

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

TRẦN NGỌC ANH

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN
HELICOBACTER PYLORI BẰNG NESTED PCR
TỪ DỊCH DẠ DÀY

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

TRẦN NGỌC ANH

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN
HELICOBACTER PYLORI BẰNG NESTED PCR
TỪ DỊCH DẠ DÀY**

Ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 84 20 201

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN PHÚ HÙNG

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào. Mọi kết quả thu được không chỉnh sửa, sao hoặc chép từ các nghiên cứu khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Trần Ngọc Anh

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành bản luận văn này em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới: Ban Giám hiệu, phòng Đào tạo, trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên. Các thầy cô và cán bộ Khoa Công nghệ Sinh học đã tận tình dạy dỗ, truyền dạy kiến thức và kinh nghiệm nghiên cứu khoa học cho chúng em trong những năm qua.

Em xin chân thành cảm ơn thầy giáo TS. Nguyễn Phú Hùng, người thầy đã định hướng nghiên cứu và tận tình hướng dẫn, chỉ bảo cho em trong suốt thời gian em thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài, em đã nhận được rất nhiều sự quan tâm giúp đỡ từ gia đình, bạn bè, đồng nghiệp và các anh, chị trong nhóm nghiên cứu, những người luôn động viên, khích lệ em, tạo cho em động lực và niềm say mê trong nghiên cứu khoa học. Em vô cùng biết ơn tất cả những tình cảm tốt đẹp mà mọi người đã dành cho em.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2019

Tác giả

Trần Ngọc Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
MỤC LỤC	III
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	V
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	VI
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	VII
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu gồm.....	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu <i>H. pylori</i>	3
1.1.2. Đặc điểm hình thái học của <i>H. pylori</i>	4
1.1.3. Cơ chế gây bệnh của <i>H. pylori</i>	5
1.2. Gen mã hoá <i>CagA</i> (cytotoxine associated gene A).....	6
1.3. Các phương pháp chẩn đoán vi khuẩn <i>H. pylori</i>	8
1.3.1. Các xét nghiệm xâm hại qua nội soi dạ dày tá tràng (invasive test)	9
1.3.2. Các thử nghiệm không xâm lấn	19
1.4. Nested PCR trong chẩn đoán <i>H. pylori</i>	23
1.4.1. Khái niệm về Nested PCR	23
1.4.2. Ứng dụng của Nested PCR trong chẩn đoán <i>H. pylori</i>	24
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26
2.1. Vật liệu nghiên cứu	26
2.1.1. Mẫu bệnh phẩm.....	26
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ thiết bị	26
2.2. Địa điểm và thời gian.....	27

2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Phương pháp thu nhận mẫu bệnh phẩm dịch dạ dày	27
2.3.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm	27
2.3.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu chủng vi khuẩn	28
2.3.4. Phương pháp đo DNA tổng số	29
2.3.5. Phương pháp Nested PCR.....	29
2.3.6. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose	33
2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu.....	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	35
3.1. Kết quả tách DNA từ chủng vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i> và dịch dạ dày ...	35
3.2. Khuếch đại DNA đặc trưng genome của <i>H. pylori</i> bằng kỹ thuật Nested PCR	36
3.3. Xác định độ nhạy của kỹ thuật Nested PCR trong phát hiện <i>H. pylori</i>	38
3.3. Xác định gen <i>CagA</i> của vi khuẩn <i>H. pylori</i> bằng Nested PCR.....	39
3.4. Áp dụng kỹ thuật Nested PCR để đánh giá mức độ nhiễm <i>H. pylori</i> và chủng <i>H. pylori</i> mang gen <i>CagA</i> trong các mẫu bệnh phẩm	41
3.5. Xây dựng quy trình chẩn đoán ở mức độ phòng thí nghiệm	44
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	47

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Campylobacter Like Organism test	Clotest
Cytotoxine associated gen A	CagA
Deoxyribonucleic acid	DNA
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	ELISA
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	ELISA
Heptose - bisphosphate	HBP
Immuno Globulin A	IgA
Immuno Globulin G	IgG
Immuno Globulin M	IgM
Nuclear factor kappa B	NFkB
Pathogenicity island	PAI
Ribonucleic acid	RNA
Urea Breath Test	UBT
Vacuolating toxin gene A	VacA

