

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



NGUYỄN HÀ THU

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN PROTEIN  
AMIDASE ALIPHATIC TỪ  
*Rhodococcus erythropolis* PR4  
VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thái Nguyên - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



NGUYỄN HÀ THU

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN PROTEIN  
AMIDASE ALIPHATIC TỪ  
*Rhodococcus erythropolis* PR4  
VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME**

**Ngành: Công nghệ sinh học  
Mã ngành: 84.20.20.01**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. Phạm Bằng Phương**

**Thái Nguyên - 2018**

**LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Phạm Bằng Phương. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi thông tin trích dẫn trong luận văn đều được chỉ rõ nguồn gốc.

**Tác giả luận văn**

**Nguyễn Hà Thu**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận văn tốt nghiệp ngoài sự nỗ lực, cố gắng của bản thân, tôi đã nhận được sự giúp đỡ, hướng dẫn, chỉ bảo và động viên của thầy cô, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới thầy giáo **TS. Phạm Bằng Phương** người đã trực tiếp hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài cũng như trong quá trình hoàn chỉnh luận văn tốt nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới các thầy cô trong Khoa Công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm đã hướng dẫn và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ làm việc tại Viện khoa học sự sống – Đại học Thái Nguyên đặc biệt là **Th.S Ma Thị Trang** đã tạo điều kiện để giúp đỡ tôi học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, người thân, bạn bè đã luôn động viên, chia sẻ giúp đỡ tôi trong những lúc khó khăn trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

*Tôi xin chân thành cảm ơn!*

*Thái Nguyên, ngày.....tháng.....năm 2018*

**Học viên**

**Nguyễn Hà Thu**

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục đích nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Ý nghĩa của luận văn.....	2
4.1. Ý nghĩa khoa học .....	2
4.2. Ý nghĩa thực tiễn.....	2
<b>CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan chung về nhóm vi khuẩn <i>Rhodococcus</i> .....	3
1.1.1. Đặc điểm của vi khuẩn <i>Rhodococcus</i> .....	3
1.1.2. Khái quát về vi khuẩn <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 và gen mã hóa amidase aliphatic .....	4
1.2. Tổng quan chung về amidase .....	5
1.2.1. Hệ thống phân loại enzyme.....	5
1.2.2. Đặc tính của amidase .....	6
1.2.3. Khả năng thủy phân sinh học .....	8
1.3. Ứng dụng của amidase trong y dược và công nghiệp .....	11
1.3.1. Tổng quan về nhóm phức amide aliphatic .....	11
1.3.2. Ứng dụng của amidase trong y dược .....	13
1.3.3. Ứng dụng của amidase trong công nghiệp và xử lý chất thải chứa amide aliphatic .....	14
1.4. Đặc điểm chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> sử dụng trong tạo dòng và biểu hiện .....	15
1.4.1. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ JM109 .....	15
1.4.2. <i>E. coli</i> BL21 .....	16
1.4.3. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS .....	16
1.4.4. <i>E. coli</i> M15 (pREP4).....	17
1.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước .....	17
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	17

1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	19
<b>CHƯƠNG 2 NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>21</b>
2.1. Đối tượng, phạm vi và vật liệu nghiên cứu.....	21
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	21
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu.....	21
2.1.3. Vật liệu nghiên cứu .....	21
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu .....	24
2.3. Nội dung nghiên cứu .....	24
2.4. Dụng cụ, thiết bị và hóa chất nghiên cứu.....	24
2.4.1. Dụng cụ nghiên cứu .....	24
2.4.2. Thiết bị nghiên cứu .....	24
2.4.3. Hóa chất nghiên cứu.....	25
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.5.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số.....	25
2.5.2. Phương pháp khuếch đại gen PCR.....	26
2.5.3. Phương pháp chuẩn bị tế bào khả biến .....	27
2.5.4. Phương pháp gắn nối gen vào vector .....	28
2.5.5. Phương pháp tách chiết plasmid .....	28
2.5.6. Phương pháp biến nạp.....	29
2.5.7. Phương pháp kiểm tra gắn nối gen.....	30
2.5.8. Phương pháp cảm ứng biểu hiện protein bằng IPTG.....	31
2.5.9. Phương pháp thu nhận protein .....	31
2.5.10. Phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE .....	31
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>33</b>
3.1. Nghiên cứu khuếch đại gen mã hóa amidase aliphatic từ <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 .....	33
3.1.1. Tách chiết ADN hệ gen của <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 .....	33
3.1.2. Khuếch đại gen mã hoá amidase bằng phương pháp PCR .....	34
3.2. Tạo dòng gen mã hóa amidase aliphatic từ <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4.....	35
3.2.1. Vector tạo dòng.....	35

