

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGÔ THỊ MỸ DIỆU

**XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN TỔNG HỢP ISOFLAVONE
PHÂN LẬP TỪ ĐẬU TƯƠNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGÔ THỊ MỸ DIỆU

**XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN TỔNG HỢP ISOFLAVONE
PHÂN LẬP TỪ ĐẬU TƯƠNG**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. NGUYỄN VŨ THANH THANH

DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

bp	base pair (cặp bazơ)
cDNA	complementary DNA
CHI	Chalcone isomerase
cs	cộng sự
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DNA	deoxyribosenucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IFS	Isflavone synthase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
RNA	Ribonucleic acid
TAE	Tris-acetate-EDTA
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1 Thành phần hóa học của hạt đậu tương	8
Bảng 1.2. Hàm lượng amino acid không thay thế trong protein đậu tương	8
Bảng 1.3. Các acid béo có giá trị dinh dưỡng cao	9
Bảng 1.4. Thành phần vitamin trong đậu tương	9
Bảng 1.5. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới.....	12
Bảng 1.6. Tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam những năm gần đây.....	13
Bảng 2.1. Danh mục các thiết bị đã sử dụng.....	28
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA	30
Bảng 2.3. Cặp mồi nhân gen IFS1	30
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen IFS1	31
Bảng 2.5. Chu kì nhiệt của phản ứng PCR nhân gen IFS1	31
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng nối gen IFS1 vào vector pBT.....	33
Bảng 3.1. Các trình tự đoạn mã hoá của gen IFS1 mang mã số trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI được sử dụng để phân tích	41
Bảng 3.2. Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen IFS1 của 2 giống đậu tương DT84 và DT2008 với trình tự có mã số FJ483836, FJ770473 và NM_001249093 trên ngân hàng gen NCBI.....	43
Bảng 3.3. Hệ số tương đồng nucleotide của gen IFS1 ở 2 giống đậu tương DT84 và DT2008 với trình tự có mã số FJ483836, FJ770473 và NM_001249093 trên ngân hàng NCBI.....	46
Bảng 3.4. Sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của protein IFS1 ở 2 giống đậu tương DT84 và DT2008 với trình tự có mã số FJ483836, FJ770473 và NM_001249093 trên ngân hàng NCBI.....	48

Bảng 3.5. Hệ số tương đồng amino acid suy diễn của protein IFS1 của 2 giống đậu tương DT84 và DT2008 với FJ483836, FJ770473 và NM_001249093 trên NCBI	49
---	----

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của các aglucone.	15
Hình 1.2. Cấu trúc hoá học của các β -Glucoside	15
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp isoflavone	23
Hình 1.4. Sơ đồ mô tả gen IFS1 ở cây đậu tương.....	25
Hình 1.5. Sơ đồ mô tả protein IFS1 ở đậu tương.....	26
Hình 2.1. Cấu trúc vector pBT	33
Hình 3.1. Hình ảnh điện di kết quả PCR nhân gen IFS1 từ 2 giống đậu tương DT84 và DT2008	37
Hình 3.2. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR tinh sạch	38
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR plasmid	40
Hình 3.4. So sánh trình tự nucleotide của gen IFS1 ở giống DT84 và DT2008 với FJ483836, FJ770473 và NM_001249093.....	42
Hình 3.5. So sánh trình tự amino acid suy diễn của giống DT84 và DT2008 với FJ483836, FJ770473 và NM_001249093 trên NCBI	47

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây đậu tương (*Glycine max.* (L) Merrill) thuộc họ đậu là cây thực phẩm và cũng là loại cây công nghiệp ngắn ngày quan trọng có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Cây đậu tương dễ trồng, khả năng thích nghi rộng, năng suất cao nên đã được trồng ở khắp năm châu, trở thành cây lương thực quan trọng thứ tư sau lúa mì, lúa nước và ngô. Sản phẩm hạt đậu tương có hàm lượng protein cao, từ 20-40%, dễ tan và chứa hầu hết các loại amino acid cần thiết cho cơ thể con người. Ngoài ra, giống như các cây trồng họ đậu khác, cây đậu tương còn được trồng để cải tạo đất nhờ vào bộ rễ với các nốt sần chứa hàng tỷ vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium japonicum* giúp tăng giá trị dinh dưỡng cho đất, giúp cho cây trồng vụ sau phát triển tốt hơn.