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các cặp mồi được sử dụng cho phản ứng Nested PCR.....	31
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR vòng 1.....	31
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng cho vòng 2	31
Bảng 2.4. Chu kì nhiệt cho mỗi vòng của phản ứng Nested- PCR.....	32
Bảng 2.5. Các cặp mồi được sử dụng cho phản ứng Nested PCR phát hiện gen CagA.....	32
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng PCR cho 2 vòng.....	33
Bảng 2.7. Chu kì nhiệt cho mỗi vòng của phản ứng Nested- PCR.....	33
Bảng 3.1. Nồng độ DNA tổng số tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và chủng <i>H. pylori</i> đối chứng	35
Bảng 3.2. Kết quả phân tích từ mẫu bệnh phẩm bệnh nhân	41

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Vi khuẩn <i>H. pylori</i>	3
Hình 1.2. Mẫu thử Clotest.....	9
Hình 1.3. Vi khuẩn <i>H. pylori</i> trên đĩa nuôi cấy phân lập.....	11
Hình 1.4. Viêm dạ dày lympho.....	14
Hình 1.5. Viêm dạ dày hạt.....	16
Hình 1.6. Nguyên lý test thử ^{13}C và ^{14}C	20
Hình 1.7. Nested PCR.....	24
Hình 3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	35
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng 1 khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn <i>H. pylori</i>	37
Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng 2 khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn <i>H.pylori</i>	37
Hình 3.4. Độ nhạy của phản ứng Nested PCR khuếch đại đoạn DNA đặc trưng genome <i>H. pylori</i>	38
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen <i>CagA</i> vòng 1.....	39
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen <i>CagA</i> vòng 2.....	40
Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn <i>H. pylori</i>	40
Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn <i>H. pylori</i>	40
Hình 3.9. Quy trình chẩn đoán <i>H. pylori</i> bằng phương pháp Nested PCR áp dụng cho các phòng thí nghiệm.....	45

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Helicobacter pylori (*H. pylori*) là một trong những vi khuẩn thường gặp gây nhiễm trùng đường tiêu hóa. Sự phát hiện ra *H. pylori* bởi Marshall và Warren năm 1982 đã mở ra một kỉ nguyên mới trong điều trị bệnh lý dạ dày tá tràng. *H. pylori* đã được xem là nguyên nhân chính gây viêm, loét dạ dày ở mọi lứa tuổi. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới, hơn 50% dân số bị nhiễm loại vi khuẩn này [46]. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* đang giảm ở vùng châu Á - Thái Bình Dương, nhưng ở Việt Nam tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này còn cao [2]. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở những trẻ em bị viêm dạ dày là 70% và ở bệnh nhân loét hành tá tràng là 90% [3]. Ở Việt Nam chưa có những theo dõi quy mô, toàn diện, chủ yếu là các số liệu thống kê dựa trên những nghiên cứu rải rác trong các cộng đồng nhỏ.

Có rất nhiều phương pháp để giúp cho chẩn đoán nhiễm *H. pylori* dựa theo điều kiện cụ thể của từng cơ sở y tế. Các phương pháp chẩn đoán có tính xâm lấn thông qua nội soi gồm thử nghiệm urease, nuôi cấy vi khuẩn, xác định acid nhân của vi khuẩn, chẩn đoán mô bệnh học, phản ứng chuỗi PCR. Các phương pháp không xâm lấn bao gồm: Nghiệm pháp thở C^{13} hoặc C^{14} , chẩn đoán huyết thanh, test nhanh bằng huyết thanh, test huyết thanh phát hiện kháng thể kháng *CagA*, tìm kháng thể kháng *H. pylori* trong nước tiểu, Immunoblot, dùng PCR chẩn đoán *H. pylori* trong phân, phát hiện kháng nguyên trong phân. Mỗi phương pháp đều cho những ưu nhược điểm riêng.

Hiện nay, PCR là một kỹ thuật chẩn đoán tiên tiến nhưng chưa được phổ biến rộng rãi ở Việt Nam trong chẩn đoán nhiễm *H. pylori*. Ngoài việc chẩn đoán nhiễm *H. pylori* trước điều trị, PCR còn dùng để theo dõi sau điều trị diệt trừ *H. pylori*.