3.2.2. Gắn nối đoạn gen <i>amiE</i> vào vector tạo dòng pGEM T-easy .....	37
3.2.3. Kiểm tra gắn nối bằng enzyme giới hạn .....	37
3.3. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa amidase aliphatic từ <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 .....	38
3.3.1. Thiết kế vector biểu hiện.....	38
3.3.2. Gắn nối đoạn gen <i>amiE</i> vào vector biểu hiện pET28a.....	40
3.3.3. Kiểm tra gắn nối bằng enzyme giới hạn .....	41
3.4. Đánh giá khả năng biểu hiện amidase aliphatic từ <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> PR4 trên vi khuẩn <i>E. coli</i> .....	42
3.5. Kết quả đánh giá sự sinh trưởng của tế bào <i>E. coli</i> tái tổ hợp <i>amiE</i> -PR4.....	43
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>45</b>
1. Kết luận .....	45
2. Kiến nghị .....	45
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>46</b>

## DANH MỤC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

	<b>Tiếng việt</b>	<b>Tiếng nước ngoài</b>
AMP	: Ampicillin	Ampicillin
bp	: Cặp bazơ nitơ	Base pair
CoA	: Coenzyme Acetoacetyl	
Cs	: Cộng sự	
kDa	: Kilo dalton	
ADN	: Deoxyribonucleic Acid	
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>	
EDTA	: Etilendiamin tetraaxetic axit	Etilendiamin tetraaxetic acid
IPTG	: Isopropyl Thiogalactoside	
kb	: Kilo bazơ nitơ	Kilo base
LB	: Laria Broth	
NCBI	: Ngân hàng gen	Nation Centre for Biotechnology Information
PCR	: Khuếch đại gen	Polymerase Chain Recation
<i>R. erythropolis</i>	: <i>Rhodococcus erythropolis</i>	
RE	: Enzyme giới hạn	Restriction enzyme
TAE	: Tris-acetate-EDTA	
TTH	: Tái tổ hợp	
SDS –PAGE	: Điện di SDS- polyacrylamide gel	Sodium dodecyl sulfat - polyacrylamide gel electrophoresis)
X-gal	:5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D- alactoside	



**DANH MỤC CÁC BẢNG**

Bảng 2.1. Các thành phần của vector pGEM® T-easy.....	22
Bảng 2.2. Các thành phần của vector biểu hiện pET-28a(+ ).....	23
Bảng 2.3. Danh mục các thiết bị sử dụng trong đề tài.....	24
Bảng 2.4. Hóa chất sử dụng trong đề tài.....	25
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gen <i>amiE</i> .....	27
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng gắn gen vào vector tách dòng.....	28
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng <i>EcoRI</i> và <i>SalI</i> .....	30
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng cắt mở vòng plasmid.....	30
Bảng 3.1: Kết quả đo độ tinh sạch và nồng độ ADN.....	34

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc X-ray của amidase peptide .....	6
Hình 1.2. Phản ứng xúc tác thủy phân amit hình thành axit và amoniac tương ứng ..	7
Hình 1.3. Cơ chế kiểm soát sự phiên mã của T7 promoter.....	16
Hình 1.4. Sơ đồ ứng dụng sản xuất thuốc kháng HIV .....	20
Hình 2.1. Vector plasmid pGEM <sup>®</sup> T-easy .....	21
Hình 2.2. Vector biểu hiện pET-28a(+)	23
Hình 2.3. Chu kỳ nhiệt khuếch đại gen <i>amiE</i> .....	27
Hình 3.1. Hình ảnh điện di ADN hệ gen được tách chiết từ.....	33
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4.....	33
Hình 3.2. Hình ảnh điện di đoạn gen <i>amiE</i> được khuếch đại từ ADN hệ gen.....	34
Hình 3.3. Hình ảnh điện di đoạn gen <i>amiE</i> đã tinh sạch.....	35
Hình 3.4. Hình ảnh điện di vector pGEM T-easy .....	35
Hình 3.5. Vector pGEM T-easy- <i>amiE</i> thiết kế trên phần mềm NTI.....	36
Hình 3.6. Hình ảnh điện di vector tạo dòng tách chiết.....	37
Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt các dòng plasmid có khả năng mang gen <i>amiE</i> .....	38
Hình 3.8. Hình ảnh điện di vector pET28a và pET28a cắt mở vòng.....	39
Hình 3.9. Hình ảnh điện di đoạn gen <i>amiE</i> thu nhận từ vector tạo dòng.....	39
Hình 3.10. Vector pET28a- <i>amiE</i> thiết kế trên phần mềm NTI.....	40
Hình 3.11. Hình ảnh điện di sản phẩm gắn nối <i>amiE</i> vào pET28a.....	41
Hình 3.12. Hình ảnh điện di plasmid tách chiết từ các dòng khuẩn lạc.....	41
nghỉ mang gen <i>amiE</i> .....	41
Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid nghỉ mang gen <i>amiE</i> .....	42
Hình 3.14. Hình ảnh điện di protein được cảm ứng biểu hiện trong tế bào <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS .....	43
Hình 3.15. Đánh giá sự sinh trưởng của tế bào <i>E. coli</i> tái tổ hợp <i>amiE</i> -PR4 .....	44