

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HÀ THU NGA

**ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *ISOFLAVONE SYNTHASE (IFS1)*
PHÂN LẬP TỪ HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT26 và ĐT84**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HÀ THU NGA

**ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *ISOFLAVONE SYNTHASE (IFS1)*
PHÂN LẬP TỪ HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT26 và ĐT84**

Chuyên ngành : Di truyền học
Mã số: 60.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học : GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái nguyên, 4- 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. 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 kết quả trong luận văn này.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 4 năm 2016

Tác giả luận văn

Hà Thu Nga

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS .TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn trong suốt thời gian nghiên cứu , thực hiện và hoàn thành bản luận văn thạc sỹ sinh học này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Khoa Sinh học , trường Đại học sư phạm - 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 luận văn thạc sỹ.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ 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 4 năm 2016

Tác giả luận văn

Hà Thu Nga

MỤC LỤC

Trang

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG.....	3
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại học và đặc điểm sinh học của cây đậu tương	3
1.1.2. Thành phần hóa học trong hạt đậu tương.....	4
1.2. ĐẶC ĐIỂM CỦA ISOFLAVONE	11
1.2.1. Cấu trúc và thành phần cơ bản của isoflavone	11
1.2.2. Cơ chế hoạt động và chức năng của isoflavone.....	13
1.3. CHUYỂN HÓA ISOFLAVONE VÀ GEN MÃ HÓA ISOFLAVONE SYNTHASE	14
1.3.1. Chu trình chuyển hóa isoflavone trong hạt đậu tương.....	14
1.3.2. Con đường sinh tổng hợp isoflavone	15
1.3.3. Isoflavone synthase và gen mã hóa IFS	16
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	19
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ 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.....	21
2.2.1. Phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone trong các mẫu đậu tương ĐT26, ĐT90, ĐT84.....	21
2.2.2. Phương pháp tách chiết mRNA tổng số.....	22
2.2.3. Phương pháp nhân bản đoạn mã hóa của gen <i>GmIFS1</i>	23
2.2.4. Tách dòng phân tử.....	25
2.2.5. Phương pháp xác định và phân tích trình tự nucleotide của gen.....	28
2.2.6. Phân tích và xử lý dữ liệu.....	28
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. HÀM LƯỢNG ISOFLAVONE TRONG HẠT NẢY MẦM CỦA BA GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT26, ĐT90, ĐT84.....	29
3.2. TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE CỦA A GEN <i>GmIFS</i> TỪ mRNA CỦA ĐẬU TƯƠNG.....	32
3.2.1. Thiết kế cặp mồi PCR và nhân bản gen <i>GmIFS</i>	32
3.2.2. Tách dòng phân tử đoạn mã hóa của gen <i>GmIFS</i> trong <i>E.coli</i>	34
3.2.3. Trình tự gen <i>GmIFS</i> phân lập từ hai giống đậu tương ĐT26 và ĐT84.....	35
3.3. SỰ ĐA DẠNG VỀ TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÀ AMINO ACID SUY DIỄN CỦA GEN <i>GmIFS1</i>	42
3.3.1. Sự đa dạng về trình tự nucleotide của gen <i>GmIFS1</i>	42
3.3.2. Sự đa dạng về trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmIFS1</i>	44
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	47
1. Kết luận.....	47
2. Đề nghị.....	47
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	49

DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

cs	: cộng sự
bp	: base pair (cặp bazơ)
kb	: kilo base
kDa	: kilo Dalton
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
DNA	: deoxyribosenucleic acid
dNTP	: deoxynucleoside triphosphate
cDNA	: complementary DNA
mRNA	: messenger ribonucleic acid
IFS	: Isflavone synthase
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
<i>E. coli</i>	: Escherichia coli

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA.....	23
Bảng 2.2. Trình tự các cặp môi PCR sử dụng trong nghiên cứu.....	23
Bảng 2.3. Thành phần của phản ứng PCR	24
Bảng 2.4. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR	24
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng nối gen <i>GmIFS1</i> vào vector pBT	26
Bảng 3.1. Hàm lượng daidzein , genistein và isoflavone trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của 3 giống đậu tương ĐT26, ĐT90 và ĐT84.	31
Bảng 3.2. Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen <i>GmIFS1</i> giữa các giống đậu tương ĐT26, ĐT84 và NM_001249093	39
Bảng 3.3. Các vị trí sai khác trong trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>GmIFS1</i> giữa ba giống đậu tương ĐT26, ĐT84, NM_001249093	41
Bảng 3.4. Trình tự gen <i>GmIFS1</i> của giống đậu tương ĐT26, ĐT84 và các trình tự có mã số trên Ngân hàng gen quốc tế được sử dụng trong phân tích.....	43
Bảng 3.5. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>GmIFS1</i>	44
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmIFS1</i>	45

