

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

ĐẶNG KIỀU TRANG

**SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN LIÊN QUAN ĐẾN
TỔNG HỢP ISOFLAVONE CỦA
2 GIỐNG ĐẬU TƯƠNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐẶNG KIỀU TRANG

**SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN LIÊN QUAN ĐẾN
TỔNG HỢP ISOFLAVONE CỦA
2 GIỐNG ĐẬU TƯƠNG**

**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:

PGS. TS Nguyễn Vũ Thanh Thanh

THÁI NGUYÊN - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh và sự giúp đỡ của các cán bộ Khoa Khoa học sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi thông tin trích dẫn trong luận văn này đã được ghi rõ nguồn gốc.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận văn này.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 11 năm 2016

Tác giả luận văn

Đặng Kiều Trang

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian nghiên cứu thực hiện luận văn này tôi luôn nhận được sự hướng dẫn, chỉ bảo tận tình của PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, người trực tiếp hướng dẫn luận văn cho tôi. Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới cô.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Trịnh Đình Khả cũng như các thầy cô giáo Khoa Khoa học sự sống - Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong thời gian học tập cũng như thực hiện đề tài này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, kỹ thuật viên phòng Công nghệ ADN ứng dụng - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ tốt nhất để tôi có thể hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã luôn động viên, khích lệ, chia sẻ khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu hoàn thiện luận văn này.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 11 năm 2016

Tác giả luận văn

Đặng Kiều Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
1.3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cây đậu tương	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây đậu tương.....	3
1.1.2. Đặc điểm nông sinh học của cây đậu tương	4
1.1.3. Thành phần dinh dưỡng trong hạt đậu tương.....	7
1.2. Thành phần và hoạt tính của isoflavone đậu tương	10
1.2.1. Thành phần của isoflavone đậu tương	10
1.2.2. Hàm lượng isoflavone trong thực phẩm	13
1.2.3. Hoạt tính của isoflavone đậu tương	14
1.2.4. Tác dụng của isoflavone	15
1.3. Sinh tổng hợp isoflavone.....	21
1.3.1. Con đường sinh tổng hợp isoflavone	21
1.3.2. Các enzyme tổng hợp isoflavone	22
1.3.3. Gen tổng hợp isoflavone <i>IFS2</i> ở cây đậu tương	23
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24

2.1. Vật liệu nghiên cứu	24
2.2. Hóa chất thiết bị và địa điểm nghiên cứu.....	25
2.2.1. Hóa chất.....	25
2.2.2. Thiết bị	26
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone trong các mẫu đậu tương nghiên cứu.....	27
2.3.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	27
2.3.3. Định lượng và kiểm tra độ tinh sạch của DNA tổng số.....	28
2.3.4. Kỹ thuật PCR	28
2.3.5. Tinh sạch sản phẩm PCR	30
2.3.6. Kỹ thuật tách dòng gen	30
2.3.7. Phương pháp xác định trình tự nucleotide	33
2.3.8. Phương pháp phân tích trình tự gen.....	33
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. Hàm lượng isoflavone của các giống đậu tương nghiên cứu.....	34
3.2. Kết quả nhân dòng và xác định trình tự gen <i>IFS2</i>	35
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số	35
3.2.2. Kết quả nhân gen <i>IFS2</i> ở cây đậu tương.....	36
3.2.3. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR	37
3.2.4. Kết quả tách dòng gen.....	37
3.2.5. Kết quả giải trình tự gen.....	39
3.3. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>IFS2</i>	42
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	51
1. Kết luận	51
2. Đề nghị	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52

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	7
Bảng 1.2. Hàm lượng amino acid không thay thế trong protein đậu tương	8
Bảng 1.3. Thành phần vitamin trong đậu tương	8
Bảng 1.4. Hàm lượng isoflavone trong thực phẩm	13
Bảng 2.1. Đặc điểm các giống đậu tương nghiên cứu	24
Bảng 2.2. Danh mục các thiết bị đã sử dụng.....	26
Bảng 2.3. Cặp mỗi nhân gen <i>IFS2</i>	29
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen <i>IFS2</i>	29
Bảng 2.5. Chu kì nhiệt của phản ứng PCR nhân gen <i>IFS2</i>	29
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng nối gen <i>IFS2</i> vào vector pBT.....	31
Bảng 2.7. Thành phần của phản ứng colony - PCR.....	32
Bảng 2.8. Chu trình nhiệt của phản ứng colony- PCR.....	33
Bảng 3.1 . Hàm lượng Isoflavone ở các giống đậu tương	34
Bảng 3.2. Giá trị mật độ quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260nm và 280nm của hai giống đậu tương DT84 và DT22	35
Bảng 3.3 Số lượng và tỷ lệ các nucleotide trong gen <i>IFS2</i> của giống đậu tương DT84 và DT22.....	39
Bảng 3.4. Các trình tự đoạn mã hoá của gen <i>IFS2</i> mang mã số trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI được sử dụng để phân tích	42

