

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

NGUYỄN HỮU QUÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH CỦA CHITINASE
TỰ NHIÊN VÀ BIỂU HIỆN CHITINASE TÁI TỔ HỢP
TỪ CHỦNG NẤM *LECANICILLIUM LECANII***

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, 2015

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

NGUYỄN HỮU QUÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH CỦA CHITINASE
TỰ NHIÊN VÀ BIỂU HIỆN CHITINASE TÁI TỔ HỢP
TỪ CHỦNG NẤM *LECANICILLIUM LECANII***

Chuyên ngành: **Hóa sinh học**

Mã số: **62 42 01 16**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Quyền Đình Thi**

PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh

Thái Nguyên, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Quyền Đình Thi, PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, sự giúp đỡ của các cán bộ Phòng Công nghệ Sinh học Enzyme, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần kết quả đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành dưới sự cho phép của các đồng tác giả, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ các công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả luận án

Nguyễn Hữu Quân

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới PGS.TS. Quyền Đình Thi đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện hóa chất, thiết bị và hỗ trợ kinh phí để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh đã chỉ bảo, sửa luận án để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và đồng nghiệp Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ, hợp tác và chia sẻ kinh nghiệm chuyên môn cho tôi trong quá trình tiến hành thực nghiệm đề tài.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của đề tài “Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm từ nấm *Lecanicillium* spp. để diệt rệp muội (Aphididae) gây hại cây trồng” thuộc chương trình Công nghệ sinh học của Bộ Nông nghiệp & Phát triển nông thôn do PGS.TS. Quyền Đình Thi và TS. Vũ Văn Hạnh làm chủ nhiệm, 2010-2013.

Tôi xin cảm ơn Khoa Khoa học Sự sống, Phòng Đào tạo Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin cảm ơn Ban chủ nhiệm Khoa Giáo dục Trung học cơ sở, Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Phòng Khoa học Công nghệ và Hợp tác quốc tế, Ban Giám hiệu Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên và các bạn đồng nghiệp đã ủng hộ, tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận án.

Lời cảm ơn sau cùng tôi xin dành cho gia đình và những người thân, bạn bè đã luôn động viên giúp đỡ, tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình làm nghiên cứu sinh.

Tác giả luận án

Nguyễn Hữu Quân

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
DANH MỤC BẢNG.....	xii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
4. Những đóng góp mới của luận án.....	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	5
1.1. Nấm <i>Lecanicillium lecanii</i>	5
1.2. Chitinase	5
1.2.1. Nguồn gốc của chitinase.....	6
1.2.2. Phân loại chitinase.....	7
1.2.3. Cấu trúc và trung tâm hoạt động của chitinase.....	9
1.2.4. Cơ chế phản ứng của chitinase.....	12
1.2.5. Các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính của chitinase.....	14
1.2.6. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp chitinase.....	16

1.3. Ứng dụng của nấm <i>L. lecanii</i> và chitinase.....	19
1.3.1. Trong lĩnh vực nông nghiệp và bảo vệ môi trường.....	19
1.3.2. Trong lĩnh vực y học.....	23
1.3.3. Trong lĩnh vực công nghệ sinh học.....	24
1.4. Một số nghiên cứu về gen và biểu hiện gen mã hóa chitinase.....	25
1.4.1. Trên thế giới.....	25
1.4.2. Ở Việt Nam.....	29
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	33
2.1. Vật liệu và hóa chất.....	33
2.1.1. Chủng giống.....	33
2.1.2. Thiết bị.....	33
2.1.3. Hóa chất.....	33
2.1.4. Dung dịch và đệm.....	34
2.1.5. Môi trường nuôi cấy.....	34
2.1.6. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận án	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	33
2.2.1. Phương pháp nuôi cấy.....	33
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu trên enzyme/protein.....	35
2.2.3. Các phương pháp sinh học phân tử.....	42
2.2.4. Các phương pháp thử nghiệm.....	47
2.2.7. Xử lý số liệu.....	49
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	50
3.1. Sàng lọc, kiểm tra và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp chitinase	

từ nấm <i>L. lecanii</i>.....	50
3.1.1. Sàng lọc chủng nấm <i>L. lecanii</i> sinh tổng hợp chitinase cao.....	50
3.1.2. Kiểm tra chủng nấm <i>L. lecanii</i> 43H dựa vào đoạn gen 28S rRNA...	50
3.1.3. Khảo sát điều kiện sinh tổng hợp chitinase.....	53
3.2. Tinh sạch và đánh giá đặc tính lý hóa của chitinase từ chủng nấm <i>L. Lecanii</i> 43H.....	61
3.2.1. Tinh sạch chitinase.....	61
3.2.2. Đánh giá đặc tính lý hóa của chitinase từ chủng nấm <i>L. lecanii</i> 43H.....	64
3.3. Nhân dòng gen mã hóa chitinase từ chủng nấm <i>L. lecanii</i> 43H.....	67
3.4. Biểu hiện, tinh sạch và đánh giá tính chất lý hóa của rChit trong nấm men <i>P. pastoris</i> X33.....	71
3.4.1. Thiết kế plasmid pPChit biểu hiện gen <i>Chit</i> trong nấm men.....	71
3.4.2. Biểu hiện chitinase tái tổ hợp trong nấm men <i>P. pastoris</i>	72
3.4.3. Tinh sạch rChit.....	77
3.4.4. Đánh giá đặc tính lý hóa của rChit từ nấm men <i>P. pastoris</i> X33.....	79
3.5. Thử nghiệm khả năng ức chế rệp và nấm bệnh của chitinase và bào tử từ nấm <i>L. lecanii</i>.....	85
3.5.1. Ảnh hưởng của chitinase tới sự phát triển của nấm bệnh hại cây trồng.....	85
3.5.2. Ảnh hưởng của rChit tới khả năng phát triển của rệp.....	87
3.5.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phát triển của sợi nấm.....	88
3.5.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm.....	89
3.5.5. Khả năng diệt rệp của chủng nấm <i>L. lecanii</i> 43H.....	90

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	93
1. KẾT LUẬN.....	93
2. KIẾN NGHỊ.....	93
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN...	94
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	95
DANH MỤC PHỤ LỤC.....	114

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BLAST	Basic local alignment search tool	Phần mềm so sánh trình tự
bp	Base pair	Cặp bazơ
cDNA	Complement DNA	DNA bổ sung
<i>Chit</i>	Gene encoding chitinase	Gen mã hóa chitinase
CMC	Carboxyl methyl cellulose	Carboxyl methyl cellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonate	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
DNase	Deoxyribonuclease	Enzyme thủy phân DNA
dNTPs	2'-Deoxynucleoside 5'-triphosphate	Các nucleotide
ĐC	Control	Đối chứng
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	Axit ethylenediamine tetraacetic
EtBr	Ethidium bromide	Ethidium bromide
kb	Kilo base	Kilo base
kDa	Kilo Dalton	Kilo Dalton
M	Marker	Thang chuẩn
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại gen
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic

RNase	Ribonuclease	Enzyme thủy phân RNA
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại gen
rChit	Recombinante chitinase	Chitinase tái tổ hợp
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris boric acid EDTA	Tris boric acid EDTA
TE	Tris EDTA	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
v/v	Volume/volume	Thể tích/thể tích
w/v	Weight/volume	Khối lượng/thể tích
