

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

HOÀNG THỊ THU YẾN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC
MỘT SỐ GEN THUỘC HỆ MIỄN DỊCH TÔM SÚ
(*PENAEUS MONODON*)

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62 42 70 01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. NÔNG VĂN HẢI

2. TS. PHẠM ANH TUẤN

THÁI NGUYÊN - 2012

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến **PGS.TS. Nông Văn Hải** và **TS. Phạm Anh Tuấn** đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và hết lòng giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin cảm ơn các cấp Lãnh đạo Đại học Thái Nguyên, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên, Khoa Sinh - KTNV và Khoa Sau đại học đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới Lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học, Phòng trọng điểm Công nghệ gen, tập thể cán bộ nghiên cứu Phòng ADN ứng dụng thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đặc biệt là **TS. Kim Thị Phương Oanh** đã tạo điều kiện về vật chất, phương tiện và giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn các cấp Lãnh đạo Trường Đại học khoa học, Khoa Khoa học Sự sống, Phòng ĐT - KH và QHQT đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi về mọi mặt trong suốt quá trình nghiên cứu thực hiện đề tài luận án.

Tôi xin cảm ơn tập thể nghiên cứu thực hiện đề tài cấp nhà nước: **“Nghiên cứu giải trình tự một phần bộ gen và xây dựng cơ sở dữ liệu genome tôm sú (*P. monodon*)”** thuộc Chương trình Công nghệ sinh học thủy sản 2008-2010, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã tạo điều kiện về kinh phí để tôi thực hiện luận án.

Tôi cũng xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân, các bạn đồng nghiệp, những người luôn động viên, khuyến khích và giúp đỡ về mọi mặt để tôi có thể hoàn thành công việc nghiên cứu của mình.

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2012

Tác giả luận án

Hoàng Thị Thu Yến

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan tất cả các kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Nếu sai tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn.

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2012

Tác giả luận án

Hoàng Thị Thu Yến

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
LỜI CAM ĐOAN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH	ix
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tôm sú và các bệnh thường gặp ở tôm sú	3
1.1.1. Giới thiệu về tôm sú	3
1.1.2. Tình hình nuôi và dịch bệnh tôm sú ở Việt Nam	5
1.1.3. Các bệnh thường gặp ở tôm sú	7
1.1.4. Phương pháp phòng và trị bệnh ở tôm sú	12
1.2. Hệ miễn dịch tôm sú	14
1.2.1. Đáp ứng miễn dịch tế bào	15
1.2.2. Đáp ứng miễn dịch dịch thể	21
1.3. Nghiên cứu gen và tiềm năng ứng dụng trong phòng trị bệnh cho tôm sú	23
1.3.1. Tình hình nghiên cứu genome tôm sú trên thế giới	23
1.3.2. Nghiên cứu gen liên quan đến khả năng miễn dịch ở tôm sú	24
1.3.3. Tiềm năng ứng dụng của gen liên quan đến miễn dịch trong phòng trị bệnh ở tôm sú	28
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	32
2.1. Vật liệu	32
2.1.1. Thu thập mẫu	32

2.1.2. Hóa chất	32
2.1.3. Thiết bị	34
2.1.4. Các vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu	35
2.2.1. Tách chiết RNA tổng số	36
2.2.2. Tinh sạch mRNA	37
2.2.3. Tổng hợp cDNA	38
2.2.4. Thiết kế môi phân lập một số gen (cDNA) lựa chọn	41
2.2.5. Khuếch đại gen bằng phản ứng PCR	48
2.2.6. Tinh sạch sản phẩm PCR	49
2.2.7. Tạo dòng phân tử sản phẩm PCR	49
2.2.8. Xác định trình tự gen (cDNA)	50
2.2.9. Biểu hiện gen <i>ALFPm3</i>	50
2.2.10. Phân tích dữ liệu trình tự và xử lý số liệu	55
2.3. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận án	55
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	56
3.1. Gen <i>Rab7</i> - protein liên quan đến cơ chế xâm nhiễm của virus	56
3.1.1. Tạo dòng gen <i>Rab7</i> từ mẫu tôm sú Việt Nam	56
3.1.2. Xác định và phân tích trình tự gen <i>Rab7</i>	58
3.2. Gen <i>syntenin</i> - protein liên quan đến con đường dẫn truyền tín hiệu	61
3.2.1. Phân lập đoạn 5'- <i>syntenin</i> từ mẫu tôm sú Việt Nam	62
3.2.2. Tạo dòng gen <i>syntenin</i> hoàn chỉnh từ mẫu tôm sú Việt Nam	64
3.2.3. Xác định và phân tích trình tự gen <i>syntenin</i>	65
3.3. Gen <i>hemocyanin</i> - protein có hoạt tính phenoloxidase	68
3.3.1. Phân lập đoạn 5'- <i>hemocyanin</i> từ mẫu tôm sú Việt Nam	69
3.3.2. Tạo dòng gen <i>hemocyanin</i> hoàn chỉnh từ mẫu tôm sú Việt Nam	72
3.3.3. Phân tích trình tự gen <i>hemocyanin</i>	74
3.4. Gen <i>Ran</i> - protein điều khiển thực bào	76
3.4.1. Tạo dòng một phần đoạn gen <i>Ran</i> từ mẫu tôm sú Việt Nam	77