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của các aglucon.....	12
Hình 1.2. Cấu trúc hoá học của các β -Glucozit	12
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp isoflavone	21
Hình 1.4. Sơ đồ mô tả gen <i>IFS2</i> ở cây đậu tương.....	23
Hình 2.1. Cấu trúc vector pBT	31
Hình 3.1. Hình ảnh điện di DNA tổng số trên gel agarose	35
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>IFS2</i> của 2 mẫu đậu tương DT84 và DT22.....	36
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR tinh sạch	37
Hình 3.4. Hình ảnh sản phẩm colony-PCR.....	38
Hình 3.5. Hình ảnh điện di plasmid tái tổ hợp BT- <i>IFS2</i> của giống đậu tương DT22 và DT84.....	39
Hình 3.6. Trình tự gen DT22	40
Hình 3.7. Trình tự gen DT84	41
Hình 3.8. Hệ số tương đồng dựa vào trình tự mã hóa (CDS) của DT 84, DT22 và các trình tự tương đồng trên NCBI	43
Hình 3.9. So sánh trình tự nucleotide gen <i>IFS2</i> của giống DT84 và DT2 và trình tự tương đồng trên GenBank	44
Hình 3.10. Hệ số tương đồng trình tự amino acid suy diễn của giống đậu tương DT22 và DT84 với các trình tự tương đồng trên GenBank	48
Hình 3.11. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein <i>IFS2</i> giống đậu tương DT22, DT84 và trình tự tương đồng trên NCBI.....	49
Hình 3.12. Cây quan hệ di truyền gen <i>IFS2</i> và protein suy diễn của giống đậu tương DT22 và DT84 với các trình tự tương đồng trên GenBank.....	50

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Đậu tương từ lâu đã được biết đến là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao vì nó chứa hàm lượng protein cao hơn bất kì loại nông sản nào, không những thế trong đậu tương còn chứa rất nhiều khoáng chất, các chất sinh tố B đặc biệt là các hoạt chất thảo mộc có khả năng ngăn ngừa và trị liệu bệnh tật. Trong những năm gần đây, đậu tương đã và đang chuyển biến từ thực phẩm thành dược phẩm, là cây thuốc quý được sử dụng trong đông y. Nhiều nghiên cứu khoa học đã chỉ ra sử dụng đậu tương có tác dụng giảm nguy cơ các bệnh liên quan đến tim mạch, ngăn cản sự phát triển một số dạng tiền ung thư và ung thư, ngăn ngừa bệnh thận, bệnh tiểu đường, bệnh loãng xương, bệnh niếp hộ tuyến đàn ông, các triệu chứng rối loạn tiền mãn kinh phụ nữ...

Hàm lượng protein cao trong hạt đậu tương cũng như nhiều hợp chất có giá trị khiến đậu tương trở thành một trong những thực phẩm quan trọng trên thế giới, đậu tương còn được mệnh danh là “thần dược” của phụ nữ [3].

Điều làm các nhà khoa học say mê nghiên cứu là khám phá ra các hoạt chất thảo mộc có trong đậu tương và những ứng dụng của chúng trong lĩnh vực y khoa trị liệu, trong đó các isoflavones là loại hoạt chất sinh học mang lại nhiều hứng thú nhất [3]. Isoflavone là một enzyme có nguồn gốc từ thực vật có cấu trúc tương tự như hormone kích thích tố sinh dục phái nữ 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 [8], [9], [10], [11].

Đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính và tác dụng của isoflavone đậu tương cũng như phương pháp tách chiết, sản xuất, ứng dụng sản phẩm này, nhưng những nghiên cứu sâu hơn về di truyền đối với gen isoflavone vẫn còn rất hạn chế. Hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương khá cao, cao nhất