Những năm gần đây, diện tích trồng đậu tương và năng suất đậu tương trên toàn thế giới không ngừng tăng lên, trong đó bốn nước có sản lượng đậu tương đứng đầu, chiếm khoảng 80% sản lượng đậu tương được sản xuất là Mỹ, Brazil, Argentina, và Trung Quốc.

Ở Việt Nam, cây đậu tương đã được canh tác từ lâu đời và ngày càng được ưu tiên trong hệ thống nông nghiệp. Ngoài việc cung cấp thực phẩm cho con người, thức ăn cho gia súc, đậu tương còn là nguồn nguyên liệu cho công nghiệp và là một mặt hàng xuất khẩu [1].

Sản phẩm thực phẩm từ đậu tương rất đa dạng và được sử dụng quen thuộc từ lâu trong các gia đình như các loại đậu phụ, giá tương, bột đậu tương, sữa đậu nành, tào phớ, chao, tương, nước sốt,... vì giá trị dinh dưỡng và mùi vị thơm ngon. Tuy nhiên ngày nay, xã hội phát triển, đời sống người dân được nâng cao, người ta đã bắt đầu chú ý đến các loại thực phẩm không chỉ thơm ngon mà còn tốt cho sức khỏe, thì khả năng ngăn ngừa và điều trị bệnh tật của đậu tương cũng đang được chú ý đến. Ngoài giá trị dinh dưỡng, đậu tương và những món ăn chế biến từ đậu tương còn có giá trị phòng và chữa bệnh. Đậu tương có tác dụng làm trẻ hoá cơ thể con người, tăng cường sinh lực, tăng trí nhớ và tái tạo các mô, làm cứng xương và tăng sức đề kháng của cơ thể với các loại bệnh tật, kể cả các bệnh nan y như ung thư, tiểu đường, mỡ máu, tim mạch, bệnh thận [5], [6], [24].

Đậu tương từ thực phẩm đã và đang được nghiên cứu dưới vai trò là cây dược phẩm. Các nghiên cứu cho thấy ngoài hàm lượng protein và lipip cao trong đậu tương còn chứa nhiều khoáng chất, các sinh tố nhóm B và đặc biệt là các hoá chất thảo mộc, trong đó quan trọng nhất là các isoflavone.

Isoflavone là một hoạt chất có nguồn gốc từ thực vật có cấu trúc tương tự như hormone kích thích tố sinh dục phái nữ (female hormone estrogen) và sự vận hành giống như estrogen. Vì thế các nhà khoa học còn gọi nó là estrogen thảo mộc (phytoestrogens). Những nghiên cứu đã chỉ ra rằng isoflavone đậu tương không chỉ có tác dụng phòng mà còn có khả năng điều trị nhiều căn bệnh nan y của thời đại như giảm triệu chứng vận mạch ở phụ nữ độ tuổi mãn kinh, tái tạo mô cơ xương, giảm nguy cơ bệnh tim mạch, tăng cường chức năng thận, làm chậm chứng suy giảm nhận thức, ngăn chặn ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư liên quan đến hormone như ung thư tử cung, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt [29], [35], [36], [43].

Đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính và tác dụng của isoflavone đậu tương cũng như phương pháp tách chiết, sản xuất và ứng dụng sản phẩm này, nhưng những nghiên cứu sâu hơn về di truyền đối với gen tổng hợp isoflavone vẫn còn

rất hạn chế. Hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương khá cao, cao nhất trong các loại hạt đậu. Tuy nhiên, để đáp ứng nhu cầu ứng dụng hoạt chất isoflavone làm dược phẩm của con người, yêu cầu đặt ra là phải nâng cao hơn nữa hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương. Phân lập và xác định trình tự gen tổng hợp isoflavone là bước đầu tiên tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo như nghiên cứu về chức năng của gen, thiết kế vector chuyển gen.. nhằm đạt mục đích nâng cao hàm lượng isoflavone trong hạt đậu. Xuất phát từ yêu cầu đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài ***“Xác định trình tự gen tổng hợp isoflavone phân lập từ đậu tương”***.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được sự sai khác trong trình tự gen IFS1 tổng hợp isoflavone và protein suy diễn phân lập từ 2 giống đậu tương DT2008 và DT84.

