
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN HÀ XUYÊN

**Nghiên cứu sản xuất, tinh sạch *Pfu* DNA polymerase
tái tổ hợp từ *Escherichia coli***

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Hà Xuyên

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành tới **TS. Lê Quang Hòa, trưởng phòng Kỹ thuật Gen, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội**, người thầy đã luôn hướng dẫn, định hướng và giúp đỡ tôi thực hiện thành công luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo trường **Đại học Thái Nguyên** cũng như các thầy cô thuộc **Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật**, các thầy cô **Viện Công nghệ Sinh học**, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy và truyền thụ cho tôi kiến thức chuyên môn để thực hiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các **cô chị, các bạn đồng nghiệp và các em sinh viên phòng Kỹ thuật Gen** đã nhiệt tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong quá trình làm việc tại phòng thí nghiệm.

Xin gửi lời cảm ơn tới **gia đình, bố mẹ** những người sinh thành, nuôi dưỡng tôi là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi suốt thời gian qua. Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới **anh chị, bạn bè** tôi đã cổ vũ động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Một lần nữa tôi vô cùng cảm ơn.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Học viên

Nguyễn Hà Xuyên

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên đầy đủ
a.a	Amino acid
APS	Amonium persulphate
Bp	Base pair
CBB	Coomassie brilliant blue
DNA Pol	Deoxyribonucleic acid Polymerase
Dntp	Deoxynucleoside triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactoside
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
KLPT	Khối lượng phân tử
LB	Luria – Bertani
OD	Mật độ quang học (optical density)
PCR	Polymerase chain reaction
PLysS	plasmid pLysS mã hóa cho T7 lysozyme
PMSF	Phenyl methyl sulphonyl fluoride
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
ssDNA	Sợi đơn DNA (single stranded DNA)
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl ethylendiamine

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
-------------------	---

LỜI CẢM ƠN.....	iii
CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	iii
MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN	vii
MỞ ĐẦU	1
PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	2
1.1. Tổng quan về DNA polymerase.....	2
1.1.1. DNA polymerase ở sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn	3
1.1.2. Tổng quan về DNA polymerase bền nhiệt.....	4
1.2. Tổng quan về <i>Pfu</i> DNA polymerase	6
1.2.1. Cấu trúc của <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	6
1.2.2. Cơ chế hoạt động sửa sai của <i>Pfu</i> DNA polymerase	8
1.2.3. Một số tính chất của <i>Pfu</i> DNA polymerase	10
1.2.4. Ứng dụng của <i>Pfu</i> DNA polymerase	13
1.2.5. Tình hình nghiên cứu <i>Pfu</i> DNA polymerase tái tổ hợp	15
PHẦN 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị	18
2.1.1. Vật liệu.....	18
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	20
2.2. Phương pháp	21
2.2.1. Tách chiết plasmid	21
2.2.2. Nhân đoạn gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol bằng phản ứng PCR.....	21
2.2.3. Điện di DNA trên gel agarose.....	23
2.2.4. Tinh sạch bằng kit Wizard SV Gel	23
2.2.5. Ghép nối gen.....	23
2.2.6. Biến nạp plasmid vào <i>E. coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt	24
2.2.7. Xác định trình tự DNA.....	25
2.2.8. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol	26
2.2.9. Biểu hiện gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol.....	26
2.2.10. Phân tích protein bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE.....	26
2.2.11. Sắc ký ái lực qua cột amylose	27
2.2.12. Tinh sạch protein đuôi Histag bằng Ni-charged Magbeads	28
2.2.13. Kiểm tra hoạt độ tổng hợp DNA của <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp.....	28

PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Xác định trình tự gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol từ tế bào mang vector pET 11a	29
3.2. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol	36
3.3. Xây dựng quy trình tạo vector biểu hiện.....	38
3.4. Lựa chọn chủng biểu hiện gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol.....	42
3.5. Tinh sạch protein <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp	44
3.6. Thử hoạt tính <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp	47
PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
PHỤ LỤC	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55

DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng	Tiêu đề	Trang
Bảng 1.1	So sánh độ chính xác của các DNA polymerase bền nhiệt trong PCR	11

Bảng 2.1	Trình tự các cặp môi sử dụng trong luận văn	19
Bảng 2.2	Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gen mã hóa <i>Pfu</i> DNA pol	22
Bảng 2.3	Thành phần phản ứng nối ghép	24
Bảng 2.4	Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật	25
Bảng 2.5	Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE	27
Bảng 2.6	Thành phần phản ứng PCR thử hoạt tính <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp	29

DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Hình	Tiêu đề	Trang
Hình1.1	Cấu trúc tổng thể của <i>Pfu</i> DNA polymerase	8

Hình 1.2	So sánh trình tự acid amin và cấu trúc của motif β –hairpin (vùng exonulcease) và motif Y-GG/A (vùng ngón tay cái)	9
Hình 1.3	Cơ chế hoạt động và sửa sai của <i>Pfu</i> DNA polymerase	11
Hình 3.1	Kết quả điện di kiểm tra DNA plasmid mang đoạn gen <i>Pfu</i>	32
Hình 3.2	Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn gen mã hóa cho <i>Pfu</i> DNA pol trong vector pET11a trên gel agarose 1%.	31
Hình 3.3	Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa <i>Pfu</i> DNA pol bằng 2 cặp mồi T7- F/ <i>Pfu</i> - R1 và <i>Pfu</i> – F1/ T7- R	32
Hình 3.4	Kết quả giải trình tự đoạn gen mã hóa <i>Pfu</i> DNA pol từ vector pET11a tái tổ hợp	36
Hình 3.5	Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa <i>Pfu</i> DNA pol	38
Hình 3.6	Kết quả điện di sản phẩm cắt <i>Pfu</i> và vector pMAL - c5X bằng enzyme giới hạn trên gel agarose 1%	39
Hình 3.7	Kết quả PCR sàng lọc và tách chiết plasmid các dòng khuẩn lạc mang plasmid pMAL c5X – <i>Pfu</i> điện di trên gel agarose 1%	41
Hình 3.8	Kết quả biểu hiện protein <i>Pfu</i> DNA pol trong tế bào <i>E. coli</i> BL21(DE3) và <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS điện di trên gel polyacrylamide 8%	43
Hình 3.9	Kết quả tinh sạch protein MBP – <i>Pfu</i> bằng xử lý nhiệt điện di trên gel polyacrylamide 8%	45
Hình 3.10	Kết quả tinh sạch <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp điện di trên gel polycrylamide	46
Hình 3.11	Kết quả điện di sản phẩm PCR thử hoạt tính <i>Pfu</i> DNA pol tái tổ hợp trên gel agarose 1%	47

MỞ ĐẦU

Hiện nay PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm nhân bản một đoạn DNA trong ống nghiệm lên hàng triệu bản sao. Kỹ thuật này có ứng dụng rất nhiều trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau như: chẩn đoán bệnh di truyền, bệnh nhiễm trùng, tách dòng gen và xác định huyết thống... Do tính chất lặp lại nhiều chu kỳ phản ứng ở các nhiệt độ khác nhau, đặc biệt là sự biến tính DNA ở 95°C nên PCR đòi hỏi phải có các enzyme DNA polymerase bền nhiệt để đảm bảo việc xúc tác quá trình nhân bản DNA được thực hiện dễ dàng và đặc hiệu.

