

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**  
**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**  
-----\*\*\*-----

**Nguyễn Thanh Ngọc**

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA DẠNG HỆ VI KHUẨN VÀ KHAI THÁC CÁC  
TRÌNH TỰ DNA MÃ HÓA ENZYM THỦY PHÂN LIGNOCELLULOSE  
TỪ DỮ LIỆU METAGENOME HỆ VI KHUẨN RUỘT MÔI BẬC THẤP  
*COPTOTERMES GESTROI***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**HÀ NỘI – 2013**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**  
**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**  
-----\*\*\*-----

**Nguyễn Thanh Ngọc**

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA DẠNG HỆ VI KHUẨN VÀ KHAI THÁC CÁC  
TRÌNH TỰ DNA MÃ HÓA ENZYM THỦY PHÂN LIGNOCELLULOSE  
TỪ DỮ LIỆU METAGENOME HỆ VI KHUẨN RUỘT MỐI BẠC THẤP  
*COPTOTERMES GESTROI***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
GS. TS. Trương Nam Hải

HÀ NỘI – 2013

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS. TS. Trương Nam Hải - Trưởng phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt thời gian qua.

Trong quá trình thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự chỉ bảo chuyên môn nhiệt tình của TS. Đỗ Thị Huyền, sự hỗ trợ chuyên môn quý giá của NCS. Nguyễn Thị Thảo, ThS. Lê Quỳnh Giang và TS. Nguyễn Cường cũng như sự động viên tinh thần của tập thể cán bộ nghiên cứu tại phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nhân dịp hoàn thành luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình tới sự giúp đỡ quý báu đó.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến những người thân trong gia đình và bạn bè đã động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và làm việc vừa qua.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 01 tháng 10 năm 2013

**Nguyễn Thanh Ngọc**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và không trùng lặp với các đề tài khác. Tôi cũng xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ trong việc thực hiện đề tài đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đã được ghi rõ nguồn gốc.

**Ký tên**

**Nguyễn Thanh Ngọc**

## MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	i
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	v
MỞ ĐẦU .....	1
<b>Chương 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Tổng quan về mối – “cỗ máy” sản xuất enzym thủy phân lignocellulose hiệu quả.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại mối.....	3
1.1.2. Cấu tạo ruột mối và hệ vi sinh vật trong ruột mối .....	4
<b>1.2. Lignocellulose – sinh khối phế phụ phẩm nông lâm nghiệp và hệ enzym thủy phân lignocellulose.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Cấu trúc lignocellulose.....	12
1.2.2. Enzym thủy phân lignocellulose .....	15
<b>1.3. Metagenomics – công cụ hữu hiệu để nghiên cứu đa dạng sinh vật khu hệ mini sinh thái và khai thác gen .....</b>	<b>20</b>
1.3.1. Khái quát về phương pháp metagenomics.....	20
1.3.2. Các cách tiếp cận trong nghiên cứu metagenomics .....	21
1.3.3. Ứng dụng metagenomics trong nghiên cứu đa dạng sinh học và khai thác gen.....	23
<b>Chương 2 – VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Vật liệu và hóa chất nghiên cứu .....</b>	<b>25</b>
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu .....	25
2.1.2. Hóa chất.....	25
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. Phương pháp thu nhận ruột mối.....	26

2.2.3.	<i>Phương pháp tách DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột mới</i>	26
2.2.3.	<i>Tinh sạch DNA metagenome bằng kỹ thuật troubleshooting</i>	28
2.2.4.	<i>Phương pháp điện di DNA trên gel agarose</i>	28
2.2.5.	<i>Phân tích và khai thác dữ liệu DNA metagenome bằng các công cụ tin sinh</i>	29
<b>Chương 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b>		<b>31</b>
3.1.	<i>Tách chiết DNA metagenome hệ vi khuẩn cộng sinh trong ruột C. gestroi</i>	31
3.1.1.	<i>Thu nhận mẫu ruột mới C. gestroi</i>	31
3.1.2.	<i>Tách chiết và tinh sạch DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột mới</i>	32
3.2.	<i>Phân tích dữ liệu DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột mới C. gestroi</i>	36
3.3.	<i>Đa dạng hệ vi khuẩn cộng sinh trong ruột mới C. gestroi</i>	41
3.4.	<i>Khai thác các trình tự DNA mã hóa enzym thủy phân lignocellulose từ dữ liệu metagenome của hệ vi khuẩn ruột mới C. gestroi</i>	45
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b>		<b>53</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>		<b>54</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN</b>		<b>64</b>
<b>PHỤ LỤC</b>		<b>65</b>

