

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

TRẦN THỊ THANH HƯƠNG

PHÂN LẬP GEN *ORCA3* LIÊN QUAN ĐẾN SỰ
TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY DỪA CẠN
(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Thái Nguyên - 8/ 2014

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

TRẦN THỊ THANH HƯƠNG

**PHÂN LẬP GEN ORCA3 LIÊN QUAN ĐẾN SỰ
TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY DỪA CẠN**
(Catharanthus roseus (L.) G. Don)

Chuyên ngành: Di truyền học
Mã số: 60.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn khoa học: GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên - 8/ 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 8 năm 2014

Tác giả

Trần Thị Thanh Hương

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng ADN ứng dụng, Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi tiến hành các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình, bạn bè và đồng nghiệp trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài luận văn.

Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Tác giả

Trần Thị Thanh Hương

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ORF: Open read frame

ORCAs: Octadecanoid - responsive *Catharanthus* AP2/ERF domain

MIA: Monoterpenoid indole alkaloids

DNA: Deoxyribonucleic acid

RNA: Ribonucleic acid

TIA: Terpenoid indole alkaloids

FDA: Food and Drug Administration

JA: Jasmonic acid

MeJA: Methyl ester jasmonic acid

JRE: Jasmonate responsive element

ERF: Ethylene response factor

PCR: Polymerase chain reaction

MỤC LỤC

	Trang
Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
Những chữ viết tắt.....	iii
Mục lục.....	iv
Danh mục các bảng trong luận văn	vi
Danh mục các hình trong luận văn.....	vii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÂY DỪA CẠN	3
1.1.1. Giới thiệu chung.....	3
1.1.2. Vị trí và giá trị dược học của cây dứa cạn	4
1.2. NGHIÊN CỨU ALKALOID Ở THỰC VẬT VÀ Ở CÂY DỪA CẠN	5
1.2.1. Alkaloid ở thực vật.....	5
1.2.1.1. Trạng thái thiên nhiên	5
1.2.1.2. Sự phân bố.....	5
1.2.1.3. Sự tạo thành alkaloid trong thực vật	6
1.2.1.4. Những nghiên cứu về chất thứ cấp ở Việt Nam và trên thế giới	6
1.2.2. Alkaloid ở cây dứa cạn.....	8
1.2.2.1. Các vinca alkaloid chính	8
1.2.2.2. Một số gen chức năng liên quan đến quá trình tổng hợp alkaloid ở cây dứa cạn	11
1.2.2.3. Alkaloid trong cây dứa cạn và bệnh ung thư	12
1.3. ORCA3 VÀ GEN MÃ HÓA ORCA3	16
1.3.1. ORCA3.....	16
1.3.1.1. Con đường sinh tổng hợp TIA	17
1.3.1.2. Cơ chế điều khiển của ORCA3.....	19

1.3.1.3. Cấu trúc protein ORCA3	21
1.3.2. Gen ORCA3 và tình hình nghiên cứu gen ORCA3	22
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ	27
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu	27
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	27
2.2.1. Phương pháp thu mẫu	27
2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử.....	27
2.2.2.1. Phương pháp tách chiết mRNA	27
2.2.2.2. Phương pháp tạo cDNA từ mRNA	28
2.2.2.3. Phương pháp nhân gen ORCA3 bằng kỹ thuật RT-PCR.....	28
2.2.2.4. Kỹ thuật tách dòng gen	29
2.2.2.5. Phương pháp xác định và phân tích trình tự nucleotide gen ORCA3...31	
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	31
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	32
3.1. KẾT QUẢ KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG GEN ORCA3 TỪ MẪU DỪA CẠN HOA MÀU HỒNG THU TẠI THÁI NGUYÊN	32
3.1.1. Kết quả nghiên cứu thông tin và thiết kế cặp môi PCR nhân đoạn gen ORCA3.....	32
3.1.2. Kết quả nhân đoạn gen ORCA3 từ mRNA.....	33
3.1.3. Kết quả tách dòng đoạn gen ORCA3.....	34
3.2. ĐẶC ĐIỂM CỦA TRÌNH TỰ GEN ORCA3 PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN	35
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO	43

