

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----

**NGUYỄN THỊ DUNG**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN MATRIX  
METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) CỦA NGƯỜI Ở  
E. COLI**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm**

Hà Nội - 2014

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành tới **TS. Lê Thị Bích Thảo**, trưởng phòng Hóa sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học, người thầy đã luôn hướng dẫn, định hướng và giúp đỡ tôi thực hiện thành công luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo trường **Đại học Thái Nguyên** cũng như các thầy cô thuộc **Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật**, các thầy cô **Viện Công nghệ Sinh học**, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy và truyền thụ cho tôi kiến thức chuyên môn để thực hiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các **cô chú, các anh chị phòng Hóa sinh Protein** đã hướng dẫn tận tình, dạy tôi những kiến thức thực hành trong phòng thí nghiệm. Đặc biệt là **Th.S Bùi Thị Huyền** người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo tôi từng bước từ khi mới bắt đầu thực tập, cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ, và cho tôi những lời khuyên quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Xin gửi lời cảm ơn tới **gia đình, bố mẹ** những người sinh thành, nuôi dưỡng tôi là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi suốt thời gian qua. Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới **anh chị, bạn bè** tôi đã cổ vũ động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Một lần nữa tôi vô cùng cảm ơn.

*Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2014*

Học viên

**Nguyễn Thị Dung**

## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tên Tiếng Anh	Tên Tiếng Việt
a.a	Amino acid	Axit amin
Amp+	Ampicilin	Ampicilin
APS	Amonium persulphate	Muối amonium persulphate
bp	Base pair	Cặp bazơ
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonucleic
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	Deoxynucleoside triphosphate
E. coli	Escherichia coli	Vi khuẩn Escherichia coli
ECM	Extracellular matrix	Chất nền ngoại bào
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Axit ethylenediaminetetraacetic
EtBr	Ethidium bromide	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol	Cồn ethanol
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactoside	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactoside
Kb	Kilo base	1000 cặp bazơ (1000 bp)
kD	Kilo Dalton	Kilo Dalton
LB	Luria - Bertani	Môi trường LB
MMPs	Matrix metalloproteinases	Metalloproteinases cơ chất
mRNA	Messenger RNA	RNA thông tin
MT-MMPs	Membrane-type MMPs	MMPs dạng màng
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	RNA ribosome
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di biến tính trên gel polyacrylamide
TAE	Tris-Acetate-EDTA	Tris-Acetate-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl Ethylenediamine	N, N, N', N'-Tetramethyl Ethylenediamine

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT .....	iii
MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN .....	vii
MỞ ĐẦU .....	1
<b>CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về Matrix metalloproteinases (MMPs) .....	3
1.1.1. Phân loại và cấu trúc MMPs .....	3
1.1.2. Chức năng sinh học của MMPs .....	9
1.2. Tổng quan về Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).....	10
1.2.1. Cấu trúc gen MMP-9 .....	11
1.2.2. Cấu trúc protein MMP-9.....	12
1.2.3. Sự kích hoạt MMP-9 .....	15
1.2.4. Chức năng sinh học của MMP-9.....	15
1.3. Tiềm năng ứng dụng của MMP-9 trong y học .....	17
1.3.1. Tiềm năng là chỉ thị sinh học trong chẩn đoán các bệnh về tim mạch .....	17
1.3.2. Tiềm năng là chỉ thị sinh học cho các bệnh lý khác.....	20
1.4. Tình hình nghiên cứu MMP-9 ở Việt Nam.....	20
<b>CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>22</b>
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị máy móc.....	22
2.2. Phương pháp .....	24
2.2.1. Tách chiết RNA tổng số.....	24
2.2.2. Tổng hợp cDNA.....	24
2.2.3. Nhân gen MMP-9 bằng phản ứng PCR.....	25
2.2.4. Phương pháp ghép nối DNA .....	26
2.2.5. Biến nạp plasmid vào E. coli bằng phương pháp sốc nhiệt .....	27
2.2.6. Tách chiết DNA plasmid .....	28
2.2.7. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose .....	29
2.2.8. Thôi gel bằng kit QIAquick Gel Extraction.....	29
2.2.9. Xác định trình tự DNA .....	30
2.2.10. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho MMP-9 .....	31

