Hình 2.2. Sơ đồ vector tách dòng pJET 1.2	29
Hình 2.3. Sơ đồ vector biểu hiện pET-32a(+).	33
Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm nhân dòng và thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa anthocyanidin reductase của cây chè	34
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách chiết RNA tổng số... 36	
Hình 3.2. Kết quả nhân gen <i>ANR</i> từ cDNA của mẫu chè Trung du xanh ở các nhiệt độ khác nhau.....	37
Hình 3.3. Hình ảnh điện di tách plasmid của mẫu chè Trung du xanh... 37	
Hình 3.4. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR trong plasmid pJET1.2	38
Hình 3.5. Kết quả phân tích trình tự gen <i>CsANR2</i> phân lập từ mẫu chè xanh.....	41
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của <i>CsANR2</i> từ giống chè Trung du xanh với các trình tự đã công bố	43
Hình 3.7. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen <i>ANR</i> trong plasmid pET32a(+).	46
Hình 3.8. Kết quả cắt kiểm tra plasmid pET32a(+)_ <i>ANR</i> bằng <i>NcoI</i> và <i>XhoI</i>	46
Hình 3.9. Kết quả PCR kiểm tra plasmid pET32a(+)_ <i>ANR</i>	47