

R

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
Trung tâm Công nghệ Sinh học
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI

**“NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
PROTEIN TÁI TỔ HỢP, PROTEIN BẤT HOẠT RIBOXOM CÓ
GIÁ TRỊ SỬ DỤNG TRONG Y DƯỢC VÀ NÔNG NGHIỆP”**

CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI: GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Hà nội, tháng 10 năm 2004
Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước,
mã số KC-04-14

5414 11

13/7/05

Các đề tài nhánh:

- 14.1 Nghiên cứu CNSX protein tái tổ hợp ức chế proteinaza (RePPI)
Chủ trì: **GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu**
TT CNSH, ĐHQG Hà nội
- 14.2 Nghiên cứu CNSX protein tái tổ hợp ức chế α -amilaza (Re α -AI)
Chủ trì: **PGS. TS. Đặng Thị Thu**
Viện CNSH-CN Thực phẩm, Bộ môn CN thực phẩm - CN sau thu hoạch
ĐHBK Hà nội.
- 14.3 Nghiên cứu CNSX protein bất hoạt riboxom
Chủ trì: **PGS. TS. Nông Văn Hải**
Viện CNSH, Viện KHCN Quốc gia

Danh sách những người thực hiện:

Đề tài nhánh	Họ tên	Cơ quan
14.1	GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu	TTCNSH-ĐHQGHN
	TS. M.K. Reddy	Khối (Division) Sinh học phân tử thực vật. Trung tâm Quốc tế kỹ thuật Di truyền và Công nghệ sinh học, Ấn độ.
	TS. Võ Thương Lan	Khoa sinh học, ĐHKHTN-ĐHQGHN
	PGS.TS. Trịnh Hồng Thái	“
	TS. Dương Văn Hợp	TTCNSH-ĐHQGHN
	Ths. Phan Thị Hà	Phòng CN Enzim-Protein, TTCNSH-ĐHQGHN
	CN. Đào Thị Thuý	“
	CN. Hoàng Thu Hà	“
	CN. Nguyễn Quỳnh Uyển	“
	CN. Đặng Xuân Nghiêm	“
	CN. Nguyễn Phương Nam	“
	KS. Nguyễn Phương Thảo	“
14.2	KS. Mai Kiều Linh	“
	PGS.TS. Đặng Thị Thu	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Nguyễn Xuân Sâm	Viện CNSH-CNTP
	TS. Tô Kim Anh	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Lê Quang Hoà	“
	CN. Trương Quốc Phong	“

14.3	PGS. TS. Nông Văn Hải	Viện KHCN Việt nam
	PGS. TS. Phan Văn Chi	“
	TS. Lê Thị Thu Hiền	“
	TS. Trần Thị Phương Liên	“
	Ths. Nguyễn Huy Hoàng	“
	Ths. Nguyễn Đăng Tôn	“
	CN. Nguyễn Đình Cường	“
	CN. Đặng Thành Nam	“
	CN. Nguyễn Thuỳ Dương	“
	CN. Phạm Thu Thủy	“

BÀI TÓM TẮT

Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã phát hiện được các nguồn thực vật giàu các protein ức chế proteinaz (PPI), protein ức chế α - amilaz (α - AI), protein bất hoạt riboxom (RIP). Chúng tôi đã nghiên cứu tính chất, khả năng ứng dụng thực tế của các chất này. Kết quả cho thấy MCoTI-II tách từ hạt gạo ($M_r=3,48\text{kD}$), CMTI-V của hạt bí đỏ ($M_r=7,1\text{kD}$), α -AI của hạt đậu cove ($M_r \sim 18\text{kD}$), RIP của quả mướp đắng ($M_r \sim 30\text{kD}$) có tiềm năng ứng dụng lớn để làm thuốc chữa bệnh, trừ sâu hại. Công trình này nhằm sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để tạo các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp các chất đã nêu làm cơ sở để có thể lên men sản xuất chúng với lượng lớn. Mặt khác, thiết kế các vector phục vụ chuyển các gen, tạo các chủng *Agrobacterium* thích hợp để chuyển gen vào cây trồng.

Kết quả nghiên cứu của đề tài:

- 1. Đã tách ADN genom của gạo, bí đỏ, mướp đắng, đậu cove, có độ sạch đạt yêu cầu ($OD_{260}/OD_{280} = 1.85-1.9$).**
- 2. Đã tổng hợp hoặc phân lập được 4 gen:** 2 gen mã hoá PPI là gen MCoTI-II, gen CMTI-V; một gen mã hoá α -AI; một gen mã hoá RIP, các gen có các trung tâm nhận biết của các enzym giới hạn đã được lựa chọn. Nhân bản các gen bằng kỹ thuật PCR kiểm tra kích thước trên gel agaroz, các gen có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết, theo thứ tự tương ứng vào khoảng 110bp; 230bp; 700bp; 800bp, có độ đồng nhất điện di (cho 1 băng). Đã xác định trình tự nucleotit của các gen này là đúng.
- 3. Đã lựa chọn các vector thích hợp, xử lý với các enzym giới hạn tương thích, gắn với các protein đích tạo các vector tái tổ hợp.** Bốn vector tái tổ hợp được thiết kế được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* BL21 để biểu hiện các protein đích. Đối MCoTI-II sử dụng vector pTYB12, các enzym *NdeI*, *XhoI*; gen CMTI-V: vector pET14b, các enzym *NdeI*, *BamHI*; với α - AI và RIP: vector pET21d (+), các enzym *NcoI*, *BamHI*. Các vi khuẩn tái tổ hợp được kí hiệu là: PI-17 mang gen MCoTI-II; BL21-TI mang gen CMTI-V; BL21- α AI mang gen α -AI; BL21-RIP mang gen RIP.

Trước khi tiến hành nuôi biểu hiện đã kiểm tra kết quả biến nạp bằng cách tách plasmid của các vi khuẩn này, cắt bằng các enzym giới hạn tương ứng, điện di trên agaroz, sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi tương thích để nhân bản gen đích, điện di trên gel agaroz, PAG, kiểm tra trình tự nucleotit của các gen đích. Các kết quả cho thấy đã biến nạp thành công.

4. Đã xây dựng 4 qui trình (vượt kế hoạch 1 qui trình) thích hợp để nuôi các vi khuẩn tái tổ hợp:

Đã lựa chọn được các điều kiện thích hợp (về nhiệt độ, nồng độ ampicilin, nồng độ chất cảm ứng, thời gian nuôi v.v...) để nuôi các vi khuẩn tái tổ hợp biểu hiện gen đích. Đối với tất cả 4 vi khuẩn tái tổ hợp đều nuôi trong môi trường LB pH 7.0, sau khi thêm dung dịch huyền phù vi khuẩn vào, lắc hoặc khuấy (trong nồi lên men) 220 vòng/phút, thêm chất cảm ứng IPTG và nuôi tiếp. Tuy nhiên điều kiện nuôi mỗi vi khuẩn có những khác nhau như đã ghi trong bảng sau:

Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicilin ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi ($^{\circ}\text{C}$)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI (mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- αAI (mang gen αAI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

5. Thu protein tái tổ hợp ở dạng sơ chế, tinh sạch: Thu tế bào vi khuẩn bằng cách li tâm ở 4°C , tốc độ 5000-6000 vòng/phút, phá vỡ màng tế bào bằng siêu âm, nhưng đối với mỗi loại vi khuẩn có những sai khác như thành phần dung dịch để hoà tế bào trước khi phá vỡ bằng siêu âm.

+ *PI-17* và *BL21-TI*: sau khi li tâm thu tế bào còn tiến hành rửa nhanh tế bào bằng cách li tâm trong dung dịch đệm TE, giữ ở -20°C trước khi xử lí bằng siêu âm trong dung dịch đệm TE.

+ *BL21 - αAI* : trộn tế bào trong dung dịch đệm STET, thêm lizozim ($1\mu\text{g/ml}$) xử lí ở 30°C trong 30 phút rồi mới xử lí bằng siêu âm.

+ *BL21-RIP*: tế bào trộn trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM pH 7.0 có EDTA 20mM, 0.01% Triton và lizozim $0,3\mu\text{g/ml}$.

Sau khi xử lí bằng siêu âm, li tâm ở 10000-12000 vòng/phút ở 4°C , thu dịch nổi trong, giữ ở dạng lỏng, cô đặc hoặc đông khô. Kiểm tra sản phẩm biểu hiện bằng phương pháp PAGE của dịch chiết tế bào vi khuẩn nuôi có IPTG và không có IPTG (đối chứng). Đã phát hiện được sự sai khác rõ rệt về phổ điện di, trong đó có một băng protein chiếm tỉ lệ lớn hơn hẳn so với mẫu đối chứng, đó là các protein được biểu hiện bởi các gen đích đã đưa vào vi khuẩn tái tổ hợp. Cụ thể:

- + PI-17: băng protein có Mr khoảng 58 kD, là dạng dung hợp của ReMCoTI-II (Mr hơn 3,4 kD) với protein intein-tag với Mr =55kD. Băng này chiếm đến 50% tổng protein.
- + BL21-TI: băng protein có kích thước khoảng 7kD (đúng với kích thước của CMTI-V), chiếm khoảng 15% tổng protein.
- + BL21- α AI: băng protein có kích thước 18kD (bằng kích thước của α AI từ đậu cô ve).
- + BL21-RIP: băng protein với Mr bằng 30kD (bằng Mr của RIP từ mướp đắng).

6. Đã thiết lập 4 qui trình tinh sạch (vượt kế hoạch 1 qui trình) 4 protein tái tổ hợp là ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Re α -AI, Re RIP. Cụ thể như sau:

6.1. Qui trình tinh sạch ReMCoTI-II: sử dụng phương pháp sắc kí ái lực với cột chitin, khi có chất khử DTT, giữ ở 4°C trong 40 giờ protein dung hợp 58kD tự cắt, giải phóng ReMCoTI-II. Rút ReMCoTI-II, đông khô, loại muối, đông khô thu được sản phẩm chỉ cho 1 băng protein với kích thước khoảng 3kD khi điện di trên PAG.

6.2. Qui trình tinh sạch ReCMTI-V: Chế phẩm thô (dịch chiết tế bào) được điều chỉnh đến pH 4.5 để loại protein tạp, li tâm thu dịch trong, loại mẫu bằng DEAE xenluloz, tinh sạch qua cột HiTrap Q, phản hấp phụ bằng dung dịch Tris-HCl 0.015M với các nồng độ NaCl khác nhau. ReCMTI-V được rút xuống ở nồng độ NaCl 0.1M.

6.3. Qui trình tinh sạch Re α -AI: Kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà làm lạnh trong nước đá 4 giờ, li tâm thu kết tủa, hoà tan trong nước, thẩm tích trong nước 36 giờ ở 4°C, tiếp theo thẩm tích trong dung dịch đệm photphat 20mM pH 6.7 trong hơn 12 giờ ở 4°C, sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm trên với gradient nồng độ NaCl. Re α -AI được rút xuống ở nồng độ NaCl 0,6M.

6.4. Qui trình tinh sạch RIP: Sắc kí qua cột CM-Sepharoz trên hệ thống FPLC, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM pH 7.2 với gradient nồng độ NaCl từ 0.0M-0.4M. ReRIP được rút ở nồng độ muối 0.4M. Kiểm tra độ sạch của các protein tái tổ hợp bằng phương pháp PAGE, MALDI-TOF MS.

Tổng lượng 4 protein tái tổ hợp thu được là 4 gam.

7. Thử hoạt tính và ứng dụng của 4 protein tái tổ hợp:

7.1. Hoạt tính của ReMCoTI-II: sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất edestin, kết quả cho thấy MCoTI-II ức chế tripxin và ức chế proteinaz của sâu khoang. Do đó gen này được nghiên cứu tiếp để phục vụ chuyển gen vào thực vật.

7.2. Hoạt tính của ReCMTI-V: ReCMTI-V không chỉ có hoạt tính ức chế tripxin mà còn có tác dụng ức chế đường đông máu nội sinh (kết quả thử nghiệm của Khoa Đông-Cầm máu, Viện Huyết học truyền máu Trung ương).

7.3. Hoạt tính của Re α -AI: có khả năng diệt được một ngô (*Sitophilus zeamays*), một đậu (*Callosobruchus chinensis*).

7.4. Hoạt tính của ReRIP: có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của vi khuẩn (*B. subtilis*, *P. putida*) và nấm mốc (*A. flavus*, *A. parasiticus*).

8. Thiết kế các vectơ phục vụ việc chuyển gen vào cây trồng

8.1. Đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pCAMBIA1300 mang gen MCoTI-II dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer; Ti-plasmit tái tổ hợp pCAMBIA 1301 mang gen mã hoá α -AI ; Đã thiết kế 2 vectơ trung gian thế hệ mới pCAMBIA 1300 và pNOV2819 mang tổ hợp adaptor và đoạn khởi động CaMV35S+đoạn kết thúc NOS, đã ghép thành công gen mã hoá RIP vào vectơ trung gian.

8.2. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp chứa các Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen đích phục vụ cho việc chuyển gen vào cây trồng. Cụ thể:

- 2 chủng EHA105 là pCTI-5 và pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI-II.
- 2 chủng pCHA6 và pCHA7 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen α -AI
- 2 chủng EHA105 và LBA4404 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen RIP.

Tóm lại, đề tài đã hoàn thành tất cả nội dung, yêu cầu khoa học, sản phẩm đã đăng ký. Vượt kế hoạch 1 PPI tái tổ hợp.

MỤC LỤC

	Trang
Danh sách những người thực hiện.....	1
Bài tóm tắt	3
Mục lục	7
Các chữ viết tắt	15
Lời mở đầu	16
Thông tin chung về đề tài	17
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC	22
1.1 Ngoài nước	22
1.2 Trong nước	28
Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1 Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị	30
2.1.1 Nguyên liệu, hoá chất	30
2.1.2 Thiết bị	31
2.2 Phương pháp nghiên cứu	32
Chương 3. KẾT QUẢ	33
3.1 Phân lập gen, thiết kế các vectơ tái tổ hợp mã hoá cho các gen MCoTI-II, CMTI-V, α -AI, RIP	33
3.1.1 Tách ADN tổng số	33
3.1.1.1 Tách ADN tổng số của gác và bí đỏ	33
3.1.1.2 Tách ADN tổng số từ đậu cô ve (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	37
3.1.1.3 Tách ADN tổng số từ mướp đắng	39
3.1.2 Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V), MCoTI-II (TI-II), α -AI và RIP từ ADN tổng số của các thực vật tương ứng bằng kỹ thuật PCR ...	40
3.1.2.1 Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V) từ ADN tổng số của bí đỏ ..	40
3.1.2.2 Phân lập gen mã hoá MCoTI-II (gen TI-II) từ ADN tổng số của gác ...	48
3.1.2.3 Phân lập gen mã hoá α -AI từ ADN tổng số của đậu cô ve	52
3.1.2.4 Phân lập gen mã hoá RIP từ ADN tổng số của mướp đắng	53
3.1.3 Thiết kế các vectơ tái tổ hợp	54
3.1.3.1 Thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen CMTI-V	54
3.1.3.2 Thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen MCoTI-II	62
3.1.3.3 Thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen α -AI	66
3.1.3.4 Thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen RIP	68

3.1.4	<i>Giải trình tự các gen CMTI-V, gen MCoTI-II, gen α-AI, gen RIP</i>	69
3.1.4.1	<i>Trình tự gen CMTI-V</i>	69
3.1.4.2	<i>Trình tự gen MCoTI-II</i>	69
3.1.4.3	<i>Trình tự gen α-AI</i>	70
3.1.4.4	<i>Trình tự gen RIP</i>	70
3.2	Biến nạp các vector tái tổ hợp vào vi khuẩn biểu hiện <i>E. coli</i> BL21, biểu hiện các protein tái tổ hợp tương ứng	71
3.2.1	<i>Biến nạp các vector tái tổ hợp pET14b-(TI-V), pTYB12-(TI-II), pET21d(+)-αAI, pET21d(+)-RIP vào vi khuẩn <i>E.coli</i> BL21</i>	71
3.2.1.1	<i>Biến nạp vector pET14b-(TI-V) vào chủng vi khuẩn biểu hiện <i>E. coli</i> BL21</i>	72
3.2.1.2	<i>Biến nạp vector tái tổ hợp pTYB12-(TI-II) vào vi khuẩn biểu hiện <i>E. coli</i> BL21</i>	73
3.2.1.3	<i>Biến nạp vector pET21d(+)-α-AI vào chủng vi khuẩn biểu hiện <i>E. coli</i> BL21</i>	73
3.2.1.4	<i>Biến nạp vector pET21d (+)- RIP vào chủng vi khuẩn biểu hiện <i>E. coli</i> BL21</i>	74
3.2.2.	<i>Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> tái tổ hợp</i> .	75
3.2.2.1	<i>Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>E.coli</i> tái tổ hợp mang gen CMTI-V</i>	75
3.2.2.2	<i>Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>E.coli</i> tái tổ hợp mang gen MCoTI-II</i>	77
3.2.2.3	<i>Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>E. coli</i> tái tổ hợp mang gen α-AI</i>	79
3.2.2.4	<i>Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>E. coli</i> tái tổ hợp mang gen RIP</i>	81
3.3	Thu nhận, tinh sạch và kiểm tra hoạt tính các protein tái tổ hợp	84
3.3.1	<i>Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp</i>	84
3.3.1.1	<i>Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen CMTI-V</i>	84
3.3.1.2	<i>Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen MCoTI-II</i>	89
3.3.1.3	<i>Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen α-AI</i>	93
3.3.1.4	<i>Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen RIP</i>	97
3.3.2	<i>Kiểm tra hoạt tính của các chế phẩm protein tái tổ hợp</i>	103
3.3.2.1	<i>Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp ReCMTI-V</i>	103
3.3.2.2	<i>Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp ReMCoTI-II</i>	106
3.3.2.3	<i>Kiểm tra hoạt tính của chế phẩm α-AI tái tổ hợp</i>	107
3.3.2.4	<i>Kiểm tra hoạt tính của chế phẩm ReMcRIP tái tổ hợp</i>	108

3.4	Thiết kế các vectơ mang gen tái tổ hợp phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng	109
3.4.1	<i>Thiết kế vectơ (Ti-plasmid) tái tổ hợp mang gen mã hoá chất kìm hãm tripxin (TI-II) làm vật liệu phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng</i>	109
3.4.1.1	Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen TI dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer	109
3.4.1.2	Thiết kế cặp môi đặc hiệu và nhân gen TI	110
3.4.1.3	Thiết kế Ti-plasmid trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 và mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer	111
3.4.1.4	Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen TI dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer	112
3.4.1.5	Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzym giới hạn	113
3.4.1.6	Kiểm tra chiều gắn của gen TI trong Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI .	113
3.4.1.7	Tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6 .	115
3.4.1.8	Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong tế bào <i>A. tumefaciens</i> bằng kỹ thuật PCR	117
3.4.2	<i>Thiết kế vectơ (Ti-plasmid) tái tổ hợp mang gen mã hoá chất kìm hãm α-amilaz (α-AI) làm vật liệu phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng</i>	118
3.4.2.1	Tách chiết, kiểm tra hai hệ vectơ: vectơ tách dòng mang gen mã hoá chất kìm hãm α -AI và vectơ Ti-plasmid pCAMBIA1301	118
3.4.2.2	Thiết kế vectơ Ti-plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1301 mang gen mã hoá α -AI	119
3.4.2.3	Kiểm tra sự có mặt của gen α -AI trong plasmid pCAMBIA1301 tái tổ hợp nhờ kỹ thuật PCR	121
3.4.2.4	Kiểm tra sự có mặt của gen α -AI trong thể plasmid tái tổ hợp nhờ phương pháp xác định trình tự nucleotit	121
3.4.3	<i>Thiết kế vectơ (Ti-plasmid) tái tổ hợp mang gen mã hoá RIP làm vật liệu phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng</i>	123
3.4.3.1	Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vectơ pNOA+RIP mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + RIP + NOS	123
3.4.3.2	Thiết kế vectơ trung gian pNOA+35S+NOS mang kết cấu 35S 2X enhancer+NOS	127
3.4.3.3	Tạo đoạn gen mã hoá RIP thích hợp để ghép nối vào vectơ trung gian	128
3.4.3.4	Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer	129
3.4.3.5	Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzym giới hạn	129
3.4.3.6	Kiểm tra chiều gắn của gen RIP trong Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP	130

3.4.3.7	Tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9 ...	132
3.4.3.8	Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào <i>A. tumefaciens</i> bằng kỹ thuật PCR	133
Chương 4. KẾT LUẬN		135
Tài liệu tham khảo		137
Bảng tự đánh giá về tình hình thực hiện và những đóng góp mới của đề tài khoa học và công nghệ cấp nhà nước		149
Các công trình đã công bố.....		152
Phụ lục (xem quyển phụ lục)		

MỤC LỤC CÁC BẢNG

	Trang
<i>Bảng 1.</i> Khảo sát nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thích hợp thu protein α -AI tái tổ hợp.....	94
<i>Bảng 2.</i> Tóm tắt kết quả tinh sạch rCMTI-V	99
<i>Bảng 3.</i> Tóm tắt kết quả tinh sạch Re α AI	102
<i>Bảng 4.</i> Kết quả tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI.....	103
<i>Bảng 5.</i> Thử tác dụng của chế phẩm ReCMTI-V đến quá trình đông máu	105
<i>Bảng 6.</i> Kết quả đánh giá tác dụng của ReCMTI-V đến con đường đông máu nội sinh (chỉ số ATTP)	105
<i>Bảng 7.</i> Kết quả kiểm tra hoạt tính của α -AI sau kết tủa muối và tinh sạch qua cột DEAE	107
<i>Bảng 8.</i> Bảng kết quả xác định hoạt tính của α -AI	107
<i>Bảng 9.</i> Kết quả thí nghiệm xung điện chuyển pCTi-5 và pCTi-6 vào <i>A. tumefaciens</i> chủng EHA105	116

MỤC LỤC CÁC HÌNH

	Trang
<i>Hình 1.</i> Phổ điện di ADN tổng số của bí đỏ và gấc	37
<i>Hình 2.</i> Phổ điện di ADN tổng số từ mầm đậu cô ve	39
<i>Hình 3.</i> Điện di đồ ADN genom từ cây mướp đắng	40
<i>Hình 4.</i> Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng ADN tổng số của bí đỏ làm khuôn	44
<i>Hình 5.</i> Kết quả tổng hợp hoá học gen CMTI-V	45
<i>Hình 6a.</i> Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR của gen CMTI-V	45
<i>Hình 6b.</i> Sản phẩm PCR của gen CMTI-V được phân tích trên máy Scan Sharp JX 330 ..	48
<i>Hình 7.</i> Phổ điện di sản phẩm PCR gen MCoTI-II trên gel poliacrilit 5%	52
<i>Hình 8.</i> Phổ điện di sản phẩm PCR của đậu cô ve trắng	53
<i>Hình 9.</i> Phổ điện di sản phẩm PCR từ ADN genom cây mướp đắng.....	54
<i>Hình 10.</i> Phổ điện di sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp trên gel agaroz	61
<i>Hình 11.</i> Phổ điện di sản phẩm PCR ADN của pE14b-TI tách từ các khuẩn lạc dương tính trên PAGE 5%	62
<i>Hình 12.</i> Phổ điện di sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp trên gel agaroz	63
<i>Hình 13.</i> Điện di đồ các sản phẩm PCR của gen MCoTI-II trên gel agaroz	65
<i>Hình 14.</i> Sơ đồ thiết kế vectơ pET21d mang gen α -AI tái tổ hợp	66
<i>Hình 15.</i> Thiết kế vectơ pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng	69

Hình 16. Trình tự ADN vectơ tái tổ hợp có chứa gen CMTI-V	69
Hình 17. Trình tự ADN vectơ tái tổ hợp pTYB12 có chứa gen MCoTI-II	70
Hình 18. Trình tự của đoạn gen α - AI của đậu <i>Phaseolus vulgaris</i>	70
Hình 19. Trình tự của đoạn gen McRIP của mướp đắng	70
Hình 20. Phổ điện di sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% (sử dụng ADN vectơ tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc BL21-TI khác nhau làm khuôn)	72
Hình 21. Phổ điện di sản phẩm PCR trên PAGE 5% (sử dụng ADN vectơ tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc BL21-TI khác nhau làm khuôn)	72
Hình 22. Kiểm tra khả năng biến nạp gen MCoTI-II vào E. coli BL21	73
Hình 23. Kết quả kiểm tra sau khi biến nạp	74
Hình 24. Phổ điện di kiểm tra gen mã hoá RIP vào tế bào E.coli chủng BL21	75
Hình 25. Phổ điện di protein tái tổ hợp CMTI-V trên PAGE-SDS 18% biểu hiện các thời gian khác nhau	76
Hình 26. Phổ điện di protein tái tổ hợp TI-II trên PAGE 12,5% biểu hiện các thời gian khác nhau	79
Hình 27. RIP tái tổ hợp (ReMcRIP) từ mướp đắng được biểu hiện trong tế bào E. coli ...	82
Hình 28. SDS-PAGE 18% các protein của dịch chiết tế bào BL21-TI	86
Hình 29. Phổ điện di ReCMTI-V tinh sạch qua cột HiTrap Q trên PAGE-SDS 18%	88
Hình 30. Biến đổi phổ điện di gel kitin trước và sau khi rút ReMCoTI-II	89
Hình 31. Phổ điện di ReMCoTI-II tinh sạch có kích thước khoảng 3,4kD.....	89
Hình 32. Sắc ký đồ qua cột trao đổi ion DEAE xelluloz 16/10	95
Hình 33. Phổ điện di protein α - AI tái tổ hợp sau khi sắc ký trên SDS- PAGE 12,5%	96
Hình 34. Điện di đồ ReMcRIP tinh sạch	97
Hình 35. Phổ MALDI-TOF MS của rMcRIP sau khi xử lý bằng tripxin	98
Hình 36. Phổ MALDI-TOF MS/MS của mảnh peptit có giá trị m/z 1338,7126 amu	99
Hình 37. Phổ điện di TI trên PAGE 15% có cơ chất.	104
Hình 38. Ảnh hưởng của ReMCoTI-II ở các nồng độ khác nhau đến hoạt tính ức chế proteinaz sâu khoang và tripxin	106
Hình 39. Hoạt tính kháng khuẩn của ReMcRIP	108
Hình 40. Sơ đồ thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI	109
Hình 41. Sản phẩm PCR nhân gen TI sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 với các nồng độ khác nhau	110
Hình 42. Thiết kế vectơ trung gian pC1300+35S+NOS	111
Hình 43. Chọn dòng Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI	112
Hình 44. Kiểm tra Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI bằng enzym giới hạn <i>BamH</i> I	113

Hình 45. Sơ đồ các vị trí cắt của pC1300+TI bởi <i>Hind</i> III và <i>Eco</i> R I	114
Hình 46. Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen TI trong pC1300+TI	115
Hình 47. Kết quả tách chiết ADN plasmid tái tổ hợp từ tế bào <i>A. tumefaciens</i>	117
Hình 48. Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong các dòng tế bào <i>A. tumefaciens</i> chủng EHA 105:pCTI-5, EHA105:pCTI-6 tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR	117
Hình 49. Kết quả kiểm tra hai hệ vectơ pCAMBIA1301 và pKS ⁽⁺⁾ α -AI bằng các enzym giới hạn	119
Hình 50. Điện di kiểm tra các plasmid tái tổ hợp	120
Hình 51. Kết quả PCR kiểm tra thể tái tổ hợp	121
Hình 52. Trình tự gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaz đã được đưa vào vectơ CAMBIA1301 tạo vectơ Ti-plasmid tái tổ hợp	123
Hình 53. Sơ đồ vectơ pCAMBIA1300	124
Hình 54. Sơ đồ vectơ thế hệ mới pNOA2819	124
Hình 55. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP	126
Hình 56. Kiểm tra vectơ trung gian pNOA+35S+NOS	128
Hình 57. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào <i>E. coli</i> bằng enzym giới hạn	130
Hình 58. Sơ đồ các vị trí cắt của pNOA+RIP bởi <i>Nco</i> I	131
Hình 59. Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen RIP trong pNOA+RIP	132
Hình 60. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các dòng tế bào <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR	133

MỤC LỤC CÁC SƠ ĐỒ

	Trang
Sơ đồ 1. Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Qiagen Kit	33
Sơ đồ 2. Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Eija Pehu và cộng sự	35
Sơ đồ 3. Các bước tiến hành tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của đậu cô ve	38
Sơ đồ 4. Phân lập gen mã hoá CMTI-V từ ADN tổng số của bí đỏ	43
Sơ đồ 5. Phân lập gen MCoTI-II từ ADN tổng số của gấc	51
Sơ đồ 6. Lai và biến nạp gen CMTI-V vào vector và vi khuẩn <i>E.coli</i>	55
Sơ đồ 7. Tách ADN từ pET14b-TI	59
Sơ đồ 8. Biến nạp gen MCoTI-II vào vector và vi khuẩn <i>E. coli</i>	63
Sơ đồ 9. Nuôi cấy vi khuẩn mang plasmit tái tổ hợp, tách chiết ADN plasmit Bluescrip d(+) mang gen tái tổ hợp (α -AI)	67
Sơ đồ 10. Quy trình nuôi BL21-TI biểu hiện gen CMTI-V	76
Sơ đồ 11. Quy trình nuôi cấy PI-17 biểu hiện gen MCoTI-II	78
Sơ đồ 12. Quy trình nuôi cấy BL21 biểu hiện gen α -AI	81
Sơ đồ 13. Quy trình nuôi cấy BL-21 biểu hiện gen RIP	83
Sơ đồ 14. Quy trình thu nhận chế phẩm ReCMTI-V thô	85
Sơ đồ 15. Quy trình thu nhận chế phẩm tinh sạch ReCMTI-V	86
Sơ đồ 16. Phương pháp thu nhận sản phẩm protein tái tổ hợp ReMCoTI-II	92
Sơ đồ 17. Quy trình tách chiết protein α - AI tái tổ hợp từ sinh khối vi khuẩn (chế phẩm thô)	93
Sơ đồ 18. Sơ chế protein α - AI tái tổ hợp bằng phương pháp kết tủa muối	94
Sơ đồ 19. Tinh sạch protein α - AI bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE xelluloz	95
Sơ đồ 20. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMcRIP	101

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

1. ADN: Acid deoxyribonucleic (axit deoxyribonucleic)
2. Amp: Ampicilin (ampixilin)
3. bp: Base pair (cặp bazơ nitơ)
4. DMSO: Dimethyl sulfoxide (dimetil xunphoxit)
5. dNTPs: Deoxynucleoside triphosphate (deoxinucleozit triphotphat)
6. DTT: 1,4-Dithiothreitol
7. EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid (etilendiamin tetraaxetic axit)
8. *E.coli*: *Escherichia Coli*
9. EtBr: Ethidium Bromide (etidium bromit)
10. GITC: Guanidin thiocyanate (guanidin tioxianat)
11. IAA: Isoamyl alcohol (ancol izoamilic)
12. IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (izopropil - β -Dtiogatactopiranozit)
13. IU Đơn vị kìm hãm
14. Kac: Kali acetate (kali axetat)
15. Km: Kanamycin (kanamixin)
16. kD: Kilo Dalton (kilo dalton)
17. LB: Luria Bertani Media (môi trường Luria Bertani)
18. OD: Optical density (mật độ quang học)
19. PAG Polyacrylamide gel
20. PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis (điện di trên gel poliacrilamit)
21. PCR: Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi enzym trùng hợp)
22. PPI: Proteinase protein inhibitor (protein ức chế proteinaz)
23. RePPI Proteinase protein inhibitor tái tổ hợp
24. Rif: Rifamycin (rifamixin)
25. ARN: Ribonucleic acid (axit ribonucleic)
26. RNase: Ribonuclease (ribonucleaz)
27. SDS: Sodium dodecyl sulfate (sodium dodexil xunfat)
28. TAE: Tris/acetate/EDTA (buffer) (đệm Tris/ axetat / EDTA)
29. *Taq*: *Thermus aquaticus*
30. TE: Tris/EDTA (buffer) (đệm Tris /EDTA)
31. TEMED: N, N, N', N' – tetramethylethylenediamine
32. TI: Trypsin inhibitor (Chất ức chế tripxin)
33. X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
(5- bromo – 4 – cloro – 3 indolil - β -D-galactopiranozit)

LỜI MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu của nước ngoài cũng như các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy các protein ức chế proteinaz (PPI), protein ức chế α -amilaz (α -AI) cũng như protein bất hoạt riboxom (RIP) tách từ thực vật có tiềm năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

Mặc dù đã tìm được các nguồn thực vật giàu các chất này và cũng đã sử dụng chúng làm nguyên liệu để sản xuất các chất đã nêu nhưng trong thực tế cũng có những khó khăn: chu kỳ sống của thực vật dài, việc khai thác phụ thuộc vào mùa vụ, hàm lượng không ổn định v.v... Vì vậy bên cạnh việc khai thác nguồn nguyên liệu tự nhiên cần tiến hành nghiên cứu sản xuất protein bằng con đường tái tổ hợp nhằm khắc phục được các điểm yếu đã nêu.

Để tài này nhằm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

Để đạt được mục tiêu này chúng tôi đã tiến hành tổng hợp hoặc phân lập các gen mã hoá cho các protein đích: MCoTI-II của hạt gấc, CMTI-V của hạt bí đỏ, α -AI của đậu cô ve, RIP của mướp đắng; thiết kế các vectơ mang các gen này và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* để tạo các vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp các protein đích; nghiên cứu các điều kiện thích hợp để nuôi cấy các vi khuẩn tái tổ hợp; xây dựng qui trình tách và tinh sạch các protein tái tổ hợp để tiến hành ứng dụng thử.

Mặt khác, đối với các protein có khả năng diệt côn trùng, tiến hành thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng.

THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

1. Tên đề tài: *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, protein bất hoạt riboxom có giá trị sử dụng trong y dược và nông nghiệp.*
2. Mã số: **KC-04-14**
3. Thời gian thực hiện : 36 tháng (Từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004)
4. Cấp quản lý: Nhà nước.
5. Kinh phí: Tổng số = 2.200.000.000 VND
Trong đó, từ Ngân sách SNKH: 2.100.000.000
6. Thuộc Chương trình: “Nghiên cứu khoa học và phát triển Công nghệ Sinh học”
7. Chủ nhiệm đề tài:

Họ và tên: **Phạm Thị Trân Châu**

Học hàm/học vị: Giáo sư, Tiến sĩ Khoa học

Điện thoại: 7.680.638 (CQ) / 8.543.905 (NR)

E-mail: chauppt@vnu.edu.vn ; pttranchau@yahoo.com

Địa chỉ cơ quan: Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội

144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu giấy, Hà nội

Địa chỉ nhà riêng: Số 17, ngõ Bạch Liên (ngõ 126), đường Khuất Duy Tiến, Nhân chính, Thanh Xuân, Hà nội.

8. Cơ quan chủ trì đề tài:

Tên tổ chức KH&CN: Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội

Điện thoại: 7.680.907 Fax: 7.680.907

E-mail: biotechttk@hn.vnn.vn

Địa chỉ: Nhà E2-144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu Giấy, Hà nội

9. Mục tiêu của đề tài:

Thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số protein tái tổ hợp có khả năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

10. Nội dung nghiên cứu

* Phân lập và đọc trình tự nucleotit của các gen TI, α AI, RIP:

- Thu thập mẫu cây có chứa gen mã hoá TI, RIP (các cây họ bầu bí như: *Cucurbita maxima*, *Momordica cochinchinensis*...) và α -AI (một số loại đậu cô ve: *Phaseolus vulgaris*).
- Tách chiết và tinh sạch ADN từ các mẫu thực vật trên.
- Thiết kế trình tự các cặp mồi thích hợp của các gen TI, α -AI, RIP.
- Phân lập các gen TI, α -AI, RIP mong muốn.

- Kiểm tra các gen phân lập được bằng cách dùng enzym giới hạn để cắt và đọc trình tự nucleotit của gen.
- * Thiết kế các vectơ biểu hiện gen TI, α -AI, RIP trong *E. coli* hoặc nấm men:**
 - Chọn các vectơ thích hợp.
 - Biến nạp gen vào *E. coli* hoặc nấm men
 - Xác định sự biểu hiện gen tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* hoặc nấm men.
- * Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn mang gen protein tái tổ hợp:**
 - Lựa chọn điều kiện nuôi cấy (môi trường, nhiệt độ, pH....).
 - Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy thu sản phẩm.
- * Thăm dò điều kiện tách và tinh sạch protein tái tổ hợp:**
 - Thăm dò điều kiện tách protein tái tổ hợp từ *E.coli* hoặc nấm men đã được biểu hiện gen.
 - Tinh sạch protein tái tổ hợp qua các bước sắc ký: lọc gel, trao đổi ion, ái lực,...
Chọn điều kiện và xây dựng quy trình tinh sạch thích hợp ít nhất 3 protein tái tổ hợp TI, α -AI, RIP
 - Đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp điện di phát hiện trực tiếp các băng TI, α -AI, RIP trên gel poliacrilamit, điện di protein.
 - Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp thu được.
- * Thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm:**
 - Thử tác dụng của các chế phẩm protein tái tổ hợp (TI, α -AI, RIP) trừ các loại sâu rau (sâu xanh, sâu tơ, sâu khoang...) và các loại côn trùng có hại khác. Đánh giá hiệu quả trừ sâu của chế phẩm này.
 - Thử tác dụng kháng khuẩn của TI và RIP.
 - Thử tác dụng của TI ức chế một số yếu tố đông máu có vai trò trong điều trị bệnh thrombosis.
 - Thăm dò các ứng dụng khác trong y học.
- * Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng**
 - Có các chủng *Agrobacterium* thích hợp để chuyển gen vào cây trồng.

11. Dạng kết quả dự kiến của đề tài

I	II	III
Mẫu (<i>model, maket</i>)	<i>Quy trình công nghệ</i> X	<i>Sơ đồ</i> X
<i>Sản phẩm</i> X	<i>Phương pháp</i> X	<i>Bảng số liệu</i> X
<i>Vật liệu</i> X	Tiêu chuẩn	Báo cáo phân tích
Thiết bị, máy móc	Quy phạm	<i>Tài liệu dự báo</i> X
<i>Dây chuyền công nghệ</i> X		Đề án, qui hoạch triển khai
Giống cây trồng		Luận chứng kinh tế-kỹ thuật, nghiên cứu khả thi
Giống gia súc		Chương trình máy tính
		<i>Khác (các bài báo, đào tạo NCS, SV,...)</i> X

12. Bảng thống kê kết quả đối chiếu với nội dung đã đăng ký

12.1. Yêu cầu khoa học đối với sản phẩm tạo ra (dạng kết quả I và II)

Số TT	Đã đăng ký			Kết quả đã đạt được
	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Đơn vị đo	Mức số lượng và chất lượng cần đạt của cả đề tài	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
12.1.1	VẬT LIỆU			
	- Gen tái tổ hợp	Gen	3 gen tái tổ hợp có hoạt lực ổn định	4 gen tái tổ hợp có hoạt lực ổn định: <i>gen mã hoá MCoTI-II</i> , <i>gen mã hoá CMTI-V</i> , <i>gen mã hoá α-AI</i> , <i>gen mã hoá RIP</i> .
	- Sinh khối VSV tái tổ hợp	Kg	3-4 kg	3 kg (đã sử dụng cho các bước tạo chế phẩm)
	- Chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật	Kg	0,5-1kg	0,5 kg: ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Re α -AI, ReRIP.
	- Chế phẩm protein tinh sạch	Gam	1-5 gam, có độ đồng nhất điện di	4g protein tái tổ hợp ReMCoTI-II : 0,2g ReCMTI-V: 0,8g Re α -AI: 1g ReRIP: 2g
	- Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng	Chủng	Có các chủng <i>Agrobacterium</i> thích hợp để chuyển gen vào cây trồng	- Đã thiết kế được các vectơ trung gian để chuyển gen vào cây trồng - Đã tạo được các chủng <i>Agrobacterium</i> mang <i>gen MCoTI-II</i> , <i>gen α-AI</i> , <i>gen RIP</i> để phục vụ chuyển gen vào cây trồng.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
12.1.2.	QUY TRÌNH			
	- Quy trình thích hợp nuôi cấy <i>E.coli</i> tái tổ hợp	Số qui trình	3 qui trình biểu hiện protein tái tổ hợp chiếm 30% protein tổng số	4 qui trình: - PI-17 biểu hiện ReMCoTI-II: amp: 100µg/ml ; IPTG: 0,5mM ; 16 giờ ở 15°C. - BL21-TI biểu hiện ReCMTI-V: amp: 200µg/ml ; IPTG: 1mM ; 6 giờ ở 37°C. - BL21-αAI biểu hiện Reα-AI amp: 100µg/ml ; IPTG: 1mM ; 4 giờ ở 37°C. - BL21-RIP biểu hiện ReRIP: amp: 50µg/ml, IPTG: 0,7mM, 4 giờ ở 37°C * Vượt mức đăng ký 1 qui trình
	- Quy trình sản xuất protein tái tổ hợp	Số qui trình	3 qui trình sản xuất ở qui mô PTN	4 qui trình sản xuất ở qui mô PTN * Vượt mức đăng ký 1 qui trình
	- Quy trình sử dụng chế phẩm	Số qui trình	3 qui trình sử dụng ổn định	3 qui trình sử dụng ổn định: - Tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu - Tác dụng của Reα-AI đến côn trùng, ấu trùng (mọt đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vảy) trên ngô, đậu. - Tác dụng của ReRIP trên các đối tượng mọt gạo, vi khuẩn (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>P. putida</i>) và nấm mốc (<i>A. flavus</i> , <i>A.parasiticus</i>)
12.1.3.	- Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp	Số phương pháp	3 phương pháp thích hợp để thu nhận protein tinh sạch có độ đồng nhất điện di	4 phương pháp để thu nhận 4 chế phẩm kỹ thuật và chế phẩm tinh sạch: ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Reα-AI, ReRIP. * Vượt mức đăng ký 1 qui trình

12.2. Yêu cầu khoa học đối với sản phẩm tạo ra (dạng kết quả III)

Số TT	Đã đăng ký			Kết quả đã đạt được
	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Đơn vị đo	Mức số lượng và chất lượng cần đạt	
12.2.1	Các bài báo	Bài	5 công trình công bố trên các Tạp chí KH trong nước và quốc tế (QT)	- 7 bài báo công bố trên tạp chí Khoa học trong nước - 4 báo cáo ở HNQT (vượt đăng ký)
12.2.2	Đào tạo		10 cử nhân, 3 thạc sỹ	- 6 Cử nhân - 3 Thạc sỹ (1 chưa bảo vệ)
12.2.3	Sơ đồ			20 sơ đồ qui trình tạo sản phẩm protein tái tổ hợp, tách chiết ADN, tách chiết protein, thử hoạt tính.
12.2.4	Bảng số liệu			9 bảng số liệu, 60 hình minh hoạ về nghiên cứu, sản xuất các protein tái tổ hợp PPI, α -AI, RIP.

13. Tình hình sử dụng kinh phí

TT	Nội dung chi	Tổng vốn đầu tư (triệu đồng)
1- 114	Thuê khoán chuyên môn	680,0
2- 119	Nguyên vật liệu, hoá chất, dụng cụ, tài liệu	907,5
3- 109	Điện nước, xăng dầu	120,5
4- 145	Thiết bị	100,0
5- 117	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	35,0
6- 113	Công tác phí	21,6
7- 134	Quản lý cơ sở	30,0
8- 112	Nghiệm thu, hội nghị, hội thảo	27,0
9- 110	Văn phòng phẩm	13,0
10- 111	Phim ảnh, thông tin liên lạc	15,4
11- 116	Đoàn vào	30,0
12- 115	Đoàn ra	120,0
		Tổng 2.100

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.1. Ngoài nước

Phần lớn các protein có hoạt tính sinh học dùng trong y dược, công nghiệp, nông nghiệp v.v... được tách từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu các chất này. Một số khó khăn thường gặp là khó chủ động về nguyên liệu do chu kỳ sống dài, phụ thuộc vào mùa vụ (thực vật), một số trường hợp giá thành khá cao. Ví dụ một số protein ức chế proteinaz (PPI) thường dùng trong y dược như α_1 -antitripxin (điều trị bệnh tràn khí) tách từ huyết tương người, 1 mg giá 20,9 - 34 USD ; antitrombin III từ huyết tương bò 1mg (200-400 đơn vị) giá 1174 USD, aprotinin từ phổi bò 1mg giá 35,6 USD.

Các protein kìm hãm proteinaz (PPI): là những protein làm giảm thuận nghịch hoạt độ của các proteaz. Proteaz tham gia vào nhiều quá trình sống quan trọng như hoạt hoá proenzim, prohoocmon, đông máu, thụ tinh, viêm, nhiễm, biến thái, quá trình tấn công của nấm mốc, vi khuẩn, virus (kể cả HIV) vào vật chủ v.v... Vì vậy PPI không chỉ điều hoà quá trình phân giải protein nội sinh mà còn có thể góp phần bảo vệ cơ thể, giới hạn tác dụng của các yếu tố gây bệnh, kìm hãm quá trình sinh trưởng phát triển của côn trùng v.v... [2, 3, 4, 6, 53, 54, 116].

Trong cơ thể người và động vật ở trạng thái bình thường, tồn tại cân bằng giữa các proteinaz và các protein kìm hãm đặc hiệu của chúng. Vì một lý do nào đó cân bằng này bị phá vỡ, hoạt độ enzym tăng quá mức bình thường có thể dẫn đến các bệnh khác nhau. Ví dụ bệnh viêm tụy cấp do cường tripxin ; tràn khí phổi (ephysema) do hoạt độ elastaz tăng quá mức bình thường (do khói thuốc lá đã làm bất hoạt protein kìm hãm đặc hiệu của nó là α - antitripxin). Vì vậy việc nghiên cứu sản xuất PPI có nhiều ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

TI họ bí được các nhà khoa học Ba Lan [96] và Mỹ [34] phát hiện đầu tiên từ hạt bí đỏ vào năm 1980 nhưng do chúng có nhiều đặc tính quý nên đã được quan tâm nghiên cứu nhiều [55, 80, 81, 84, 85, 86, 87]. TI chủ yếu của hạt các cây họ bầu bí thuộc loại PPI có khối lượng phân tử thấp (3kD) có 3 cấu trúc rất bền với nhiệt và các yếu tố hoá, lý khác nhau, là mô hình tốt để nghiên cứu liên quan giữa cấu trúc và chức năng của phân tử protein hoặc có thể dựa vào đó để tạo các phân tử mới có hoạt tính sinh học mới [45]. Ngoài việc nghiên cứu TI của hạt, chỉ có rất ít công trình nghiên cứu TI ở các bộ phận khác của cây hoặc nghiên cứu có hệ thống TI trong quá trình sinh trưởng phát triển của cây [87].

Các TI cũng như các PPI khác khá phổ biến ở thực vật nhưng đến nay vẫn chưa biết rõ vai trò đích thực của chúng ở thực vật; quá trình sinh tổng hợp, tích lũy chúng ở thực vật cũng chưa sáng tỏ. Có giả thiết cho rằng PPI ức chế proteinaz xerin có vai trò ức chế proteinaz hệ tiêu hoá (chủ yếu là proteinaz xerin) của động vật phá hại cây.

Đến nay đã xác định được cấu trúc bậc I của hơn 50 TI loại này từ hạt các cây bầu bí khác nhau và được xếp thành một họ mới, họ TI bầu bí, đó là họ thứ 10 của các chất ức chế proteinaz – xerin [97, 128].

Gần đây, người ta đã phát hiện được từ hạt bí đỏ một TI khác được đặt tên là CMTI-V, có khối lượng phân tử 7,1 kD và chỉ có 1 cầu disulfua [44]. CMTI-V có tác dụng ức chế đặc hiệu yếu tố XIIa (một proteinaz – xerin xúc tác cho phản ứng đầu tiên của quá trình đông máu), tuy nhiên hàm lượng của nó trong hạt tương đối thấp.

Một vài TI họ bí cũng đã được tổng hợp bằng phương pháp hoá học [45, 50, 51, 107], hoặc cải biến phân tử tạo ra phân tử có hoạt tính sinh học mới có hiệu quả ứng dụng cao hơn.

Một số tác giả đã nghiên cứu để tạo các PPI bằng công nghệ ADN tái tổ hợp [7, 8, 9, 12, 101, 123, 127, 135]. Sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp có thể tạo được các vi sinh vật tái tổ hợp (hoặc các hệ thống sống khác tái tổ hợp) có khả năng sản xuất các protein, các PPI mong muốn với số lượng lớn, cho phép chủ động được nguồn nguyên liệu trong sản xuất và có thể cải biến phân tử dễ dàng hơn [10].

Hướng nghiên cứu này đang được phát triển với hi vọng sản xuất các PPI dùng trong y tế [117], và để tạo các cây có tính chống chịu cao với sâu bệnh [102] hoặc các loại ký sinh phá hoại cây trồng [3].

Các chất kìm hãm α -amilaz (α -AI)

Các α -AI đã được nghiên cứu trong nhiều phòng thí nghiệm từ năm 1945 [42]. Khối lượng phân tử α -AI từ 14-18 kD [29]. α -AI có nhiều trong không bào của cây đậu *P. vulgaris* [98]. Từng phân tử protein được tổng hợp trong thể lưới nội chất từ tiền protein với khối lượng phân tử 25-28 kD, sau khi loại bỏ đoạn peptit tín hiệu và gắn thêm phân đường tại hai điểm hay nhiều hơn, glicoprotein được tạo ra với khối lượng phân tử 32-36 kD. Glicoprotein được vận chuyển đến các không bào dự trữ protein. Thể golgi là cơ quan trung gian vận chuyển, tại đây một vài N liên kết glican được biến đổi. α -AI được tổng hợp như một tiền protein, nó được xử lý theo hai bước bao gồm việc loại bỏ

một đầu cacboxi ngắn và tách chuỗi phân giải protein tại điểm cacboxi Asn⁷⁷, kết quả là hình thành các tiểu cấu trúc α và β . Sự biến đổi tại Asn⁷⁷ làm α -AI trở thành protein hoạt động [25].

Đến nay người ta đã biết hai dạng α -AI: α AI-1 và α AI-2. α AI-1 được tìm thấy trong các giống đậu (*P. vulgaris* L), được nghiên cứu từ năm 1945, có tác dụng kìm hãm amilaz tuy tạng lợn (PPA) và các amilaz của một số loại một hạt, như một đậu-lăng và một đậu azuki. α AI-2 mới được tinh sạch từ hạt của một vài giống đậu thông thường hoang dại, các hạt đậu này chứa protein dự trữ là arcelin thay vì phaseolin. α AI-2 kìm hãm α -amilaz của *Z. subfasciatus* (ZSA) nhưng không kìm hãm PPA. Chuỗi axit amin của α AI-1 và α AI-2 có độ tương đồng 78% [42].

Quá trình hoạt hoá tiền chất α -AI làm biến đổi cấu hình không gian phân tử cho phép chất kìm hãm bám vào α -amilaz tạo thành phức liên kết rất chặt chẽ với hai phân tử α -amilaz tuy tạng lợn (PPA). Sự hình thành phụ thuộc vào pH, pH tối ưu khoảng 5,0, chính là pH trong ruột động vật có vú và côn trùng. Việc phân tích cấu trúc 3 chiều của phức α -AI-1-PPA chứng minh sự tồn tại của các tương tác kéo dài giữa các axit amin trong hai loop của α -AI-1 và gốc axit amin trong cấu hình tương ứng của cơ chất enzym. Một vài axit amin có liên kết đa hiđrô với α -AI-1 cũng có ở ZSA. Trên thực tế, nhiều trong số chúng là gốc của trung tâm hoạt động. Trong 12 gốc có liên kết hiđrô với α -AI-1, chỉ có Glu-49 và Ser 311 của PPA bị thay thế bằng Asn và Arg đối với ZSA. Hai enzym khác nhau đáng kể ở một đoạn uốn cong này tạo thành bề mặt của điểm bám cơ chất. Ở PPA, loop bao gồm Gly-His-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser. Trong khi đó, tại ZSA, vùng tương tự ngắn hơn nhiều và kém mềm dẻo bao gồm Asp-Asn-Gly. Các đoạn uốn cong này có thể là yếu tố quyết định cho các enzym khi chúng tương tác với α AI-1.

Do α -AI có tác dụng kìm hãm α -amilaz nên đã làm giảm tác hại của côn trùng [64], sâu mọt, bọ cánh cứng phá hoại lương thực trong quá trình bảo quản hoặc có thể sử dụng để điều trị các bệnh do hoạt độ amilaz tăng cao quá mức bình thường. Vì vậy, chúng có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực bảo vệ thực vật trước và sau thu hoạch, cũng như trong một số lĩnh vực y học. α -AI đang là đối tượng được quan tâm nghiên cứu tại nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Năm 1994, người ta đã biến nạp ADN mã hoá α AI-1 vào đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) với *A. tumefaciens* và các hạt chuyển gen của thế hệ thứ 2 đã được kiểm tra tính kháng một đậu azuki trong phòng thí nghiệm. Năm 1995, Schroeder

[110] và các cộng sự tiến hành thử nghiệm tính kháng một đậu ở thực vật trồng trong nhà kính (một hạt trứng vào vỏ đậu chứ không phải hạt đậu khô). Với một đậu azuki, tác động của α -AI trong đậu thật ấn tượng và không thể nhầm lẫn, hầu như tất cả các hạt chứa α -AI đều làm cho tất cả ấu trùng ăn hại bị chết. Kết quả trên đậu lăng khá đa dạng và phụ thuộc vào hàm lượng α -AI trong hạt. Hàm lượng α -AI từ 0,8-1,0 % làm ấu trùng chết hoàn toàn. ADNc của α -AI biểu hiện bền vững trong hạt đậu của cây được biến nạp gen, tối thiểu đến thế hệ thứ 5. Trong một vài dòng đã được chuyển gen, α AI-1 tích lũy trong hạt đạt tới 3% protein tan. Trong những hạt này, sự phát triển của ấu trùng một đậu hại cây trồng trong nhà kính sớm bị ngăn chặn. Các thử nghiệm gần đây cho thấy hạt đậu hoàn toàn kháng được sự ăn hại nghiêm trọng trong tự nhiên của các loại một đậu trên đất trồng. Những kết quả song song nhận được từ Ishimoto và cộng sự 1996 [42], chuyển gen đậu azuki (*Vigna angularis*) với cùng loại ADNc, chứng tỏ rằng các hạt biểu hiện gen α -AI hoàn toàn kháng lại một đậu azuki [14].

Chrispeels và cộng sự [14] biểu hiện thành công α AI-1 trong đậu (*P. sativum*) trồng trong nhà kính nhằm bảo vệ đậu khỏi sự ăn hại của một đậu (*Bruchus pisorum*). α AI-1 đã kìm hãm 80% α -amilaz một đậu trên dải pH rộng (4,5-6,5). Họ cũng nhận thấy α AI-2 là chất kìm hãm hiệu quả thấp với α -amilaz một đậu, α AI-2 là chất kìm hãm 40% enzym trong dải pH hẹp (4,0-4,5).

Tuy nhiên, α AI-2 vẫn có hiệu quả một phần trong việc bảo vệ đậu chuyển gen trên đất trồng trọt chống lại một đậu. α AI-2 chỉ làm chậm quá trình trưởng thành của ấu trùng, trong khi đó α AI-1 làm ấu trùng chết nhanh chóng [129].

Các kết quả nghiên cứu về amilaz tái tổ hợp mang hoạt tính diệt côn trùng gây hại đã mở ra triển vọng to lớn cho lĩnh vực bảo quản trước và sau thu hoạch.

Các protein bất hoạt ribosom (RIP)

Protein bất hoạt ribosom (Ribosome Inactivating Protein - RIP) của thực vật là một nhóm protein những chất có hoạt tính N - glicozidaz có khả năng nhận biết và cắt gốc adenin đặc hiệu trên tiểu phần rARN lớn, do đó phá hủy ribosom và ngăn cản quá trình sinh tổng hợp protein [24].

Dựa vào cấu trúc phân tử có thể chia RIP thành 3 nhóm. RIP nhóm 1 phổ biến hơn so với RIP nhóm 2 và 3, được tìm thấy ở trên 60 loài thực vật và được tinh sạch từ nhiều

loài trong số đó [114]. Chúng chỉ gồm một chuỗi polipeptit có khối lượng phân tử khoảng 23 - 32 kD, pI ở vùng kiềm 8 - 10 (đôi khi ở dạng glycosyl hóa). RIP nhóm 2 gồm hai chuỗi polipeptit A và B được liên kết với nhau bằng cầu nối disulfua, trong đó chuỗi A có trình tự axit amin tương tự như RIP nhóm 1 và có hoạt tính N - glicozidaz, còn chuỗi B có vị trí liên kết với xacarit và không có hoạt tính enzym, pI dao động từ 4 - 8 [26,112]. RIP nhóm 3 bao gồm một số RIP mới được tìm thấy nhưng có cấu trúc khác hai nhóm RIP trên. Một trong số đó là RIP b-32 được tìm thấy ở ngô (*Zea mays*), nó được tổng hợp dưới dạng tiền enzyme (proenzyme) và trở thành dạng hoạt động khi được cắt bỏ một đoạn peptit ở giữa và tạo thành dạng hoạt động gồm hai đoạn peptit với khối lượng khoảng 16,5 và 8,5 kD nối với nhau [124]. Một loại RIP nhóm 3 khác là JIP60 có khối lượng phân tử khoảng 60 kD được tìm thấy ở lúa mạch. JIP60 gồm một tiểu phần có cấu trúc tương tự như RIP nhóm 1 liên kết với một tiểu phần khác có kích thước tương tự nhưng chưa rõ chức năng [103]. Tuy nhiên, cũng có ý kiến cho rằng chỉ nên chia RIP thực vật thành hai nhóm 1 và 2 còn b-32 và JIP60 chỉ là những trường hợp đặc biệt của RIP nhóm 1 [83].

RIP được tìm thấy đầu tiên ở thực vật, chủ yếu ở thực vật hạt kín (cả thực vật một và hai lá mầm). Đồng thời, RIP cũng đã được phát hiện ở nấm *Volvariella volvacea* và *Lyophyllum shimeij* [46, 130], tảo *Laminaria japonica* [61]. Mức độ biểu hiện của RIP ở các mô thực vật cũng khác nhau rất nhiều, từ dạng “dấu vết” tới hàng trăm mg/100 g sinh khối của mô. Ở một số loài thực vật, RIP có ở nhiều mô thậm chí tất cả các mô được kiểm tra (rễ, lá, thân, vỏ, hoa, quả, hạt, nhựa, các tế bào nuôi cấy) trong khi đó ở một số loài thực vật khác, RIP chỉ được tìm thấy ở một mô duy nhất. Đồng thời, trong một mô cũng có thể có nhiều dạng RIP khác nhau: ví dụ, một số dạng saporin được tìm thấy ở hạt, lá và rễ của cây *Saponaria officinallis* [23] và một vài dạng RIP không độc thuộc nhóm 2 được xác định ở nhiều mô của các loài *Sambucus* [28].

RIP nhóm 1 phổ biến hơn RIP nhóm 2 và dường như nó phân bố ở hầu hết các thực vật thuộc một số họ như Bầu bí (*Cucurbitaceae*), Cẩm chướng (*Caryophyllaceae*), Thầu dầu (*Euphorbiaceae*)... [118, 126, 132]. Ở một số loài thực vật, cả hai loại RIP đều được tìm thấy [16, 30]. Cũng cần phải chú ý rằng, cho tới gần đây RIP nhóm 2 mới được cho là có độc tính cao, bởi vì nhiều loại lectin không độc có cấu trúc tương tự như RIP nhóm 2. Sự biểu hiện RIP ở một số thực vật được tăng cường khi cơ thể trong quá trình lão hóa, trong những điều kiện stress [11, 105, 115] và sau khi bị nhiễm virus.

RIP không chỉ có mặt ở thực vật. Shiga và những chất độc như shiga có cấu trúc và hoạt tính enzyme tương tự như RIP đã được tìm thấy ở các tế bào và mô động vật [78, 104]. Hơn nữa, những chất này cũng được tạo ra nhiều hơn khi tế bào bị nhiễm virus và trong điều kiện stress. Điều này chứng tỏ rằng sự phân bố của RIP trong tự nhiên dường như rộng hơn so với những dự đoán ban đầu của các nhà khoa học.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, RIP là những chất có hoạt tính N-glycozidaz có khả năng nhận biết và cắt gốc adenin đặc hiệu trên trên cấu trúc “loop” bảo thủ của rARN (vị trí A₄₃₂₄ ở rARN gan chuột), do đó phá hủy riboxom và ngăn cản quá trình sinh tổng hợp protein. Ngoài ra, RIP còn có tác động tương tự trên các axit nucleic không phải là rARN nên còn được coi là có hoạt tính adenosin glycozidaz [5, 36, 57].

Cho tới nay, đã có nhiều loại RIP được tìm thấy, như là abrin, curxin (curcin), rixin (ricin), momorcarin (momorcharin), MAP30... [22, 100, 121]. Các loại RIP này đã nhận được sự chú ý trong các nghiên cứu sinh học và y sinh học bởi hoạt tính của chúng đối với các tế bào động vật và người như: sử dụng làm thuốc ra thai [131], thuốc chống HIV [63, 122, 133], chống ung thư [59, 60], độc tố đối với hệ thống miễn dịch [109]. Ngoài ra, RIP còn đóng vai trò trong hệ thống bảo vệ của thực vật bởi hoạt tính kháng nấm, vi khuẩn, virus [47, 77, 125].

Gần đây, đã có những cuộc tranh luận về việc liệu RIP có những hoạt tính enzym nào khác ngoài hoạt tính N-glycozidaz. Những nghiên cứu mới nhất đã cho thấy hoạt tính RNaz và DNaz [65], khả năng khử các gốc tự do (superoxide dismutase - SOD) [58, 111] và phospholipaz [31] của RIP.

Cơ chế phá hủy riboxom đã được Endo (1987) phát hiện [21]. Nghiên cứu này đã nhận thấy ricin cắt liên kết glycozidic của gốc adenin đơn (A₄₃₂₄ ở rARN của tế bào gan chuột). Gốc này liên kết với vị trí cắt rARN của α -sarxin (α -sarcin) gồm bốn nucleotit GA₄₃₂₄GA trong cấu trúc “loop” có mức độ bảo thủ cao (còn được gọi là α -sarcin/ricin loop). Vị trí cắt đặc trưng này đã được tìm thấy sau đó ở các loại RIP khác.

RIP không những tác động lên riboxom của động vật có vú mà còn tác động lên riboxom của các côn trùng [134], thực vật [38], nấm men [106] và vi khuẩn [27]. Các nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng, một số RIP cắt bỏ nhiều hơn một gốc adenin trên mỗi riboxom và một số RIP còn có khả năng cắt các gốc adenin của ADN và một số polinucleotit [5, 75, 76]. Do đó, RIP còn được gọi là các polinucleotit adenin glycozidaz hay adenin polinucleotit glycozidaz. Với khả năng tác động lên nhiều loại cơ chất khác nhau như vậy, RIP có thể còn đóng nhiều vai trò quan trọng khác trong tế bào.

1.2. Trong nước

Phòng Công nghệ Enzim – Protein của Đại học Tổng Hợp Hà Nội trước đây, nay thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội là nơi khởi xướng ở nước ta và liên tục từ năm 1982 đến nay nghiên cứu các PPI từ các nguồn khác nhau.

Ngoài chế phẩm AT-04 được tách, tinh sạch từ phổi bò và đã được sử dụng thử nghiệm có kết quả để điều trị bỏng độ II và độ III ở 38 bệnh nhân [20, 66, 67, 68] phần lớn các nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào PPI thực vật, đặc biệt là các PPI của các cây họ bầu bí.

Trong số các đối tượng đã được nghiên cứu, chúng tôi đã phát hiện được hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*) giàu TI nhất [89, 93]. Từ hạt gấc đã sản xuất được chế phẩm giàu PPI đặt tên là MOMOSERTATIN (Mo) có tác dụng ức chế sinh trưởng sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh và proteinaz trong hệ tiêu hoá của chúng [52, 90]. Chế phẩm đã được thử nghiệm ngoài đồng ruộng (hơn 10 ha các loại rau họ thập tự) cho kết quả diệt sâu cao [92].

Chế phẩm tinh sạch một phần có tác dụng ức chế sinh trưởng của nhiều vi khuẩn, kể cả *Pseudomonas aeruginosa* phân lập từ mụn vết thương bỏng của người và ức chế proteinaz của chúng [91, 94]. Chế phẩm peptit phân tử thấp tách từ Mo (đặt tên là peptit kháng khuẩn hoặc MCoPIs) có tác dụng làm giảm viêm mạn, viêm cấp thực nghiệm, chế phẩm không độc đối với động vật thực nghiệm [69].

Do Mo có các hoạt tính sinh học quan trọng nên chúng tôi đi sâu nghiên cứu kỹ hơn về các PPI của nó. Từ chế phẩm Mo đã tách được 3 TI, đặt tên là MCoTI-I, -II và -III [70], tinh sạch, nghiên cứu tính chất và xác định được cấu trúc bậc I của chúng [1]. Tất cả 3 TI này khá tương đồng với các TI họ bí: khối lượng phân tử khoảng 3 kD, 3 cầu disulfua và rất bền. MCoTI-II chiếm tỉ lệ lớn nhất, bao gồm 34 axit amin, không bị thủy phân dưới tác dụng của termolizin (thermolysin) ở 50°C trong 48 giờ. Cấu trúc không gian của MCoTI-II cũng đã được xác định [32, 49]. Cho đến nay cũng chưa có công trình nào công bố về tạo MCoTI-II tái tổ hợp. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu phân lập gen mã hoá TI họ bí [120] sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để sản xuất MCoTI-II.

Vấn đề nghiên cứu protein kìm hãm α -amilaz (α -AI) ở Việt Nam mới được quan tâm khoảng 5 - 10 năm gần đây, trong đó Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm trường ĐH BKHN đã nghiên cứu, thăm dò tách, tinh sạch protein α -AI, lectin từ các loại đậu cove Việt Nam [19]. ĐH BKHN phối hợp với phòng ADN ứng dụng - Viện

Công nghệ Sinh học tách, tinh sạch ADN, nhân đoạn gen ADN - α AI, giải trình tự ADN trong một số loại đậu *Phaseolus vulgaris* Việt Nam. Nói chung, những nghiên cứu đều ở mức thăm dò.

