

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

**NGUYỄN THỊ HƯƠNG**

**TẠO CHỨNG VI KHUẨN *E. COLI* CÓ KHẢ NĂNG  
SẢN XUẤT LYCOPENE**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Chuyên ngành Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 60.46.30**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Ngô Xuân Bình**

**Thái Nguyên, 2011**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành khóa luận tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ, 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: PGS. TS Ngô Xuân Bình, Th.S Dương Văn Cường, đã giúp đỡ và hướng dẫn 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 lãnh đạo trường Đại học Sư phạm, khoa Sau đại học, bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ gen - Viện Khoa học Sự sống, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN và các thầy cô giáo, cán bộ khoa Sinh - KTNN đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

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

**Tác giả luận văn**

**Nguyễn Thị Hương**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực, chưa được công bố trong bất kì công trình nào khác.

**Tác giả**

Nguyễn Thị Hương

## MỤC LỤC

|   |          |
|---|----------|
| <b>Mở đầu .....</b>   | <b>1</b> |
| 1. Đặt vấn đề .....   | 1        |
| 2. Mục tiêu nghiên cứu.....   | 2        |
| 3. Nội dung nghiên cứu .....  | 2        |
| <b>Chương I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>  | <b>4</b> |
| 1.1. Nhóm chất carotenoid .....   | 4        |
| 1.1.1. Cấu trúc và tính chất của carotenoid .....   | 4        |
| 1.1.2. Vai trò của carotenoid trong thực tiễn.....  | 4        |
| 1.2. Sắc tố lycopene .....  | 6        |
| 1.2.1. Cấu trúc và tính chất của lycopene .....   | 6        |
| 1.2.2. Vai trò của sắc tố lycopene với con người.....   | 8        |
| 1.2.2.1. Vai trò của lycopene đối với sức khỏe con người.....                                     | 8        |
| 1.2.2.2. Vai trò của lycopene trong công nghiệp .....   | 9        |
| 1.2.3. Con đường sinh tổng hợp lycopene trong tự nhiên.....                                       | 10       |
| 1.2.4. Các phương pháp sản xuất lycopene hiện nay .....   | 12       |
| 1.2.4.1. Sản xuất lycopene từ thực vật .....  | 12       |
| 1.2.4.2. Sản xuất lycopene bằng phương pháp tổng hợp hóa học.....                                 | 13       |
| 1.2.4.3. Sản xuất lycopene bằng phương pháp điều hướng trao đổi chất (Metabolic engineering)..... | 15       |
| 1.3. Vi khuẩn <i>P. ananatis</i> và nhóm gene carotenoid .....                                    | 17       |
| 1.4. Vi khuẩn <i>E. coli</i> và gene <i>idi</i> .....   | 19       |
| 1.5. Tình hình nghiên cứu về lycopene trong và ngoài nước.....                                    | 19       |
| 1.5.1. Các nghiên cứu trên thế giới .....   | 19       |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....  | 21        |
| <b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>  | <b>23</b> |
| 2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị .....  | 23        |
| 2.1.1. Vật liệu nghiên cứu .....   | 23        |
| 2.1.2. Hóa chất và thiết bị .....  | 23        |
| 2.1.2.1. Hóa chất dùng cho tách dòng gene .....  | 23        |
| 2.1.2.2. Hóa chất dùng cho gắn nối gene vào vector .....   | 27        |
| 2.1.2.3. Thiết bị .....  | 28        |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu .....  | 29        |
| 2.4.1. Phương pháp tách dòng và xác định trình tự gene .....   | 30        |
| 2.4.1.1. Nuôi phục hồi khuẩn .....   | 30        |
| 2.4.1.2. Thành phần và chu trình phản ứng PCR .....  | 30        |
| 2.4.1.3. Tinh sạch DNA từ bản gel sau khi điện di .....  | 31        |
| 2.4.1.4. Gắn sản phẩm PCR vào vector tách dòng .....   | 31        |
| 2.4.1.5. Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt.....                               | 31        |
| 2.4.1.6. Tách chiết DNA plasmid thu được .....   | 32        |
| 2.4.1.7. Cắt DNA plasmid bằng enzyme giới hạn .....  | 32        |
| 2.4.1.8. Giải trình tự DNA và so sánh với các trình tự đã công bố .....  | 33        |
| 2.4.2. Phương pháp thiết kế vector biểu hiện pRSET-iEIB .....  | 33        |
| 2.4.4. Phương pháp biểu hiện các gene trong <i>E. coli</i> BL21(DE3) và phân tích lycopene bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) ..... | 36        |
| 2.2.3.1. Phương pháp biểu hiện các gene trong <i>E. coli</i> BL21(DE3).....  | 36        |
| 2.2.3.2 Phân tích lycopene bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....  | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>   | <b>37</b> |
| 3.1. Kết quả tách dòng các gene <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i> và <i>crtB</i> .....   | 37        |
| 3.1.1. Kết quả nhân gene <i>crtE</i> , <i>crtI</i> , <i>crtB</i> từ vi khuẩn <i>P. ananatis</i> và gene <i>idi</i> từ hệ gene của vi khuẩn <i>E. coli</i> ..... | 37        |
| 3.1.2. Kết quả chọn lọc các dòng plasmid mang gene đích .....   | 37        |
| 3.1.3. Kiểm tra sự bảo toàn các vị trí cắt enzyme giới hạn của các gene trong thiết kế polycistron. ....  | 39        |
| 3.1.3.1. Kiểm tra sự bảo toàn các vị trí cắt enzyme giới hạn gene <i>idi</i> .....  | 40        |
| 3.1.3.2. Kiểm tra sự bảo toàn các vị trí cắt enzyme giới hạn gene <i>crtE</i> .....   | 41        |
| 3.1.3.3. Kiểm tra sự bảo toàn các vị trí cắt enzyme giới hạn gene <i>crtI</i> .....   | 42        |
| 3.1.4. Kết quả xác định trình tự .....  | 43        |
| 3.2. Kết quả thiết kế vector biểu hiện .....  | 52        |
| 3.2.1. Kết quả thiết kế vector pR-i .....   | 52        |
| 3.2.1.1. Kết quả chọn lọc dòng và kiểm tra plasmid tái tổ hợp pR-i .....  | 52        |
| 3.2.1.2. Kiểm tra chiều gắn của gene <i>idi</i> trong vector vector pR-i .....  | 53        |
| 3.2.2. Kết quả thiết kế vector pR-iE .....  | 54        |
| 3.2.3. Kết quả thiết kế vector pR-iEI .....   | 56        |
| 3.2.3. Kết quả thiết kế vector pR-iEIB .....  | 57        |
| 3.3. Kết quả biểu hiện pR-iEIB trong <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....  | 59        |
| 3.4. Kết quả phân tích lycopene trong dịch cảm ứng.....   | 60        |
| <b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>  | <b>62</b> |
| Kết luận.....   | 62        |
| Đề nghị.....  | 62        |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>  | <b>63</b> |

