

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

TRẦN THỊ MAI

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG HỆ XÚC TÁC TẾ BÀO *E.COLI*
TÁI TỔ HỢP DỰA TRÊN HỆ THỐNG CYP264B1 ĐỂ CHUYỂN HÓA
MỘT SỐ HỢP CHẤT SESQUITERPENE

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2015

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

TRẦN THỊ MAI

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG HỆ XÚC TÁC TẾ BÀO *E.COLI* TÁI TỔ
HỢP DỰA TRÊN HỆ THỐNG CYP264B1 ĐỂ CHUYỂN HÓA
MỘT SỐ HỢP CHẤT SESQUITERPENE**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60420201

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC
NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. LÝ THỊ BÍCH THỦY**

THÁI NGUYÊN - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các kết quả nghiên cứu dưới đây là do tôi và nhóm cộng sự nghiên cứu tại phòng Sinh hóa thực vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thực hiện từ tháng 5 năm 2014 đến tháng 5 năm 2015.

Thái Nguyên, ngày.... thángnăm 201...

Học viên

Trần Thị Mai

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến **TS. Lý Thị Bích Thủy** – Nghiên cứu viên phòng Sinh hóa thực vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, hướng dẫn và tạo điều kiện về kinh phí, hóa chất và thiết bị trong suốt thời gian tôi thực hiện luận văn tại phòng.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn **CN. Đoàn Hữu Thanh** và các cô chú, anh chị cán bộ phòng Sinh hóa thực vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công Nghệ Việt Nam đã nhiệt tình hướng dẫn, giúp đỡ và đóng góp nhiều ý kiến quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin cảm ơn **PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh** cùng các thầy cô giáo trong nhà trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên, các thầy cô trong Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi cũng xin cảm ơn **Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED)** đã cung cấp kinh phí để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này trong đề tài mã số 106-NN.02-2013.57.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè những người đã luôn bên tôi, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn này.

Bằng tấm lòng biết ơn sâu sắc tôi xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, ngày.... thángnăm 201...

Học viên

Trần Thị Mai

CÁC TỪ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Giải thích |
|---------------------|--|
| μg | Micro gram |
| μM | Micromol |
| μl | Microlit |
| AdR | Adrenodoxin reductase |
| Adx | Adrenodoxin |
| APS | Amonium persulphate |
| bp | Base pair |
| CYP | Cytochrome P450 |
| CPR | Cytochrcome P450 reductase |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| dNTP | Deoxyribonucleotide triphosphate |
| FAD | Flavin adenin dinucleotid |
| Fdx | Ferredoxin |
| FdR | Ferredoxin reductase |
| Fldx | Flavodoxin |
| FMN | Flavin mononucleotide |
| GCMS | Gas chromatography mass spectometry |
| HPLC | High pressure liquid chromatography |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside |
| kDa | Kilo dalton |
| KppG | Kali phosphate glycerol |
| LB | Lysogeny broth |

| | |
|------------|--|
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| NADH | Nicotinamide adenine dinucleotide |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| PCB | Polychlorinate biphenyl |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| SDS – PAGE | Sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis |
| TB | Terrific Broth |
| TLC | Thin layer chromatography |
| v/p | Vòng/phút |

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | II |
| MỤC LỤC..... | V |
| DANH MỤC CÁC HÌNH..... | VII |
| DANH MỤC CÁC BẢNG..... | IX |
| MỞ ĐẦU | 1 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 3 |
| 1.1 Cytochrome P450..... | 3 |
| 1.1.1 Định nghĩa và phân loại..... | 3 |
| 1.1.2 Cấu trúc của cytochrome P450..... | 5 |
| 1.1.3. Cơ chế xúc tác của cytochrome P450 | 8 |
| 1.1.4 Ứng dụng của cytochrome P450 | 8 |
| 1.2 Nghiên cứu về CYP264B1 | 10 |
| 1.3 Hợp chất sesquiterpene | 13 |
| 1.3.1 Định nghĩa và nguồn gốc..... | 13 |
| 1.3.2 Phân loại sesquiterpene | 13 |
| 1.3.3 Vai trò và ứng dụng của sesquiterpene | 15 |
| 1.4 Hệ xúc tác tế bào <i>E. coli</i> tái tổ hợp dựa trên hệ thống cytochrome P450 | 16 |
| 1.5 Tình hình nghiên cứu ứng dụng hệ xúc tác tế bào để chuyển hóa sesquiterpene trên thế giới và ở Việt Nam | 19 |
| CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 20 |
| 2. 1 Vật liệu nghiên cứu | 20 |
| 2.1.1 Vật liệu | 20 |
| 2.1.2 Thiết bị thí nghiệm | 21 |
| 2.1.3 Hóa chất..... | 22 |
| 2.1.4 Dung dịch và đệm..... | 22 |
| 2.1.5 Môi trường..... | 23 |
| 2.2 Phương pháp nghiên cứu..... | 24 |
| 2.2.1 Nuôi cấy <i>E.coli</i> | 24 |
| 2.2.2 Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào <i>E.coli</i> bằng phương pháp sốc | |