Những năm gần đây một số phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học thuộc Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam đã tiến hành nghiên cứu về RIP của một số đối tượng họ bầu bí: đã nghiên cứu khả năng kháng một gạo của dịch chiết từ hạt mướp đắng [71]; về tách dòng và biểu hiện gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng trong nấm men *Pichia pastoris* [72, 73, 74]. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các dòng đó còn chưa đạt yêu cầu. Ngoài ra, đã có các nghiên cứu về sự phân bố của RIP ở một số thực vật thuộc họ bầu bí [33] và về đặc điểm của tricochakin [95].

Vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất PPI, α AI, RIP tái tổ hợp có giá trị sử dụng trong y dược và nông nghiệp sẽ góp phần tạo được những chế phẩm có tiềm năng ứng dụng trong y dược và nông nghiệp.

Đề tài này nhằm thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số protein tái tổ hợp (PPI, α -AI, RIP) có khả năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

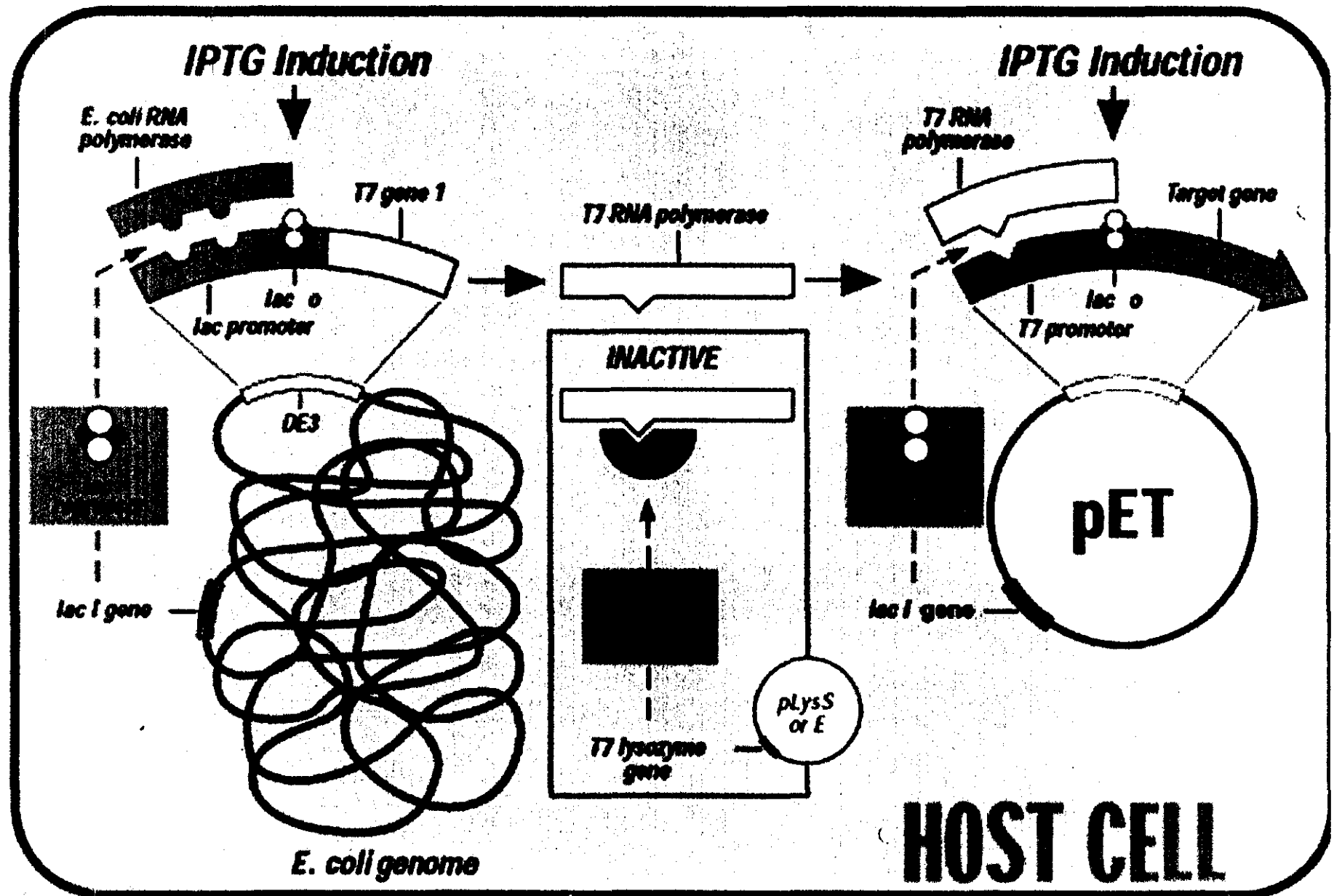
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị

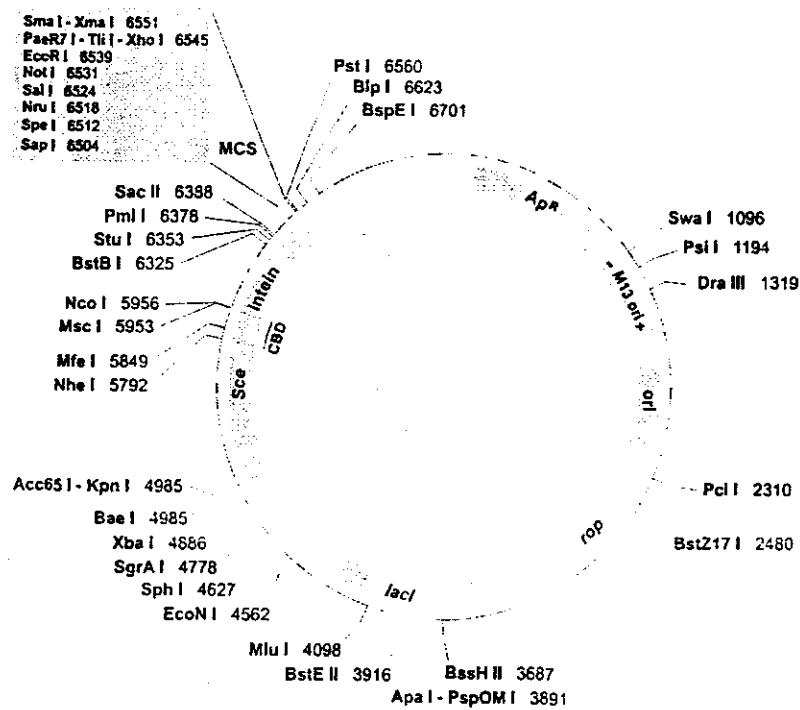
2.1.1 Nguyên liệu, hoá chất

- Các nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, tự thu thập: lá gấc non, lá bí đỏ non, các loại đậu cô ve trắng, cô ve vàng, cô ve nâu... và lá non của mướp, mướp đắng.
- Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli*: *DH5 α* , *BL21(DE3)*, dòng tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ... của hãng Promega, Mỹ.
- Vectơ Ti-plasmid pCAMBIA 1300+HAL1, pCAMBIA1301 do Trung tâm Ứng dụng Sinh học Phân tử và nông nghiệp Quốc tế (CAMBIA), Australia cung cấp.
- Các dòng vectơ: pET-14b, pTYB-12 của hãng Promega, Mỹ.
- Vectơ chọn dòng pBluescript (KS⁺) và vectơ biểu hiện pET21d(+) được mua từ hãng Novagen[®] (Hoa Kỳ).
- Các enzym giới hạn (*Bam*HI, *Nde*I, *Xho*I, *Nco*I), enzym T₄ ligaz, RNaz và đệm tương ứng của hãng Promega, Mỹ.
- α -amilaz tuy tạng lợn (Pancreatin): Hàn Quốc
- Các loại thang chuẩn ADN: λ - ADN, λ /HindIII, Mix (100bp-10000bp), 100bp Plus (100-3000bp), 100bp (80-1031), 1kb (250-10000) của hãng Fermentas MBI, Đức.
- Các loại kit tách và tinh sạch ADN: Bộ kit tách ADN tổng số của thực vật và bộ kit tách ADN của vectơ của hãng Qiagen.
- Màng whatman glassmembrane GF/D của UK Biolab.
- Một số hoá chất kèm theo dùng cho tách và tinh sạch ADN: GITC, EDTA, isopropanol, Kac, IAA, Chloroform, Glucoz,... của hãng Promega, Mỹ.
- Bộ mồi đặc hiệu (1, 2, 3, 4) cho gen CMTI-V và gen MCoTI-II do chúng tôi thiết kế, hãng Invitrogen Life Technologies tổng hợp.
- Cặp mồi AIF/AIR cho gen α -AI được thiết kế và đặt hãng Invitrogen[®] (Hoa Kỳ) tổng hợp.
- Cặp mồi MAP65F/MAP859R cho gen RIP được thiết kế và đặt hãng Invitrogen[®] (Hoa Kỳ) tổng hợp.
- Các hoá chất dùng cho PCR: *Taq*, dNTPs của hãng Finenzym.
- Các hoá chất dùng cho điện di agaroz: agaroz-Plus, đệm TAE, EtBr của hãng Promega, Mỹ.

Figure 1. Control elements of the pET System



pET-14b



Intein Forward Primer →

...CCCGCCGCTGCTTTTGACGCTGAGTGCC...GAAGACGATTATTATGGGATTACTTTATCTGATGATCTGATCATCAGTTTGTCTTGATCCAG
 6380 6440 6460 6480

Sca VMA Intein
 Sca VMA Intein ... S D H Q F L L G S O
 ...CCCGCCGCTGCTTTTGACGCTGAGTGCC...GAAGACGATTATTATGGGATTACTTTATCTGATGATCTGATCATCAGTTTGTCTTGATCCAG...
 6380 6440 6460 6480

PTYB11 MCS
 GTTGTGTACAGAA
 V V V C N R R A T S S R Y D G G R E F L E P G *

PTYB12 MCS
 GTTGTGTACAGAA
 V V V C N A G H M T S S R Y D G G R E F L E P G *

- Bộ hóa chất *sinh chuẩn* BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing.
- Bộ hoá chất dùng để phân tích khối phổ: các loại MALDI matrix của hãng Sigma (Hoa Kỳ); triptxin của hãng Promega (Madison, WI, Hoa Kỳ); axetonitril, metanol của hãng Fisher Scientific (Anh); hệ thống khối phổ QSTAR[®] XL (MDS Sciex, Toronto, Canada).
- Các hoá chất dùng cho SDS - PAGE của hãng Sigma, Mỹ.
- Môi trường LB- agar và môi trường LB dịch thể, cao nấm men, tripton... của hãng Sigma (Mỹ) và Merck (Đức).
- Các loại hoá chất dùng trong nuôi cấy vi sinh vật: Ampi, IPTG, X-gal, Rif, Kan... của hãng Promega (Mỹ).
- Các loại gel và cột dùng cho tinh sạch protein tái tổ hợp: Sephadex, Superdex, cột HiTrap, cột HiPrep16/10 (DEAE), cột QAE, cột DEAE.... của hãng Pharmacia, Thụy Điển.
- Các loại hoá chất thông dụng khác đạt độ sạch phân tích (PA).

2.1.2. Thiết bị

- Máy ly tâm Sigma 3K18, máy ly tâm Sigma 6K15, máy ly tâm Eppendorf 5417C của Mỹ.
- Máy PCR Eppendorf: Mastercycler Personal 5332, Mastercycler Personal Gradient của Đức.
- Máy quang phổ Spectronic Unicam LR 115161 của Đức.
- Hệ thống lọc nước Milli Q của hãng Millipore, Mỹ.
- Máy điện di ngang, máy điện di đứng của Hoefer, Mỹ.
- Máy soi ADN và chụp ảnh ADN của Hoefer, Mỹ.
- Máy lắc ổn nhiệt Shellab (Mỹ), máy lắc ổn nhiệt IKA Labotechnic HS 502 (Đức), tủ ấm ổn nhiệt Binder WTB (Đức).
- Tủ cấy vô trùng NUAIRE 400E (Đức).
- Hệ thống đọc trình tự gen ALFexpress II, Mỹ.
- Hệ thống phân tích trình tự gen tự động ABI PRISM 3100 AVANT GENETIC ANALYZER.
- Tủ lạnh sâu Sanyo Ultra Low (Nhật).
- Hệ thống lên men 3lít MDL_B.E. Marubishi (Nhật).
- Hệ thống lên men 5 lít (BioFloor, Mỹ).
- Hệ thống sắc ký tinh sạch protein FPLC, Pharmacia Biotech, Thụy Điển.
- Máy Scan Sharp JX330 (Nhật).
- Các loại tủ lạnh chuyên dụng từ 4⁰C đến -20⁰C của các hãng Sanyo, Sharp, Hitachi, Daewoo và một số thiết bị, máy móc khác .v.v...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Các phương pháp tách ADN tổng số của thực vật gồm: phương pháp tách ADN tổng số theo Qiagen Kit [99], phương pháp tách ADN tổng số theo Eija Pehu và cộng sự (1998) [17], phương pháp tách ADN tổng số theo Becker *et al.* (1995) [6].
- Phương pháp phân lập gen CMTI-V và MCoTI-II từ ADN tổng số của gốc và bí đỏ [17, 120]
- Phương pháp biến nạp gen vào vector tái tổ hợp và biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli* [39, 41].
- Phương pháp tách ADN của vector tái tổ hợp [99, 108].
- Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp CMTI-V tác động đến yếu tố chống đông máu XIIa [34, 44].
- Kiểm tra hoạt tính ức chế của α -AI tái tổ hợp theo phương pháp của Grossi và cộng sự [29].
- Thiết kế vector chuyển gen vào *Agrobacterium* phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng [18, 35, 102, 103, 119].
- Phương pháp điện di ADN trên gel agaroz và gel poliacrilamit [48].
- Phương pháp điện di TI như đã mô tả trước đây [55, 56]
- Nhân bản gen bằng kỹ thuật PCR [41].
- Biến nạp gen vào vector tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* [39, 41].
- Biến nạp Ti-plasmid tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* theo Draper và cộng sự [18].
- Chuyển Ti – plasmid tái tổ hợp mang gen MCoTI-II và *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp xung điện [35].
- Điện di protein theo Leammli [48].
- Xác định hoạt tính ức chế proteinaz bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và điện di có cơ chất [56, 88].
- Sắc ký ái lực qua cột chitin theo hệ thống IMPACTTM-CN [40].
- Phân tích khối phổ, xử lý và so sánh số liệu theo tài liệu [15, 43, 62, 82, 113].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

3.1. PHÂN LẬP GEN, THIẾT KẾ CÁC VECTƠ TÁI TỔ HỢP MÃ HOÁ CHO CÁC GEN MCoTI-II, CMTI-V, α -AI, RIP

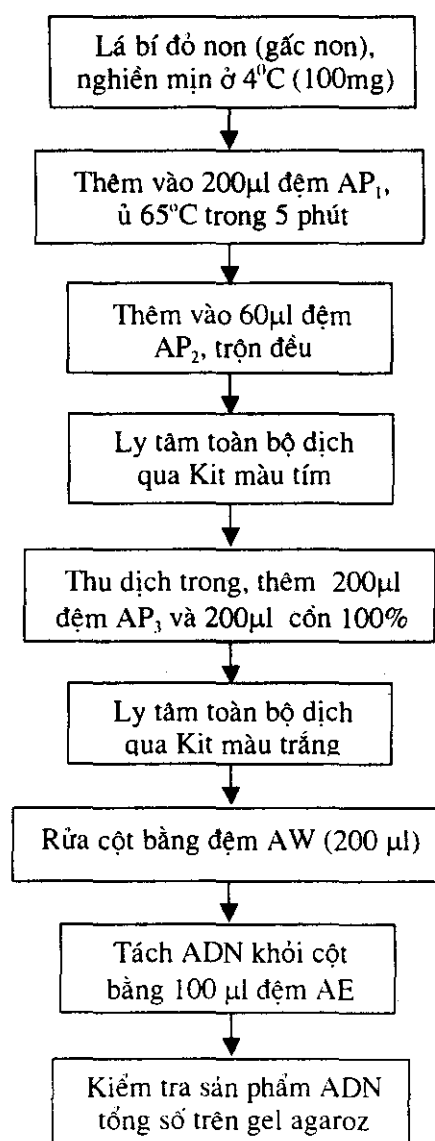
3.1.1. Tách ADN tổng số

3.1.1.1. Tách ADN tổng số của gốc và bí đỏ

Để phân lập gen CMTI-V, chúng tôi đã tiến hành tách ADN tổng số của bí đỏ; phân lập gen MCoTI-II, chúng tôi tiến hành tách ADN tổng số của gốc.

Chúng tôi đã sử dụng 4 phương pháp khác nhau và đã lựa chọn được 2 phương pháp thích hợp với các đối tượng này là: phương pháp Qiagen Kit [99] (sơ đồ 1) và phương pháp được mô tả bởi Eija Pehu và cộng sự [17] (sơ đồ 2).

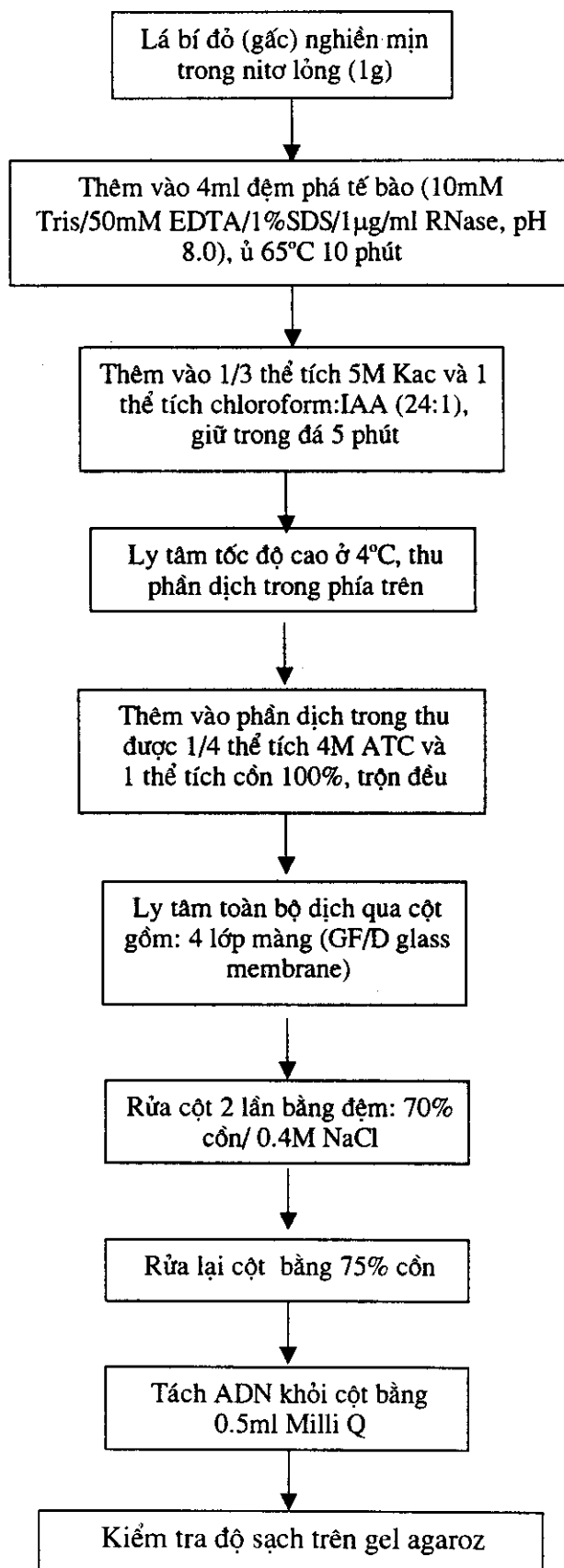
Sơ đồ 1: Phương pháp tách ADN tổng số của gốc (bí đỏ) theo Qiagen Kit



* *Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Qiagen Kit gồm các bước cụ thể như sau:*

1. 100mg lá gấc, hoặc lá bí đỏ non rửa sạch bằng nước cất, thấm khô (không làm dập nát lá). Cho vào ống eppendorf 1,5ml sạch đã khử trùng, nghiền mịn bằng chày nhựa chuyên dụng đã khử trùng (như máy nghiền), ống phải được giữ trong nước đá hoặc nhúng trong nitơ lỏng.
2. Sau khi nghiền mịn lá, cho vào ống eppendorf 400µl đệm AP₁ (10mM tris/50mM EDTA/1%SDS/1µg/ml RNase, pH 8,0), ủ ở 65°C trong 10 phút, lắc nhẹ ống eppendorf 2 lần.
3. Lấy tube ra giữ trong đá, cho vào 130µl đệm AP₂ (5M Kac: Kalium acetat), lắc nhẹ ống (không dùng pipet), giữ trong đá 5 phút.
4. Cho toàn bộ hỗn dịch trên qua Kit màu tím, ly tâm 2 phút, tốc độ 16.000 vòng/ phút.
5. Thu toàn bộ dịch trong qua Kit, thêm vào dịch trong thu được 0,5 thể tích đệm AP₃ (4M GITC: Guanidin thiocyanat) và 1 thể tích cồn tuyệt đối, trộn nhẹ bằng pipet.
6. Cho toàn bộ dịch trên qua Kit màu trắng, ly tâm 1 phút ở 6000 vòng/phút.
7. Rửa Kit màu trắng 2 lần, mỗi lần bằng 500µl đệm AW (70% cồn/0,4M NaCl). Rửa tiếp một lần bằng 500µl cồn 75%.
8. Tách ADN khỏi Kit bằng 100µl đệm AE (1mM EDTA, 10mM Tris).
9. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN trên gel agaroz 0,8%, bằng máy quang phổ với bước sóng 260nm/280nm.

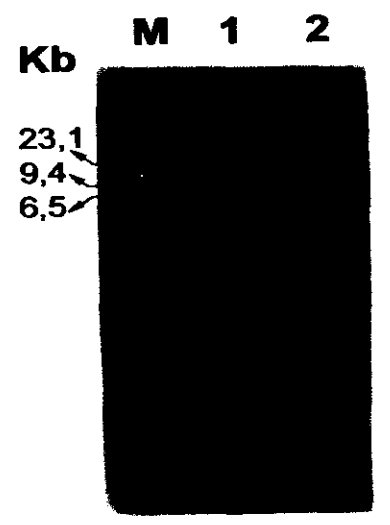
Sơ đồ 2: Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Eija Pehu và cộng sự



* *Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Eija Pehu gồm các bước cụ thể như sau:*

1. 1g lá gấc, hoặc lá bí đỏ non rửa sạch bằng nước cất, thấm khô (không làm dập nát lá). Cho vào cối sứ sạch, nghiền mịn trong nitor lỏng bằng chày sứ chuyên dụng, dùng thìa inox nhúng trong nitor lỏng để cho bột lá đã nghiền mịn vào ống Falcol 50ml sạch, đã khử trùng, chịu được các dung môi hữu cơ (làm thật nhanh khi nitor còn đủ lạnh tránh để bột lá bị chảy nước).
2. Cho vào ống 4ml đệm phá tế bào (10mM tris/50mM EDTA/1%SDS/1 μ g/ml RNase, pH 8,0), ủ ở 65°C trong 10 phút, lắc nhẹ ống 2 lần.
3. Lấy ống ra, giữ trong đá, thêm vào 1/3 thể tích 5M Kac (Kalium acetat) và 1 thể tích chloroform:IAA (isoamyl alcohol) (24:1) (hai đệm này đã đạt khoảng 4°C), lắc nhẹ ống (không dùng pipet), giữ trong đá 5 phút.
4. Ly tâm 20.000 vòng/phút ở 4°C, trong 20 phút, thu phần dịch trong phía trên.
5. Thêm vào phần dịch trong thu được 1/4 thể tích 4M đệm ATC (Amonium thiocyanat) và 1 thể tích cồn 100%, trộn đều bằng pipet.
6. Dùng xilanh 5ml đã bỏ pít tông, làm cột. Lót dưới đáy xilanh 1 lớp giấy lọc, để 4 lớp màng GF/D glass membrane và trên cùng là 1 lớp giấy lọc, khử trùng trước khi dùng.
7. Đặt cột đã chuẩn bị như trên vào ống falcol 15ml sạch, đã khử trùng. Cho toàn bộ dịch thu được qua cột bằng ly tâm tốc độ 300 vòng/phút, trong 2 phút, ở nhiệt độ phòng.
8. Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 5ml, ly tâm 300 vòng/phút, trong 2 phút, nhiệt độ phòng.
9. Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 5500 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống falcol 15ml mới.
10. Tách ADN bằng 0,5ml -1ml nước MilliQ, ly tâm 5500 vòng phút, trong 1 phút.
11. Kiểm tra nồng độ của ADN trên gel agaroz 0,8%.
12. Cho 3 μ l RNase vào dung dịch ADN thu được, ủ ở 37°C trong 1 giờ để loại bỏ ARN.
13. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN bằng máy quang phổ với bước sóng 260nm/280nm.

Cả hai phương pháp đã sử dụng đều đạt hiệu suất tương đương 100mg lá tươi tách được 26 μ g ADN, có tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ là 1.86-1.90. Phương pháp nêu ở sơ đồ 1 tuy nhanh hơn nhưng phải có Kit, vì vậy trong điều kiện không có kit có thể sử dụng phương pháp nêu ở sơ đồ 2. Dung dịch ADN tổng số của bí đỏ (gấc) thu được chỉ cho một băng ADN rõ nét, có kích thước lớn trên gel agaroz 0.8% (hình 1). Như vậy chế phẩm đạt độ sạch cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Phổ điện di ADN tổng số của bí đỏ và gấc

M. Thang chuẩn ADN

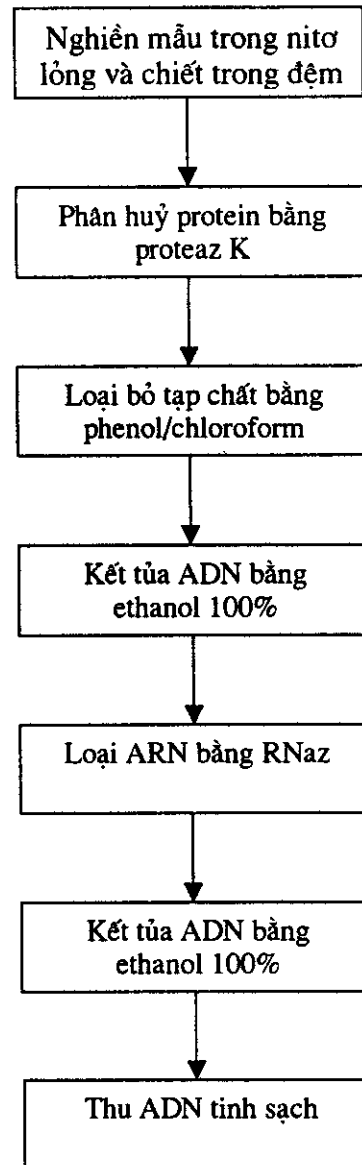
1. ADN tổng số của bí đỏ

2. ADN tổng số của gấc

3.1.1.2. Tách ADN tổng số từ đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*)

Việc tách chiết ADN tổng số này là bước khởi đầu quan trọng để nhân đoạn gen cần nghiên cứu. Chúng tôi đã tách chiết ADN tổng số từ mầm đậu vì ở mô phân sinh mầm đậu tập trung nhiều ADN và quá trình nghiền mô non dễ dàng hơn so với mô khác. Qui trình tách chiết ADN được mô tả ở sơ đồ 3.

Sơ đồ 3: Các bước tiến hành tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của đậu cô ve

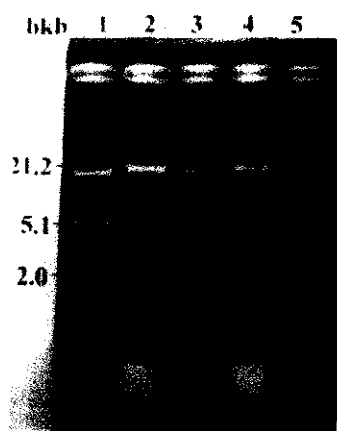


** Các bước cụ thể như sau:*

1. 0,5g mầm đậu cô ve trắng tươi được nghiền mịn trong nitor lỏng. Sau đó được chiết bằng 6ml đệm có thành phần NaCl 10mM, Tris-HCl 10mM, pH=8 , EDTA 25mM, SDS 0,5%.
2. Phân huỷ protein bằng proteaz K (10 µg/ml) trong 2 giờ ở 56°C.
3. Cho một thể tích hỗn hợp phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1).
4. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C, thu dịch trong.
5. Kết tủa ADN bằng etanol 100%, để trong 3 giờ ở -20°C.
6. Ly tâm 14.000 vòng phút, trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa.

7. Rửa rửa bằng etanol 70%, ly tâm thu kết tủa 14.000 vòng phút, trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa
8. Hoà tan kết tủa bằng 400µl H₂O khử ion vô trùng
9. Loại ARN bằng 3µl RNaz (nồng độ 10µg/ml) trong 1 giờ ở 37°C.
10. Kết tủa và hoà tan lại như bước 5-8.

Để xác định sản phẩm ADN chúng tôi tiến hành kiểm tra trên gel agaroz 0,8%. Kết quả được thể hiện trên hình 2.



Hình 2 : Phổ điện di ADN tổng số từ mầm đậu cô ve

1. Thang ADN chuẩn (ADN λ/Hind III/ Eco RI)
2. ADN tổng số của đậu cô ve nâu chưa loại ARN
3. ADN tổng số của đậu cô ve nâu đã loại ARN
4. ADN tổng số của đậu cô ve trắng chưa loại ARN
5. ADN tổng số của đậu cô ve trắng đã loại ARN

Qua hình 2 ta thấy xuất hiện một băng ADN có kích thước khoảng 21,2kb. Kích thước này phù hợp với kích thước của ADN tổng số thực vật. Do vậy có thể kết luận rằng chúng tôi đã tách chiết được ADN tổng số từ mầm đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*).

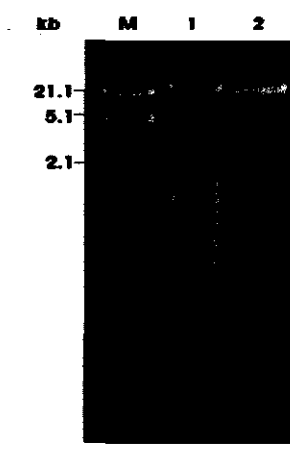
3.1.1.3. Tách ADN tổng số từ mướp đắng

ADN tổng số được tách chiết từ lá mướp đắng theo phương pháp Sambrook, cụ thể được tiến hành như sau:

1. Nghiền mẫu trong nitor lỏng: lá mướp đắng non được nghiền trong nitor lỏng thành dạng bột mịn; bổ sung 3 ml đệm chiết ADN tổng số vào 0,3 - 0,5 g lá; ủ 65°C trong 1 giờ.
2. Tách chiết: loại bỏ protein và tạp chất bằng phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1); lắc đều, ly tâm 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu dịch ở pha trên.

3. Tủa ADN bằng EtOH 100%, bổ sung natri axetat 3M pH 5,2 (tỉ lệ thể tích 1/10), để qua đêm ở - 20°C.
4. Thu tủa: ly tâm thu tủa 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu tủa; rửa lại tủa ADN bằng EtOH 70% (hai lần), làm khô, hòa tan trong 200 µl nước khử ion vô trùng.
5. Loại ARN: bổ sung 2 µl RNaz 10 mg/ml vào 100 µl dung dịch ADN thô, dẫn nước đến 400 µl, ủ 37°C trong 3 giờ; chiết bằng một thể tích tương đương cloroform: isoamylalcohol (24: 1); ly tâm 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu dịch pha trên; lặp lại bước 3 và bước 4 để tinh sạch ADN.

Sau khi tách chiết, ADN tổng số được kiểm tra bằng đo quang phổ bước sóng 260nm và 280nm và chạy điện di trên gel agaroz. Kết quả thu được: tỷ số A260 nm/280nm là 1,96 và có đỉnh cực đại ở bước sóng 260 nm. Với 1 gram lá, thu được 0,5 - 1 mg ADN tổng số. Sau khi xác định nồng độ, ADN tổng số được kiểm tra trên gel agaroz 0,8 % (hình 3). Kết quả cho thấy ADN chiết được từ lá non mướp đắng ít bị đứt gãy, không bị lẫn ARN và có đủ chất lượng để sử dụng được cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Điện di đồ ADN genom từ cây mướp đắng

M: Thang chuẩn ADN λ /HindIII/EcoRI

1: ADN genom mướp đắng trước khi loại ARN

3. ADN genom mướp đắng sau khi loại ARN

3.1.2. Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V), MCoTI-II (TI-II), α -AI và RIP từ ADN tổng số của các thực vật tương ứng bằng kỹ thuật PCR

3.1.2.1. Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V) từ ADN tổng số của bí đỏ

Gen TI-V trong ADN tổng số của bí đỏ được nhân lên bằng kỹ thuật PCR. Sử dụng ADN tổng số đã tinh sạch làm khuôn, với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự

gen TI-V gắn thêm hai trình tự nhận biết của hai enzym giới hạn. Ở đầu 5' của mỗi xuôi gắn trung tâm nhận biết của enzym giới hạn *NdeI* (CA↓TATG) có mã khởi đầu Met (ATG), đầu 3' của mỗi ngược gắn trung tâm nhận biết của enzym giới hạn *BamHI* (GGATCC) có mã dừng tổng hợp. Trình tự nucleotit của cặp mỗi như sau:

Mỗi xuôi (forward primer) có chứa trung tâm nhận biết của *NdeI*:

5' CATATGCATATGTCCTCCTGCCCAGGTAAGTC 3'

Mỗi ngược (reverse primer) có chứa trung tâm nhận biết của *BamHI*:

5' CGCGGATCCGCGTTAACCGATCCTCGGTGGTG 3'

Gen CMTI-V trong ADN tổng số của bí đỏ được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với các điều kiện nêu ở sơ đồ 4.

* Các bước tiến hành phân lập gen mã hoá CMTI-V từ ADN tổng số của bí đỏ như sau:

1. ADN tổng số của bí đỏ có độ sạch = 1.90, nồng độ $\approx 560\text{ng}/\mu\text{l}$ được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR (25 μl) tổng hợp gen CMTI-V.
2. Hai môi đặc hiệu cho CMTI-V (xuôi và ngược) như đã nêu trên được dùng với nồng độ thích hợp nhất của mỗi môi là 150ng trong 1 phản ứng; dNTPs nồng độ 200 μM , 200ng ADN tổng số của bí đỏ (làm khuôn), Taq 0.2IU. Cụ thể là:

0,5 μl ADN tổng số	(560ng/ μl)
0,5 μl dNTPs	(10mM)
1 μl môi xuôi	(150ng/ μl)
1 μl môi ngược	(150ng/ μl)
0,25 μl Taq	(2IU/ μl)
2,5 μl đệm cho Taq	(10X)
19,25 μl nước MilliQ khử trùng	

= 25 μl cho 1 phản ứng PCR.

3. Phản ứng PCR gồm:

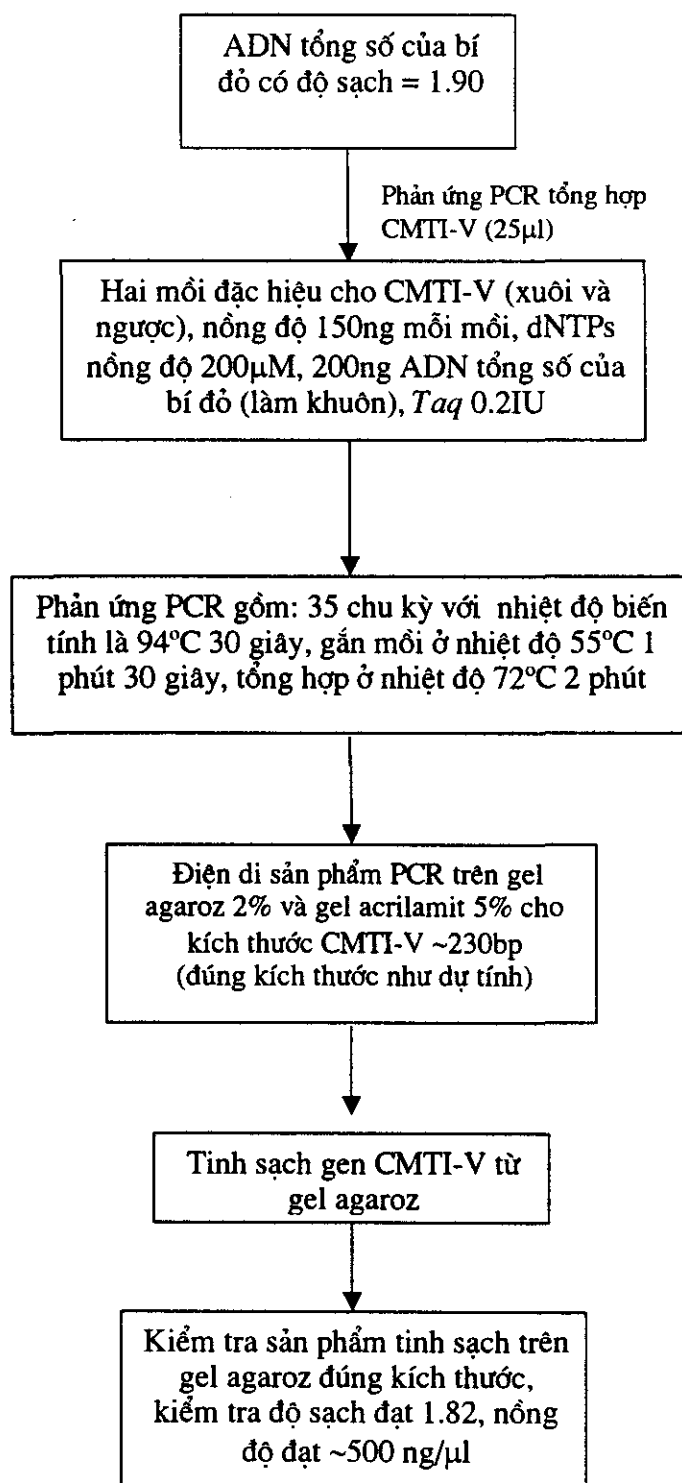
35 chu kỳ	{	94°C 3 phút
		94°C 30 giây
		55°C 1 phút 30 giây
		72°C 2 phút
		72°C 8 phút
		4°C

4. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agaroz 2% và gel poliacrilit 5% cho kích thước CMTI-V $\sim 230\text{bp}$ (đúng kích thước như dự tính).

5. Tinh sạch gen CMTI-V từ gel agaroz như sau:

- + Điện di lượng lớn sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% song song với thang chuẩn ADN, cắt lấy băng ADN đúng kích thước CMTI-V theo thang chuẩn, cho vào ống eppendorf 2ml sạch.
- + Cho vào ống trên khoảng 1 thể tích đệm gồm: 4M GITC (Guanidin thiocyanat), ủ ở 65°C cho tới khi agaroz tan hoàn toàn. Thêm vào bằng 1 thể tích cồn 100%, trộn nhẹ bằng pipet.
- + Cho toàn bộ hỗn dịch có chứa ADN ở trên qua cột có 4 lớp màng GF/D, ly tâm 6000 vòng/phút trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.
- + Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 0,5ml, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút, nhiệt độ phòng.
- + Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống mới.
- + Tách ADN bằng 100µl nước MilliQ, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút.
- + Kiểm tra độ sạch của ADN trên gel agaroz 2% cho thấy chỉ có 1 băng ADN với kích thước khoảng 230bp. Đo độ hấp phụ ở các bước sóng 260nm và 280nm cho thấy tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,82 đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sơ đồ 4: Phân lập gen mã hoá CMTI-V từ ADN tổng số của bí đỏ

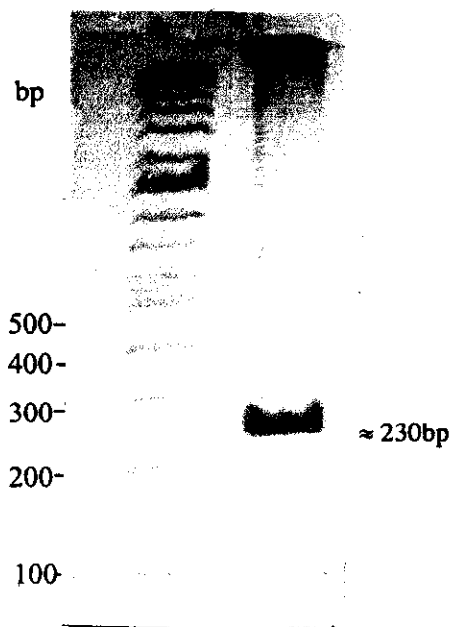


Chú thích : Các điều kiện PCR ghi trên sơ đồ 4 là kết quả của việc thăm dò nhiều điều kiện khác nhau.

1. Nồng độ môi: 50ng, 75ng, 100ng, 125ng, **150ng**, 200ng, 300ng.

2. Nồng độ dNTP: 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, **200 μ M**, 300 μ M, 400 μ M.
3. Nồng độ khuôn: 10ng, 20ng, 50ng, 100ng, 150ng, **200ng**, 300ng, 400ng, 500ng, 600ng, 700ng.
4. Nồng độ Taq: 0.1IU, **0.2IU**, 0.25IU, 0.3IU, 0.5IU.
5. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian biến tính khuôn khác nhau: từ 92°C, 93°C, 94°C và 95°C; dải thời gian biến tính khuôn từ 30 giây đến 5 phút, mỗi phản ứng chênh nhau 30 giây. Tìm thấy thời gian đủ để biến tính khuôn đầu tiên là **3 phút**, nhiệt độ là **94°C**. Tiếp đó vào chu kỳ là **94°C trong 30 giây**.
6. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian gắn mỗi khác nhau: từ 45°C đến 64°C liên tục mỗi phản ứng chênh nhau 0.5°C (máy PCR: Mastercycler Personal Gradient – Eppendorf); dải thời gian gắn mỗi từ 30 giây đến 120 giây, mỗi phản ứng chênh nhau 15 giây. Tìm thấy thời gian đủ ở **1 phút 30 giây**, nhiệt độ thích hợp là **55°C**.
7. Nhiệt độ và thời gian tổng hợp khác nhau: từ 70°C, 71°C, 72°C, 73°C và 74°C; dải thời gian tổng hợp từ 30 giây đến 3 phút, mỗi phản ứng chênh nhau 30 giây. Tìm thấy thời gian đủ để tổng hợp trong chu kỳ là **2 phút**, nhiệt độ là **72°C**.
8. Số chu kỳ phản ứng: 15, 20, 25, 30, **35**, 40, 45.

Sau khi tiến hành PCR với các điều kiện phản ứng như đã nêu trong sơ đồ 4, sản phẩm được kiểm tra trên gel poliacrilamit 5% (hình 4), chỉ phát hiện được 1 băng ADN với kích thước đúng như tính toán lí thuyết, vào khoảng 230bp.

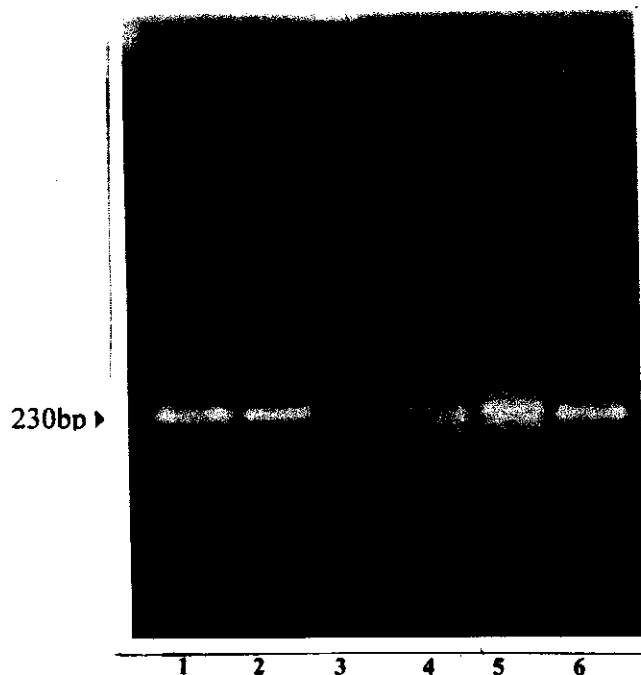


Hình 4. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng ADN tổng số của bí đỏ làm khuôn

1. Thang ADN chuẩn Mix (100bp – 10000bp)
2. Sản phẩm PCR $\approx$ 230bp

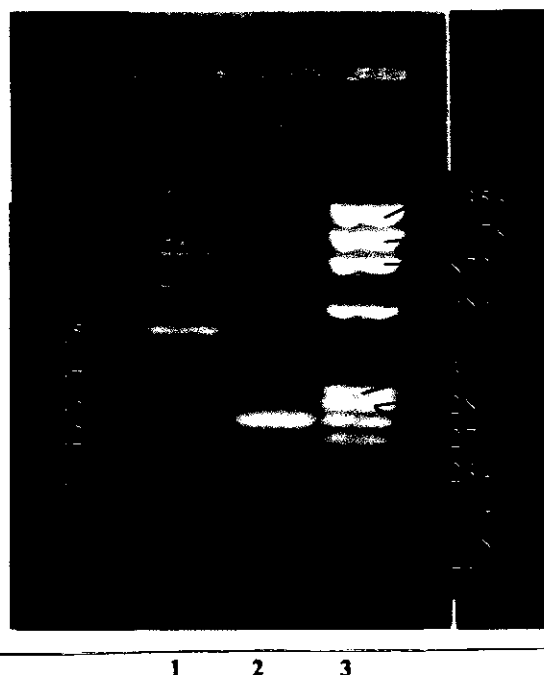
Ngoài ra, chúng tôi cũng đã tổng hợp hoá học gen mã hoá CMTI-V từ 4 mỗi gói nhau bằng kỹ thuật PCR với 2 phản ứng PCR nối tiếp nhau, phản ứng sau sử dụng sản phẩm của phản ứng trước làm khuôn. Kết quả trên hình 5 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 230bp, đúng theo tính toán lý thuyết.

Sản phẩm PCR được tinh sạch qua màng Recochip, nhận được một băng ADN sắc nét, có kích thước tương ứng khoảng 230bp (hình 6a, 6b).



Hình 5: Kết quả tổng hợp hoá học gen CMTI-V

1. Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 200 ng.
2. Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 250 ng.
3. Thang chuẩn ADN 100bp (100bp-1031bp).
4. 5. 6. Sản phẩm PCR 2 (mỗi xuôi và ngược, khuôn là sản phẩm PCR 1)



Hình 6a: Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR của gen CMTI-V

1. Thang chuẩn ADN 100bp (100bp-1031bp).
2. Sản phẩm PCR (cột 4, 5 hình 5 sau khi tinh sạch qua màng Recochip)
3. Thang ADN chuẩn *HaeIII* 72-1353

* Quy trình tổng hợp nhân tạo gen mã cho CMTI-V dựa trên bốn đoạn môi gồi nhau

Trình tự của bốn đoạn oligonucleotit (môi) được thiết kế dựa trên trình tự axit amin của CMTI-V sử dụng bảng mã di truyền của *E. coli*:

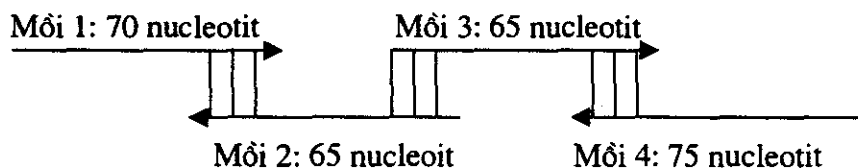
Oligonucleotit 1 5'CATGGATCCATGTCCTCCTGCCCAGGTAAGTCATCATG
GCCACACCTGGTAGGTGTTGGTGGTTCCGTTG

Oligonucleotit 2 5'CAGGATAACAGGTTTAACGTTTCGGATTCTGCCTTTTCGA
TGATAGCCTTAGCAACGGAACCACCAA

Oligonucleotit 3 5'AAAGCTGTTATTCCTGGAAGAAGGTACACCAGTTACCA
AGGACTTCAGGTGCAACAGGGTAGGAT

Oligonucleotit 4 5'CGCGGATCGCGTTAACCGATCCTCGGTGGTGATACTA
CCAGACCTCTCTTGTTAACCCAGATCCTAACCCCTGTTG

Các đoạn môi được thiết kế nằm gồi lên nhau như hình sau:



Sơ đồ cấu trúc môi

Trình tự của môi 1 và 4 được thiết kế có chứa vị trí nhận biết của enzym giới hạn BamHI. Trật tự gồi nhau các môi như sau: môi 1 và 2 gồi nhau 15 nucleotit, môi 2 và 3 gồi nhau 16 nucleotit, môi 3 và 4 gồi nhau 14 nucleotit. Trật tự các môi nằm gồi lên nhau được thiết kế sao cho không xảy ra sự đảo ngược đầu của các đoạn ngoài ý muốn. Để thu được gen mã cho CMTI-V bằng con đường tổng hợp nhân tạo, chúng tôi tiến hành thí nghiệm gồm hai phản ứng PCR nối tiếp nhau, phản ứng sau sử dụng sản phẩm của phản ứng trước làm khuôn.

Phản ứng PCR 1: tổng hợp nhân tạo đoạn gen mã cho CMTI-V bằng phản ứng PCR sử dụng 4 oligonucleotit vừa làm khuôn vừa làm môi.

Phản ứng PCR 2: nhân bản gen tổng hợp nhân tạo bằng phản ứng PCR thứ hai trong đó sử dụng sản phẩm PCR1 làm khuôn với môi 1 và môi 4.

Trước tiên, chúng tôi tiến hành xác định nồng độ tối ưu của 4 oligonucleotit cho phản ứng PCR1. Đặc điểm của phản ứng này là các oligo vừa được dùng làm môi vừa

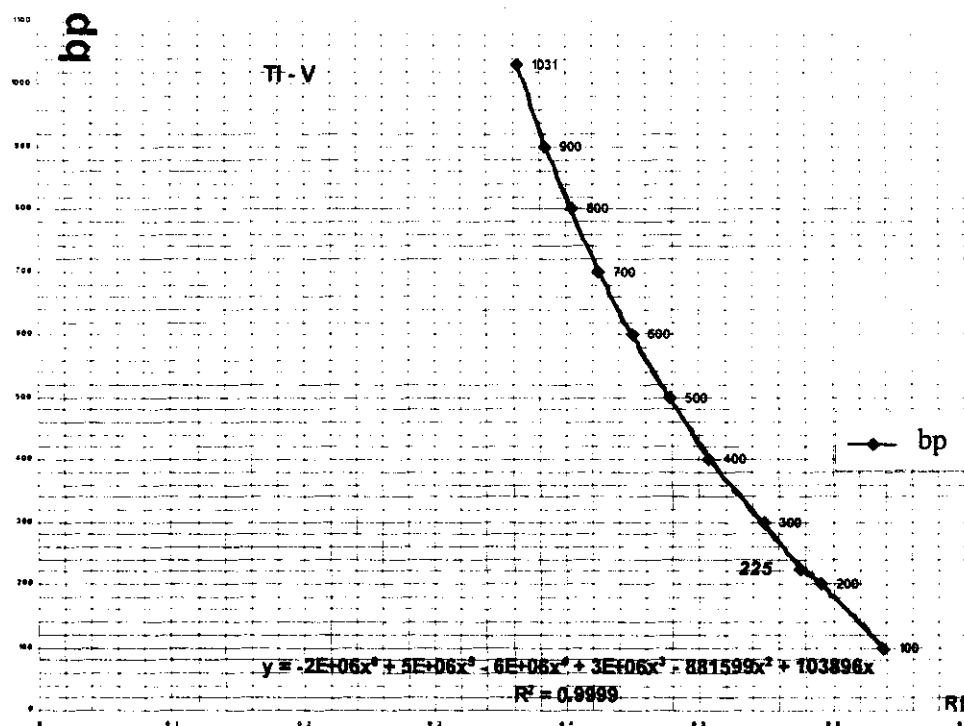
được dùng làm khuôn. Do đó, việc cần thiết là phải xác định được nồng độ thích hợp của các oligo trong phản ứng tổng hợp nhân tạo đoạn ADN có kích thước nằm giữa mỗi 1 và mỗi 4. Chúng tôi thực hiện các phản ứng PCR thăm dò nồng độ 4 mỗi trong khoảng từ 50ng đến 300ng/ mỗi. Kết quả chúng tôi xác định được nồng độ 250ng cho phép nhân tổng hợp được đoạn ADN có kích thước khoảng hơn 200bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR 1 được trình bày trên hình 5.

Kết quả trên hình 5 cho thấy sản phẩm PCR2 và PCR3 chỉ có một băng ADN rất sáng và rõ nét tương ứng với kích thước xấp xỉ 230bp. Kích thước này phù hợp với kích thước của gen CMTI-V (207bp) cộng với 6bp của mã mở đầu và mã kết thúc và 18bp trình tự nhận biết của enzym giới hạn thiết kế ở hai đầu đoạn ADN. Như vậy, các oligo thiết kế là đặc hiệu, cho phép tổng hợp và nhân lên đúng đoạn gen mong muốn.

Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR tổng hợp nhân tạo gen mã hoá cho CMTI-V qua màng Recochip:

Sản phẩm PCR tổng hợp nhân tạo gen mã cho CMTI-V được thôi qua màng Recochip (Takara, Nhật) vì chúng có kích thước nhỏ khoảng 230bp nên khó tinh sạch bằng phương pháp thôi gel thông thường. ADN sau đó được rửa lại bằng CH_3COOH : EtOH 100% như đã nêu, rồi hoà tan trở lại trong nước. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR được mô tả trong hình 6a và 6b.

Kết quả cho thấy chỉ có duy nhất một băng ADN sắc nét, tương ứng với kích thước 230bp so với ADN marker chứng tỏ đã tinh sạch được sản phẩm PCR, đủ tiêu chuẩn dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 6b. Sản phẩm PCR của gen CMII-V
được phân tích trên máy Scan Sharp JX 330

3.1.2.2. Phân lập gen mã hoá MCoTI-II (gen TI-II) từ ADN tổng số của gấc

Gen MCoTI-II trong ADN tổng số của gấc được nhân lên bằng kỹ thuật PCR. Để thực hiện điều này, sử dụng ADN tổng số đã tinh sạch làm khuôn trong phản ứng PCR. Cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự gen MCoTI-II gắn thêm 2 trình tự nhận biết của 2 enzym giới hạn. ở đầu 5' của mỗi xuôi gắn trung tâm nhận biết của enzym giới hạn *NdeI* (CA↓TATG) có mã khởi đầu Met (ATG), đầu 5' của mỗi ngược gắn trung tâm nhận biết của enzym giới hạn *XhoI* (C↓TCGAG) có mã dừng tổng hợp. Trình tự nucleotit của cặp mồi như sau:

Mỗi xuôi (forward primer) có chứa trung tâm nhận biết của *NdeI*:

5' GAATTCATATGAGCGGCAGCGATGGCGGCGTGTGCCCCGA 3'

Mỗi ngược (reverse primer) có chứa trung tâm nhận biết của *XhoI*:

5' CGGCTCGAGTTAGCCGCAATAGCCGTTGCCGCCGCAAAT 3'

Gen MCoTI-II trong genom của gấc được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với các điều kiện đã ghi trên sơ đồ 5. Theo tính toán lý thuyết sẽ nhận được sản phẩm phản ứng có kích thước hơn 110bp. Kết quả điện di trên gel agaroz 2% cho thấy sản phẩm thu được có 1 băng với kích thước khoảng 110 bp (hình 7).

* Các bước tiến hành phân lập gen mã hoá MCoTI-II từ ADN tổng số của gác cụ thể như sau:

1. ADN tổng số của gác có độ sạch = 1,86, nồng độ = 1000ng/μl được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR (25μl) tổng hợp gen MCoTI-II.
2. Hai môi đặc hiệu cho MCoTI-II (xuôi và ngược), nồng độ 150ng thích hợp nhất cho mỗi môi, dNTPs nồng độ 200μM, 400ng ADN tổng số của gác (làm khuôn), Taq 0.2 IU. Cụ thể là:

0,4μl ADN tổng số	(1000ng/μl)
0,5μl dNTPs	(10mM)
1μl mỗi xuôi	(150ng/μl)
1μl mỗi ngược	(150ng/μl)
0,25μl Taq	(2IU/μl)
2,5μl đệm cho Taq	(10X)
19,26μl nước MilliQ khử trùng	

= 25μl cho 1 phản ứng PCR.

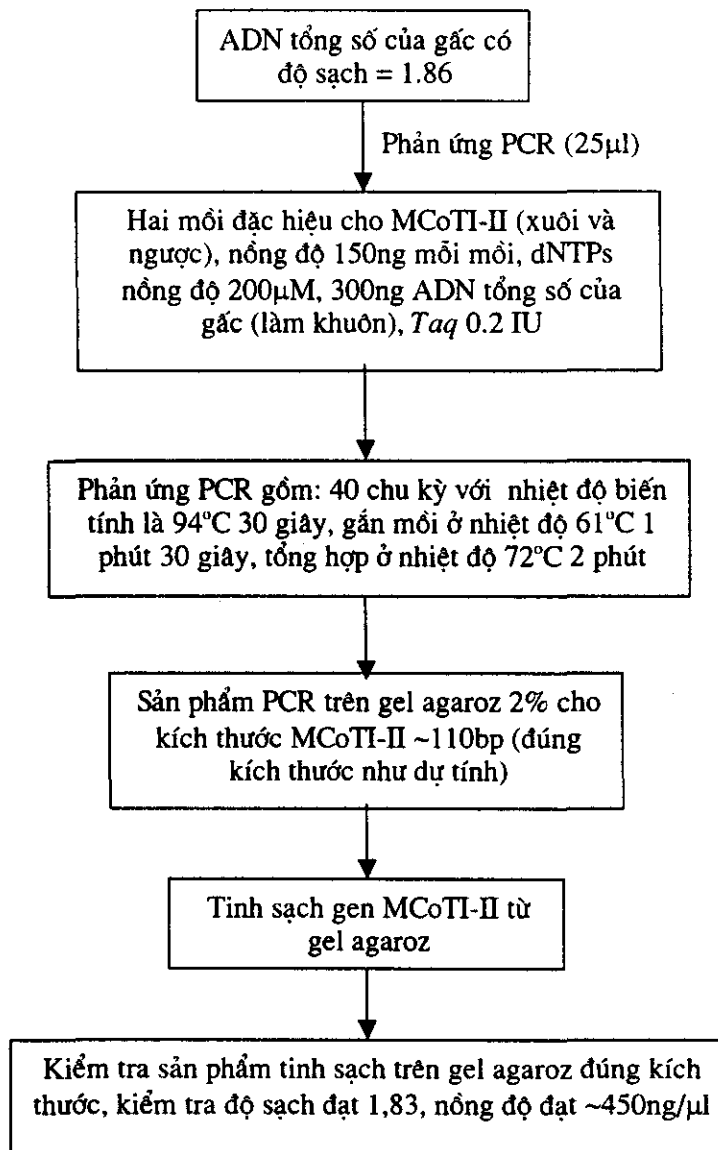
3. Phản ứng PCR gồm:

	94°C 3 phút
40 chu kỳ {	94°C 30 giây
	61°C 1 phút 30 giây
	72°C 2 phút
	72°C 8 phút
	4°C

4. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agaroz 2% và gel poliacrilamit 5% cho kích thước MCoTI-II ~110bp (đúng kích thước như dự tính).
5. Tinh sạch gen MCoTI-II từ gel agaroz như sau:
 - + Điện di lượng lớn sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% song song với thang chuẩn ADN, cắt lấy băng ADN đúng kích thước MCoTI-II theo thang chuẩn, cho vào ống eppendorf 2ml sạch.
 - + Cho vào ống trên khoảng 1 thể tích đệm gồm: 4M GITC (Guanidin thiocyanat), ủ ở 65°C cho tới khi agaroz tan hoàn toàn. Thêm vào bằng 1 thể tích cồn 100%, trộn nhẹ bằng pipet.

- + Cho toàn bộ hỗn dịch có chứa ADN ở trên qua cột có 4 lớp màng GF/D bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.
- + Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 0,5ml, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút, nhiệt độ phòng.
- + Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống mới.
- + Tách ADN bằng 100µl nước MilliQ, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút.
- + Kiểm tra độ sạch của ADN trên gel agaroz 2% cho thấy chỉ có 1 băng ADN với kích thước khoảng 110bp. Đo độ hấp phụ ở các bước sóng 260nm và 280nm cho thấy tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,83, nồng độ đạt khoảng 450ng/µl đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

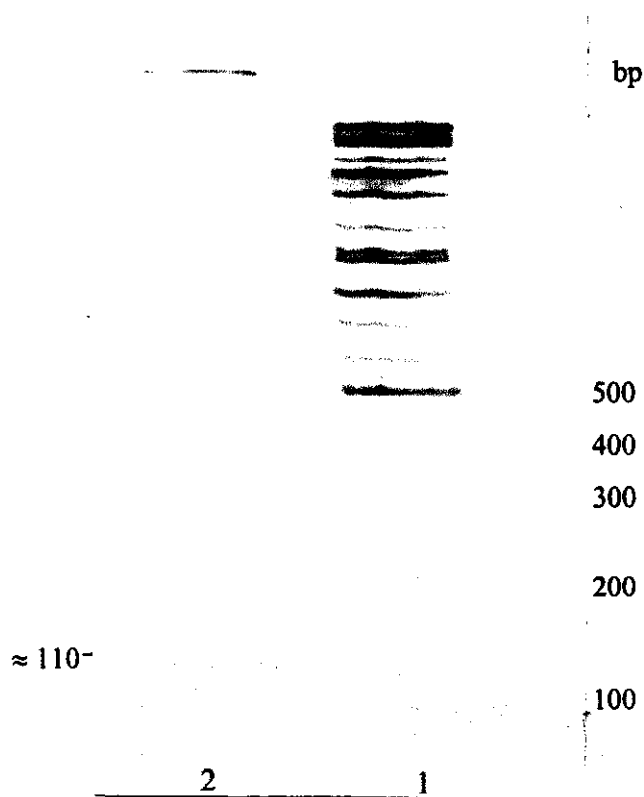
Sơ đồ 5: Phân lập gen MCoTI-II từ ADN tổng số của gấc



Chú thích : Các điều kiện PCR ghi trên sơ đồ 5 là kết quả thăm dò nhiều điều kiện khác nhau:

1. Nồng độ mỗi: 50ng, 75ng, 100ng, 125ng, **150ng**, 200ng, 300ng.
2. Nồng độ dNTPs: 50µM, 100µM, 150µM, **200µM**, 300µM.
3. Nồng độ khuôn: 50ng, 100ng, 150ng, 200ng, **300ng**, 400ng, 500ng, 600ng, 700ng.
4. Nồng độ Taq: **0.2IU**, 0.25IU, 0.3IU.
5. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian biến tính khuôn : 92°C, 93°C, 94°C và 95°C; dài thời gian biến tính khuôn từ 30 giây đến 5 phút, mỗi phản ứng chênh nhau 30 giây. Tìm thấy thời gian đủ để biến tính khuôn đầu tiên là **3 phút**, nhiệt độ là **94°C**. Tiếp đó vào chu kỳ là **94°C trong 30 giây**.

6. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian gắn mỗi: từ 45⁰C đến 64⁰C liên tục mỗi phản ứng chênh nhau 0.5⁰C (máy PCR: *Mastercycler Personal Gradient - Eppendorf*); dải thời gian gắn mỗi từ 30 giây đến 2 phút, mỗi phản ứng chênh nhau 15 giây. Tìm thấy thời gian đủ là **1 phút 30 giây**, nhiệt độ thích hợp là **61⁰C**.
7. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian tổng hợp: từ 70⁰C, 71⁰C, 72⁰C, 73⁰C và 74⁰C; dải thời gian tổng hợp từ 30 giây đến 3 phút, mỗi phản ứng chênh nhau 30 giây. Tìm thấy thời gian đủ để tổng hợp trong chu kỳ là **2 phút**, nhiệt độ là **72⁰C**.
8. Số chu kỳ phản ứng khác nhau: 15, 20, 25, 30, 35, **40**, 45.



Hình 7. Phổ điện di sản phẩm PCR gen MCoTI-II trên gel poliacrilamit 5%
 1. Thang ADN chuẩn 100bp # SMO 0321/2/3 (100-3000)
 2. Sản phẩm PCR của gen MCoTI-II

3.1.2.3. Phân lập gen mã hoá α -AI từ ADN tổng số của đậu cô ve

Cặp mồi đặc hiệu được thiết kế lại trên trình tự đoạn gen mã hóa họ protein kìm hãm α - amilaz trong đậu *Phaseolus vulgaris*. Trên cặp mồi 5' và 3' chúng tôi gắn thêm điểm cắt của *Nco* I (CCATGG) và *Bam* HI (GGATCC) để tạo mã khởi đầu Met (ATG) và mã dừng trên trình tự gen mã hóa chất ức chế α - amilaz.

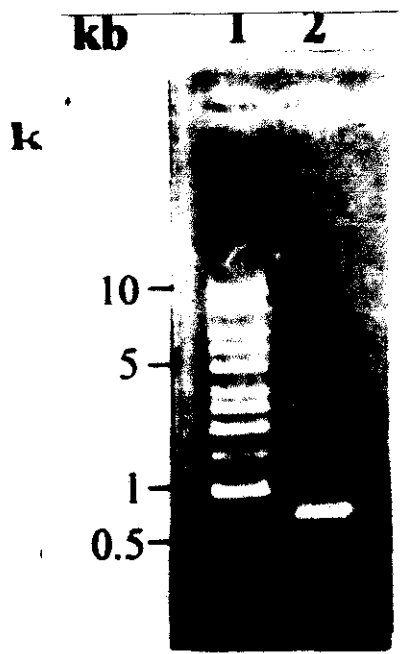
Cặp mồi có trình tự như sau :

Mồi AIF : 5' - GGC CAT GGC TTC CTC CAA CTT AC - 3'

Mồi AIR : 5' - GCG GAT CCT AGA GGA TTT TGT TG - 3'

Chu trình nhiệt của PCR là : 95⁰C: 3 phút (95⁰C: 1 phút, 54⁰C: 1 phút , 72⁰C: 1 phút 20 giây) x 30 chu kỳ : 72⁰C: 10 phút và kết thúc ở 4⁰C (ngay hoặc để qua đêm).