## DANH MỤC CÁC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

|            |   |
|------------|---|
| BLAST      | Basic Local Alignment Search Tool   |
| Amp        | Ampicillin  |
| Bp         | Base pair - Cặp bazơ nitơ   |
| PCR        | Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi trùng hợp  |
| NCBI       | National Center for Biotechnology Information-Trung tâm thông tin quốc gia về thông tin công nghệ sinh học. |
| DMAPP      | Dimethylallyl diphosphate   |
| DNA        | Deoxyribonucleic Acid   |
| <i>DXS</i> | 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase   |
| dNTP       | Deoxynucleotide Triphosphate  |
| FPP        | Farnesyl diphosphate  |
| GPP        | Geranyl diphosphate   |
| GGPP       | Geranylgeranyl diphosphate  |
| NB         | Nutrient Broth  |
| IPP        | Isopentenyl diphosphate   |
| IPTG       | Isopropyl Thiogalactoside   |
| Kb         | Kilo base - Kilo bazơ nitơ  |
| LB         | Luria Broth   |
| MEP        | C-methyl-D-erythritol 4-phosphate   |
| MVA        | Mevalonate  |
| X-gal      | 5-bromo-4-chloro-3-indoly- $\beta$ -D-galactoside   |
| HPLC       | High Performance Liquid Chromatography- Sắc ký lỏng hiệu năng cao   |

## DANH MỤC HÌNH

|  |    |
|--|----|
| Hình 1.1: Biểu đồ đánh giá thị trường carotenoid toàn cầu năm 2007 và 2015 (BCC, 2008).....  | 6  |
| Hình 1.2: Cấu trúc của tất cả các dạng đồng phân trans-lycopene và một số đồng phân - cis. ....  | 7  |
| Hình 1.3: Quá trình sinh tổng hợp lycopene trong vi khuẩn E. coli từ các tiền chất trung tâm IPP và DMAPP sử dụng con đường MVA và MEP. .... | 11 |
| Hình 1.4: Sơ đồ tổng hợp công nghiệp hợp chất lycopene. ....   | 14 |
| Hình 1.5: Con đường tổng hợp lycopene trong E. coli sử dụng các gene ngoại lai   | 16 |
| Hình 1.6: Con đường sinh tổng hợp lycopene trong P. ananatis   | 18 |
| Hình 1.7: Màu của khuẩn lạc carotenoid   | 18 |
| Hình 2.1: Cấu trúc vector tách dòng pLUG <sup>®</sup> TA-cloning   | 26 |
| Hình 2.2: Các vị trí enzyme giới hạn trên vị trí đa tách dòng của vector pLUG <sup>®</sup> TA-cloning  | 26 |
| Hình 2.3: Cấu trúc vector biểu hiện pRSET-A  | 27 |
| Hình 2.4: Sơ đồ quy trình tách dòng và xác định trình tự gene  | 29 |
| Hình 2.5: Sơ đồ phương pháp thiết kế vector pRSETA-iEIB.....   | 34 |
| Hình 3.1: Kết quả PCR nhân dòng gene (A) <i>idi</i> , [1] <i>crtE</i> , (C) <i>crtI</i> và (D) <i>crtB</i> .....                             | 37 |
| Hình 3.2: Kết quả cắt plasmid bằng <i>HindIII</i>  | 38 |
| Hình 3.3: Sơ đồ thiết kế vector pRSET-IEIB   | 39 |
| Hình 3.4: Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng (A) <i>BamHI</i> và (B) phối hợp <i>BamHI</i> và <i>NdeI</i>                              | 40 |
| Hình 3.5: Kết quả cắt độc lập từng enzyme <i>XhoI</i> (A) và <i>BamHI</i> (B)  | 41 |
| Hình 3.6: Kết quả cắt với từng enzyme <i>XhoI</i> , <i>KpnI</i>  | 42 |