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>ORCA3</i>	28
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng gắn gen vào vector tách dòng pBT.....	29
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng colony – PCR	30
Bảng 3.1. Cặp mồi nhân gen <i>ORCA3</i>	33
Bảng 3.2. Bảng tổng hợp những vị trí nucleotide khác nhau giữa 3 trình tự nucleotide của gen <i>ORCA3</i>	37
Bảng 3.3. Tỷ lệ và số lượng từng loại amino acid của protein suy diễn <i>ORCA3</i> mẫu TN1	39
Bảng 3.4. Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid trong protein suy diễn của mẫu dừa cạn Thái Nguyên và protein mang mã số CAB96899, ABW77571	40

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Sinh tổng hợp vinca alkaloid.....	10
Hình 1.2. Con đường sinh tổng hợp TIA ở dừa cạn.....	19
Hình 1.3. Mô hình biểu hiện gen <i>STR</i> được cảm ứng bởi JA thông qua yếu tố phiên mã ORCA3 ở cây dừa cạn.....	20
Hình 1.4. Tổng quan về các phân tử tín hiệu thực vật	21
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen ORCA3 (cDNA) từ mẫu dừa cạn hoa hồng thu tại Thái Nguyên (TN1)	33
Hình 3.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony - PCR từ 7 dòng khuẩn lạc màu trắng với cặp mồi đặc hiệu	35
Hình 3.3. Trình tự nucleotide của gen ORCA3 phân lập từ cây dừa cạn mẫu TN1 và hai trình tự mang mã số AJ251249, EU072424 trên Ngân hàng gen quốc tế.....	36
Hình 3.4. Trình tự acid amin suy diễn của protein ORCA3 của mẫu dừa cạn Thái Nguyên và của protein mang mã số CAB96899, ABW77571 trên Ngân hàng gen quốc tế.....	38
Hình 3.5. Vùng AP-2 của protein ORCA3 bám DNA	41

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cả thế giới đang phải đối mặt với bệnh ung thư, một căn bệnh đang trở thành hiểm họa cho cuộc sống chúng ta và có xu hướng ngày càng gia tăng. Theo thống kê, thế giới sẽ có 21,4 triệu người được phát hiện mới mắc bệnh ung thư và hơn 13,2 triệu người chết vì căn bệnh này vào năm 2030. Tỷ lệ này sẽ có nguy cơ tăng dần so với thời gian. Trong khi đó, các loại thuốc chữa trị ung thư chưa nhiều và giá thành của chúng khá đắt. Xu hướng của thế giới hiện nay là nghiên cứu phương pháp làm tăng hàm lượng alkaloid ở cây thảo dược để hạ giá thành thuốc chữa bệnh.

Thực vật bậc cao được coi là nguồn nguyên liệu quý giá có thể cung cấp các hợp chất thứ cấp, đặc biệt là các alkaloid. Những chất này đóng vai trò quan trọng đối với ngành công nghiệp dược phẩm trong việc sản xuất các loại thuốc có giá trị, trong số đó quan trọng nhất là nhóm dược phẩm điều trị ung thư. Trong những năm gần đây, tình hình nghiên cứu về hợp chất thứ cấp thực vật ngày càng phát triển. Các hợp chất thứ cấp được chiết xuất từ thực vật có hoạt tính và rất có giá trị đối với cuộc sống. Một số hợp chất thuộc các nhóm alkaloid, terpenoid, phenolic, saponin được biết đến như là các hợp chất có khả năng trị bệnh ung thư.

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong các loại thực vật có khả năng sản xuất các alkaloid - có dược tính quan trọng trong chế tạo thuốc chữa ung thư như vinblastine và vincristine. Các alkaloid này trong cây dừa cạn có hàm lượng rất nhỏ (khoảng 1 phần vạn trong lá dừa cạn khô đối với vinblastin còn đối với vincristin thì ít hơn 10 lần nữa) và không thể tổng hợp bằng con đường hóa học do có cấu trúc phức tạp [1]. Do vậy, tiếp cận con đường tổng hợp các alkaloid từ góc độ công nghệ gen là một hướng nghiên cứu đầy