2.2.11.	<i>Biểu hiện gen mã hóa cho protein MMP-9</i> .....	31
2.2.12.	<i>Phân tích protein bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE</i> .....	31
2.2.13.	<i>Kỹ thuật Western blot</i> .....	32
<b>CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....		<b>34</b>
3.1.	Kết quả tách dòng gen mã hoá cho MMP-9.....	34
3.1.1.	<i>Tách chiết RNA tổng số</i> .....	34
3.1.2.	<i>Nhân gen mã hoá cho MMP-9 bằng phản ứng PCR</i> .....	34
3.1.3.	<i>Tách dòng và xác định trình tự gen MMP-9</i> .....	36
3.2.	Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho MMP-9 .....	43
3.3.	Biểu hiện gen MMP-9 ở vi khuẩn <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	48
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....		<b>51</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....		<b>52</b>

## DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

<b>Bảng</b>	<b>Tiêu đề</b>	<b>Trang</b>
Bảng 1.1	Phân loại Matrix metalloproteinases	4
Bảng 1.2	Vai trò của MMPs	9
Bảng 1.3	Đa hình gen liên quan tới sự biểu hiện tăng của MMP-9 và bệnh tim mạch	18
Bảng 2.1	Trình tự các cặp mồi	22
Bảng 2.2	Hóa chất và enzyme	23
Bảng 2.3	Máy móc và thiết bị	23
Bảng 2.4	Thành phần phản ứng PCR	25
Bảng 2.5	Thành phần phản ứng nối ghép	26
Bảng 2.6	Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật	28
Bảng 2.7	Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE	32

## DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Hình	Tiêu đề	Trang
Hình 1.1	Đặc điểm cấu trúc của một số phân nhóm MMPs	8
Hình 1.2	Vị trí các yếu tố phiên mã trên promoter của gen mã hóa cho MMP-9	11
Hình 1.3	Cấu trúc ba chiều của MMP-9	14
Hình 3.1	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách RNA tổng số	34
Hình 3.2	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cDNA mã hóa cho MMP-9	36
Hình 3.3	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách DNA plasmid các dòng khuẩn lạc	37
Hình 3.4	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng <i>EcoRI</i>	38
Hình 3.5	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc đã chọn lọc	39
Hình 3.6	Kết quả xác định trình tự gen MMP-9	39
Hình 3.7	Kết quả so sánh trình tự protein MMP-9	42
Hình 3.8	Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện của gen mã hóa cho MMP-9	44
Hình 3.9	Kết quả điện di kiểm tra đoạn gen và vector sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn	45
Hình 3.10	Sơ đồ enzyme giới hạn <i>NcoI</i> và <i>EcoRI</i> của vector MMP9-pCR2.1	46
Hình 3.11	Kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp cho biểu hiện MMP-9	47
Hình 3.12	Kết quả biểu hiện protein điện di trên gel polyacrylamide 12.5%	48
Hình 3.13	Kết quả kiểm tra protein biểu hiện bằng phản ứng Western blot với kháng thể kháng MMP-9	49

## MỞ ĐẦU

Ngày nay, quá trình công nghiệp hóa, đô thị hóa làm thay đổi hàng loạt các yếu tố môi trường, tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến sức khỏe con người. Đồng thời áp lực cuộc sống và công việc cũng góp phần không nhỏ ảnh hưởng xấu tới con người làm gia tăng tỷ lệ mắc các bệnh lý nghiêm trọng như tiểu đường, các bệnh về tim mạch, ung thư, rối loạn gây suy thoái thần kinh hay các bệnh về xương khớp... đe dọa tới tính mạng con người. Tuy nhiên, với những tiến bộ mới của y học hiện nay có thể giúp chẩn đoán sớm và đưa ra nhiều phương pháp điều trị hiệu quả, góp phần kéo dài tuổi thọ và nâng cao chất lượng sống cho bệnh nhân. Trong đó, phương pháp chẩn đoán sớm sử dụng chỉ thị sinh học (biomarkers) để tiên lượng sẽ hỗ trợ bác sĩ đưa những phương pháp điều trị thích hợp.