Sau khi tiến hành chạy PCR, sản phẩm được kiểm tra trên gel agaroz 1%, kết quả nhận được trên hình 8.



Hình 8: Phổ điện di sản phẩm PCR của đậu cô ve trắng

1. ADN λ / *Bam* HI/ *Eco*RI

2. Sản phẩm PCR

Qua kết quả phổ điện di ta thấy rằng sản phẩm PCR của đậu cô ve trắng được nhân lên khá đặc hiệu, cho một băng với kích thước phân tử khoảng 0,7kb so với Marker. Kết quả này phù hợp với các tính toán lý thuyết và kết quả nghiên cứu của Chrispeel và cộng sự [14].

3.1.2.4. Phân lập gen mã hoá RIP từ ADN tổng số của cây mướp đắng

Để nhân đoạn gen mã hoá RIP từ ADN tổng số của cây mướp đắng (*Momordica charantia*) bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi MAP65F/ MAP859R có chứa các trình tự nhận biết của 2 enzym giới hạn *Nco*I và *Bam*HI để đưa vào vectơ biểu hiện:

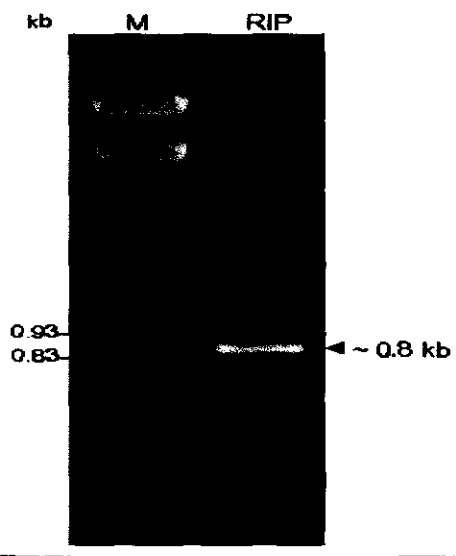
MAP65F: 5' – CCTACTGCACCATGGATGTTAACTTCG – 3'
*Nco*I

MAP859R: 5' – GGATTATTATGGATCCTTCAATTCACAACAG – 3'
*Bam*HI

Chu trình nhiệt của PCR là: 94⁰C: 1 phút; [94⁰C: 1 phút; 54⁰C: 1 phút; 72⁰C: 1 phút 20 giây] lặp lại 32 chu kỳ; 72⁰C: 10 phút và kết thúc ở 4⁰C.

Tổng thể tích là 25 μ l gồm: 500 ng ADN genom; 10 pM mỗi môi; 0,625 unit Taq ADN polymeraz; $MgCl_2$ 2,4 mM; dNTP 1 mM và đệm tương ứng.

Sử dụng cặp môi đã thiết kế để tiến hành PCR với phương pháp trên đã thu được sản phẩm PCR đặc hiệu với kích thước khoảng 0,8 kb. Kích thước của sản phẩm PCR đúng với tính toán lý thuyết và tương đương với kích thước của cDNA gen MAP30 (*Momordica anti - HIV protein of 30 kD*), chứng tỏ đoạn gen này không có intron. Kết quả được trình bày trên hình 9.



Hình 9. Phổ điện di sản phẩm PCR từ ADN genom cây mướp đắng

M: Thang chuẩn ADN λ /*EcoRI*/ *Bam*HI

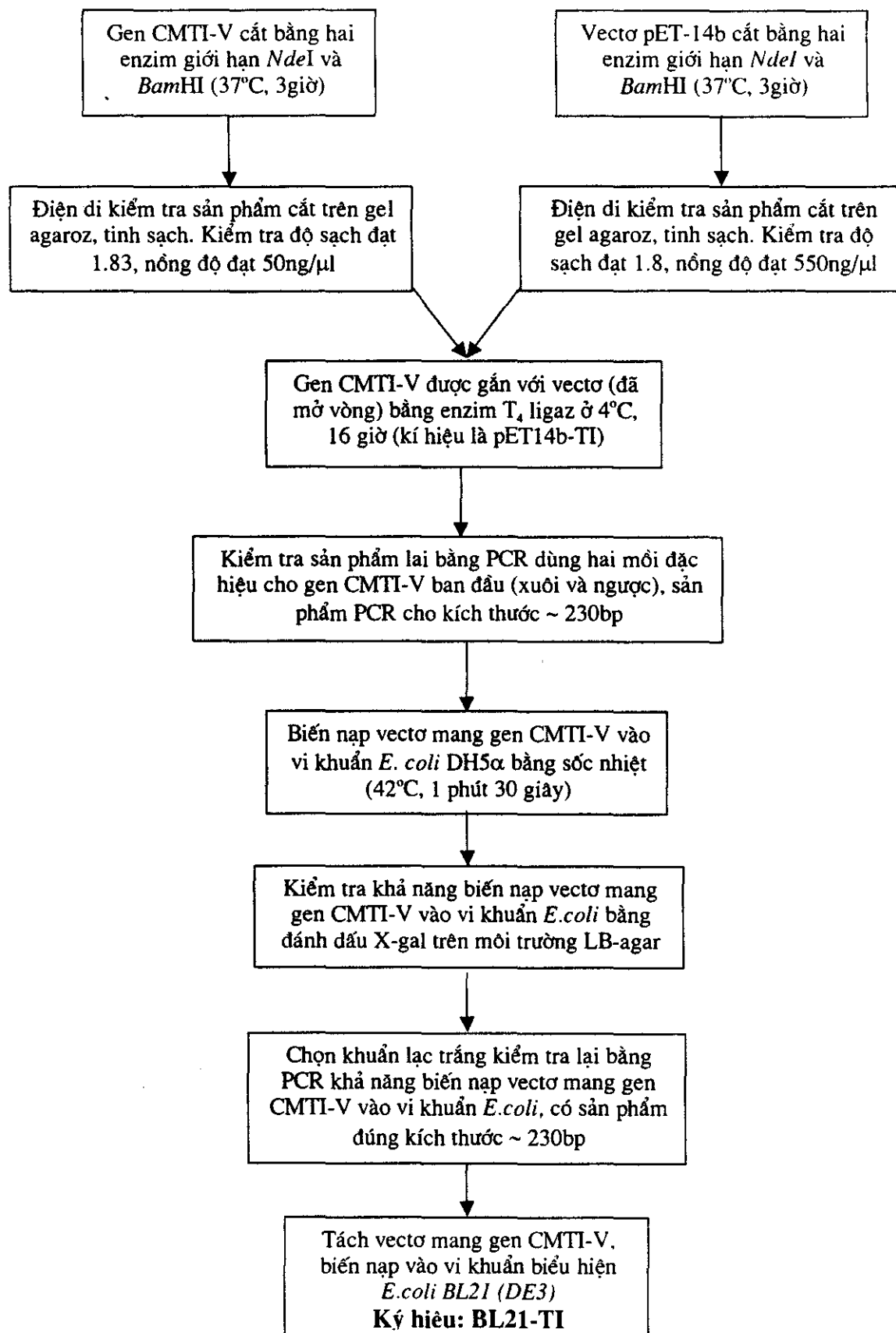
RIP: Sản phẩm PCR gen mã hoá RIP

3.1.3 Thiết kế vector tái tổ hợp

3.1.3.1. Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen CMTI-V

Để thu được đủ số lượng gen CMTI-V dùng trong biến nạp, sản phẩm PCR nhân bản từ ADN tổng số của bí đỏ được cắt bằng hai enzym giới hạn *Nde*I và *Bam*HI, điện di trên gel agaroz 2% để tách và tinh sạch gen CMTI-V. Vector pET 14b cũng được cắt với 2 enzym trên. Quá trình lai gen vào vector được thực hiện nhờ T_4 ligaz theo tỉ lệ (1:3), ủ ở 4°C qua đêm. Sản phẩm sau khi lai được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB-agar có ampicilin, X-gal và IPTG, các khuẩn lạc màu trắng (khuẩn lạc dương tính) là các khuẩn lạc mang gen tái tổ hợp CMTI-V, các khuẩn lạc màu xanh (khuẩn lạc âm tính) là các khuẩn lạc không mang gen tái tổ hợp CMTI-V. Quá trình lai và biến nạp được trình bày trên sơ đồ 6.

Sơ đồ 6: Lai và biến nạp gen CMTI-V vào vectơ và vi khuẩn *E. coli*



* Các bước tiến hành lai và biến nạp gen CMTI-V vào vector và vi khuẩn *E.coli* tiến hành như sau:

1. Gen CMTI-V thu được từ sản phẩm PCR ở sơ đồ 4 được cắt bằng 2 enzym giới hạn ở hai đầu tương ứng, dùng làm insert cho phản ứng lai với vector thực hiện như sau:

5 μ l sản phẩm PCR (khoảng 5 μ g ADN)

1 μ l enzym NdeI (10U/ μ l)

1 μ l BamH I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

11 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 3 giờ.

2. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch đoạn gen CMTI-V qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,83, nồng độ là 260ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với vector tương thích.
3. Song song với cắt và tinh sạch đoạn gen CMTI-V (Insert), vector tương thích (pET-14b) cũng được mở vòng bằng chính 2 enzym giới hạn tương ứng như với đoạn gen CMTI-V (NdeI và BamH I). Tiến hành như sau:

1 μ l (khoảng 6 μ g ADN plasmit)

1 μ l enzym NdeI (10U/ μ l)

1 μ l BamH I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

15 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 3 giờ

4. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm vector (đã mở đoạn tương ứng cho insert) được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,81 nồng độ là 280ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với insert (đoạn gen CMTI-V).
5. Lai đoạn gen CMTI-V với vector pET-14b đã mở vòng bằng enzym T₄ ligaz, tiến hành như sau:

4 μ l insert (khoảng 1 μ g)
 1 μ l vectơ (khoảng 280ng)
 1 μ l đệm cho T₄ ligaz (10X)
 0,5 μ l enzym T₄ ligaz (20U/ μ l)
 3,5 μ l nước MilliQ

 = 10 μ l cho phản ứng, ủ ở 4°C 16 giờ.

6. Kiểm tra sản phẩm lai trên gel agaroz 1%.
7. Kiểm tra sản phẩm lai bằng PCR với mỗi tương ứng của gen CMTI-V, phản ứng gồm:

0,5 μ l ADN tổng số	(560ng/ μ l)
0,5 μ l dNTPs	(10mM)
1 μ l môi xuôi	(150ng/ μ l)
1 μ l môi ngược	(150ng/ μ l)
0,25 μ l Taq	(2IU/ μ l)
2,5 μ l đệm cho Taq	(10X)
19,25 μ l nước MilliQ khử trùng	

 = 25 μ l cho 1 phản ứng PCR.

8. Phản ứng PCR gồm:

	94°C 3 phút
35 chu kỳ {	94°C 30 giây
	55°C 1 phút 30 giây
	72°C 2 phút
	72°C 8 phút
	4°C

9. Sản phẩm lai đoạn gen CMTI-V vào vectơ pET-14b thành công (ký hiệu pET 14b-TI) ở trên được biến nạp vào vi khuẩn DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút 30 giây, gặt trên môi trường LB-agar có ampicilin 200mg/ml + 1mM IPTG + 1 μ g/ml X-gal, ủ ở 37°C khoảng 16 giờ để chọn lọc các khuẩn lạc mang gen CMTI-V (khuẩn lạc trắng).

10. Kiểm tra các khuẩn lạc trắng bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho gen CMTI-V, sản phẩm điện di trên gel agaroz 2% cho kích thước đúng khoảng 230bp. Phản ứng gồm:

0,5µl (chấm 1 khuẩn lạc trắng bằng tăm khử trùng, hoà vào 20µl nước MilliQ khử trùng)	
0,5µl dNTPs	(10mM)
1µl mỗi xuôi	(150ng/µl)
1µl mỗi ngược	(150ng/µl)
0,25µl Taq	(2IU/µl)
2,5µl đệm cho Taq	(10X)
19,25µl nước MilliQ khử trùng	

= 25µl cho 1 phản ứng PCR.

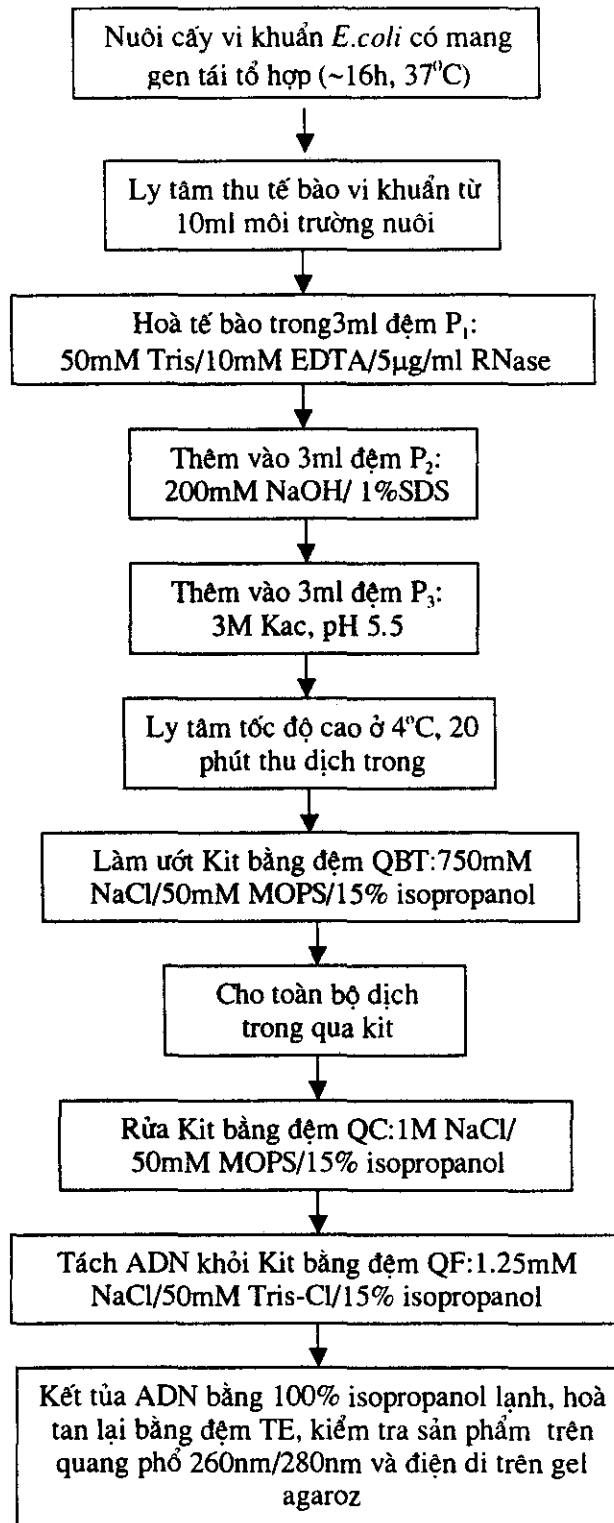
11. Phản ứng PCR gồm:

	94°C 3 phút
35 chu kỳ	94°C 30 giây
	55°C 1 phút 30 giây
	72°C 2 phút
	72°C 8 phút
	4°C

12. Nuôi biểu hiện khuẩn lạc trắng đã được chọn lọc trong môi trường LB dịch thể có 200µg/ml ampicilin ở 37°C qua đêm (khoảng 16 giờ), thu tế bào, tách plasmid để tiến hành giải trình tự gen CMTI-V và dùng để biến nạp vào vi khuẩn biểu hiện *E.coli* BL21.

Để khẳng định chắc chắn các khuẩn lạc trắng mang gen CMTI-V, tiến hành chọn các khuẩn lạc trắng riêng rẽ nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có ampicilin 200µg/ml khoảng 16 giờ, 37°C, thu tế bào, tách ADN vectơ tái tổ hợp theo sơ đồ 7. Sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp có độ sạch đạt OD_{260/280} là 1.91, nồng độ khoảng 1µg/µl đủ tiêu chuẩn để đọc trình tự gen đích CMTI-V và dùng trong các thí nghiệm khác.

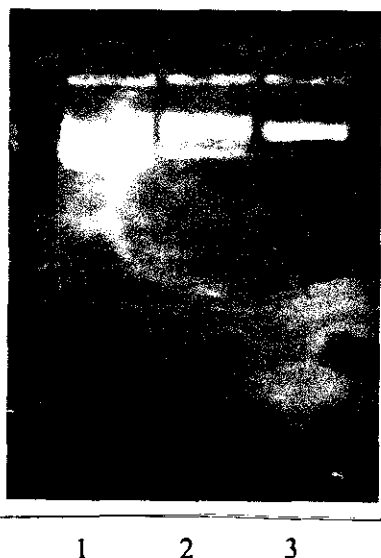
Sơ đồ 7: Tách ADN từ pET14b-TI



** Các bước tách ADN plasmid mang gen CMTI-V bằng Qiagen Kit ở sơ đồ 7 được tiến hành như sau:*

1. Nuôi cấy chủng DH5 α mang gen CMTI-V trong môi trường LB dịch thể có 200 μ g/ml Ampicilin ở 37°C qua đêm (khoảng 16 giờ). Ly tâm thu tế bào từ 10ml môi trường nuôi cấy bằng ống falcol 15ml sạch đã khử trùng ở 4°C, 5000 vòng/phút trong 5 phút.
2. Hoà tan tế bào bằng 3ml đệm P₁ (50mM tris/10mM EDTA/5 μ g/ml RNase) đã làm lạnh ở 4°C.
3. Thêm vào 3ml đệm P₂ (200mM NaOH/ 1%SDS) ở nhiệt độ phòng.
4. Thêm vào 3ml đệm P₃ (3M Kac, pH 5,5 bằng glacial acid acetic) đã làm lạnh ở 4°C. Lắc nhẹ nhàng (không dùng pipet), ly tâm 20.000 vòng phút, 20 phút ở 4°C, thu dịch trong.
5. Làm ướt Kit bằng 0,5ml đệm QBT (750mM NaCl, 50mM MOPS (3-(N-Morpholino) propanosulphonic acid) pH7,0 , 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100).
6. Đặt Kit vào ống falcol 15ml mới, cho toàn bộ dịch trong thu được ở bước (4) qua Kit.
7. Rửa Kit 2 lần, mỗi lần bằng 2 ml đệm QC (1M NaCl, 50mM MOPS pH 7.0 , 15% Isopropanol). Rửa lại Kit bằng 2ml cồn 75%, chuyển cột sang ống mới.
8. Tách ADN plasmid khỏi Kit bằng 0,8ml đệm QF (1,25mM NaCl, 50mM Tris pH 8,5 , 15% isopropanol), ly tâm 500 vòng/phút, trong 1 phút. Thu lấy dịch ADN plasmid sang ống eppendorf 1,5ml sạch, kết tủa ADN plasmid bằng cách thêm vào 560 μ l Isopropanol 100% ở 4°C, trộn nhẹ. Ly tâm 16.000 vòng/phút, 4°C trong 30 phút, bỏ hết dịch trong, để khô ống trong tủ hút, hoà tan ADN plasmid bằng 50 μ l đệm TE (1mM EDTA, 10mM Tris pH 8,0).
9. Kiểm tra nồng độ của ADN plasmid trên gel agaroz 0,8%.
10. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN bằng máy quang phổ. đo độ hấp phụ ở bước sóng OD_{260nm}/OD_{280nm} có tỉ lệ là 1,84, đạt tiêu chuẩn dùng để giải trình tự gen và biến nạp vào vi khuẩn biểu hiện.

Sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp tách và tinh sạch theo sơ đồ 7 so sánh với ADN vectơ pET14b (không mang gen tái tổ hợp) được thể hiện trên hình 10:

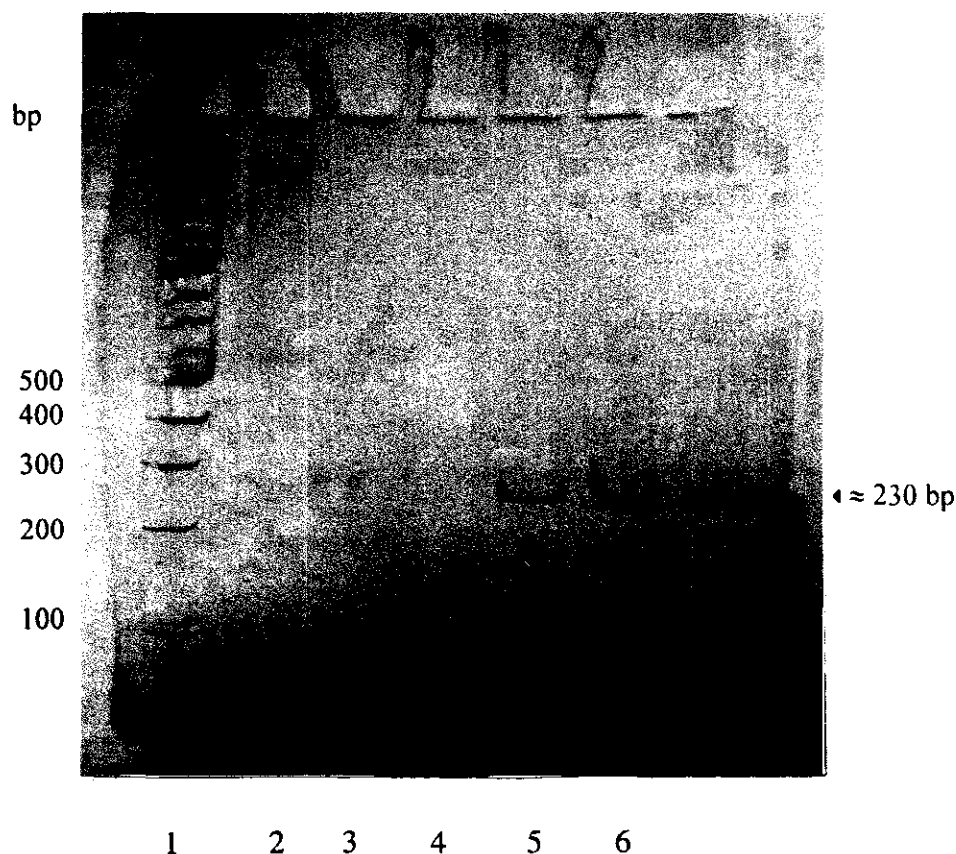


Hình 10: Phổ điện di sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp trên gel agaroz

1. Sản phẩm ADN vectơ pET14b không mang gen CMTI-V tái tổ hợp (1 μ l)
2. Sản phẩm ADN vectơ (pET-TI) mang gen CMTI-V tái tổ hợp (1 μ l)
3. Sản phẩm ADN vectơ (pET-TI) mang gen CMTI-V tái tổ hợp cắt bằng enzym giới hạn *Bam*H I/*Nde*I (1 μ l)

Kiểm tra lại sản phẩm biến nạp bằng PCR

Vectơ tái tổ hợp mang gen TI-V được dùng làm khuôn để kiểm tra lại kích thước gen CMTI -V sau khi biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH 5 α bằng PCR với cặp mồi xuôi, ngược đặc hiệu của gen CMTI-V. Kết quả trên hình 11 cho thấy sản phẩm PCR được nhân bản từ ADN vectơ tái tổ hợp của khuẩn lạc trắng có 1 băng ADN sắc nét có kích thước khoảng 230bp, tương ứng với sản phẩm PCR khi sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn.



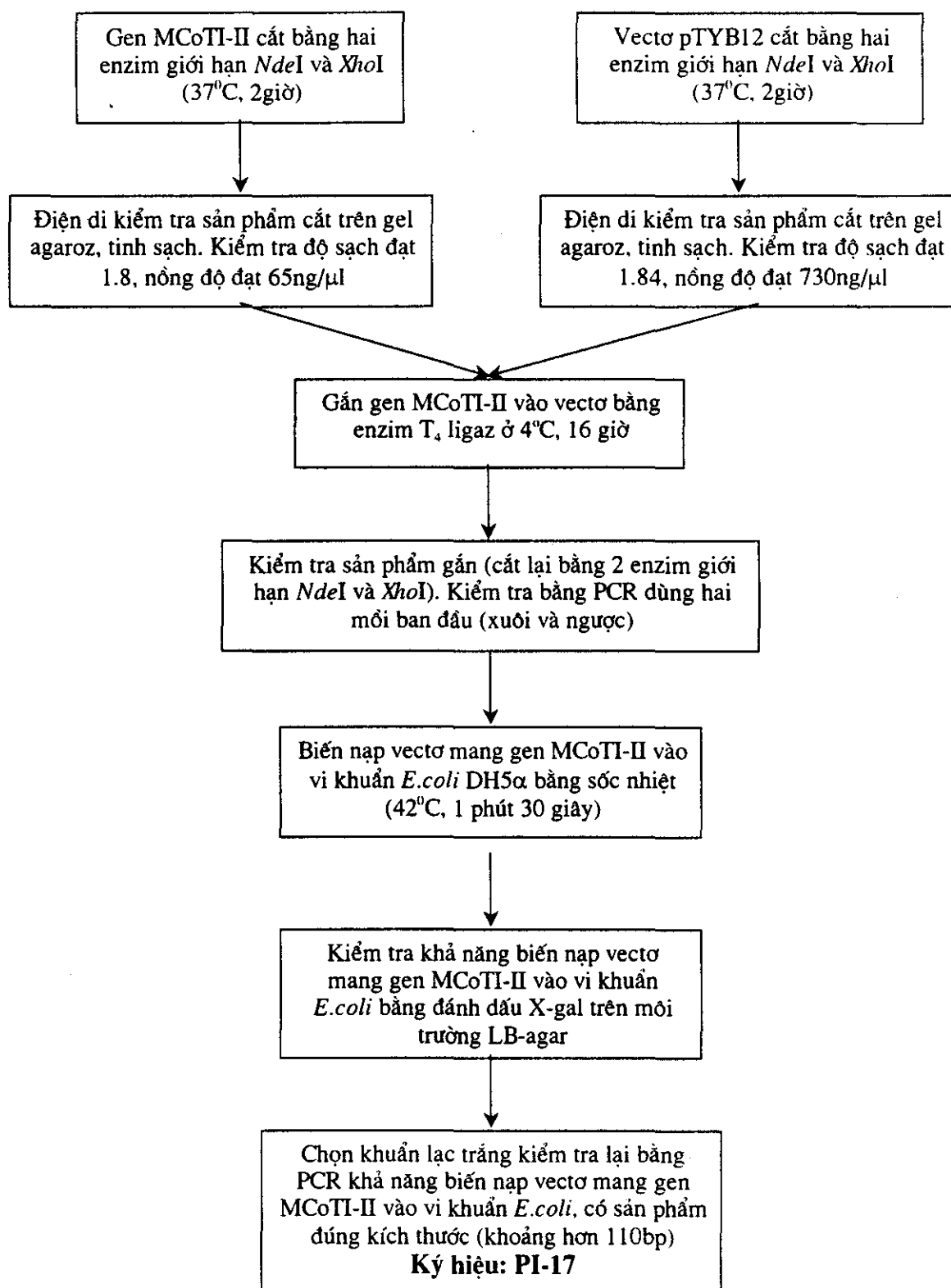
Hình 11: Phổ điện di sản phẩm PCR ADN của pE14b-TI tách từ các khuẩn lạc dương tính trên PAGE 5%.

- 1- Thang chuẩn ADN Mix (100-10000bp)
- 2. 3. 4- Sản phẩm PCR sử dụng ADN vectơ tái tổ hợp từ khuẩn lạc xanh làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho gen CMTI-V
- 5 - Sản phẩm PCR sử dụng ADN vectơ tái tổ hợp từ khuẩn lạc trắng làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho gen CMTI-V
- 6 - Sản phẩm PCR sử dụng ADN tổng số của bí đỏ làm khuôn

3.1.3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen MCoTI-II

Nhân gen MCoTI-II bằng PCR, cắt với 2 enzym giới hạn *NdeI* và *XhoI*, vectơ pTYB12 cũng đã được cắt với 2 enzym *NdeI* và *XhoI*. Quá trình lai gen vào vectơ được thực hiện nhờ T_4 ligaz theo tỉ lệ (1:3), ủ ở 4°C , 16 giờ. Sản phẩm sau khi lai được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB-agar có ampicilin, X-gal và IPTG, các khuẩn lạc màu trắng (khuẩn lạc dương tính) là các khuẩn lạc mang gen tái tổ hợp MCoTI-II, các khuẩn lạc màu xanh (khuẩn lạc âm tính) là các khuẩn lạc không mang gen tái tổ hợp MCoTI-II. Quá trình lai và biến nạp được trình bày ở sơ đồ 8.

Sơ đồ 8: Biến nạp gen MCoTI-II vào vectơ và vi khuẩn *E. coli*



* Các bước tiến hành như sau:

1. Gen MCoTI-II thu được từ sản phẩm PCR được cắt bằng 2 enzym giới hạn ở hai đầu tương ứng, dùng làm insert cho phản ứng lai với vectơ thực hiện như sau:

5 μ l sản phẩm PCR (khoảng 5 μ g ADN)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l *Xho* I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

11 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 2 giờ.

2. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch đoạn gen MCoTI-II qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,8, nồng độ là 65ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với vectơ tương thích.
3. Song song với cắt và tinh sạch đoạn gen MCoTI-II (insert), vectơ tương thích (ptyb12) cũng được mở vòng bằng chính 2 enzym giới hạn tương ứng như với đoạn gen MCoTI-II (*Nde*I và *Xho* I). Tiến hành như sau:

1 μ l (khoảng 5 μ g ADN plasmit)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l *Xho*I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

15 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 2 giờ

4. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm vectơ (đã mở đoạn tương ứng cho insert) được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,84 nồng độ là 730ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với insert (đoạn gen MCoTI-II).

5. Lai đoạn gen MCoTI-II với vectơ pTYB12 đã mở vòng bằng enzym T₄ ligaz. tiến hành như sau:

6,5μl insert (khoảng 420μg)
 0,4μl vectơ (khoảng 300ng)
 1μl đệm cho T₄ ligaz (10X)
 0,5μl enzym T₄ ligaz (20U/μl)
 1,6μl nước MilliQ

= 10μl cho phản ứng, ủ ở 4°C 16 giờ.

6. Kiểm tra sản phẩm lai trên gel agaroz 1%.
7. Kiểm tra sản phẩm lai bằng PCR với môi tương ứng của gen MCoTI-II, phản ứng gồm:

0,5μl sản phẩm lai	(khoảng 300ng/μl)
0,5μl dNTPs	(10mM)
1μl môi xuôi	(150ng/μl)
1μl môi ngược	(150ng/μl)
0,25μl Taq	(2IU/μl)
2,5μl đệm cho Taq	(10X)
19,25μl nước MilliQ khử trùng	

 = 25μl cho 1 phản ứng PCR.

8. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút

40 chu kỳ { 94°C 30 giây
 63°C 1 phút 30 giây
 72°C 2 phút

72°C 8 phút

4°C

9. Sản phẩm lai đoạn gen MCoTI-II vào vectơ pTYB12 thành công (ký hiệu PI-17) ở trên được biến nạp vào vi khuẩn DH5α theo phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút 30 giây, gọt trên môi trường LB-agar có ampicilin 200mg/ml + 1mM IPTG + 1μg/ml X-gal, ủ ở 37°C khoảng 16 giờ để chọn lọc các khuẩn lạc mang gen MCoTI-II (khuẩn lạc trắng).

10. Kiểm tra các khuẩn lạc trắng bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho gen MCoTI-II, sản phẩm điện di trên gel agaroz 2% cho kích thước đúng khoảng 110bp. Phản ứng gồm:

0,5 μ l (chấm 1 khuẩn lạc trắng bằng tăm khử trùng, hoà vào 20 μ l nước MilliQ khử trùng)
0,5 μ l dNTPs (10mM)
1 μ l mỗi xuôi (150ng/ μ l)
1 μ l mỗi ngược (150ng/ μ l)
0,25 μ l Taq (2IU/ μ l)
2,5 μ l đệm cho Taq (10X)
19,25 μ l nước MilliQ khử trùng

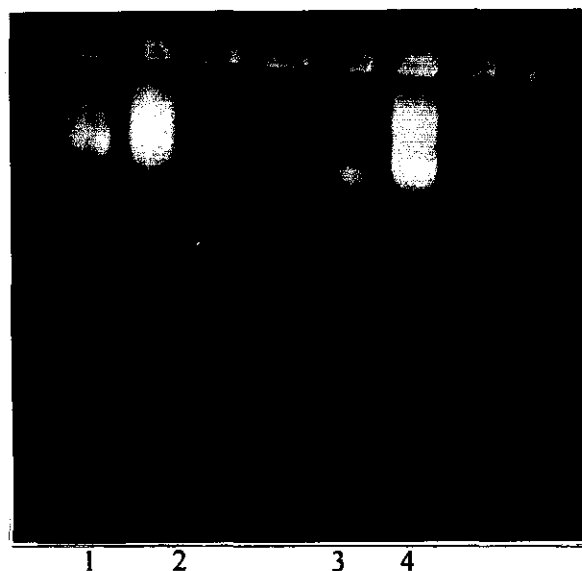
= 25 μ l cho 1 phản ứng PCR.

11. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút
40 chu kỳ { 94°C 30 giây
63°C 1 phút 30 giây
72°C 2 phút
72°C 8 phút
4°C

12. Nuôi biểu hiện khuẩn lạc trắng đã được chọn lọc trong môi trường LB dịch thể có 200 μ g/ml ampicilin ở 37°C qua đêm (khoảng 16 giờ), thu tế bào, tách plasmit để tiến hành giải trình tự gen MCoTI-II và dùng để biến nạp vào vi khuẩn biểu hiện *E.coli* BL21.

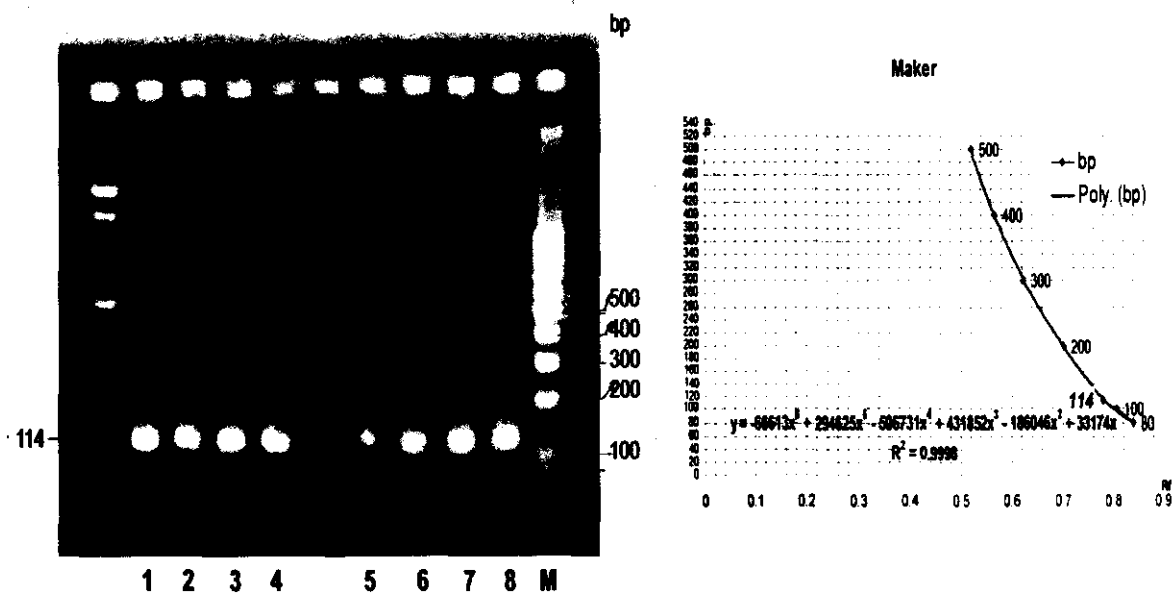
Để kiểm tra kết quả biến nạp, tiến hành chọn các khuẩn lạc trắng riêng rẽ nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có ampicilin 100 μ g/ml khoảng 16 giờ ở 15°C, thu tế bào, tách ADN vectơ tái tổ hợp theo Qiagen Kit được so sánh với ADN vectơ pTYB12 (không mang gen tái tổ hợp) trên hình 12. Sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp có nồng độ và độ sạch đạt OD₂₆₀/OD₂₈₀ là 1,91 khoảng 1 μ g/ μ l đủ tiêu chuẩn để đọc trình tự gen đích TI-II và dùng trong các thí nghiệm khác.



Hình 12: Phổ điện di sản phẩm ADN vectơ tái tổ hợp trên gel agaroz

1. Sản phẩm ADN vectơ pTYB12 mang gen MCoTI-II tái tổ hợp (1 μ l)
2. Sản phẩm ADN vectơ pTYB12 không mang gen MCoTI-II tái tổ hợp (1 μ l)
3. Sản phẩm ADN vectơ pTYB12 mang gen MCoTI-II tái tổ hợp cắt bằng *Nde*I và *Xho*I (1 μ l)
4. Sản phẩm ADN vectơ pTYB12 mang gen MCoTI-II tái tổ hợp cắt bằng *Nde*I

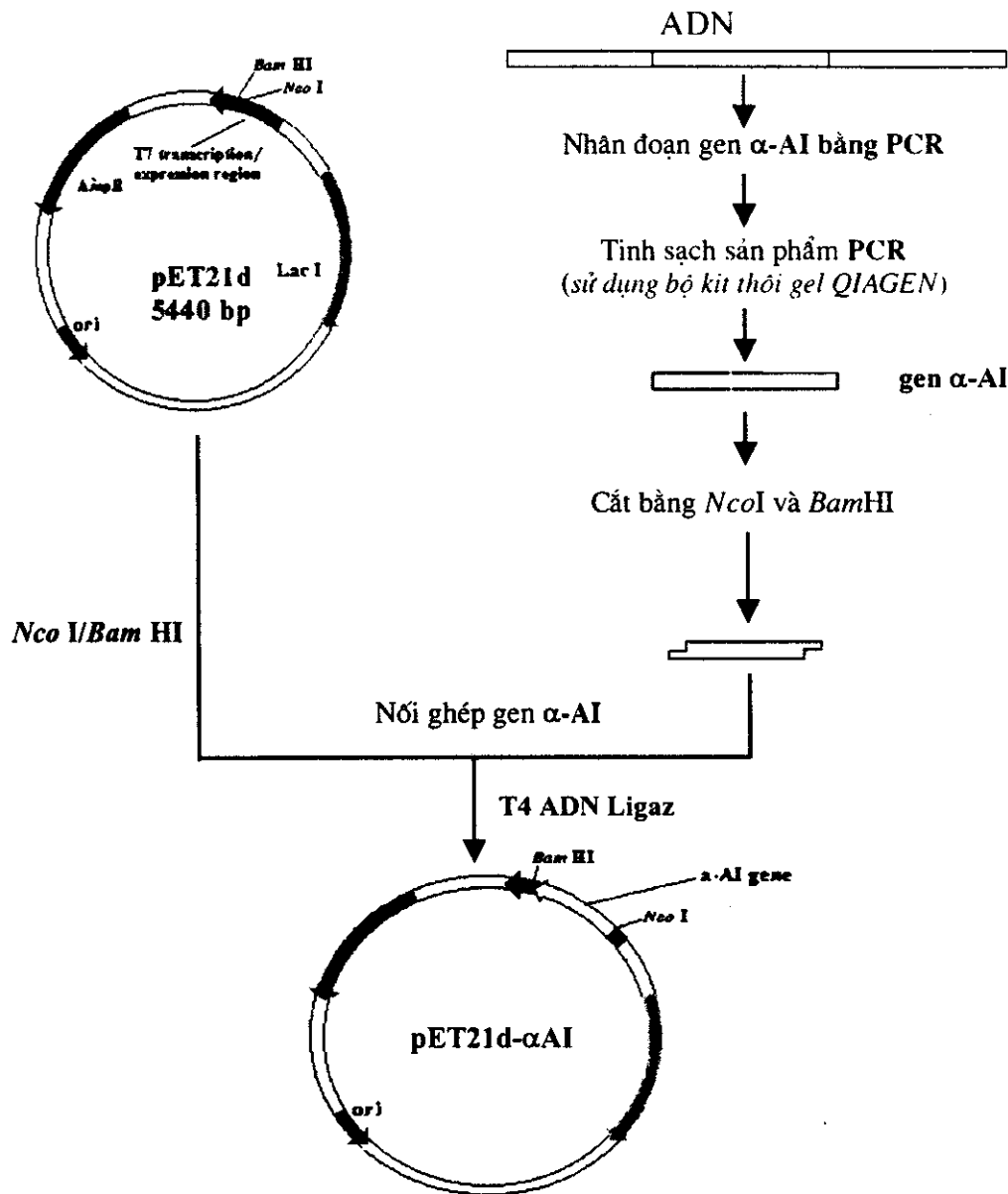
Chúng tôi cũng đã kiểm tra tiếp tục sản phẩm biến nạp gen TI-II vào vector pTYB12 bằng PCR. Sử dụng ADN vector tái tổ hợp mang gen TI-II làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu của gen TI-II. Kết quả trên hình 13 cho thấy sản phẩm PCR có 1 băng ADN sắc nét được nhân bản từ ADN vector tái tổ hợp của khuẩn lạc trắng có kích thước khoảng 114bp, tương ứng với sản phẩm PCR khi sử dụng ADN tổng số của gốc làm khuôn.



Hình 13. Điện di đồ các sản phẩm PCR của gen MCoTI-II trên gel agaroz

- M. Thang ADN chuẩn 100bp #SMO0241/2/3 (80→1031)
- 1 → 7. Sản phẩm PCR của gen MCoTI-II
- 8. Sản phẩm PCR sử dụng ADN genom của gốc làm khuôn

3.1.3.3. Thiết kế vector pET 21 d(+) mang gen α -AI



PLASMIT TÁI TỔ HỢP

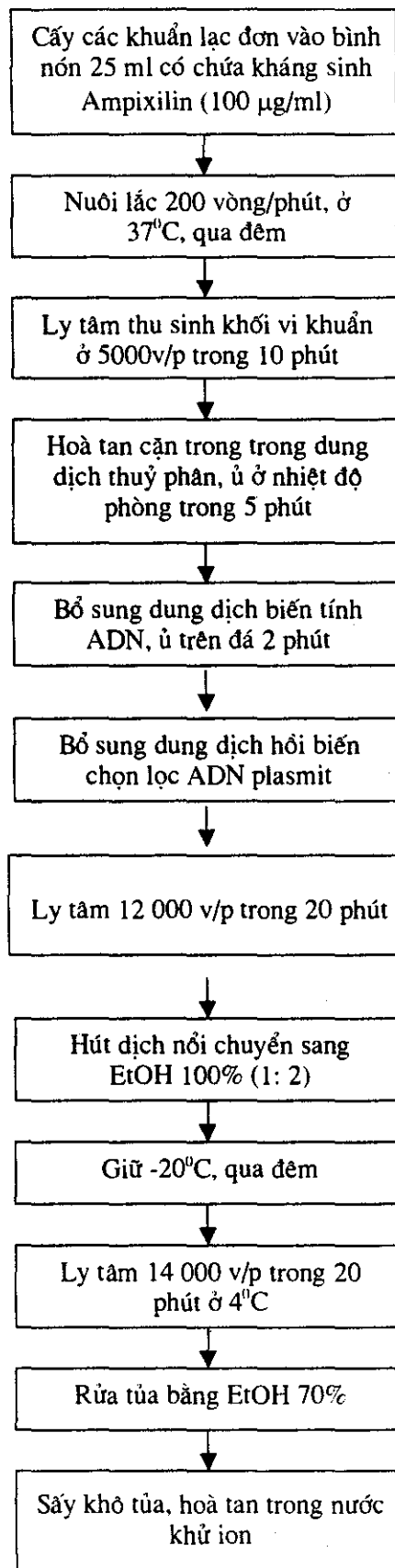
Hình 14: Sơ đồ thiết kế vector pET21d mang gen α -AI tái tổ hợp

* Các bước tiến hành như sau:

1. Từ ADN tổng số nhân đoạn gen α -AI bằng PCR với các điều kiện như đã mô tả ở phần phân lập gen.
2. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit thời gel QIAGEN
3. Cắt gen bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *BamHI*
4. Plasmid pET21d được mở vòng bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *BamHI*
5. Thực hiện phản ứng nối bằng T4 ADN ligaz: 3 μ l vector pET21d đã mở vòng + 5 μ l gen α -AI sau tinh sạch sản phẩm PCR + 0,6 μ l T₄ ADN ligaz + 1,2 μ l đệm T₄ ligaz x10 + 2,2 μ l nước cất. Hỗn hợp ủ qua đêm ở 12-16⁰C.

Sơ đồ 9: Nuôi cấy vi khuẩn mang plasmit tái tổ hợp, tách chiết ADN plasmit

Bluescrip d(+) mang gen tái tổ hợp (α -AI)



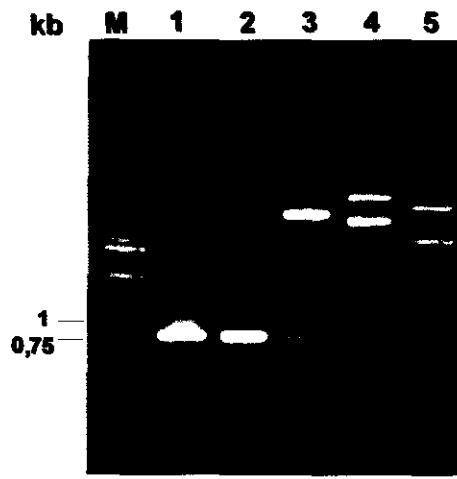
* Các bước cụ thể được tiến hành như sau:

1. Cấy các khuẩn lạc đơn vào bình nón 25 ml môi trường LB có chứa kháng sinh ampicilin (100 µg/ml)
2. Nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 37°C, qua đêm
3. Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn ở 5000vòng /phút trong 10 phút ở 4°C
4. Hoà tan cặn trong dung dịch thuỷ phân, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút
5. Bổ sung dung dịch biến tính ADN, ủ trên đá trong 2 phút
6. Ly tâm 12 000 vòng /phút trong 20 phút.
7. Hút dịch nổi, bổ sung EtOH 100% với tỷ lệ 1: 2 (v/v), giữ qua đêm ở -20°C
8. Ly tâm 14 000 vòng /phút trong 20 phút ở 4°C
9. Rửa tủa bằng EtOH 70%
10. Sấy khô tủa, hoà tan trong nước đã khử ion

3.1.3.4. Thiết kế vector pET21d(+) mang gen mã hoá RIP của mướp đắng

Sau khi nhận được sản phẩm PCR đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng gen mã hóa RIP trong vector biểu hiện pET-21d(+). Vector pET-21d(+) với kích thước phân tử là 5440 bp có một số đặc điểm sau: mang trình tự khởi đầu sao chép (origin) của *E. coli* giúp cho plasmid có thể sao chép trong tế bào vật chủ; mang vùng tạo dòng biểu hiện bao gồm promoter T7, vùng cắt gắn đặc hiệu (từ điểm cắt của *Bam*HI đến *Xho*I) đặt giữa promoter T7 và terminator T7; đoạn gen quan tâm gắn vào vector tái tổ hợp được phiên mã nhờ ARN polymeraz T7 trong tế bào vật chủ; mang gen chọn lọc kháng ampicilin. Do đó, vector này có thể đồng thời dùng làm vector tách dòng và biểu hiện.

Sau khi gắn sản phẩm PCR được xử lý bằng enzym giới hạn *Nco*I và *Bam*HI được ghép nối vector biểu hiện pET-21d(+), chúng tôi đã thu được một số plasmid với kích thước lớn hơn pET-21d(+). Để kiểm tra các đoạn ADN gắn vào plasmid có phải là gen mã hóa RIP hay không, chúng tôi đã tiến hành xử lý các plasmid đó bằng enzym giới hạn *Nco*I, *Bam*HI và đã thu được 2 băng với kích thước 5,4 kb và 0,8 kb. Kết quả thực nghiệm của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Hơn nữa, khi tiến hành PCR sử dụng cặp mồi MAP65F/ MAP859R với khuôn là các plasmid tái tổ hợp, chúng tôi cũng thu được băng có kích thước khoảng 0,8 kb tương đương với kích thước của sản phẩm thu được khi sử dụng cặp mồi MAP65F/ MAP859R với khuôn là ADN tổng số của cây mướp đắng (hình 15).



Hình 15. Thiết kế vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng

M: Thang ADN chuẩn 1kb

1: Sản phẩm PCR với khuôn là ADN tổng số

2: Sản phẩm PCR với khuôn là plasmid tái tổ hợp

3: Plasmid tái tổ hợp cắt bằng *NcoI* và *BamHI*

4: Plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa RIP

5: Vector pET-21d(+)

3.1.4. Giải trình tự các gen CMTI-V, gen MCoTI-II, gen α -AI, gen RIP

Để tiếp tục kiểm tra kết quả biến nạp, đã xác định trình tự các đoạn gen mã hoá CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP trong các vector tái tổ hợp tương ứng. Kết quả trên các hình 16, 17, 18, 19 cho thấy các trình tự gen đích trong plasmid tái tổ hợp đúng với các trình tự đã đưa vào vector.

3.1.4.1. Trình tự gen CMTI-V

TGA TGGCCC ACC TGGTAG GTG TTG GTG GTT CCG TTG CTA AGGCTA TCA TC	50
GAAAGGCAG AAT CCGAAC GTT AAAGCT GTT ATC CTG GAAGAAGGT ACA CC	100
AGT TAC CAA GGACTT CAG GTG CAA CAGGGT TAG GATCTG GGT TAACAA GA	150
AGT CTG GTA GTA TCA CCA CCG AGGATC GGT TAA CGCGGA TCA TGGCTG CC	200
GGC GCGGCA CCA GGCCGC TGC TGT GAT GAT GAT GATGAT G	240

Hình 16: Trình tự ADN vector tái tổ hợp có chứa gen CMTI-V

3.1.4.2. Trình tự gen MCoTI-II

1	GCTCGCGGAT	TTCAGACCTG	TTATTTCGAG	AAGGAGACGA	TTATTATGGG	50
51	TATTACTTTA	TCTGATGATT	CTGATCATCA	GTTTTTGCTT	GGATCCCAGG	100
101	TTGTTGTACA	GAATGCTGGT	<u>CATATG</u> AGCG	GCAGCGATGG	CGGCGTGTGC	150
151	CGAAAATTCT	GAAAAAATGC	CGCCGCGATA	GCGATTGCCC	GGGCGCGTCA	200
201	TTTGCCGCGG	CAACGGCTAT	TGCGGCTAAC	<u>TCGAG</u> CCCGG	GTGACTGCAG	250
251	GAAGGGGATC	CGGCTGCTAA	CAAAGCCCCA	AAGGAAGCTG	AGTTGGCTGC	300
301	TGCCACCGCT	GAGCAATAAC	TAGCATACCC	CTTGGGGCCT	CTAAACGGGT	350

351 CTTGAGGGGT TTTTGCTGA AAGGAGGAAC TATATCCGGA TATCCCGCAA 400
 401 GAGCCCGGCA GTACCGGCAT AACCAAGCCT ATGCCTACAG CATCCAGGGT 450
 451 GACGGTGCCG AGGATGACGA TGAAGCGCCA TTG

Hình 17: Trình tự ADN vector tái tổ hợp pTYB12 có chứa gen MCoTI-II

3.1.4.3. Trình tự gen α -AI

ATGGCTTCCTCCAAGTTACTCTCCCTTGCCCTCTTCCTTGCTTCTCACCCCTCGC 56
 AAACCTCAGCCACCGAAACCTCCTTCAATATCGATGGGTTCAACAAAACCAACCTTA 112
 TCCTTCAAGGCGATGCCATCGTCTCACCGAACGGCAACTTACAACCTATCCTATAAT 168
 TCATACGACTCTATGAGCAGAGCCTTCTACTCCGCCCCCATCCAAATCAGGGACAG 224
 CACCACCGGCAACGTCGCCAGCTTCGACACCAACTTCACAATGAATATCCGCACTC 280
 ACCGCCAAGCAAATTCGCCCGTTGGCCTTGACTTTGTTCTCGTCCCCGTCCAGCCC 336
 GAATCCAAAGGCGATACTGTGACTGTGGAGTTCGACACCTTCCTTAGCCGTATTAG 392
 CATCGACGCGAACAACAACGATATCAAAAGCGTGCCTTGGGATGTACACGACTACG 448
 ACGGACAAAACGCGGAGGTTCCGATCACCTATAACTCCTCCACGAAGGTCTTTGCG 504
 GTTTCTCTGCTAAACCTTCTACGGGAAAGAGCANCACGCTCTCTACCACAGTGGA 560
 GCTGGAGAAAGAAGTTTACGACTGGGTGAGGGTTGGGTTCTCTGCCACCTCAGGGG 616
 CTTATCAATGGAGCTATGAAACGCACGACGTTCTCTCTTGGTCTTTTTCTTCCAAG 672
 TTCATCAATCTTAAGGACCAAAAATCTGAACGTTCCAACATCGTCCTCAACAAAAT 728
 CCTCTAG 735

Hình 18 : Trình tự của đoạn gen α - AI của đậu *Phaseolus vulgaris*

3.1.4.4. Trình tự gen RIP

1 atggatgtta acttcgattt gtcgactgcc actgcaaaaa cctacacaaa atttatcgaa
 61 gatttcaggg cgactcttcc atttagccat aaagtgtatg atatacctct actgtattcc
 121 actatttccg actccagacg tttcatactc ctcaatctca caagttatgc atatgaaacc
 181 atctcggtgg ccatagatgt gacgaacgtt tatgttgtgg cctatcgac ccgcgatgta
 241 tcctactttt ttaaagaatc tcctcctgaa gcttataaca tcctattcaa aggtacgcgg
 301 aaaattacac tgccatatac cggttaattat gaaaatcttc aaactgctgc acacaaaata
 361 agagagaata ttgatcttgg actccctgcc ttgagtagtg ccattaccac attgttttat
 421 tacaatgccc aatctgctcc ttctgcattg cttgtactaa tccagacgac tgcagaagct
 481 gcaagattta agtatatcga gcgacacgtt gctaagtatg ttgccactaa ctttaagcca
 541 aatctagcca tcataagctt ggaaaatcaa tggctctgctc tctccaaaca aatatttttg
 601 gcgcagaatc aaggaggaaa atttagaaat cctgtcgacc ttataaaacc taccggggaa
 661 cggtttcaag taaccaatgt tgattcagat gttgtaaaag gtaatatcaa actcctgctg
 721 aactccagag ctagcactgc tgatgaaaac tttatcacia ccatgactct acgtggggaa
 781 tctgttgtga attga

Hình 19 : Trình tự của đoạn gen McRIP của mướp đắng

Đoạn gen RIP (hình 19) bao gồm 795 bp mã hóa cho phân tử protein gồm 264 axit amin (protein này được đặt tên là McRIP) với khối lượng phân tử khoảng 30 kD. So với trình tự chúng tôi đã công bố về gen này (mã số AJ294541) [73], đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRip6* có một số thay đổi nucleotit ở các vị trí 375 (G->T), 438 (G->T) và 617

(C->G) dẫn tới những thay đổi axit amin tương ứng ở các vị trí 124 (Glu->Asp) và 205 (Ala->Gly). Có thể đây là hai alen khác nhau của RIP ở mướp đắng.

So với các trình tự về gen mã hoá RIP được phân lập từ các thực vật thuộc chi *Momordica* đã được công bố [53, 79, 100, 126], đoạn gen mã hoá RIP trong *pMcRip6* có mức độ tương đồng cao (trên 99%). Trong đó, đáng chú ý là các nghiên cứu về momordin II (còn gọi là beta-momorcharin) của Ortigao và MAP30 của Lee-Huang. Gen mã hoá RIP trong *pMcRip6* sai khác 4 nucleotit so với gen mã hoá momordin II và 6 nucleotit so với gen mã hoá MAP30, dẫn tới những thay đổi tương ứng trong trình tự axit amin (hình 19). MAP30 đã được tách dòng trong vectơ pRSET và biểu hiện thành công trong *E. coli* [54]. Hơn nữa MAP30 tái tổ hợp cũng có đầy đủ các hoạt tính sinh học giống như MAP30 tự nhiên (được tinh sạch từ các mô của mướp đắng). Do đó, chúng tôi đã quyết định sử dụng *pMcRip6* để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Trình tự axit amin suy diễn của McRIP không chứa xistin giống như trichosanthin (một loại RIP được phân lập từ *Trichosanthes kirilowii*) [132]. Trong khi đó, một số loại RIP khác có chứa xistein như là xistin [59], abrin A-chain [37], ricin A-chain [22], trichoanguin [13]. Axit amin này có thể trực tiếp tham gia vào tạo liên kết disulfua với một kháng thể đã được hoạt hóa. McRIP không chứa đoạn peptit tín hiệu (gồm 23 axit amin ở đầu N), đoạn peptit này sẽ được cắt bỏ trong quá trình tạo thành RIP hoàn chỉnh.

Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa RIP trong vectơ pBluescript KS(-) đã được xác định và công bố trên các Ngân hàng trình tự gen Quốc tế EMBL/Genbank/DDBJ với mã số AJ748278.

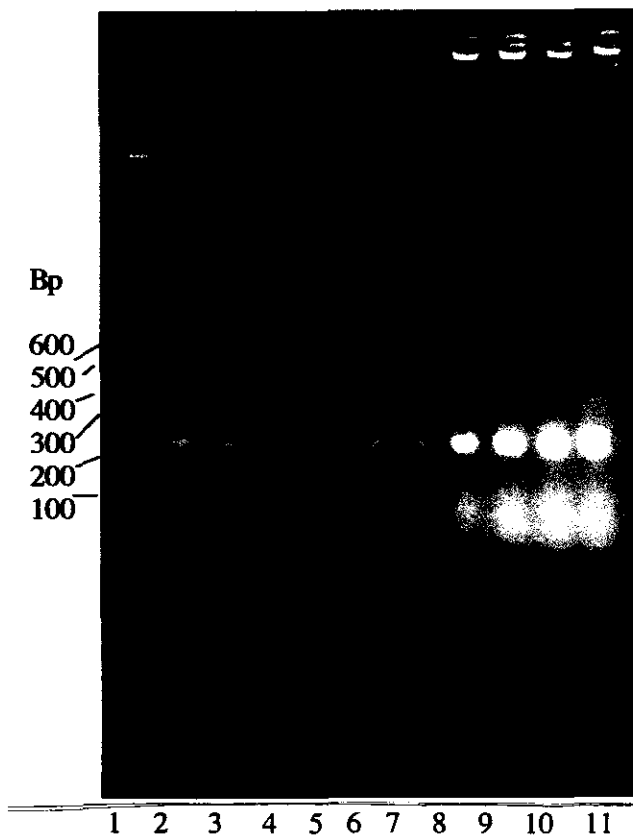
3.2. BIẾN NẠP CÁC VECTƠ TÁI TỔ HỢP VÀO VI KHUẨN BIỂU HIỆN *E. COLI* (BL21) VÀ BIỂU HIỆN CÁC PROTEIN TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ƯNG

3.2.1. Biến nạp các vectơ tái tổ hợp pET14b-(TI-V), pTYB12-(TI-II), pET21d(+)- α AI, pET21d(+)-RIP vào vi khuẩn *E. coli* (BL21)

Trước khi biến nạp các vectơ tái tổ hợp pET14b-TI, pTYB12-TI-II, pET21d(+)- α AI, pET21d(+)-RIP vào chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* (BL21), cần kiểm tra sự thuần khiết và khả năng phát triển của chủng vi khuẩn biểu hiện. Quá trình kiểm tra được thực hiện như sau: Lấy giống gốc tế bào đã giữ ở -70°C (30 μ l) giữ trong đá 30 phút, cho vào 300 μ l môi trường SOC, nuôi lắc ở 37°C 1 giờ, cấy trải trên đĩa môi trường LB không có kháng sinh. Ủ 37°C qua đêm thấy khuẩn lạc mọc tương đối dày. Chọn lấy 1 khuẩn lạc riêng rẽ nuôi trong môi trường LB lỏng không có kháng sinh ở 37°C qua đêm, chủng vi khuẩn phát triển rất tốt. Tiếp tục nuôi giống tế bào này trong môi trường LB lỏng mới ở 37°C 3 giờ, thu tế bào để tiến hành biến nạp vectơ tái tổ hợp vào chủng tế bào biểu hiện này.

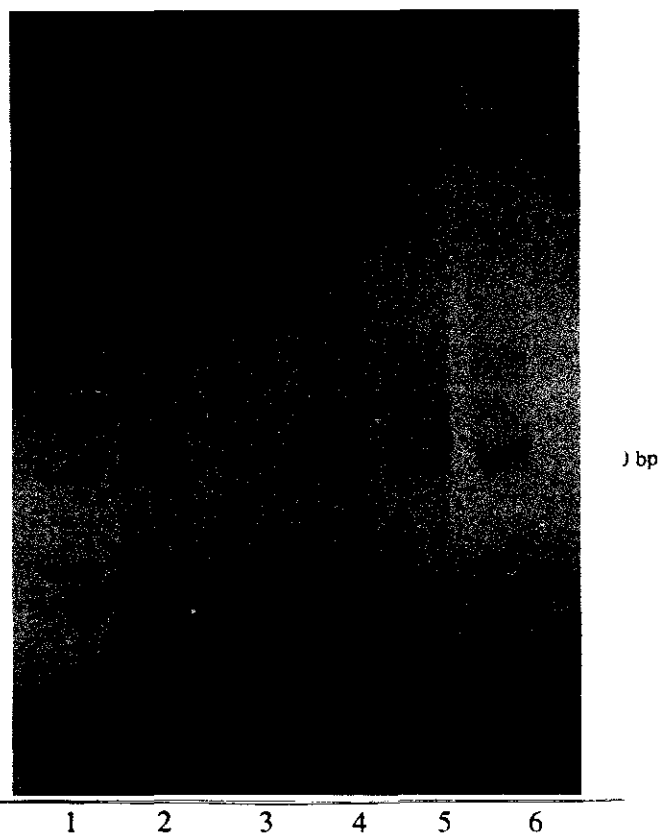
3.2.1.1. Biến nạp vector *pET14b-(TI-V)* vào chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* (BL21)

Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 theo phương pháp sốc nhiệt. Sau khi biến nạp, cấy trải vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường LB-agar có ampicilin, ủ 37°C qua đêm thấy mọc trên mỗi đĩa khoảng hơn 20 khuẩn lạc riêng rẽ, điều đó chứng tỏ chủng vi khuẩn biểu hiện đã mang gen CMTI-V tái tổ hợp (ký hiệu BL21-TI). Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ nuôi cấy tiếp trên môi trường LB lỏng có ampicilin ở 37°C qua đêm, tách plasmid và kiểm tra bằng kỹ thuật PCR. Kết quả trên hình 20 và 21 cho thấy các khuẩn lạc đều cho sản phẩm PCR khoảng 230bp, đúng kích thước đã dự tính. Các khuẩn lạc BL21-TI 4, 5, 6 được giữ lại cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 20: Phổ điện di sản phẩm PCR trên gel agaroz (sử dụng ADN vector tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc BL21-TI khác nhau làm khuôn).

- 1- Thang ADN chuẩn (Marker Mix: từ 100-10000bp).
- 2-11: Sản phẩm PCR (sử dụng ADN vector của các khuẩn lạc dương tính khác nhau)

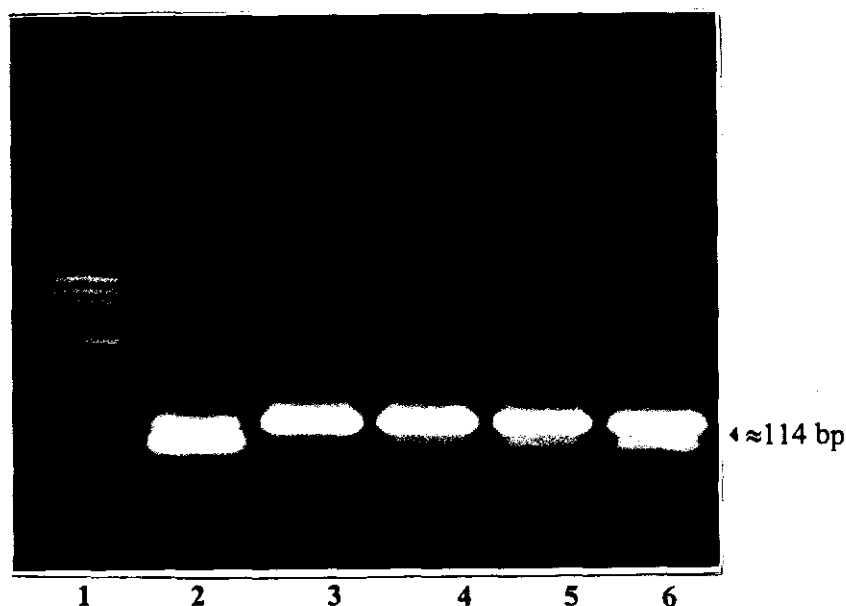


Hình 21: Phổ điện di sản phẩm PCR trên PAG 5% (sử dụng ADN vector tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc BL21-TI khác nhau làm khuôn).

- 1- Thang ADN chuẩn (Marker 100bp: từ 80-1031bp)
- 2,3- Đối chứng: sản phẩm PCR ban đầu (sử dụng ADN genôm bí đỏ làm khuôn với môi xuôi, ngược (1μl và 0.5μl))
- 4,5,6- Sản phẩm PCR (sử dụng ADN vector tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc khác nhau)

3.2.1.2. Biến nạp vector tái tổ hợp pTYB12-(TI-II) vào vi khuẩn biểu hiện *E. coli* BL21

Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 theo phương pháp sốc nhiệt. Sau khi biến nạp, cấy trải vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường LB-agar có ampicilin, ủ 37°C qua đêm thấy mọc trên mỗi đĩa khoảng 10 khuẩn lạc riêng rẽ. điều đó chứng tỏ vi khuẩn biểu hiện đã mang gen MCoTI-II. Ký hiệu BL 21- TI-II (PI-17). Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ nuôi cấy trên môi trường LB lỏng có ampicilin ở 37°C qua đêm. Tách plasmid và kiểm tra khả năng biến nạp vector mang gen TI-II vào vi khuẩn biểu hiện bằng kỹ thuật PCR. Kết quả trên hình 22 cho thấy các khuẩn lạc đều cho sản phẩm PCR khoảng 114bp đúng kích thước đã dự định.



