

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



MAI HOÀNG OANH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ XÁC
ĐỊNH MỘT SỐ TRÌNH TỰ GEN PHÂN LOẠI
CÂY SÓI RỪNG (*Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Thái Nguyên – 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



MAI HOÀNG OANH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ XÁC
ĐỊNH MỘT SỐ TRÌNH TỰ GEN PHÂN LOẠI
CÂY SÓI RỪNG (*Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai)**

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: **TS. Nguyễn Thị Hải Yến**

Thái Nguyên - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và nhóm nghiên cứu, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2016

Tác giả luận văn

Mai Hoàng Oanh

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thị Hải Yến - Khoa Khoa học sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và ThS. Hồ Mạnh Tường cùng các cán bộ nghiên cứu thuộc Phòng công nghệ ADN ứng dụng - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy, cô giáo các nhà khoa học đã trực tiếp giảng dạy truyền đạt những kinh nghiệm, kiến thức khoa học quý báu. Cảm ơn các thầy cô, đồng nghiệp và bạn bè đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn này. Tôi luôn trân trọng và biết ơn sự giúp đỡ hết mình đó.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và các cán bộ của cơ sở đào tạo thuộc Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tác giả luận văn

Mai Hoàng Oanh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về cây sói rừng	3
1.1.1. Phân loại học	3
1.1.2. Thành phần hóa học của cây sói rừng	4
1.1.3. Tác dụng sinh học của cây sói rừng	4
1.2. Tổng quan về mã vạch DNA	7
1.2.1. Giới thiệu về DNA Barcode	7
1.2.2. Các đặc điểm cơ bản của trình tự barcode	8
1.2.3. Một số locus được sử dụng trong phương pháp DNA barcode ở thực vật	9
1.2.3.1. Trình tự gen nhân	9
1.2.3.2. Vùng gen mã hóa ribosome	10
1.2.3.3. Trình tự gen lục lạp	10
1.3. Ứng dụng của mã vạch DNA trong nhận biết cây dược liệu	14
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Vật liệu nghiên cứu, hóa chất và thiết bị	18
2.1.1. Vật liệu thực vật	18
2.1.2. Chủng vi khuẩn	18
2.1.3. Hóa chất	18
2.1.4. Thiết bị sử dụng	19
2.1.5. Địa điểm nghiên cứu	19
2.2. Phương pháp nghiên cứu	19
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái	19
2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử	20
2.2.2.2. Kiểm tra sản phẩm DNA sau khi tách chiết	21
2.2.2.3. Phương pháp nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR	22
2.2.2.4. Tinh sạch sản phẩm PCR	24

2.2.2.5. Phản ứng ghép nối gen ngoại lai vào vector	25
2.2.2.6. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào <i>E. coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt.....	26
2.2.2.7. Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony - PCR)	26
2.2.2.8. Tách chiết plasmid từ tế bào <i>E. coli</i>	28
2.2.2.9. Phương pháp xác định trình tự của gen.....	29
2.2.2.10. Phương pháp phân tích số liệu	29
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1. Đặc điểm thực vật học của cây sói rừng thu tại Lạng Sơn.....	30
3.2. Phân lập gen từ mẫu cây sói rừng	32
3.2.1. Tách chiết DNA tổng số.....	32
3.2.2. Khuếch đại vùng gen nghiên cứu bằng phản ứng PCR	33
3.2.3. Kết quả ghép nối gen vào vector tách dòng.....	35
3.2.4. Kết quả chọn dòng tế bào mang gen tái tổ hợp	36
3.2.5. Kết quả tách chiết plasmid tái tổ hợp	37
3.3. Kết quả xác định trình tự đoạn các đoạn gen nghiên cứu.....	38
3.3.1. Phân tích trình tự đoạn gen <i>rpoC1</i>	39
3.3.2. Phân tích vùng ITS	42
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	48

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tên tiếng Anh
bp	Base pair
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleostide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropylthio-beta-D-galactoside
UV	Ultraviolet
LB	Luria Bertani
ITS-rDNA	Internal Transcribed Spacer-rDNA
Kb	Kilobase
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
rDNA	Ribosome deoxyribonucleic acid
Rnase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Sol	Solution
STS	Sequence-Tagged Site
TAE	Tris - Acetic acid - EDTA
<i>Taq</i> polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase
TE	Tris - Ethylenediaminetetraacetic acid
X-gal	X - 5 - brom - 4 - chloro3 - indolyl - β - D - galactosidase

