

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

ĐÀO THỊ NHÂM

THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN  
MANG CẤU TRÚC GEN *CrPrx* PHÂN LẬP  
TỪ CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN – 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

ĐÀO THỊ NHÂM

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN  
MANG CẤU TRÚC GEN *CrPrx* PHÂN LẬP  
TỪ CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 60.42.01.21

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm

THÁI NGUYÊN – 2016

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, tháng 4 năm 2016*

**Tác giả**

**Đào Thị Nhâm**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo thuộc Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm Khoa Sinh học đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn, Ths. Hồ Mạnh Tường và các cán bộ Phòng DNA ứng dụng, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi tiến hành các thí nghiệm của đề tài luận văn.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài luận văn.

Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

*Thái Nguyên, tháng 4 năm 2016*

**Tác giả**

**Đào Thị Nhâm**

# MỤC LỤC

Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn .....	ii
Mục lục .....	iii
Danh mục chữ viết tắt.....	iv
Danh mục bảng.....	v
Danh mục hình .....	vi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
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> .....	<b>3</b>
1.1. Giới thiệu về cây dừa cạn.....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại .....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây dừa cạn.....	4
1.1.3. Tác dụng của cây dừa cạn .....	5
1.2. Hợp chất alkaloid và tác dụng .....	6
1.2.1. Alkaloid .....	6
1.2.2. Alkaloid trong cây dừa cạn .....	10
1.2.3. Peroxidase và gen mã hóa peroxidase .....	14
1.3. Các nghiên cứu nâng cao khả năng tổng hợp vinblastine và vincristine ở cây dừa cạn .....	17
1.3.1. Nghiên cứu nâng cao khả năng tổng hợp vinblastine và vincristine ở cây dừa cạn bằng phương pháp nuôi cấy mô – tế bào thực vật .....	17
1.3.2. Nghiên cứu nâng cao khả năng tổng hợp vinblastine và vincristine ở cây dừa cạn bằng phương pháp chuyển gen .....	19
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>22</b>
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị.....	22

2.1.1.	Vật liệu .....	22
2.1.2.	Hóa chất và thiết bị .....	22
2.2.	Phương pháp nghiên cứu.....	24
2.2.1.	Thiết kế cặp mồi nhân gen .....	27
2.2.2.	Kỹ thuật tách chiết RNA tổng số.....	28
2.2.3.	Phương pháp tổng hợp cDNA từ mRNA.....	28
2.2.4.	Nhân gen <i>CrPrx</i> bằng kỹ thuật RT-PCR.....	29
2.2.5.	Phương pháp tinh sạch sản phẩm RT-PCR.....	30
2.2.6.	Kỹ thuật tách dòng gen .....	31
2.2.7.	Phương pháp xác định và phân tích trình tự nucleotide đoạn gen <i>CrPrx</i> .....	34
2.2.8.	Thiết kế vector chuyển gen mang <i>CrPrx</i> .....	34
2.2.9.	Xử lý số liệu bằng phần mềm chuyên dụng.....	37
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....		<b>38</b>
3.1.	Kết quả phân lập và tách dòng gen <i>CrPrx</i> .....	38
3.1.1.	Kết quả khuếch đại đoạn gen <i>CrPrx</i> từ mRNA .....	38
3.1.2.	Kết quả ghép nối gen <i>CrPrx</i> vào vector tách dòng .....	39
3.2.	Xác định trình tự gen <i>CrPrx</i> .....	43
3.3.	Thiết kế vector chuyển gen mang gen <i>CrPrx</i> .....	47
3.3.1.	Tạo cấu trúc chứa gen đích <i>CrPrx</i> (35S- <i>CrPrx</i> -Cmyc) .....	48
3.3.2.	Gắn cấu trúc chứa gen <i>CrPrx</i> vào vector pBI121 .....	51
3.4.	Tạo vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i> mang vector chuyển gen <i>CrPrx</i> .....	54
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</b> .....		<b>56</b>

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABA	Abscisic acid	Axit Absisic
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
Bp	base pairs	Cặp bazơ nito
CaMV 35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter	
Cs		Cộng sự
<i>CrPrx</i>	<i>Catharanthus roseus</i> peroxidase	Gen mã hóa peroxidase ở cây dứa cạn
<i>C. roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	Cây dứa cạn
<i>DAT</i>	<i>Deacetylvindoline 4-O-acetyl transferase</i>	Gen <i>DAT</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonucleic
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assa	Xét nghiệm ELISA
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MCS	Multi Cloning Site	Vùng cắt gắn đa vị
NptII	Neomycin phosphotransferase gene	
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
Kb	Kilo base	
SDS	Sodium dodecyl sulphate	
RT-PCR	Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase -phiên mã ngược
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-Dgalacto-pyranoside	
V/p		Vòng/ phút

