

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

Vũ Thị Hiền

**NÂNG CAO HIỆU SUẤT BIỂU HIỆN
CỦA TEV PROTEASE TRONG VI KHUẨN *E.coli*
BẰNG PROTEIN DUNG HỢP SUPER FOLDER
GREEN FLUORESCENT PROTEIN (sfGFP)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ

Hà Nội – 2013

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

Vũ Thị Hiền

**NÂNG CAO HIỆU SUẤT BIỂU HIỆN
CỦA TEV PROTEASE TRONG VI KHUẨN *E.coli*
BẰNG PROTEIN DUNG HỢP SUPER FOLDER
GREEN FLUORESCENT PROTEIN (sfGFP)**

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số : 06 42 30

LUẬN VĂN THẠC SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. ĐỒNG VĂN QUYỀN

Hà Nội – 2013

LỜI CẢM ƠN!

Tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới TS. Đồng Văn Quyền, Trưởng phòng Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Đinh Duy Kháng và các cán bộ Phòng Vi sinh vật học phân tử đã đồng viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu đề tài này.

Tôi xin cảm ơn các thầy, cô thuộc Viện Công nghệ Sinh học, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật đã giúp đỡ và chỉ bảo tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, nơi tôi làm việc, đã tạo điều kiện tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận văn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè đã giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Học viên

Vũ Thị Hiền

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Stt	Từ viết tắt	Tên đầy đủ
1	Ala	Alanin
2	bp	Base pair
3	APS	Amonium persulfat
4	Arg	Arginin
5	Asn	Asparagin
6	Asp	Aspartic acid
7	bp	Base pair
8	CBB	Coomassie brilliant blue
9	Cys	Cystein
10	Đc	Đường chạy
11	DNA	Deoxyribonucleic Acid
12	DTT	Dithiothreitol
13	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
14	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
15	EtBr	Ethidium bromid
16	Gln	Glutamin
17	Glu	Acid glutamic
18	Gly	Glycin
19	GST	Glutathione transferase
20	His	Histidin
21	TEV	Tobacco Etch Virus
22	TEVp	Tobacco Etch Virus protease
23	GFP	Green Fluorecent Protein
24	sfGFP	Super folder Green Fluorecent Protein
25	sfGFP-TEVp	Super folder Green Fluorecent Protein- Tobacco Etch Virus protease

26	IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
27	kDa	Kilo Dalton
28	LB	Luria Bertani
29	NaOAc	Sodium acetate
30	OD	Optical Density
31	PCR	Polymerase chain reaction
32	PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
33	SDS	Sodium dodecyl sulfate
34	TAE	Tris- acid acetic – EDTA
35	TEMED	N, N, N', N'- tetramethyl- ethylenediamine
36	v/ v	Volume/ volume: thể tích/ thể tích
37	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

DANH MỤC BẢNG

STT	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1	Chức năng dự đoán của các protein trong TEV.	
Bảng 2.1	Thành phần phản ứng cắt gen <i>sfGFP-TEVp</i> bằng enzyme giới hạn.	
Bảng 2.2	Thành phần phản ứng cắt vector pET21(a+) bằng enzyme giới hạn.	
Bảng 2.3	Thành phần phản ứng gắn gene vào vector biểu hiện.	
Bảng 2.4	Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE.	
Bảng 2.5	Thành phần phản ứng cắt GP120 tái tổ hợp bằng <i>sfGFP-TEVp</i> .	