Hình 22. Kiểm tra khả năng biến nạp gen MCoTI-II vào *E. coli* BL21

1. Thang ADN 100bp 2. Đối chứng
3→6. Sản phẩm ADN vector mang gen MCoTI-II

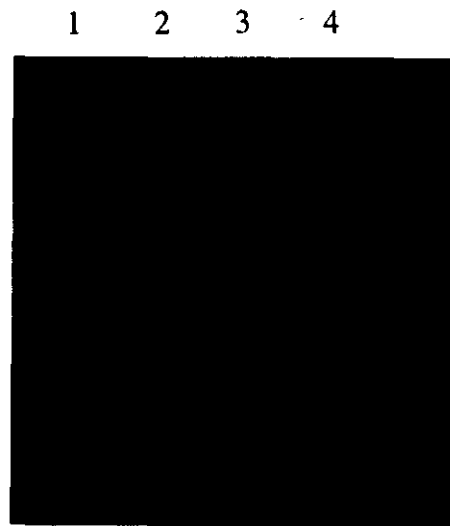
3.2.1.3. Biến nạp vector pET21d(+)- α -AI vào chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* (BL21)

Để biểu hiện được gen nói chung và gen α -AI nói riêng trong vi khuẩn thì cần phải chọn được chủng vi khuẩn biểu hiện thích hợp. Để biểu hiện gen α -AI chúng tôi lựa chọn chủng *E. coli* BL 21.

Quá trình biến nạp được thực hiện như sau: Chúng tôi lấy plasmid pET21d đã mang gen α -AI trộn với dung dịch tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 khả biến. Sau đó tiến hành sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút. Sau khi sốc nhiệt, bổ sung 0,4ml môi trường SOC, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C trong 1 giờ. Dịch nuôi cấy sau đó được cấy trải lên môi trường LB thạch có chứa kháng sinh Ampicilin, ủ 37°C qua đêm. Chúng tôi nhận được kết quả là trên đĩa thạch mọc rất nhiều khuẩn lạc đơn. Theo lý thuyết chúng tôi sử dụng plasmid đã mang

gen α -AI do vậy các khuẩn lạc mọc được trên môi trường có kháng sinh ampicilin là đã mang plasmit tái tổ hợp (mang gen α -AI) và các khuẩn lạc này có thể sử dụng để biểu hiện.

Tuy nhiên để khẳng định chắc chắn thêm các khuẩn lạc mọc được là mang plasmit tái tổ hợp chúng tôi tiến hành nuôi cấy khuẩn lạc trên môi trường LB lỏng và tách ADN plasmit sau đó xử lý bằng enzym giới hạn và PCR kết quả được thể hiện trên hình 23.



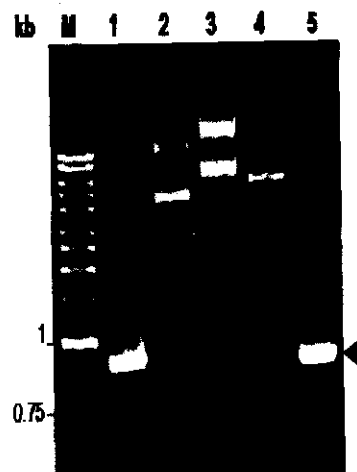
Hình 23 . Kết quả kiểm tra sau khi biến nạp

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Marker | 2. Plasmit tách từ một khuẩn lạc |
| 3. Plasmit cắt bằng <i>Bam</i> HI + <i>Nco</i> I | 4. Sản phẩm PCR |

Qua kết quả trên chúng tôi thấy rằng chủng vi khuẩn đó đã mang plasmit tái tổ hợp. Khuẩn lạc này được sử dụng cho quá trình biểu hiện tiếp theo.

3.2.1.4. Biến nạp vector *pET21d(+)-RIP* vào chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* (BL21)

Vectơ *pET21d (+)* mang gen RIP được biến nạp vào *E. coli* chủng BL21. Các dòng khuẩn lạc được chọn lọc trên môi trường có kháng sinh ampicilin, IPTG và X-gal. Các khuẩn lạc trắng được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR cho ra các băng có kích thước khoảng 0,8 kb đúng với kích thước sản phẩm PCR từ ADN genome (hình 24). Chúng tôi tiến hành kiểm tra lại một lần nữa bằng cắt enzym giới hạn *Nco*I và *Bam*HI cho ra 2 băng có kích thước phân tử vào khoảng 3 kb và 0,8 kb. Như vậy, kết quả thực nghiệm phù hợp với tính toán lý thuyết.



Hình 24. Phổ điện di kiểm tra gen mã hoá RIP vào tế bào *E. coli* chủng BL21

M: Thang ADN chuẩn 1kb

1: Sản phẩm PCR với khuôn là ADN genom

2: pET21d(+)

3: pET21d(+) + RIP

4: pET21d(+) + RIP/*Bam*HI/*Nco*I

5: Sản phẩm PCR với khuôn là plasmid tái tổ hợp

Qua kết quả trên chúng tôi thấy rằng chủng vi khuẩn BL21 đã mang plasmid có chứa gen RIP tái tổ hợp. Khuẩn lạc này được sử dụng cho quá trình biểu hiện tiếp theo.

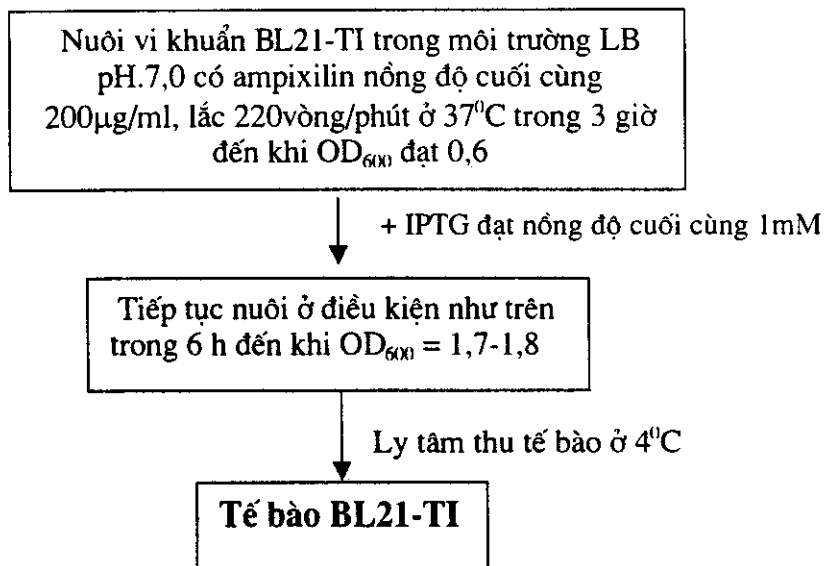
3.2.2. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp

3.2.2.1. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen *CMTI-V*

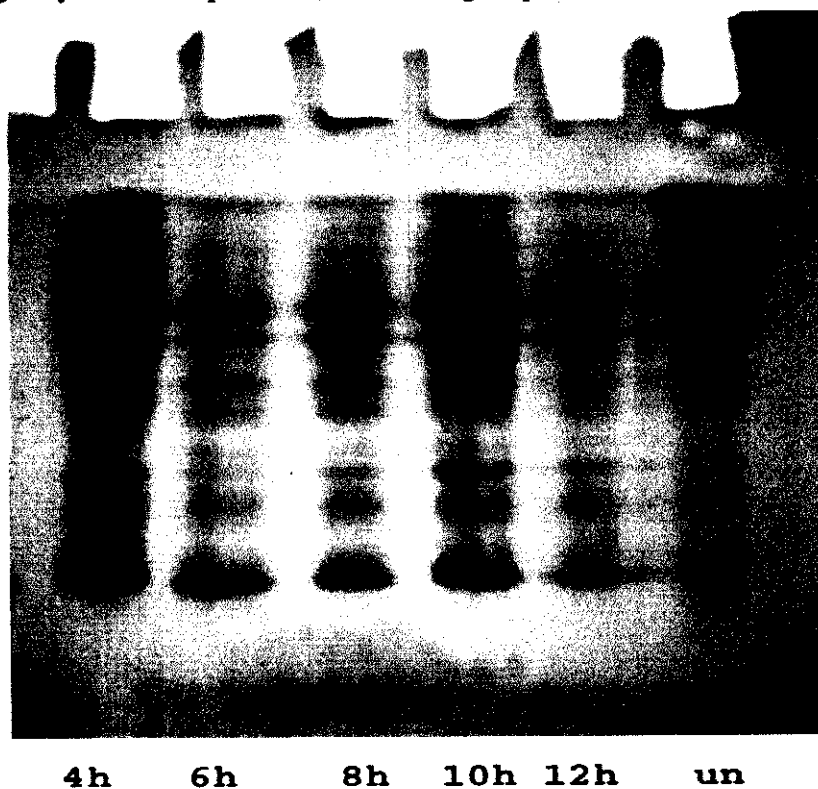
Các khuẩn lạc BL21-TI đã chọn lọc (khuẩn lạc 4, 5, 6 hình 20 và 21) được nuôi biểu hiện protein tái tổ hợp trên môi trường LB lỏng, cảm ứng bằng IPTG. Chúng tôi đã tiến hành thăm dò các điều kiện sau (số in đậm chỉ điều kiện tốt nhất đã lựa chọn):

- Nồng độ ampicilin: 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, **200µg/ml**, 250µg/ml, 300µg/ml.
- Nồng độ IPTG: 0.25mM, 0.5mM, 0.75mM, **1mM**, 1.25mM, 1.5mM.
- Điều kiện nhiệt độ: 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C, **37°C**.
- Thời gian biểu hiện protein tái tổ hợp: 2giờ, 3giờ, 4giờ, 5giờ, **6giờ**, 8giờ, 10giờ, 12giờ, 18giờ.

Sơ đồ 10: Quy trình nuôi BL21-TI biểu hiện gen CMTI-V



Kết quả cho thấy với điều kiện biểu hiện ở 37 $^{\circ}$ C, 200 μ g/ml ampicilin, 1mM IPTG sau thời gian cảm ứng là 6 giờ cho băng protein tái tổ hợp đậm nhất (hình 25) chiếm 15,6% (dùng máy Scan Sharp JX330) so với tổng số protein.



Hình 25: Phổ điện di protein tái tổ hợp CMTI-V trên PAG-SDS 18% biểu hiện các thời gian khác nhau

un - Đối chứng (tế bào nuôi không có chất cảm ứng IPTG)

Các giếng khác là mẫu nuôi với các thời gian cảm ứng khác nhau: 4, 6, 8, 10, 12 giờ

Trong các thí nghiệm tiếp theo tiến hành nuôi vi khuẩn tái tổ hợp BL21-TI để biểu hiện ở điều kiện đã lựa chọn ở trên.

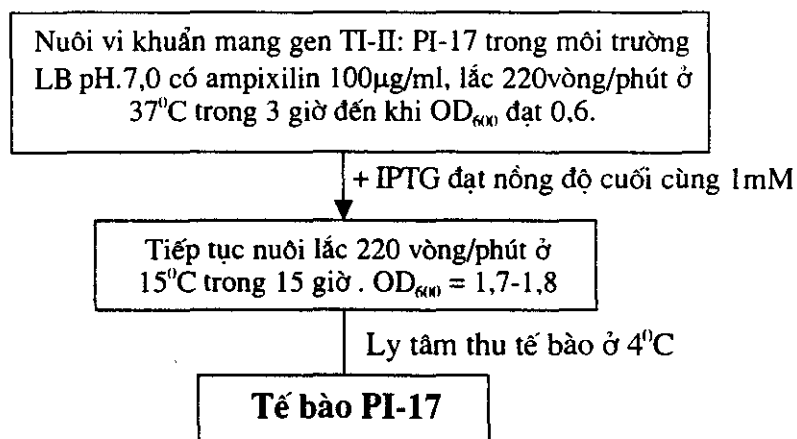
** Quy trình nuôi vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp CMTI-V (ReCMTI-V) được tiến hành cụ thể như sau:*

1. Dùng tăm khử trùng, chấm một khuẩn lạc cho vào môi trường LB dịch thể pH7.0 có 200 μ g/ml ampicillin, lắc 220 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đo OD₆₀₀=1,7-1,75 (khoảng 16 giờ).
2. Cho dung dịch huyền phù vi sinh vật này vào môi trường LB dịch thể mới, với tỉ lệ sao cho OD₆₀₀ đạt khoảng 0,1. Nuôi cấy ở 37°C, lắc 200 vòng/phút khoảng 3 giờ.
3. Sau 3 giờ, kiểm tra OD₆₀₀=0,5-0,6 thêm IPTG đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 1mM/ml, cùng điều kiện nhiệt độ và tốc độ lắc như trên, trong 6 giờ.
4. Sau 6 giờ biểu hiện protein tái tổ hợp, kiểm tra OD₆₀₀ = 1,7-1,8 là thời điểm đạt sinh khối nhiều nhất (thu được khoảng 5 gam tế bào/1lít môi trường nuôi cấy). Ly tâm thu tế bào ở 4°C, 5000 vòng/phút trong 10 phút, rửa tế bào bằng đệm TE 1 lần, ly tâm như trên bỏ hết dịch trong, giữ tế bào ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2.2. Nuôi biểu hiện vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen MCoTI-II

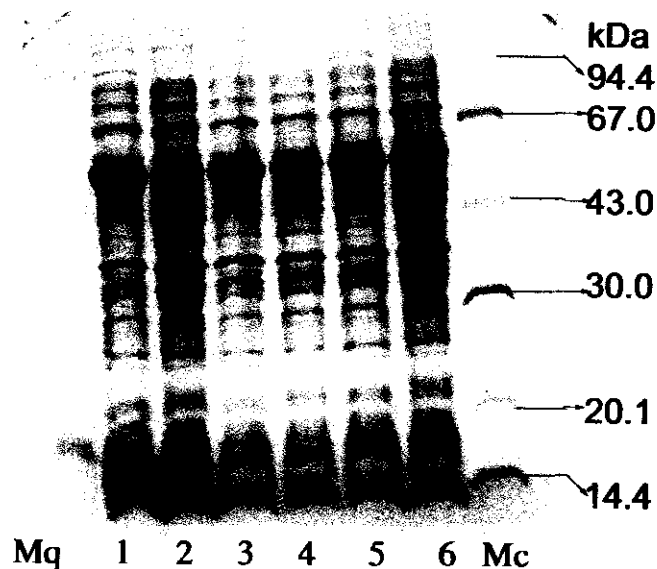
Các khuẩn lạc mọc trên môi trường có ampicillin đã kiểm tra lại bằng PCR, được chọn để nuôi biểu hiện protein tái tổ hợp trên môi trường LB lỏng, cảm ứng bằng IPTG. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ kháng sinh, nồng độ chất cảm ứng, thời gian, nhiệt độ nuôi cấy v.v.. đến quá trình biểu hiện. Kết quả cho thấy với điều kiện biểu hiện ở 15°C, 100 μ l/ml ampicillin, 1mM IPTG sau thời gian cảm ứng là 16 giờ cho băng protein tái tổ hợp dung hợp (fusion protein) đậm nhất có kích thước khoảng 58kD (55+3,4kD) (hình 26), băng này chiếm khoảng 45-50% so với tổng số protein (dùng máy Scan Sharp JX300).

Sơ đồ 11: Quy trình nuôi cấy PI-17 biểu hiện gen MCoTI-II



* Quy trình nuôi vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp MCoTI-II (ReMCoTI-II) được tiến hành cụ thể như sau:

1. Dùng tăm khử trùng, chấm một khuẩn lạc vi khuẩn PI17 cho vào môi trường LB dịch thể pH 7,0 có 100 µg/ml ampicilin, lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đo OD₆₀₀=1,7-1,75 (khoảng 16 giờ).
2. Cho dung dịch huyền phù vi sinh vật này vào môi trường LB dịch thể mới, với tỉ lệ sao cho OD₆₀₀ đạt khoảng 0,1. Nuôi cấy ở 37°C, lắc 220 vòng/phút khoảng 3 giờ.
3. Sau 3 giờ, kiểm tra OD₆₀₀=0,5-0,6 thêm IPTG đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 1mM/ml, lắc 200 vòng/phút ở 15°C trong 15 giờ.
4. Sau 15 giờ biểu hiện protein tái tổ hợp, kiểm tra OD₆₀₀=1,7 – 1,8 là thời điểm đạt sinh khối nhiều nhất (thu được khoảng 5 gam tế bào/1lít môi trường nuôi cấy). Ly tâm thu tế bào ở 4°C, 5000 vòng/phút trong 10 phút, giữ tế bào ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 26. Phổ điện di protein tái tổ hợp Tl-II trên PAGE 12,5% biểu hiện các thời gian khác nhau.

Mc. Thang chuẩn protein

1. Sau 16 giờ nuôi có chất cảm ứng IPTG ở 15°C

2, 4. Đối chứng (không có chất cảm ứng)

3, 5, 6. Sau 3, 6, 8 giờ nuôi có chất cảm ứng IPTG ở 37°C

3.2.2.3. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn tái tổ hợp gen α -AI

Các điều kiện của quá trình biểu hiện được sử dụng dựa vào các công bố trước đây có liên quan đến đối tượng chúng tôi đang nghiên cứu.

Lấy một khuẩn lạc mang plasmit tái tổ hợp cấy vào 2 ml môi trường LB lỏng có chứa kháng sinh. Nuôi lắc 200 v/p, ở 37°C qua đêm. Lấy 50 μ l dịch nuôi cấy qua đêm cấy vào 5 ml môi trường LB có kháng sinh ampicilin, nuôi lắc trong 2^h30' sau đó tiến hành cảm ứng bằng cách lấy 1 ml ra (mẫu trước khi cảm ứng) sau đó bổ sung 40 μ l IPTG 100mM. Tiếp tục nuôi và cứ 1 giờ lại lấy 1ml dịch nuôi để lựa chọn các thời gian cảm ứng khác nhau.

Dịch nuôi sau đó được ly tâm ở 6000v/p trong 10 phút. Thu tế bào để chuẩn bị điện di kiểm tra sản phẩm biểu hiện.

Mẫu trước khi điện di được làm biến tính bằng cách hoà tan sinh khối trong 50 μ l đệm mẫu sau đó đun sôi trong 5 phút. Cho mẫu lên gel điện di poliacrilamit 12,5%. Kết quả chúng tôi thấy xuất hiện một băng khoảng 16 kD mà bên đối chứng (biểu hiện chủng vi khuẩn chỉ mang plasmit pET21d) không có băng protein này, điều đó phù hợp với kết quả dự kiến của chúng tôi. Tuy nhiên băng protein chưa được đậm nét. Điều đó có thể là

do quá trình biểu hiện chưa tối ưu. Do vậy cần phải tiến hành tối ưu hóa bằng cách lựa chọn các điều kiện thích hợp như nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng cho quá trình biểu hiện.

Để chọn nồng độ chất cảm ứng thích hợp chúng tôi đã tiến hành biểu hiện trong điều kiện thay nồng độ chất cảm ứng IPTG : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 mM. Tuy nhiên chúng tôi thấy kết quả biểu hiện không khác nhau nhiều và ở nồng độ 1 mM là cho kết quả tốt hơn.

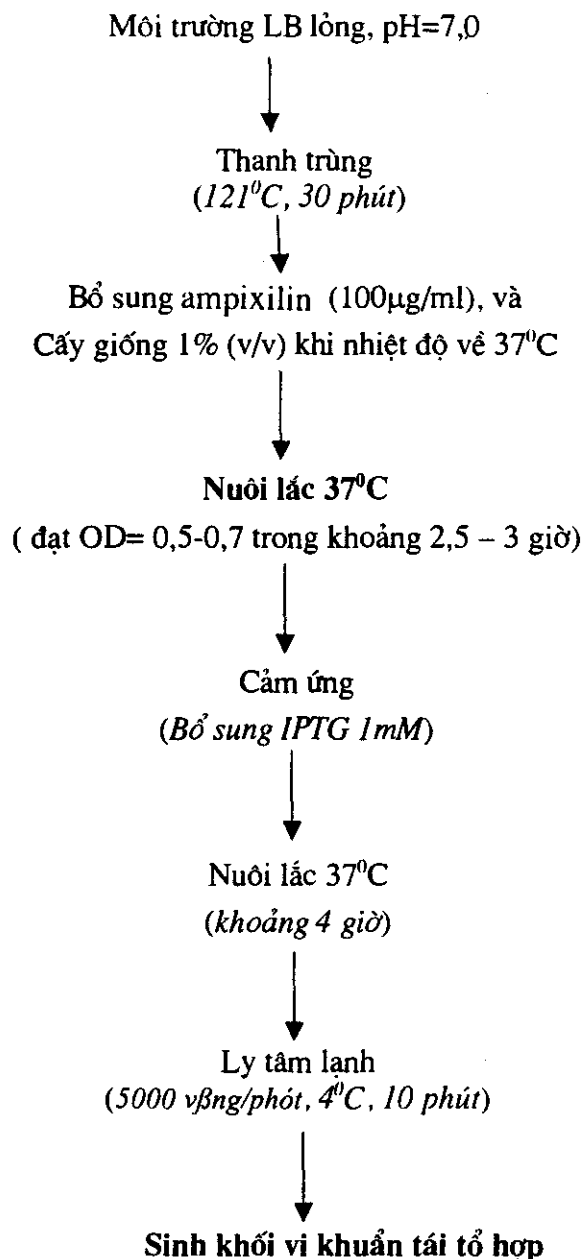
Về nhiệt độ: Xuất phát từ nhận định protein kìm hãm α -amilaz có thể gây độc cho vi khuẩn cho nên vi khuẩn vẫn chưa biểu hiện tốt trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi, do vậy chúng tôi cho rằng cần phải hạ nhiệt độ xuống để cho quá trình biểu hiện diễn ra từ từ, giảm khả năng gây chết đối với vi khuẩn. Chúng tôi đã tiến hành biểu hiện trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

Kết quả cho thấy vi khuẩn sinh trưởng rất chậm và sản phẩm protein nhiều nhất khi được biểu hiện ở 37°C. Như vậy, điều kiện tốt cho quá trình biểu hiện protein mã cho gen α -AI: nồng độ chất cảm ứng IPTG là 1 mM, nhiệt độ 37°C.

** Các bước tiến hành cụ thể như sau:*

1. Môi trường LB lỏng có pH 7,0 được thanh trùng 121°C, 30 phút
2. Để nguội môi trường đến khoảng 37°C rồi bổ sung ampicilin (100µg/ml) và cấy giống (đã nuôi tăng sinh qua đêm) 1% (v/v).
3. Nuôi khuẩn lắc (200 vòng/phút) ở 37°C cho đến khi đạt OD= 0,5-0,7 trong khoảng 2,5 – 3 giờ
4. Cảm ứng bằng IPTG đạt nồng độ cuối cùng là 1mM
5. Lắc ở 37°C trong 4 giờ
6. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở 5000 vòng/phút, 4°C, 10 phút

Sơ đồ 12. Quy trình nuôi cấy BL-21 biểu hiện gen α -AI

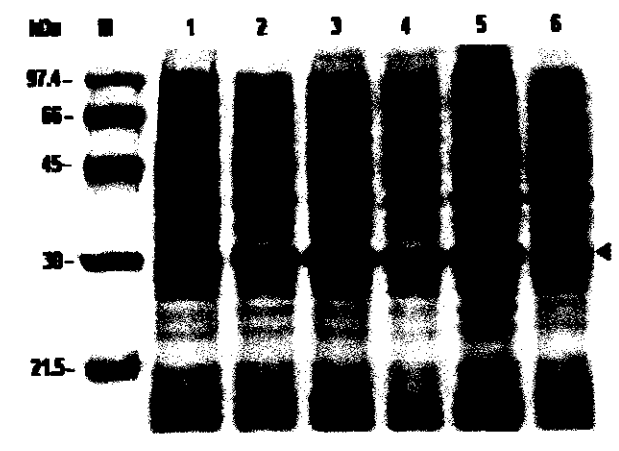


3.2.2.4. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn tái tổ hợp gen RIP

Để nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa RIP, chúng tôi đã biến nạp *pMcRip6* vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Nhằm xác định điều kiện tối ưu hóa cho quá trình biểu hiện gen mã hóa RIP, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm tại các nồng độ cảm ứng IPTG khác nhau: 0,3 mM, 0,7 mM, 1,5 mM và 2 mM (nồng độ cuối). Các mẫu tế bào nuôi cảm ứng IPTG nồng độ khác nhau được thu tại cùng các thời điểm và kiểm tra trên gel SDS-PAGE.

Chúng tôi nhận thấy: lượng ReMcRIP tạo ra tại nồng độ IPTG 0,3 mM ít hơn tại nồng độ IPTG là 0,7 mM ở cùng thời điểm. Trong khi đó, tại nồng độ IPTG là 1,5 mM và 2 mM, băng protein trên điện di đồ không có sự khác biệt đáng kể so với băng protein ở nồng độ IPTG 0,7 mM. Kết quả này phản ánh cơ chế cảm ứng IPTG ở hệ vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP trong *E. coli* chủng BL21(DE3): Nồng độ IPTG đủ lớn mới kìm hãm được hoàn toàn *lac* repressor. Như vậy, với điều kiện nuôi lắc 200 vòng/ phút trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicilin (50 µg/ ml) ở nhiệt độ 37 °C, chúng tôi đã xác định được nồng độ chất cảm ứng tối ưu cho quá trình biểu hiện *pMcRip6* ở *E. coli* chủng BL21 là 0,7 mM IPTG.

Kết quả điện di protein tổng số của chủng biểu hiện *E. coli* BL21 có mang vector *pMcRip6* trên SDS-PAGE cho thấy rõ động học của quá trình biểu hiện gen RIP (hình 27).



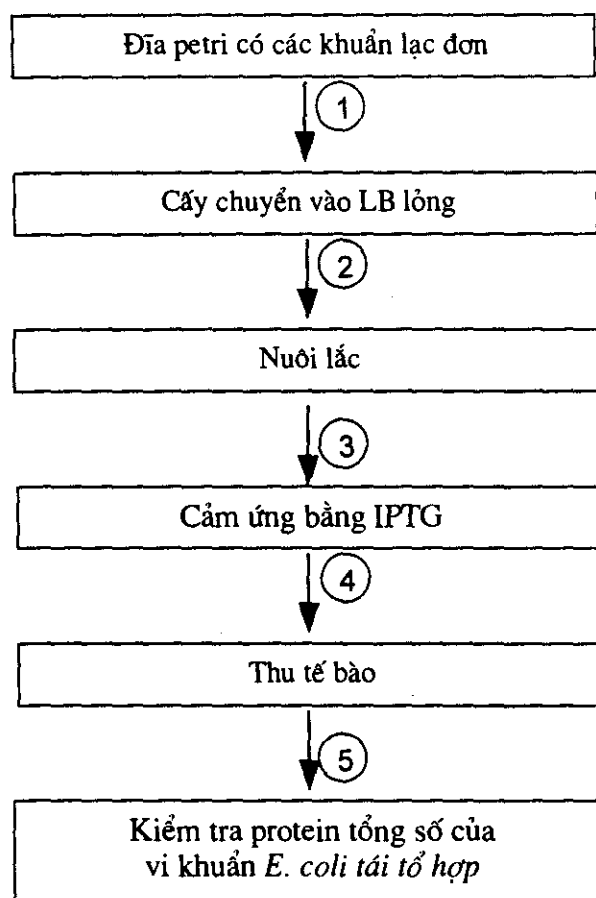
Hình 27. RIP tái tổ hợp (ReMcRIP) từ mược đắng được biểu hiện trong tế bào *E. coli*.

- M: Thang protein chuẩn
- 1: Trước khi cảm ứng
- 2-5: 1-4h sau khi cảm ứng bằng IPTG nồng độ 0,7 mM
- 6: Không cảm ứng bằng IPTG

Sau khi cảm ứng bằng IPTG đã thu được băng protein có khối lượng phân tử khoảng 30 kD và độ đậm của băng này tăng dần từ 1 - 4h sau khi cảm ứng do lượng protein biểu hiện được nhiều hơn; còn băng protein tương ứng ở các mẫu đối chứng (đường chạy số 1 và 6) rất mờ nhạt. Khối lượng phân tử của protein biểu hiện được cũng bằng với khối lượng phân tử của ReMcRIP suy diễn. Thời điểm tích lũy tối đa ReMcRIP trong tế bào *E. coli* (ở nhiệt độ nuôi cấy là 37 °C, IPTG 0,7 mM) là 4h sau cảm ứng.

Tính tan của rMcRIP cũng được kiểm tra theo phương pháp đã mô tả. Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy phần lớn rMcRIP nằm trong phần dịch có pH = 7. Điều này sẽ tạo thuận lợi khi tiến hành tinh sạch ReMcRIP.

Sơ đồ 13. Quy trình nuôi BL21 biểu hiện gen RIP



1. Cấy chuyển một khuẩn lạc đơn *E. coli* chủng BL21(DE3) mang vector pET21d(+) tái tổ hợp có chứa đoạn gen mã hoá RIP vào 50 ml môi trường LB lỏng có chứa ampicilin (nồng độ 50 µg/ml).
2. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm (12-16 giờ).
3. Hoạt hóa tế bào: bổ sung 10 ml dịch nuôi vào 490 ml môi trường LB lỏng có chứa ampicilin (nồng độ 50 µg/ml) (tiến hành thí nghiệm với 5 bình nuôi có thể tích 2,5 lít). Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho tới khi OD 600nm của dịch nuôi đạt 0,5 - 0,7.
4. Cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 0,7 mM. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C qua đêm (12-16 giờ).

5. Chuyển dịch nuôi vào các ống ly tâm 0,5 lít. Ly tâm 6000 vòng/phút, 6 phút, 4°C (sử dụng rotor văng) dịch nuôi để thu sinh khối tế bào. Chuyển sinh khối tế bào sang các ống falcon 50 ml, bảo quản sinh khối tế bào ở -20°C cho đến khi sử dụng.

3.3. THU NHẬN, TINH SẠCH VÀ KIỂM TRA HOẠT TÍNH CÁC PROTEIN TÁI TỔ HỢP

3.3.1. Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp

3.3.1.1. Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen TI-V

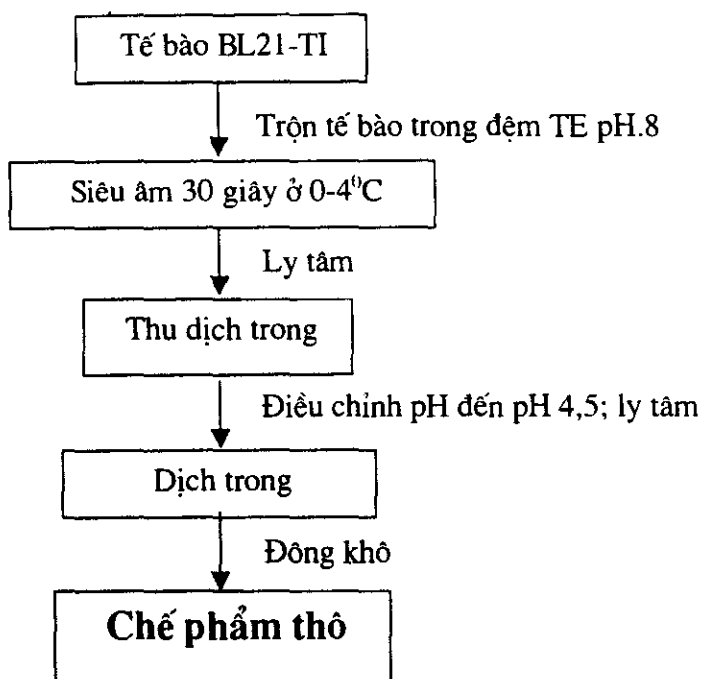
* Quy trình thu nhận CMTI-V tái tổ hợp (Re CMTI-V) dạng sơ chế

Để tách chiết protein tái tổ hợp từ tế bào vi khuẩn cần phải phá vỡ màng tế bào. Do đó phải tìm dung dịch đệm thích hợp, các thử nghiệm đã tiến hành như sau:

- Tế bào được giữ ở -20°C khoảng 16 giờ.
- Đệm phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} = 177,99\text{g/mol}$ + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 137,99\text{g/mol}$) nồng độ 100mM các pH khác nhau: pH6,0; pH6,5; pH7,0; pH7,5. Các đệm này khó phá vỡ tế bào, hiệu quả không cao (phần dịch trong sau ly tâm rất ít protein).
- Đệm phosphate nồng độ 100mM; pH7,0 có thêm các nồng độ Urea khác nhau: 2M Urea, 4M Urea, 6M Urea, 8M Urea. Các loại đệm này phá vỡ tế bào tốt, nhưng protein thu được khó xử lý cho các bước tinh sạch sau và hoạt tính không cao.
- Đệm TE (10mM Tris-HCl/1mM EDTA) với các pH khác nhau: pH 7,2; pH 7,5; pH 8,0; pH 8,5. Các đệm này phá tế bào rất nhanh, phần dịch trong sau ly tâm rất nhiều protein. Lượng tế bào bị phá vỡ gần hoàn toàn ở pH8,0 với thời gian rất ngắn (tổng thời gian chỉ 90 giây). Protein thu được dễ xử lý cho các bước tinh sạch tiếp theo và có hoạt tính cao.
- Đệm TE (10mM Tris-HCl/1mM EDTA) pH 7,2 có thêm các nồng độ khác nhau của lisozim: 1mg/ml lisozim, 3mg/ml lisozim, 5mg/ml lisozim. Các đệm này phá tế bào cực mạnh, phần dịch trong sau ly tâm rất nhiều protein. Lượng tế bào bị phá vỡ hoàn toàn chỉ với thời gian rất ngắn (tổng thời gian chỉ 60 giây). Nhưng protein thu được bị lẫn lisozim, khó xử lý cho các bước tinh sạch tiếp theo.

Đánh giá kết quả bằng PAGE 18% có SDS. Kết quả cho thấy dung dịch đệm TE pH 8,0 thu được nhiều ReCMTI-V nhất và cũng không ảnh hưởng đến các bước tinh sạch tiếp theo.

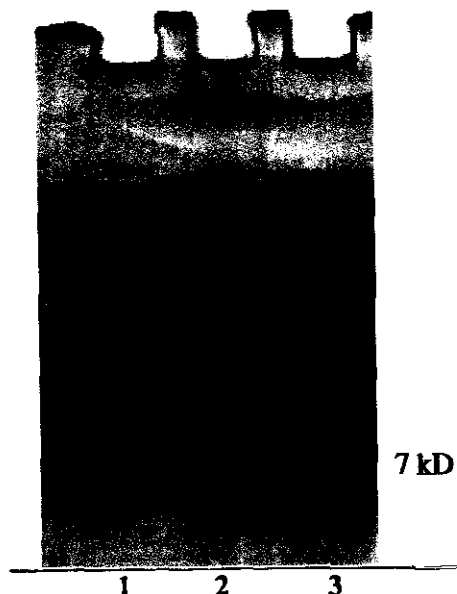
Sơ đồ 14. Quy trình thu nhận chế phẩm ReCMTI-V thô



*** Quy trình tinh sạch ReCMTI-V**

Chúng tôi đã thăm dò 5 quy trình tinh sạch khác nhau, trong đó kết hợp sử dụng các yếu tố kết tủa thuận nghịch như muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etanol với sắc kí cột lọc gel, sắc kí cột trao đổi ion, sắc kí ái lực v. v... Kết quả đã lựa chọn được quy trình tinh sạch thích hợp ở sơ đồ 15.

Qua mỗi bước tinh sạch đã tiến hành điện di để kiểm tra. Kết quả cho thấy (điện di và scan để tính %) tỉ lệ % của băng protein có kích thước khoảng 7 kD (hình 28) so với tổng protein có trong dịch chiết từ tế bào BL21-TI đã tăng dần trong quá trình tinh sạch: mẫu tế bào nuôi không có chất cảm ứng chỉ chiếm 2,45%, trong dịch chiết tế bào BL21-TI nuôi có chứa chất cảm ứng sau 6 giờ khoảng 15%, trong chế phẩm thô là vào khoảng 78-80% tổng số protein.

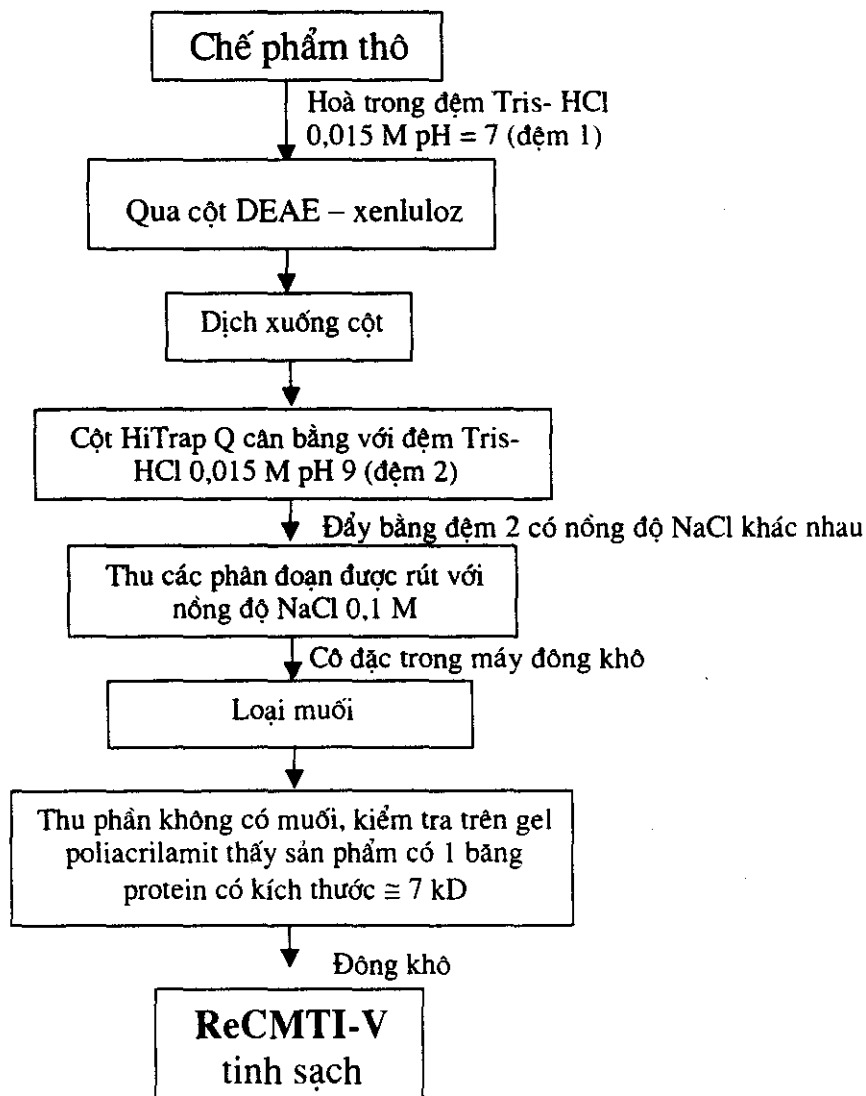


Hình 28: SDS-PAGE 18% các protein của

dịch chiết tế bào BL21-TI

1. BL21-TI không có chất cảm ứng
2. BL21-TI có chất cảm ứng sau 6 giờ
3. Chế phẩm ReCMTI-V tinh sạch

Sơ đồ 15. Quy trình thu nhận chế phẩm tinh sạch ReCMTI-V

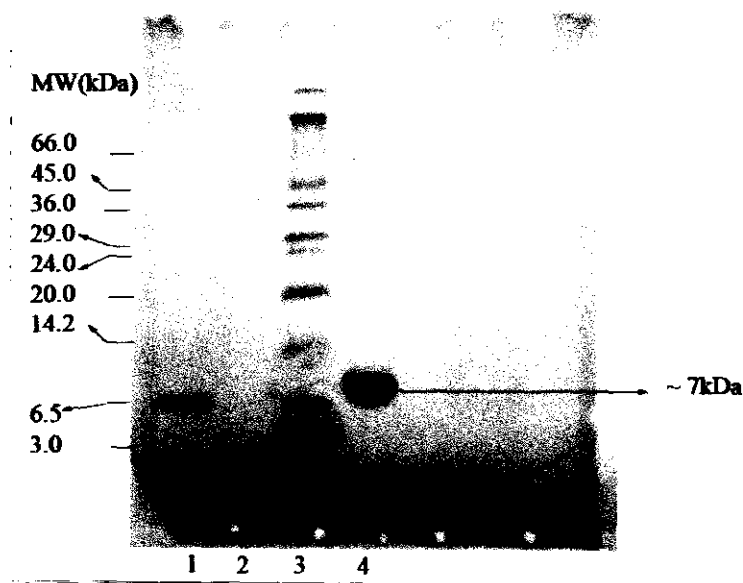


* *Quy trình sản xuất và tinh sạch chế phẩm ReCMTI-V được cụ thể hoá từ sơ đồ 12 và 13 như sau:*

1. Thu nhận tế bào: Sau khi nuôi cấy (1 lít môi trường) vi khuẩn tái tổ hợp BL21-TI ở các điều kiện đã lựa chọn, ly tâm 5000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong, thu tế bào, rửa tế bào bằng dung dịch đệm TE pH8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA) 1 lần, ly tâm như trên, bỏ dịch trong, giữ tế bào ở -20°C.
2. Phá vỡ màng tế bào: trộn tế bào thu được trong 80ml đệm TE 8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA), siêu âm ở 0-4°C, 10 giây, lặp lại 3 lần, sau mỗi lần nghỉ 1 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C, thu dịch trong, thêm 20ml đệm TE pH8 vào phần xác tế bào, tiếp tục siêu âm lần thứ 2, ly tâm. Đổ dịch trong của 2 lần ly tâm để phân tích tiếp.
3. Chỉnh pH dung dịch trong đến pH4,5. Ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C, thu dịch trong, loại bỏ cặn.
4. Đông khô dịch trong, chia vào các lọ. Thu được chế phẩm thô, bảo quản ở 4°C.
5. Hoà chế phẩm thô trong 60ml đệm Tris-HCl 0,015M pH 7,2 (đệm 1).
6. Chuẩn bị cột DEAE – xenluloz: gel DEAE – xenluloz đã được cân bằng với đệm 1. Dung dịch chế phẩm thô được cho qua cột với tốc độ 40ml/giờ để loại bỏ chất màu. Phần húng xuống cột phải đảm bảo trong suốt.
7. Chuẩn bị cột HiTrap Q: cột HiTrap Q được cân bằng trong đệm Tris-HCl 0,015 M pH 9 (đệm 2). Dịch húng xuống cột DEAE-xenluloza trên được cho qua cột HiTrap Q với tốc độ 2ml/min cho đến hết. Rửa cột bằng đệm 2 cho đến khi dịch húng xuống cột hết protein (thử protein với thuốc thử Folin).
8. Loại protein tạp bằng dung dịch đệm 1 có 0,04 NaCl cho đến khi dịch qua cột hết protein.
9. Rút protein đích ra khỏi cột HiTrap Q bằng đệm 1 với 0,1M NaCl đến khi hết protein thì dừng lại (thử protein với thuốc thử Folin). Đông khô, cô đặc phần thu được.
10. Loại muối các phần cô đặc được bằng cột loại muối HiTrap: axit axetic 0,005M được dùng để cân bằng cột cũng như để rút protein. Thu các phân đoạn xuống cột, thử protein với thuốc thử Folin, thử muối bằng AgNO₃ 1%. Thu các phân đoạn có protein mà không có NaCl để đông khô.

mercaptoetanol, đun cách thủy trong 8 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút, thu dịch trong để lên gel, nhuộm gel với dung dịch Coomassie brilliant blue R-250 1% trong metanol : axit axetic : nước (4:1:5), tẩy bằng dung môi trên cho đến khi xuất hiện các băng tím trên nền gel trong suốt.

12. Đôn sản phẩm đã khô vào lọ, đóng nắp, dán nhãn.



Hình 29: Phổ điện di ReCMTI-V tinh sạch qua cột HiTrap Q trên PAGE-SDS 18%

1- Aprotinin (6.5kD)

2- Marker 3kD

3- Marker từ 3kD đến 94kD

4- ReCMTI-V tinh sạch (kích thước $\approx$ 7kD)

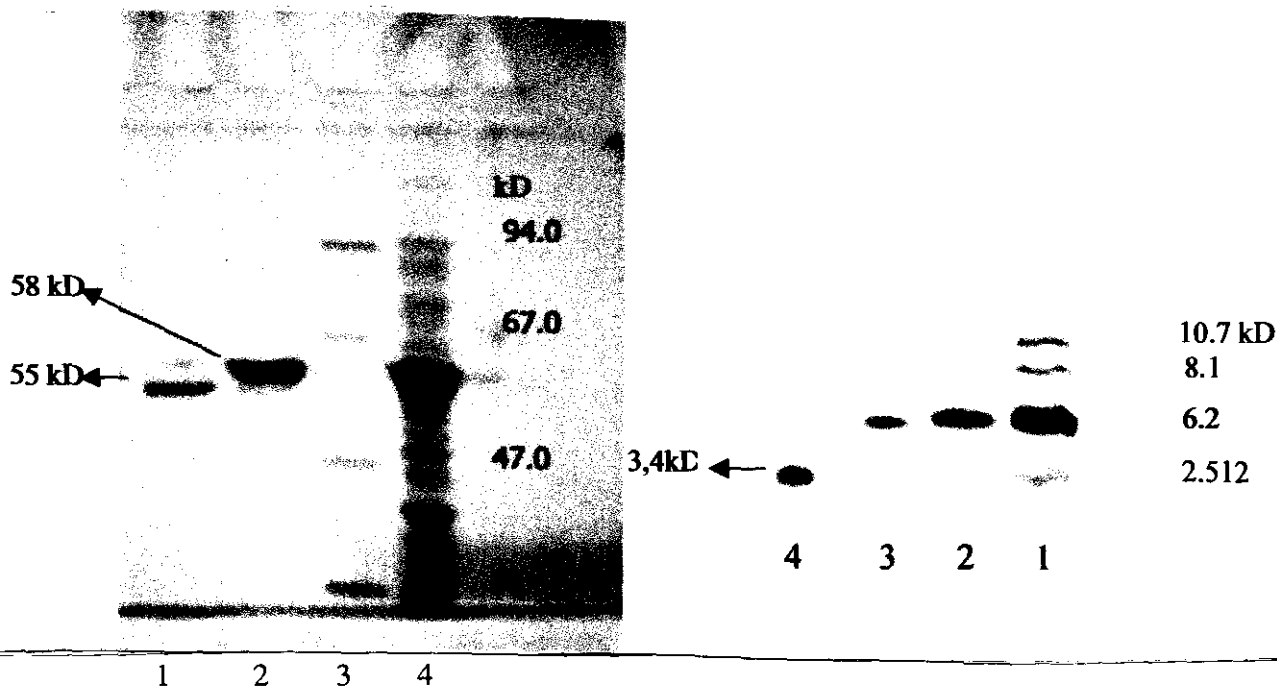
Các kết quả trên chứng tỏ chúng tôi đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp CMTI-V và thu được số lượng protein tái tổ hợp tương đối lớn.

3.3.1.2. Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp ReMCo TI-II

Quy trình thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen TI-II từ PI-17 được trình bày trên sơ đồ 15, sử dụng phương pháp sắc ký ái lực qua cột kitin (chitin) để tinh sạch [40]. Đây là một phương pháp tương đối mới còn ít được sử dụng, ưu điểm chủ yếu là đơn giản. Quy trình tinh sạch bao gồm các bước sau:

1. Cột kitin được cân bằng với đệm CB (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 500mM NaCl).
2. Chế phẩm thô được cho qua cột với tốc độ 1ml/phút.
3. Rửa cột bằng đệm CB cho đến khi hết protein.
4. Cắt trên cột với đệm CB có chứa 0,5mM DTT, giữ ở 4°C trong 40 giờ.
5. Rút bằng đệm CB với thể tích bằng 3 lần thể tích cột.
6. Dịch thu được đông khô và loại muối bằng cột HiTrap.
7. Sản phẩm ReMCoTI-II tinh sạch được kiểm tra trên gel SDS-PAGE 20%.

Kết quả điện di gel kitin trước khi cắt (bước c) và sau khi cắt, rút ReMCoTI-II (bước e) có khối lượng phân tử khác nhau khoảng 3 kD (hình 29). Sản phẩm thu được (ở bước g) chỉ có 1 băng trên SDS-PAGE, có kích thước khoảng hơn 3 kD (hình 31).

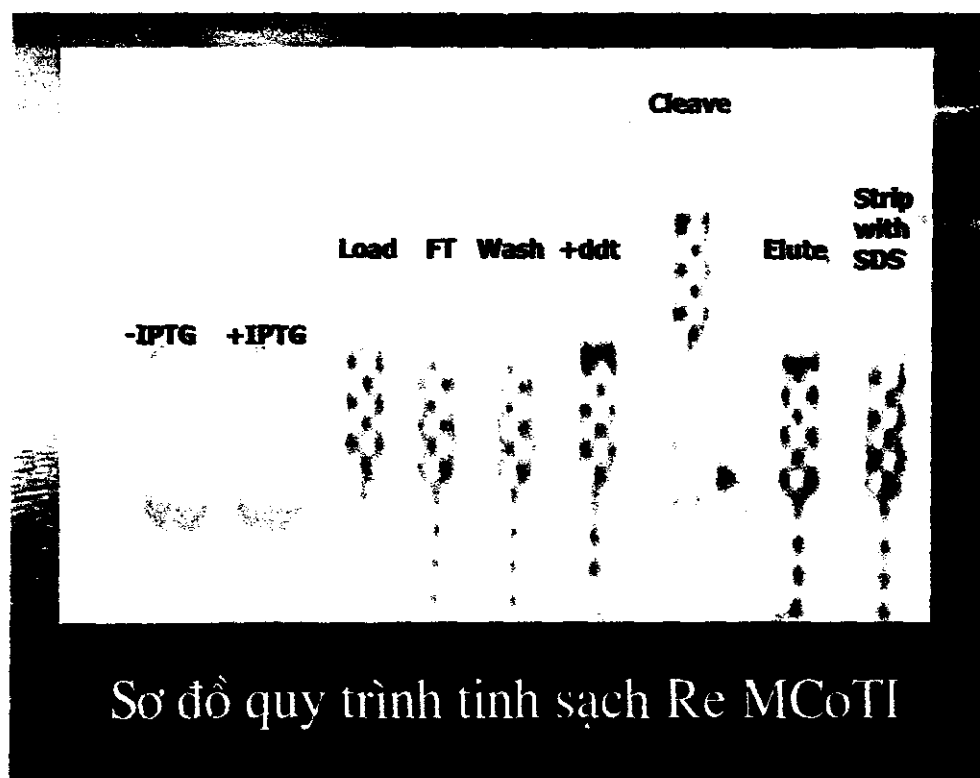
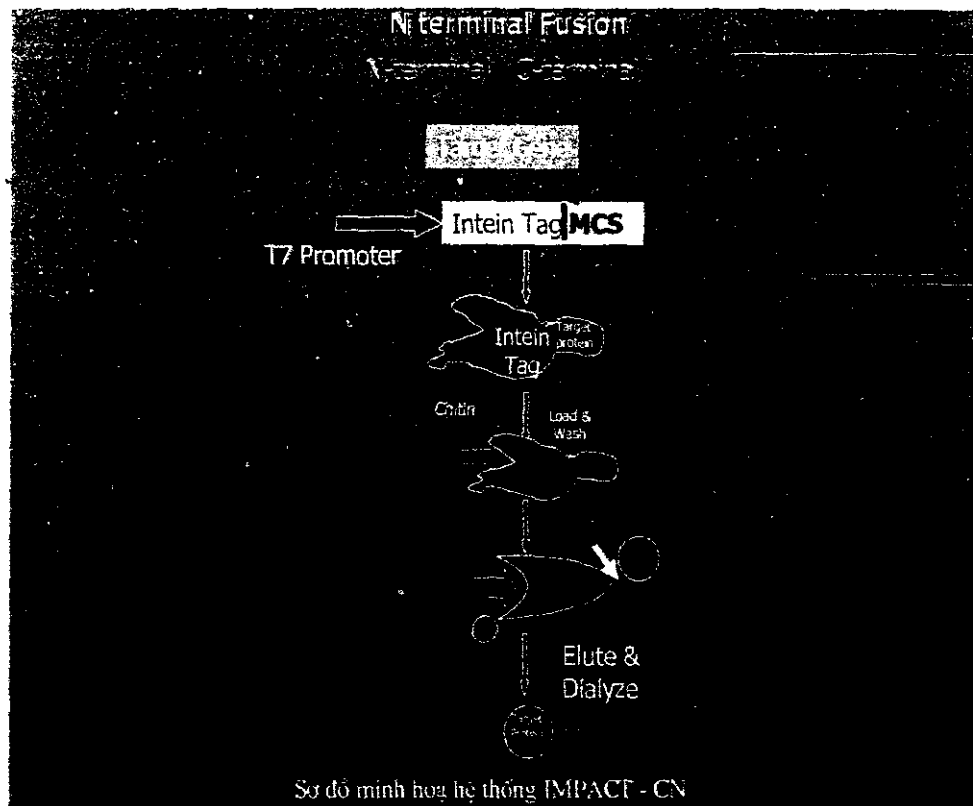


Hình 30: Biến đổi phổ điện di gel kitin trước và sau khi rút ReMCoTI-II.

- 1- Gel kitin sau khi rút ReMCoTI-II
- 2- Gel kitin trước khi rút ReMCoTI-II
- 3- Thang protein chuẩn
- 4- Protein thô thu từ tế bào PI-17

Hình 31: Phổ điện di ReMCoTI-II tinh sạch có kích thước khoảng 3,4kD.

- 1- Thang protein chuẩn
- 2,3- Aprotinin
- 4- ReMCoTI-II



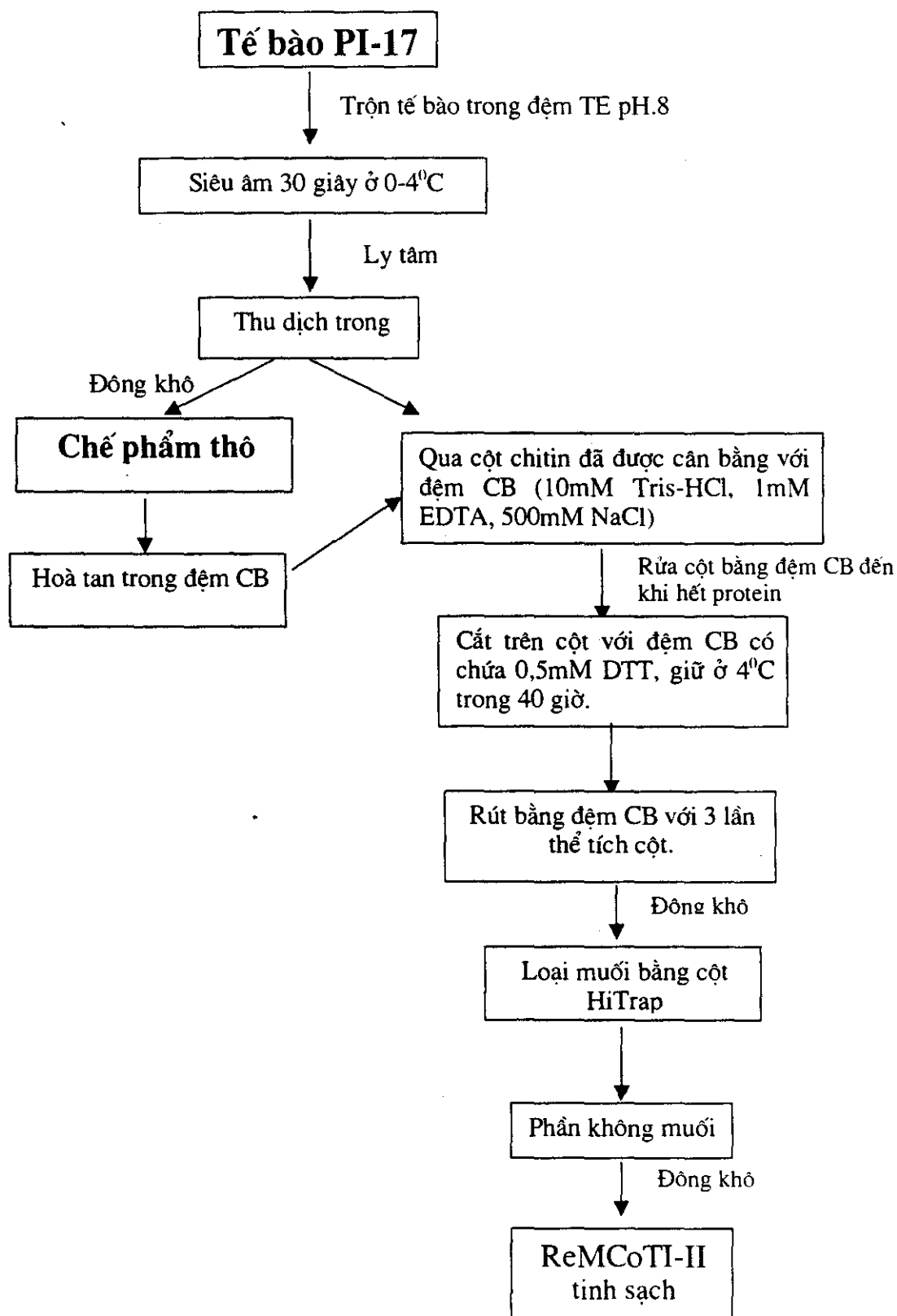
** Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMCoTI-II*

1. Thu nhận tế bào: Sau khi nuôi cấy (1 lít môi trường) vi khuẩn tái tổ hợp PI-17 ở các điều kiện đã lựa chọn, ly tâm 5000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong, thu tế bào, giữ ở -20°C).
2. Phá vỡ màng tế bào: trộn tế bào thu được trong 60ml đệm TE 8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA), siêu âm ở 0-4°C, 10 giây, lặp lại 3 lần, sau mỗi lần nghỉ 1 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ xác tế bào, thu dịch trong để chuẩn bị cho qua cột chitin. Lấy 20µl dịch trong (ký hiệu LC) để điện di.
3. Chuẩn bị cột chitin: 15-20ml gel chitin có thể sử dụng cho tế bào thu được từ 1 lít dịch nuôi cấy. Cân bằng cột trong đệm CB (Column Buffer: 20mM Tris-HCl 1M pH8, 500 mM NaCl, 1mM EDTA) ở 4°C (với khoảng 10 lần thể tích cột). Lấy 20µl gel (ký hiệu N).
4. Lên cột: cho dịch trong thu được qua cột chitin với tốc độ từ 0,5-1ml/min. Lưu ý dịch lên cột phải luôn được làm lạnh ở 4°C.
5. Rửa cột: Sau khi kết thúc lên cột, rửa cột bằng đệm CB với tốc độ 6-8ml/min, thông thường, cần ít nhất 10 lần thể tích cột. Phần húng qua cột được chia làm các phân đoạn, ký hiệu ft1, ft2... (flow through). Rửa đến khi dịch húng hết protein (thử với thuốc thử Folin hoặc đo ở OD₂₈₀). Lấy 20µl gel chitin (ký hiệu N₁) để điện di.
6. Chuẩn bị đệm CB1: gồm đệm CB chứa 50mM DTT, với thể tích gấp 3 lần thể tích cột. Đệm CB1 chỉ được pha ngay trước khi dùng. Cho đệm CB1 đã được làm lạnh qua cột với tốc độ sao cho thời gian chảy qua cột không quá 30 phút. Cuối cùng giữ đệm trên cột cách mặt gel 1cm. Khi cho CB1 qua cột, húng phân xuống cột với mỗi phân đoạn 10ml. Ký hiệu qf1, qf2.... để kiểm tra xem protein đích có bị đẩy xuống cột không. Cột được giữ ở 4°C trong 40 giờ. Trong quá trình này xảy ra phản ứng tự cắt protein đích (MCoTI) khỏi protein dung hợp intein tag [40].
7. Rút protein đích ra khỏi cột bằng đệm CB: Rút hết phần đệm trên mặt gel húng vào một ống, cho tiếp đệm CB lên cột gel và tiếp tục thu mỗi phân đoạn 2ml. Thể tích đệm CB dùng để rút protein đích vào khoảng 10 lần thể tích cột. Lấy 20µl gel chitin trên cột (ký hiệu N₂) để điện di.
8. Điện di trên gel poliacrilamit 12,5% SDS để kiểm tra quá trình tinh sạch qua cột chitin, tiến hành như sau: lấy 20µl các mẫu LC, ft1, ft2 ..., N1, qf1, qf2..., N2 trộn với 4µl đệm mẫu 5X có SDS và β-mercaptoetanol, đun cách thủy trong 8 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút, thu dịch trong để lên gel. nhuộm gel với dung dịch

Coomassie brilliant blue R-250 1% trong metanol : axit axetic : nước (4:1:5), tẩy bằng dung môi trên cho đến khi xuất hiện các băng tím trên nền gel trong suốt.

9. Loại muối các phân đoạn bằng cột loại muối HiTrap: axit axetic 0,005M được dùng để rửa bằng cột cũng như để rút protein. Thu các phân đoạn xuống cột, thử protein với thuốc thử Folin, thử muối bằng AgNO_3 1%. Thu các phân đoạn có protein mà không có NaCl để đông khô.
10. Đồn sản phẩm đã khô vào lọ, đóng nắp, dán nhãn.

Sơ đồ 16. Phương pháp thu nhận sản phẩm protein tái tổ hợp ReMCoTI-II

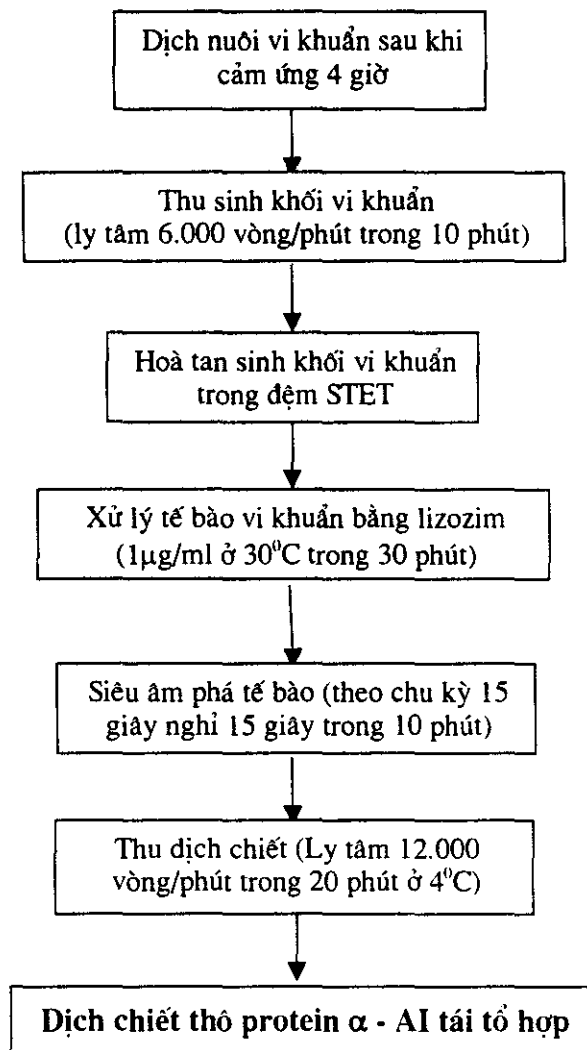


3.3.1.3. Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen α -AI

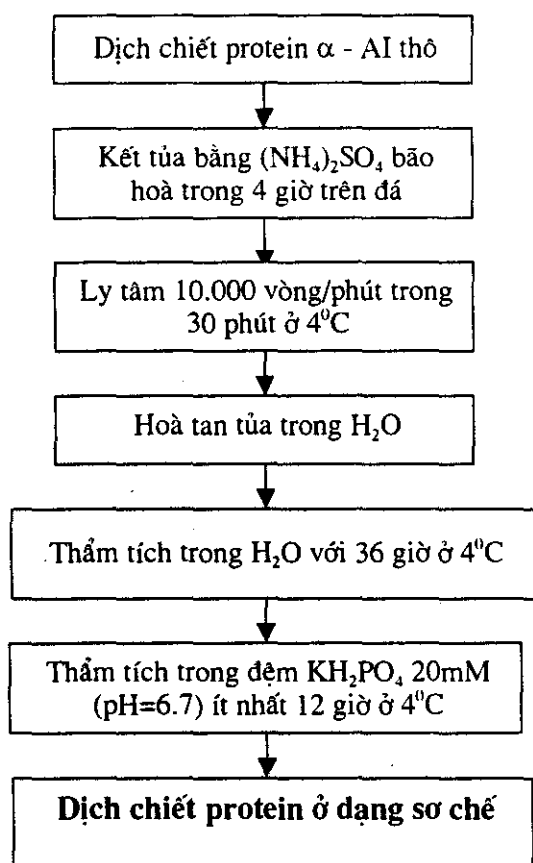
Vì khuẩn *E.coli* BL21 mang gen α - AI tái tổ hợp để sinh tổng hợp protein kìm hãm α -amilaz được nuôi bằng phương pháp nuôi chìm.

- Tách chiết protein tái tổ hợp α - AI từ sinh khối vi khuẩn theo phương pháp sử dụng lizozim và siêu âm.
- Thu protein tái tổ hợp α - AI dạng sơ chế (kỹ thuật) bằng phương pháp kết tủa muối amonisulfate.
- Tinh sạch protein tái tổ hợp α - AI bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE-xelluloz.
- Kiểm tra protein tái tổ hợp bằng phương pháp điện di trên gel poliacrilamit có SDS (SDS – PAGE).
- Kiểm tra hoạt tính ức chế của α - AI tái tổ hợp theo phương pháp của Grossi và cộng sự [29].