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Thành phần phản ứng RT-PCR nhân gen <i>CrPrx</i> .....	29
Bảng 2.2: Chu trình nhiệt và thời gian phản ứng RT- PCR nhân gen <i>CrPrx</i> .....	30
Bảng 2.3: Thành phần phản ứng gắn gen <i>CrPrx</i> vào vector tách dòng pBT.....	31
Bảng 2.4: Thành phần môi trường nuôi cấy khuẩn .....	32
Bảng 2.5: Thành phần phản ứng colony - PCR.....	32
Bảng 2.6: Thành phần hoá chất tách plasmid.....	33
Bảng 2.7: Thành phần cắt vector tái tổ hợp pBT- <i>CrPrx</i> và pRTRA7/3 .....	35
Bảng 2.8: Thành phần ghép nối vector pRTRA7/3 và gen <i>CrPrx</i> .....	35
Bảng 2.9: Thành phần phản ứng cắt plasmid pRTRA7/3- <i>CrPrx</i> và pBI121 .....	36
Bảng 3.1: Vị trí nucleotide sai khác giữa hai trình tự gen <i>CrPrx</i> và LN809932 .....	46



## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Hoa của ba giống <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	4
Hình 1.2: Sơ đồ tổng hợp vinblastine và vincristine.....	12
Hình 1.3: Công thức hóa học của vinblastine .....	13
Hình 1.4: Công thức hóa học của vincristine .....	13
Hình 2.1: Vector tách dòng pBT .....	23
Hình 2.2: Vector pRTRA7/3 .....	23
Hình 2.3: Vector pBI121 .....	23
Hình 2.4: Sơ đồ thí nghiệm phân lập và thiết kế vector chuyển gen pBI121- <i>CrPrx</i> .....	26
Hình 3.1: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn cDNA <i>CrPrx</i> .....	38
Hình 3.2: Đĩa nuôi cấy dòng tế bào khả biến <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ chứa vector tái tổ hợp mang đoạn gen <i>CrPrx</i> .....	40
Hình 3.3: Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc.....	41
Hình 3.4: Kết quả điện di sản phẩm DNA tinh sạch sau khi cắt plasmid bằng <i>NcoI/NotI</i> .....	43
Hình 3.5: So sánh trình tự nucleotid của gen <i>CrPrx</i> với trình tự gen mang mã số LN809932 .....	45
Hình 3.6: Sơ đồ thiết kế vector pBI121- <i>CrPrx</i> .....	47
Hình 3.7: Đoạn DNA đích đã tinh sạch từ pRTRA7/3 cắt mở vòng bằng <i>NcoI/NotI</i> .....	49
Hình 3.8: Kết quả PCR các dòng khuẩn lạc từ plasmid tái tổ hợp pRTRA7/3- <i>CrPrx</i> .....	50
Hình 3.9: Kết quả cắt plasmid pRTRA7/3- <i>CrPrx</i> bằng <i>HindIII</i> thu nhận cấu trúc chứa gen <i>CrPrx</i> .....	52
Hình 3.10: Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid vector pBI121 .....	53
Hình 3.11: Kết quả điện di colony-PCR của vector tái tổ hợp pBI121- <i>CrPrx</i> .....	54
Hình 3.12: Kết quả điện di sản phẩm <i>A.tumefaciens</i> mang vector chuyển gen.....	55

# MỞ ĐẦU

## 1. Đặt vấn đề

Nước ta là một nước nhiệt đới với những điều kiện khí hậu thuận lợi, vì vậy nguồn tài nguyên thiên nhiên rất phong phú và đa dạng. Cùng với nền y học cổ truyền dân tộc có truyền thống lâu đời, nhân dân ta đã biết sử dụng các loài cây cỏ xung quanh làm nguồn dược liệu để chữa bệnh rất có hiệu quả. Ngày nay, bên cạnh thuốc tân dược thì các loại dược liệu có nguồn gốc từ thiên nhiên ngày càng được ưa chuộng.

Sự thay đổi khí hậu toàn cầu dẫn tới sự khắc nghiệt của thời tiết, môi trường sống bị ô nhiễm, thói quen sinh hoạt của con người thay đổi, thực phẩm không an toàn... Những yếu tố này tác động đến sức khỏe của con người, làm gia tăng nguy cơ mắc bệnh, trong đó có nguy cơ các tế bào bị biến đổi. Đây là một trong các nguyên nhân làm cho số ca mắc bệnh ung thư ngày càng tăng. Vì thế, một trong những nhiệm vụ hàng đầu của các nhà khoa học là nghiên cứu, cải tiến các biện pháp chữa trị ung thư để nâng cao chất lượng đời sống cho người bệnh.

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong những cây có khả năng sản xuất các indol alkaloid có dược tính quan trọng trong chế tạo các loại thuốc chống ung thư, đặc biệt là ung thư máu. Trong các indol alkaloid có mặt trong cây dừa cạn, hai loại alkaloid là vinblastine, vincristine được sử dụng nhiều nhất. Nhưng các chất này lại có hàm lượng rất nhỏ trong cây dừa cạn, khoảng nửa tấn lá khô mới chiết được 1g vinblastine cho sản xuất dược phẩm (Noble, 1990) [21]. Các chất này không thể tổng hợp bằng con đường hóa học do có cấu trúc rất phức tạp. Do vậy, nâng cao hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn theo hướng công nghệ gen là một hướng nghiên cứu được quan tâm bởi nhiều nhà khoa học trên thế giới.