|  |    |
|--|----|
| Hình 3.7: Kết quả so sánh trình tự gene <i>idi</i> đã tách dòng với trình tự gene <i>idi</i> đã công bố trên ngân hàng gene .....                  | 43 |
| Hình 3.8: Kết quả so sánh trình tự gene <i>crtE</i> (trong pLE4) đã tách dòng với trình tự gene <i>crtE</i> đã công bố trên ngân hàng gene .....   | 46 |
| Hình 3.9: Kết quả so sánh trình tự gene <i>crtI</i> (trong pL-I2) đã tách dòng với trình tự gene <i>crtI</i> đã công bố trên ngân hàng gene .....  | 49 |
| Hình 3.10: Kết quả so sánh trình tự gene <i>crtB</i> (trong pL-B1) đã tách dòng với trình tự gene <i>crtB</i> đã công bố trên ngân hàng gene ..... | 51 |
| Hình 3.11: Kết quả điện di kiểm tra các dòng plasmid .....   | 52 |
| Hình 3.12: Kết quả cắt plasmid dòng số 4 bằng NdeI và BamHI .....  | 53 |
| Hình 3.13: Hình minh họa cơ sở kiểm tra chiều gắn gene <i>idi</i> trong pR-i .....   | 54 |
| Hình 3.14: Kết quả cắt pR-i bằng <i>BamHI</i> + <i>HindIII</i> .....   | 54 |
| Hình 3.15: Kết quả điện di kiểm tra các dòng plasmid .....   | 55 |
| Hình 3.16: Kết quả cắt kiểm tra plasmid pR-iE .....  | 55 |
| Hình 3.17: Kết quả điện di sàng lọc plasmid của các dòng khuẩn lạc sản phẩm biến nạp <i>crtI</i> và pR-iE .....                                    | 56 |
| Hình 3.18: Kết quả cắt kiểm tra plasmid pR-iEI .....   | 57 |
| Hình 3.19: Kết quả điện di plasmid sản phẩm biến nạp <i>crtB</i> và pR-iEI .....   | 58 |
| Hình 3.20: Kết quả cắt pR-iEIB với <i>EcoRI</i> .....  | 58 |
| Hình 3.21: Biểu hiện sản xuất lycopene trên dòng tế bào <i>E. coli</i> BL21 (DE3) mang vector pR-iEIB.....   | 59 |
| Hình 3.22: Sắc ký đồ dung dịch mẫu chuẩn.....  | 60 |
| Hình 3.22: Sắc ký đồ dung dịch mẫu cảm ứng 12 giờ.....   | 60 |
| Hình 3.22: Sắc ký đồ dung dịch mẫu cảm ứng 24 giờ.....   | 60 |

## DANH MỤC BẢNG BIỂU

|  |    |
|--|----|
| Bảng 1.1: Một số carotenoid được sử dụng làm phụ gia trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.....                       | 5  |
| Bảng 1.2: Phân phối lycopene trong cơ thể người .....  | 8  |
| Bảng 1.3: Mức độ sử dụng lycopene công nghiệp thực phẩm (Theo thống kê của Công ty các sản phẩm dinh dưỡng DSM)..... | 10 |
| Bảng 1.4: Hàm lượng lycopene trong một số loại rau quả .....   | 12 |
| Bảng 1.5: Sử dụng kỹ thuật điều hướng trao đổi chất sản xuất lycopene trong một số vi sinh vật .....                 | 16 |
| Bảng 1.6: Các gene <i>crt</i> trong vi khuẩn <i>P. ananatis</i> và chức năng tương ứng .....                         | 17 |
| Bảng 2.1: Trình tự và thông tin về các cặp mồi .....   | 24 |
| Bảng 2.2 : Các thành phần của vector pLUG <sup>®</sup> TA-cloning .....  | 26 |
| Bảng 2.3: Các thành phần của vector pRSET – A .....  | 28 |
| Bảng 3.1: Khoảng tuyến tính và đường chuẩn.....  | 61 |
| Bảng 3.2: Kết quả phân tích lycopene.....  | 61 |