

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

HÀ THỊ THANH HOÀN

**SO SÁNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE
CỦA ĐOẠN SSR CÓ LIÊN QUAN ĐẾN PROTEIN
THỰC HIỆN CHỨC NĂNG TRAO ĐỔI CHẤT
Ở MỘT SỐ MẪU CHÈ TẠI THÁI NGUYÊN**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 60 42 02 01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Hoàng Thị Thu Yến

Thái Nguyên, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Hà Thị Thanh Hoàn

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS. Hoàng Thị Thu Yến** - Giảng viên, phó trưởng khoa - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - người đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và tập thể cán bộ phòng thí nghiệm Khoa Khoa học Sự sống, cảm ơn lãnh đạo Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới các cán bộ công tác tại Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình hướng dẫn tôi trong quá trình làm đề tài.

Nhân dịp này tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể cán bộ, Công ty chè Sông Cầu - Huyện Đồng Hỷ - Thành Phố Thái Nguyên, nhân dân vùng chè Trại Cài - Minh Lập - Đồng Hỷ và Vùng chè Tân Cương -Thành Phố Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong thời gian tôi thu thập vật liệu nghiên cứu làm đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp và nhóm nghiên cứu di truyền đã luôn cổ vũ, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Tác giả

Hà Thị Thanh Hoàn

DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Viết đầy đủ
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphic (đa hình chiều dài các đoạn cắt khuếch đại)
bp	Cặp base
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
đtg	Đồng tác giả
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
EtBr	Ethidium Bromide
Kb	Kilobase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
Primer F	Primer Forward (mũi xuôi)
Primer R	Primer Reverse (mũi ngược)
RAPD	Random Amplify Polymorphic DNA (phân tích đa dạng DNA khuếch đại ngẫu nhiên)
RNA	Ribonucleic Acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphic (đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn)
SSR	Simple Sequence Repeat (đoạn lặp lại trình tự đơn giản)
TAE	Tris acetat EDTA
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (DNA lặp lại nối tiếp có kích thước khác nhau)

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
MỤC LỤC	v
DANH MỤC CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Giới thiệu chung về cây chè	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây chè	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây chè	5
1.1.3. Giá trị của cây chè	7
1.1.4. Đặc điểm một số giống chè tại Thái Nguyên	9
1.2. Tình hình nghiên cứu hệ gen chè trên thế giới và ở Việt Nam	10
1.2.1. Tình hình nghiên cứu hệ gen chè trên thế giới	10
1.2.2. Tình hình nghiên cứu hệ gen chè ở Việt Nam	13
1.3. Chỉ thị SSR và những ứng dụng trong nghiên cứu protein thực hiện chức năng trao đổi chất	14
1.3.1. Khát quát về chỉ thị SSR	14
1.3.2. Chỉ thị SSR liên quan đến protein thực hiện chức năng trao đổi chất	17
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu	22
2.1.1. Nguyên liệu	22
2.1.2. Hóa chất	22

2.1.3. Thiết bị	22
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.2.1. Phương pháp thu mẫu lá chè.....	23
2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ lá chè	23
2.2.3. Phương pháp điện di	25
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng và kiểm tra độ tinh sạch DNA tổng số	27
2.2.5. Kỹ thuật PCR-SSR.....	27
2.2.6. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR	29
2.2.7. Phương pháp xác định và phân tích trình tự	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	31
3.1. Tách DNA tổng số từ các mẫu chè nghiên cứu	31
3.2. Phân tích chỉ thị SSR ở các mẫu chè nghiên cứu.....	32
3.2.1. Phân tích một số chỉ thị SSR ở các mẫu chè nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR - SSR.....	32
3.2.2. Đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các mẫu chè dựa trên phân tích chỉ thị SSR	38
3.3. Phân tích trình tự nucleotide các đoạn SSR liên quan đến protein thực hiện chức năng trao đổi chất	41
3.3.1. Phân tích trình tự nucleotid đoạn SSR liên quan đến glyoxalase.....	42
3.3.2. Phân tích trình tự nucleotid đoạn SSR liên quan đến sucrose	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	46
PHỤ LỤC	1

DANH MỤC CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN

Hình 1.1. Một số giống chè trồng tại Công ty chè Sông Cầu tỉnh Thái Nguyên.....	10
Hình 1.2. Chu trình sinh tổng hợp sucrose với sự tham gia của các enzyme chính.....	18
Hình 1.3. Sơ đồ hệ thống enzyme glyoxilase.....	20
Hình 3.1. Kết quả điện di DNA tổng số của 18 mẫu chè nghiên cứu.....	31
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 18 mẫu chè với môi YS27.....	32
Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 18 mẫu chè với môi YTS46.....	33
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 18 mẫu chè với môi YTS64.....	34
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 18 mẫu chè với môi YTS98.....	36
Hình 3.6. Sơ đồ quan hệ di truyền của 18 mẫu chè nghiên cứu.....	40
Hình 3.7. So sánh trình tự nucleotide đoạn SSR của bốn mẫu nghiên cứu với các trình tự đã công bố.....	43
Hình 3.8. So sánh trình tự nucleotide đoạn SSR của bốn mẫu nghiên cứu với các trình tự đã công bố.....	44

