

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

CHU THỊ HOA

**TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA CHITINASE CỦA
BACILLUS LICHENIFORMIS KNUC213 TRONG NẤM MEN *PICHIA*
*PASTORIS***

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 30

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Hà Nội – 2012

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phí Quyết Tiến-người thầy đã dìu dắt tôi những bước đi đầu tiên trên con đường nghiên cứu khoa học, truyền đạt cho tôi những kiến thức, chỉ bảo tận tình và có những đóng góp mới mẻ, sâu sắc về lĩnh vực nghiên cứu. Đồng thời, thầy cũng tạo điều kiện tốt nhất về thời gian và điều kiện làm việc khi tôi thực hiện những nghiên cứu trong luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Văn Hiếu, KS. Quách Ngọc Tùng và tập thể cán bộ Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học đã tận tình hướng dẫn thí nghiệm, thường xuyên chỉ bảo kiến thức chuyên môn, góp ý cho luận văn và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp tôi học tập và rèn luyện trong suốt quá trình thực tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo trong khoa Sinh trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giảng dạy và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành khóa luận.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tạo mọi điều kiện về mặt thời gian, luôn động viên khích lệ tôi trong quá trình học tập.

Bên cạnh đó, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn yêu thương, ủng hộ, động viên giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập để tôi có được kết quả như ngày hôm nay.

Hà Nội, ngày 24 tháng 12 năm 2012

Học viên

Chu Thị Hoa

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tên đầy đủ
Amp	Ampicillin
Bp	Base pair
CHI	Chitinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleic triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
EtBr	Ethidium Bromide
GlcN	N- glucosamine
GlcNAc	N- acetylglucosamine
LB	Môi trường Luria Bertani
OD	Optical Density (mật độ quang)
PCR	Polymerase chain reaction
rCHI	Chitinase tái tổ hợp
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAE	Đệm Tris – Acetate – EDTA
TE	Đệm Tris – EDTA
YPD	Môi trường Yeast – Peptone – Dextrose
YPDS	Môi trường Yeast – Peptone – Dextrose - Sorbitol

DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1	Gen <i>chi</i> mã hóa chitinase từ các chủng <i>Bacillus licheniformis</i>	8
1.2	Tình hình nghiên cứu chitinase trên thế giới	15
3.1	Đặc điểm nuôi cấy của chủng vi khuẩn KNUC213 trên môi trường thạch khác nhau	35
3.2	Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa của chủng KNUC213 khi sử dụng kit API 50 CHB sau 48 giờ nuôi cấy ở 37°C	37
3.3	Ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ muối, pH đến khả năng phát triển của chủng <i>B. licheniformis</i> KNUC213	38
3.4	Kết quả so sánh độ tương đồng trình tự amino acid của endochitinase từ <i>B. licheniformis</i> KNUC213 (AEQ55312) với các trình tự amino acid của chitinase tương ứng từ các chủng <i>B. licheniformis</i> khác được đăng ký trên GenBank (NCBI)	43
3.5	So sánh hoạt tính enzyme chitinase của các chủng nghiên cứu tại các thời điểm khác nhau	48
3.6	Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính rCHI của chủng nấm men <i>P. pastoris</i> Y2	54

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CHITIN	3
1.1.1. Cấu trúc hóa học của chitin.....	3
1.1.2. Vai trò và ứng dụng của chitin.....	4
1.2. CHITINASE.....	5
1.2.1. Giới thiệu về chitinase	5
1.2.2. Cơ chế thủy phân chitin	5
1.2.3.2. Dựa vào phản ứng phân cắt.....	6
1.2.3.3. Căn cứ vào cấu trúc phân tử.....	7
1.2.4. Cấu trúc phân tử chitinase.....	8
1.2.5. Nguồn thu nhận chitinase.....	9
1.2.5.1. Chitinase từ thực vật.....	9
1.2.5.2. Chitinase từ động vật.....	10
1.2.5.3. Chitinase từ vi sinh vật.....	10
1.2.5.4. Chitinase từ vi sinh vật tái tổ hợp.....	11
1.2.6. Vai trò và ứng dụng của chitinase.....	12
1.2.7. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của chitinase.....	13
1.2.7.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	13
1.2.7.2. Ảnh hưởng của pH	14
1.2.7.3. Ảnh hưởng của ion kim loại.....	14
1.2.8. Tình hình nghiên cứu chitinase trên thế giới và Việt Nam.....	15