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của các aglucone	12
Hình 1.2. Cấu trúc hoá học của các β -glucoside	12
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp isoflavone (Phản ứng xúc tác bởi enzym IFS màu xanh dương) [14]	16
Hình 2.1. Sơ đồ vector pBT.....	26
Hình 3.1. Hình ảnh hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi được sử dụng chiết rút daidzein và genistein. A. ĐT26, B: ĐT90, C: ĐT84	29
Hình 3.2. Sắc ký đồ phân tích daidzein , genistein từ hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của các giống đậu tương. A: ĐT26, B: ĐT90, C: ĐT84.....	30
Hình 3.3. Biểu đồ so sánh hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm giữa ba giống đậu tươngĐT 26, ĐT90, ĐT84 (mg/100 g). Thanh đứng trên mỗi cột biểu đồ biểu thị sai số chuẩn ($\bar{x} \pm S_x$)	32
Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmIFS</i> từ hai giống đậu tương ĐT26 và ĐT84.....	34
Hình 3.5. A: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony -PCR với cặp mồi SoyIFS-NcoI-F/ SoyIFS-NotI-R từ 4 dòng khuẩn lạc có kiểu hình trắng được lựa chọn ngẫu nhiên . M: thang DNA 1 kb; giếng 1, 2: ĐT26; giếng 3,4: ĐT84.	35
Hình 3.6 Trình tự nucleotide của gen <i>GmIFS1</i> phân lập từ hai giống đậu tương ĐT26 và ĐT84 so với trình tự gen <i>IFS1</i> của giống đậu tương mang mã số NM_001249093 trên Ngân hàng Gen.....	37
Hình 3.7. Trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>GmIFS</i> 1 phân lập từ hai giống đậu tương ĐT 26, ĐT84 và từ gen <i>IFS</i> 1 mang mã số NM_001249093 trên Ngân hàng Gen	40
Hình 3.8. Vị trí của gen <i>GmIFS1</i> phân lập từ hai giống đậu tương ĐT 26 và ĐT84.....	42
Hình 3.9. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ của một số giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>GmIFS1</i>	44
Hình 3.10. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ của một số giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmIFS1</i>	46

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương có tên khoa học là *Glycine max* (L.) Merrill, thuộc chi *Glycine*, họ đậu (*Fabaceae*) được trồng phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới. Sản phẩm từ cây đậu tương rất đa dạng như dùng trực tiếp hạt thô hoặc chế biến thành đậu phụ, ép thành dầu đậu tương, nước tương, làm bánh kẹo, sữa đậu tương, okara... đáp ứng nhu cầu đa dạng trong khẩu phần ăn hàng ngày của người cũng như gia súc [6]. Hạt đậu tương có hàm lượng protein cao, từ 20-40%, dễ tan và chứa hầu hết các loại amino acid cần thiết cho cơ thể con người. Cây đậu tương ngày càng được quan tâm nhiều do trong thành phần có chứa được chất isoflavone. Đây là chất chống oxy hóa mạnh, ngăn chặn các gốc tự do, hỗ trợ miễn dịch và giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch ở người [26], [6].

Đậu tương giờ đây không chỉ là cây thực phẩm mà đã và đang được nghiên cứu dưới vai trò là cây dược phẩm. Theo những nghiên cứu cho thấy, ngoài hàm lượng protein và lipid cao trong đậu tương còn chứa nhiều khoáng chất, các vitamin và đặc biệt là các hoá chất thảo mộc như: lecithin, saponin, trypsin inhibitor, lectin, phenolic acid, omega-3 fatty acid,... và hiện nay isoflavone đang được quan tâm nhiều nhất, vì isoflavone có cấu trúc tương tự như hormone kích thích tố sinh dục phái nữ (female hormone estrogen) và hoạt động giống như estrogen. Isoflavone kiểm soát quá trình tương tác giữa cây và vi sinh vật, điều chỉnh hormone, kích thích tố sản xuất estrogen, do vậy có thể cải thiện các hội chứng tiền mãn kinh và chống loãng xương ở phụ nữ mãn kinh. Isoflavone cũng là chất chống oxy hóa mạnh, có thể làm giảm nguy cơ ung thư bằng cách ngăn chặn các gốc tự do, trong đó genistein là chất chống oxy hóa mạnh nhất trong số các isoflavone, tiếp theo là daidzein. Isoflavone làm giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch ở người bằng cách làm giảm nồng độ LDL-cholesterol huyết thanh. Isoflavone còn là chất hỗ trợ miễn dịch [25], [31], [33], [39].