

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

HOÀNG THỊ HUYỀN TRANG

**TÁCH DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR
BIỂU HIỆN ĐOẠN GEN MÃ HÓA ĐỘC TỔ APXIA
TỪ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HOÀNG THỊ HUYỀN TRANG

**TÁCH DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR
BIỂU HIỆN ĐOẠN GEN MÃ HÓA ĐỘC TỐ APXIA
TỪ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

MÃ SỐ: 8 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**Cán bộ hướng dẫn khoa học: 1. TS. Nguyễn Thị Thu Nga
2. PGS. TS. Dương Văn Cường**

Thái Nguyên, 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi, dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Thu Nga và PGS.TS. Dương Văn Cường. Các số liệu trích dẫn rõ ràng, các kết quả trong luận văn là trung thực.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những kết quả nghiên cứu trong luận văn này.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 6 năm 2018

Tác giả luận văn

Hoàng Thị Huyền Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới TS. Nguyễn Thị Thu Nga và PGS.TS. Dương Văn Cường đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành đề tài này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô, cán bộ Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên, cảm ơn các cán bộ phòng Sinh học phân tử & Công nghệ tế bào - Viện Khoa học Sự sống - Đại học Thái Nguyên, cảm ơn Công ty thuốc thú y Đức Hạnh Marphavet đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, thực hiện các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn đến gia đình, bè bạn đã động viên khuyến khích giúp đỡ trong quá trình làm đề tài.

Tác giả luận văn

Hoàng Thị Huyền Trang

MỤC LỤC

Trang

TRANG BÌA PHỤ

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
CÁC CHỮ VIẾT TẮT DÙNG TRONG ĐỀ TÀI.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vi
MỞ ĐẦU.....	1
1. Lí do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Bệnh viêm màng phổi ở lợn và vi khuẩn <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	3
1.1.1. Bệnh viêm màng phổi ở lợn	3
1.1.2. Vi khuẩn <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5
1.2. Độc tố Apx và cơ chế gây bệnh.....	7
1.2.1. Ngoại độc tố Apx.....	7
1.2.2. Các yếu tố độc lực khác.....	10
1.2.3. Cơ chế gây bệnh	11
1.2.4. Gen mã hóa protein ApxIA	12
1.3. Vaccine phòng bệnh viêm màng phổi do <i>A. pleuropneumoniae</i> gây ra.....	12
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	14
2.1. Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu	14
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	14
2.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	15

2.2. Phương pháp nghiên cứu	15
2.2.1. Nghiên cứu thông tin về gen và thiết kế cặp môi nhân gen	15
2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số	15
2.2.3. Phương pháp PCR	16
2.2.4. Phương pháp gắn gen vào vector tách dòng và biểu hiện	17
2.2.5. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến	18
2.2.6. Phương pháp cắt kiểm tra	19
2.2.7. Phương pháp xác định và phân tích trình tự DNA	20
2.3. Hóa chất và trang thiết bị nghiên cứu.....	20
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	23
3.1. Kết quả tách dòng và xác định trình tự đoạn gen <i>ApxIA</i> của <i>A.pleuropneumoniae</i>	23
3.1.1. Kết quả PCR nhân đoạn gen <i>ApxIA</i>	23
3.1.2. Kết quả biến nạp đoạn gen <i>ApxIA</i> vào vector tách dòng pGEM.....	24
3.1.3. Phân tích trình tự đoạn gen <i>ApxIA</i>	25
3.2. Kết quả thiết kế vector biểu hiện đoạn gen mã hóa độc tố <i>ApxIA</i>	28
3.2.1. Kết quả sàng lọc các dòng plasmid mang vector biểu hiện chứa đoạn gen <i>ApxIA</i>	28
3.2.2. Kết quả chọn lọc vector pET– <i>ApxIA</i> bằng PCR và cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn.....	29
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	31
1. Kết luận.....	31
2. Đề nghị.....	31
01 CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN	32
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	33