1.2.8.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	15
1.2.8.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam.....	17
1.3. BIỂU HIỆN CHITINASE TRONG <i>PICHA PASTORIS</i>	18
1.3.1. Đặc điểm của hệ biểu hiện <i>P. pastoris</i>	18
1.3.2. Vector biểu hiện ở pPICZ α A.....	20
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.1. VẬT LIỆU.....	22
2.1.1. Các chủng sinh vật và plasmid.....	22
2.1.2. Hóa chất, enzyme, thiết bị nghiên cứu.....	22
2.1.3. Các dung dịch sử dụng và môi trường nghiên cứu.....	22
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	24
2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của vi khuẩn KNUC213.....	24
2.2.2. Tách DNA tổng số của vi khuẩn <i>Bacillus licheniformis</i> KNUC213...25	25
2.2.3. Khuếch đại gen <i>chi</i> mã hóa chitinase của <i>B. licheniformis</i> KNUC21325	25
2.2.4. Điện di DNA trên gel agarose.....	27
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR.....	27
2.2.6. Cắt và ghép nối gen.....	27
2.2.7. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào <i>E. coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt...28	28
2.2.8. Tách chiết plasmid từ vi khuẩn.....	29
2.2.9. Giải trình tự gen <i>chi</i>	29
2.2.10. Thiết kế vector biểu hiện gen <i>chi</i> trong <i>P. pastoris</i>	30
2.2.11. Biến nạp vector tái tổ hợp vào <i>P. pastoris</i> X33 bằng phương pháp xung điện.30	30
2.2.12. Biểu hiện rCHI.....	31
2.2.13. Tách chiết enzyme ngoại bào.....	32
2.2.14. Điện di protein trên gel polyacrylamide-SDS.....	32
2.2.15. Xác định hoạt tính của enzyme chitinase.....	32
2.2.16. Xác định đặc tính của rCHI.....	34

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	36
3.1. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN KNUC213	36
3.1.1. Đặc điểm nuôi cấy.....	36
3.1.2. Đặc điểm hình thái tế bào	37
3.1.3. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa.....	37
3.2. TÁCH DÒNG GEN <i>chi</i> MÃ HÓA CHITINASE CỦA CHỦNG <i>B. licheniformis</i> KNUC213	40
3.2.1. Tách DNA tổng số	40
3.2.2. Khuếch đại gen <i>chi</i> bằng kỹ thuật PCR	40
3.2.3. Tách dòng gen <i>chi</i> trong vector pJET1.2/blunt.....	41
3.2.4. Giải và phân tích trình tự gen <i>chi</i> của <i>B. licheniformis</i> KNUC213	43
3.3. BIỂU HIỆN GEN <i>chi</i> MÃ HÓA CHITINASE TỪ CHỦNG <i>B. licheniformis</i> KNUC213 TRONG <i>P. pastoris</i> X33	45
3.3.1. Thiết kế vector biểu hiện pPICZ α A:: <i>chi</i>	45
3.3.2. Tạo chủng <i>P. pastoris</i> tái tổ hợp có khả năng biểu hiện rCHI	46
3.3.3. Biểu hiện rCHI bởi chủng <i>P. pastoris</i> Y2.....	48
3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	51
3.4.2. Ảnh hưởng của pH	52
3.4.3. Ảnh hưởng của ion kim loại.....	54
CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
KẾT LUẬN	56
KIẾN NGHỊ	57
Phụ lục 1: Sơ đồ cấu trúc plasmid pJET1.2/blunt	62
Phụ lục 2: Sơ đồ cấu trúc plasmid pPICZ α A	63
Phụ lục 3: Khả năng sử dụng các nguồn cacbon của chủng <i>Bacillus licheniformis</i> KNUC213	65
Phụ lục 4: Trình tự gen <i>chi</i> của chủng <i>Bacillus licheniformis</i> KNUC213.....	66

MỞ ĐẦU

Chitin là polyme sinh học không phân nhánh, được cấu thành từ các đơn vị N-acetyl D-glucosamin (GlcNAc) thông qua liên kết β -(1,4)-glucozit. Chitin rất phổ biến, phân bố rộng rãi trong tự nhiên chỉ sau cellulose và đóng vai trò là polysaccharide cấu trúc của các sinh vật như: thành tế bào của nấm, khung vỏ ngoài của động vật chân đốt, vỏ ngoài của các loài giáp xác và giun tròn.... Một trong những phương pháp chuyển hóa chitin tạo các dẫn xuất mạch ngắn chitin-oligosaccharide có giá trị kinh tế và ứng dụng cao, an toàn đối với con người và môi trường là sử dụng enzyme chitinase.

Chitinase (EC 3.2.1.14) là enzyme phân hủy cơ chất chitin không hòa tan trong nước thành các sản phẩm chitooligosaccharide hòa tan thông qua quá trình thủy phân liên kết β -(1,4)-glucozit. Hiện nay, chitinase được ứng dụng chủ yếu trong sản xuất chitooligosaccharide, nano-chitin, N-acetyl D-glucosamine. Đây là những sản phẩm giá trị ứng dụng cao và được sử dụng trong thực phẩm, nông nghiệp, y dược, kháng nấm và côn trùng. Ngoài ra, chitinase còn được sử dụng như thuốc trừ sâu sinh học trong nông nghiệp nhờ khả năng phân hủy chitin cấu trúc trong thành tế bào của nấm, côn trùng gây bệnh và xử lý các chất thải giàu chitin...

