

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN MẠNH HÀ

**NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA
ĐỘT BIẾN TRONG VÙNG ĐIỀU KHIỂN HỆ GEN TY THỂ
VÀ BỆNH UNG THƯ PHỔI**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Hà Nội - 2013

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN MẠNH HÀ

**NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA
ĐỘT BIẾN TRONG VÙNG ĐIỀU KHIỂN HỆ GEN TY THỂ
VÀ BỆNH UNG THƯ PHỔI**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. LÊ QUANG HUẤN

Hà Nội – 2013

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, em xin bày tỏ lòng biết ơn và lời cảm ơn trân trọng nhất tới các bệnh nhân đã hiến mẫu cho nghiên cứu này.

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Quang Huấn đã tạo điều kiện cũng như tận tình chỉ bảo và động viên trong suốt thời gian thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Em xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ hết sức quý báu cả về kiến thức lẫn tinh thần từ tập thể phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học.

Trong suốt thời gian khóa luận, em đã nhận được sự giúp đỡ vô cùng quý báu của TS.BS Đào Huyền Quyên, Khoa Sinh Hóa Bệnh viện Bạch Mai. Em xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới chị.

Nhân dịp này em cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy, cô, bạn bè và gia đình đã chỉ dẫn và giúp đỡ em trong suốt thời gian qua.

Hà Nội, ngày 9 tháng 12 năm 2013

Học viên

Trần Mạnh Hà

MỤC LỤC

	Trang
LỜI MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu.....	2
3. Nội dung	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Giới thiệu chung về ty thể	3
1.1.1. Cấu trúc ty thể	4
1.1.2. Chức năng của ty thể	5
1.1.3. Hệ gen ty thể.....	6
1.1.4. Sự phân chia ty thể và quá trình sao chép gen ty thể.....	9
1.2. Di truyền gen ty thể và đột biến gen ty thể liên quan đến bệnh học	11
1.2.1. Di truyền gen ty thể	11
1.2.2. Đột biến gen ty thể liên quan đến bệnh học	12
1.3. Mối liên quan giữa ung thư phổi và đột biến gen ty thể.....	14
1.3.1. Giới thiệu chung về ung thư	14
1.3.1.1. Định nghĩa ung thư và dịch tế học ung thư.....	14
1.3.1.2. Cơ chế và nguyên nhân gây ung thư	15
1.3.2. Ung thư phổi.....	18
1.3.2.1. Giới thiệu về ung thư phổi và tình hình dịch tế.....	18
1.3.2.2. Nguyên nhân gây ung thư phổi và quá trình phát triển ung thư phổi.....	20
1.3.3. Mối liên quan của chức năng của ty thể và sự phát triển ung thư	21
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Vật liệu	23
2.1.1. Sinh phẩm.....	23
2.1.2. Hóa chất.....	23
2.2. Trang thiết bị	23
2.3. Phần mềm tin sinh học	24
2.4. Phương pháp nghiên cứu	25
2.4.1. Phương pháp tách chiết DNA từ mẫu máu.....	25

2.4.2.	Định lượng DNA tách chiết bằng phương pháp quang phổ kế	26
2.4.3.	Nhân đoạn gen bằng PCR.....	26
2.4.4.	Phương pháp giải trình tự	30
2.4.5.	Phương pháp phân tích chất lượng dữ liệu trình tự.....	31
2.4.6.	Phương pháp tìm đột biến gen.....	32
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....		33
3.1.	Kết quả tách chiết DNA	33
3.2.	Kết quả nhân gen PCR	35
3.3.	Kết quả giải trình tự gen.....	38
3.4.	Kết quả phân tích đột biến.....	40
3.5.	Thảo luận	41
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....		43
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		44

THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

Bp	Base pair (Cặp base)
DNA	Deoxyribonucleic acid
D-loop	Displacement loop
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
HV	Hypervariable regions
kb	kilo base
mtDNA	Mitochondrial Deoxyribonucleic acid(DNA ty thể)
OD	Optical Density (mật độ quang)
PCR	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi tổng hợp nhờ enzyme Polymerase)
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosome Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Standard saline citrate
TAE	Tris - Acetate - EDTA
TE	Tris - EDTA
Tm	Melting Temperature (nhiệt độ nóng chảy)
tRNA	Transfer Ribonucleic acid

DANH SÁCH CÁC HÌNH VẼ

Danh mục hình	Tên hình	Trang
1.1	Cấu trúc ty thể	4
1.2	Quá trình sinh tổng hợp ATP trong ty thể	5
1.3	Cấu trúc hệ gen ty thể	7
1.4	Sự phân chia ty thể	10
1.5	Cơ chế sao chép mtDNA	11
1.6	Di truyền ty thể theo dòng mẹ	12
1.7	Cơ chế phát triển ung thư	15
1.8	Quá trình chết theo chương trình của tế bào	17
1.9	Sự phát triển của ung thư phổi	20
2.1	Sơ đồ nguyên lý PCR	28
2.2	Các bước của một chu kỳ PCR	29
2.3	Kiểm tra chất lượng tín hiệu dựa trên dữ liệu trình tự	31
2.4	Kiểm tra chất lượng giải mã trình tự bằng phương pháp phổ thông	32
3.1	Kết quả tách chiết DNA tổng số	33
3.2	Đồ thị kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo OD	35
3.3	Trình tự vùng D-loop và vị trí bắt cặp môi	36
3.4	Sản phẩm PCR kiểm tra trên gel agarose 1%	38
3.5	Kết quả giải trình tự trên một số mẫu bệnh và mẫu đối chứng	40
3.6	Kết quả phân tích đột biến	41

