VIỆN HÀN LÂM KH&CN VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

----------*----------**

LUẬN VĂN CAO HỌC

Mã số chuyên ngành: 60420103

Đề tài:

Nghiên cứu biểu hiện gen *cry2* mã hóa protein diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* trong vi khuẩn *Escherichia coli*

Học viên: Đặng Văn Tiến

Lớp: CHST _ K15

Hướng dẫn: PGS.TS Ngô Đình Bính

Hà Nội, 2013

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT v
DANH MỤC CÁC BẢNG viii
DANH MỤC CÁC HÌNH ix
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN 3
1.1. Tổng quan về Bacillus thuringiensis. 3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu và ứng dụng của Bacillus thuringiensis. *3*
1.1.2. Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng Bt ở Việt Nam. *4*
1.1.3. Vị trí, đặc điểm hình thái và sinh thái học Bt. *5*
1.1.3.2. Đặc điểm hình thái. *6*
1.1.3.3. Đặc điểm sinh hóa. *7*
1.1.4. Đặc điểm phân loại. *7*
1.1.5. Hệ gen của vi khuẩn Bacillus thuringiensis. *11*
1.1.6. Cơ chế tác động của protein tinh thể diệt côn trùng. *15*
1.2. Tổng quan về gen cry2. 17
1.3. Tổng quan về côn trùng thử nghiệm. 18
1.3.1. Phân loại khoa học của ruồi nhà (Musca domestica). *19*
1.3.2. Vòng đời của ruồi nhà (Musca domestica) *19*
1.3.3. Ảnh hưởng của ruồi đối với sức khỏe cộng đồng. *21*
1.3.4. Một số phương pháp diệt và phòng chống ruồi hiện nay. *22*
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP 24
2.1. Vật liệu. 24
2.1.1. Sinh phẩm. *24*
2.1.2. Hóa chất và thiết bị. *24*
2.2. Phương pháp nghiên cứu. 27

2.2.1. Phân loại Bacillus thuringiensis bằng phương pháp huyết thanh miễn dịch.....27
2.2.2. Phương pháp thử hoạt tính sinh học. 27
2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn. 29
2.2.4. Phương pháp tinh sạch plasmid của E. coli......30
2.2.5. Phương pháp PCR khuếch đại gen cry2A......30
2.2.6.Phương pháp điện di trên gel agarose. 30
2.2.7. Phương pháp tách dòng gen cry2......31
2.2.8. Phương pháp xác định trình tự nucleotit của đoạn gen đã tách dòng. 32
2.2.9. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 12,6 %.....32
2.2.10. Phương pháp biểu hiện gen 34
2.2.11. Khảo sát điều kiện biểu hiện thích hợp cho quá trình biểu hiện 34
2.2.12. Xác định khả năng hoà tan của protein 35
2.2.13. Tinh chế protein dung hợp bằng cột Probond Nikel Resin 35
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....37
3.1. Xác định hình dạng tinh thể của các chủng *Bacillus thuringiensis* nghiên cứu. 37
3.2. Phân loại các chủng *Bacillus thuringiensis* bằng kit huyết thanh miễn dịch....38
3.3. Xác định nồng độ bào tử và thử hoạt tính ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* của các chủng Bt phân lập được. 40
3.4. Phát hiện gen *cry2A* từ các chủng *Bacillus thuringiensis* đã phân loại huyết thanh bằng phương pháp PCR. 42
3.5. Tách dòng và đọc trình tự gen *cry2A.* 43
3.5.1. Tách dòng gen cry2A. 43
3.5.2. Đọc trình tự gen cry2A.....45
3.6. Nghiên cứu biểu hiện gen *cry2A* trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3).....48
3.6.1.Thiết kế vector biểu hiện mang gen cry2A 48
3.6.2. Gắn đoạn gen cry2A vào vector biểu hiện pET22b(+).....49

3.6.3. Tạo chủng E. coli BL21 tái tổ hợp mang gen cry2A.....*50*
3.6.3.2. Kiểm tra sự tồn tại của cry2A trong plasmid tái tổ hợp.....*50*
3.6.4. Nghiên cứu biểu hiện gen cry2A trong E. coli BL21.....*54*
3.7. Tinh chế protein tái tổ hợp bằng cột sắc kí ái lực Probond Nikel Resin.....*58*
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....60
4.1. Kết luận.....60
4.2. Kiến nghị.....61
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....62

Lời cảm ơn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Ngô Đình Bính là người thầy đã hướng cho tôi những ý tưởng khoa học, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể phòng Di truyền Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và bản luận án này.

