

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

PHẠM THỊ HẰNG

**TẠO DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN
MÃ HÓA LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE
Ở CÂY CHÈ**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 8 42 02 01

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

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. Mọi sự giúp đỡ của các cá nhân và tập thể đều được ghi nhận trong lời cảm ơn.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm về những gì đã cam đoan ở trên.

Tác giả

Phạm Thị Hằng

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **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 TS. Huỳnh Thị Thu Huệ và 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.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả

Phạm Thị Hằng

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI	1
2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI.....	2
3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	2
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÂY CHÈ	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại của cây chè.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học chung của cây chè	4
1.1.3. Thành phần hóa học của chè.....	9
1.2. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT CHÈ TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.....	12
1.2.1. Tình hình sản xuất chè trên thế giới.....	12
1.2.2. Tình hình sản xuất chè ở Việt Nam	13
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CHÈ TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.	14
1.3.1. Tình hình nghiên cứu chè trên thế giới	14
1.3.2. Tình hình nghiên cứu chè ở Việt Nam.....	15
1.4. CATECHINS VÀ LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE Ở CHÈ..	16
1.4.1. Catechins và công dụng của Catechins.....	16
1.4.2. Cơ chế sinh tổng hợp catechins ở chè.....	17
1.4.3. Leucoanthocyanidin reductase (LAR)	19
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. VẬT LIỆU.....	21
2.1.1 Nguyên liệu	21
2.1.2. Hóa chất, thiết bị	21
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.2.1. Phương pháp thu mẫu lá chè.....	22
2.2.2. Phương pháp tách chiết RNA tổng số từ lá chè.....	22

2.2.3. Điện di RNA tổng số.....	23
2.2.4. Tổng hợp cDNA.....	24
2.2.5. Nhân gen <i>CsLARI</i> bằng kỹ thuật RT –PCR	24
2.2.6. Tách dòng gen <i>CsLARI</i>	25
2.2.7. Xác định và phân tích trình tự.....	29
2.2.8. Tạo vector biểu hiện gen <i>CsLARI</i>	30
2.2.9. Biểu hiện gen <i>CsLARI</i>	31
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	32
3.1. KHUẾCH ĐẠI GEN <i>CsLARI</i> TỪ MẪU CHÈ NGHIÊN CỨU	32
3.2. TẠO DÒNG GEN, XÁC ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE	33
3.2.1. Tạo dòng gen <i>CsLARI</i>	33
3.2.2. Xác định và phân tích trình tự gen <i>CsLARI</i>	34
3.3. BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA <i>CsLARI</i> TỪ CHÈ TRUNG DU XANH TRONG VI KHUẨN <i>E. COLI</i>	41
3.3.1. Tạo cấu trúc biểu hiện mang gen <i>CsLARI</i> vào vi khuẩn <i>E. coli</i> DH10B	41
3.3.2. Biểu hiện gen <i>CsLARI</i>	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
KẾT LUẬN	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	46

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
C	Catechin	Catechin
cDNA	DNA bổ sung	Complementary DNA
<i>CsLAR</i>	Gen LAR của chè	<i>Camellia sinensis LAR</i>
DNA	Axit Deoxiribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
Đtg	Đồng tác giả	et al.
EDTA	Axit etylene diamin tetraaxetic	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EtBr	Ethidium Bromide	Ethidium Bromide
EtOH	Etanol	Ethanol
EGCG	Epigallocatechin-3-O-gallate	Epigallocatechin-3-O-gallate
EC	Epicatechin	Epicatechin
ECG	Epicatechin-3-O-gallate	Epicatechin-3-O-gallate
EGC	Epigallocatechin	Epigallocatechin
GC	Gallocatechin	Gallocatechin
IPTG	Chất cảm ứng biểu hiện gen IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
Kb	Kilô bazơ	Kilo base
LAR	Leucoanthocyanidin reductase	Leucoanthocyanidin reductase
LB	Môi trường LB	Luria Bertani
mRNA	ARN thông tin	Messenger Axit Ribonucleic
NCBI	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia	National Center for Biotechnology Information
NAD	Nicotinamid adenine	Nicotinamid adenine

	dinucleotide	dinucleotide
NADP	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate
ORF	Khung đọc mở	Open reading frame
PA	Proanthocyanidin	Proanthocyanidin
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp	Polymerase Chain Reaction
Primer R	Môi ngược	Primer reverse
Primer F	Môi xuôi	Primer forward
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic Acid
RNase	Enzyme phân hủy RNA	Ribonuclease
RT	Enzyme phiên mã ngược	Reverse Transcriptase
SSR	Chất chỉ thị phân tử	Simple sequence repeats
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 HÌNH