Sơ đồ 17: Quy trình tách chiết protein α - AI tái tổ hợp từ sinh khối vi khuẩn (chế phẩm thô)



Sơ đồ 18: Sơ chế protein α - AI tái tổ hợp bằng phương pháp kết tủa muối



Chúng tôi đã tiến hành kết tủa protein α -AI tái tổ hợp bằng muối amonium sulfate bão hoà ở các nồng độ cuối cùng khác nhau 70%, 85% và 90%. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

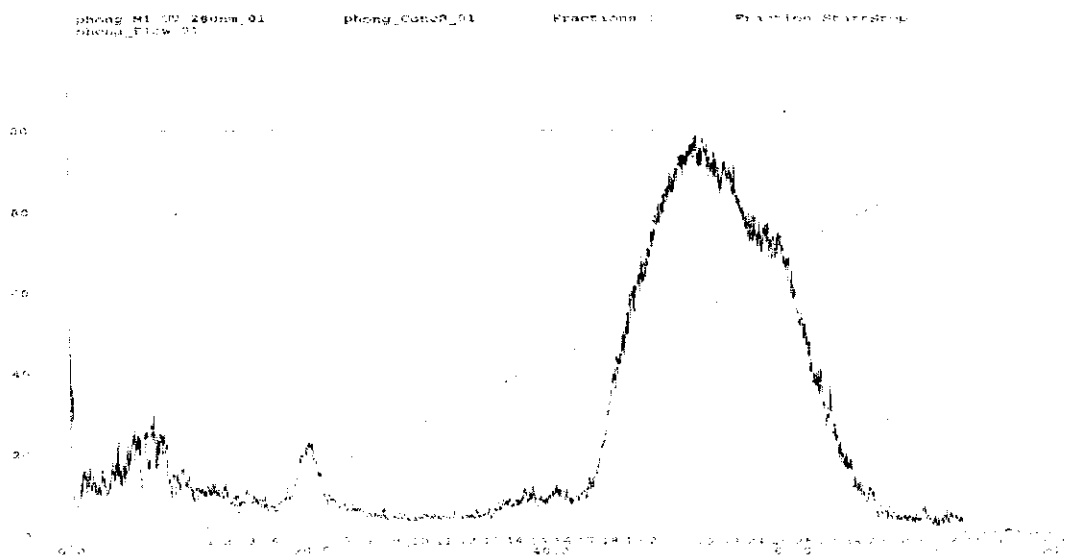
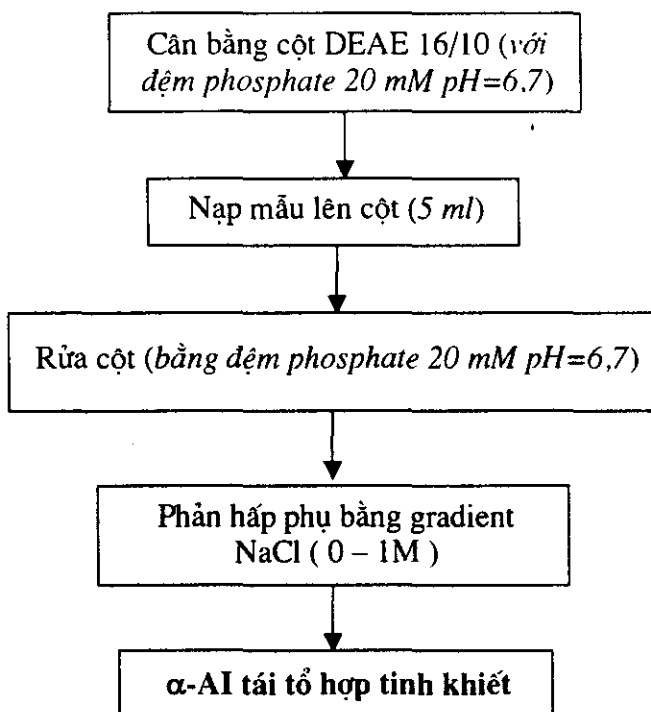
Bảng 1. Khảo sát nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thích hợp thu protein α -AI tái tổ hợp

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % nồng độ bão hoà	Hoạt độ ức chế	Hiệu suất
70	34	39,76
85	62	72,51
90	46	53,79

Kết quả ở bảng 1 cho thấy tại nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 85% bão hoà cho hoạt tính cao nhất.

Dịch chiết protein sau khi kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 85% và loại muối bằng phương pháp thẩm tích sẽ được tiếp tục tinh sạch trên cột sắc ký trao đổi ion DEAE-xelluloz 16/10. Quá trình tinh sạch được thực hiện trên hệ thống tinh sạch tự động FPLC, kết quả sắc ký trao đổi ion được thể hiện trên hình 32. Các bước tiến hành được tóm tắt như sơ đồ 18.

Sơ đồ 19: Tinh sạch protein α - AI bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE xelluloz



Hình 32: Sắc ký đồ qua cột trao đổi ion DEAE xelluloz 16/10

* Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Dịch nuôi vi khuẩn sau khi cảm ứng 4 giờ, ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút để thu sinh khối.
2. Trộn sinh khối vi khuẩn trong đệm STET.

3. Xử lý bằng lizozim (nồng độ 1 μ g/ml) ở 30⁰C trong 30 phút.
4. Tiến hành siêu âm phá tế bào theo chu kỳ 15 giây nghỉ 15 giây trong vòng 10 phút.
5. Ly tâm thu dịch chiết thô: 12.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4⁰C.
6. Kết tủa bằng (NH₄)₂SO₄ 85% bão hoà trong 4 giờ ở t⁰ < 0⁰C.
7. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4⁰C thu kết tủa.
8. Hoà tan tủa trong H₂O khử ion, ly tâm thu dịch trong.
9. Thẩm tích trong nước và đệm KH₂PO₄ 20mM (pH=6,7) ít nhất 12 giờ ở 4⁰C, dịch chiết thu được là dạng chế phẩm sơ chế.
10. Tinh sạch dịch chiết protein ở dạng sơ chế trên cột sắc ký trao đổi ion DEAE celluloz 16/10. Quá trình tinh sạch được thực hiện trên hệ thống tinh sạch tự động FPLC, tốc độ 0,5ml/phút, phân đoạn 2ml/ống. Cột được cân bằng với đệm photphat 20 mM pH=6,7. Thể tích lên cột 5 ml. rửa cột bằng đệm cân bằng cột. Phản hấp phụ bằng đệm cân bằng có gradient NaCl từ 0-1M.

Kiểm tra độ tinh sạch của protein α -AI tái tổ hợp bằng phương pháp điện di kết quả thể hiện ở hình 33.



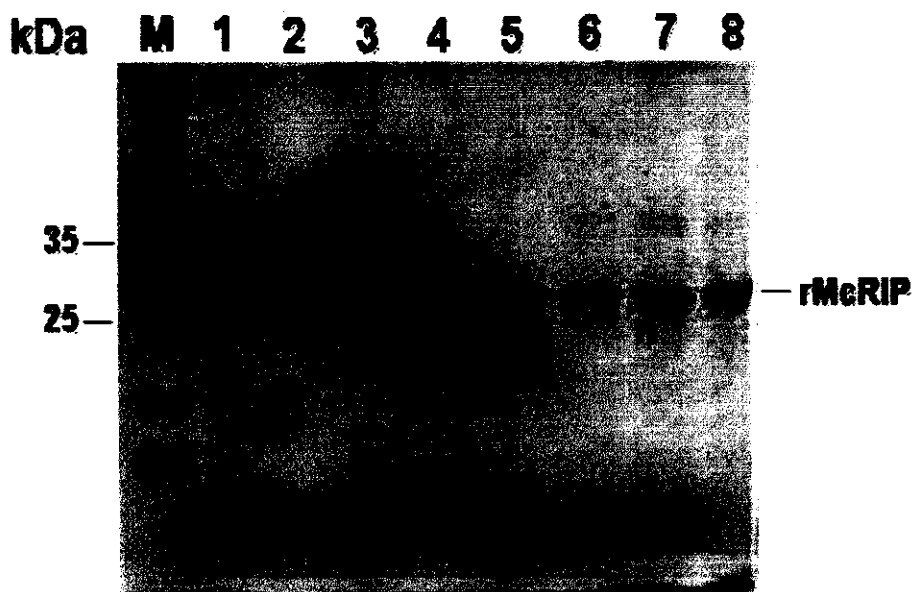
Hình 33: Phổ điện di protein α - AI tái tổ hợp sau khi sắc ký trên SDS- PAGE 12.5%

1. Dịch protein α - AI sau khi qua cột trao đổi ion DEAE
- 2- Protein chuẩn, 3-4 : Dịch protein thô

Qua ảnh điện di đồ cho thấy sau khi sắc ký trao đổi ion thu được protein α -AI tái tổ hợp tương đối sạch, xuất hiện 1 băng protein khá đậm tương ứng 16 kD.

3.3.1.4. Thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mã hoá gen RIP

β - momocharin tự nhiên đã được tinh sạch từ hạt mướp đắng với việc sử dụng đồng thời nhiều loại cột sắc ký như S-Sepharose, Sephadex G-50, CM-Sepharose và Red Sepharose [121] hay DEAE-cellulose và Mono-S [24]. Còn đối với các loại RIP tái tổ hợp thì việc tinh sạch chúng đơn giản hơn, re-MAP30 được tinh sạch qua cột ái lực được nhồi bằng $\text{Ni}(\text{Cl})_2$ [53], Trichobakin (TBK - RIP của *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98) được tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion CM-Sepharose [95]. Do rMcRIP có tính chất tương tự với TBK nên chúng tôi đã lựa chọn phương pháp tinh sạch rMcRIP bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sepharose (XK-16/20).



Hình 34: Điện di đồ ReMcRIP tinh sạch

M. Thang protein chuẩn

1-8. ReMcRIP thu được ở các phân đoạn khác nhau

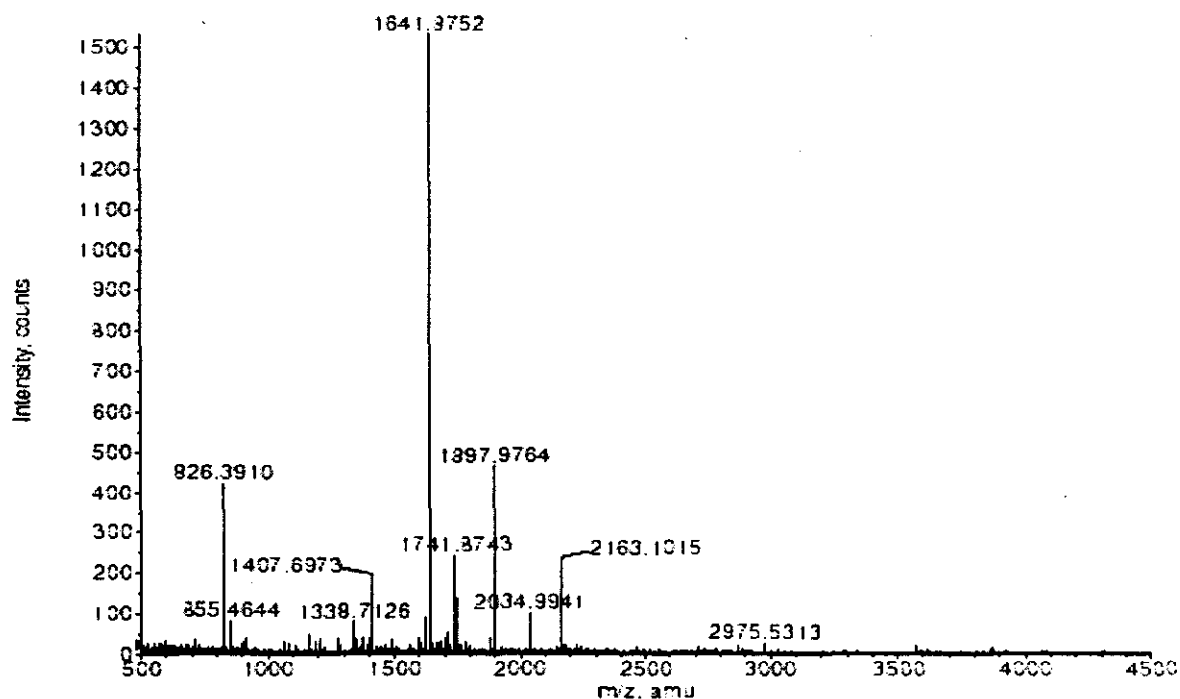
Theo tính toán lý thuyết, ReMcRIP có giá trị pI 8,86. ReMcRIP tan trong đệm Tris-HCl 50 mM pH 7 nên đã tạo điều kiện thuận lợi khi tiến hành tinh sạch. Đệm Tris-HCl 50 mM pH7 đã được sử dụng để đảm bảo cho ReMcRIP mang điện tích dương và có thể liên kết với các nhóm chức năng ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$) của CM-Sepharose. Hơn nữa, với giá trị pH này thì các nhóm trao đổi của CM-Sepharose vẫn mang điện tích dương và cấu trúc hạt của CM-Sepharose ổn định.

ReMcRIP được chiết ra khỏi cột dưới dạng một đỉnh duy nhất bởi gradient nồng độ NaCl (0,0 M - 0,4 M). Kết quả phân tích các phân đoạn thu được ở xung quanh đỉnh phổ sắc ký bằng SDS-PAGE cho thấy protein thu được có dạng một băng duy nhất có

kích thước tương ứng với kích thước lý thuyết của ReMcRIP (Hình 34). Như vậy, chỉ cần sử dụng một cột CM-Sepharose với các thông số kỹ thuật thích hợp chúng tôi đã thu được ReMcRIP tinh sạch. ReMcRIP đã được tinh sạch với lượng lớn (3 - 5 g) và đông khô để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

* Xác định ReMcRIP

Dựa trên trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRIP6* (mã số AJ748278 trên Ngân hàng EMBL), chúng tôi thu được trình tự axit amin suy diễn của ReMcRIP bao gồm 264 axit amin. Để nghiên cứu khối phổ của ReMcRIP, protein này đã được xử lý bằng tripxin.

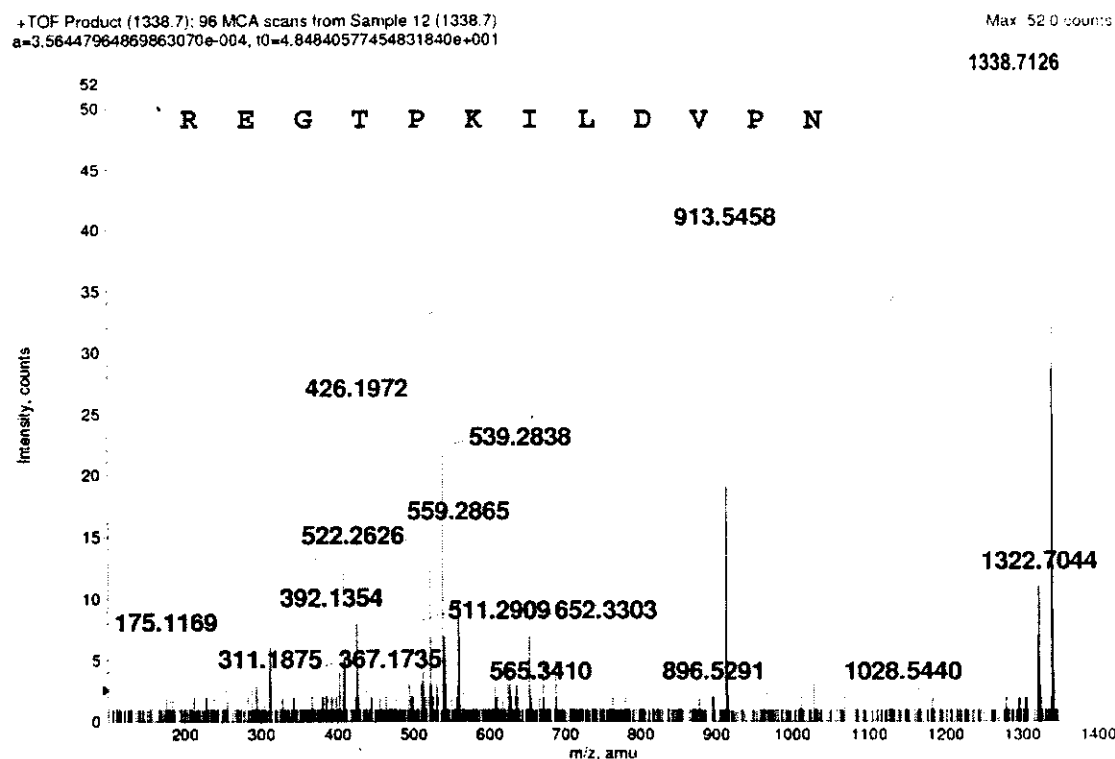


Hình 35: Phổ MALDI-TOF MS của ReMcRIP sau khi xử lý bằng tripxin

Kết quả thực nghiệm thu được trên hình 35 cho thấy, các peptit sau khi thủy phân đều được ghi lại rõ nét. Trên phổ MALDI-TOF MS xuất hiện các đoạn peptit có Mr (do các đoạn peptit có điện tích $z = 1$, nên $KLPT\ m = m/z$) trùng với Mr của các đoạn peptit được tạo ra theo lý thuyết (826,3910 Da; 1338,7126 Da; 1407,6973 Da; 1641,8752; 1741,8743 Da; 2034,9941 Da).

Tuy nhiên, để có thể kết luận chắc chắn về protein đã biểu hiện và tinh sạch được, chúng tôi tiến hành đo khối phổ liên tục MALDI TOF MS/MS của các đoạn peptit có Mr

giống như tính toán lý thuyết. Phổ MALDI-TOF MS/MS của các đoạn peptit này cũng rất rõ nét và đặc trưng (Hình 36).



Hình 36. Phổ MALDI-TOF MS/MS của mảnh peptit có giá trị m/z 1338,7126 amu.

Toàn bộ phổ MALDI-TOF MS/MS của hỗn hợp peptit thu được đã dùng để so sánh với cơ sở dữ liệu về protein của NCBI bằng chương trình tìm kiếm MATRIX SCIENCE MASCOTTM v1.8. Kết quả cho thấy các protein tìm được có số điểm (score) cao nhất (239, 219) đều là RIP (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI

1. gi 6573485		Mass: 29583		Total score: 239			Peptides matched: 8	
Chain A, The Restrained And Minimized Average Nmr Structure Of Map30								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<u>3</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(30)	2	FIEDFR
<u>4</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	44	1	FIEDFR
<u>5</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(27)	4	FIEDFR
<u>7</u>	905,40	904,39	904,43	-0,04	0	17	2	DVSYFFK
<u>8</u>	1203,60	1202,59	1202,64	-0,05	0	72	1	QIFLAQNQGCK
<u>9</u>	1338,70	1337,69	1337,73	-0,04	0	41	4	NPVDLIKPTGER
<u>10</u>	1350,70	1349,69	1349,68	0,01	0	26	1	FQVTNVDSDVVK
<u>11</u>	1407,70	1406,69	1406,71	-0,02	0	39	3	ESPPEAYNILFK

Proteins matching the same set of peptides:

gi|2119758 Mass: 31999 Total score: 236 Peptides matched: 8

rRNA N-glycosidase (EC 3.2.2.22) map30 precursor - balsam pear

gi|11225518 Mass: 32011 Total score: 236 Peptides matched: 8

MAP30I [*Momordica charantia*]

gi|132581 Mass: 32012 Total score: 236 Peptides matched: 8

Ribosome-inactivating protein momordin II precursor (rRNA N-glycosidase)

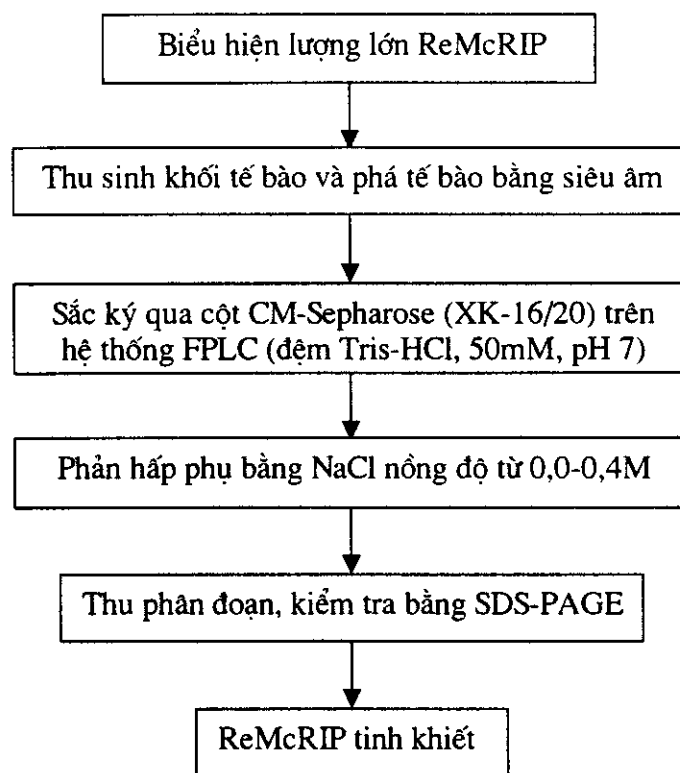
gi|10129818 Mass: 29742 Total score: 219 Peptides matched: 8

ribosome inactivating protein, RIP, type I [*Momordica charantia*]

2. gi 10129818		Mass: 29742		Total score: 219			Peptides matched: 8	
ribosome inactivating protein, RIP, type I [<i>Momordica charantia</i>]								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
3	826,40	82539	825,40	-0,01	0	(30)	2	FIEDFR
4	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	44	1	FIEDFR
5	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(27)	4	FIEDFR
7	905,40	904,39	904,43	-0,04	0	17	2	DVSYFFK
9	1338,70	1337,69	1337,73	-0,04	0	41	4	NPVDLIKPTGER
10	1350,70	1349,69	1349,68	0,01	0	26	1	FQVTNVDSDVVK
11	1407,70	1406,69	1406,71	-0,02	0	39	3	ESPPEAYNILFK
12	1412,70	1411,69	1411,67	0,03,	0	52	1	MDVNFDLSTATAK

Tóm lại, các kết quả phân tích khối phổ liên tục MALDI-TOF MS và MS/MS đã tìm thấy ít nhất 7 đoạn peptit có từ 6 đến 13 gốc axit amin trùng khớp hoàn toàn với trình tự axit amin suy diễn từ gen mã hoá McRIP và các gen khác từ mướp đắng trong ngân hàng của NCBI. Điều này khẳng định protein tái tổ hợp được nhân chính là ReMcRIP.

Sơ đồ 20. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMcRIP



Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Sau khi biểu hiện lượng lớn ReMcRIP tiến hành ly tâm 6.000 vòng/phút trong 6 phút ở 4°C để thu sinh khối tế bào. Bổ sung 30 ml đệm (Tris.HCl 50 mM pH7, EDTA 20 mM pH7, Triton 0,01%, lizozim 0,3 µg/ml) vào 3g sinh khối tế bào. Ủ 37°C và vortex nhằm hòa tan các tế bào. Chuyển ống falcon có tế bào vào trong đá, để 30 phút. Phá tế bào bằng siêu âm trong 20 phút (cho đến khi dung dịch không còn nhớt). Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút. Chuyển phần dịch sang ống falcon mới và bỏ phần cặn.
2. Chuyển phần dịch lên cột CM-Sepharoz (XK-16/20) với tốc độ dòng chảy 60 ml/giờ trên hệ FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). Sử dụng đệm Tris.HCl 50 mM pH 7.
3. Các chất không bám trên cột được rửa bằng đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 cho đến khi giá trị A_{280nm} trở lại đường nền. Tốc độ dòng chảy vẫn duy trì ở 60 ml/giờ.
4. ReMcRIP được thôi ra khỏi cột bởi gradient nồng độ NaCl (0,0 M - 0,4 M) trong đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 với tốc độ dòng chảy 60 ml/giờ và thể tích

mỗi phân đoạn là 1 ml. Protein trong mỗi phân đoạn được kiểm tra bằng SDS-PAGE 12,5%.

5. Lựa chọn các phân đoạn có nồng độ ReMcRIP cao, chuyển vào các ống penicillin (có thể bảo quản ở - 20°C). Đông khô ReMcRIP ở áp suất khoảng 100 mtor và nhiệt độ khoảng - 102°C. Bảo quản ReMcRIP ở -20°C để giữ hoạt tính của ReMcRIP.

♦ Hiệu suất tinh sạch các protein tái tổ hợp

ReCMTI-V:

Bảng 3. Tóm tắt kết quả tinh sạch ReCMTI-V

Số TT	Giai đoạn tinh sạch	Protein		TIA		HĐR (mIU/mg protein)	Số lần tinh sạch
		mg	%	mIU	%		
1	Dịch sonicate của tế bào tái tổ hợp thu được từ 1 lít	890,89	100	Protein tạp nhiều không xác định được			
2	Sau khi xử lý loại các protein tạp	142,54	16	76,0	100	0,533	1,0
3	Loại màu qua cột DEAE – xenluloz	133,63	15	75,5	99,3	0,565	1,06
4	Qua cột HiTrap Q phản hấp phụ ở 0,1 M NaCl, loại muối, đông khô	115,8	13	74,9	98,5	0,647	1,21

HDR: Hoạt động riêng

Re α -AI:

Bảng 4. Tóm tắt kết quả tinh sạch Re α -AI

Các bước tinh sạch	Tổng thể tích (ml)	Hàm lượng protein (mg)	Hoạt độ (U)	Hoạt độ riêng (U/mg protein)	Mức độ sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Dịch thô	45	185,0	963,0	5,20	1,00	100
Sau kết tủa (NH ₄) ₂ SO ₄	15	56,4	900,0	15,95	3,00	93,45
Dịch sau sắc ký qua cột DEAE -Xelluloz	24	7,2	403,2	56,00	10,76	41,86

ReMcRIP:

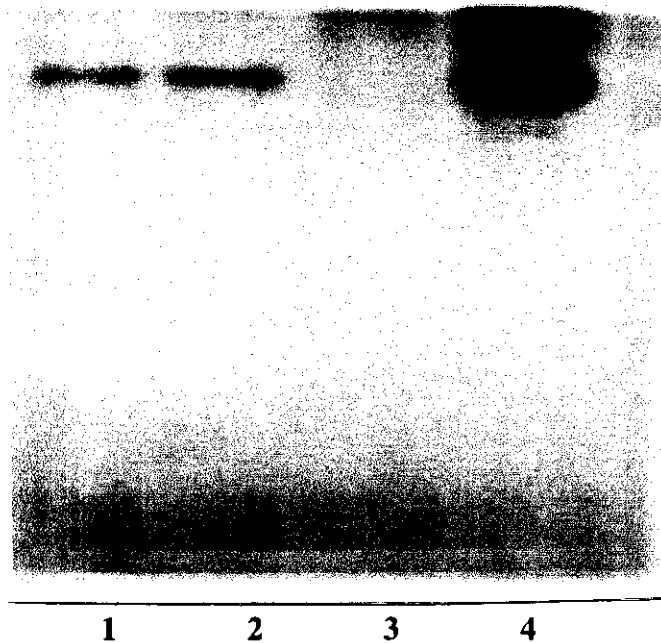
- ReMcRIP chiếm khoảng 30% protein tổng số của vi khuẩn *E. coli*, trong đó khoảng 80% ReMcRIP ở dạng hoà tan trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM, pH 7; EDTA 20 mM, pH 7.
- ReMcRIP hấp phụ tốt trên cột CM-Sepharoz (XK-16/20): khoảng 90% ReMcRIP của 0,3 ml dịch nuôi được đưa lên cột dài 12-15 cm.
- ReMcRIP được phản hấp phụ ở nồng độ NaCl từ 0,15-0,27M.
- Kiểm tra độ sạch và nồng độ ReMcRIP: 1 lit dịch nuôi *E. coli* thu được khoảng 30 mg ReMcRIP tinh sạch.

3.3.2. Kiểm tra hoạt tính của các chế phẩm protein tái tổ hợp

3.3.2.1. Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp ReCMTI-V

+ Kiểm tra hoạt tính ức chế tripxin

Đã tiến hành kiểm tra hoạt độ ức chế tripxin (TIA) và bằng phương pháp điện di trên gel poliacrilamit 15% không có SDS, có cơ chất [56] băng protein có TIA sẽ có màu xanh trên nền trắng. Kết quả trên hình 37 cho thấy có một băng TI chủ yếu (băng màu xanh đậm).



Hình 37: Phổ điện di TI trên PAG 15% có cơ chất
 1,2 - ReCMTI-V tinh sạch qua cột HiTrap Q
 3. Đối chứng: BL21-TI (không có chất cảm ứng)
 4. ReCMTI-V thô

+ Kiểm tra ảnh hưởng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu

Nơi thực hiện: Khoa Đông- Cầm máu – Viện Huyết học truyền máu trung ương

Người thực hiện: Thạc sĩ Y khoa – Bác sĩ Nguyễn Thị Nữ - Chủ nhiệm khoa

Kết quả nghiên cứu của một số tác giả trước đây [34, 44] cho thấy CMTI-V còn có tác dụng ức chế yếu tố XIIa (một proteinaz xerin) xúc tác cho phản ứng đầu tiên của quá trình đông máu. Nếu ức chế yếu tố này sẽ kéo dài thời gian đông máu. Điều này có ý nghĩa thực tế: *ức chế yếu tố XIIa sẽ làm hạn chế những tình trạng tăng đông máu nhất là tăng đông do phát động quá mức yếu tố tiếp xúc thường gặp trong phẫu thuật da chấn thương, tai biến sản khoa...* *Ức chế yếu tố XIIa sẽ là một chất chống đông hiệu quả và an toàn hơn heparin vì phổ tác dụng của nó không rộng như heparin. Vì vậy, ức chế XIIa có thể được sử dụng để điều trị dự phòng trong phẫu thuật sẽ an toàn hơn heparin.*

Chúng tôi đã thử nghiệm ảnh hưởng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu bằng các xét nghiệm các chỉ số sau:

- + APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) để đánh giá đường đông máu nội sinh.
- + PT (Prothrombin Time) để đánh giá đường đông máu ngoại sinh.

+ TT (Thrombin Time) để đánh giá đoạn trung chuyển từ fibrinogen thành fibrin dưới tác dụng của thrombin.

Các xét nghiệm này được tiến hành trên máy ACL 100, bằng hoá chất của hãng IL với điều kiện xét nghiệm như sau:

Trộn chế phẩm với huyết tương bình thường để phát hiện tác dụng của chế phẩm lên hệ thống đông máu (sử dụng NaCl 0.9% thay cho chế phẩm ở nhóm đối chứng).

Bảng 5: Thử tác dụng của chế phẩm ReCMTI-V đến quá trình đông máu

	Có ReCMTI-V (55mIU/ml) + HTBT (tỉ lệ 1:1)	Đối chứng + HTBT
APTT (giây)	60,3	40,2
TT (giây)	18,3	22,3
PT (giây)	13,0	14,3

Kết quả trên bảng 5 cho thấy khi có ReCMTI-V giá trị APTT tăng lên rõ rệt nghĩa là kéo dài thời gian đông máu nội sinh so với đối chứng, như vậy ReCMTI-V có tác dụng ức chế đường đông máu nội sinh. Từ kết quả trên, đã tiến hành thử tác dụng các nồng độ khác nhau của ReCMTI-V đến APTT (bảng 6).

Bảng 6: Kết quả đánh giá tác dụng của ReCMTI-V đến con đường đông máu nội sinh (chỉ số ATTP)

Số TT	Mẫu pha trộn ReCMTI-V với HTBT		ATTP (giây)					
			Thí nghiệm (có ReCMTI-V)		Đối chứng (thay ReCMTI-V bằng NaCl)		HTBT	
			Không ủ	ủ ở 37°C/1 giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1 giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1 giờ
	Thể tích ReCMTI-V	Thể tích HTBT	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1.	1	1	52,3	102,0	39,3	39,5	29,3	29,5
2.	1	2	44,5	80,2	36,1	36,6	29,3	29,5
3.	1	3	40,5	56,8	34,0	34,8	29,3	29,5
4.	1	4	35,5	48,5	32,2	33,0	29,3	29,5
5.	1	5	34,0	44,1	31,0	32,1	29,3	29,5

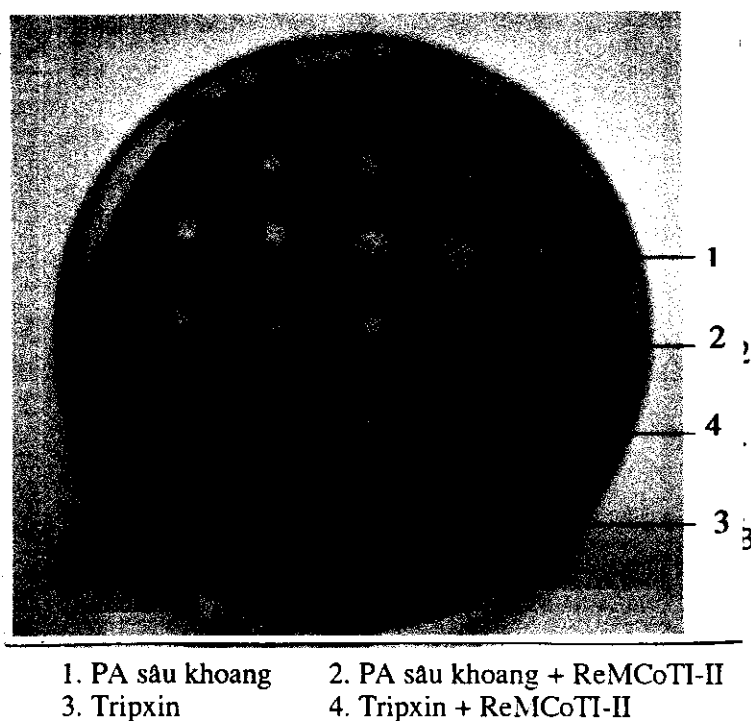
Chú thích: Mẫu ReCMTI-V: 1ml có 85mg protein, 55mIU ; HTBT: Huyết tương bình thường ; Đối chứng: Thay dung dịch ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9% (cùng thể tích)

So sánh các số liệu ở cột 2 (có ReCMTI-V với HTBT) với số liệu của cột 5 (thay ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9%) ở bảng 4 ta thấy khi có ReCMTI-V ở tất cả các nồng độ khác nhau, chỉ số ATTP (ở cột 2) luôn lớn hơn các giá trị ATTP tương ứng ở mẫu đối chứng (cột 5). Điều đó chứng tỏ khi có ReCMTI-V kéo dài thời gian đông máu nội sinh, nói cách khác là ức chế đường đông máu nội sinh. Tác dụng ức chế tăng lên rõ rệt khi ủ ở 37°C trong 1 giờ (cột 3). Ở các nồng độ ReCMTI-V thấp, sự sai khác giữa mẫu có ReCMTI-V và mẫu đối chứng chỉ thấy rõ sau khi ủ ở 37°C/ 1 giờ (so sánh cột 3 và cột 6).

3.3.2.2. Thử hoạt tính của ReMCoTI-II

Đã tiến hành thử hoạt tính của ReMCoTI-II đối với proteinaz của sâu khoang bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: khi có chất ức chế, cơ chất không bị phân giải sẽ bị nhuộm màu xanh với amido đen 10B. Do đó vòng phân giải (vòng sáng) sẽ bé hơn hoặc không thấy.

Kết quả trên hình 38 cho thấy vòng phân giải ở giếng 2 (có dung dịch ReMCoTI-II) bé hơn hẳn vòng phân giải ở giếng 1 (đối chứng, thay ReMCoTI-II bằng nước cất). Điều đó chứng tỏ ReMCoTI-II có tác dụng kìm hãm proteinaz của sâu khoang. So sánh giếng 4 và giếng 3 cũng thấy rõ ReMCoTI-II kìm hãm tripxin.



Hình 38: Ảnh hưởng của ReMCoTI-II ở các nồng độ khác nhau đến hoạt tính ức chế proteinaz sâu khoang và tripxin

3.3.2.3. Kiểm tra hoạt tính của chế phẩm α -AI tái tổ hợp

Kết quả kiểm tra hoạt tính sau kết tủa muối và tinh sạch qua cột DEAE được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 7: Kết quả kiểm tra hoạt tính của α -AI sau kết tủa muối và tinh sạch qua cột DEAE

Các bước làm sạch	Hoạt độ kìm hãm (U/ml)	% ức chế
Dịch α -AI tái tổ hợp thô	41	47,95
Sau kết tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62	72,51
Sau sắc ký DEAE-cellulose	80	92,98

Qua kết quả ở bảng trên ta thấy rằng hoạt tính của α - AI tăng lên sau khi sơ chế đạt (24,56%) và sau khi tinh sạch đạt (50,03%).

Thử hoạt tính của chế phẩm lên côn trùng

Dịch chiết thô sau đó được kiểm tra hoạt tính theo phương pháp của Grossi et al (1997) như sau:

5 μ l enzym α -amilaz tụy tạng được ủ trước với 20 μ l dịch chiết thô α -AI ở 37 $^{\circ}$ C trong 1 giờ (tổng thể tích phản ứng là 250 μ l với đệm B). Sau đó bổ sung 250 μ l cơ chất (tinh bột tan 1% trong đệm B), ủ 30 $^{\circ}$ C trong 10 phút. Dừng phản ứng bằng cách bổ sung 500 μ l DNS (axit 3,5 dinitrosalisilic). Đun sôi cách thủy 10 phút. Bổ sung 5 ml H₂O. để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Đo độ hấp thụ ở 546nm. (Chú thích : Thành phần đệm B đệm phosphate 100 mM, pH=5.8, NaCl 20 mM; 0,1 mM CaCl₂).

Với phương pháp như trên chúng tôi đã thu được kết quả xác định hoạt tính thể hiện trên bảng 8.

Bảng 8: Bảng kết quả xác định hoạt tính của α -AI

	ĐC	Không chất ức chế	α -AI không cảm ứng	α -AI có cảm ứng
α A (μ l)	0	5	5	5
α AI (μ l)	0	0	20	20
Đệm B (μ l)	250	245	225	225
Hoạt độ α A(U/ml)	0	342	305	178
Hoạt độ kìm hãm α AI (U/ml)			9	41
% ức chế		0	10,81	47.95

Chú thích : α A $\rightarrow$ α -amilaz

Qua bảng 8 ta thấy rằng hoạt tính của enzym α -amilaz đã bị giảm đi 47,95% ở dịch thô có cảm ứng. Điều đó chứng tỏ trong dịch chiết thu được có chứa α - AI hoạt động.

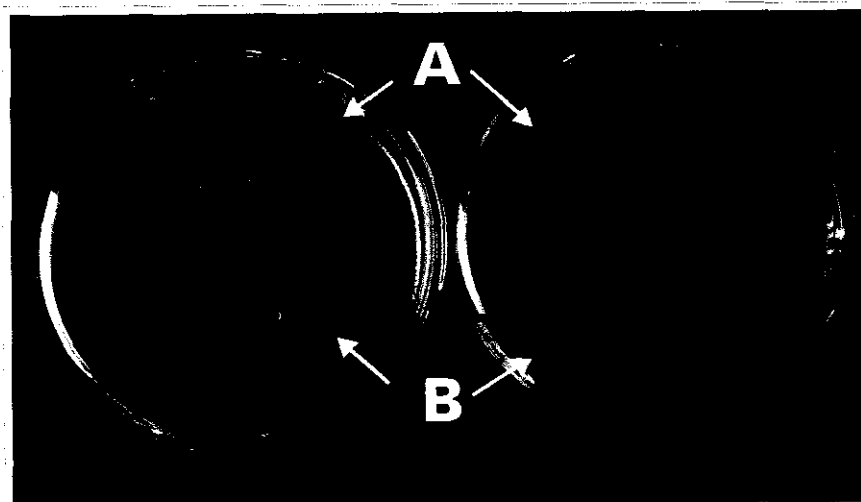
Chúng tôi đã tiến hành thăm dò khả năng diệt một đục hạt (ngô, đậu) của chế phẩm α - AI theo các nội dung như sau :

- Khả năng diệt côn trùng, ấu trùng (mọt đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vảy) trên các đối tượng ngô, đậu, thóc theo lượng và thời gian. Chế phẩm α -AI được pha loãng theo các nồng độ khác nhau sau đó được phun lên các loại hạt ngũ cốc đã được nghiền nhỏ theo tỷ lệ 20 ml dịch pha loãng/ 1kg ngô. Kết quả cho thấy với hàm lượng 0,1 – 0,4% trong thời gian 5 – 7 ngày diệt được 50-60%.

- Nếu cho ăn trực tiếp với liều lượng 0,25%, sau 8 ngày mẫu thí nghiệm mọt chết hoàn toàn, còn mẫu đối chứng không có con nào chết (Kết quả Viện Cơ điện và Công nghệ sau thu hoạch).

3.3.2.4. Kiểm tra hoạt tính của chế phẩm ReMcRIP tái tổ hợp

Chúng tôi đã kết hợp với các nhóm nghiên cứu của Học viện Quân Y (GS. TS. Lê Bách Quang) và Phòng Vi sinh vật học phân tử - Viện Công nghệ Sinh học (TS. Nguyễn Thị Kim Cúc) tiến hành các nghiên cứu về tác động của ReMcRIP tinh chế lên vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*). Kết quả cho thấy ReMcRIP có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của hai loài vi khuẩn nói trên (Hình 39).



A: 40 µg rMcRIP/ giếng thử; B: 60 µg rMcRIP/ giếng thử

Hình 39. Hoạt tính kháng khuẩn của ReMcRIP.

Ngoài ra, chúng tôi cũng đang phối hợp với PGS. TS. Nguyễn Thuỳ Châu - Viện Cơ khí nông nghiệp và Công nghệ Sau thu hoạch, Bộ Nông nghiệp và phát

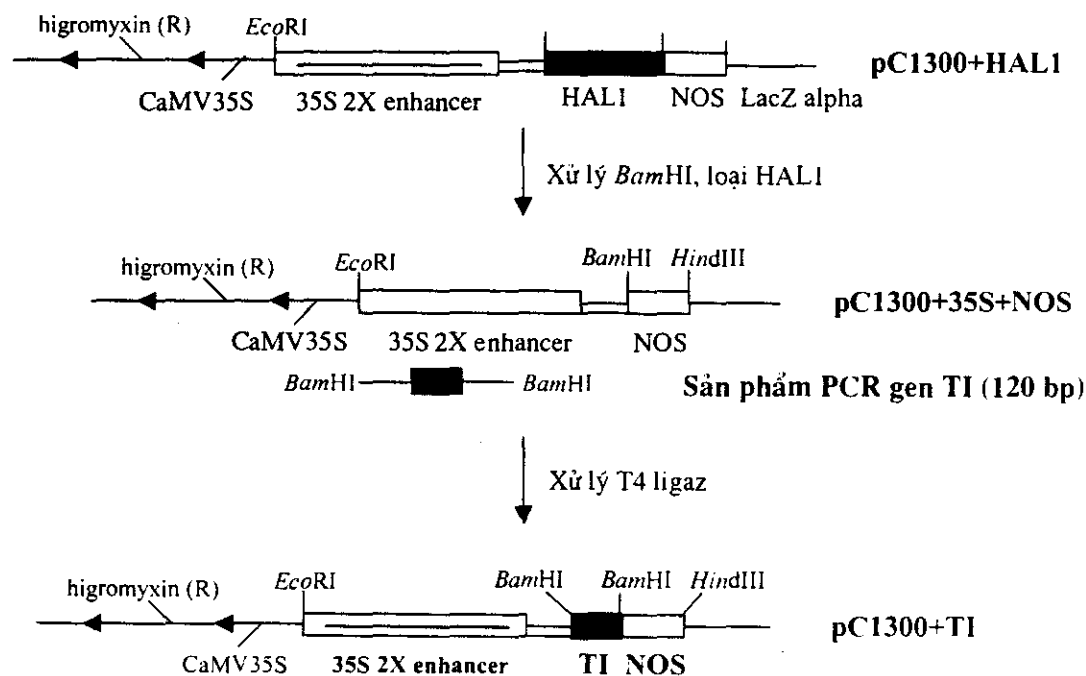
triển nông thôn tiến hành các nghiên cứu về tác động của ReMcRIP tinh chế lên một gạo; nấm mốc (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*).

3.4. THIẾT KẾ CÁC VECTƠ MANG GEN TÁI TỔ HỢP PHỤC VỤ CHO CHUYỂN GEN VÀO CÂY TRỒNG

3.4.1. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá chất kìm hãm tripxin (TI-II)

3.4.1.1. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI mang gen TI dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer

Đoạn gen TI muốn được chuyển vào cây trồng thông qua phương pháp *A. tumefaciens* thì cần được gắn vào vùng T-ADN trên Ti-plasmit. Hơn nữa, để biểu hiện được trong tế bào thực vật thì gen phải nằm trong một kết cấu hoàn chỉnh với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Vì vậy, sau khi nghiên cứu bản đồ một số Ti-plasmit tái tổ hợp trên cơ sở vectơ pCAMBIA, chúng tôi nhận thấy Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+HAL1 mang kết cấu gen: đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen HAL1 + đoạn kết thúc NOS phù hợp với yêu cầu thiết kế gen TI. Trong pC1300+HAL1, gen HAL1 đã được kết nối với đoạn khởi động và đoạn kết thúc bởi enzym giới hạn *Bam*HI. Điểm nhận biết của enzym này cũng không có mặt trong vùng mang mã của gen TI. Như vậy, về lý thuyết, gen HAL1 có thể được loại khỏi kết cấu gen và thay thế gen TI vào vị trí HAL1 nhờ sử dụng enzym *Bam*HI. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn pC1300+HAL1 làm vật liệu khởi đầu cho các thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI. Sơ đồ thí nghiệm được trình bày trên hình 40.



Hình 40. Sơ đồ thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI

3.4.1.2. Thiết kế cặp mồi đặc hiệu và nhân gen TI

* **Thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân gen TI:** Trên cơ sở trình tự gen TI, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân đoạn gen TI (dạng đoạn *Bam*HI) với kích thước ~ 120 bp. Cặp mồi thiết kế được ký hiệu là TI-F/ TI-R. Để kết nối gen TI vào vị trí *Bam*HI ở giữa đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS (như đã trình bày trên hình 40), chúng tôi đã thiết kế điểm nhận biết của enzym *Bam*H I ở cả hai mồi TI-F và TI-R. Tuy nhiên, đối với mồi TI-R, ngoài điểm nhận biết của *Bam*HI, chúng tôi cũng đưa thêm điểm nhận biết của enzym *Hind* III ở mồi TI-R tạo cơ sở để kiểm tra chiều gắn của gen TI. Trình tự của cặp mồi như sau:

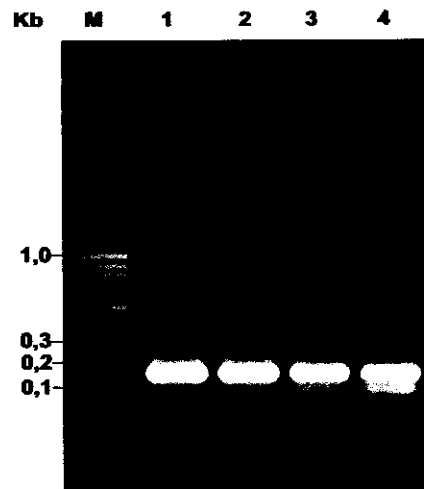
TI-F: 5' - GCGGATCCATGAGCGGCAGCGATGGCGG - 3'

*Bam*H I

TI-R: 5' - GCGGATCCCAAGCTTAGCCGCAATAGCCG - 3'

*Bam*H I *Hind* III

* **Nhân gen TI:** Sử dụng cặp mồi TI-F/ TI-R và ADN plasmit tách dòng pTI-17 mang gen TI với các nồng độ khác nhau, chúng tôi đã tiến hành PCR nhân gen TI (dạng đoạn *Bam*H I). Sản phẩm PCR thu được rất đặc hiệu có kích thước ~ 120 bp phù hợp với tính toán lý thuyết (hình 41).



Hình 41. Sản phẩm PCR nhân gen TI sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 với các nồng độ khác nhau

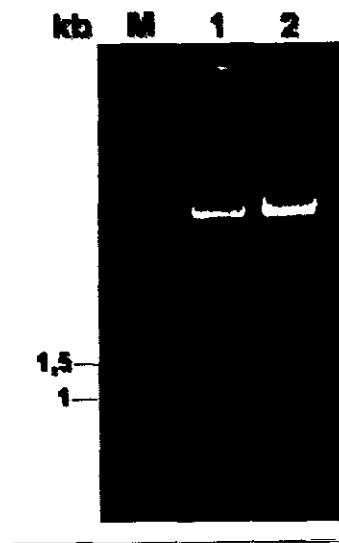
M: Thang ADN chuẩn 100 bp

1. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 (1X)
2. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 (pha loãng 5X)
3. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 (pha loãng 10X)
4. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pTI-17 (pha loãng 20X)

3.4.1.3. Thiết kế Ti-plasmit trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 và mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer

Trên cơ sở phân tích lý thuyết, chúng tôi đã xử lý pC1300+HAL1 mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + HAL1 + NOS bằng *Bam*HI, loại bỏ gen HAL1 nhưng giữ lại đoạn khởi động 35S 2 X enhancer và đoạn kết thúc NOS nhằm tạo ra một vectơ trung gian pC1300+35S+NOS (khuyết gen HAL1 nhưng vẫn mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS) (hình 41). Vectơ này là nguyên liệu để lai ghép với gen TI. Gen TI, khi được thay thế vào vị trí của gen HAL1 sẽ chịu sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer này.

Về lý thuyết, sản phẩm thu được khi xử lý pC1300+HAL1 mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + HAL1 + NOS bằng *Bam*H I là hai đoạn có kích thước ~ 1,2 kb (tương ứng với gen HAL1) và ~ 10 kb (tương ứng với pCAMBIA1300 + 35S 2X enhancer + NOS). Đoạn ADN có kích thước ~ 10 kb được chúng tôi tinh sạch và xử lý với enzym T4 ligaz nhằm đóng vòng vectơ. Kết quả chọn dòng tế bào mang vectơ trung gian pC1300+35S+NOS được trình bày trên hình 42.



Hình 42. Thiết kế vectơ trung gian pC1300+35S+NOS

M: Thang ADN chuẩn 1kb

1. pC1300+35S+NOS/*Bam*H I

2. pC1300+HAL/*Bam*H I

Rõ ràng, sản phẩm xử lý ADN plasmit tái tổ hợp sau khi chọn lọc sơ bộ bằng *Bam*HI là một băng duy nhất (cột 1, hình 42). Trong khi, mẫu đối chứng pC1300+HAL xử lý bằng *Bam*HI có một gen HAL1 kích thước ~ 1,2 kb (cột 2, hình 42). Vectơ trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 được chúng tôi tinh sạch lượng lớn. Sản phẩm tinh sạch được sử dụng cho phản ứng lai ghép với gen TI tạo Ti-plasmit tái tổ hợp.

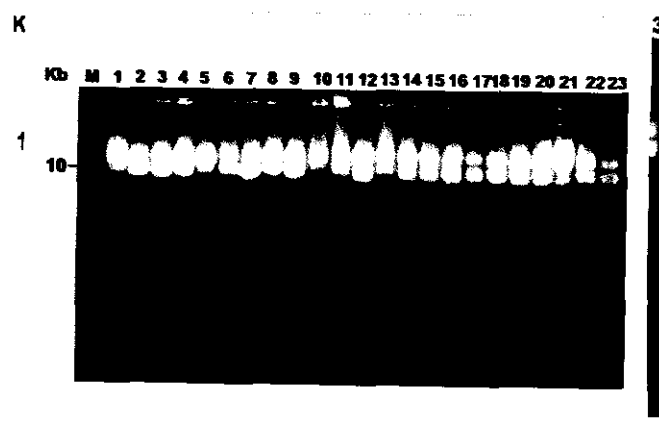
3.4.1.4. Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI mang gen TI dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer

- **Tinh sạch gen TI:** Sản phẩm PCR (lượng lớn) nhân gen TI sử dụng cặp mồi TI-F/TI-R và khuôn là plasmit pTI-17 được chúng tôi xử lý bằng enzym giới hạn *Bam*HI và tinh sạch phục vụ cho thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp.

- Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI

Sản phẩm PCR nhân gen TI sau khi xử lý bằng *Bam*HI, tinh sạch, được gắn trực tiếp vào vectơ trung gian pC1300+35S+NOS (trước đó đã mở vòng bằng *Bam*HI) và biến nạp vào *E. coli* chủng DH5 α để chọn lọc, nhân Ti-plasmit tái tổ hợp với lượng lớn phục vụ thí nghiệm chuyển plasmit này vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Dòng các tế bào *E. coli* thu nhận được sau khi biến nạp sản phẩm lai giữa pC1300+35S+NOS với gen TI được chúng tôi tiến hành tách chiết plasmit và chọn lọc các plasmit có kích thước nhỏ hơn plasmit đối chứng (pC1300+35S+NOS) (hình 43).



Hình 43. Chọn dòng Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI

M: Thang ADN chuẩn 1kb

1 → 22. Plasmit pCTI-1 → pCTI-22

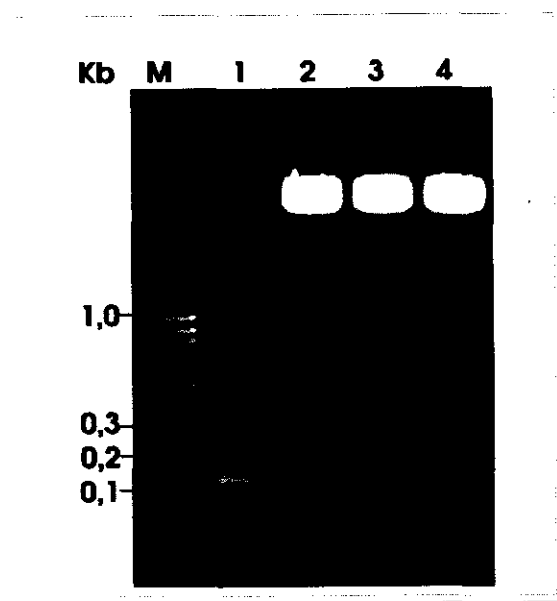
23. Plasmit pC1300+35S+NOS (đối chứng)

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI có kích thước khoảng 10,2 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 10 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký hiệu là pCTI-1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 21 và pCTI-22 (cột 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 21 và 22, hình 43). Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmit để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

3.1.4.5. Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzym giới hạn

Như đã trình bày, trong vector pC1300+35S+NOS, điểm nhận biết của enzym *Bam*HI nằm giữa đoạn khởi động 35S X2 enhancer và đoạn kết thúc NOS. Như vậy, nếu gen TI được gắn vào vector tại vị trí *Bam*HI thì khi xử lý bằng enzym này sản phẩm sẽ là hai băng: một băng tương ứng với kích thước của vector trung gian (mở vòng) và một băng tương ứng với kích thước của gen TI (khoảng 120 bp).

Kết quả xử lý bằng enzym giới hạn *Bam*HI đối với 3 dòng pCTI-1, pCTI-5, pCTI-6 được trình bày trên hình 44. Sản phẩm xử lý bởi enzym này là 2 băng hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy, chúng tôi đã sơ bộ chọn lọc được 3 dòng tế bào có mang gen TI.



Hình 44. Kiểm tra Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI bằng enzym giới hạn *Bam*HI

M: Thang ADN chuẩn 100 bp

1. Sản phẩm PCR nhân gen TI sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (đối chứng)

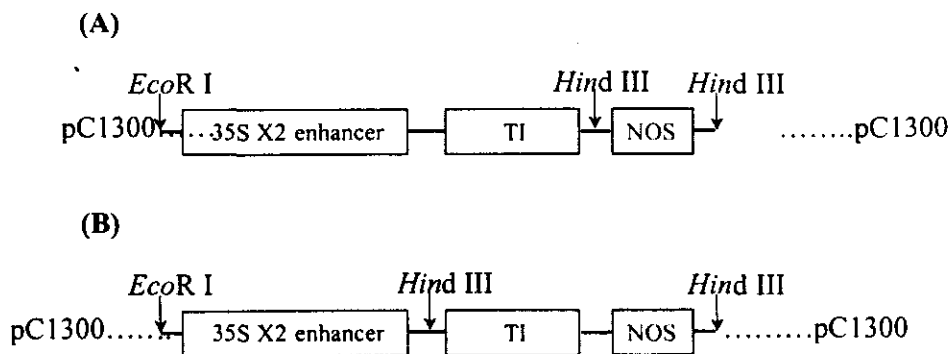
2. Plasmid pCTI-1/ *Bam*H I 3. Plasmid pCTI-5/ *Bam*H I

4. Plasmid pCTI-6/ *Bam*H I

3.1.4.6. Kiểm tra chiều gắn của gen TI trong Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI

Các Ti-plasmid tái tổ hợp có chứa gen TI như pCTI-1, pCTI-5 và pCTI-6 tiếp tục được kiểm tra bằng cách cắt đơn với enzym giới hạn *Hind*III và cắt kép với hai enzym *Hind*III và *Eco*RI. Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI có hai điểm nhận biết của *Hind*III: một điểm nằm cuối gen TI (thuộc môi ngược TI-R) và một điểm ở cuối đoạn

kết thúc NOS. Đối với enzym *EcoRI*, có một điểm nhận biết của enzym này nằm ngay đầu đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Sản phẩm xử lý bởi *HindIII*, *EcoRI* theo tính toán lý thuyết được trình bày trên hình 45.



Hình 45. Sơ đồ các vị trí cắt của pC1300+TI bởi *HindIII* và *EcoRI*

(A). Gen TI gắn xuôi chiều

(B). Gen TI gắn ngược chiều

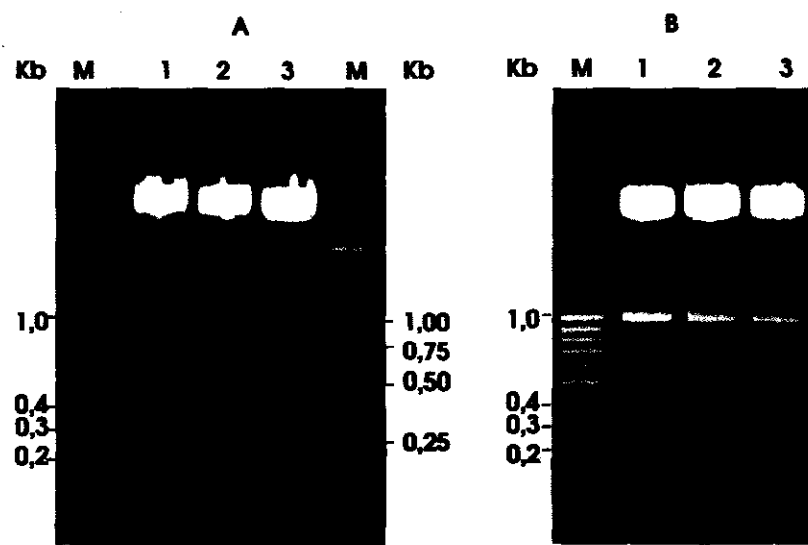
Trường hợp gắn xuôi chiều (hình 45A): sản phẩm cắt bởi *HindIII* của pC1300+TI sẽ là 2 băng, trong đó có một băng kích thước ~ 0,3 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS và một băng kích thước ~ 9,9 kb tương ứng với phần còn lại của vector tái tổ hợp (plasmid gốc pCAMBIA1300+35S 2X enhancer+gen TI). Sản phẩm cắt bởi *HindIII* + *EcoRI* sẽ là 3 băng: một băng kích thước ~ 0,9 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen TI, một băng kích thước ~ 0,3 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS và băng còn lại ~ 9 kb tương ứng với vector pCAMBIA1300.

Trường hợp gắn ngược chiều (hình 45B): sản phẩm cắt bởi *HindIII* của pC1300+TI cũng sẽ là 2 băng nhưng với kích thước khác: một băng kích thước ~ 0,4 kb tương ứng với gen TI và đoạn kết thúc NOS; băng còn lại ~ 9,8 kb tương ứng với pCAMBIA1300+35S 2X enhancer. Sản phẩm cắt bởi *HindIII* + *EcoRI* sẽ là 3 băng: một băng ~ 0,8 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer, một băng ~ 0,4 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS + gen TI và băng còn lại ~ 9 kb tương ứng với vector pCAMBIA1300.

Rõ ràng, đối với trường hợp cắt đơn bằng *HindIII*, sự khác biệt giữa hai cách gắn chủ yếu được nhận biết thông qua sự xuất hiện của băng có kích thước khoảng 300 bp (cách gắn xuôi chiều) và 400 bp (cách gắn ngược chiều). Tương tự, khi cắt kép bằng *EcoRI* + *HindIII*, sản phẩm cắt của trường hợp gắn xuôi chiều và ngược chiều có một băng giống nhau về kích thước (~ 9 kb), hai băng khác biệt nhau về kích thước: ~ 0,3 kb và 0,9 kb (trường hợp gắn xuôi chiều); ~ 0,4 kb và 0,8 kb (trường hợp gắn ngược chiều). Kết quả thí nghiệm trên hình 46 cho thấy, ở các dòng pCTI-5 và pCTI-6 (cột 2, 3, hình 46A, 46B), gen TI đã được gắn vào trong vector trung gian pC1300+35S+NOS theo kiểu

xuôi chiều so với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Trong khi, ở các dòng pCTI-1 (cột 1, hình 46A, 46B), gen TI đã được gắn vào vectơ trung gian pC1300+35S+NOS theo kiểu ngược chiều.

Như vậy, chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI, trong đó gen TI được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp này được chúng tôi giữ trong glycerol, ở -75°C để làm nguyên liệu chuyển Ti-plasmit này vào vi khuẩn *A. tumefaciens*.



Hình 46. Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen TI trong pC1300+TI

(A) M. Thang ADN chuẩn 100 bp
 1. pCTI-1/ *Hind* III: ngược chiều
 2. pCTI-5/ *Hind* III: xuôi chiều
 3. pCTI-6/ *Hind* III: xuôi chiều
 M.(giếng 5) Thang ADN chuẩn 1kb

(B) M. Thang ADN chuẩn 100 bp
 1. pCTI-1/ *Hind* III + *EcoR* I: ngược chiều
 2. pCTI-5/ *Hind* III + *EcoR* I: xuôi chiều
 3. pCTI-6/ *Hind* III + *EcoR* I: xuôi chiều

3.1.4.7. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6

Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6 sau khi thiết kế thành công được chúng tôi tiến hành chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện. Đây là phương pháp khá hiệu quả, có thời gian thí nghiệm ngắn (từ 2 - 3 ngày) và các thể sau biến nạp hoàn toàn không có khả năng bị nhiễm các tế bào *E. coli*.

Để có tế bào khả biến *A. tumefaciens* dùng cho xung điện, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy lại chủng *A. tumefaciens* gốc trên môi trường thạch đặc YEP, sau đó nuôi lắc trong 2 ml môi trường LB trong khoảng 6 giờ ở 29°C. Dịch vi khuẩn này (100 µl) được tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong 100 ml môi trường LB có bổ sung 0,1% glucos.

Tế bào khả biến *A. tumefaciens* chủng EHA105 (40 µl) có bổ sung 1 µl Ti-plasmit tái tổ hợp (đối với hai mẫu thí nghiệm) được chúng tôi xử lý bằng xung điện ở điều kiện 25 µF; 400 Ω; 2,5 kV; 8-10 ms. Sau khi xung điện, mẫu được bổ sung ngay 1 ml môi trường SOC, lắc ở 29°C trong 2 giờ và cấy trải trên đĩa petri chứa các môi trường chọn lọc thích hợp: YEP + Kanamixin (Km) 50 µg/ml (cho chủng EHA105). Tương ứng, các mẫu đối chứng (không bổ sung Ti-plasmit tái tổ hợp) cũng được xung điện và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường YEP, YEP + Km 50 µg/ml. Kết quả xung điện được trình bày trên bảng 7.

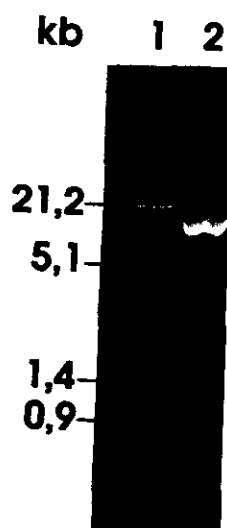
Bảng 9. Kết quả thí nghiệm xung điện chuyển pCTI-5 và pCTi-6 vào *A. tumefaciens* chủng EHA105

		EHA105		
		Đối chứng	Thí nghiệm	
			pCTI-5	pCTI-6
Số lượng khuẩn lạc trung bình / 1 đĩa petri chứa môi trường chọn lọc thích hợp sau thí nghiệm xung điện	YEP	+++		
	YEP + Km	-	++	+++

Chú thích: (++) : Xuất hiện khuẩn lạc; (+++) : Khuẩn lạc mọc dày đặc;
(-) : Không xuất hiện khuẩn lạc

Kết quả trên bảng 9 cho thấy tế bào khả biến *A. tumefaciens* (mẫu đối chứng) rất tốt. Chúng phát triển mạnh trên môi trường YEP và không phát triển trên môi trường có bổ sung Km. Đối với mẫu thí nghiệm, số lượng khuẩn lạc thu được rất nhiều. Trong đó, ở mẫu thí nghiệm pCTI-6, số lượng khuẩn lạc xuất hiện sau xung điện nhiều hơn so với mẫu pCTI-5.

Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* có chứa plasmit tái tổ hợp được chúng tôi phát hiện bằng phương pháp tách chiết ADN plasmit, biến nạp trở lại tế bào *E. coli*, cắt bằng enzym giới hạn, PCR và điện di. Sở dĩ cần phải biến nạp trở lại ADN plasmit vào *E. coli* do số lượng bản sao của vectơ tái tổ hợp này trong tế bào *Agrobacterium* rất ít, không đủ để tiến hành các thí nghiệm kiểm tra sự có mặt của kết cấu gen này. Hình 47 trình bày kết quả tách chiết ADN plasmit của vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105:pCTI-5.