Theo các công bố trên thế giới, chitinase có thể thu nhận từ nhiều nhóm vi sinh vật như: vi khuẩn (*Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Alteromonas* sp...), nấm sợi (*Trichoderma* sp., *Gliocladium virens*, *Fusarium chlamyosporum*, *Trichothecium roseum*, *Stachybotry elegans*, *Talaromyces flavus*,...), xạ khuẩn (*Streptomyces griseus*, *Str. plicatus*, *Str. lydicus*...). Tuy nhiên, chitinase thu nhận từ các chủng tự nhiên thường không ổn định, hoạt tính không cao, chứa nhiều loại chitinase khác nhau (nhóm exochitinase và endochitinase) ảnh hưởng đến phổ sản phẩm thủy phân chitin cũng như quy mô thu nhận và ứng dụng chitinase nhằm tạo ra các sản phẩm chuyển hóa của chitin.

Hiện nay, nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới đã nâng cao hiệu suất của quá trình sản xuất chitinase bằng cách tạo ra các chủng vi sinh vật tái tổ hợp. Cho đến nay gen *chi* mã hóa chitinase từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau đã được biểu hiện thành công trong nấm men, vi khuẩn; trong đó hệ thống biểu hiện trên nấm men *Pichia pastoris* đang được sử dụng rộng rãi do có các đặc tính: nuôi cấy đơn giản, đạt sinh khối cao trên môi trường khoáng rẻ tiền, dễ dàng nâng cấp quy mô sản xuất, dễ điều khiển hệ thống biểu hiện enzyme nhờ quá trình cảm ứng... Xuất phát từ những tiềm năng ứng dụng của chitinase và ưu điểm của hệ thống biểu hiện trên *P. pastoris*, chúng tôi đã thực hiện đề tài: “Tách dòng và biểu hiện gene mã hóa chitinase của *B. licheniformis* KNUC213 trong *Pichia pastoris*” nhằm nâng cao quá trình sinh tổng hợp endochitinase có hoạt tính cao, tạo tiền đề cho sản xuất enzyme ở quy mô lớn.

Đề tài được thực hiện tại phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam với các nội dung chính sau:

- Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn KNUC213 có hoạt tính chitinase nhằm khai thác nguồn gen.
- Tách dòng và phân tích trình tự gen *chi* mã hóa chitinase của chủng *B. licheniformis* KNUC213.
- Biểu hiện gen *chi* mã hóa chitinase của chủng *B. licheniformis* KNUC213 trong *P. pastoris* X33.
- Bước đầu nghiên cứu một số tính chất của chitinase tái tổ hợp (rCHI).

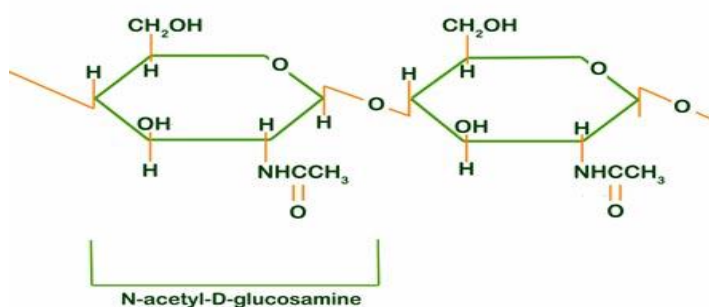
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CHITIN

1.1.1. Cấu trúc hóa học của chitin

Chitin là polyme sinh học không phân nhánh, cấu thành từ các đơn vị N-acetyl D-glucosamine (GlcNAc) thông qua liên kết β -(1-4)-glycosyl (Hình 1.1). Chitin là một trong các polymer sinh học phổ biến nhất trong tự nhiên chỉ đứng sau cellulose (cấu trúc hóa học của chitin gần giống với cellulose) và đóng vai trò là polysaccharide cấu trúc của các sinh vật như: thành tế bào của nấm, khung vỏ ngoài của động vật chân đốt, vỏ ngoài của các loài giáp xác và giun tròn. Trong cấu trúc của chitin, nhóm (-OH) ở nguyên tử C₂ được thay thế bằng nhóm axetyl amino (-NHCOCH₃).

Liên kết β -(1-4)-glycosyl của mỗi đơn phân trong cấu trúc của chitin lệch nhau một góc 180° tạo nên mạch xoắn và loại liên kết này kém bền, dễ bị cắt đứt bởi tác nhân có tính axit hay enzyme [7]. Cấu tạo hóa học của chitin được thể hiện trong hình 1.1. Công thức phân tử của chitin: (C₈H₁₃O₅N)_n, Khối lượng phân tử: (203,09)_n với thành phần các nguyên tố: C = 47,29%; H = 6,4%; O = 39,4%; N = 6,91%.



Hình 1.1. Công thức cấu tạo hóa học của chitin

Các nghiên cứu nhiễu xạ sử dụng tia X cho thấy, chitin tồn tại dưới ba dạng α -, β - và γ -chitin do sự khác nhau về sắp xếp của các nhánh phân tử bên trong tinh thể chitin. Trong α -chitin, các nhánh được sắp xếp theo hướng đối song (antiparallel), β -chitin gồm các nhánh song song và γ -chitin được hình thành từ hỗn hợp hai loại α -chitin và β -chitin. Trong ba loại trên thì α -chitin là