DANH MỤC HÌNH

STT	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Quá trình đồng biểu hiện và xử lý sau dịch mã của TEV	
Hình 1.2	Cấu trúc không gian của TEV protease	
Hình 1.3	Cấu trúc không gian của GFP	
Hình 1.4	Đỉnh kích thích huỳnh quang (nét liền) và đỉnh huỳnh quang phát ra (nét đứt) của GFP tự nhiên từ <i>A. victoria</i>	
Hình 2.1	Sơ đồ minh họa các bước trong nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch sfGFP-TEVp.	
Hình 2.2	Sơ đồ minh họa quá trình loại bỏ đuôi TRX khỏi protein dung hợp GP120- TRX nhờ sfGFP-TEV protease.	
Hình 2.3	Sơ đồ thể hiện quá trình thiết kế vector biểu hiện chứa gene mã hóa sfGFP-TEVp.	
Hình 3.1	Sơ đồ thể hiện quá trình thiết kế vector biểu hiện chứa gene mã hóa sfGFP-TEVp.	
Hình 3.2	Điện di sản phẩm PCR khuếch đại genesfGFP-TEV protease	
Hình 3.3	Điện di plasmid và sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bởi <i>Nde</i> I và <i>Xho</i> I.	
Hình 3.4	Trình tự nucleotide gene sfGFP-TEVp và trình trình tự acid amin suy diễn	
Hình 3.5	Kết quả biểu hiện sfGFP-TEVprotease	
Hình 3.6	Kết quả biểu hiện sfGFP-TEV protease ở các nhiệt độ khác nhau	
Hình 3.7	Kết quả xác định trạng thái tồn tại của protein sfGFP-TEVp khi biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau.	
Hình 3.8	Kết quả biểu hiện sfGFP-TEVp ở các thời gian cảm ứng khác nhau	
Hình 3.9	Kết quả biểu hiện sfGFP-TEVp ở các nồng độ IPTG	

Hình 3.10 Kết quả tinh sạch sfGFP-TEV_p tái tổ hợp

Hình 3.11 Điện di đồ kết quả kiểm tra hoạt tính của sfGFP-TEV.

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Đại cương về Protease	3
1.1.1. Khái niệm protease	3
1.1.2. Phân loại protease	3
1.2. TEV protease.....	6
1.2.1. Giới thiệu chung về Tobacco Etch Virus.....	6
1.2.2. Nguồn gốc, phân loại và vai trò của TEV protease trong đời sống của virus.	7
1.2.4. Cấu trúc của TEV protease	8
1.2.5. Cơ chất đặc hiệu và điều kiện hoạt động	9
1.2.6. Ưu điểm và hạn chế của TEV protease	11
1.2.7. Tình hình nghiên cứu TEV protease tái tổ hợp trong và ngoài nước	11
1.3. Tổng quan về Green Fluorescent Protein (GFP).....	13
1.3.1. Đặc điểm cơ bản của GFP	13
1.3.2. Super folder GFP và các biến thể khác của GFP	15
1.4. Hệ thống dùng để biểu hiện TEVp.....	17
1.4.1. Hệ thống biểu hiện E.coli.....	17
1.4.2. Vector biểu hiện pET.....	17
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. Vật liệu	19
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	19
2.1.2. Hoá chất và sinh phẩm.....	19
2.1.3. Trang thiết bị và máy móc	20
2.2. Phương pháp nghiên cứu	20
2.2.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gene mã hóa sfGFP-TEVp	21
2.2.2. Phương pháp cắt bằng enzyme giới hạn	21
2.2.3. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose.....	22

2.2.4. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào khả biến <i>E.coli</i>	23
2.2.5. Tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn <i>E.coli</i>	24
2.2.6. Phương pháp biểu hiện protein tái tổ hợp trong <i>E. coli</i>	25
2.2.7. Phương pháp xác định trạng thái tồn tại của TEVp	25
2.2.8. Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide	26
2.2.9. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cột Probond Nickel- Chelating Resin	27
2.4.11. Định lượng protein bằng phương pháp Bradford	28
2.2.11. Phương pháp thử hoạt tính của sfGFP-TEV protease	29
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. Thiết kế vector biểu hiện psfGFP-TEVp	31
3.2. Kiểm tra khung đọc của gene sfGFP-TEVp trong vector pET21(a+)	34
3.3. Kết quả biểu hiện sfGFP-TEVp trong <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star™	35
3.4. Tối ưu hoá các điều kiện biểu hiện	36
3.3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy	37
3.3.2 Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG	39
3.3.3 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	39
3.5. Kết quả tinh chế sfGFP-TEVp	41
3.6. Kiểm tra hoạt tính của sfGFP-TEVp	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	47