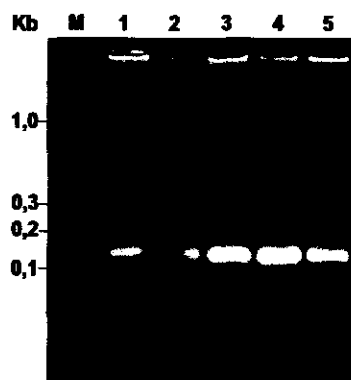


Hình 47. Kết quả tách chiết ADN plasmid tái tổ hợp từ tế bào *A. tumefaciens*

1. Thang ADN chuẩn ADN λ HindIII + EcoRI;
2. ADN plasmid tái tổ hợp tách chiết từ tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105:pCTI-5

3.1.4.8. Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong tế bào *A. tumefaciens* bằng kỹ thuật PCR

Ở thí nghiệm kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, ADN plasmid của tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105:pCTI-5 và chủng EHA105:pCTI-6 được tạo ra nhờ xung điện sau khi biến nạp trở lại vào *E. coli* DH5 α được chúng tôi tách chiết lại và sử dụng làm khuôn để nhân gen TI với cặp mồi TI-F/ TI-R. Kết quả kiểm tra (hình 48) cho thấy chúng tôi đã nhận được các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105:pCTi-5, EHA105:pCTI-6 có chứa Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI-5 và pCTi-6 dùng làm nguyên liệu để chuyển gen TI vào cây trồng.



Hình 48. Kiểm tra sự có mặt của gen TI trong các dòng tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA 105:pCTI-5, EHA105:pCTI-6 tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR
M. Thang ADN chuẩn 100 bp

1. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pCTI-5 (1X)
2. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pCTI-5 (pha loãng 10X)
3. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pCTI-6 (1X)
4. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmit pCTI-5 (pha loãng 10X)
5. Sản phẩm PCR nhân gen TI từ ADN plasmit tách dòng pTI-17 (đối chứng)

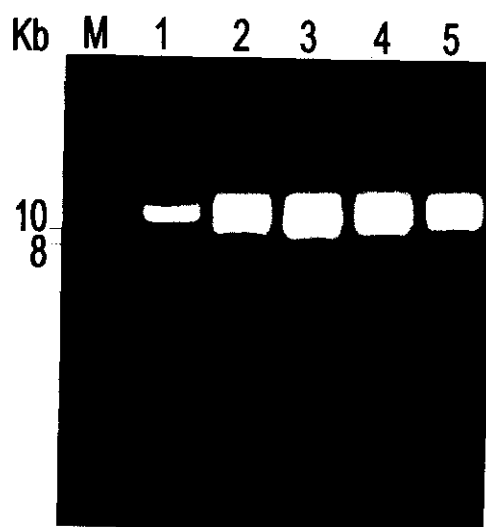
Rõ ràng, đoạn gen TI đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước khoảng 120 bp phù hợp với mẫu đối chứng. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc đưa đoạn gen TI vào vectơ trung gian pC1300+35S+NOS và tạo được hai chủng *A. tumefaciens* EHA105:pCTI-5, EHA105:pCTI-6 tái tổ hợp mang gen TI phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

3.4.2. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaz (α -AI) làm vật liệu phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng

Qua nghiên cứu bản đồ vectơ chúng tôi nhận thấy vùng T-ADN của vectơ pCAMBIA1301 với một số đặc điểm: (1) Có mang đoạn khởi động CaMV35S (đoạn khởi động hoạt động mạnh trong gen nhân thực vật); (2) Có vị trí nhận biết của enzym giới hạn *Nco*I và *Nhe*I (trình tự gen α -AI không có vị trí cắt của hai enzym này); (3) Mang gen kháng higromixin thuận lợi cho chọn lọc thực vật, phù hợp với yêu cầu thiết kế của chúng tôi. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn vectơ pCAMBIA1301 làm nguyên liệu cho các thí nghiệm thiết kế vectơ tái tổ hợp.

3.4.2.1. Tách chiết, kiểm tra hai hệ vectơ: vectơ tách dòng mang gen mã hoá chất kìm hãm α -AI và vectơ Ti-plasmit pCAMBIA1301

Để thiết kế vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp, chúng tôi đã tiến hành tách chiết vectơ tách dòng mang gen mã hoá chất kìm hãm α -AI và vectơ Ti-plasmit pCAMBIA1301, dùng một số enzym giới hạn cắt và kiểm tra cấu trúc của chúng. Tinh sạch đoạn gen α -AI và vectơ pCAMBIA1301 khuyết đoạn GUS, sau đó lai ghép đoạn gen α -AI vào vectơ mở vòng tạo vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp. Vectơ tái tổ hợp được biến nạp vào *E. coli* nhằm nhân số lượng Ti-plasmit mang gen mã hoá α -AI lên để phục vụ cho các thí nghiệm kiểm tra và tạo các hệ thống vectơ chuyển gen thực vật. Kết quả tách chiết, tinh sạch và kiểm tra một số điểm cắt của enzym giới hạn trên hai hệ thống vectơ: vectơ tách dòng mang gen mã hoá chất kìm hãm α -AI và vectơ Ti-plasmit pCAMBIA1301 được thể hiện trên hình 49.



Hình 49. Kết quả kiểm tra hai hệ vectơ pCAMBIA1301 và pKS⁽⁻⁾ α -AI bằng các enzym giới hạn

- M. Marker 1kb 1. pCAMBIA1301/*Nco*I 2. pCAMBIA1301/*Nhe*I
 3. pCAMBIA1301/*Bam*HI 4. pKS⁽⁻⁾ α -AI/*Bam*HI
 5. pKS⁽⁻⁾ α -AI/*Bam*HI+*Hind*III

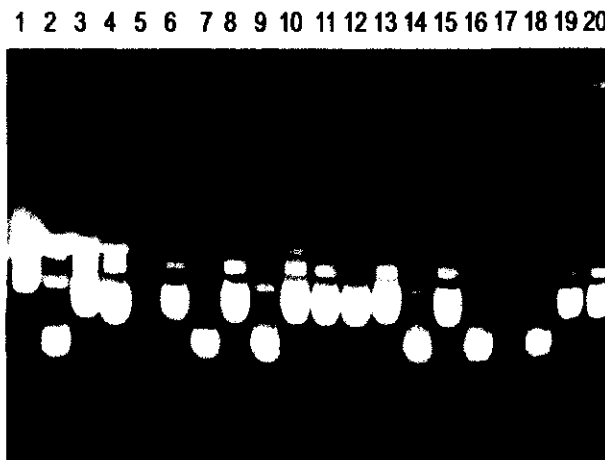
Theo tính toán lý thuyết, xử lý vectơ pCAMBIA1301 bởi *Nco*I sẽ cho ta vectơ mở vòng có kích thước 11837 bp và xử lý bởi *Nhe*I sẽ cho ta hai đoạn ADN với kích thước 3444 bp và 8393 bp. Nếu xử lý vectơ pKS⁽⁻⁾ α -AI bởi *Bam*HI sản phẩm tạo thành là vectơ mở vòng có kích thước khoảng 3kb Trong trường hợp xử lý vectơ pKS⁽⁻⁾ α -AI bởi *Bam*HI và *Hind*III theo lý thuyết sẽ tạo ra hai đoạn với kích thước khoảng 2,9 kb (ứng với kích thước vectơ pKS⁽⁻⁾) và 750 bp (ứng với kích thước của đoạn α -AI). Trên hình 49, kết quả kiểm tra cho thấy sản phẩm xử lý vectơ pCAMBIA1301 và vectơ pKS⁽⁻⁾ α -AI bởi các enzym giới hạn là các băng có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.

3.4.2.2. Thiết kế vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp pCAMBIA1301 mang gen mã hoá α -AI

Để thiết kế vectơ tái tổ hợp, vectơ pCAMBIA1301 mở vòng khuyết đoạn GUS và đoạn gen α -AI đã tinh sạch được gắn kết với nhau nhờ phản ứng lai dưới sự hỗ trợ của enzym T₄ ligaz. Theo tính toán lý thuyết, đoạn gen α -AI với hai đầu gắn sẽ gắn vào hai vị trí là hai đầu gắn của pCAMBIA1301 mở vòng tương ứng. Do hai enzym *Nco*I và *Nhe*I cắt tạo hai đầu so le nên việc gắn kết xảy ra dễ dàng, đúng chiều của gen và tương đối đặc hiệu. Ti-plasmit tái tổ hợp tạo thành là plasmit mang cấu trúc CaMV35S - α -AI - NOS polyA và gen chọn lọc kháng Hygromycin nằm giữa vùng T-ADN. Trong cấu trúc vectơ

còn mang gen kháng kanamixin, do đó ta có thể chuyển cấu trúc này vào vi khuẩn và chọn lọc các dòng mang thể tái tổ hợp.

Với mục đích tạo thuận tiện cho việc chọn lọc, kiểm tra và nhằm nhân lên một lượng lớn plasmit sử dụng cho việc chuyển vào *Agrobacterium* sau này, chúng tôi đã tiến hành biến nạp dịch lai vào tế bào *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt. Tế bào mang thể tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc có bổ sung chất kháng sinh kanamixin. Kết quả, đĩa nuôi cấy mọc nhiều khuẩn lạc. Chúng tôi nhặt ngẫu nhiên một số khuẩn lạc và nuôi cấy thu plasmit để kiểm tra. Kết quả điện di kiểm tra các thể tái tổ hợp được thể hiện trên hình 50.



Hình 50: Điện di kiểm tra các plasmit tái tổ hợp.

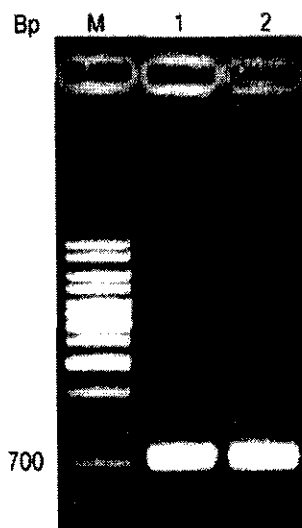
1. Đối chứng - pCambia1301

2-20. ADN plasmit của các dòng khuẩn lạc (kí hiệu là pCHA (5 - 23))

Theo tính toán của chúng tôi, vectơ pCambia1301 tái tổ hợp mang gen mã hoá α -AI có kích thước khoảng 10,5 kb; có kích thước phân tử nhỏ hơn vectơ pCambia1301. Trên hình 50 ta thấy, so với vectơ pCambia1301 làm đối chứng (giếng 1) plasmit ở các giếng 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 19, 20 có kích thước nhỏ hơn tương ứng với các dòng khuẩn lạc pCHA6, pCHA7, pCHA9, pCHA11, pCHA13, pCHA14, pCHA15, pCHA16, pCHA18, pCHA22, pCHA23. Do đó, có thể các plasmit có kích thước nhỏ hơn chính là các thể tái tổ hợp mang gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaz. Các plasmit có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết được nuôi cấy và tách chiết thu plasmit để tiến hành các kiểm tra khác.

3.4.2.3. Kiểm tra sự có mặt của gen α -AI trong plasmid pCambia1301 tái tổ hợp nhờ kỹ thuật PCR

Chọn hai khuẩn lạc pCHA6 và pCHA7, nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường lỏng có bổ sung kanamixin 50 μ g/ml. Dịch nuôi cấy được đem tách chiết thu plasmid sử dụng làm khuôn cho các kiểm tra nhờ PCR. Kết quả kiểm tra bằng PCR được thể hiện trên hình 51.



Hình 51: Kết quả PCR kiểm tra thể tái tổ hợp

M. Marker 1 kb

1. Sản phẩm PCR dòng pCHA6

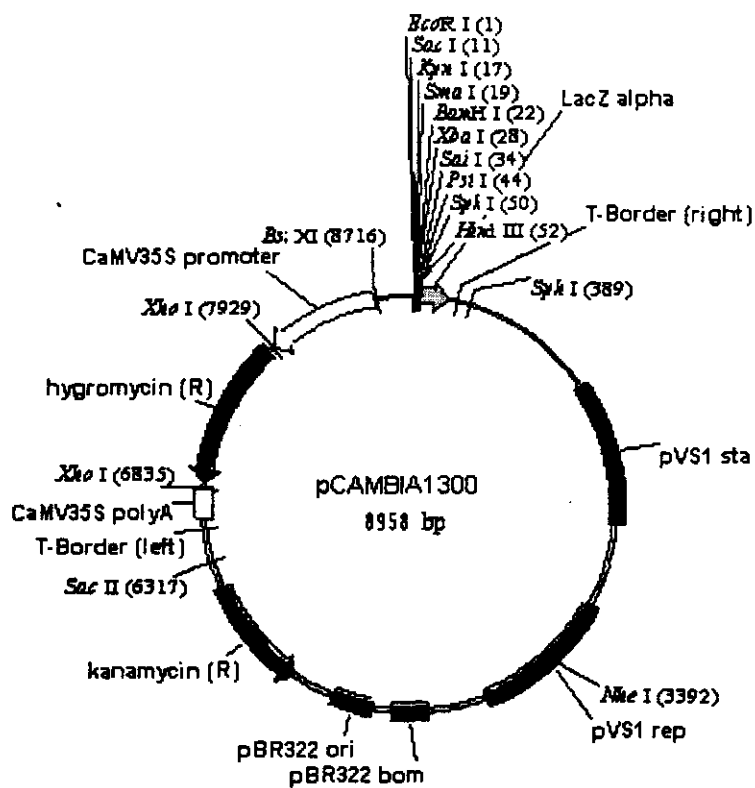
2. Sản phẩm PCR dòng pCHA7

Phổ điện di, sản phẩm PCR với khuôn là plasmid tái tổ hợp ở dòng được lựa chọn cho ta một băng rất đặc hiệu, với kích thước khoảng 750 bp, bằng với kích thước của đoạn gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaz ban đầu. Như vậy, đoạn gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaz đã được đưa vào vectơ pCambia1301 tạo vectơ Ti-plasmid tái tổ hợp.

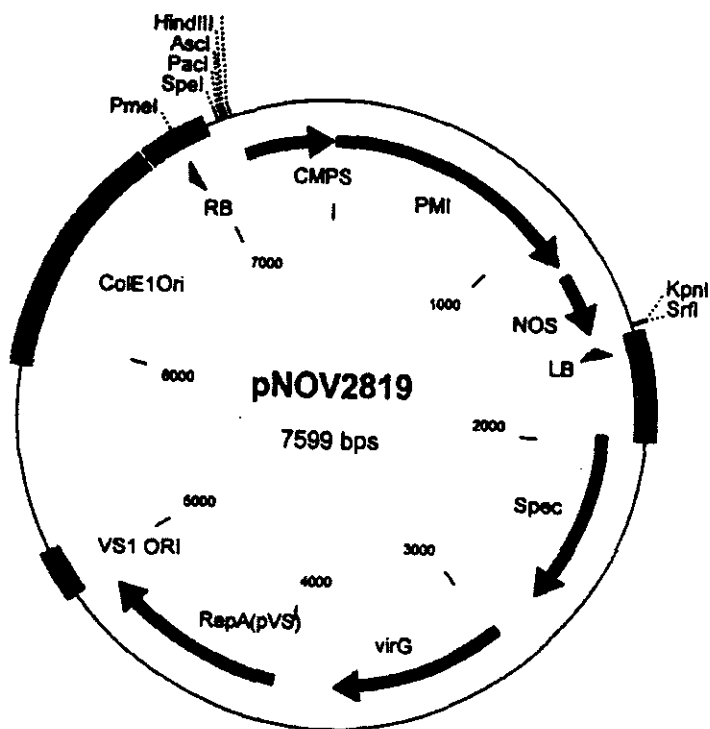
Để khẳng định hơn nữa kết quả này, chúng tôi tiến hành kiểm tra thể tái tổ hợp theo phương pháp xác định trình tự nucleotit.

3.4.2.4. Kiểm tra sự có mặt của gen α -AI trong thể plasmid tái tổ hợp nhờ phương pháp xác định trình tự nucleotit

Đoạn gen trình tự ADN được xác định theo phương pháp Sanger trên máy xác định trình tự tự động ABI Avant 3100, sau đó được xử lý bằng các phần mềm (ABI PRISM® 3100-Avant Data Collection v1.0 and DNA sequencing analysis). Trình tự thu được được so sánh với các trình tự trong ngân hàng trình tự gen Quốc tế EMBL/Genbank/DDBJ nhờ sử dụng phần mềm (Fasta 3, ClustalX và BioEdit). Kết quả được thể hiện trên hình 52.



Hình 53. Sơ đồ vectơ pCambia1300

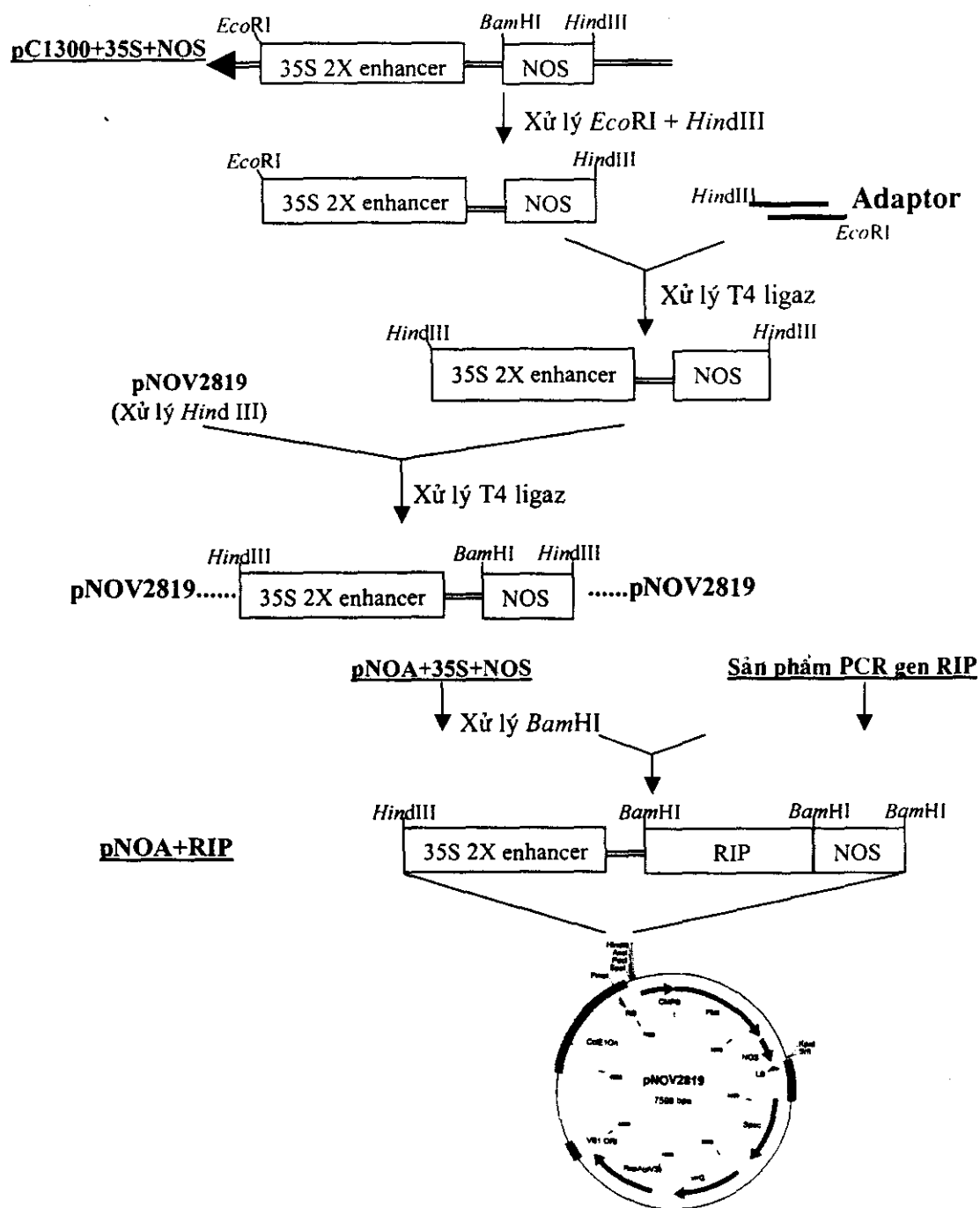


Hình 54. Sơ đồ vectơ thế hệ mới pNOV2819

Trong đó, vectơ pNOV2819 thuộc hệ thống vectơ chọn lọc tích cực chứa gen PMI cho phép chọn lọc một cách dễ dàng các tế bào thực vật tái tổ hợp mà không sử dụng các chất kháng sinh hoặc chất diệt cỏ. Đoạn khởi động cơ định CMPS (Cestrium Yellow Leaf Curling Virus) đã được xác định điều khiển gen PMI biểu hiện mạnh ở nhiều loài cây trồng thử nghiệm như ngô, lúa, lúa mì, đậu tương, thuốc lá, cà chua, hướng dương và cây cà. Vì vậy, chúng tôi cho rằng pNOV2819 là vectơ nguồn thích hợp cho việc mang và chuyển kết cấu gen mã hóa RIP vào cây trồng.

Bên cạnh đó, khi tìm kiếm các đoạn khởi động và đoạn kết thúc phù hợp để thiết kế kết cấu gen mã hóa RIP hoàn chỉnh có thể biểu hiện trong thực vật, chúng tôi đã nhận thấy pC1300+HAL1 có rất nhiều đặc điểm phù hợp với yêu cầu: (1) Đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS trong kết cấu gen quan tâm (35S 2X enhancer + HAL1 + NOS) ở vectơ này là đoạn khởi động và kết thúc đang được sử dụng phổ biến hiện nay trên thế giới do khả năng hoạt động mạnh ở rất nhiều loại mô của cả cây một lá mầm và hai lá mầm; (2) Gen HAL1 trong kết cấu gen quan tâm có thể được loại bỏ dễ dàng và thay thế vào vị trí đó là gen mã hóa RIP nhờ enzyme giới hạn *Bam*HI.

Như vậy, trên cơ sở vectơ nguồn pNOV2819 và kết cấu bao gồm đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS tách từ vectơ pC1300+HAL1, chúng tôi đã thiết kế Ti-plasmit trung gian pNOA+35S+NOS. Đây là vectơ cơ sở để tạo Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào các đối tượng cây trồng ở nước ta. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP được trình bày trên hình 55.



Hình 55. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP

3.4.3.2. Thiết kế vectơ trung gian pNOA+35S+NOS mang kết cấu 35S 2X enhancer+NOS

Vectơ pC1300+HAL1 thu nhận từ chủng tế bào *E. coli* sau khi tinh sạch được chúng tôi xử lý bằng các enzym giới hạn *Bam*HI, *Hind*III và *Eco*RI để kiểm tra kết cấu gen 35S+HAL1+NOS. Theo tính toán lý thuyết, xử lý đơn bằng *Hind*III sẽ xuất hiện một băng do vectơ chỉ chứa một điểm nhận biết duy nhất đối với enzym này ở cuối đoạn kết thúc NOS. Sản phẩm xử lý bằng *Eco*RI là hai băng do vectơ có chứa hai điểm nhận biết của enzym này (một điểm nằm ở đầu đoạn khởi động 35S 2X enhancer và một điểm nằm trên gen HAL1). Riêng đối với *Bam*HI, sản phẩm thu được sẽ là hai băng: một băng có kích thước ~ 10 kb tương ứng với kích thước vectơ pC1300+35S+NOS và một băng có kích thước ~ 1,2 kb tương ứng với gen HAL1. Kết quả thực nghiệm khi xử lý đơn vectơ bằng enzym *Bam*HI, *Hind*III cũng như khi xử lý kép bằng *Hind*III + *Eco*RI, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết.

Vectơ pC1300+HAL1 sau khi kiểm tra cấu trúc được xử lý bằng *Bam*H I để loại bỏ gen HAL1 nhằm tạo ra vectơ trung gian pC1300+35S+NOS (khuyết gen HAL1 nhưng vẫn mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS). Như đã trình bày, sản phẩm xử lý pC1300+HAL1 bằng *Bam*H I sẽ là hai băng, trong đó có một băng kích thước ~ 10 kb tương ứng với vectơ pC1300+HAL1 đã loại gen HAL1. Sau khi tinh sạch đoạn gen có kích thước ~ 10 kb, chúng tôi đã tiến hành phản ứng ghép nối để vectơ không mang gen HAL1 đóng vòng trở lại. Kết quả biến nạp sản phẩm ghép nối vào *E. coli* chủng DH5α và kiểm tra plasmit tái tổ hợp bằng enzym giới hạn cho thấy:

- Trường hợp xử lý bằng *Bam*HI, sản phẩm xuất hiện một băng duy nhất có kích thước ~ 10 kb.

- Sản phẩm xử lý đồng thời bằng hai enzym *Eco*RI và *Hind*III là hai băng: một băng có kích thước ~ 1,1 kb tương đương với kích thước đoạn khởi động 35S 2X enhancer + NOS và một băng có kích thước ~ 9 kb tương ứng với kích thước của vectơ pCAMBIA1300.

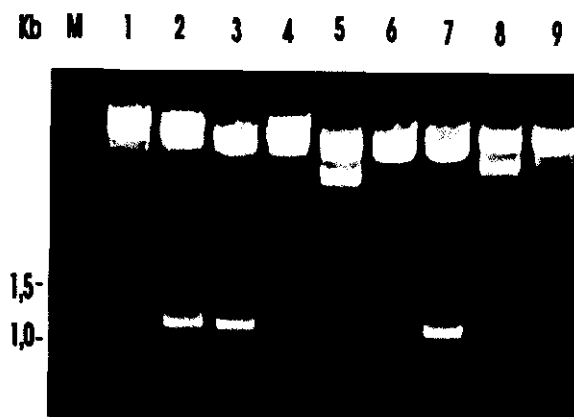
Kết quả nhận được chứng tỏ gen HAL1 đã bị loại bỏ hoàn toàn khỏi vectơ pC1300+HAL1 và chúng tôi đã tạo được một vectơ trung gian pC1300+35S+NOS. Kết cấu 35S+NOS sau đó được chúng tôi nghiên cứu để chuyển vào vectơ pNOV2819.

Để lắp ghép kết cấu 35S+NOS đoạn *Eco*RI - *Hind*III thu nhận được nhờ phương pháp tinh sạch băng ADN từ trong gel vào vùng MCS của vectơ pNOV2819, chúng tôi đã thiết kế đoạn nối (adaptor) *Hind* III - *Eco*R I nhằm tạo các điểm cắt gắn thích hợp. Adaptor có trình tự như sau:

Ad1: 5' – AGCTTCCATGGAGCTCG – 3'

Ad2: 3' – AGGTACCTCGAGCTTAA – 5'

Việc ghép nối kết cấu 35S+NOS (đoạn *EcoRI* - *HindIII*) với adaptor đoạn *HindIII*-*EcoRI* sẽ tạo nên kết cấu mới Adaptor+35S+NOS có đầu cắt *HindIII*. Đây là vật liệu có thể ghép nối được vào vị trí *HindIII* trong vùng MCS của vector pNOV2819. Kết quả kiểm tra sản phẩm ghép nối tổ hợp Adaptor+35S+NOS vào pNOV2819 trước đó đã xử lý bằng *HindIII* để tạo vector trung gian chuyển gen thực vật thể hệ mới pNOA+35S+NOS được trình bày trên hình 56.



Hình 56. Kiểm tra vector trung gian pNOA+35S+NOS

M: Thang DNA chuẩn 1kb

1→9: pNOA1 → pNOA9/ *Hind III*

Kết quả phân tích enzym giới hạn trên hình 56 cho thấy, sản phẩm xử lý các plasmid pNOA2, 3, 4 và 7 bằng *HindIII* xuất hiện hai băng, trong đó có băng ~ 1,1 kb tương ứng với kích thước của tổ hợp Adaptor+35S+NOS (cột 2, 3, 4 và 7). Như vậy, chúng tôi đã sơ bộ chọn lọc được 4 dòng tế bào chứa plasmid tái tổ hợp pNOA+35S+NOS. Tiếp theo, plasmid pNOA3 đã được kiểm tra cấu trúc bằng enzym giới hạn *BamHI*. Sản phẩm xử lý *BamHI* là một băng duy nhất chứng tỏ plasmid đã được mở vòng.

Các kết quả trên cho thấy, chúng tôi đã thiết kế được vector trung gian pNOA+35S+NOS mang tổ hợp adaptor + đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS. Plasmid pNOA3 đáp ứng yêu cầu làm vật liệu để thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP.

3.4.3.3. Tạo đoạn gen mã hoá RIP thích hợp để ghép nối vào vector trung gian

Song song với việc thiết kế vector trung gian pNOA+35S+NOS, chúng tôi đã tiến hành nhân đoạn gen mã hoá RIP trên cơ sở vector tách dòng mang gen mã hoá RIP đã

được chúng tôi phân lập trước đây. Cặp mồi đặc hiệu RIP-FB/ RIP-RB được chúng tôi thiết kế mới, mang điểm nhận biết của enzym giới hạn *Bam*HI (GGATCC) và *Nco*I (CCATGG) tạo cơ sở cho việc gắn đoạn gen mã hóa RIP vào vectơ trung gian.

RIP-FB: 5' – GCCGGATCCATGGATGTTAACTTG – 3'



RIP-RB: 5' – GGATTATTATGGATCCTTCAATTCACAACAG – 3'

*Bam*HI

Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi RIP-FB/ RIP-RB là một băng đặc hiệu có kích thước ~ 0,8 kb. Sản phẩm này sau đó được xử lý bằng *Bam*HI, tinh sạch lượng lớn làm vật liệu cho quá trình chuyển gen mã hoá RIP vào pNOA+35S+NOS/ *Bam*HI.

3.4.3.4. Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer

Sản phẩm PCR nhân gen RIP sau khi xử lý bằng *Bam*HI, tinh sạch, được gắn trực tiếp vào vectơ trung gian pNOA+35S+NOS (trước đó đã mở vòng bằng *Bam*HI) và biến nạp vào *E. coli* chủng DH5α để chọn lọc, nhân Ti-plasmit tái tổ hợp với lượng lớn phục vụ thí nghiệm chuyển plasmit này vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Dòng các tế bào *E. coli* thu nhận được sau khi biến nạp sản phẩm lai giữa pNOA+35S+NOS với gen RIP được chúng tôi tiến hành tách chiết plasmit và chọn lọc các plasmit có kích thước nhỏ hơn plasmit đối chứng (pNOA+35S+NOS).

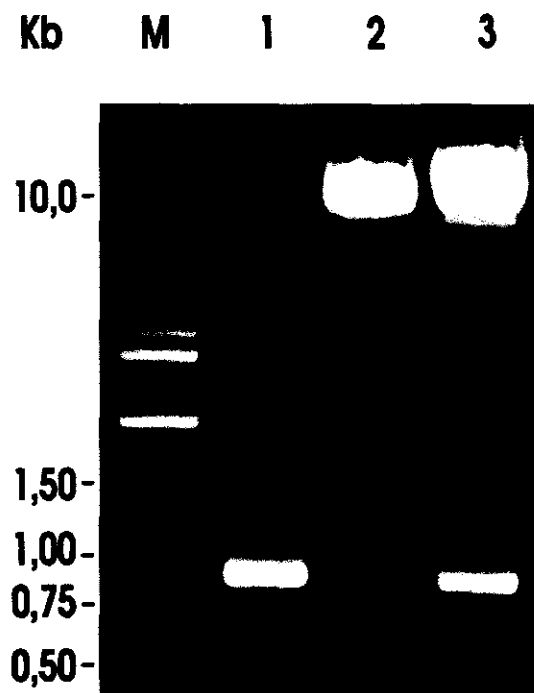
Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP có kích thước ~ 9,4 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 6 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký hiệu là pNOA+RIP-3, 4, 7, 9, 14 và pNOA+RIP-18. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmit để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

3.4.3.5. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmit tái tổ hợp bằng enzym giới hạn

Trong vectơ pNOA+35S+NOS, điểm nhận biết của enzym *Bam*HI nằm giữa đoạn khởi động 35S X2 enhancer và đoạn kết thúc NOS. Như vậy, nếu gen RIP được gắn vào vectơ tại vị trí *Bam*HI thì khi xử lý bằng enzym này sản phẩm sẽ là hai băng: một băng tương ứng với kích thước của vectơ mở vòng và một băng tương ứng với kích thước của gen RIP (~ 0,8 kb).

Sản phẩm xử lý bởi enzym giới hạn *Bam*HI đối với dòng pNOA+RIP-9 (cột 3, hình 57) là 2 băng hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Việc kiểm tra bằng enzym *Bam*HI

cho phép chúng tôi chọn lọc được 4 dòng tế bào có mang gen RIP trong các plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-4, 9, 14 và 18.



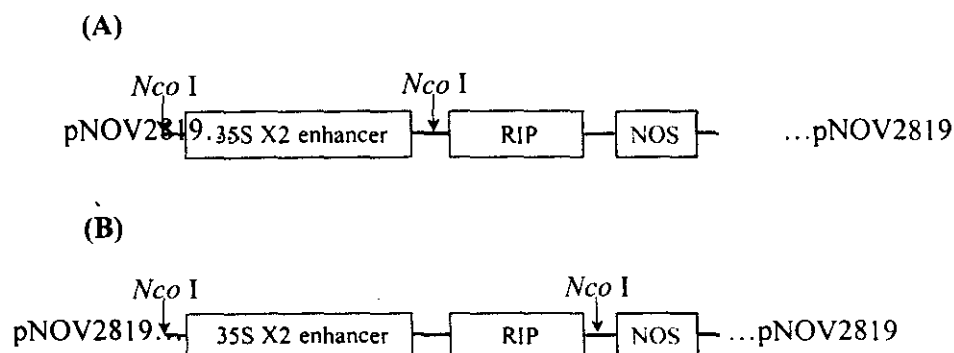
Hình 57. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào *E. coli* bằng enzym giới hạn

M: Thang DNA chuẩn 1 kb

1. Sản phẩm PCR nhân gen RIP sử dụng khuôn là plasmit tách dòng (đối chứng)
2. Plasmit pNOA+35S+NOS/ *Bam*H I
3. Plasmit pNOA+RIP-9/ *Bam*H I

3.4.3.6. Kiểm tra chiều gắn của gen RIP trong Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP

Các Ti-plasmit tái tổ hợp có chứa gen RIP như pNOA+RIP-4, 9, 14 và 18 tiếp tục được kiểm tra bằng cách cắt đơn với enzym giới hạn *Nco*I. Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP có hai điểm nhận biết của *Nco*I: một điểm nằm đầu đoạn khởi động 35S 2X enhancer (thuộc vùng adaptor) và một điểm ở đầu gen RIP (thuộc mỗi RIP-FB). Sản phẩm xử lý bởi *Nco*I theo tính toán lý thuyết được trình bày trên hình 58.



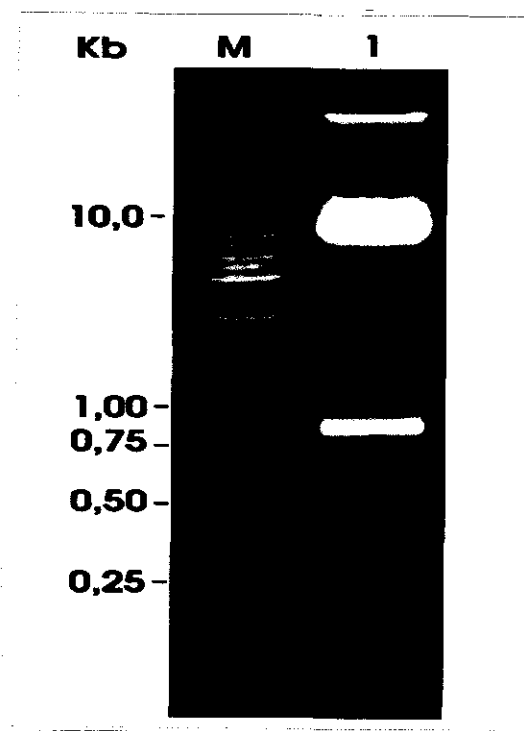
Hình 58. Sơ đồ các vị trí cắt của pNOA+RIP bởi *NcoI*

(A). Gen RIP gắn xuôi chiều

(B). Gen RIP gắn ngược chiều

Trường hợp gắn xuôi chiều (Hình 58A): sản phẩm cắt bởi *NcoI* của pNOA+RIP sẽ là 2 băng, trong đó có một băng kích thước ~ 0,8 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer và một băng kích thước ~ 8,6 kb tương ứng với phần còn lại của vector tái tổ hợp (plasmit gốc pNOV2819+gen RIP+NOS). Trường hợp gắn ngược chiều (Hình 58B): sản phẩm cắt bởi *NcoI* của pNOA+RIP cũng sẽ là 2 băng nhưng với kích thước khác: một băng kích thước ~ 1,6 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer và gen RIP; băng còn lại ~ 7,8 kb tương ứng với pNOA+NOS.

Kết quả thí nghiệm trên hình 59 cho thấy, ở dòng pNOA+RIP-9 (cột 1, hình 59), gen RIP đã được gắn vào trong vector trung gian pNOA+35S+NOS theo kiểu xuôi chiều so với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP, trong đó gen RIP được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp này được chúng tôi giữ trong glycerol, ở -75°C để làm nguyên liệu chuyển Ti-plasmit này vào vi khuẩn *A. tumefaciens*.



Hình 59. Kết quả kiểm tra chiều dài của gen RIP trong pNOA+RIP
M. Thang DNA chuẩn 1 kb
1. pNOA+RIP-9/ *Nco* I

3.4.3.7. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9

Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9 sau khi thiết kế thành công được chúng tôi tiến hành chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện. Đây là phương pháp rất hiệu quả, có thời gian thí nghiệm ngắn (từ 2 - 3 ngày) và các thể sau biến nạp hoàn toàn không có khả năng bị nhiễm các tế bào *E. coli*.

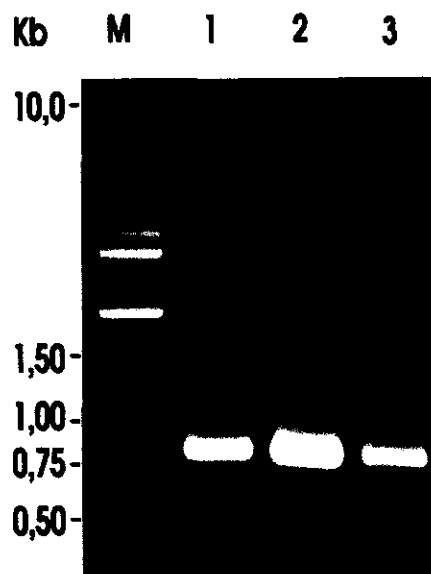
Tế bào khả biến *A. tumefaciens* chủng EHA105 (40 μ l) có bổ sung 1 μ l Ti-plasmit tái tổ hợp (đối với hai mẫu thí nghiệm) được chúng tôi xử lý bằng xung điện ở điều kiện 25 μ F; 400 Ω ; 2,5 kV; 8-10 ms. Sau khi xung điện, mẫu được bổ sung ngay 1 ml môi trường SOC, lắc ở 29°C trong 2 giờ và cấy trải trên đĩa petri chứa các môi trường chọn lọc thích hợp: YEP + Spectinomycin (Spec) 50 μ g/ml. Tương ứng, các mẫu đối chứng (không bổ sung Ti-plasmit tái tổ hợp) cũng được xung điện và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường YEP, YEP + Spec 50 μ g/ml.

Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* sau xung điện có chứa plasmit tái tổ hợp được chúng tôi phát hiện bằng phương pháp tách chiết ADN plasmit, biến nạp trở lại tế bào *E. coli*, cắt bằng enzym giới hạn, PCR và điện di. Sở dĩ cần phải biến nạp trở lại ADN plasmit vào *E.*

coli do số lượng bản sao của vectơ tái tổ hợp này trong tế bào *Agrobacterium* rất ít, không đủ để tiến hành các thí nghiệm kiểm tra sự có mặt của kết cấu gen này.

3.4.3.8. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào *A. tumefaciens* bằng kỹ thuật PCR

Ở thí nghiệm kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, ADN plasmid pNOA+RIP-9 của tế bào *A. tumefaciens* được tạo ra nhờ xung điện sau khi biến nạp trở lại vào *E. coli* chủng DH5 α được chúng tôi tách chiết lại và sử dụng làm khuôn để nhân gen RIP với cặp mồi RIP-FB/RIP-RB. Kết quả kiểm tra (Hình 60) cho thấy chúng tôi đã nhận được các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105:pNOA+RIP-9 có chứa gen RIP. Đây là vật liệu quan trọng phục vụ các thí nghiệm chuyển gen này vào cây trồng.



Hình 60. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các dòng tế bào *A. tumefaciens* tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR

M. Thang ADN chuẩn 1 kb

1. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid tách dòng (đối chứng)
2. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pNOA+RIP-9 (1X)
3. Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pNOA+RIP-9 (pha loãng 10X)

Rõ ràng, đoạn gen RIP đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước ~ 0,8 kb phù hợp với mẫu đối chứng. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc đưa đoạn gen RIP vào vectơ trung gian pNOA+35S+NOS và tạo được chủng *A. tumefaciens* EHA105:pNOA+RIP-9 tái tổ hợp mang gen RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

Các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105:pNOA+RIP-9 có chứa gen RIP đã được chuyển cho nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Lê Trần Bình (Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học) và TS. Bùi Mạnh Cường (Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Ngô) để tiến hành các thí nghiệm chuyển gen thực vật.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN

1. Đã tách chiết, tinh sạch ADN tổng số của gác (*Momordica chochinensis*), bí đỏ (*Cucurbita maxima*), đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) và mướp đắng (*Momordica charantia*) có độ sạch đạt 1,85-1,9. Sử dụng các ADN này để phân lập các gen tương ứng.
2. Đã phân lập (hoặc tổng hợp) được bốn gen: hai gen mã hoá PPP là gen MCoTI-II, gen CMTI-V; một gen mã hoá α -AI, một gen mã hoá RIP. Các gen có kích thước đúng như tính toán lý thuyết, theo thứ tự tương ứng vào khoảng 110bp, 230bp, 700bp, 800bp. Các gen có độ đồng nhất điện di.
3. Đã thiết kế 4 vectơ tái tổ hợp mang các gen đích: pTYB12 mang gen MCoTI-II, pET-14b mang gen CMTI-V, pET21d(+) mang gen α -AI, pET21(+) mang gen RIP. Các vectơ tái tổ hợp đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *E. coli* BL21, kí hiệu là: PI-17 (gen MCoTI-II); BL21-TI (gen CMTI-V); BL21- α AI (gen α -AI); BL21-RIP (gen RIP).
4. Đã lựa chọn được điều kiện nuôi cấy tối ưu các vi khuẩn tái tổ hợp như sau:

Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicillin (μ g/ml)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi ($^{\circ}$ C)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI(mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- α AI (mang gen α AI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

5. Thiết lập được 4 qui trình tinh sạch các protein tái tổ hợp:
 - 5.1. Tinh sạch ReMCoTI-II: sắc kí qua cột kitin ở điều kiện có chất khử DTT 0,05 mM trong đệm Tris-HCl 0,02 M có 0,5 M NaCl, 4 $^{\circ}$ C trong 40 giờ, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm trên nhưng không có DTT.
 - 5.2. Tinh sạch ReCMTI-V: loại protein tạp bằng cách điều chỉnh pH đến 4,5; sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, tinh sạch qua cột HiTrap Q, phản hấp phụ bằng dung dịch Tris-HCl 0,015M, nồng độ NaCl 0,1M.

- 5.3. Tinh sạch Re α -AI: kết tủa bằng (NH₄)₂SO₄ bão hoà, sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm photphat 20mM pH 6,7; 0,6M NaCl.
- 5.4. Tinh sạch ReRIP: sắc kí qua cột CM-Sepharoz trên hệ thống FPLC, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm Tris-HCl 0,05 M pH 7,2; nồng độ muối 0,4 M.
6. Các sản phẩm sau khi tinh sạch có độ đồng nhất điện di, có kích thước đúng như dự tính: ReMCoTI-II khoảng 3kD, ReCMTI-V khoảng 7kD, Re α -AI khoảng 18kD, ReRIP khoảng 30kD.
7. Các protein tái tổ hợp đã tinh sạch có các hoạt tính sau:

ReMCoTI-II:	ức chế triptxin, ức chế proteinaz sâu khoang
ReCMTI-V:	ức chế triptxin, ức chế con đường đông máu nội sinh
Re α -AI:	có tác dụng diệt được một ngô (<i>Sitophilus zeamays</i>), một đậu (<i>Callosobruchus chinensis</i>)
ReRIP:	ức chế mạnh sự sinh trưởng của <i>B. subtilis</i> , <i>P. putida</i> và <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> .
8. Đã thiết kế được các Ti-plasmit tái tổ hợp: pC1300-TI mang gen MCoTI-II, pC1301- α AI mang gen α -AI, pNOA-RIP mang gen RIP.
9. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa các Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen đích phục vụ việc chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Cụ thể:
 - 2 chủng EHA105 là pCTI-5 và pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI-II.
 - 2 chủng pCHA6 và pCHA7 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen α -AI
 - 2 chủng EHA105 và LBA4404 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen RIP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Annie Heitz, Jean-Francois Hernandez, Jean Gagnon, T.H. Thai, Pham Thi Tran Chau, N.T.Mai, L.N. Dung and Laurent Chiche. *Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic Knottins*. Biochemistry 2001, 40, 7973-7983.
2. Atkinson CA. *Proteinase inhibitors in plants: genes for improving against insects and pathogens*. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, 28: 425-449.
3. Atkinson HJ, Urwin PE, Hansen E, McPherson MJ. *Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes*. Trends Biotechnol. 1995, 13: 369-374.
4. Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC. *The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase*. 2000, FEBS Lett 471(2-3): 169-172.
5. Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. *Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating protein: effect on DNA, RNA and poly(A)*. Nucleic acids Res, 1997, 25: 518-522.
6. Becker C, Shutov AD, Nong Van Hai, Senyuk VL, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen N C, Muntz K, *Purification cDNA cloning and characterization of proteinase B - an asparagine – specific andopeptidase*. Eur. J. Biochem, 1995, 228: 456-462.
7. Bolewska K, Krowarsch D, Otlewski J, Jaroszewski L, Bierzynski A, *Synthesis, cloning and expression in E.coli of a gene coding for the Met 8→Leu CMTI-I- a representative of squash inhibitors of serine proteinases*. FEBS Lett. 1995, 377 : 172-174.
8. Botes DP, Qobose MD, Corfield VA, *Synthesis of wild type and three mutant Cucurbita maxima trypsin inhibitor encoding genes by a single-strand approach*. Gene, 1991, 105 (2): 243-247.
9. Bozenna Rempola, Wilusz T, Markiewicz W and Fikus M, *Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of the gene coding for the trypsin inhibitor from Cucurbita pepo*. Acta Biochimica Polonica, 1995, 42 (1) : 109-114.
10. Cai M, Gong YX, Wen L, Krishamoorthi R. *Correlation of binding-loop internal dynamics with stability and function in Potato I inhibitor family: Relative contribution of Arg50 and Arg52 in Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V as studies by site-directed mutagenesis and NMR Spectroscopy*. Biochemistry, 2002, 41: 9572-9579.
11. Chaudhry B, Muller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K, Mundy J. *The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein*. Plant J, 1994, 6:815-824.

12. Chen, X-M., Qian Y-W., Chi C-W., Gan K-D. E., Zhang M-F., Chen C-Q., *Chemical synthesis, molecular cloning and expression of the gene coding for the trichosantes trypsin inhibitor*. J. Biochem 112, 1991. 45-51.
13. Chow LP, Chou MH, Ho CY, Chuang CC, Pan FM, Wu SH, Lin JY. *Purification, characterization and molecular cloning of trichoanguin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the seeds of Trichosanthes anguina*. Biochem J, 1999, 318: 211-219.
14. Chrispeels MJ, Grossi de Sa MF, Higgins TJV. *Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids*. Seed Science Research, 1998, 8 : 257-263.
15. Cohen SL, Chait BT, *Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels*. Anal Biochem, 1997, 247 (2) : 257-267.
16. de Benito FM, Citores L, Iglesias R, Ferreras JM, Soriano F, Arias J, Mendez E, Girbes T. *Ebulitins: a new family of type I ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of Sambucus ebulus L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin I*. FEBS Lett, 1995, 360: 299-302.
17. Deana Namuth, Kimmo Koivu, Jelena Arbatova, Viktor Kuvshinov and Eija Pehu. *Advanced plant Molecular Biology Laboratory Manual*, University of Helsinki, Finland, 1998, 4-7.
18. Draper J, Scott R, Armitage P. *Plant genetic transformation and gene expression*. A laboratory manual Blackwell Scientific Publications, London, 1988, 3-36.
19. Đặng Thị Thu, Trần Văn Hà, Đỗ Ngọc Liên, *Nghiên cứu thăm dò protein kìm hãm α -amylaza từ một số hạt đậu Phaseolus vulgaris Việt Nam*. Báo cáo khoa học – Hội nghị CNSH toàn quốc. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1999, 662-668.
20. Đỗ Lương Tuấn. *Đánh giá tác dụng điều trị tại chỗ vết thương bỏng nông bằng AT-04 có so sánh với mỡ silver sunlfadiazin 1%*. Luận án Thạc sĩ bảo vệ năm 1996.
21. Endo Y, Tsurugi K. *RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes*. J Biol Chem, 1987, 262: 8128-8130.
22. Evensen G, Mathiesen A, Sundan A. *Ricin A-chain type 72 (Abrus precatorius)*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 1991, Accession Number: CAA 38654.
23. Ferreras JM, Barbieri L, Girbes T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, Rocher MA, Soriano F, Mendez E, Stirpe F. *Distribution and properties of major ribosome-*

- inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant Saponaria officinalis L. (Caryophyllaceae). Biochim Biophys Acta. 1993, 1216: 31-42.*
24. Fong WP, Poon YT, Wong TM, Mock JW, Ng TB, Wong RN, Yao QZ, Yeung HW. *A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharins from Momordica charantia seeds, N-terminal sequence comparison and establishment of their N-glycosidase activity. Life Sci. 1996, 59(11): 901-909.*
 25. Finardi – Filho F, Mirkov TE, Chrispeels MJ, *A putative precursor protein in the evolution of the bean α -amylase inhibitor. Phytochemistry, 1996, 43 (1) : 57-62.*
 26. Franke AE, Burbage C, Fu T, Tagge E, Chandler J, Willingham MC. *Ricin toxin contains at least three galactose-binding sites located in B chain subdomains 1 α , 1 β , 2 γ . Biochemistry, 1996, 35: 14749-14756.*
 27. Girbes T, Barbieri L, Ferreras M, Arias FJ, Rojo MA, Iglesias R, Alegre C, Escarmis C, Stirpe F. *Effects of ribosome-inactivating proteins on Escherichia coli and Agrobacterium tumefaciens translation systems. J Bacteriol. 1993, 175: 6721-6724.*
 28. Girbes T, Ferreras JM, Arias FJ, Munoz R, Iglesias R, Jimenez P, Rojo MA, Arias Y, Perez Y, Benitez J, Sanchez D, Gayoso MJ. *Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from Sambucus: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses. Cell Mol Biol, 2003, 49: 537-545.*
 29. Grossi de Sa MF, Mirkov TE, Ishimoto M, Colucci G, Bateman K, Chrispeels MJ. *Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil Zabrotes subfasciatus. Planta, 1997, 203 : 295-303.*
 30. Hao Q, Van Damme EJ, Hause B, Barre A, Chen Y, Rouge P, Peumans WJ. *Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. Plant Physiol, 2001, 125: 866-876.*
 31. Helmy M, Lombard S, Pieroni G Ricin. *RCA60: evidence of its phospholipase activity. Biochem Biophys Res Commun. 1999, 258: 252-255.*
 32. Hernandez JF, Gagnon J, Chiche L, Nguyen TM, Andrieu JP, Heitz A, Trinh HT, Pham TT Chau, and Le Nguyen D, *Squash trypsin inhibitors from Momordica cochinchinensis exhibit an atypical macrocyclic structure. Biochemistry, 2000, 39 : 5722-5730.*
 33. Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Phan Văn Chi, *Nghiên cứu sự phân bố của RIP nhóm I ở một số thực vật thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật Western blotting. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội, 2000, 172-174.*

34. Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ, *Pumpkin seeds inhibitor of human Factor XIIa, (activated Hageman factor) and bovine trypsin*. Biochemistry, 1982, 21: 3741-3746.
35. Holster M., De Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J. *Transfection and transformation of A. tumefaciens* Mol Gen Genet 163, 181-187, 1987.
36. Hudak KA, Wang P, Tumer NE. *A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: Depurination of the capped RNA template*. RNA, 2000, 6: 369-380.
37. Hung CH, Lee MC, Chen JK, Lin JY. *Abrin A-chain (Abrus precatorius)*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 1996, Accession Number: CAA 54138.
38. Iglesias R, Arias FJ, Rojo MA, Escarmis C, Ferreras JM, Girbes T. *Molecular action of the type I ribosome-inactivating protein saporin 5 on Vicia sativa ribosomes*. FEBS Lett. 1993, 325: 291-294.
39. Inoue H, Nojima H, Okayama H, *Transformation of E. coli with plasmids*. Gene, 1990, 96 : 23-28.
40. *IMPACT™-CN. Instruction Manual*. New England BioLabs Inc. Version 1.9, 7/2001 (50p).
41. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J and White T.J., eds. *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publ. San Diego, New York, Berkeley, Boston 1990.
42. Ishimoto M, Chrispeels M J. *Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean*. Plant physiol. 1996, 11(1): 393-401.
43. Karas M, Hillenkamp F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons*. Anal Chem , 1988, 60: 2299-2301.
44. Krishnamoorthi R, Gong Y-X, Richardson M. *A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (Cucurbita maxima) seeds*. FEBS Lett. 1990, 273, 163-167.
45. Kupryszewski G, Rolka K. *Cucurbita maxima TIs I and III. Structure - activity relationship studies*. Hellenic Forum on Bioactive Peptides, 1997, 193-207.
46. Lam SK, Ng TB. *First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (Lyophyllum shimeji) together with evidence for synergism of their antifungal effects*. Arch Biochem Biophys, 2001, 393: 271-280.

47. Lam YH, Wong YS, Wang B, Wong RNS, Yeung HW, Shaw PC. *Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus*. Plant Sci, 1996, 114: 111-117.
48. Laemmli U.K., *Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227 (1970) pp 680-685.
49. Laurent Chiche, A. Heitz, J. C. Gelly, J. Gracy, T.C. Pham, T. H. Phan, J. F. Hernandez and Le nguyen, D. *Squash Inhibitors: From Structural Motifs to Macrocyclic Knottins*. Current Protein and Peptide Science 5(2004), pp: 341 –349.
50. Le Nguyen D, Castro B, *Synthesis of a 32 - residue peptide inhibiting trypsin and carboxypeptidase A*. Peptides. Chemistry, Structure and Biology (Proceedings of the 11th APSymposium 7/1990), 1073-1075.
51. Le Nguyen D, LG Barry, J.P.Tam, A. Heitz, L. Chiche, J. F. Hernandez, T.C. Pham. *Chemical synthesis of MCoTI-I*. In “Peptides” 2002 (Benedelii, E., and Pedone, C., Eds), Endizioni Ziino, Napoli, Italy, pp: 182 – 183.
52. Le nguyen D, A. Heitz, L. Chiche, J. F. Hernandez, T. H. Phan, T.C. Pham. *Antimicrobial and insecticidal effects of crude extract momosertatin from Momordica cochinchinensis*. in “Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics” Michael Chorev & Tomi K. Sawyer (Eds). American Peptide Society, 2003.
53. Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, Huang PL, Bourinbaiar A, Huang HI, Kung HF (2000) Map30 anti-HIV protein/ anti-tumor protein. *EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: S 79450.
54. Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, Huang PL, Bourinbaiar A, Huang HI, Kung HF. *Anti-HIV and anti tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon*. Gene, 1995, 161 (2): 151-156.
55. Leluk J. Otlewski J. Wicorek M., Polanowski A., Wilusz T., *Preparation and characteristics of trypsin inhibitors from the seeds of squash (Cucurbita maxima and Zucchini (Cucurbita pepo var. giromonta)*. Acta Biochem. Pol. 1983, 30: 127-136.
56. Leluk J., and Pham T.T.C., *Zastosowanie edestyny do badania aktywnosc proteinaz i ich inhibitorow* (Polish) in XXI Meeting of Polish Biochemical Society , Krakow, Poland .1985, 139.
57. Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI. *Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA in vitro*. Nucleic acids Res, 1991, 19: 6309-6312.

58. Li XD, Chen WF, Liu WY, Wang GH. *Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins--cinnamomin and camphorin from the seeds of Cinnamomum camphora*. Protein Expr Purif, 1997, 10: 27-31.
59. Lin J, Li Y, Li Y, Xu Y, Yan F, Tang L, Chen F. *Curcin precursor (Jatropha curcas)*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 2002, Accession Number: AAL 58089.
60. Lin JY, Tserng KY, Chen CC, Lin LT, Tung TC. *Abrin and ricin: New anti-tumour substances*. Nature, 1970, 227: 292-293.
61. Liu RS, Yang JH, Liu WY. *Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (Laminaria japonica A)*. Eur J Biochem, 2002, 269: 4746-4752.
62. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 437-473.
63. McGrath MS, Hwang KM, Caldwell SE, Gaston I, Lik KC, Wu P, Ng VL, Crowe S, Daniels J, Marsh J, Daihart T, Lekas PU, Uennaari JC, Yeung HW, Lifson JF. *GLG223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2844-2848.
64. Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E, Higgins TJ. *Bean alpha- amylase inhibitor 1 in transgenic (Pisum sativum) provides complete protection from pea weevil (Bruchus pisorum) under field conditions*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8) : 3820-3825.
65. Ng TB, Lam YW, Wang H. *Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom Calvatia caelata*. Planta Med. 2003, 69: 212-217.
66. Nguyễn Đình Bảng, Đỗ Lương Tuấn, Phạm Thị Trân Châu. *Tìm hiểu tác dụng kháng vi khuẩn của chế phẩm AT-04 trên bệnh nhân bỏng*. Tạp chí Sinh học 21 (1b), 1999, tr. 168-172.
67. Nguyễn Văn Nguyên, Lê Huynh, Vũ Hà, Phạm Trân Châu, Phan Thị Hà, L. T. Quang. *Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp và viêm mạn thực nghiệm của AT-04 trên chuột cống trắng thực nghiệm*. Thông báo KH các trường Đại học – Sinh học – Nông nghiệp – Y học . 1996. tr 64-68.
68. Nguyễn Văn Nguyên, Phạm Thị Trân Châu, Vũ Hà, Hoàng Văn Lương. *Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong điều trị viêm tụy cấp thực nghiệm*. Tạp chí Y học thực hành, 1988, 350: 243-250.

69. N.V.Nguyên, V.Hà, L.Năm, Đ.L.Tuấn, P.T.Trân Châu, P.T. Hà. *Nghiên cứu khả năng ứng dụng chế phẩm protein ức chế proteinaz trong điều trị viêm*. Trong quyển: *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống Y-Dược học*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà nội 2004, 287-290.
70. Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Thị Trân Châu. *So sánh các chất ức chế triptxin (TI) của hạt gạo chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt*. Tạp chí Khoa học-Đại học Quốc gia Hà nội. 1996, 12 (3), 33-41.
71. Nguyễn Huy Hoàng, Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thuỳ Châu, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải. *Nghiên cứu hoạt tính kháng mọt gạo của dịch chiết protein từ hạt mít, gấc và mướp đắng*. Tạp chí Sinh học, 1999, 21(3): 199-202.
72. Nguyen Huy H, Nghiem Ngoc M, Dao Huy P, Le Tran B, Nong Van H *Momordica charantia partial RIP gene for ribosome inactivating protein, type I*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases, 2000, Accession number: AJ 294541.
73. Nguyễn Huy Hoàng, Đào Huy Phong, NghiêM Ngọc Minh, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải. *Phân lập và đọc trình tự gen mã hóa protein bất hoạt ribosome từ cây mướp đắng (Momordica charantia)*. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2000, 84-88.
74. Nguyễn Văn Đạt, Nguyễn Thanh Thuý, Nguyễn Huy Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Trương Nam Hải. *Biểu hiện gen mã hóa cho protein bất hoạt ribosom của cây mướp đắng trong nấm men Pichia pastoris*. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội. 2000, 44-47.
75. Nicolas E, Beggs JM, Haltiwanger BM, Taraschi TF. *A new class of DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA*. J Biol Chem, 1998, 273: 17216-17220.
76. Nicolas E, Beggs JM, Taraschi TF. *Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches*. J Biol Chem. 2000, 275: 31399-31406.
77. Nielsen K, Payne GA, Boston RS. *Maize ribosome-inactivating protein inhibits normal development of Aspergillus nidulans and Aspergillus flavus*. Mol Plant Microbe Interact. 2001, 14: 164-172.
78. Obrig TG. *Shiga toxin mode of action in E. coli O157: H7 disease*. Front Biosci. 1997, 2: 635-642.
79. Ortigao M and Better M. *Momordica balsamina mRNA for momordin II*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 1992, Accession Number: Z 12175.

80. Otlewski J, Polanowski A, Leluk J, Wilusz T. *Trypsin inhibitors in summer squash (Cucurbita pepo) seeds. Isolation, purification and partial characterization of the inhibitors.* Acta Biochim. Pol. 1984, 31: 267-278.
81. Otlewski J, Krowarsch D. *Squash inhibitor family of serine proteinases.* Acta Biochim. Pol, 1996, 43(3): 431-444.
82. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.* Electrophoresis, 1999, 20: 3551-3567.
83. Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ. *Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?* FASEB J. 2001, 15:1493-1506.
84. Pham Thi Tran Chau, Leluk J, Wilusz T, Polanowski A, *Isolation of two trypsin inhibitors from resting seeds of the white bush Cucurbita pepo var. Patissonina and their properties.* Acta Biochim.Pol, 1985, 32(4) : 319-328.
85. Pham Thi Tran Chau, Leluk J, Wilusz T, Polanowski A, *Purification and characterization of the trypsin inhibitor from Cucurbita pepo var. Patissonina Fruits.* Biol.Chem. Hoppe-Seyler , 1985, 366 (10) : 939-944.
86. Pham Thi Tran Chau, Waliszewicz LK, Leluk J, *Trypsin inhibitors in the aleurone grains.* Biochem. Physiol. Pflanzet, 1986, 181 : 565-569.
87. Pham Thi Tran Chau. *Trypsin inhibitors of white bush (Cucurbita pepo var. Patissonina) fruits and seeds* (Doctor habilitatus thesis, 1985). Acta Universitatis Wratislaviensis N°-912, Wroclaw University, Wroclow, 1987 (110 pp).
88. Pham Tran Chau, Konopska L., Leluk J., *Trypsin inhibitors in the aleurone grains of Cucurbita pepo var. Patissonina (white bush) cotyledons.* Biochem. Physiol. pflanz 1986, 181: 565-569.
89. Pham Thi Tran Chau, V. T . Hien, P.T. Ha, N. H. M. Quyen, N. T. Mai. *Preliminary of trypsin inhibitors (TIs) from squash seeds of Viet nam 10th FAOB symposium on Protein Resarch.* Taipei 7 – 10/12/1993. Abstracts PIII – 21.
90. Pham Thi Tran Chau, M. N. Toan, T. Q. Tan. *Effect of Momosertatin on the growth and nortality of insect pests, Plutella xylostella (PX) and Spodoptera litura (SL).* 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Annual Meeting of the American Society of Biochenistry and Molecular Biology. August 24 – 29, San Franciso, California. Program N^o - 2130, 1997.
91. Pham Thi Tran Chau, M. T. Hang, V. T. Hao, N. H. Ha, N. L. Dung. *Effect of Momosertain on the growth of microorganisms.* 8th FAOBMB Congress, Kula Lumpur, Malaysia. Abstract C 26, November 22 – 27/1998.

92. Phạm Thị Trân Châu, T. Q. Tấn, P.T. Hà, H. T. Việt, M. N. Toàn, N. Đ. Toàn, T. H. Thái, P. T. Hạnh. *Tác dụng trừ sâu hại rau của chế phẩm Momosertatin tách từ hạt gấc (Momordica cochinchinensis)*. Tạp chí khoa học. Khoa học Tự nhiên. ĐHQGHN. T XVI, N°1, 2000, 1 – 11.
93. Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Trân Châu. *Sự biến đổi hoạt độ kim hãm triptxin (TIA) ở quả và hạt mướp đắng trong quá trình phát triển của chúng*. Tạp chí Sinh học, 1987, 9(3) : 12-17.
94. Phan Thị Hà, Phạm Thị Trân Châu. *Tác dụng của Momosertatin đến proteinaz ngoại bào của Pseudomonas phân lập từ mủ bòng*. Tạp chí Sinh học, 2000, 22(3) : 31 – 37.
95. Phan Van Chi, Hoang Quoc Truong, Nguyen Thuy Ha, Won-II Chung, Le Tran Binh. *Characterization of trichobakin, a type I ribosome – inactivating protein from Trichosanthes sp.* *Bac Kan* 8-89. Biotechnol Appl Biochem, 2001, 34(2): 85-92.
96. Polanowski A., Wilusz T., Nienartowicz B., Ciesla E., Slominska A., and Nowak K., *Isolation and partial amino acid sequence of the trypsin inhibitor from the seeds of Cucurbita maxima*. Acta Biochem.Pol. 1980, 27:371-375.
97. Polanowski, A., Otlewski, J., Leluk, J., Wilimowska – Pelc, A., and Wilusz, T., . *A new family of serine proteinase inhibitors from squash seeds*. Biol. Zentralbl . 1988, 107 : 45-49.
98. Pueyo JJ, Hunt DC, Chrispeels MJ. *Activation of bean (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor requires processing of the proprotein*. Plant Physiol., 1993, 101: 1341-1348.
99. *Qiagen Mini Handbook*, 1999, 9-11.
100. Quanhong Y, Rihe P, Aisheng X. *Momordica charantia MAP30 gene, complete cds*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 2001, Accession Number: AF 284811.
101. Rempola B., *Trypsin inhibitor gene cloned and expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Acta Biochim.Polon. 1993, 40: 8-11.
102. Reeck GR, Kramer KJ, Baker JE, *Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insect control*. The role of transgenic plants. London-Taylor and Frances, 1997, 157-183.
103. Reinboth S, Reinboth C, Lehmann L, Becker W, Apel K Parthier B. JIP60. . *Amethyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reaction*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91: 7012-7016.
104. Reisbig R, Olsnes S, Eiklid K. *The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit*. J Biol Chem, 1981, 256: 8739-8744.

105. Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, Bohnert HJ. *Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress*. Plant Mol Biol. 1997, 35: 701-709.
106. Roberts WK, Selitrennikoff CP. *Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley*. Biochim Biophys Acta. 1986, 880:161-170.
107. Rolka, K., Kupryszewski G., Ragnarsson U., Otlewski J., Krokoszynska I., Wilusz T.E. *Chemical synthesis of new trypsin, chymotrypsin and elastase inhibitors by amino acid substitutions in a trypsin inhibitor from squash seeds (CMTI-V)* Biol. Chem. Hoppe-Seyler 372. 1991, 63-58.
108. Sambrook J., Fritsch E.J. and Maniatis T. in: *Molecular cloning: Laboratory Manual, 2nd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. Cold Spring Harbor.
109. Sandvig K, Van Deurs B. *Entry of ricin and shiga toxin into cells: Molecular mechanisms and medical perspectives*. EMBO J, 2000, 10: 5943-5950.
110. Schroeder HE, Gollas S, Moore A, Tabe LM, Craig S, Hardie DC, Chispeels MJ, Spencer D, Higgins TJV. *Bean α -amylaza inhibitor*. Phytochemistry, 1995, 43: 57-62.
111. Sharma N, Park SW, Vepachedu R, Barbieri L, Ciani M, Stirpe F, Savary BJ, Vivanco JM. *Isolation and characterization of an RIP (ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic activity*. Plant Physiol. 2004, 134: 171-181.
112. Steeves RM, Denton ME, Barnard FC, Henry A, Lambert JM. *Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin*. Biochemistry, 1999, 38: 11677-11685.
113. Stensballe A and Jensen ON. *Simplified sample preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: in gel digestion on the probe surface*. Proteomics. 2001, 1: 955-966.
114. Stirpe F. *Ribosome-inactivating proteins*. Toxicon. 2004, 44: 371-383.
115. Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Bolognesi A, Polito L. *Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves*. FEBS Lett. 1996, 382: 309-312.
116. Surekha Mandal, Pallob Kundu, Biswajit Ray, and Radha K. Mandal. *Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian Mustard Brassica Juncea is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post- translation processing studies, and transgenic expression to develop insect resistant plants*. The Journal of Biol. Chem. (American). 2002, 277(40) : 37161 – 37168.
117. Troll W, Frenkel K, Wiesner R. *Protease inhibitors as anti-carcinogens*. J. Natl Cancer Inst, 1984, 73 : 1245-1250.

118. Tsang KY, Ng TB. *Isolation and characterization of a new ribosome inactivating protein, momorgrovin, from seeds of the monk's fruit Momordica grosvenorii*. Life Sci. 2001, 68 (7) : 773:784.
119. Ulrike Schindler and Anthony R. Cashmore. *Methods in Plant Molecular Biology A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press in USA, 1995, 175-297.
120. Võ T Thương Lan, Phạm T Trần Châu. *Phân lập gen mã cho triptxin inhibitor (TI-IV) từ một số cây thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật PCR*. Di truyền và ứng dụng, Chuyên san CNSH, 2000, 32-36.
121. Valbonesi P, Barbieri L, Bolognesi A, Bonora E, Polito L, Stirpe F. *Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity*. Life Sci. 1999, 65(14): 1485-1491.
122. Zheng YT, Ben KL, Jin SW. *Anti-HIV-1 activity of trichobitacin, a novel ribosome-inactivating proteins*. Acta Pharmacol Sin. 2000, 21(2): 179-182.
123. Zhi-Yuan Chen, Robert L. Brown, Alan R. Lax, Thomas E. Cleveland, John S. Russin. *Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 1320-1324.
124. Walsh TA, Morgan AE, Hey TD. *Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment*. J Biol Chem. 1991, 266: 23422-23427.
125. Wang P, Tumer NE. *Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins*. Adv Virus Res, 2000, 55: 325-355.
126. Wei YF, Cai LB and Zhuang W. *Momordica charantia RIP (rip) mRNA, complete cds*. EMBL/ Genbank/ DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 2004. Accession Number: AY 523412.
127. Wen L., Kim S-S., Tinn T.t., Hoang J-K., Krishnamoorthi Gong Y., Lwin Y.N., and Kyin S. Chemical synthesis. *Molecular cloning, overexpression and site-directed mutagenesis of the gene coding for pumpkin (Cucurbita maxima) trypsin inhibitor CMTI-V*. Protein Expression and purification, 1993, 4: 215-222.
128. Wieczorek M., Otlewski J., Cook J., Parks, K., Leluk J., Wilimowska-Pelc A., Polanowski A., Wilusz T., and Laskowski M., Jr. *The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini and cucumber seeds*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985, 126: 646-652.

129. Wood HA, Hughes PR, Aeschlimann P. *Recombinant viral insecticides: delivery of environmentally safe and cost-effective products*. International organization for biological control of noxious animals and plants, 1996.
130. Yao QZ, Yu MM, Ooi LS, Ng TB, Chang ST, Sun SS, Ooi VE. *Isolation and characterization of a type I Ribosome-Inactivating Protein from fruiting bodies of the edible mushroom (Volvariella volvacea)*. J Agric Food Chem. 1998, 46:788-792.
131. Yeung HW, Li WW, Feng Z, Barbieri L, Stirpe F. *Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin: Identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins*. Int J Pept Protein Res. 1988, 31: 265-268.
132. Yuan H, Wang L, Wang Y, An C, Chen Z. *Trichosanthin precursor (Trichosanthes kirilowii)*. EMBL/ Genbank/DDBJ Nucleotide Sequence Databases. 2004, Accession Number: AAK 52960.
133. Zarling JM, Moran PA, Haffar O, Sias J, Richman DD, Spina CA, Myers DE, Kuebelbeck V, Ledbetter JA, Uckun FM. *Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies*. Nature. 1990, 347: 92-95.
134. Zhou X, Li XD, Yuan JZ, Tang ZH, Liu WY. *Toxicity of cinnamomin - a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito*. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 259-264.
135. Zhi – Yuan Chen, Robert L. Brown, Alan R. Lax, Thomas E. Cleveland and John S. Russin. *Inhibition of plant – pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in E. coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 1320-1324.

BẢNG TỰ ĐÁNH GIÁ
VỀ TÌNH HÌNH THỰC HIỆN VÀ NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC

1. Tên đề tài :

Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, protein bất hoạt ribosome có giá trị sử dụng trong y dược, nông nghiệp.

Mã số đề tài: **KC- 04 - 14**

2. Thuộc chương trình: Khoa học và Công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước.

3. Chủ nhiệm đề tài:

GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu

4. Cơ quan chủ trì đề tài:

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

5. Thời gian thực hiện:

10/2001 – 10/2004

6. Tổng kinh phí thực hiện:

2.200.000.000 đ (Hai tỷ hai trăm triệu đồng)

Trong đó: - từ kinh phí NSNN: 2.100 triệu đồng

- từ vốn tự có: 100 triệu đồng

7. Tình hình thực hiện đề tài so với hợp đồng

7.1. Về mức độ hoàn thành khối lượng công việc

Đề tài đã hoàn thành đủ khối lượng công việc đã đăng ký, *có một số phần vượt* (trang 19-20 trong báo cáo toàn văn) cụ thể:

- Số lượng gen tái tổ hợp vượt: 01 gen
- Số qui trình sản xuất protein tái tổ hợp vượt: 01 qui trình.
- Qui trình thích hợp biểu hiện gen tái tổ hợp vượt: 01 qui trình.
- Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp vượt: 01 phương pháp.

7.2. Về các yêu cầu khoa học và chỉ tiêu cơ bản của các sản phẩm KHCN

Đạt các yêu cầu và chỉ tiêu đã đăng ký.

7.3. Về tiến độ thực hiện

Thực hiện đúng tiến độ đã ghi trong hợp đồng.

8. Về những đóng góp mới của Đề tài

PPI: Là công trình đầu tiên nghiên cứu tạo MCoTI-II của hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*) tái tổ hợp (MCoTI-II mới được chúng tôi phát hiện [32,70]) cụ thể những kết quả mới như sau:

- Đã thiết kế được các đoạn môi thích hợp để tổng hợp gen mã hoá MCoTI-II từ cây gấc.
- Thiết kế được vectơ tái tổ hợp pTYB12 mang gen mã hoá MCoTI-II (sử dụng vectơ pTYB12 cho phép sử dụng phương pháp mới để tinh sạch)
- Biến nạp thành công vectơ tái tổ hợp biểu hiện gen mã hoá MCoTI-II vào tế bào *E. coli* chủng BL21.
- ReMCoTI-II có hoạt tính ức chế không chỉ triptoxin mà còn ức chế proteinase của sâu khoang.

Các kết quả trên là những kết quả nghiên cứu đầu tiên, cho đến nay chúng tôi chưa tìm thấy trên các Tạp chí Khoa học nước ngoài.

- Kết quả thử nghiệm tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu và phát hiện được tác dụng ức chế con đường đông máu nội sinh là kết quả mới về nghiên cứu ứng dụng PPI ở nước ta, có tiềm năng ứng dụng quan trọng.

α -AI: Là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu tạo α -AI tái tổ hợp của đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*):

- Xác định trình tự nucleotit của gen α -AI từ đậu cô ve.
- Thiết kế được vectơ tái tổ hợp pET21(+) mang gen α -AI.
- Đã biến nạp thành công vectơ tái tổ hợp biểu hiện gen mã hoá α AI vào vi khuẩn *E. coli* BL21.
- Re α -AI thô có khả năng diệt một ngô (*Sitophilus reamays*), một đậu (*Callosobruchus chinensis*).

RIP: Có được 1 trình tự gen mã hoá RIP (mã số AJ 748278) đăng ký vào Ngân hàng Gen Quốc tế.

- Thiết kế thành công vectơ biểu hiện PET21d(+) mang gen mã hoá RIP.
- Biến nạp thành công vectơ tái tổ hợp biểu hiện gen mã hoá RIP vào tế bào *E. coli* chủng BL21.
- Đã đo khối phổ MALDI – TOF MS và MS/MS sản phẩm biểu hiện của gen RIP và xác định chính xác protein tái tổ hợp là RIP.

9. Về giải pháp khoa học – công nghệ

9.1. Tối ưu hoá qui trình nuôi cấy các vi khuẩn tái tổ hợp: 4 qui trình

- Qui trình nuôi cấy thích hợp vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* để biểu hiện gen mã hoá MCoTI-II tái tổ hợp (ở dạng dung hợp) chiếm 70-80% protein tổng số.

- Qui trình nuôi cấy thích hợp *E. coli* tái tổ hợp để biểu hiện gen mã hoá CMTI-V.
- Qui trình nuôi cấy thích hợp *E. coli* tái tổ hợp để biểu hiện gen mã hoá α AI.
- Qui trình nuôi cấy thích hợp *E. coli* tái tổ hợp để biểu hiện gen mã hoá RIP.

9.2. Phương pháp tinh sạch các protein tái tổ hợp: 4 phương pháp

- Sử dụng được phương pháp mới, đơn giản để tinh sạch ReMCoTI-II, đây là phương pháp còn mới mẻ để tinh sạch protein tái tổ hợp, hầu như chưa được sử dụng ở Việt nam.
- Tìm được qui trình đơn giản loại protein tạp để thu nhận chế phẩm ReCMTI-V dạng sơ chế, đề xuất được qui trình đơn giản để tinh sạch ReCMTI-V.
- Đề xuất được qui trình tách, tinh sạch Re α -AI chỉ sử dụng các hoá chất thông dụng.
- Đã xây dựng được qui trình tinh sạch RIP tái tổ hợp bằng phương pháp sắc kí trao đổi ion.

9.3. Qui trình sử dụng các protein tái tổ hợp

- Qui trình thử nghiệm tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu.
- Qui trình thử nghiệm tác dụng của Re α -AI đến một ngô, một đậu.

9.4. Thiết kế vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp phục vụ việc chuyển gen vào cây trồng

Đã sử dụng các vectơ pCMBIA là thế hệ vectơ 2 nguồn mới nhất và vectơ pNOV 2819 là thế hệ vectơ chọn lọc tích cực đang được ưa chuộng hiện nay để thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp mang các gen đích:

- Đã thiết kế được vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp pCMBIA 1300 mang gen mã hoá MCoTI-II.
- Đã thiết kế được vectơ Ti-plasmit pCMBIA1201 mang gen mã hoá α -AI.
- Đã sử dụng 2 vectơ nguồn là pCMBIA 1300 và pNOV2819 để thiết kế Ti-plasmit trung gian pNOA-35S+ NOS, từ vectơ cơ sở này đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen mã hoá RIP phục vụ việc chuyển gen vào cây trồng.

9.5. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa Ti-plasmit tái tổ hợp phục vụ việc chuyển gen kháng sâu vào cây trồng.

- 2 chủng *A. tumefaciens* EHA 105: pCTI-5 và EHA105: pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen MCoTI-II.
- 2 chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp EHA105: pNOA +RIP và LBA4404: pNOA +RIP mang gen RIP.

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

Các bài báo:

1. **Synthesis, cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for MCoTI-II.** Phạm Thị Trân Châu, M.K. Reddy, Đào Thị Thuý, Hoàng Thu Hà, Lê Nguyên Dũng, Laurent Chiche (2005). *VNU. Journal of science, Nat., Sci & Tech*, 1(20): 8-18.
2. **Tách dòng gen mã hoá một chất ức chế tripxin của hạt bí đỏ (*Cucurbita maxima*) CMTI-V và biểu hiện ở *E.coli*.** Đào Thị Thuý, Nguyễn Quỳnh Uyển, Nguyễn Thị Bích Hậu, Võ Thị Thương Lan và Phạm Thị Trân Châu (2004). *Tạp chí Khoa học, ĐHQGHN, KHTN & CN*, 3(20): 1-10.
3. **Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI mã hoá protein ức chế tripxin phân lập từ hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*) – MCoTI-II.** Lê Thu Hiền, Đào Thị Thuý, Phan Thị Hà, Nguyễn Đăng Tôn, Nông Văn Hải, Phạm Thị Trân Châu (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2(3): 335-344.
4. **Tinh chế và phân tích khối phổ protein bất hoạt ribosome tái tổ hợp từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.).** Nguyễn Đình Cường, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Đặng Thành Nam, Phan Văn Chi (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(2): 217-226.
5. **Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP) từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.) để chuyển vào cây trồng.** Lê Thị Thu Hiền, Đào Minh Châu, Nguyễn Đình Cường, Phạm Thu Thủy, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2(4): 461-470.
6. **Biểu hiện gen mã hoá protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*.** Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thuỳ Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải (2003). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(4): 451-460.
7. **Điều tra sự phân bố và nghiên cứu một số tính chất của protein kìm hãm amylaz (α -AI) từ một số cây họ đậu (*Fabaceae*).** Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu (2002). *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng*, 1: 39-44.

Các báo cáo:

1. **Synthesis, cloning and expression in *E. coli* of a gene coding for MCoTI-II.** Tran Chau Thi Pham *et. al...* (2004) 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference. *Genomics and Health in 21st Century*

Bangkok, Thailand November 22-26, 2004. Program and abstracts OP-C9, pp. 87. (oral presentation).

2. **Purification of a recombinant trypsin inhibitor CMTI-V.** Dang Xuan Nghiem, Phan Thi Ha, Nguyen Phuong Nam and Pham Thi Tran Chau (2004). 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference. Genomics and Health in 21st Century Bangkok, Thailand November 22-26, 2004. Ibid. OP-6.23, p.167 (poster).
3. **Expression of gene encoding α -amylase inhibitor from common bean (*Phaseolus vulgaris*) in *Escherichia coli*.** Đặng Thị Thu, Trương Quốc Phong, Nông Văn Hải (2003). *Proceeding of the 8th Asean food conference 8-11 October 2003, Ha noi, Vietnam*, 1: 30-34.
4. **Tripxin inhibitors (TIs) from *Momordica cochinchinensis*.** Pham Thi Tran Chau, Le Nguyen Dung, Laurent Chiche (2002). 16th FAOBMB Symposium, Taipei, Sept. 20-22, 2002. *From genes to proteins: Frontiers in Biochemistry and Molecular Biology. Program Book* . OP. 22, p.33 (oral presentation).

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

* Khoá luận tốt nghiệp

1. **Đề tài:** Thiết kế vector biểu hiện chất kìm hãm α -amilaza từ đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) để sử dụng trong bảo quản sau thu hoạch.
Sinh viên : Phạm Ái Nhi
Năm bảo vệ: 2001.
2. **Đề tài:** Tổng hợp nhân tạo gen mã hoá cho protein ức chế tripxin ở bí ngô (*Cucurbita maxima*)
Sinh viên: Nguyễn Thị Bích Hậu (hệ cử nhân tài năng)
Năm bảo vệ: 2002.
3. **Đề tài :** Biểu hiện gen mã hoá protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*.
Sinh viên: Phạm Minh Thu
Năm bảo vệ: 2003.
4. **Đề tài:** Biểu hiện và tinh chế protein lai ATS-TBK ở *E. coli*
Sinh viên Giang Thị Hương Huyền
Năm bảo vệ: 2003

5. Đề tài: Thiết kế vectơ Ti-plasmit mang gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaza từ đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) làm nguyên liệu chuyển gen thực vật.

Sinh viên : Vi Quốc Hạnh

Năm bảo vệ: 2004.

6. Đề tài: Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP) từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.) để chuyển vào cây trồng.

Sinh viên: Đào Minh Châu

Năm bảo vệ: 2005

* *Luận án thạc sĩ:*

1. Đề tài: Nghiên cứu biểu hiện và tính chế minitricobakin

Học viên: Trịnh Tất Cường

Năm bảo vệ: 2003

2. Đề tài: Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy và một số đặc tính của protein tái tổ hợp kìm hãm α -amilaza từ vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE23).

Học viên: Đào Hồng Vân

Năm bảo vệ: 2004

3. Đề tài: Nghiên cứu các phương pháp tinh sạch một chất ức chế tripxin tái tổ hợp.

Học viên: Đặng Xuân Nghiêm.

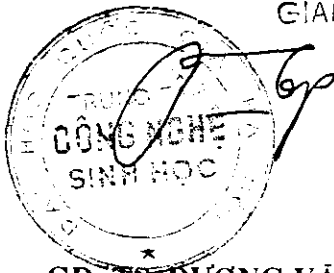
Năm bảo vệ: sẽ bảo vệ năm 2005 (do học viên tham gia lớp học DAAD, học tiếng Đức nên phải lùi thời gian bảo vệ).

LỜI CẢM ƠN

Trung tâm Công nghệ Sinh học-Đại học Quốc gia Hà Nội, cơ quan chủ trì đề tài KC-04-14, Chủ nhiệm đề tài KC-04-14 và tất cả các thành viên đề tài xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đặc biệt là Vụ quản lý Khoa học Công nghệ các ngành kinh tế - kỹ thuật, Vụ kế hoạch-Tài chính; Lãnh đạo Đại học Quốc gia Hà Nội, Ông chủ nhiệm và Ban chủ nhiệm, Văn phòng và Ban thư ký chương trình KC-04 đã ủng hộ, quan tâm chỉ đạo và tạo điều kiện thuận lợi để đề tài hoàn thành tốt các mục tiêu, nhiệm vụ đã đề ra.

Cơ quan chủ trì và Chủ nhiệm đề tài KC-04-14 đánh giá cao sự phối hợp có trách nhiệm và hiệu quả của các cán bộ chủ trì và tham gia thực hiện các đề tài nhánh, các cơ quan chủ trì thực hiện các đề tài nhánh: Viện Công nghệ Sinh học-Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội; Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học Công nghệ Quốc gia.

**CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI
GIÁM ĐỐC**



GD: TS. DUƠNG VĂN HỢP

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI

A handwritten signature in black ink, belonging to GS.TSKH Phạm Thị Trân Châu.

GS.TSKH PHẠM THỊ TRẦN CHÂU

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM CỦA ĐỀ TÀI

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Ảnh hưởng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu

Nơi thực hiện: Khoa Đông- Cầm máu – Viện Huyết học truyền máu Trung Ương

Phương pháp:

Sử dụng các xét nghiệm:

- APTT (*Activated Partial Thromboplastin Time*) để đánh giá đường đông máu nội sinh.
- PT (*Prothrombin Time*) để đánh giá đường đông máu ngoại sinh
- TT (*Thrombin Time*) để đánh giá giai đoạn chung chuyển từ fibrinogen thành fibrin dưới tác dụng của thrombin.

Các xét nghiệm này được tiến hành trên máy ACL 100, bằng hoá chất của hãng IL.

Điều kiện xét nghiệm:

- Trộn chế phẩm với huyết tương bình thường để phát hiện tác dụng của chế phẩm lên hệ thống đông máu (sử dụng NaCl 0,9% thay cho chế phẩm ở nhóm đối chứng)
- Nếu chế phẩm được phát hiện có tác dụng chống đông, trộn chế phẩm với huyết tương đối chứng với những tỉ lệ khác nhau để xác định ở nồng độ nào còn tác dụng.

Nguyên liệu: - ReCMTI-V tinh sạch do đề tài KC-04-14 sản xuất.

- Huyết tương của người bình thường.

Kết quả:

Kết quả nghiên cứu của một số tác giả trước đây [Hojima Y., et al..., 1982, Krishnamoorthi R, et al..., 1990] cho thấy CMTI-V còn có tác dụng ức chế yếu tố XIIa (một proteinase xerin) xúc tác cho phản ứng đầu tiên của quá trình đông máu. Nếu ức chế yếu tố này sẽ kéo dài thời gian đông máu. Điều này có ý nghĩa thực tế: *ức chế yếu tố XIIa sẽ làm hạn chế những tình trạng tăng đông máu nhất là tăng đông do phát động quá mức yếu tố tiếp xúc thường gặp trong phẫu thuật đa chấn thương, tai biến sản khoa... Ức chế yếu tố XIIa sẽ là một chất chống đông hiệu quả và an toàn hơn heparin vì phổ tác dụng của nó không rộng như heparin. Vì vậy, ức chế XIIa có thể được sử dụng để điều trị dự phòng trong phẫu thuật sẽ an toàn hơn heparin.*

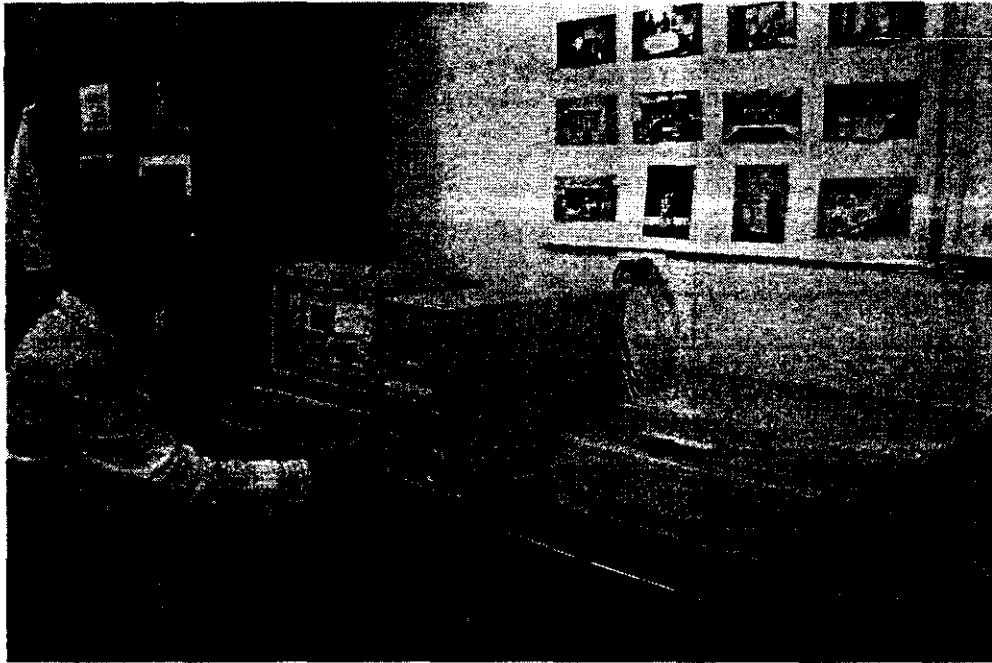
Chúng tôi đã thử nghiệm ảnh hưởng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu bằng các xét nghiệm các chỉ số sau: APTT, PT, TT.



Siêu âm phá màng tế bào vi khuẩn



Đồng khô sản phẩm



Máy Scan Sharp IX330



Hệ thống FPLC – tinh sạch protein tái tổ hợp



Các chế phẩm : ReCMTI-V ; Re α AI ; ReRIP

TTCNSH
ĐHQGHN
TTCNSH
ĐHQGHN
TTCNSH

ĐHQGHN
TTCNSH

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
Trung tâm Công nghệ Sinh học
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

Báo cáo tóm tắt tổng kết khoa học và kỹ thuật Đề tài

**“NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
PROTEIN TÁI TỔ HỢP, PROTEIN BẤT HOẠT
RIBOXOM CÓ GIÁ TRỊ SỬ DỤNG TRONG Y
DƯỢC VÀ NÔNG NGHIỆP”**

MÃ SỐ: KC - 04 - 14

CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI: GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Hà Nội, tháng 10 năm 2004

5414 TT

13/7/05

Ch...

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
Trung tâm Công nghệ Sinh học
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

**BÁO CÁO TÓM TẮT TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ
THUẬT ĐỀ TÀI**

**“NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
PROTEIN TÁI TỔ HỢP, PROTEIN BẤT HOẠT RIBOXOM CÓ
GIÁ TRỊ SỬ DỤNG TRONG Y DƯỢC VÀ NÔNG NGHIỆP”**

CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI: GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Hà nội, tháng 10 năm 2004
Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước,
mã số KC-04-14

CÁC ĐỀ TÀI NHÁNH

- 14.1. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp ức chế proteinaz (RePPI)*

Chủ trì: GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học,

Đại học Quốc gia Hà Nội

- 14.2. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp ức chế α -amilaz (Re α -AI)*

Chủ trì: PGS. TS. Đặng Thị Thu

Bộ môn Công nghệ thực phẩm – Công nghệ sau thu hoạch,

Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm,

Đại học Bách khoa Hà nội

- 14.3. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein bất hoạt riboxom*

Chủ trì: PGS. TS. Nông Văn Hải

Viện Công nghệ Sinh học,

Viện Khoa học và Công nghệ Quốc gia

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

Đề tài nhánh	Họ tên	Cơ quan
14.1	GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu	TTCNSH-ĐHQGHN
	TS. M.K. Reddy	Khối (Division) Sinh học phân tử thực vật, Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ sinh học, Ấn độ.
	TS. Võ Thương Lan	Khoa Sinh học, ĐHKHTN-ĐHQGHN
	PGS.TS. Trịnh Hồng Thái	“
	TS. Dương Văn Hợp	TTCNSH-ĐHQGHN
	Ths. Phan Thị Hà	Phòng CN Enzim-Protein, TTCNSH-ĐHQGHN
	CN. Đào Thị Thuý	“
	CN. Hoàng Thu Hà	“
	CN. Nguyễn Quỳnh Uyên	“
	CN. Đặng Xuân Nghiêm	“
	CN. Nguyễn Phương Nam	“
	KS. Nguyễn Phương Thảo	“
	KS. Mai Kiều Linh	“
14.2	PGS.TS. Đặng Thị Thu	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Nguyễn Xuân Sâm	Viện CNSH-CNTP
	TS. Tô Kim Anh	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Lê Quang Hoà	“
	CN. Trương Quốc Phong	“
14.3	PGS. TS. Nông Văn Hải	Viện CNSH, Viện KHCN Quốc gia
	PGS. TS. Phan Văn Chi	“
	TS. Lê Thị Thu Hiền	“
	TS. Trần Thị Phương Liên	“
	Ths. Nguyễn Huy Hoàng	“
	Ths. Nguyễn Đăng Tôn	“
	CN. Nguyễn Đình Cường	“
	CN. Đặng Thành Nam	“
	CN. Nguyễn Thuỳ Dương	“
	CN. Phạm Thu Thuý	“

BÀI TÓM TẮT

Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã phát hiện được các nguồn thực vật giàu các protein ức chế proteinaz (PPI), protein ức chế α - amilaz (α - AI), protein bất hoạt riboxom (RIP). Chúng tôi đã nghiên cứu tính chất, khả năng ứng dụng thực tế của các chất này. Kết quả cho thấy MCoTI-II tách từ hạt gạo ($M_r=3,48\text{kD}$), CMTI-V của hạt bí đỏ ($M_r=7,1\text{kD}$), α -AI của hạt đậu cove ($M_r \sim 18\text{kD}$), RIP của quả mướp đắng ($M_r \sim 30\text{kD}$) có tiềm năng ứng dụng lớn để làm thuốc chữa bệnh, trừ sâu hại. Công trình này nhằm sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để tạo các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp các chất đã nêu làm cơ sở để có thể lên men sản xuất chúng với lượng lớn. Mặt khác, thiết kế các vectơ phục vụ chuyển các gen, tạo các chủng *Agrobacterium* thích hợp để chuyển gen vào cây trồng.

Kết quả nghiên cứu của đề tài:

1. Đã tách ADN genom của gạo, bí đỏ, mướp đắng, đậu cove, có độ sạch đạt yêu cầu ($OD_{260}/OD_{280} = 1.85-1.9$).
2. Đã tổng hợp hoặc phân lập được 4 gen: 2 gen mã hoá PPI là gen MCoTI-II, gen CMTI-V; một gen mã hoá α -AI; một gen mã hoá RIP, các gen có các trung tâm nhận biết của các enzym giới hạn đã được lựa chọn. Nhân bản các gen bằng kỹ thuật PCR kiểm tra kích thước trên gel agaroz, các gen có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết, theo thứ tự tương ứng vào khoảng 110bp; 230bp; 700bp; 800bp, có độ đồng nhất điện di (cho 1 băng). Đã xác định trình tự nucleotit của các gen này là đúng.
3. Đã lựa chọn các vectơ thích hợp, xử lý với các enzym giới hạn tương thích, gắn với các protein đích tạo các vectơ tái tổ hợp. Bốn vectơ tái tổ hợp được thiết kế được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* BL21 để biểu hiện các protein đích. Đối với MCoTI-II sử dụng vectơ pTYB12, các enzym *NdeI*, *XhoI*; CMTI-V: vectơ pET14b, các enzym *NdeI*, *BamHI*; với α - AI và RIP: vectơ pET21d (+), các enzym *NcoI*, *BamHI*. Các vi khuẩn tái tổ hợp được kí hiệu là: PI-17 mang gen MCoTI-II; BL21-TI mang gen CMTI-V; BL21- α AI mang gen α -AI; BL21-RIP mang gen RIP.

Trước khi tiến hành nuôi biểu hiện đã kiểm tra kết quả biến nạp bằng cách tách plasmit của các vi khuẩn này, cắt bằng các enzym giới hạn tương ứng, điện di trên agaroz, sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi tương thích để nhân bản gen đích, điện di trên gel agaroz,

PAG, kiểm tra trình tự nucleotit của các gen đích. Các kết quả cho thấy đã biến nạp thành công.

4. Đã xây dựng 4 qui trình (vượt kế hoạch 1 qui trình) thích hợp để nuôi các vi khuẩn tái tổ hợp:

Đã lựa chọn được các điều kiện thích hợp (về nhiệt độ, nồng độ ampicilin, nồng độ chất cảm ứng, thời gian nuôi v.v...) để nuôi các vi khuẩn tái tổ hợp biểu hiện gen đích. Đối với tất cả 4 vi khuẩn tái tổ hợp đều nuôi trong môi trường LB pH 7.0, sau khi thêm dung dịch huyền phù vi khuẩn vào, lắc hoặc khuấy (trong nổi lên men) 220 vòng/phút, thêm chất cảm ứng IPTG và nuôi tiếp. Tuy nhiên điều kiện nuôi mỗi vi khuẩn có những khác nhau như đã ghi trong bảng sau:

Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicilin ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi ($^{\circ}\text{C}$)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI (mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- αAI (mang gen αAI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

5. Thu protein tái tổ hợp ở dạng sơ chế, tinh sạch: Thu tế bào vi khuẩn bằng cách li tâm ở 4°C , tốc độ 5000-6000 vòng/phút, phá vỡ màng tế bào bằng siêu âm, nhưng đối với mỗi loại vi khuẩn có những sai khác như về thành phần dung dịch để trộn tế bào trước khi phá vỡ bằng siêu âm.

+ *PI-17 và BL21-TI*: sau khi li tâm thu tế bào còn tiến hành rửa nhanh tế bào bằng cách li tâm trong dung dịch đệm TE, giữ ở -20°C trước khi xử lí bằng siêu âm trong dung dịch đệm TE.

+ *BL21 - αAI* : trộn tế bào trong dung dịch đệm STET, thêm lizozim ($1\mu\text{g/ml}$) xử lí ở 30°C trong 30 phút rồi mới xử lí bằng siêu âm.

+ *BL21-RIP*: tế bào trộn trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM pH 7.0 có EDTA 20mM, 0.01% triton và lizozim $0,3\mu\text{g/ml}$.

Sau khi xử lí bằng siêu âm, li tâm ở 10000-12000 vòng/phút ở 4°C , thu dịch nổi

trong, giữ ở dạng lỏng, cô đặc hoặc đông khô. Kiểm tra sản phẩm biểu hiện bằng phương pháp PAGE dịch chiết tế bào vi khuẩn nuôi có IPTG và không có IPTG (đối chứng). Đã phát hiện được sự sai khác rõ rệt về phổ điện di, trong đó có một băng protein chiếm tỉ lệ lớn hơn hẳn so với mẫu đối chứng, đó là các protein được biểu hiện bởi các gen đích đã đưa vào vi khuẩn tái tổ hợp. Cụ thể:

- + PI-17: băng protein có Mr khoảng 58 kD là dạng dung hợp của ReMCoTI-II Mr hơn 3,4 kD và protein intein-tag với Mr =55kD. Băng này chiếm đến 50% tổng protein.
- + BL21-TI: băng protein có kích thước khoảng 7kD (đúng với kích thước của CMTI-V), chiếm khoảng 15% tổng protein.
- + BL21- α AI: băng protein có kích thước bằng kích thước 18kD của α AI từ đậu cô ve.
- + BL21-RIP: băng protein với Mr 30 kD (bằng Mr của RIP từ mướp đắng).

6. Đã thiết lập 4 qui trình tinh sạch (vượt kế hoạch 1 qui trình) 4 protein tái tổ hợp là ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Re α -AI, Re RIP. Cụ thể như sau:

6.1. Qui trình tinh sạch ReMCoTI-II: sử dụng phương pháp sắc kí ái lực với cột chitin, khi có chất khử DTT, giữ ở 4°C trong 40 giờ protein dung hợp 58kD tự cắt, giải phóng ReMCoTI-II. Rút ReMCoTI-II, đông khô, loại muối, đông khô thu được sản phẩm chỉ cho 1 băng protein với kích thước khoảng 3kD khi điện di trên PAG.

6.2. Qui trình tinh sạch ReCMTI-V: Chế phẩm thô (dịch chiết tế bào) được điều chỉnh đến pH 4.5 để loại protein tạp, li tâm thu dịch trong, loại mẫu bằng DEAE xenluloz, tinh sạch qua cột HiTrap Q, phản hấp phụ bằng dung dịch Tris-HCl 0.015M với các nồng độ NaCl khác nhau. ReCMTI-V được rút xuống ở nồng độ NaCl 0.1M.

6.3. Qui trình tinh sạch Re α -AI: Kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà làm lạnh trong nước đá 4 giờ, li tâm thu kết tủa, hoà tan trong nước, thẩm tích trong nước 36 giờ ở 4°C, tiếp theo thẩm tích trong dung dịch đệm photphat 20mM pH 6.7 trong hơn 12 giờ ở 4°C, sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm trên với gradient nồng độ NaCl. Re α -AI được rút xuống ở nồng độ NaCl 0,6M.

6.4. Qui trình tinh sạch RIP: Sắc kí qua cột CM-Sepharoz trên hệ thống FPLC, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM pH 7.2 với gradient nồng độ NaCl từ 0.0M-0.4M. ReRIP được rút ở nồng độ muối 0.4M. Kiểm tra độ sạch của các protein bằng phương pháp PAGE, MALDI-TOF MS.

Tổng lượng 4 protein tái tổ hợp thu được là 4 gam.

7. Thử hoạt tính và ứng dụng của 4 protein tái tổ hợp:

7.1. Hoạt tính của ReMCoTI-II: sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất edestin, kết quả cho thấy MCoTI-II ức chế tripxin và ức chế proteinaz của sâu khoang. Do đó gen này được nghiên cứu tiếp để phục vụ chuyển gen vào thực vật.

7.2. Hoạt tính của ReCMTI-V: ReCMTI-V không chỉ có hoạt tính ức chế tripxin mà còn có tác dụng ức chế đường đông máu nội sinh (kết quả thử nghiệm của Khoa Đông-Cầm máu, Viện Huyết học truyền máu Trung ương).

7.3. Hoạt tính của Re α -AI: có khả năng diệt được một ngô (*Sitophilus zeamays*), một đậu (*Callosobruchus chinensis*).

7.4. Hoạt tính của ReRIP: có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của vi khuẩn (*B. subtilis*, *P. putida*) và nấm mốc (*A. flavus*, *A. parasiticus*).

8. Thiết kế các vectơ phục vụ việc chuyển gen vào cây trồng

8.1. Đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pCAMBIA1300 mang gen MCoTI-II; Ti-plasmit tái tổ hợp pCAMBIA 1301 mang gen mã hoá α -AI; 2 vectơ trung gian thế hệ mới pCAMBIA 1300 và pNOV2819 mang tổ hợp adaptor và đoạn khởi động CaMV35S+đoạn kết thúc NOS, đã ghép thành công gen mã hoá RIP vào vectơ trung gian.

8.2. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp chứa các Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen đích phục vụ cho việc chuyển gen vào cây trồng. Cụ thể:

- 2 chủng EHA105 là pCTI-5 và pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI-II.
- EHA105: pNOA+RIP-9 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen RIP.

Tóm lại, đề tài đã hoàn thành tất cả nội dung, yêu cầu khoa học, sản phẩm đã đăng ký.

Vượt kế hoạch 1 PPI tái tổ hợp.

MỤC LỤC

Các đề tài nhánh	1
Danh sách những người thực hiện	2
Bài tóm tắt	3
Mục lục	7
Lời mở đầu	8
Chương 1. Thông tin chung về đề tài	10
Chương 2. Phương pháp nghiên cứu	16
2.1 Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị	16
2.2 Phương pháp nghiên cứu	18
Chương 3. Kết quả	19
3.1 Phân lập gen, thiết kế các vectơ tái tổ hợp mã hoá cho các gen MCoTI-II, CMTI-V, α -AI, RIP	19
3.1.1 Tách ADN tổng số	19
3.1.2 Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V), MCoTI-II (TI-II), α -AI và RIP từ ADN tổng số của các thực vật tương ứng bằng kỹ thuật PCR....	22
3.1.3 Thiết kế và biến nạp các vectơ tái tổ hợp	23
3.1.4 Giải trình tự các gen CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP	27
3.2 Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> tái tổ hợp.....	29
3.3 Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch các protein tái tổ hợp.....	29
3.4 Quy trình sử dụng thử nghiệm (qui mô phòng thí nghiệm) các chế phẩm protein tái tổ hợp.....	33
3.5 Thiết kế các vectơ mang gen tái tổ hợp phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng	35
Chương 4. KẾT LUẬN	40
Tài liệu tham khảo	42

LỜI MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu của nước ngoài cũng như các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy các protein ức chế proteinaz (PPI), protein ức chế α -amilaz (α -AI) cũng như protein bất hoạt riboxom (RIP) tách từ thực vật có tiềm năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược. Mặc dù đã tìm được các nguồn thực vật giàu các chất này và cũng đã sử dụng chúng làm nguyên liệu để sản xuất các chất đã nêu nhưng trong thực tế cũng có những khó khăn: chu kỳ sống của thực vật dài, việc khai thác phụ thuộc vào mùa vụ, hàm lượng không ổn định v.v... Vì vậy bên cạnh việc khai thác nguồn nguyên liệu tự nhiên cần tiến hành nghiên cứu sản xuất protein bằng con đường tái tổ hợp nhằm khắc phục được các điểm yếu đã nêu.

Các protein kìm hãm proteinaz (PPI) là những protein làm giảm thuận nghịch hoạt độ của các proteaz. Proteaz tham gia vào nhiều quá trình sống quan trọng như hoạt hoá proenzim, prohoocmon, đông máu, thụ tinh, viêm, nhiễm, biến thái, quá trình tấn công của nấm mốc, vi khuẩn, virus (kể cả HIV) vào vật chủ v.v... Vì vậy PPI không chỉ điều hòa quá trình phân giải protein nội sinh mà còn có thể góp phần bảo vệ cơ thể, giới hạn tác dụng của các yếu tố gây bệnh, kìm hãm quá trình sinh trưởng phát triển của côn trùng v.v...

Các chất kìm hãm α -amilaz (α -AI) đã được nghiên cứu trong nhiều phòng thí nghiệm từ năm 1945. Khối lượng phân tử α -AI từ 14-18 kD. α -AI có nhiều trong không bào của cây đậu *P. vulgaris*. α -AI có tác dụng kìm hãm α -amilaz nên đã làm giảm tác hại của côn trùng, sâu mọt, bọ cánh cứng phá hoại lương thực trong quá trình bảo quản hoặc có thể sử dụng để điều trị các bệnh do hoạt độ amilaz tăng cao quá mức bình thường. Vì vậy, chúng có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực bảo vệ thực vật trước và sau thu hoạch, cũng như trong một số lĩnh vực y học.

Các protein bất hoạt riboxom (RIP) của thực vật là một nhóm protein có hoạt tính N - glicozidaz có khả năng nhận biết và cắt gốc adenin đặc hiệu trên tiểu phần rARN lớn, do đó phá hủy riboxom và ngăn cản quá trình sinh tổng hợp protein. RIP được tìm thấy đầu tiên ở thực vật, chủ yếu ở thực vật hạt kín (cả thực vật một và hai lá mầm). Đồng thời, RIP cũng đã được phát hiện ở nấm *Volvariella volvacea* và *Lyophyllum shimeij*, tảo *Laminaria japonica*. Một số RIP có thể sử dụng làm thuốc ra thai, thuốc

chống HIV, chống ung thư. RIP còn đóng vai trò trong hệ thống bảo vệ của thực vật bởi hoạt tính kháng nấm, vi khuẩn, virus. Ngoài ra, RIP không những tác động lên ribosom của động vật có vú mà còn tác động lên ribosom của các côn trùng, thực vật, nấm men và vi khuẩn.

Các kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã phát hiện được một vài PPI, α -AI và RIP có khả năng sử dụng trong nông nghiệp và y dược. Cụ thể là: MCoTI-II (PPI từ hạt gấc – *Momordica cochinchinensis*), CMTI-V (PPI của hạt bí đỏ – *Cucurbita maxima*), α -AI từ đậu cove (*Phaseolus vulgaris*), RIP của hạt mướp đắng (*Momordica charantia*). Tuy nhiên do những hạn chế trong việc khai thác nguồn nguyên liệu tự nhiên (mùa vụ, chất lượng...) nên chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số vi khuẩn tái tổ hợp mang các gen quy định các protein nói trên.

Để đạt được mục tiêu này chúng tôi đã tiến hành tổng hợp hoặc phân lập các gen mã hoá cho các protein đích: MCoTI-II của hạt gấc, CMTI-V của hạt bí đỏ, α -AI của đậu cove, RIP của mướp đắng; thiết kế các vectơ mang các gen này và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* để tạo các vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp các protein đích; nghiên cứu các điều kiện thích hợp để nuôi cấy các vi khuẩn tái tổ hợp; xây dựng qui trình tách và tinh sạch các protein tái tổ hợp để tiến hành ứng dụng thử.

Mặt khác, đối với các protein có khả năng diệt côn trùng, tiến hành thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng.

CHƯƠNG 1. THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

1. Tên đề tài: *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, protein bất hoạt riboxom có giá trị sử dụng trong y dược và nông nghiệp*

2. Mã số: **KC-04-14**

3. Thời gian thực hiện : 36 tháng (Từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004)

4. Cấp quản lý: Nhà nước

5. Kinh phí: Tổng số = 2.200.000.000 VND

Trong đó, từ Ngân sách SNKH: 2.100.000.000

6. Thuộc Chương trình: “Nghiên cứu Khoa học và Phát triển Công nghệ Sinh học”

7. Chủ nhiệm đề tài:

Họ và tên: **Phạm Thị Trân Châu**

Học hàm/học vị: Giáo sư, Tiến sĩ Khoa học

Điện thoại: 7.680.638 (CQ) / 8.543.905 (NR)

E-mail: chauptt@vnu.edu.vn ; pttranchau@yahoo.com

Địa chỉ cơ quan: Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội
144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu giấy, Hà nội

Địa chỉ nhà riêng: Số 17, ngõ Bạch Liên (ngõ 126), đường Khuất Duy Tiến,
Nhân chính, Thanh Xuân, Hà nội.

8. Cơ quan chủ trì đề tài:

Tên tổ chức KH&CN: Trung tâm Công nghệ Sinh học,
Đại học Quốc gia Hà nội

Điện thoại: 7.680.907 Fax: 7.680.907

E-mail: biotechttk@hn.vnn.vn

Địa chỉ: Nhà E2-144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu Giấy, Hà nội

9. Mục tiêu của đề tài:

Thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số protein tái tổ hợp có khả năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

10. Nội dung nghiên cứu đã đăng ký

* Phân lập và đọc trình tự nucleotit của các gen TI, α AI, RIP:

- Thu thập mẫu cây có chứa gen mã hoá TI, RIP (các cây họ bầu bí như: *Cucurbita maxima*, *Momordica cochinchinensis*...) và α -AI (một số loại đậu cô ve: *Phaseolus vulgaris*).

- Tách chiết và tinh sạch ADN từ các mẫu thực vật trên.
 - Thiết kế trình tự các cặp mồi thích hợp của các gen TI, α -AI, RIP.
 - Phân lập các gen TI, α -AI, RIP mong muốn.
 - Kiểm tra các gen phân lập được bằng cách dùng enzym giới hạn để cắt và đọc trình tự nucleotit của gen.
- * Thiết kế các vectơ biểu hiện gen TI, α -AI, RIP trong *E. coli* hoặc nấm men:**
- Chọn các vectơ thích hợp.
 - Biến nạp gen vào *E. coli* hoặc nấm men
 - Xác định sự biểu hiện gen tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* hoặc nấm men.
- * Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn mang gen protein tái tổ hợp:**
- Lựa chọn điều kiện nuôi cấy (môi trường, nhiệt độ, pH...).
 - Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy thu sản phẩm.
- * Thăm dò điều kiện tách và tinh sạch protein tái tổ hợp:**
- Thăm dò điều kiện tách protein tái tổ hợp từ *E.coli* hoặc nấm men đã được biểu hiện gen.
 - Tinh sạch protein tái tổ hợp qua các bước sắc ký: lọc gel, trao đổi ion, ái lực,...
Chọn điều kiện và xây dựng quy trình tinh sạch thích hợp ít nhất 3 protein tái tổ hợp TI, α -AI, RIP
 - Đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp điện di phát hiện trực tiếp các băng TI, α -AI, RIP trên gel poliacrilamit, điện di protein.
 - Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp thu được.
- * Thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm:**
- Thử tác dụng của các chế phẩm protein tái tổ hợp (TI, α -AI, RIP) trừ các loại sâu rau (sâu xanh, sâu tơ, sâu khoang...) và các loại côn trùng có hại khác. Đánh giá hiệu quả trừ sâu của chế phẩm này.
 - Thử tác dụng kháng khuẩn của TI và RIP.
 - Thử tác dụng của TI ức chế một số yếu tố đông máu có vai trò trong điều trị bệnh thrombosis.
 - Thăm dò các ứng dụng khác trong y học.
- * Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng**
- Có các chủng *Agrobacterium* thích hợp để chuyển gen vào cây trồng.

11. BẢNG THỐNG KÊ KẾT QUẢ ĐỐI CHIẾU VỚI NỘI DUNG ĐÃ ĐĂNG KÝ CỦA SẢN PHẨM TẠO RA

S TT	Đã đăng ký		Kết quả đã đạt được		
	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Mức số lượng và chất lượng cần đạt của cả đề tài	Số lượng sản phẩm tạo ra	Chất lượng sản phẩm tạo ra	Đánh giá
(1)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)
1.	VẬT LIỆU				
	* Gen tái tổ hợp	3 gen tái tổ hợp có hoạt lực ổn định	Tổng số là 04 gen tái tổ hợp - 01 gen tái tổ hợp mã hoá MCoTI -II từ cây gấc (<i>Momordica cochinchinesis</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá CMTI-V từ cây bí đỏ (<i>Cucurbita maxima</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá gen RIP từ cây mướp đắng Việt Nam (<i>Momordica charantia</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá gen α -AI từ cây đậu cove (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Cả 4 gen tái tổ hợp đều có hoạt lực ổn định Các chủng <i>E. coli</i> mang các gen trên đã được bảo quản lâu dài ở -80°C	Vượt chỉ tiêu 01 gen TI Đạt yêu cầu kỹ thuật

(1)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)
	* Sinh khối VSV tái tổ hợp	3-4 kg	3 kg sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp :		Đạt yêu cầu Đã sử dụng hết để thăm dò các điều kiện phá vỡ tế bào và tạo chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật. Khi cần, có thể tạo sinh khối lớn bằng cách lên men các chủng nói trên.
			- 0,2kg sinh khối vi sinh vật chứa ReMCoTI-II: nuôi cấy trên máy lắc và lên men nhiều đợt, mỗi đợt 5 – 7 lít.	Kiểm tra bằng điện di trên gel poliacrilamit (PAGE), có băng ReMCoTI-II (có Mr >3kD) ở dạng dung hợp với intein tag (có Mr=55kD), đúng theo tính toán lý thuyết (58kD)	
			- 0,8 kg sinh khối vi sinh vật chứa ReCMTI-V: nuôi cấy trên máy lắc và lên men nhiều đợt, mỗi đợt 5 – 7 lít.	Kiểm tra bằng PAGE, có băng protein tái tổ hợp với khối lượng phân tử đúng theo tính toán lý thuyết, khoảng 7kD.	
			- 1,2 kg sinh khối vi sinh vật chứa ReRIP: lên men lượng lớn 10 lần, mỗi lần 10 lít dịch nuôi và thu được 100-130g sinh khối VSV.	Có chứa protein tái tổ hợp đúng kích thước khoảng 30kD	
			- 0,8 kg sinh khối vi sinh vật chứa α -AI: lên men lượng lớn 9 lần, mỗi lần 10 lít dịch nuôi và thu được 80-100g sinh khối VSV.	Kiểm tra bằng PAGE có chứa protein tái tổ hợp đúng theo tính toán lý thuyết (khoảng 16 kD).	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật	0,5-1kg	0,5 kg: ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Reα-AI, ReRIP: - 0,05kg chế phẩm kỹ thuật ReMCoTI-II - 0,150 kg chế phẩm kỹ thuật ReCMTI-V. - 0,2kg chế phẩm kỹ thuật ReRIP - 0,1kg chế phẩm kỹ thuật Re α -AI	Đã loại được nhiều protein tạp của tế bào vi khuẩn.	Đạt yêu cầu kỹ thuật - Một phần chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật được sử dụng để thăm dò các phương pháp tinh sạch và chọn phương pháp thích hợp để tạo protein tái tổ hợp tinh sạch. - Phần còn lại dùng để tạo protein tái tổ hợp tinh sạch theo phương pháp tối thích.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Chế phẩm protein tinh sạch	1-5 gam, có độ đồng nhất điện di	4g protein tái tổ hợp tinh sạch: - 0,2g ReMCoTI-II - 0,8g ReCMTI-V - 1g Reα-AI - 2g ReRIP	Có độ đồng nhất điện di, có khối lượng phân tử đúng, có hoạt tính sinh học.	Đạt yêu cầu kỹ thuật (các chế phẩm protein tinh sạch được sử dụng cho các thí nghiệm về thử hoạt tính sinh học trên các đối tượng sinh vật khác nhau)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng	Có các chủng <i>Agrobacterium</i> thích hợp để chuyển gen vào cây trồng	+ Đã thiết kế được 3 vectơ trung gian để chuyển gen vào cây trồng: - 01 vectơ pC1300+TI mang gen MCoTI-II - 01 vectơ pNOA2819+RIP mang gen RIP - 01 vectơ pC1301+αAI mang gen αAI + Đã tạo được 6 chủng <i>Agrobacterium</i> mang các gen đích để phục vụ chuyển gen vào cây trồng: - 02 chủng: pCTI-5 và pCTI-6 mang gen MCoTI-II - 02 chủng: EHA105 và LBA4404 mang gen RIP - 02 chủng: pCHA6 và pCHA7 mang gen αAI	- Các vectơ tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng điện di, bảo quản lâu dài ở - 80°C - Các chủng <i>A. tumefaciens</i> mang các gen trên có đủ tiêu chuẩn để phục vụ cho nghiên cứu chuyển vào cây trồng, được bảo quản lâu dài ở - 80°C	Đạt yêu cầu đã đăng ký Đạt yêu cầu đã đăng ký

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
2.	QUI TRÌNH				
	* Qui trình thích hợp nuôi cấy <i>E.coli</i> tái tổ hợp	3 qui trình biểu hiện protein tái tổ hợp chiếm 30% protein tổng số	4 qui trình sản xuất ở qui mô PTN (lên men mỗi đợt từ 2-10 lít) - PI-17 biểu hiện ReMCoTI-II: amp: 100µg/ml; IPTG: 0,5mM; 16 giờ ở 15°C. - BL21-TI biểu hiện ReCMTI-V: amp: 200µg/ml; IPTG: 1mM; 6 giờ ở 37°C. - BL21-αAI biểu hiện Reα-AI amp: 100µg/ml ; IPTG: 1mM ; 4 giờ ở 37°C. - BL21-RIP biểu hiện ReRIP: amp: 50µg/ml, IPTG: 0,7mM, 4 giờ ở 37°C	Sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp thu được ổn định về số lượng và chất lượng - Protein tái tổ hợp (ở dạng dung hợp) chiếm 45-50%. - Protein tái tổ hợp chiếm 15%. - Protein tái tổ hợp chiếm 30%. - Protein tái tổ hợp chiếm 30%.	* Vượt mức đăng ký 1 qui trình

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Qui trình sản xuất chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật	3 qui trình sản xuất ở qui mô PTN	4 qui trình : phá vỡ tế bào bằng siêu âm, thu dịch trong có chứa protein tái tổ hợp	- Tìm được một vài kỹ thuật đơn giản để loại protein tạp và các tạp chất (qui trình sản xuất chế phẩm protein ReCMTI-V)	* Vượt mức đăng ký 1 qui trình Đạt yêu cầu kỹ thuật
	* Qui trình sử dụng chế phẩm	3 qui trình sử dụng ổn định	3 qui trình sử dụng ổn định: - Tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu - Tác dụng của Reα-AI đến côn trùng, ấu trùng (mọt đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vẩy) trên ngô, đậu. - Tác dụng của ReRIP trên các đối tượng mọt gạo, vi khuẩn (<i>Bacillus subtilis</i>, <i>P. putida</i>) và nấm mốc (<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>)	Quy trình sử dụng ổn định ở quy mô phòng thí nghiệm	Đạt

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
4	CÁC BÀI BÁO	5 công trình công bố trên các Tạp chí KH trong nước và quốc tế (QT)	- 7 bài báo công bố trên Tạp chí Khoa học trong nước - 4 báo cáo ở HNQT: 3 tại HN Hoá sinh và Sinh học phân tử tổ chức ở nước ngoài, 1 ở HNQT tổ chức tại Việt Nam	Đều là các tạp chí khoa học chuyên ngành có uy tín	Vượt
5.	ĐÀO TẠO	10 cử nhân, 3 thạc sỹ	6 cử nhân 2 thạc sỹ và 1 học viên cao học chưa bảo vệ		Chưa đạt
6.	SƠ ĐỒ		20 sơ đồ qui trình tạo sản phẩm protein tái tổ hợp, tách chiết ADN, tách chiết protein, thử hoạt tính.		
7.	BẢNG SỐ LIỆU		9 bảng số liệu, 60 hình minh hoạ về nghiên cứu, sản xuất các protein tái tổ hợp PPI, α -AI, RIP.		

13. Tình hình sử dụng kinh phí

TT	Nội dung chi	Tổng vốn đầu tư (triệu đồng)
1- 114	Thuê khoán chuyên môn	680,0
2- 119	Nguyên vật liệu, hoá chất, dụng cụ, tài liệu	907,5
3- 109	Điện nước, xăng dầu	120,5
4- 145	Thiết bị	100,0
5- 117	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	35,0
6- 113	Công tác phí	21,6
7- 134	Quản lý cơ sở	30,0
8- 112	Nghiệm thu, hội nghị, hội thảo	27,0
9- 110	Văn phòng phẩm	13,0
10- 111	Phim ảnh, thông tin liên lạc	15,4
11- 116	Đoàn vào	30,0
12- 115	Đoàn ra	120,0
		Tổng 2.100

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị

2.1.1 Nguyên liệu, hoá chất

- Các nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, tự thu thập: lá gấc non, lá bí đỏ non, đậu cô ve trắng và lá non của mướp đắng.
- Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli*: *DH5 α* , *BL21(DE3)*, dòng tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ... của hãng Promega, Mỹ.
- Vector Ti-plasmid pCAMBIA 1300+HAL1, pCAMBIA1301 do Trung tâm Ứng dụng Sinh học Phân tử và nông nghiệp Quốc tế (CAMBIA), Australia cung cấp.
- Các dòng vector: pET-14b, pTYB-12 của hãng Promega, Mỹ.
- Vector chọn dòng pBluescript (KS⁻) và vector biểu hiện pET21d(+) được mua từ hãng Novagen[®] (Hoa Kỳ).
- Các enzym giới hạn (*Bam*HI, *Nde*I, *Xho*I, *Nco*I), enzym T₄ ligaz, RNaz và đệm tương ứng của hãng Promega, Mỹ.
- α -amilaz tuy tạng lợn (Pancreatin): Hàn Quốc
- Các loại thang chuẩn ADN: λ - ADN, λ /HindIII, Mix (100bp-10000bp), 100bp Plus (100-3000bp), 100bp (80-1031), 1kb (250-10000) của hãng Fermentas MBI, Đức.
- Các loại kit tách và tinh sạch ADN: Bộ kit tách ADN tổng số của thực vật và bộ kit tách ADN của vector của hãng Qiagen.
- Màng whatman glassmembrane GF/D của UK Biolab.
- Một số hoá chất kèm theo dùng để tách và tinh sạch ADN : GITC, EDTA, isopropanol, Kac, IAA, Chloroform, Glucoz,...của hãng Promega, Mỹ.
- Bộ môi đặc hiệu (1, 2, 3, 4) cho gen CMTI-V và gen MCoTI-II do chúng tôi thiết kế, hãng Invitrogen Life Technologies tổng hợp.
- Cặp môi AIF/AIR cho gen α -AI được thiết kế và đặt hãng Invitrogen[®] (Hoa Kỳ) tổng hợp.
- Cặp môi MAP65F/MAP859R cho gen RIP được thiết kế và đặt hãng Invitrogen[®] (Hoa Kỳ) tổng hợp.
- Các hoá chất dùng cho PCR: *Taq*, dNTPs của hãng Finenzyme.

- Các hoá chất dùng cho điện di agaroz: agaroz-Plus, đệm TAE, EtBr của hãng Promega, Mỹ.
- Bộ hóa chất *sinh chuẩn* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.
- Bộ hoá chất dùng để phân tích khối phổ: các loại MALDI matrix của hãng Sigma (Hoa Kỳ); triptxin của hãng Promega (Madison, WI, Hoa Kỳ); axetonitril, metanol của hãng Fisher Scientific (Anh); hệ thống khối phổ QSTAR® XL (MDS Sciex, Toronto, Canada).
- Các hoá chất dùng cho SDS - PAGE của hãng Sigma, Mỹ.
- Môi trường LB- agar và môi trường LB dịch thể, cao nấm men, tripton... của hãng Sigma (Mỹ) và Merck (Đức).
- Các loại hoá chất khác dùng trong nuôi cấy vi sinh vật: Ampicilin, IPTG, X-gal, Rif, Kan... của hãng Promega (Mỹ).
- Các loại gel và cột dùng cho tinh sạch protein tái tổ hợp: Sephadex, cột HiTrap, cột HiPrep16/10 (DEAE), cột QAE, cột DEAE.... của hãng Pharmacia, Thụy Điển.
- Các loại hoá chất thông dụng khác đạt độ sạch phân tích (PA).

2.1.2. Thiết bị

- Máy ly tâm Sigma 3K18, máy ly tâm Sigma 6K15, máy ly tâm Eppendorf 5417C của Mỹ.
- Máy PCR Eppendorf: Mastercycler Personal 5332, Mastercycler Personal Gradient của Đức.
- Máy quang phổ Spectronic Unicam LR 115161 của Đức.
- Hệ thống lọc nước Milli Q của hãng Millipore, Mỹ.
- Máy điện di ngang, máy điện di đứng của Hoefer, Mỹ.
- Máy soi ADN và chụp ảnh ADN của Hoefer, Mỹ.
- Máy lắc ổn nhiệt Shellab (Mỹ), máy lắc ổn nhiệt IKA Labotechnic HS 502 (Đức), tủ ấm ổn nhiệt Binder WTB (Đức).
- Tủ cấy vô trùng NUAIRE 400E (Đức).
- Hệ thống đọc trình tự gen ALFexpress II, Mỹ.
- Hệ thống phân tích trình tự gen tự động ABI PRISM 3100 AVANT GENETIC ANALYZER.
- Tủ lạnh sâu Sanyo Ultra Low (Nhật).
- Hệ thống lên men 3lít MDL_B.E. Marubishi (Nhật).
- Hệ thống lên men 5 lít (BioFloor, Mỹ).

- Hệ thống sắc ký tinh sạch protein FPLC, Pharmacia Biotech, Thụy Điển.
- Máy Scan Sharp JX330 (Nhật).
- Các loại tủ lạnh chuyên dụng từ 4°C đến -20°C của các hãng Sanyo, Sharp, Hitachi, Daewoo và một số thiết bị, máy móc khác .v.v...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Các phương pháp tách ADN tổng số của thực vật gồm: phương pháp tách ADN tổng số theo Qiagen Kit, phương pháp tách ADN tổng số theo Eija Pehu và cộng sự, phương pháp tách ADN tổng số theo Becker *et al*.
- Phương pháp phân lập gen CMTI-V và MCoTI-II từ ADN tổng số của gấc và bí đỏ
- Phương pháp biến nạp gen vào vectơ tái tổ hợp và biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli*.
- Phương pháp tách ADN của vectơ tái tổ hợp.
- Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp CMTI-V tác động đến yếu tố chống đông máu XIIa.
- Kiểm tra hoạt tính ức chế của α -AI tái tổ hợp theo phương pháp của Grossi và cộng sự.
- Thiết kế vectơ chuyển gen vào *Agrobacterium* phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng.
- Phương pháp điện di ADN trên gel agaroz và gel poliacrilamit.
- Phương pháp điện di TI.
- Nhân bản gen bằng kỹ thuật PCR.
- Biến nạp gen vào vectơ tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli*.
- Biến nạp Ti-plasmit tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* theo Draper và cộng sự.
- Chuyển Ti – plasmit tái tổ hợp mang gen MCoTI-II và *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp xung điện.
- Điện di protein theo Leammli.
- Xác định hoạt tính ức chế proteinaz bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và điện di có cơ chất.
- Sắc kí ái lực qua cột chitin theo hệ thống IMPACT™-CN.
- Phân tích khối phổ, xử lý và so sánh số liệu.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

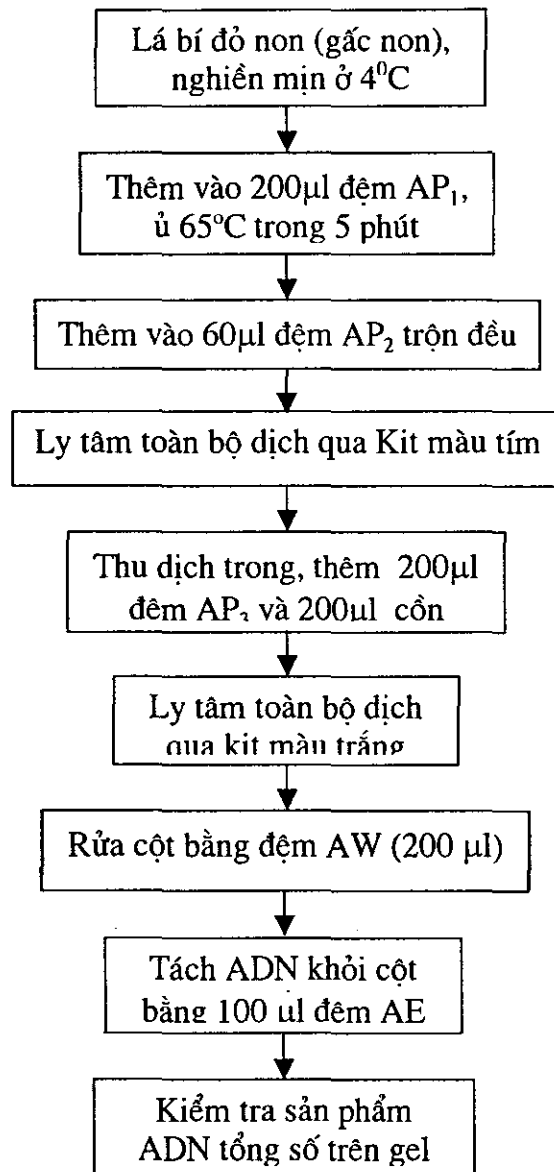
3.1. PHÂN LẬP GEN, THIẾT KẾ CÁC VECTƠ TÁI TỔ HỢP MÃ HOÁ CHO CÁC GEN MCoTI-II, CMTI-V, α -AI, RIP

3.1.1. Tách ADN tổng số

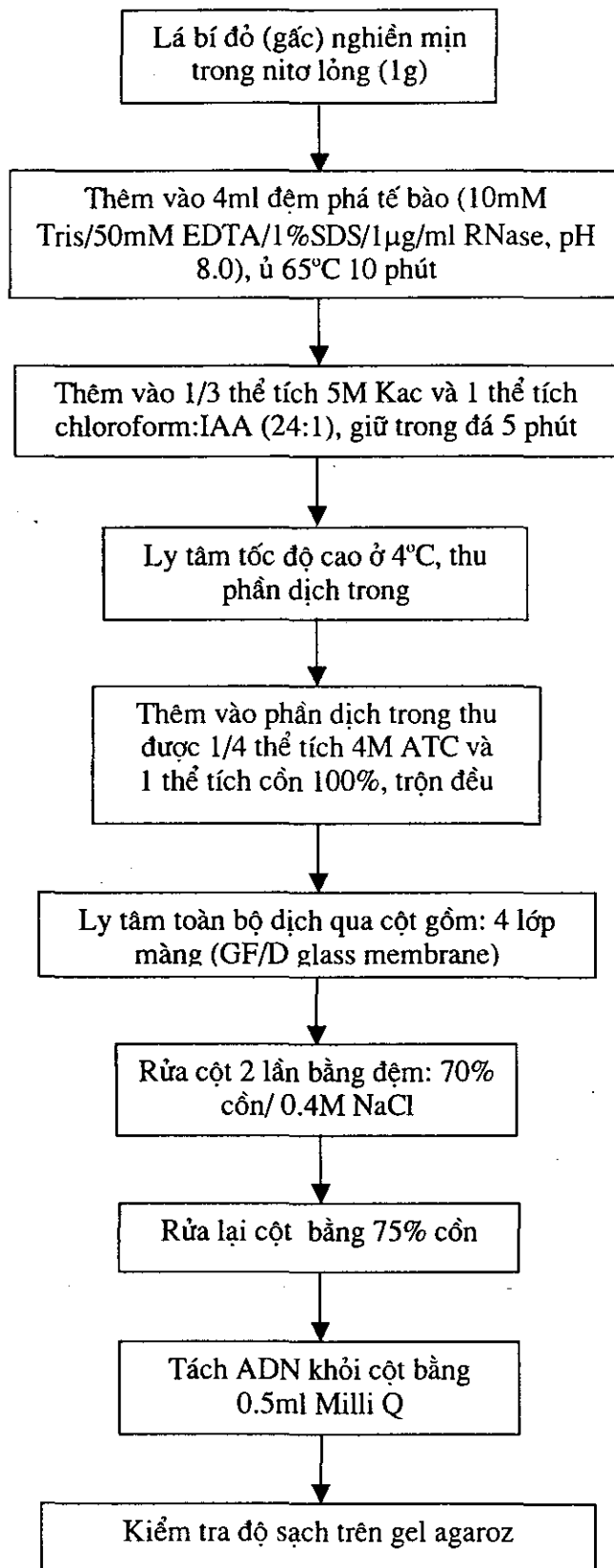
3.1.1.1. Tách ADN tổng số của gốc và bí đỏ

Đã tiến hành tách ADN tổng số của bí đỏ, của gốc theo phương pháp Qiagen Kit (sơ đồ 1) và phương pháp được mô tả bởi Eija Pehu và cộng sự (sơ đồ 2).