Pfu DNA polymerase được tách từ vi khuẩn cổ siêu ưa nhiệt *Pyrococcus furiosus* sinh trưởng tối ưu ở 100°C. *Pfu* DNA polymerase cực kỳ bền nhiệt, vẫn giữ được hơn 95% hoạt độ ban đầu ở 95°C trong một giờ. Ngoài hoạt tính tổng hợp mạch *Pfu* DNA polymerase còn có hoạt tính đọc sửa 3'-5' exonuclease làm tăng độ chính xác của quá trình tổng hợp DNA. Hiện nay *Pfu* DNA polymerase thương mại có xác suất gắn sai một nucleotide khoảng $1,3 \cdot 10^{-6}$. Độ chính xác trong quá trình tổng hợp DNA của *Pfu* DNA polymerase cao hơn nhiều so với *Taq* DNA polymerase và được xem là một trong số ít enzyme có tốc độ tổng hợp ít lỗi nhất trong tất cả các DNA polymerase bền nhiệt đã được nghiên cứu. Chính vì vậy, *Pfu* DNA polymerase được sử dụng phổ biến để khuếch đại các sản phẩm dùng cho mục đích nhân dòng, biểu hiện hay nghiên cứu các đột biến cũng như tổng hợp gen [25].

Pfu DNA polymerase đóng vai trò quan trọng trong phản ứng PCR nên việc thu nhận enzyme này từ vi khuẩn ưa nhiệt trở thành một nhu cầu cấp thiết. Tuy vậy, việc thu nhận chế phẩm enzyme trực tiếp từ các vi khuẩn ưa nhiệt là không đơn giản vì các vi khuẩn này thường yêu cầu môi trường sinh trưởng đặc biệt, nhiệt độ sinh trưởng cao và enzyme quan tâm chỉ được sản xuất ở một lượng rất thấp. Trên thế giới đã có nhiều các công trình khoa học nghiên cứu và tinh sạch *Pfu* DNA polymerase tái tổ hợp nhưng vẫn gặp khó khăn do sử dụng các biện pháp tinh sạch chưa tối ưu như Heparin có giá thành đắt [22], cột P11 phosphocellulose và cột mono Q qui trình sử dụng phức tạp [12].... Ở Việt Nam cho đến nay chỉ có công trình nghiên cứu sản xuất *Pfu* DNA pol từ *E. coli* của Giáo sư Phan Tuấn

Nghĩa được thực hiện vào năm 2005 với qui trình tinh sạch qua sắc ký ái lực với Ni^{2+} và Heparin Sepharose [1, 2]. Tuy nhiên *Pfu* DNA pol tạo ra lại ở dạng dung hợp với 20 a.a của vector nên có thể ảnh hưởng đến khả năng kéo dài DNA trong phản ứng PCR và hơn nữa qui trình tinh sạch bằng Heparin khá tốn kém mà lại không đặc hiệu. Trước những nhược điểm và khó khăn trong việc tinh sạch để thu được *Pfu* DNA pol tinh khiết, hiện nay có rất nhiều công trình nghiên cứu nhằm cải thiện khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*, cũng như khả năng tinh sạch cao khi sử dụng hệ biểu hiện tạo hexahistidine-tagged maltose-binding protein qua việc sử dụng hệ vector biểu hiện pMAL [5, 39]. PMAL là hệ vector biểu hiện cho phép protein tạo ra ở trạng thái tan do được dung hợp với maltose - binding protein (MBP). Ngoài khả năng tạo dạng tan của protein, MBP có ái lực với amylose nên có thể dễ dàng tinh sạch protein dung hợp qua việc sử dụng cột amylose. Điểm cắt của Factor Xa ngay trước *Pfu* DNA pol giúp hoàn nguyên *Pfu* DNA pol. Bên cạnh đó việc sử dụng Histag để tinh sạch bằng Ni^{2+} ở đầu N lại không ảnh hưởng đến hoạt tính của *Pfu* DNA tái tổ hợp [15]. Với những ưu điểm trên, chúng tôi sử dụng hệ vector biểu hiện pMAL kết hợp đuôi His để thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu sản xuất, tinh sạch *Pfu* DNA polymerase tái tổ hợp từ *Escherichia coli*”** với mục tiêu sản xuất *Pfu* DNA polymerase chất lượng cao góp phần tích cực trong việc phục vụ các nghiên cứu về sinh học phân tử trong nước.

PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về DNA polymerase