

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

MAI THỊ HUYỀN TRANG

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA
FLAVONOL SYNTHASE TỪ CÂY CHÈ BẢN ĐỊA
Ở THÁI NGUYÊN (*Camellia sinensis*)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2016

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

MAI THỊ HUYỀN TRANG

**PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA
FLAVONOL SYNTHASE TỪ CÂY CHÈ BẢN ĐỊA
Ở THÁI NGUYÊN (*Camellia sinensis*)**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

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

THÁI NGUYÊN - 2016

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

Mai Thị Huyền Trang

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 và 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.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Cử nhân Phạm Thị Hằng, TS. Huỳnh Thị Thu Huệ, Phòng đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã tận tình chỉ dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này.

Nhân dịp này tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Dương Trung Dũng – Khoa Nông học – Trường Đại học Nông lâm 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, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn cổ vũ, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Tác giả

Mai Thị Huyền Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
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 VỀ CÂY CHÈ	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	4
1.1.3. Thành phần hóa học của lá chè.....	6
1.1.4. Giá trị của cây chè	7
1.2. Tình hình sản xuất chè trên thế giới và Việt Nam.....	9
1.2.1. Tình hình sản xuất chè trên thế giới.....	9
1.2.2. Tình hình sản xuất chè ở Việt Nam.....	11
1.3. Tình hình nghiên cứu chè trên thế giới và ở Việt Nam.....	12
1.3.1. Tình hình nghiên cứu chè trên thế giới	12
1.3.2. Tình hình nghiên cứu chè ở Việt Nam.....	13
1.4. Flavonol synthase và con đường sinh tổng hợp polyphenol ở chè	14
1.4.1. Polyphenol ở chè	14
1.4.2. Con đường sinh tổng hợp polyphenol ở chè.....	16
1.4.3. Flavonol synthase ở chè.....	17
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18

2.1. Vật liệu nghiên cứu	18
2.1.1. Nguyên liệu	18
2.1.2. Hóa chất	18
2.1.3. Thiết bị	19
2.2. Phương pháp nghiên cứu	19
2.2.1. Phương pháp tách chiết RNA tổng số.....	19
2.2.2. Điện di RNA tổng số.....	20
2.2.3. Tổng hợp cDNA.....	20
2.2.4. Nhân gen <i>FLS</i> bằng kỹ thuật PCR.....	21
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR.....	23
2.2.6. Tách dòng gen <i>FLS</i>	24
2.2.7. Xác định trình tự gen.....	27
2.2.8. Xử lý số liệu bằng các phần mềm chuyên dụng.....	28
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Tách RNA tổng số từ các mẫu chè nghiên cứu.....	29
3.2. Nhân gen mã hóa Flavonol synthase từ các mẫu chè nghiên cứu.....	31
3.3. Tạo dòng gen <i>FLS</i>	32
3.4. Xác định và phân tích trình tự gen mã hóa Flavonol synthase.....	34
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	41
KẾT LUẬN	41
KIẾN NGHỊ.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO	42

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
cDNA	cDNA	Complementary DNA
DNA	Axit Deoxiribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
Đtg	Đồng tác giả	et al.
EDTA	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EST	Đoạn trình tự biểu hiện	Expressed Sequence Tag
EtBr	EtBr	Ethidium Bromide
Kb	Kilô bazơ	Kilo base
LB	Môi trường LB	Luria Bertani
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp	Polymerase Chain Reaction
Primer F	Mũi xuôi	Primer forward
Primer R	Mũi ngược	Primer reverse
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic Acid
Rnase	Enzyme phân hủy RNA	Ribonuclease
SDS	SDS	Natri Dodexyl Sulfat
TAE	TAE	Tris Acetate EDTA
<i>Taq</i>	Vi khuẩn chịu nhiệt	<i>Thermus aquaticus</i>
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
FLS	Flavonol synthase	Flavonol synthase

