

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

**ĐỖ THỊ CẨM VÂN**

**SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN TỔNG HỢP  
ISOFLAVONE PHÂN LẬP TỪ ĐẬU XANH**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**THÁI NGUYÊN - 2016**

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

**ĐỖ THỊ CẨM VÂN**

**SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN TỔNG HỢP  
ISOFLAVONE PHÂN LẬP TỪ ĐẬU XANH**

**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. 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 cam đoan và hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận văn này.

*Thái Nguyên, ngày 20 tháng 10 năm 2016*

**Tác giả luận văn**

**Đỗ Thị Cẩm Vân**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh đã luôn quan tâm, hướng dẫn và chỉ bảo tận tình cho tôi trong suốt thời gian nghiên cứu thực hiện luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Hoàng Thị Thu Yến và 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 PGS.TS. Lê Văn Sơn, KS. Hồ Mạnh Tường và các cán bộ, kỹ thuật viên phòng Công nghệ DNA 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 10 năm 2016*

**Tác giả luận văn**

**Đỗ Thị Cẩm Vân**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC BẢNG .....	v
DANH MỤC HÌNH .....	vi
DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT .....	vii
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	3
1.1. Cây đậu xanh.....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây đậu xanh .....	3
1.1.2. Đặc điểm hình thái của cây đậu xanh .....	4
1.1.3. Giá trị của cây đậu xanh.....	8
1.2. Thành phần và hoạt tính của Isoflavone .....	10
1.2.1. Thành phần của Isoflavone .....	10
1.2.2. Hoạt tính và tác dụng điều trị bệnh của Isoflavone .....	13
1.3. Gen và con đường sinh tổng hợp Isoflavone .....	15
1.3.1. Con đường sinh tổng hợp Isoflavone.....	15
1.3.2. Gen tổng hợp Isoflavone.....	16
1.3.3. Gen tổng hợp Isoflavone CHI ở cây xanh .....	18
<b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	19
2.1. Vật liệu, thiết bị, hóa chất và địa điểm nghiên cứu.....	19
2.1.1. Vật liệu .....	19
2.1.2. Hóa chất.....	20

2.1.3. Thiết bị .....	21
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu .....	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số và mRNA tổng số.....	22
2.2.2. Phương pháp tổng hợp cDNA.....	23
2.2.3. PCR khuếch đại gen <i>CHI</i> .....	24
2.2.4. Tách dòng gen <i>CHI</i> .....	27
2.2.5. Phương pháp xác định trình tự nucleotide .....	29
2.2.6. Phương pháp phân tích trình tự gen.....	29
<b>Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>30</b>
3.1. Tạo dòng và xác định trình tự gen <i>CHI</i> từ DNA genome .....	30
3.1.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số .....	30
3.1.2. Kết quả khuếch đại gen <i>CHI</i> từ cây đậu xanh .....	31
3.1.3. Kết quả tách dòng gen <i>CHI</i> từ DNA genome .....	32
3.2. Tạo dòng và xác định trình tự gen <i>CHI</i> từ cDNA.....	34
3.3. Phân tích trình tự gen <i>CHI</i> từ các mẫu nghiên cứu.....	37
3.3.1. Kết quả so sánh trình tự gen <i>CHI</i> từ DNA genome và từ cDNA.....	37
3.3.2. Kết quả so sánh trình tự gen <i>CHI</i> phân lập từ mẫu đậu xanh nghiên cứu với trình tự gen <i>CHI</i> đã được công bố trên Ngân hàng gen.....	41
3.3.3. Phân tích trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>CHI</i> của mẫu đậu xanh nghiên cứu .....	43
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>48</b>
1. Kết luận .....	48
2. Đề nghị .....	48
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>49</b>

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 1.1. Amino acid trong bột đậu xanh và tiêu chuẩn của FAO/WHO .....	9
Bảng 2.1. Cặp mồi nhân gen <i>CHI</i> .....	20
Bảng 2.2. Danh mục các thiết bị đã sử dụng.....	21
Bảng 2.3. Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA .....	24
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen <i>CHI</i> .....	25
Bảng 2.5. Chu kì nhiệt của phản ứng PCR nhân gen <i>CHI</i> .....	25
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng nối gen <i>CHI</i> vào vector pBT .....	27
Bảng 3.1. Tỷ số A260/A280 và hàm lượng DNA tổng số của hai giống đậu xanh nghiên cứu.....	31