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng 2.1. Danh mục các thiết bị, dụng cụ được sử dụng.....	23
Bảng 2.2. Thành phần gel polyacrylamide 8%	27
Bảng 2.3. Danh sách 14 cặp mồi SSR được sử dụng trong nghiên cứu.....	28
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR - SSR	29
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR – SSR	29
Bảng 3.1. Số phân đoạn DNA xuất hiện và số phân đoạn DNA đa hình đối với mỗi chỉ thị	37
Bảng 3.2. Bảng hệ số tương đồng di truyền của 18 mẫu chè nghiên cứu	39

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Chè là một loại cây công nghiệp dài ngày, được tìm thấy đầu tiên ở Trung Quốc, ngoài tự nhiên cây chè phân bố rộng rãi toàn bộ châu Á. Lá chè được chế biến không chỉ để phục vụ đời sống con người, sản phẩm chè từ lâu đã trở thành một trong những nét văn hóa đặc trưng của nhiều quốc gia, đặc biệt là các quốc gia vùng Đông Nam Á. Trong chè chứa nhiều vitamin có giá trị dinh dưỡng và bảo vệ sức khỏe, có tác dụng giải khát, bổ dưỡng và kích thích hệ thần kinh trung ương, giúp tiêu hóa chất mỡ và ngăn ngừa sự phát triển của một số tế bào ung thư...[43]. Ngoài ra, cây chè còn mang lại nhiều lợi ích kinh tế xã hội như: giải quyết công ăn việc làm, đem lại nguồn thu nhập ổn định cho người dân, thúc đẩy quá trình công nghiệp hóa và hiện đại hóa nông thôn [15]. Cây chè giữ tầm quan trọng đối với sức khỏe, tinh thần và nền kinh tế của xã hội. Tuy nhiên, sự hiểu biết các quá trình sinh học ở mức độ phân tử ở Việt Nam cũng như trên thế giới vẫn còn hạn chế.

Kích thước hệ gen chè là rất lớn (khoảng 4 Gb) nên việc giải mã toàn bộ hệ gen đòi hỏi thời gian nhiều năm và chi phí ước tính hàng chục triệu đôla. Ngày nay, để làm sáng tỏ các quá trình sinh học ở chè, các nhà khoa học cũng bắt đầu tập trung nghiên cứu cây chè ở mức độ phân tử.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về hệ gen chè ở mức độ phân tử, thông qua các chỉ thị: AFLP, RADP, RFLP, SSR... Trong đó SSR là đoạn DNA vệ tinh có trình tự lặp lại đơn giản của trình tự nucleotide nào đó, nó phổ biến ở sinh vật và đặc biệt là các loài sinh vật nhân chuẩn. Chỉ thị SSR với nhiều đặc tính như độ chính xác cao, phân bố rộng rãi trong hệ gen, tuân theo định luật Mendel...

Trong những năm gần đây, người ta tập trung nghiên cứu cây chè ở mức độ phân tử, đặc biệt việc phân tích cDNA/EST chè đã đem lại nguồn

thông tin khá lớn. Khi so sánh các đoạn EST ở chè và các gen đã biết từ các loài khác cho thấy rằng chỉ thị SSR-EST được nghiên cứu cho tới nay được cho rằng có liên quan đến các quá trình sinh học.

Trao đổi chất là những quá trình sinh hoá xảy ra trong cơ thể sinh vật với mục đích sản sinh nguồn năng lượng nuôi sống tế bào hoặc tổng hợp những vật chất cấu thành nên tế bào, đó là nền tảng của mọi hiện tượng sinh học. Đối với thực vật nói chung và cây chè nói riêng thì quá trình trao đổi chất do nhân tố nào điều khiển đang được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới.

Xuất phát từ những thực tế trên, chúng tôi đã thực hiện đề tài: **“So sánh trình tự nucleotide của đoạn SSR liên quan tới protein thực hiện chức năng trao đổi chất ở một số mẫu chè tại Thái Nguyên”**

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Đánh giá được mối quan hệ di truyền của 18 mẫu giống chè nghiên cứu.
- Xác định được sự khác biệt trình tự nucleotide của đoạn SSR có liên quan đến protein thực hiện chức năng trao đổi chất ở một số mẫu chè tại Thái Nguyên.

3. Nội dung nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu đề tài chúng tôi tiến hành những nội dung nghiên cứu sau:

- Phân tích chỉ thị phân tử dựa vào kỹ thuật PCR-SSR và nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các mẫu chè nghiên cứu.
- Nghiên cứu và so sánh trình tự nucleotide của đoạn SSR có liên quan đến protein tham gia vào con đường trao đổi chất ở một số mẫu chè tại Thái Nguyên.