Tôi xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã chia sẻ, động viên, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành tốt công việc nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bè bạn, những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tác giả

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực.

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Tác giả

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
1	Bp	Base pair
2	*Bt*	*Bacillus thuringiensis*
3	CFU	Colony Forming Unit
4	dH_2O	Deion water
5	DNA	Deoxyribonucleotide acid
6	dNTP	deoxyribo Nucleotide 5'- Triphosphate
7	ĐC	Đối chứng
8	*E. coli*	*Escherichia coli*
9	EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid
10	EtBr	Ethidium Bromide
11	kDa	Kilo Dalton
12	OD	Optical density - mật độ quang học
13	PCR	Polymerase Chain Reaction - phản ứng chuỗi
14	SDS	Sodium dodecyl sulphate
15	Sol	Solution
16	TE	Tris EDTA
17	X-gal	5- bromo- 4 Cloro- 3 indolyl β- d galactoside

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Sự phân loại *Bt* dựa vào kháng nguyên tiên mao H.

Bảng 2.1: Trình tự cặp mồi khuếch đại gen cry2A

Bảng 3.1: Sự phân bố hình dạng tinh thể của các chủng *Bt.*

Bảng 3.2: Kết quả phân loại dưới loài các chủng *Bacillus thuringiensis* bằng phương pháp huyết thanh.

Bảng 3.3: Kết quả thử hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* của các chủng *Bt* sau 5 ngày thử nghiệm

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Tế bào vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Hình 1.2. Tế bào vi khuẩn Bt với tinh thể (Crystal) và bào tử (Spore)

Hình 1.3. Mô hình cấu trúc chung của một protein tinh thể độc tố Cry.

Hình 1.5. Ruồi nhà (Con ruồi đực - Bên trái; Con ruồi cái - bên phải)

Hình 1.6. Vòng đời của ruồi nhà (*Musca domestica)*

Hình 1.7. Trứng của ruồi nhà (*Musca domestica*)

Hình 3.1. Hình dạng bào tử và tinh thể của vi khuẩn Bt

Hình 3.2. Hình ảnh ngưng kết của chủng MSS8.4 phân lập với typ huyết thanh dưới kính hiển vi quang học

Hình 3.3. Ảnh thử hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* của các chủng Bt phân lập

Hình 3.4. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%

Hình 3.5. Biến nạp vector tái tổ hợp *pCR2.1*- cry2A vào vi khuẩn *E.coli* DH5α

Hình 3.6. Điện di sản phẩm cắt DNA plasmide từ các dòng khuẩn lạc *pCR2.1* - cry2A - LNT7.12 và *pCR2.1* - cry2A - MSS8.4 trên agarose 1%.

Hình 3.7. Điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cry2A

Hình 3.8. So sánh trình tự gen của 2 chủng MSS8.4 và LNT7.12 với AJ488143.1

Hình 3.9. sơ đồ thiết kế vector biểu hiện gen cry2A

Hình 3.10. Điện di sản phẩm cắt mở vòng vector *pET22b(+)*

Hình 3.11. Điện di sản phẩm cắt đoạn gen cry2A từ vector tái tổ hợp *pCR2.1* – cry2A

Hình 3.12. Khuẩn lạc của *E. coli* DH5α trên môi trường LBA

Hình 3.13. Điện di plasmid từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5a trên gel 1 % agarose

Hình 3.16. Trình tự acid amin của protein *Cry2A* trên lý thuyết

Hình 3.17. Khuẩn lạc của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 trên môi
Hình 3.18. Điện di sự biểu hiện protein rCry2A trên gel 12,6 % polyacrylamide
Hình 3.19. Điện di protein tái tổ hợp Cry2A theo nhiệt độ trên gel 12,6 % polyacrylamide
Hình 3.20. Điện di biểu hiện protein tái tổ hợp Cry2A theo nồng độ IPTG
Hình 3.21. Điện di mẫu protein Cry2A theo thời gian trên gel 12,6 % polyacrylamide
Hình 3.22. Điện di protein sau khi tinh sạch trên gel 12,6 % polyacrylamide