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cây đậu xanh.....	4
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của Genistein và Daidzein.....	11
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp isoflavone.....	16
Hình 2.1. Hình ảnh hạt của mẫu giống đậu xanh nghiên cứu.....	19
Hình 3.1. Hình ảnh điện di DNA tổng số trên gel agarose.....	30
Hình 3.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại DNA của gen <i>CHI</i> từ hai giống đậu xanh ĐXĐP và ĐXHL10.....	32
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR plasmid.....	34
Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại cDNA của gen <i>CHI</i> từ hai giống đậu xanh ĐXĐP và ĐXHL10.....	35
Hình 3.5. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt vector pBT- <i>CHI</i> bằng cặp enzyme <i>NcoI</i> và <i>NotI</i> .....	36
Hình 3.6: Đặc điểm cấu trúc gen <i>CHI</i> từ các mẫu đậu xanh nghiên cứu .....	40
Hình 3.7. So sánh trình tự nucleotide gen <i>CHI</i> của đậu xanh Việt Nam với trình tự đã công bố .....	42
Hình 3.8. So sánh trình tự amino acid từ gen <i>CHI</i> của đậu xanh Việt Nam với trình tự đã công bố.....	43
Hình 3.9. So sánh (alignment) trình tự amino acid của <i>CHI</i> giữa các loài thực vật khác nhau. ....	45
Hình 3.10. Cây phân loại của <i>CHI</i> ở một số thực vật.....	46



**DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT**

bp	Base pair (cặp bazơ)
cDNA	Complementary DNA
CHI	Chalcone isomerase
cs	cộng sự
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribose nucleic acid
dNTP	Deoxy nucleoside triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
kb	Kilo base
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi trùng hợp)
RNA	Ribonucleic acid
TAE	Tris-acetate-Ethylene diamine tetraacetic acid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Đậu xanh là cây đậu đỗ ngắn ngày, khả năng sinh trưởng mạnh, dễ thích ứng với nhiều mô hình trồng trọt. Đặc biệt trong những nghiên cứu gần đây cho thấy đậu xanh có thể trồng được nhiều vụ trong năm. Đậu xanh có thể trồng xen, trồng gối, trồng thuần trên nhiều loại đất canh tác khác nhau. Cây Đậu xanh ngoài giá trị kinh tế nó còn có giá trị vô cùng quan trọng khác về mặt sinh học, đó là khả năng cố định nitơ khí quyển thành đạm cung cấp cho cây nhờ vi khuẩn *Rhizobium virgana* cộng sinh ở bộ rễ.

Hạt đậu xanh là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, hạt đậu xanh giàu hydratcacbon, protein và các loại vitamin khác. Protein đậu xanh chứa đầy đủ các amino acid không thay thế. Với hàm lượng dinh dưỡng cao của hạt đậu xanh nên sản phẩm chế biến từ hạt đậu xanh rất phong phú như: Bột đậu xanh, bánh đậu xanh, đồ xôi, nấu chè làm miến, làm giá đỗ.... Ngoài việc cung cấp dinh dưỡng, hạt đậu xanh còn được dùng trong đông y như một bài thuốc nam: Vỏ hạt đậu xanh có vị ngọt, tính hàn có tác dụng giải nhiệt giải độc. Dùng nấu ăn để tiêu phù thũng, hạ bí, giải nhiệt độc, giải các chất độc của thuốc và kim loại, hạt đậu xanh còn dùng chữa bệnh đái tháo đường... Trong đậu xanh còn có chứa thành phần isoflavone là dược chất có nguồn gốc thảo mộc, có thể làm giảm sự xuất hiện của một số loại ung thư, giảm các triệu chứng mãn kinh, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch, béo phì, loãng xương, ngăn chặn sự gia tăng cholesterol trong máu. Bên cạnh đó, hoạt chất Isoflavone giúp phụ nữ tăng cường chất lượng của da, giảm được các nếp nhăn, giảm độ sâu của nếp nhăn mắt, làm cho da săn chắc hơn nhờ tăng cường kết nối collagen, đồng thời cải thiện màu sắc và giữ ẩm cho da.