Genomics và proteomics là các kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán sớm. Nghiên cứu về các gen và protein có chức năng liên quan đến những biến đổi trạng thái bệnh lý khác nhau đang được chú trọng đầu tư ở nhiều quốc gia trên thế giới. Trong số các protein được quan tâm, Matrix metalloproteinases (MMPs) là một họ protein endopeptidases kẽm được điều hoà chặt chẽ, có thể bất hoạt các protein ngoại bào đồng thời tái tạo lại các mô liên kết ở cả trạng thái bình thường như sự phát triển phôi, sinh sản và tái tổ hợp mô cũng như trạng thái bệnh sinh như ung thư di căn, viêm mãn tính, các bệnh về tim mạch, tổn thương mô cũng như rối loạn về thần kinh (Klein and Bischoff, 2011). Do đó, MMPs được coi là chỉ thị sinh học trong chẩn đoán, tiên lượng và kiểm tra các bệnh khác nhau như bệnh tiểu đường, bệnh tim mạch, ung thư, rối loạn gây suy thoái thần kinh và nhiễm trùng (Galliera *et al*, 2014).

Họ matrix metalloproteinases gồm sáu phân nhóm, trong phân nhóm gelatinase MMP-9 (gelatinase B) có các chức năng chủ yếu trong việc phá vỡ mạng lưới ngoại bào, có thể phá huỷ nhiều loại protein ngoại bào bao gồm gelatin, collagen type IV và nhiều protein màng. MMP-9 được điều hoà chủ yếu ở mức độ phiên mã và sau dịch mã bằng sự kích hoạt của zymogen và sự ức chế của chất ức

chế nội sinh TIMP-1. Đã có nhiều nghiên cứu về MMP-9, đặc biệt là tiềm năng làm chỉ thị sinh học trong chẩn đoán sớm các bệnh lý như tim mạch, viêm (Halade *et al*, 2013), loạn dưỡng cơ Duchene (Nadarajah *et al*, 2011), ung thư tuyến tiền liệt (Gong *et al*, 2014) ... Vì vậy, MMP-9 ngày càng được chú trọng nghiên cứu ứng dụng làm nhân tố chỉ thị cho chẩn đoán trước và trong giai đoạn điều trị bệnh.

Với mục tiêu đó, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu: “**Nghiên cứu biểu hiện gen Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) của người ở *E. coli***” nhằm tạo ra được protein tái tổ hợp matrix metalloproteinase-9 của người để phục vụ cho các nghiên cứu tạo kháng thể kháng MMP-9, hỗ trợ chẩn đoán bằng các phương pháp sinh học hiện đại như thấm miễn dịch, hoá mô miễn dịch, Western Blot.

## CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Tổng quan về Matrix metalloproteinases (MMPs)

Matrix metalloproteinases (MMPs) là một họ protein endopeptidases phụ thuộc kẽm, đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình như sự tạo phôi, tăng sinh tế bào, tái tạo mô, làm lành vết thương, sự hình thành mạch, ... Năm 1962, MMPs lần đầu tiên được phát hiện bởi Jerome Gross và Charles M. Lapiere khi nghiên cứu sự suy thoái của collagen xoắn bậc ba trong biến thái của đuôi nòng nọc (Gross and Lapiere, 1962). Năm 1968, enzyme này lần đầu tiên được phân lập từ tế bào da người ở dạng không hoạt động là proMMP (còn được gọi là zymogen MMP) (Eisen *et al.*, 1968). Sau đó MMPs được tìm thấy ở động vật không xương sống và thực vật. Đến năm 1990 một nhóm nghiên cứu khác đã phát hiện ra cơ chế điều hòa các enzyme MMPs ở dạng không hoạt động (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990).

#### 1.1.1. Phân loại và cấu trúc MMPs

##### ❖ Phân loại

Phân lớp metalloproteases là một họ protein endopeptidases bao gồm các enzyme xúc tác phụ thuộc vào kẽm (William and Robert, 1998). Matrix metalloproteinase (MMPs) thuộc phân họ matrixin kẽm Metalloprotease M10 (Nagase *et al.*, 2006; Sbardella *et al.*, 2012), có cơ sở dữ liệu trên MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>).

Sau khi hoàn thành việc giải mã trình tự bộ gen người vào năm 2003 thì MMPs được xác định gồm 24 gen mã hóa cho toàn bộ MMPs ở người. Thành viên trong họ MMPs giống nhau khoảng 40% về cấu trúc chính. Khoảng hơn 20 loại MMPs khác nhau được phát hiện và phân loại dựa vào vị trí trên nhiễm sắc thể và dựa vào các loại chất nền. Mặc dù các tên gọi từ MMP-1 đến MMP-28 được sử dụng để phân loại, nhưng một số MMP vẫn chưa được xác định. Danh sách MMPs được thể hiện trong hệ thống Bảng 1.1 (Zitka *et al.*, 2010).