Hình 1.1. Các dạng tán chè	5
Hình 1.2. Mầm chè cắt dọc	5
Hình 1.3. Búp chè	6
Hình 1.4. Sơ đồ đợt sinh trưởng	6
Hình 1.5. Các loại lá trên cành chè	7
Hình 1.6. Rễ chè	8
Hình 1.7. Sơ đồ tổng hợp catechins ở chè	18
Hình 2.1. Sơ đồ vector tách dòng pJET 1.2	26
Hình 2.2. Sơ đồ vector biểu hiện pET32a(+)	30
Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu.....	31
Hình 3.1. Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại gen <i>CsLARI</i> từ chè Trung Du xanh	32
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm tách dòng gen <i>CsLARI</i> từ mẫu chè Trung du xanh trong vector pJET1.2	33
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR trong plasmid pJET 1.2.....	34
Hình 3.4. Kết quả so sánh trình tự gen <i>CsLARI</i> phân lập từ mẫu chè Trung du xanh với một số trình tự trên Genbank	36
Hình 3.5. So sánh trình tự amino acid suy diễn của <i>CsLARI</i> từ giống chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố	38
Hình 3.6. Kết quả kiểm tra plasmid	41
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm tách plasmid gắn gen <i>CsLARI</i> vào vector pET32a(+)	42
Hình 3.8. Kết quả cắt kiểm tra plasmid pET32a(+)- <i>CsLARI</i> bằng <i>Bam</i> HI và <i>Xho</i> I và PCR khuếch đại gen <i>CsLARI</i> từ plamid.....	43
Hình 3.9. Kết quả điện di sản phẩm protein tổng số từ chủng Rosetta tạo <i>CsLARI</i> tái tổ hợp	44

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của chè tươi	9
Bảng 1.2. Thành phần độ ẩm thay đổi theo tháng trong năm	11
Bảng 1.3. Diễn biến diện tích, năng suất, sản lượng một số nước trồng chè chính trên thế giới năm 2016.....	12
Bảng 1.4. Tình hình diện tích, năng suất, sản lượng chè ở Việt Nam trong những năm gần đây	14
Bảng 2.1. Thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu	22
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	24
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt thực hiện phản ứng tổng hợp cDNA	24
Bảng 2.4. Trình tự các đoạn mồi sử dụng nhân gen <i>CsLARI</i>	25
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>CsLARI</i>	25
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng tạo đầu bằng sản phẩm PCR.....	26
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng ghép nối giữa đoạn gen <i>CsLARI</i> và vector pJET 1.2	27
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng cắt plasmid.....	29
Bảng 3.1. Sự sai khác một số trình tự nucleotide gen <i>CsLARI</i> của chè Trung du xanh với các trình tự đã công bố trên Genbank	37
Bảng 3.2. Sự sai khác trình tự amino acid của gen mã hóa LAR ở giống chè Trung du xanh với trình tự đã công bố trên Genbank.....	39

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Chè (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) là loại cây công nghiệp lâu năm, có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới và Á nhiệt đới, là cây trồng xuất hiện từ lâu, được trồng khá phổ biến trên thế giới.

Chè là nước uống thông dụng và được mọi người ưa thích không chỉ bởi hương vị độc đáo của nó, mà còn do nước chè rất có lợi cho sức khỏe. Nước chè có tác dụng giải khát, khắc phục được sự mệt mỏi của cơ bắp và hệ thần kinh trung ương, kích thích vỏ đại não làm cho tinh thần minh mẫn sáng khoái, hưng phấn trong những thời gian lao động căng thẳng cả về trí óc và chân tay, ngăn chặn sự phát triển và tiến triển của bệnh Alzheimer [22]. Hơn nữa, uống chè còn kích thích tiêu hoá mỡ, chống béo phì; chống viêm; chống sâu răng, hôi miệng và ung thư vòm họng; phòng ngừa ung thư [18], [36]; phòng ngừa bệnh tăng huyết áp [41]; tiểu đường [20] và ngăn ngừa cholesterol tăng cao [17]. Ngoài ra, chè còn có khả năng bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím [21]. Hầu hết các đặc tính có lợi cho sức khỏe được liệt kê ở trên đã được chứng minh là do các hợp chất polyphenol có trong chè.

Ngoài ra, cây chè còn mang lại nhiều lợi ích kinh tế xã hội như: giải quyết công ăn việc làm, đem lại nguồn thu nhập ổn định cho người dân, cải thiện đời sống nhân dân, thúc đẩy quá trình công nghiệp hóa và hiện đại hóa nông thôn [11]. Theo đánh giá của Unal (2011) có khoảng 2,5 triệu tấn chè khô được sản xuất mỗi năm, trong đó chè đen chiếm khoảng 78%, chè xanh chiếm 20% và chè Olong chiếm 2% [26]. Thành phần hóa học, đặc biệt hàm lượng polyphenol, chất hòa tan sẽ quyết định đến chất lượng sản phẩm chè [3]. Trong đó, catechins chiếm khoảng 30% thành phần polyphenol ở chè. Catechins được chia thành 2 nhóm: catechins được epimer hóa còn gọi là epicatechin (EGCG, ECG, EGC và EC) và catechins không được epimer hóa (GC và C) [27], [30]. Hiện nay, hoạt tính sinh học và cơ chế tổng hợp