

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ KIM CHI

PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA  
ENZYME *GDP-D-MANNOSE-3'.5'- EPIMERASE*  
LIÊN QUAN ĐẾN TỔNG HỢP VITAMIN C  
TỪ CÂY QUÝT MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ KIM CHI

PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA  
ENZYME *GDP-D-MANNOSE-3'.5'- EPIMERASE*  
LIÊN QUAN ĐẾN TỔNG HỢP VITAMIN C  
TỪ CÂY QUÝT MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM

*Ngành: Sinh học thực nghiệm*

*Mã số: 8.42.01.14*

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm

THÁI NGUYÊN - 2018

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, tháng 11 năm 2018*

**Tác giả**

**Nguyễn Thị Kim Chi**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo thuộc Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm khoa Sinh học đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng DNA ứng dụng, Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi tiến hành các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài luận văn.

Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

*Thái Nguyên, tháng 11 năm 2018*

**Tác giả**

**Nguyễn Thị Kim Chi**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	vi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	3
1.1. Phân loại thực vật học và đặc điểm sinh học của cây quýt .....	3
1.1.1. Phân loại thực vật học cây quýt.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây quýt .....	3
1.1.3. Thành phần dinh dưỡng của quả quýt .....	4
1.2. Con đường sinh tổng hợp ascorbic acid và một số gen, enzyme tham gia tổng hợp ascorbic acid ở thực vật.....	6
1.2.1. Ascorbic acid .....	6
1.2.2. Con đường sinh tổng hợp vitamin C .....	7
1.3. Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền .....	11
<b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	17
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị.....	17
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	17
2.1.2. Hóa chất và thiết bị .....	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	17
2.2.1. Phương pháp thu mẫu.....	17

2.2.2. Phương pháp xác định trình tự gen.....	17
2.3. Phương pháp xử lý số liệu .....	22
2.4. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận văn .....	22
<b>Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>23</b>
3.1. Nhân bản và giải trình tự gen <i>GDP-D</i> từ DNA của giống quýt BS-LS .....	23
3.1.1. Kết quả nhân bản gen <i>GDP-D</i> bằng kỹ thuật PCR .....	23
3.1.2. Kết quả tách dòng gen <i>GDP-D</i> .....	24
3.1.3. Đặc điểm của trình tự gen <i>GDP-D</i> phân lập từ giống quýt BS-LS.....	25
3.2. Sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GDP-D</i> .....	30
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>34</b>
1. Kết luận.....	34
2. Đề nghị.....	34
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>35</b>

## DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>
bp	base pair
CIAA	24 Chloroform: 1 isoamylalcol
CTAB	Cetyl trimetyl amomnium bromide
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleotide acid
DNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
<i>GDP-D</i>	<i>GDP-D-mannose-3'.5'-epimerase</i>
kb	kilo base
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris - Acetate - EDTA

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 2.1.</b>	Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>GDP-D</i> .....	19
<b>Bảng 2.2.</b>	Chu kì nhiệt của phản ứng PCR nhân gen <i>GDP-D</i> .....	19
<b>Bảng 2.3.</b>	Thành phần phản ứng gắn gen <i>GDP-D</i> vào vector tách dòng pBT.....	20
<b>Bảng 2.4.</b>	Thành phần phản ứng colony - PCR.....	21
<b>Bảng 3.1.</b>	Những vị trí nucleotide sai khác giữa hai trình tự nucleotide của gen <i>GDP-D</i> của giống quýt BS-LS và HQ224946.....	27
<b>Bảng 3.2.</b>	Những vị trí amino acid sai khác giữa hai trình tự protein suy diễn của gen <i>GDP-D</i> của giống quýt BS-LS và HQ224946.....	29
<b>Bảng 3.3.</b>	Trình tự gen mang mã số trên GenBank được sử dụng phân tích....	30
<b>Bảng 3.4.</b>	Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của trình tự nucleotide của gen <i>GDP-D</i> phân lập từ giống quýt BS-LS và các trình tự trên GenBank.....	31
<b>Bảng 3.5.</b>	Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của BS-LS và các trình tự trên GenBank dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GDP-D</i> .....	32



## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b>	Các dạng Ascorbic acid trong tự nhiên .....	7
<b>Hình 1.2.</b>	Con đường sinh tổng hợp Ascorbic acid.....	8
<b>Hình 3.1.</b>	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ DNA tổng số của mẫu quýt BS-LS với cặp mồi <i>GDP-D-F</i> và <i>GDP-D-R</i> .....	23
<b>Hình 3.2.</b>	Hình ảnh điện di sản phẩm colony -PCR từ khuẩn lạc .....	24
<b>Hình 3.3.</b>	Đặc điểm trình tự nucleotide của mẫu BS-LS thu được bằng máy xác định trình tự nucleotide tự động .....	25
<b>Hình 3.4.</b>	Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen <i>GDP-D</i> phân lập từ giống quýt BS-LS với trình tự gen <i>GDP-D</i> trên GenBank mang mã số HQ224946.....	27
<b>Hình 3.5.</b>	Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự nucleotide của gen <i>GDP-D</i> phân lập từ giống quýt BS-LS với một số trình tự gen đã công bố trên GenBank .....	28
<b>Hình 3.6.</b>	Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>GDP-D</i> phân lập từ giống quýt BS-LS và từ gen <i>GDP-D</i> mang mã số HQ224946 trên GenBank.....	29
<b>Hình 3.7.</b>	Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ của BS-LS với các trình tự đã công bố trên GenBank dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>GDP-D</i> .....	31
<b>Hình 3.8.</b>	Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ của BS-LS với các trình tự đã công bố trên GenBank dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GDP-D</i> .....	32

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Cây quýt (*Citrus recutilata* Blanco) là giống cây ăn quả được nhiều người biết đến với vị ngọt thanh, mùi thơm đặc trưng, chứa nhiều vitamin, khoáng chất và dinh dưỡng cần thiết cho con người. Quýt được khuyến khích sử dụng hằng ngày bởi các chuyên gia dinh dưỡng.

Quýt không chỉ là nguồn cung cấp chất dinh dưỡng mà còn đóng vai trò tích cực trong phát triển kinh tế ở nhiều địa phương. Trồng quýt đem lại thu nhập cao cho các hộ làm vườn so với các cây nông nghiệp khác, trung bình từ 80 - 100 triệu đồng/ha/năm.

Cây quýt được trồng lâu đời ở miền núi phía Bắc Việt Nam có sự thích nghi sinh thái ở diện hẹp, do đó đòi hỏi khá kỹ tính về điều kiện canh tác, nông hóa thổ nhưỡng hay tiểu vùng khí hậu. Điều này dễ nhận thấy mỗi loại quýt chỉ trồng phù hợp trên một địa bàn đặc hữu với các giống thường gặp như quýt sen (Phú Thọ), quýt hồng (Hà Giang), quýt đường (Lào Cai), quýt Quang Thuận (Bắc Kạn), quýt Bắc Hà (Lào Cai), quýt giấy (Tuyên Quang), quýt Bắc Sơn (Lạng Sơn) [4].

Quả quýt chứa hàm lượng vitamin C cao, khoảng 30mg- 36mg vitamin C trong 100gram quả. Vitamin C tốt cho tóc, da, tiêu hóa, hệ thống miễn dịch và cân bằng trọng lượng cơ thể. Mỗi giống quýt lại có hàm lượng vitamin C khác nhau, điều này ảnh hưởng đến mùi vị, độ chua ngọt của mỗi giống quýt.

Nghiên cứu đặc điểm trình tự các gen tham gia tổng hợp vitamin C, và tìm hiểu sự đa dạng của trình tự các gen này ở các giống quýt địa phương là cơ sở đề xuất sử dụng đa dạng hóa trong việc chọn giống cho vùng trồng chuyên canh.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi lựa chọn đề tài: ***“Phân lập gen mã hóa enzyme GDP-D-mannose-3’.5’- epimerase liên quan đến tổng hợp vitamin C từ cây quýt miền núi phía Bắc Việt Nam.”***