| | |
|--|----|
| nhiệt | 24 |
| 2.2.3 Kiểm tra sự có mặt của gene CYP264B1, AdR và Adx | 25 |
| 2.2.4 Kiểm tra khả năng biểu hiện gene | 27 |
| 2.2.5. Kiểm tra khả năng chuyển hóa nootkatone | 30 |
| 2.2.6 Xác định điều kiện chuyển hóa nootkatone tối ưu | 30 |
| 2.2.7 Chuyển hóa một số hợp chất sesquiterpene | 32 |
| CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 34 |
| 3.1 Nhân dòng plasmid pETC4AA và kiểm tra sự có mặt của gene mã hóa CYP264B1, AdR và Adx..... | 34 |
| 3.2 Kiểm tra khả năng biểu hiện gene..... | 35 |
| 3.2.1 Khả năng biểu hiện gene CYP264B1 | 35 |
| 3.2.2 Khả năng biểu hiện của Adx | 36 |
| 3.3 Kiểm tra khả năng chuyển hóa nootkatone của hệ xúc tác tế bào C43DE3/CYP264B1-AdR-Adx | 38 |
| 3.4 Xác định điều kiện chuyển hóa nootkatone tối ưu..... | 39 |
| 3.4.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên khả năng chuyển hóa cơ chất..39 | |
| 3.4.2 Ảnh hưởng của mật độ tế bào lên khả năng chuyển hóa cơ chất | 41 |
| 3.4.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chuyển hóa cơ chất..... | 42 |
| 3.4.4 Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng chuyển hóa cơ chất | 44 |
| 3.4.5 Lựa chọn nồng độ cơ chất thích hợp để chuyển hóa..... | 45 |
| 3.5 Sử dụng hệ xúc tác tế bào C43DE3/pETC4AA để chuyển hóa một số hợp chất sesquiterpene | 47 |
| 3.5.1 Kết quả chuyển hóa longipinene | 48 |
| 3.5.2 Kết quả chuyển hóa isolongifolene | 50 |
| 3.5.3 Tinh sạch và nhận dạng sản phẩm chuyển hóa | 51 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT..... | 54 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | 55 |
| PHỤ LỤC | 60 |

DANH MỤC CÁC HÌNH

| Tên hình | Nội dung | Trang |
|----------|--|-------|
| 1.1 | Cách gọi tên enzyme P450 | 3 |
| 1.2 | Sơ đồ chuỗi vận chuyển điện tử của hệ thống cytochrome P450 | 5 |
| 1.3 | Cấu trúc không gian của Cytochrome P450 _{cam} | 7 |
| 1.4 | Cấu tạo nhân heme của enzyme cytochrome P450 | 8 |
| 1.5 | Sắp xếp của gene mã hóa CYP264B1 và terpene cyclase GeoA trên cụm 2 gene của myxobacterium <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56 | 10 |
| 1.6 | Cấu trúc của nhóm sắt-lưu huỳnh | 11 |
| 1.7 | Cấu trúc nhóm FAD | 12 |
| 1.8 | Một số sesquiterpene phổ biến | 13 |
| 1.9 | Một số Sesquiterpene mạch thẳng | 14 |
| 1.10 | Một số sequiterpene mạch vòng đơn | 14 |
| 1.11 | Một số sesquiterpene đa vòng | 15 |
| 2.1 | Plasmid pET C4AA | 20 |
| 2.2 | Sơ đồ nghiên cứu đề tài | 24 |
| 3.1 | Kết quả điện di sản phẩm PCR colony | 34 |
| 3.2 | Cấu trúc đa gene trên vector pETC4AA | 35 |
| 3.3 | Phổ hấp thụ ánh sáng trong vùng 400-500 nm của dịch chiết tế bào C43DE3/pETC4AA sau 24 giờ cảm ứng | 36 |
| 3.4 | Kết quả điện di protein ngoại bào | 37 |
| 3.5 | Phân tích khả năng biểu hiện Adx với kháng thể đặc hiệu bằng kỹ thuật Western blot. | 38 |
| 3.6 | Sắc ký đồ HPLC phân tích kết quả chuyển hóa nootkatone bằng hệ xúc tác tế bào C43DE3/pETC4AA | 39 |
| 3.7 | Chuyển hóa glycerol bởi tế bào vi sinh vật | 43 |
| 3.8 | Cấu trúc của longipinene và isolongifolene | 47 |
| 3.9 | Sắc ký đồ GCMS chuyển hóa longipinene | 49 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.10 | Sắc ký đồ GCMS chuyển hóa isolongifolene | 50 |
| 3.11 | Sắc ký đồ sản phẩm chuyển hóa longipinene (a) và cấu trúc dự đoán bởi GCMS (b) | 51 |
| 3.12 | Sắc ký đồ sản phẩm chuyển hóa isolongifolene (a) và cấu trúc dự đoán bởi GCMS (b) | 52 |
| 3.13 | Cấu trúc phân tử của 15-hydroxy longipinene | 52 |