DANH SÁCH BẢNG BIỂU

Danh mục bảng	Tên bảng	Trang
1.1	So sánh mã di truyền của gen nhân và gen ty thể	8
1.2	Các triệu chứng của ung thư phổi	18
2.1	Danh sách các trang thiết bị sử dụng cho nghiên cứu	24
2.2	Phần mềm sử dụng	24
2.3	Sơ đồ nguyên lý PCR	30
3.1	Kết quả kiểm tra độ tinh sạch DNA bằng phương pháp OD	34
3.2	Thành phần dùng cho 1 phản ứng PCR	37
3.3	Chương trình thực hiện phản ứng PCR	37

LỜI MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Từ những năm 1805 ty thể được các nhà khoa học phát hiện là một cấu trúc ngoài nhân tế bào (Ernster and Schatz, 1981). Sau gần 100 năm nghiên cứu kéo dài, mối liên hệ của ty thể và hô hấp tế bào được xác định và ngày nay ty thể được đánh giá là “trung tâm năng lượng của tế bào” (“Powerhouse of the Cell”). Ngoài ra, một trong những phát hiện đột phá về ty thể là việc xác định được sự tồn tại của vật liệu di truyền ty thể vào những năm đầu thập kỷ 60 của thế kỷ trước. Từ đó đến nay, các nghiên cứu trong lĩnh vực ty thể đã phát triển mạnh từ giải trình tự hệ gen ty thể, nghiên cứu chức năng cơ bản của ty thể và những bệnh liên quan tới rối loạn chức năng ty thể.

Tầm ảnh hưởng của ty thể tới sự phát triển bệnh ung thư ngày càng được giới nghiên cứu công nhận. Các đột biến của mtDNA (Mitochondrial Deoxyribonucleic) đã được phát hiện ở các bệnh ung thư như ung thư bàng quang, ung thư phổi, ung thư đại tràng, ung thư cổ và đầu, ung thư thận, gan, phổi, dạ dày và ung thư máu ác tính. Quan trọng hơn, vùng D-loop (displacement loop) của hệ gen ty thể lại là nơi có tần suất đột biến cao, đặc biệt là tại các vùng siêu biến như HV1 (hypervariable regions). Vì vậy đột biến tại vùng D-loop tiềm ẩn nhiều mối liên quan tới phát triển ung thư.

Ung thư phổi trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng là bệnh phổ biến và nguy hiểm trong tất cả các loại ung thư. Đây là bệnh có tiên lượng xấu bởi tiến triển nhanh, di căn sớm, phát hiện bệnh thường ở giai đoạn muộn. Ung thư phổi thường không có triệu chứng đặc biệt và có thể có các đặc điểm giống như ở các bệnh lý khác gây ra. Vì vậy việc tiến hành các chẩn đoán y học tin cậy là rất cần thiết. Việc xác định trình tự nucleotide vùng điều khiển DNA ty thể được xem là công cụ hữu hiệu để đánh giá sự liên quan mật thiết giữa tỉ lệ đột biến vùng điều khiển gen ty thể với sự phát triển, biểu hiện

ung thư phổi. Trong khuôn khổ luận văn này, chúng tôi tiến hành “**Nghiên cứu mối liên quan giữa đột biến trong vùng điều khiển hệ gen ty thể và bệnh ung thư phổi**”

2. Mục tiêu

- Giải trình tự vùng D-loop tách chiết từ mẫu bệnh phẩm (máu) của bệnh nhân ung thư phổi tại bệnh viện Bạch Mai – Hà Nội – Việt Nam và người khỏe mạnh.
- So sánh trình tự đoạn gen HV1 vùng D-loop với các trình tự tham khảo công bố trên ngân hàng gen và tìm điểm đột biến đặc trưng cho bệnh nhân ung thư phổi ở Việt Nam.
- Đề xuất chức năng đột biến gen ty thể liên quan tới bệnh ung thư phổi.

3. Nội dung

- Tách chiết DNA tổng số từ máu của bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi và người bình thường.
- Nhân đoạn gen HV1 thuộc vùng D-loop.
- Xác định và phân tích trình tự gen vùng HV1 của các mẫu bệnh phẩm và mẫu đối chứng. So sánh các trình tự với trình tự chuẩn Cambridge Reference Sequence (CRS) để tìm ra điểm đột biến sai khác.