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thông tin của một số môi DNA Barcode thiết kế cho hệ gen lục lạp.....	111
Bảng 2.1. Các máy móc và các thiết bị sử dụng trong thí nghiệm.....	19
Bảng 2.2. Thành phần dung dịch đệm rửa	200
Bảng 2.3. Thành phần dung dịch đệm tách	200
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR	22
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR nhân gen <i>ITS</i>	23
Bảng 2.6. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR nhân gen <i>rpoC1</i>	23
Bảng 2.7. Trình tự môi dừng trong phản ứng PCR	23
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng ghép nối đoạn gen vào vector tách dòng	25
Bảng 2.9. Thành phần môi trường chọn lọc tế bào vi khuẩn mang	26
Bảng 2.10. Thành phần phản ứng colony - PCR	27
Bảng 2.11. Chu trình nhiệt của phản ứng colony-PCR.....	27
Bảng 2.12. Thành phần hóa chất tách plasmid	28
Bảng 3.1. Các vị trí sai khác giữa trình tự nucleotide của đoạn gen <i>rpoC1</i> ...	41
Bảng 3.2. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự nucleotide của gen <i>rpoC1</i> phân lập từ mẫu sói rừng thu tại Lạng Sơn.....	41
Bảng 3.3. Mức độ tương đồng của gen <i>ITS</i> của mẫu sói rừng nghiên cứu với một số trình tự trên ngân hàng gen thế giới (NCBI).....	44
Bảng 3.4. Các vị trí sai khác giữa trình tự nucleotide của đoạn gen <i>ITS</i>	46
Bảng 3.5. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự nucleotide của gen <i>ITS</i> phân lập từ mẫu sói rừng thu tại Lạng Sơn	46

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh cây sói rừng trong tự nhiên	3
Hình 2.1. Sơ đồ vector pBT	25
Hình 3.1. Mẫu cây Sói rừng thu thập tại Lạng sơn.....	30
Hình 3.2. Các bộ phận của cây sói rừng.....	31
Hình 3.3. Kết quả điện di DNA tổng số cây Sói rừng trên gel agarose 1%	32
Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm nhân gen <i>rpoC1</i> và sản phẩm nhân gen <i>ITS</i> từ các cặp môi đặc hiệu	34
Hình 3.5. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến.....	35
Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm PCR - clony các khuẩn lạc sử dụng môi <i>rpoC1</i> và môi <i>ITS</i>	37
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm tách chiết plasmid.....	38
Hình 3.8. Trình tự nucleotide của đoạn <i>rpoC1</i> phân lập từ mẫu sói rừng và hai trình tự mang mã số EF380352 và KP256024 trên Genbank	40
Hình 3.9. Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng đoạn gen <i>rpoC1</i> của mẫu sói rừng với mẫu EF380352 và KP256024 trên Genbank.	42
Hình 3.10. Trình tự nucleotide của đoạn gen <i>ITS</i> phân lập từ mẫu sói rừng SR và 4 trình tự mang mã số JN407442, JN407443, KC840060, KP317601 trên ngân hàng gen quốc tế.....	45
Hình 3.11. Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng đoạn vùng gen <i>ITS</i> của mẫu sói rừng với mẫu có mã số JN407442, JN407443, KC840060, KP317601 trên ngân hàng gen quốc tế	46

MỞ ĐẦU

Theo đánh giá của Tổ chức Y tế Thế giới, bệnh ung thư hiện nay luôn là gánh nặng của nền kinh tế - xã hội đối với mọi quốc gia, trung bình mỗi năm có thêm 10 - 16 triệu người mắc bệnh. Đây là một căn bệnh nguy hiểm, có tỷ lệ tử vong cao. Mặc dù hiện nay đã có rất nhiều phương pháp điều trị hiện đại nhằm loại bỏ khối u như phương pháp xạ trị, hóa trị, liệu pháp hormon, liệu pháp sinh học, điều trị trúng đích và ghép tế bào gốc để ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư. Ngoài ra, người bệnh còn phải sử dụng các thuốc nhằm nâng cao thể trạng, khắc phục hậu quả do khối u gây ra, kéo dài thời gian sống cho người bệnh. Tuy nhiên, phương pháp này rất tốn kém về mặt kinh tế [3], [9].

Ngày nay việc sử dụng các loại thuốc thảo dược theo cách cổ truyền hay các hợp chất được tổng hợp từ các chất có nguồn gốc thiên nhiên có xu hướng ngày càng tăng và chiếm một vị trí quan trọng trong nền y học, bởi chúng có khả năng chữa trị bệnh cao, an toàn và ít tác dụng phụ. Ở Việt Nam tính đến 2005 đã xác định được 3948 loài thực vật và nấm, 52 loài tảo biển, 408 loài động vật và 75 loại khoáng vật có công dụng làm thuốc. Đa số các cây thuốc mọc tự nhiên, tập trung chủ yếu trong các quần xã rừng, chỉ có gần 10 % trong số đó là cây thuốc trồng [1]. Kết quả này cũng đã cho thấy nguồn dược liệu ở nước ta rất phong phú đa dạng về chủng loại.

Các nghiên cứu khoa học gần đây cho thấy cây Sói rừng (*Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai) là dược liệu có khả năng chữa trị các bệnh cảm mạo, viêm phổi, viêm ruột thừa, đau lưng và một số bệnh ung thư như ung thư tụy, ung thư dạ dày, ung thư gan, ung thư trực tràng, ung thư cuống họng... [2], [12], [21]. Tuy nhiên việc nghiên cứu sử dụng cây thuốc còn chưa được quan tâm đúng mức đã và đang làm cho khu vực phân bố của loài bị thu hẹp và trữ lượng của loài suy giảm một cách nghiêm trọng.