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Bp	Cặp bazơ
DNA	Axít deoxyribonucleic
GHF	Họ Glycosyl hydrolase
ORF	Khung đọc mở
PBS	Đệm phosphate buffered saline
rRNA	Axít ribonucleic ribosome

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1: Chất lượng trình tự DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột mối.....	36
Bảng 3.2: Kết quả lắp ráp tạo contig theo các thông số <i>k</i> -mer khác nhau .....	37
Bảng 3.3: Số liệu các trình tự đọc được dùng để lắp ráp contig khi sử dụng các tham số <i>k</i> -mer khác nhau .....	38
Bảng 3.4: Kết quả so sánh trình tự DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột mối <i>C. gestroi</i> với các ngân hàng dữ liệu genome.....	39
Bảng 3.5: Bảng chú giải gen từ dữ liệu metagenome hệ vi khuẩn ruột mối <i>C. gestroi</i> .	40
Bảng 3.6: Đa dạng loài các vi sinh vật (đã được định tên) cộng sinh trong <i>C. gestroi</i> .	41
Bảng 3.7: Đa dạng loài một số ngành vi khuẩn sống cộng sinh trong ruột mối <i>C. gestroi</i> .....	45
Bảng 3.8: Số liệu về các ORF mã hóa enzym thủy phân lignocellulose có nguồn gốc từ vi khuẩn cộng sinh trong ruột mối <i>C. gestroi</i> .....	49



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Sơ đồ phân loại môi. ....	3
Hình 1.2: Cấu tạo ruột môi.....	4
Hình 1.3: Sơ đồ cấu trúc bậc hai của thành tế bào thực vật.....	12
Hình 1.4: Cấu trúc vi sợi và sợi cellulose và vị trí của chúng trong thành tế bào thực vật .....	13
Hình 1.5: Các đơn vị cấu trúc của chuỗi carbohydrate (cellulose, hemicellulose) và lignin .....	14
Hình 1.6: Quy trình sản xuất cồn sinh học từ nguyên vật liệu lignocellulose. ....	15
Hình 1.7: Một số enzym hemicellulase tham gia vào quá trình phân hủy hemicellulose .....	17
Hình 1.8: Các họ enzym cellulose tham gia vào quá trình thủy phân sợi cellulose .....	20
Hình 3.1: Môi thợ <i>C. gestroi</i> trong dịch PBS lạnh và thao tác mổ môi.....	31
Hình 3.2: Ruột môi <i>C. gestroi</i> sau tách được giữ trong dịch PBS .....	31
Hình 3.3: Ảnh điện di DNA metagenome hệ vi sinh vật ruột môi .....	33
Hình 3.4: Ảnh điện di DNA metagenome hệ vi sinh vật cộng sinh trong ruột môi sau tinh sạch bằng phương pháp troubleshooting.....	34
Hình 3.5: Ảnh điện di lượng DNA metagenome thu được sau tinh sạch bằng phương pháp troubleshooting và băng kít.....	35
Hình 3.6: Ảnh điện di kiểm tra độ ổn định của DNA metagenome được tinh sạch bằng kít và phương pháp troubleshooting .....	35
Hình 3.7: Ảnh điện di mẫu DNA metagenome hệ vi khuẩn ruột môi gửi đi giải trình tự .....	35
Hình 3.8: Quy trình xử lý dữ liệu giải trình tự metagenome hệ vi khuẩn ruột môi.....	36
Hình 3.9: Cách sắp xếp lại các đoạn trình tự ngắn để tạo thành các contig .....	37
Hình 3.10: Đồ thị phân bố kích thước và số lượng các contig thu được .....	38
Hình 3.11: Đa dạng vi sinh vật cộng sinh trong ruột môi <i>C. gestroi</i> .....	41
Hình 3.12: Đa dạng các ngành vi khuẩn sống cộng sinh trong ruột môi <i>C. gestroi</i> .....	43

Hình 3.13: Các ORF mã hóa enzym lignocellulase của hệ vi khuẩn cộng sinh trong ruột môi <i>C. gestroi</i> .....	46
Hình 3.14: Kết quả tìm kiếm các trình tự tương đồng với các cellulase được mã hóa bởi các ORF hoàn thiện.....	51
Hình 3.15: Kết quả tìm kiếm các trình tự tương đồng với các hemicellulase được mã hóa bởi các ORF hoàn thiện.....	51