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Diện tích, năng suất, sản lượng chè trên thế giới giai đoạn 2001- 2010	9
Bảng 1.2. Diện tích, năng suất, sản lượng một số nước trồng chè trên thế giới năm 2010.....	10
Bảng 1.3. Tình hình diện tích, năng suất, sản lượng chè ở Việt Nam trong những năm gần đây	12
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA.....	21
Bảng 2.2. Chu trình nhiệt thực hiện phản ứng tổng hợp cDNA.....	21
Bảng 2.3. Trình tự các đoạn oligonucleotide sử dụng nhân gen <i>FLS</i>	21
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>FLS</i>	22
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng nối đoạn gen <i>FLS</i> với vector pJET 1.2.....	24
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối giữa đoạn gen và vector	25
Bảng 2.7. Phản ứng cắt được tiến hành với thành phần.....	27
Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra nồng độ RNA tổng số từ các mẫu chè Trung Du.....	30
Bảng 3.2. Sự sai khác trình tự nucleotide gen <i>FLS</i> của chè Trung du xanh và chè Trung du tím với trình tự đã công bố trên Genbank	38
Bảng 3.3. Sự sai khác trình tự amino acid của <i>FLS</i> với trình tự <i>FLS</i> chè Trung du xanh và Trung du tím	38

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Một số giống chè trồng tại Thái Nguyên.....	9
Hình 1.2. Sơ đồ con đường sinh tổng hợp các hợp chất polyphenol ở chè [26]	16
Hình 2.1. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng nhân gen <i>FLS</i>	22
Hình 2.2. Sơ đồ vector tách dòng pJET 1.2	24
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách chiết RNA tổng số	30
Hình 3.2. Kết quả PCR nhân gen <i>FLS</i> từ cDNA của hai mẫu chè Trung du xanh (chè xanh) và chè Trung du tím (chè tím).....	31
Hình 3.3. Hình ảnh điện di tách plasmid của mẫu chè Trung du tím.....	32
Hình 3.4. Hình ảnh điện di tách plasmid của mẫu chè xanh.....	33
Hình 3.5. Hình ảnh điện di kiểm tra 4 dòng plasmid	34
Hình 3.6. Kết quả phân tích trình tự gen <i>FLS</i> phân lập từ mẫu chè xanh và chè tím	37
Hình 3.7. So sánh trình tự amino acid suy diễn của <i>FLS</i> đã công bố (DQ198089.1) với <i>FLS</i> chè Trung du xanh (<i>FLS</i> CX) và chè Trung du tím (<i>FLS</i> CT).....	40

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Chè (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) là loại cây công nghiệp lâu năm, có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới và Á nhiệt đới. Cây chè sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện khí hậu nóng ẩm, tập trung chủ yếu ở Châu Á và Châu Phi. Chè là thứ nước uống tự nhiên lâu đời nhất, được tiêu thụ rộng rãi với chi phí thấp. Sản phẩm từ cây chè đang được sử dụng rộng rãi trên khắp thế giới dưới nhiều công dụng khác nhau nhưng phổ biến nhất vẫn là đồ uống. Uống chè chống được lạnh, khắc phục được sự mệt mỏi của cơ bắp và hệ thần kinh trung ương, kích thích vỏ đại não làm cho tinh thần minh mẫn sáng khoái, hưng phấn trong những thời gian lao động căng thẳng cả về trí óc và chân tay. Lá chè có khả năng chữa được một số bệnh đường ruột như kiết lỵ, tiêu chảy (do chứa tamin), lợi tiểu (do chứa theofilin, theobromin), chống lão hóa. Hơn nữa, còn kích thích tiêu hoá mỡ, chống béo phì, chống sâu răng, hôi miệng, phòng ngừa ung thư (do chứa catesin), phòng ngừa bệnh tăng huyết áp, tiểu đường và ngăn ngừa cholesterol tăng cao... Trong chè còn chứa nhiều loại vitamin như C, B₂, PP, K, E, F... và những amino acid cần thiết cho cơ thể. Ngoài ra, chè còn có khả năng bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím, chè cũng được cho là ức chế sự xâm nhiễm và sinh sản của HIV. Hầu hết các đặc tính có lợi cho sức khỏe được liệt kê ở trên đã được chứng minh là do các hợp chất polyphenol có trong chè.

Thành phần hóa học chính trong chất rắn chiết xuất từ chè xanh là polyphenol, thành phần các chất hóa học trong chè đen giống với chè xanh. Tuy nhiên, hàm lượng của một số hợp chất polyphenol được thay đổi do quá trình oxi hóa. Hàm lượng polyphenol quyết định đến màu sắc, độ chát của nước chè và góp phần tạo hương vị của chè. Có rất nhiều các hợp chất polyphenol được tìm thấy ở chè. Tuy nhiên, tùy vào loại sản phẩm chè mà