3. Nội dung nghiên cứu

- Khuyếch đại, chọn dòng và xác định trình tự gen IFS1 của 2 giống đậu tương nghiên cứu.
- So sánh trình tự gen IFS1 đã phân lập của 2 giống đậu tương nghiên cứu với trình tự đã công bố trên ngân hàng GenBank.
- So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein IFS1 của 2 giống đậu tương nghiên cứu.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG

1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây đậu tương

Cây đậu tương hay còn gọi là cây đậu nành có tên khoa học là *Glycine max* (L.) Merrill, là loại cây ăn hạt, thân thảo thuộc họ đậu (*Fabaceae*), có bộ nhiễm sắc thể $2n=40$. Cây đậu tương thuộc:

Giới	: <i>Plantae</i>
Ngành	: <i>Magnoliophyta</i>
Lớp	: <i>Magnoliopsida</i>
Bộ	: <i>Fabales</i>
Họ	: <i>Fabaceae</i>
Phân họ	: <i>Faboideae</i>
Giống	: <i>Glycine</i>
Loài	: <i>max</i>

Cây đậu tương là cây trồng có lịch sử lâu đời. Theo các tài liệu nghiên cứu thì cây đậu tương có nguồn gốc từ vùng Mãn Châu phía Bắc Trung Quốc từ thời các triều đại Phong kiến, trong đó nhiều tài liệu cho rằng cây đậu tương được thuần hoá dưới triều đại Shang, hay còn gọi là triều đại nhà Thương, vào khoảng thế kỉ XVII đến thế kỉ XI trước Công Nguyên. Từ đây cây đậu tương được lan

truyền sang Nhật Bản, Triều Tiên vào khoảng thế kỷ thứ VIII, sau đó truyền bá sang các nước châu Á khác như Thái Lan, Malaysia, Hàn Quốc, Việt Nam.. Đến thế kỷ XVII, cây đậu tương được giới thiệu vào Châu Âu bởi các nhà thực vật học và được đặt tên là *Glicine max*. Đến thế kỷ XVIII cây đậu tương mới được du nhập vào Mỹ trên những thuyền hàng có hành trình xa từ Trung Quốc. Cây đậu tương được du nhập vào Châu Âu trước nhưng do khí hậu và đất đai ở đây không mấy phù hợp nên việc trồng trọt đậu tương tại Mỹ phát triển nhanh chóng hơn nhiều. Cho đến ngày nay, Mỹ vẫn là một trong những quốc gia đứng đầu về sản xuất sản phẩm hạt đậu tương [2], [4], [6], [10].

Ngày nay, cây đậu tương đã trở nên phổ biến và được trồng phổ biến ở rất nhiều nước trên thế giới, trở thành cây thực phẩm có giá trị kinh tế cao, quan trọng nhất trong các loại cây thuộc họ đậu, nhờ vào những đặc điểm ưu việt vượt trội so với các loại cây đậu khác, như hàm lượng protein, lipid cao, chứa nhiều vitamin, các khoáng chất và nhiều loại hoá chất thảo mộc có lợi cho sức khoẻ con người.

1.1.2. Đặc điểm sinh học

Cây đậu tương là loại cây thân thảo, hằng năm. Thân cây mảnh, cao từ 0,8m đến 0,9m, có lông, cành hướng lên phía trên. Một cây đậu tương hoàn chỉnh bao gồm rễ, thân, lá, hoa, quả và hạt [6].

Rễ

Đậu tương là cây rễ cọc, bộ rễ gồm có rễ cái (rễ chính) và các rễ bên (rễ phụ). Rễ cái có thể ăn sâu vào đất đến 150 cm hoặc sâu hơn, nhưng trong điều kiện bình thường chỉ ăn sâu vào khoảng 20-30 cm. Điểm đặc biệt của bộ rễ đậu tương là trên rễ, cả rễ cái và rễ bên, có chứa các nốt sần. Nốt sần là phần vỏ rễ phình ra và trong đó có hàng tỷ vi khuẩn *Rhizobium japonicum* sinh sống. Vi khuẩn này hình gậy, sống trong đất, có khả năng đi vào rễ và cố định đạm từ khí trời, với lượng đạm cung cấp cho cây khoảng 30-60kg/ha [10].

Thân, cành