Sơ đồ 1: Phương pháp tách ADN tổng số của gốc (bí đỏ) theo Qiagen Kit



Sơ đồ 2: Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Eija Pehu và cộng sự

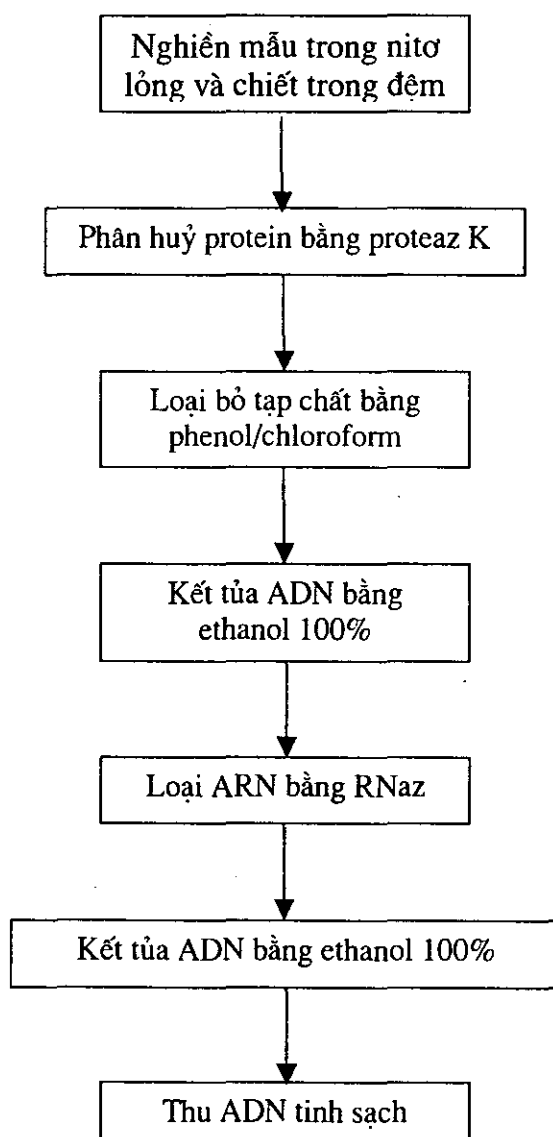


Cả hai phương pháp đã sử dụng đều đạt hiệu suất tương đương 100mg lá tươi tách được 26µg ADN, có tỷ lệ OD_{260}/OD_{280} là 1.86-1.90. Phương pháp nêu ở sơ đồ 1 tuy nhanh hơn nhưng phải có kit, vì vậy trong điều kiện không có kit có thể sử dụng phương pháp nêu ở sơ đồ 2.

3.1.1.2. Tách ADN tổng số từ đậu cô ve trắng (*Phaseolus vulgaris*)

Qui trình tách chiết ADN tổng số từ mầm đậu cô ve trắng được mô tả ở sơ đồ 3.

Sơ đồ 3: Các bước tiến hành tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của đậu cô ve trắng



3.1.1.3. Tách ADN tổng số từ mướp đắng

ADN tổng số được tách chiết từ lá mướp đắng theo phương pháp Sambrook. Sau khi tách chiết, ADN tổng số được kiểm tra bằng đo quang phổ bước sóng 260nm và 280nm và chạy điện di trên gel agaroz.

Các chế phẩm AND thu được đều có một băng trên gel agaroz 0,8%, có tỷ số $OD_{260nm/280nm}$ là từ 1,86-1,96 đạt độ sạch để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp.

3.1.2. Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V), MCoTI-II (TI-II), α -AI và RIP từ ADN tổng số của các thực vật tương ứng bằng kỹ thuật PCR

3.1.2.1. Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V) từ ADN tổng số của bí đỏ

Trình tự nucleotit của cặp mồi như sau:

Mồi xuôi (forward primer):

5' - CATATGCATATGTCCTCCTGCCCAGGTAAGTC - 3'
NdeI

Mồi ngược (reverse primer):

5' - CGCGATCCGCGTTAACCGATCCTCGGTGGTG - 3'
BamHI

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 30 giây, 55°C: 1 phút 30 giây, 72°C: 2 phút] x 35 chu kỳ;
72°C: 8 phút và kết thúc ở 4°C.

3.1.2.2. Phân lập gen mã hoá MCoTI-II (gen TI-II) từ ADN tổng số của gấc

Trình tự nucleotit của cặp mồi như sau:

Mồi xuôi (forward primer):

5' GAATTCCATATGAGCGGCAGCGATGGCGGCGTGTGCCCCGA 3'
NdeI

Mồi ngược (reverse primer):

5' CGGCTCGAGTTAGCCGCAATAGCCGTTGCCGCCGCAAAT 3'
XhoI

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 30 giây; 61°C: 1 phút 30 giây; 72°C: 2 phút] x 40 chu kỳ; 72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

3.1.2.3. Phân lập gen mã hoá α -AI từ ADN tổng số của đậu cô ve

Cặp mồi có trình tự nucleotit như sau :

Môi AIF : 5' - GGC CAT GGC TTC CTC CAA CTT AC - 3'

Môi AIR : 5' - GCG GAT CCT AGA GGA TTT TGT TG - 3'

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 1 phút, 54°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 20 giây] x 30 chu kỳ;
72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

3.1.2.4. Phân lập gen mã hoá RIP từ ADN tổng số của mùớp đắng

Cặp môi có trình tự nucleotit như sau:

MAP65F: 5' – CCTACTGCACCATGGATGTTAACTTCG – 3'
NcoI

MAP859R: 5' – GGATTATTATGGATCCTTCAATTCACAACAG – 3'
BamHI

Chu trình nhiệt của PCR là:

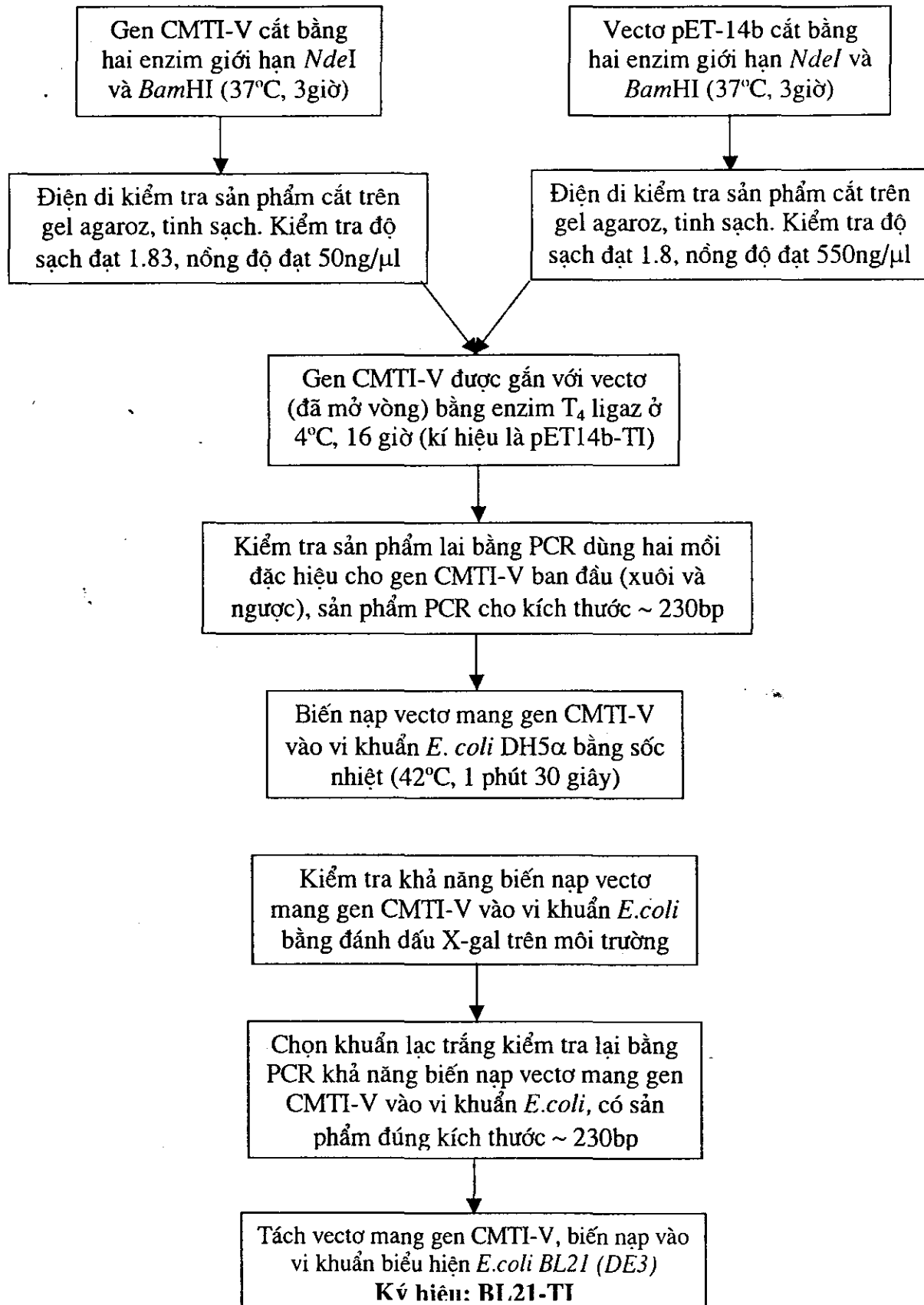
94°C: 1 phút; [94°C: 1 phút; 54°C: 1 phút; 72°C: 1 phút 20 giây] x 32 chu kỳ;
72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

Kết quả điện di kiểm tra các sản phẩm PCR cho thấy các gen thu được đều có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.

3.1.3 Thiết kế và biến nạp vector tái tổ hợp

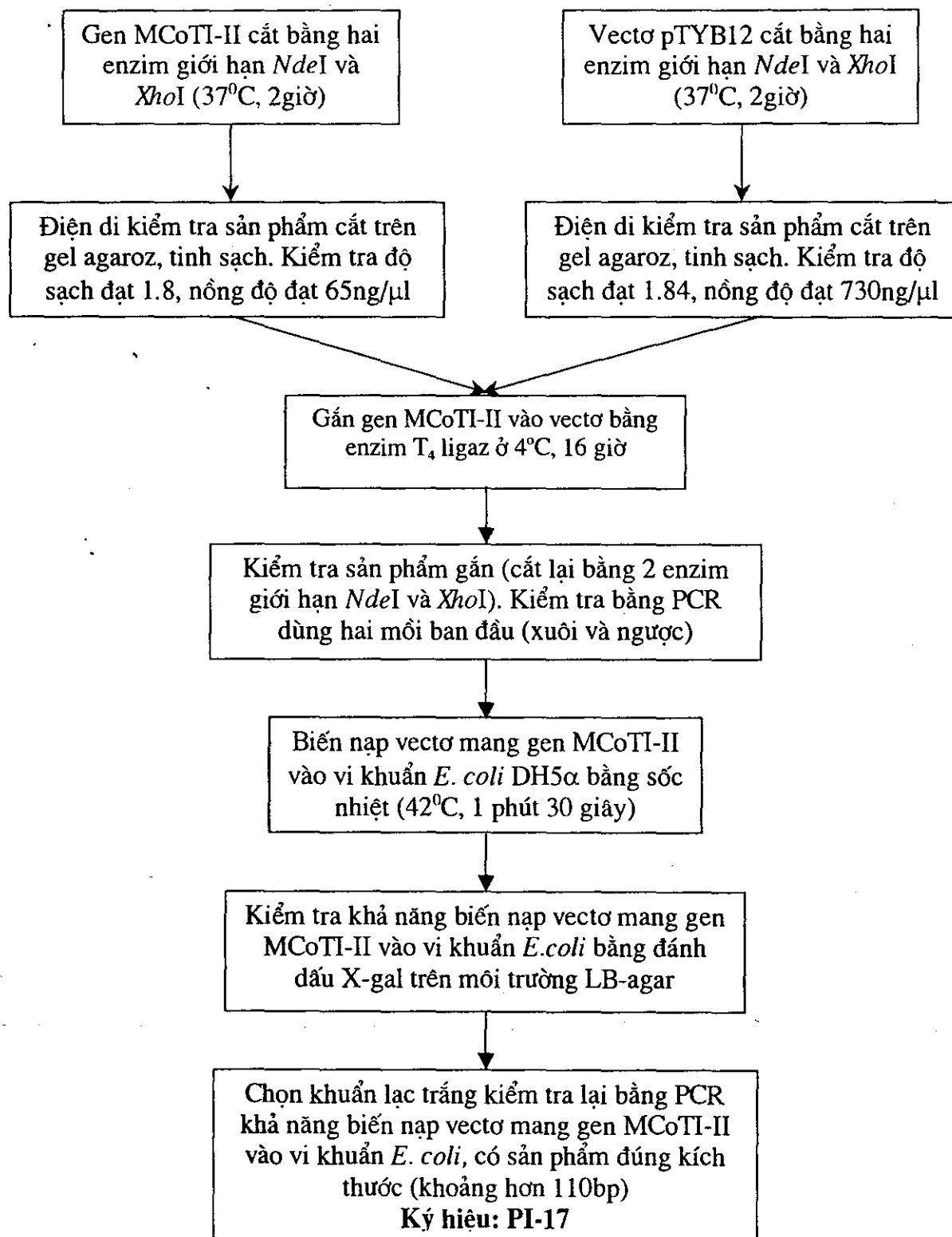
3.1.3.1. Đối với gen CMTI-V

Sơ đồ 4: Lai và biến nạp gen CMTI-V vào vectơ và vi khuẩn *E. coli*



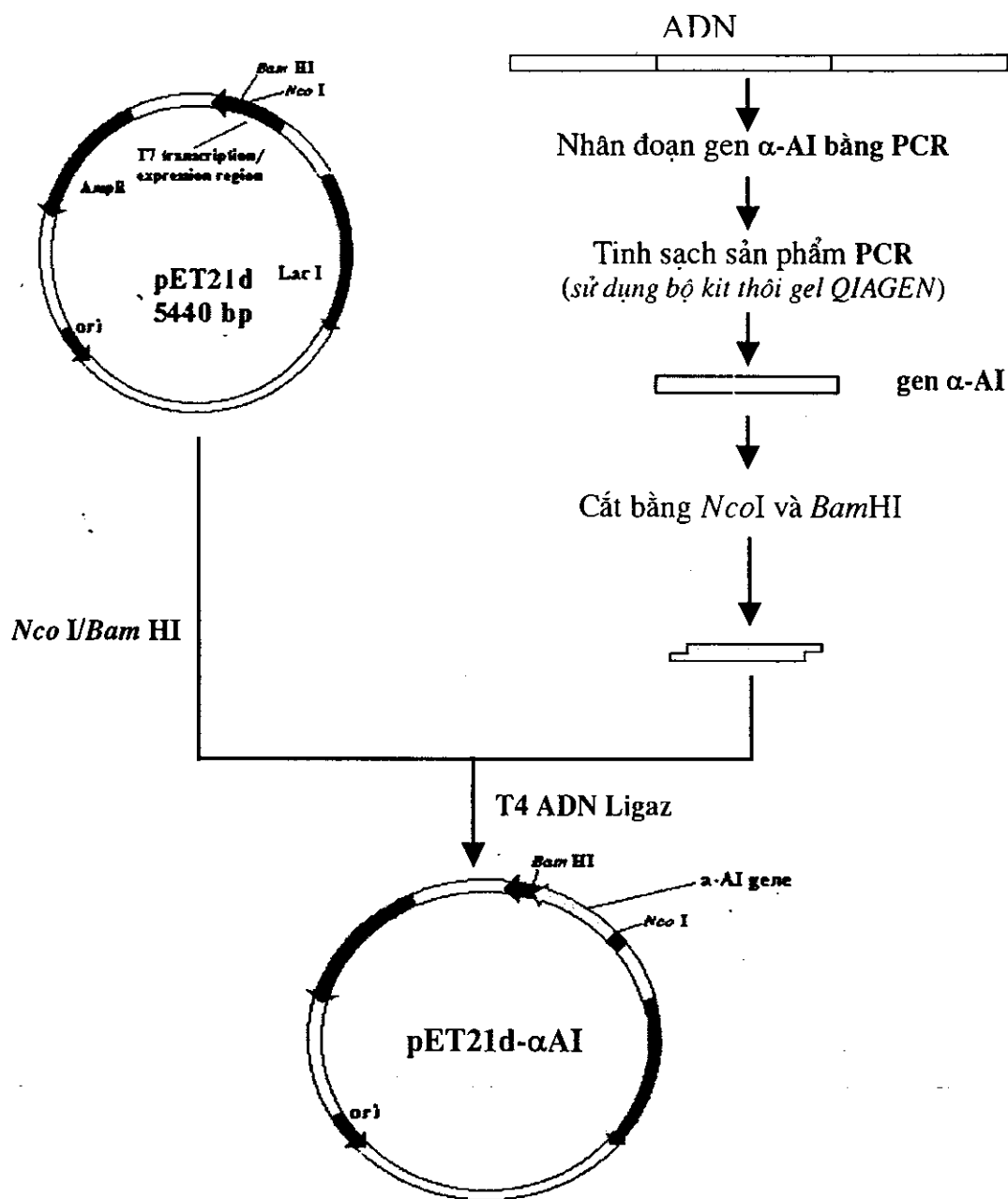
3.1.3.2. Đối với gen MCoTI-II

Sơ đồ 5: Biến nạp gen MCoTI-II vào vectơ và vi khuẩn *E. coli*



3.1.3.3. Đối với gen α -AI

Sơ đồ 6. Thiết kế vectơ pET 21 d(+) mang gen α -AI

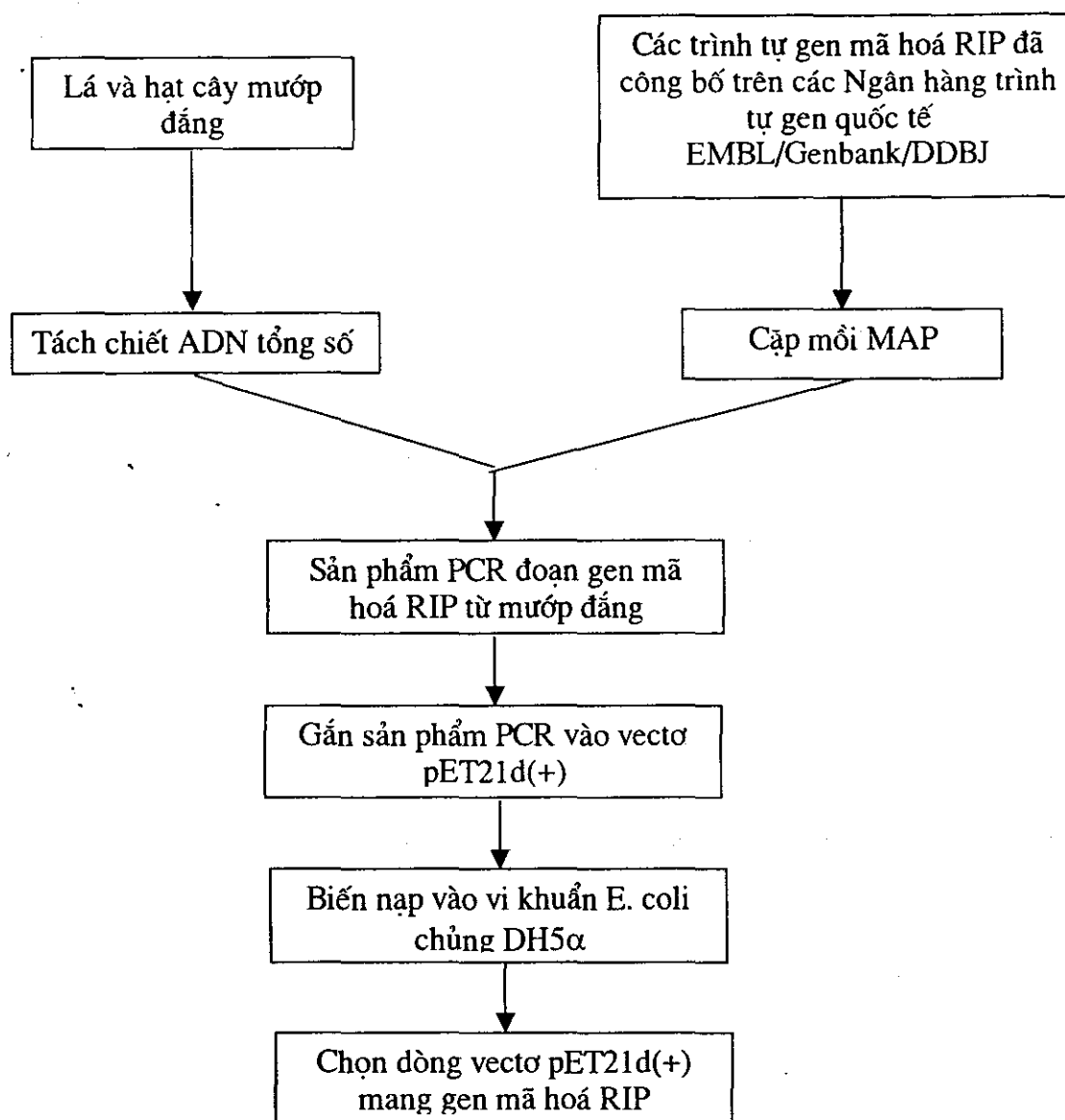


PLASMIT TÁI TỔ HỢP

Quá trình biến nạp được thực hiện bằng phương pháp sốc nhiệt.

3.1.3.4. Đối với gen RIP

Sơ đồ 7. Quy trình thiết kế vector pET21d(+) mang gen RIP



Vector pET21d (+) mang gen RIP được biến nạp vào *E.coli* chủng BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng khuẩn lạc được chọn lọc trên môi trường có kháng sinh ampicilin, IPTG và X-gal.

3.1.4. Giải trình tự các gen CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP

Để tiếp tục kiểm tra kết quả biến nạp, đã xác định trình tự các đoạn gen mã hoá CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP trong các vector tái tổ hợp tương ứng. Kết quả cho thấy các trình tự gen đích trong plasmit tái tổ hợp đúng với các trình tự đã đưa vào vector.

3.1.4.1. Trình tự gen CMTI-V

TGA TGGCCC ACC TGGTAG GTG TTG GTG GTT CCG TTG CTA AGGCTA TCA TC	50
GAAAGGCAG AAT CCGAAC GTT AAAGCT GTT ATC CTG GAAGAAGGT ACA CC	100
AGTTAC CAA GGACTT CAG GTG CAA CAGGGT TAG GATCTG GGT TAACAA GA	150
AGTCTG GTA GTA TCA CCA CCG AGGATC GGT TAA CGCGGA TCA TGGCTG CC	200
GGC GCGGCA CCA GGC CGC TGC TGT GAT GAT GAT GATGAT G	240

3.1.4.2. Trình tự gen MCoTI-II

1	GCTCGCGGAT	TTCAGACCTG	TTATTTTCGAG	AAGGAGACGA	TTATTATGGG	50
51	TATTACTTTA	TCTGATGATT	CTGATCATCA	GTTTTTGCTT	GGATCCCAGG	100
101	TTGTTGTACA	GAATGCTGGT	<u>CATATGAGCG</u>	GCAGCGATGG	CGGCGTGTGC	150
151	CGAAAATTCT	GAAAAAATGC	CGCCGCGATA	GCGATTGCCC	GGGCGCGTCA	200
201	TTTGCCGCGG	CAACGGCTAT	TGCGGCTAAC	<u>TCGAGCCC</u> CGG	GTGACTGCAG	250
251	GAAGGGGATC	CGGCTGCTAA	CAAAGCCCCG	AAGGAAGCTG	AGTTGGCTGC	300
301	TGCCACCGCT	GAGCAATAAC	TAGCATACCC	CTGGGGCCCT	CTAAACGGGT	350
351	CTTGAGGGGT	TTTTTGCTGA	AAGGAGGAAC	TATATCCGGA	TATCCCGCAA	400
401	GAGCCCGGCA	GTACCGGCAT	AACCAAGCCT	ATGCCTACAG	CATCCAGGGT	450
451	GACGGTGCCG	AGGATGACGA	TGAAGCGCCA	TTG		

3.1.4.3. Trình tự gen α -AI

ATGGCTTCCCTCCAAGTTACTCTCCCTTGCCCTCTTCCTTGTGCTTCTCACCCTCGC	56
AAACTCAGCCACCGAAACCTCCTTCAATATCGATGGGTTCACAAAACCAACCTTA	112
TCCTTCAAGGCGATGCCATCGTCTCACCGAACGGCAACTTACAACTATCCTATAAT	168
TCATACGACTCTATGAGCAGAGCCTTCTACTCCGCCCCCATCCAAATCAGGGACAG	224
CACCACCGGCAACGTCGCCAGCTTCGACACCAACTTCACAATGAATATCCGCACTC	280
ACCGCCAAGCAAATTCCGCCGTTGGCCTTGACTTTGTTCTCGTCCCCGTCCAGCCC	336
GAATCCAAAGGCGATACTGTGACTGTGGAGTTCGACACCTTCCTTAGCCGTATTAG	392
CATCGACGCGAACAACAACGATATCAAAAGCGTGCCTTGGGATGTACACGACTACG	448
ACGGACAAAACGCGGAGGTTCGGATCACCTATAACTCCTCCACGAAGGTCTTTGCG	504
GTTTCTCTGCTAAACCCTTCTACGGGAAAGAGCANCGACGTCTCTACCACAGTGGA	560
GCTGGAGAAAGAAGTTTACGACTGGGTGAGGGTTGGGTCTCTGCCACCTCAGGGG	616
CTTATCAATGGAGCTATGAAACGCACGACGTTCTCTCTTGGTCTTTTTCTTCCAAG	672
TTCATCAATCTTAAGGACCAAAAATCTGAACGTTCCAACATCGTCCTCAACAAAAT	728
CCTCTAG	735

3.1.4.4. Trình tự gen RIP

1	atggatgtta	acttcgattt	gtcgactgcc	actgcaaaaa	cctacacaaa	atztatcgaa
61	gatttcaggg	cgactcttcc	atntagccat	aaagtgtatg	atatacctct	actgtattcc
121	actatttccg	actccagacg	tttcatactc	ctcaatctca	caagttatgc	atatgaaacc
181	atctcggtgg	ccatagatgt	gacgaacgtt	tatgttgtgg	cctatcgcac	ccgcgatgta
241	tcctactttt	ttaaagaatc	tcctcctgaa	gottataaca	tcctattcaa	aggtacgcgg
301	aaaattacac	tgccatatac	cggttaattat	gaaaatcttc	aaactgctgc	acacaaaata
361	agagagaata	ttgatcttgg	actccctgcc	ttgagtagtg	ccattaccac	attgttttat

```

421 tacaatgccc aatctgctcc ttctgcattg cttgtactaa tccagacgac tgcagaagct
481 gcaagattta agtatatcga gcgacacggt gctaagtatg ttgccactaa ctttaagcca
541 aatctagcca tcataagctt ggaaaatcaa tgggtctgctc tctccaaaca aatatttttg
601 ggcgagaatc aaggaggaaa atttagaaat cctgtcgacc ttataaaacc taccggggaa
661 cggtttcaag taaccaatgt tgattcagat gttgtaaaag gtaatatcaa actcctgctg
721 aactccagag ctagcactgc tgatgaaaac tttatcacia ccatgactct acgtggggaa
781 tctgttgtga attga

```

3.2. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp

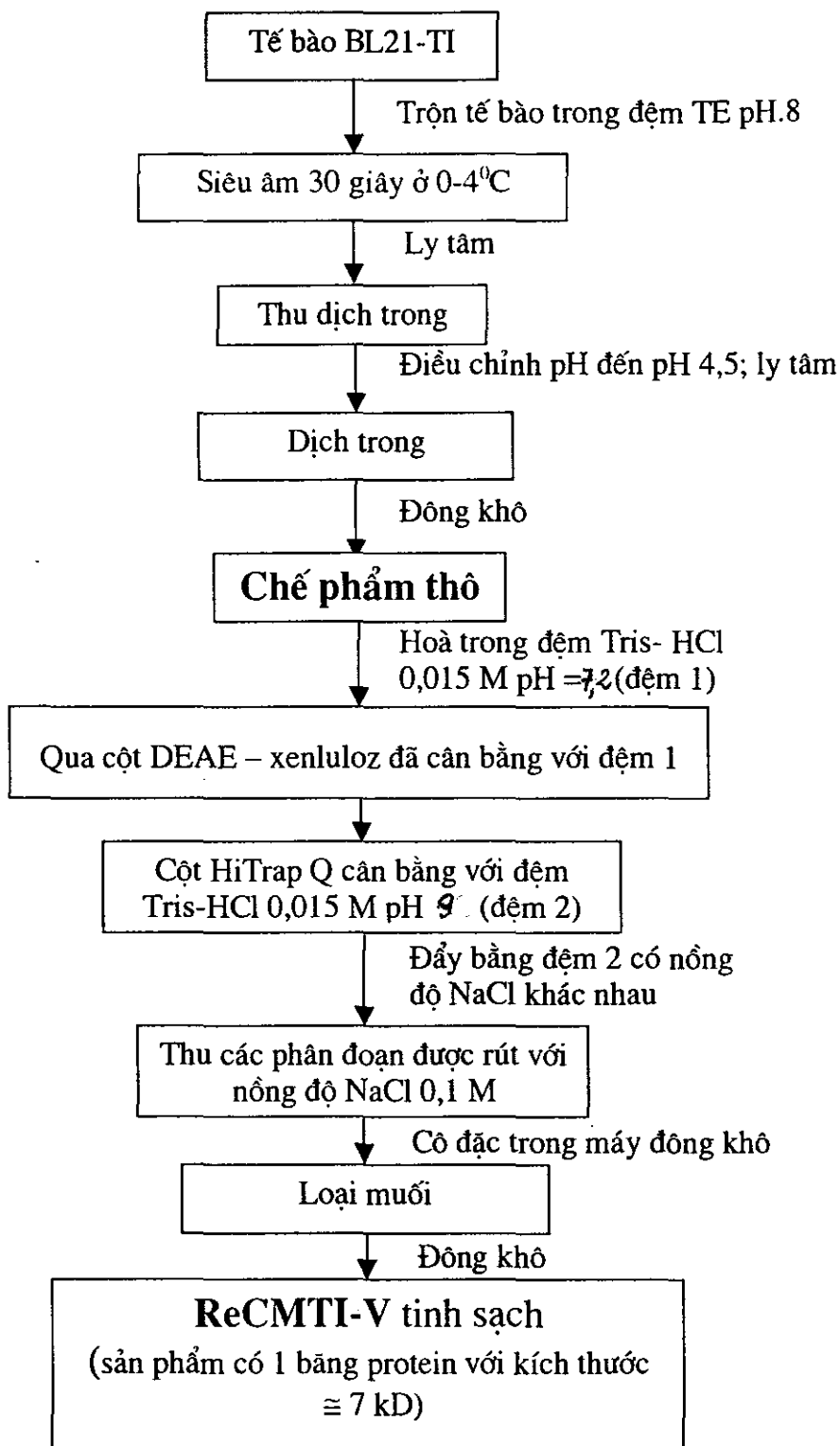
Đã lựa chọn được các điều kiện thích hợp (về nhiệt độ, nồng độ ampicilin, nồng độ chất cảm ứng, thời gian nuôi v.v...) để nuôi các vi khuẩn tái tổ hợp biểu hiện gen đích. Đối với tất cả 4 vi khuẩn tái tổ hợp đều nuôi trong môi trường LB pH 7.0, sau khi thêm dung dịch huyền phù vi khuẩn vào, lắc hoặc khuấy (trong nồi lên men) 220 vòng/phút, thêm chất cảm ứng IPTG và nuôi tiếp. Tuy nhiên điều kiện nuôi mỗi vi khuẩn có những khác nhau như đã ghi trong bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện nuôi cấy vi khuẩn tái tổ hợp

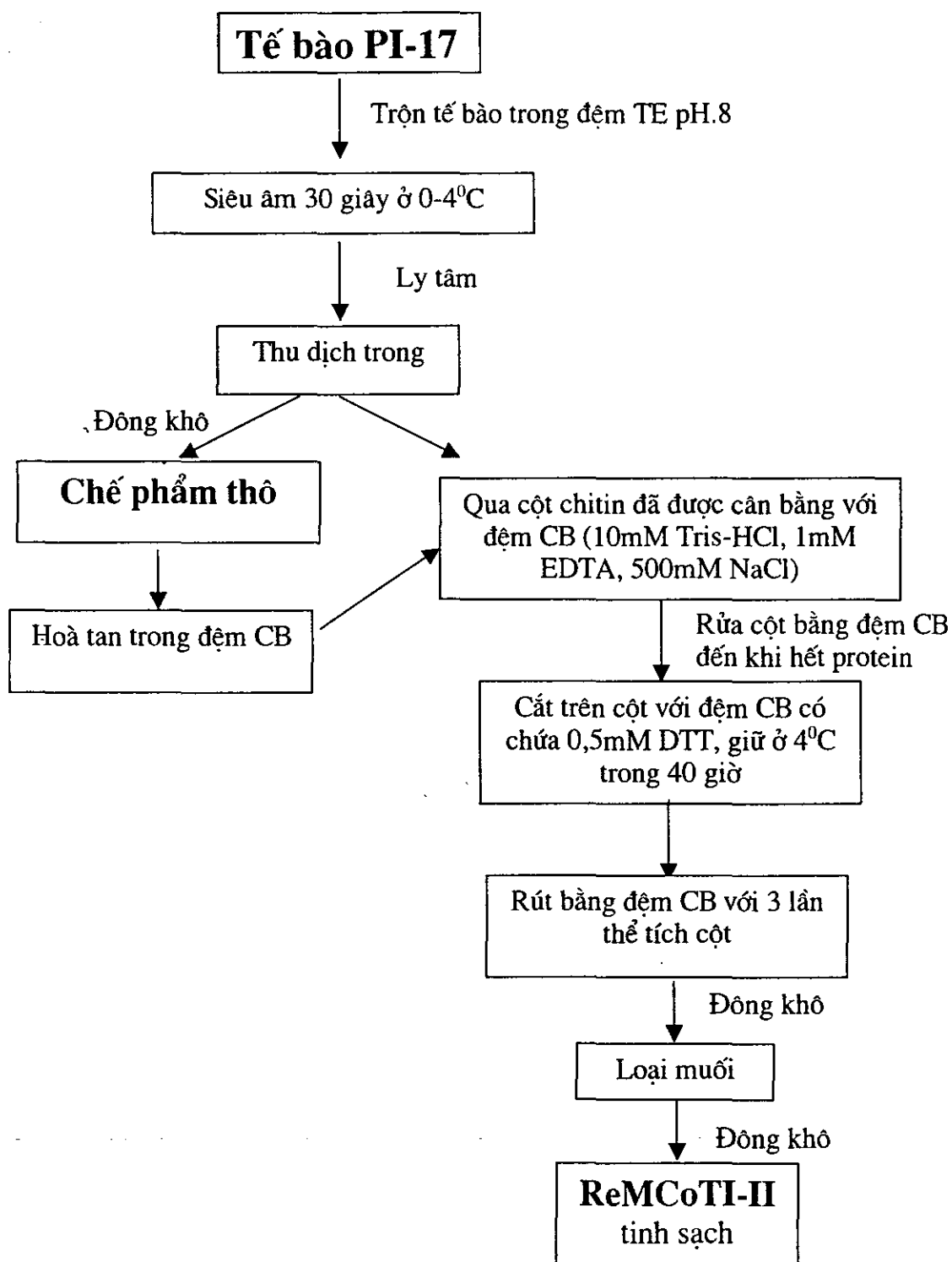
Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicilin (µg/ml)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi (°C)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI (mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- αAI (mang gen αAI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

3.3. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch các protein tái tổ hợp

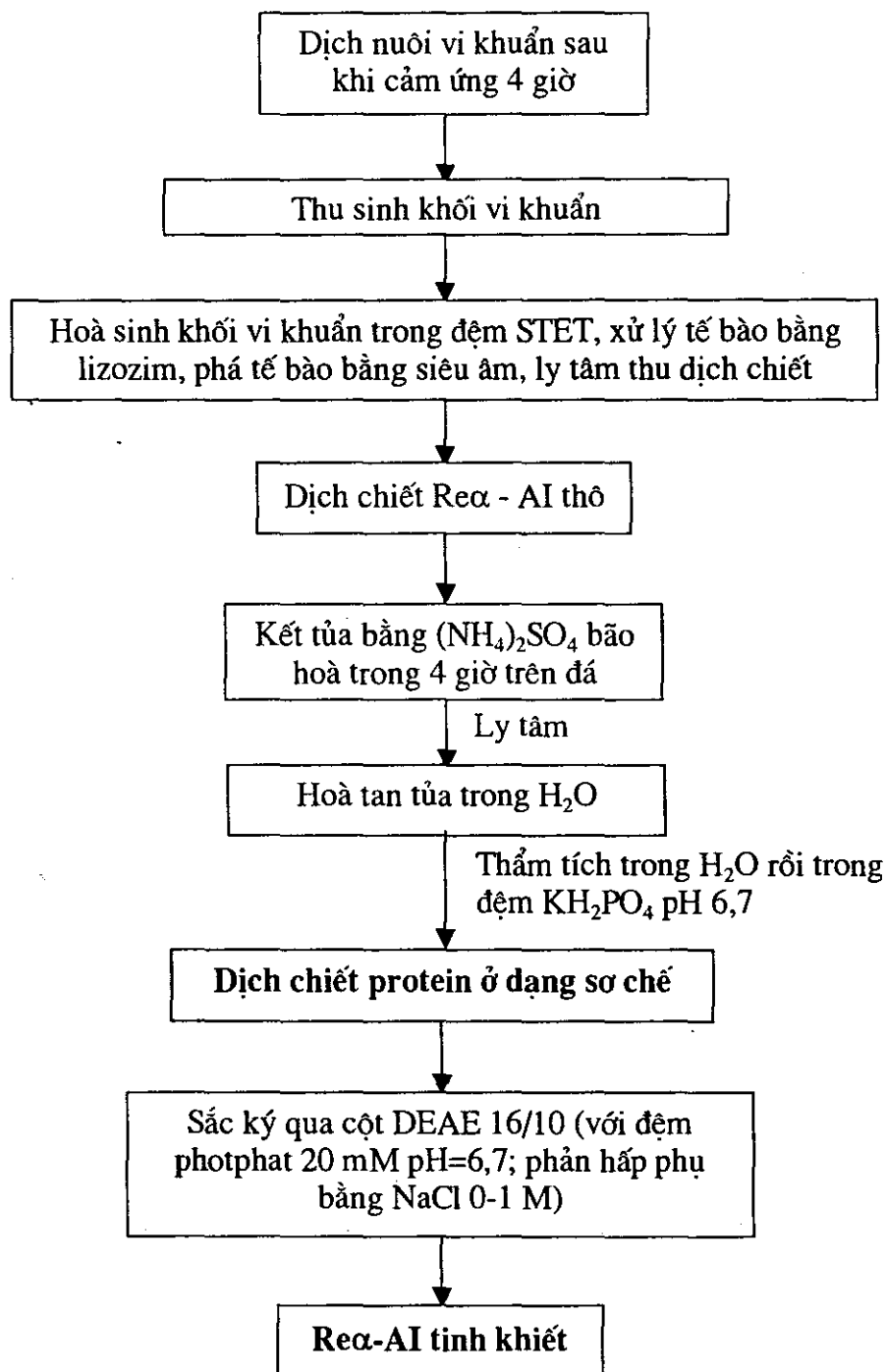
Sơ đồ 8. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReCMTI-V



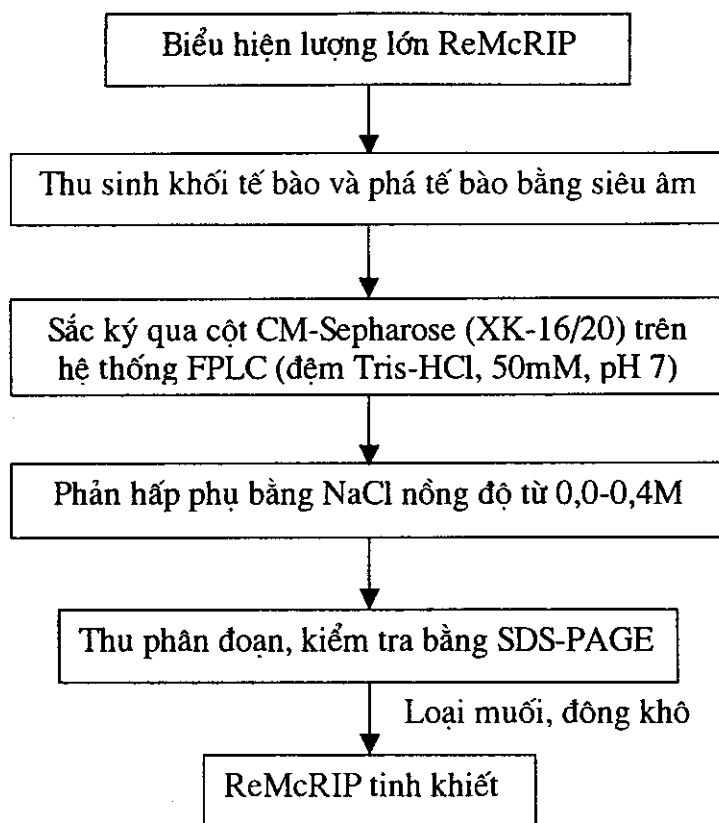
Sơ đồ 9. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMCoTI-II



Sơ đồ 10: Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm Re α -AI



Sơ đồ 11: Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMcRIP



3.4. Quy trình sử dụng thử nghiệm (qui mô phòng thí nghiệm) các chế phẩm protein tái tổ hợp

3.4.1. Thử nghiệm tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu

Nơi thực hiện: Khoa Đông- Cầm máu – Viện Huyết học truyền máu trung ương

Người thực hiện: Thạc sĩ Y khoa – Bác sĩ Nguyễn Thị Nữ - Chủ nhiệm khoa

ReCMTI-V hoà tan trong dung dịch NaCl 0,9%, trộn với huyết tương bình thường (HTBT), xác định các chỉ số sau:

- APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) để đánh giá đường đông máu nội sinh.
- PT (Prothrombin Time) để đánh giá đường đông máu ngoại sinh.
- TT (Thrombin Time) để đánh giá đoạn trung chuyển từ fibrinogen thành fibrin dưới tác dụng của thrombin.

Mẫu đối chứng thay ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9% với cùng thể tích.

Kết quả được trình bày trên bảng 2 và 3.

Bảng 2: Thử tác dụng của chế phẩm ReCMTI-V đến quá trình đông máu

	Dung dịch ReCMTI-V thí nghiệm (55mIU/ml) + HTBT (tỉ lệ 1:1)	Đối chứng Dung dịch NaCl 0,9% + HTBT
APTT (giây)	60,3	40,2
TT (giây)	18,3	22,3
PT (giây)	13,0	14,3

Kết quả trên bảng 2 cho thấy khi có ReCMTI-V giá trị APTT tăng lên rõ rệt nghĩa là kéo dài thời gian đông máu nội sinh so với đối chứng, như vậy ReCMTI-V có tác dụng ức chế đường đông máu nội sinh. Từ kết quả trên, đã tiến hành thử tác dụng các nồng độ khác nhau của ReCMTI-V đến APTT (bảng 3).

Bảng 3: Kết quả đánh giá tác dụng của ReCMTI-V đến con đường đông máu nội sinh (chỉ số ATTP)

Số TT	Mẫu pha trộn ReCMTI-V với HTBT		ATTP (giây)					
			Thí nghiệm (có ReCMTI-V)		Đối chứng (thay ReCMTI-V bằng NaCl)		HTBT	
			Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ
	Thể tích ReCMTI-V	Thể tích HTBT	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1.	1	1	52,3	102,0	39,3	39,5	29,3	29,5
2.	1	2	44,5	80,2	36,1	36,6	29,3	29,5
3.	1	3	40,5	56,8	34,0	34,8	29,3	29,5
4.	1	4	35,5	48,5	32,2	33,0	29,3	29,5
5.	1	5	34,0	44,1	31,0	32,1	29,3	29,5

Chú thích: Mẫu ReCMTI-V: 1ml có 85mg protein, 55mIU ; HTBT: Huyết tương bình thường ; Đối chứng: Thay dung dịch ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9% (cùng thể tích)

3.4.2. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm Re α - AI

Chúng tôi đã tiến hành thăm dò khả năng diệt mọt đục hạt (ngô, đậu) của chế phẩm Re α - AI theo các nội dung như sau :

- Khả năng diệt côn trùng, ấu trùng (mọt đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vảy) trên các đối tượng ngô, đậu, thóc theo trọng lượng và thời gian. Chế phẩm Re α -AI được pha loãng theo các nồng độ khác nhau sau đó được phun lên các loại hạt ngũ cốc đã được nghiền nhỏ theo tỷ lệ 20 ml dịch pha loãng/ 1kg ngô. Kết quả cho thấy với hàm lượng 0,1 – 0,4% trong thời gian 5 – 7 ngày diệt được 50-60%.

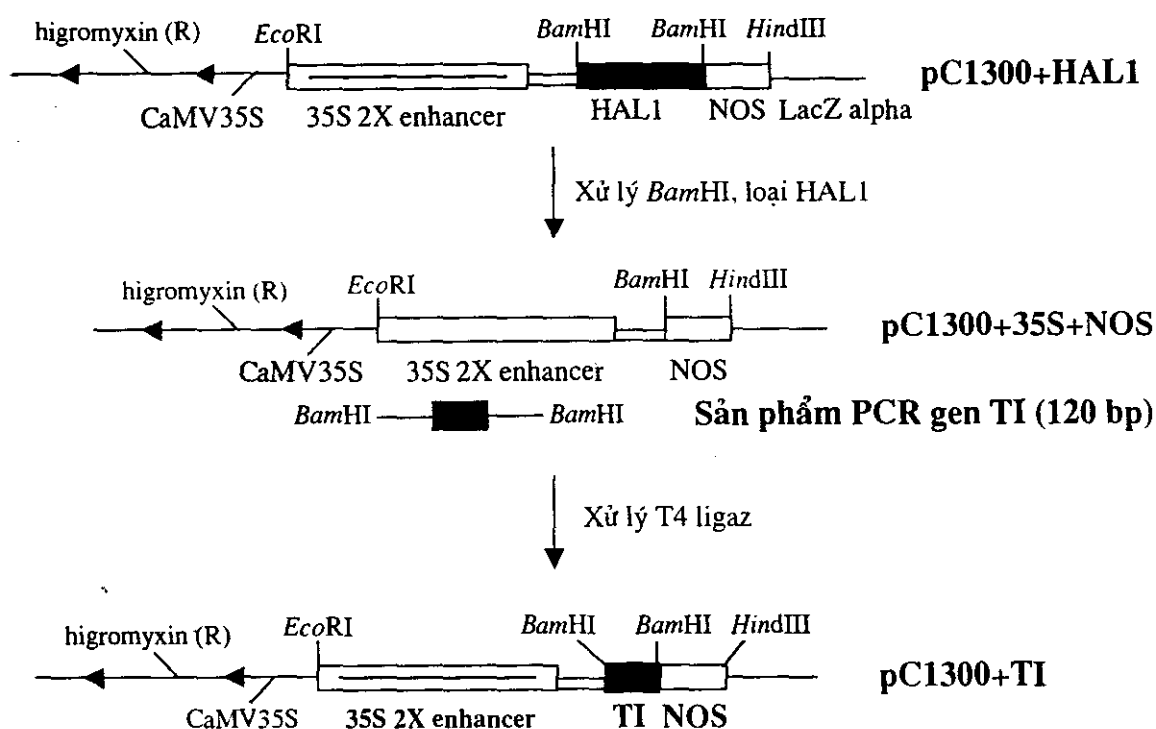
- Nếu cho ăn trực tiếp với liều lượng 0,25%, sau 8 ngày mẫu thí nghiệm một chết hoàn toàn, còn mẫu đối chứng không có con nào chết (Kết quả thí nghiệm của Viện Cơ điện và Công nghệ sau thu hoạch).

3.4.3. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm ReMcRIP đến nấm mốc và vi khuẩn

Chúng tôi đã kết hợp với các nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Nguyễn Thuỳ Châu thuộc Viện Cơ khí nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và TS. Nguyễn Thị Kim Cúc - Phòng Vi sinh vật học phân tử – Viện Công nghệ Sinh học tiến hành các nghiên cứu về tác động của ReMcRIP tinh sạch lên: mọt gạo; nấm mốc (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*); vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*). Kết quả bước đầu cho thấy ReMcRIP có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của hai loài vi khuẩn nói trên.

3.5. THIẾT KẾ CÁC VECTƠ MANG GEN TÁI TỔ HỢP PHỤC VỤ CHO CHUYỂN GEN VÀO CÂY TRỒNG

3.5.1. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá MCoTI-II (TI-II) được thực hiện theo sơ đồ 12.



Sơ đồ 12. Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI có kích thước khoảng 10,2 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 10 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký hiệu là pCTI-1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 21 và pCTI-22. Sau khi kiểm tra đã lựa chọn 2 dòng pCTI-5 và pCTI-6.

3.5.2. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6

Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6 sau khi thiết kế thành công được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện ở điều kiện 25 μ F; 400 Ω ; 2,5 kV; 8-10 ms.

Kiểm tra sự có mặt của gen TI-II trong tế bào *A. tumefaciens* bằng cách tách ADN plasmit biến nạp trở lại vào tế bào *E. coli* DH5 α , cắt bằng enzym giới hạn, tiến hành PCR và điện di. Kết quả cho thấy đoạn gen TI-II đã được nhân rất đặc hiệu với kích thước khoảng 120bp, phù hợp với mẫu đối chứng. Điều đó chứng tỏ gen TI-II đã được đưa vào vectơ trung gian pC1300+35S+NOS và tạo được hai chủng *A. tumefaciens* EHA105:pCTI-5, EHA105:pCTI-6 tái tổ hợp mang gen TI phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

3.5.2. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá α -AI

Qua nghiên cứu bản đồ vectơ chúng tôi đã lựa chọn vectơ pCAMBIA1301 làm nguyên liệu cho các thí nghiệm thiết kế vectơ tái tổ hợp. Để thiết kế vectơ tái tổ hợp, vectơ pCAMBIA1301 mở vòng khuyết đoạn GUS và đoạn gen α -AI đã tinh sạch được gắn kết với nhau nhờ phản ứng lai dưới sự hỗ trợ của enzym T_4 ligaz. Theo tính toán lý thuyết, đoạn gen α -AI với hai đầu gắn sẽ gắn vào hai vị trí là hai đầu gắn của pCAMBIA1301 mở vòng tương ứng. Ti-plasmit tái tổ hợp tạo thành là plasmit mang cấu trúc CaMV35S - α -AI - NOS polyA và gen chọn lọc kháng hygromycin nằm giữa vùng T-ADN. Trong cấu trúc vectơ còn mang gen kháng kanamixin, do đó ta có thể chuyển cấu trúc này vào vi khuẩn và chọn lọc các dòng mang thể tái tổ hợp.

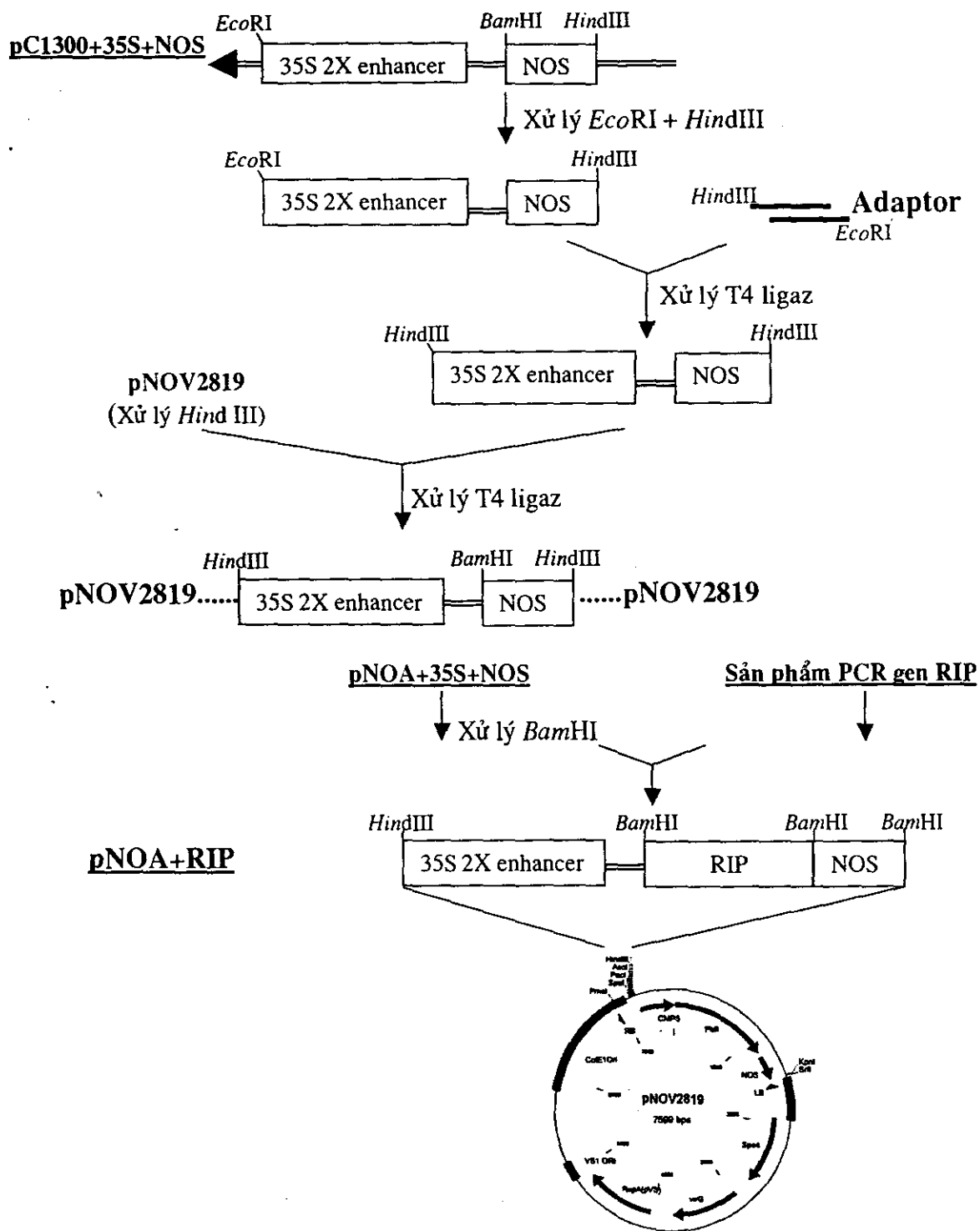
Theo tính toán của chúng tôi, vectơ pCAMBIA1301 tái tổ hợp mang gen mã hoá α -AI có kích thước khoảng 10,5 kb; có kích thước phân tử nhỏ hơn vectơ pCAMBIA1301. Chọn plasmit có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết, kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, điện di. Kết quả đã nhận được 1 băng có kích thước đúng kích thước gen mã hoá α -AI, 750bp. Xác định trình tự nucleotit, so sánh với các trình tự trong ngân hàng gen EMBL/GenBank/DDBJ cho thấy chúng tôi đã tạo được plasmit pCAMBIA1301 mang gen mã hoá α -AI. Đoạn gen mà chúng tôi giải mã có 96,463% thành phần nucleotit đồng nhất với đoạn trình tự gen α -AI (có số hiệu đăng ký AJ439614.1) do Smith-Waterman công bố. Đoạn trình tự giải mã được có chiều dài khoảng 750 nucleotit. Kết quả này cho phép khẳng định rằng đoạn gen α -AI đã được gắn vào vectơ Ti-plasmit.

3.5.3. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá McRIP

3.5.3.1. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vectơ pNOA+RIP mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + RIP + NOS

Sau khi tiến hành nghiên cứu bản đồ một số vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp thuộc hệ thống pCAMBIA (một trong những thể hệ vectơ hai nguồn mới nhất) và pNOV (thể hệ vectơ chọn lọc tích cực đang được ưa chuộng hiện nay), chúng tôi nhận thấy pC1300+HAL1 và pNOV2819 là vật liệu đáp ứng yêu cầu thiết kế vectơ.

Trên cơ sở vectơ nguồn pNOV2819 và kết cấu gồm đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS tách từ vectơ pC1300+HAL1, chúng tôi đã thiết kế Ti-plasmit trung gian pNOA+35S+NOS. Đây là vectơ cơ sở để tạo Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho công tác chuyển gen. Thí nghiệm thiết kế vectơ được trình bày trên Sơ đồ 13.



Sơ đồ 13. Thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP có kích thước ~ 9,4 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 6 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký

hiệu là pNOA+RIP-3, 4, 7, 9, 14 và pNOA+RIP-18. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmit để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

Đã tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmit tái tổ hợp kết quả cho thấy chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP, trong đó gen RIP được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer.

3.5.3.2. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9

Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9 sau khi thiết kế thành công được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện ở điều kiện 25 μ F; 400 Ω ; 2,5 kV; 8-10 ms.

Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào *A. tumefaciens* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy đoạn gen RIP đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước ~ 0,8 kb phù hợp với mẫu đối chứng. Điều đó chứng tỏ đã thành công trong việc đưa đoạn gen RIP vào vectơ trung gian pNOA+35S+NOS và tạo được chủng *A. tumefaciens* EHA105:pNOA+RIP-9 tái tổ hợp mang gen RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN

1. Đã tách chiết, tinh sạch ADN tổng số của gấc (*Momordica chochinensis*), bí đỏ (*Cucurbita maxima*), đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) và mướp đắng (*Momordica charantia*) có độ sạch đạt 1,85-1,9. Sử dụng các ADN này để phân lập các gen tương ứng.
2. Đã phân lập (hoặc tổng hợp) được bốn gen: hai gen mã hoá PPI là gen MCoTI-II, gen CMTI-V; một gen mã hoá α -AI, một gen mã hoá RIP. Các gen có kích thước đúng như tính toán lý thuyết, theo thứ tự tương ứng vào khoảng 110bp, 230bp, 700bp, 800bp. Các gen có độ đồng nhất điện di.
3. Đã thiết kế 4 vectơ tái tổ hợp mang các gen đích: pTYB12 mang gen MCoTI-II, pET-14b mang gen CMTI-V, pET21d(+) mang gen α -AI, pET21d(+) mang gen RIP. Các vectơ tái tổ hợp đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *E. coli* BL21, kí hiệu là: PI-17 (mang gen MCoTI-II); BL21-TI (mang gen CMTI-V); BL21- α AI (mang gen α -AI); BL21-RIP (mang gen RIP).
4. Đã lựa chọn được điều kiện nuôi cấy tối ưu các vi khuẩn tái tổ hợp như sau:

Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicilin (μ g/ml)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi ($^{\circ}$ C)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI(mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- α AI (mang gen α AI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

5. Thiết lập được 4 qui trình tinh sạch các protein tái tổ hợp như sau:

- 5.1. Tinh sạch ReMCoTI-II: sắc kí qua cột kitin ở điều kiện có chất khử DTT 0,05 mM trong đệm Tris-HCl 0,02 M có 0,5 M NaCl, 4 $^{\circ}$ C trong 40 giờ, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm trên nhưng không có DTT.
- 5.2. Tinh sạch ReCMTI-V: loại protein tạp bằng cách điều chỉnh pH đến 4,5; sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, tinh sạch qua cột HiTrap Q, phản hấp phụ bằng dung dịch Tris-HCl 0,015M, nồng độ NaCl 0,1M.

- 5.3. Tinh sạch Re α -AI: kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà, sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm photphat 20mM pH 6,7; 0,6M NaCl.
- 5.4. Tinh sạch ReRIP: sắc kí qua cột CM-Sepharoz trên hệ thống FPLC, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm Tris-HCl 0,05 M pH 7,2; nồng độ muối 0,4 M.
6. Các sản phẩm sau khi tinh sạch có độ đồng nhất điện di, có kích thước đúng như dự tính: ReMCoTI-II khoảng 3kD, ReCMTI-V khoảng 7kD, Re α -AI khoảng 18kD, ReRIP khoảng 30kD.
7. Các protein tái tổ hợp đã tinh sạch có các hoạt tính sau:
- ReMCoTI-II: ức chế tripxin, ức chế proteinaz sâu khoang
 - ReCMTI-V: ức chế tripxin, ức chế con đường đông máu nội sinh
 - Re α -AI: có tác dụng diệt được một ngô (*Sitophilus zeamays*), một đậu (*Callosobruchus chinensis*)
 - ReRIP: ức chế mạnh sự sinh trưởng của *B. subtilis*, *P. putida* và *A. flavus*, *A. parasiticus*.
8. Đã thiết kế được các Ti-plasmit tái tổ hợp: pC1300-TI mang gen MCoTI-II, pC1301- α AI mang gen α -AI, pNOA-RIP mang gen RIP.
9. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa các Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen đích phục vụ việc chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Cụ thể:
- 2 chủng EHA 105:pCTI-5 và EHA105:pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen MCoTI-II.
 - EHA105: pNOA+RIP-9 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen RIP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Báo cáo Tổng kết Khoa học kỹ thuật của Đề tài: “*Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, protein bất hoạt riboxom có giá trị sử dụng trong y dược và nông nghiệp*” đã sử dụng 135 tài liệu tham khảo trong đó có 15 tài liệu tiếng Việt, 119 tài liệu tiếng Anh và 01 tài liệu tiếng Ba lan. Trong số các tài liệu tham khảo có 45 tài liệu được công bố từ năm 1995 đến 1999, 42 tài liệu từ năm 2000 đến 2004.

LỜI CẢM ƠN

Trung tâm Công nghệ Sinh học-Đại học Quốc gia Hà Nội, cơ quan chủ trì đề tài KC-04-14, Chủ nhiệm đề tài KC-04-14 và tất cả các thành viên đề tài xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đặc biệt là Vụ quản lý Khoa học Công nghệ các ngành kinh tế - kỹ thuật, Vụ kế hoạch-Tài chính; Lãnh đạo Đại học Quốc gia Hà Nội, Ông chủ nhiệm và Ban chủ nhiệm, Văn phòng và Ban thư ký chương trình KC-04 đã ủng hộ, quan tâm chỉ đạo và tạo điều kiện thuận lợi để đề tài hoàn thành tốt các mục tiêu, nhiệm vụ đã đề ra.

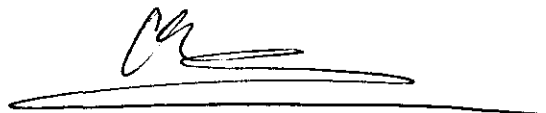
Cơ quan chủ trì và Chủ nhiệm đề tài KC-04-14 đánh giá cao sự phối hợp có trách nhiệm và hiệu quả của các cán bộ chủ trì và tham gia thực hiện các đề tài nhánh, các cơ quan chủ trì thực hiện các đề tài nhánh: Viện Công nghệ Sinh học-Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội; Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học Công nghệ Quốc gia.

CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI.....

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI.....



GD: TS. DƯƠNG VĂN HỢP



GS.TSKH PHẠM THỊ TRÂN CHÂU