CÁC CHỮ VIẾT TẮT DÙNG TRONG ĐỀ TÀI

App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
Kb	Kilo base
LPS	Lipopolysaccharide
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi
TAE	Tris - Acetate - EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. Tỷ lệ lợn bị viêm màng phổi ở một số nước châu Âu.....	3
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng gắn gen vào vector tách dòng.....	17
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng gắn gen vào vector biểu hiện.....	17
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng <i>BamHI</i> và <i>HindIII</i>	19
Bảng 2.4. Danh mục các loại hóa chất sử dụng trong nghiên cứu	20
Bảng 2.5. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	21
Bảng 3.1. Vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen <i>ApxIA</i> của <i>A.pleuropneumoniae</i> serotype 5a và <i>ApxIA</i> (GQ369732.1).....	28

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Phôi lợn bị nhiễm trùng <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5
Hình 1.2. Vi khuẩn <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	6
Hình 2.1. Sơ đồ vector pGEM®-T Easy của Promega.....	14
Hình 2.2. Sơ đồ vector biểu hiện pET-28a (+)	14
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện pET - ApxIA	22
Hình 3.1. Kết quả nhân gen <i>ApxIA</i> từ <i>App</i> serotype 5a.....	23
Hình 3.2. Khuẩn lạc mang plasmid trên môi trường chọn lọc	24
Hình 3.4. Kết quả cắt vector pGEM- ApxIA bằng enzyme <i>Bam</i> HI và <i>Hind</i> III...	25
Hình 3.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotide <i>ApxIA</i> của <i>A.pleuropneumoniae</i> serotype 5a phân lập được và <i>ApxIA</i> (GQ369732.1) trên Genbank	26
Hình 3.6. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen <i>ApxIA</i> của <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5a phân lập được và <i>ApxIA</i> (GQ369732.1) trên Genbank	27
Hình 3.7. Kết quả tách plasmid các dòng có khả năng mang pET-ApxIA	29
Hình 3.8. Kết quả chọn lọc dòng vi khuẩn mang vector pET-ApxIA bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu Apx	29
Hình 3.9. Kết quả chọn lọc dòng vi khuẩn mang vector pET-ApxIA khi cắt bằng enzyme <i>Bam</i> HI và <i>Hind</i> III.....	30

MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Lợn là vật nuôi chiếm tỷ trọng cao trong ngành chăn nuôi ở Việt Nam. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển của ngành chăn nuôi thì dịch bệnh cũng phát sinh, lây lan và gây thiệt hại lớn về kinh tế.

Bệnh viêm màng phổi ở lợn là một trong số các bệnh thuộc hội chứng hô hấp phức hợp, được ghi nhận ở nhiều nước trên thế giới, nơi có ngành chăn nuôi lợn phát triển. Bệnh có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất của đàn lợn với tỷ lệ chết có thể lên đến 20% khi có dịch cấp tính xảy ra. Tuy nhiên, các thiệt hại gián tiếp khi bệnh ở thể mãn tính gây ra như tăng trọng trên ngày giảm 50 gram và các chi phí thuốc cho điều trị cao hơn nhiều so với tỷ lệ chết.

Vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* từ lâu đã được nghiên cứu nhiều và xác định là nguyên nhân chính gây nên bệnh viêm màng phổi ở lợn. Nhiều công bố đã cho thấy, mức độ độc lực khác nhau của các serotype vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phần lớn có liên quan đến ngoại độc tố (Apx) sản sinh từ vi khuẩn đóng vai trò chính trong quá trình gây bệnh cho lợn. Độc lực của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* có liên quan đến bốn loại protein độc tố, trong đó độc tố ApxI có độc lực cao, gây dung huyết và có hoạt tính gây độc tế bào mạnh hướng đại thực bào phế nang và bạch cầu trung tính.

Hiện nay để phòng bệnh viêm màng phổi do vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* gây ra chủ yếu sử dụng vaccine nhược độc. Đây đều là các loại vaccine có giá thành khá cao, miễn dịch bảo hộ ở chuột hoặc lợn thí nghiệm cũng rất thất thường và không ổn định. Trong những năm gần đây, việc ứng dụng kỹ thuật di truyền trong sản xuất vaccine đang được quan tâm, tạo ra vaccine thế hệ mới khắc phục được nhược điểm của các loại vaccine truyền thống như vaccine nhược độc.