3.4.2. Phân lập đoạn gen 3' và 5'- <i>Ran</i>	78
3.4.3. Tạo dòng gen <i>Ran</i> hoàn chỉnh từ mẫu tôm sú Việt Nam.....	82
3.4.4. Xác định và phân tích trình tự gen <i>Ran</i>	83
3.5. Gen <i>caspase</i> - protein tham gia vào cơ chế apoptosis.....	84
3.5.1. Tạo dòng gen <i>caspase</i> từ mẫu tôm sú Việt Nam	85
3.5.2. Xác định và phân tích trình tự gen <i>caspase</i>	86
3.6. Hệ thống các gen mã hóa protein kháng khuẩn kháng nấm và kháng virus.....	90
3.6.1. Gen mã hóa protein kháng virus PmAV	90
3.6.2. Gen mã hóa peptide kháng khuẩn tương tự crustin (crustin - like antimicrobial peptide).....	94
3.6.3. Gen mã hóa yếu tố kháng khuẩn (ALF - antiliposaccharide factor).....	99
3.7. Biểu hiện yếu tố kháng khuẩn tái tổ hợp (rALFPm3).....	105
3.7.1. Tạo cấu trúc vector biểu hiện gen.....	105
3.7.2. Xác định cấu trúc gen <i>ALFPm3</i> được chuyển vào genome nấm men.....	108
3.7.3. Xác định đoạn peptide ALFPm3 được biểu hiện.....	109
3.7.4. Phân tích hoạt tính của rALFPm3.....	111
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	113
1. Kết luận	113
2. Kiến nghị	114
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	115
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
5'UTR	Vùng 5' không dịch mã	5' Untranslated region
3'UTR	Vùng 3' không dịch mã	3' Untranslated region
AAP	Mồi neo	Abridged anchor primer
AFLP	Đa hình chiều dài DNA được khuếch đại	Amplified fragment length polymorphism
ALF	Yếu tố kháng khuẩn	Anti-lipopolisaccharide factor
ALFPm	ALF dạng 1 ở tôm sú	Anti-lipopolisaccharide factor <i>Penaeus monodon</i> isorform 1
ALFPm3	ALF dạng 3 ở tôm sú	Anti-lipopolisaccharide factor <i>Penaeus monodon</i> isorform 3
AMP	Peptide kháng khuẩn	Antimicrobial peptide
apoptosis	Tế bào chết theo chương trình	Programmed cell death
bp	Cặp base	Base pair
<i>B.megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
cDNA	DNA bổ sung	Complement DNA
DP	Mồi suy diễn	Degenerate primer
DNA	Axit deoxyribonucleic	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Hỗn hợp các nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Deoxyribonucleoside triphosphate
ddNTPs	Hỗn hợp các deoxynucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)	Dideoxyribonucleoside triphosphate
dsRNA	RNA sợi kép	Double stranded RNA
DEPC	Chất khử Rnase	Diethyl pyrocarbonate
<i>E. aerogenes</i>	Vi khuẩn <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Axit ethylenediaminetetraacetic	Ethylenediaminetetraacetic acid
EST	Đoạn trình tự gen biểu hiện	Expressed sequence tag
GSP	Mồi đặc hiệu gen	Gene specific primer

kb	Kb	Kilo base
LB	Môi trường LB	Luria Bertani
mtDNA	DNA ty thể	Mitochondrial DNA
mRNA	RNA thông tin	Messenger RNA
OD	Mật độ quang	Optical density
ORF	Khung đọc mở	Open reading frame
PCR	Phản ứng chuỗi polymerase	Polymerase chain reaction
<i>PmAV</i>	Gen kháng virus ở tôm sú	<i>Penaeus monodon</i> antivrus
<i>PmRab7</i>	Rab7 ở tôm sú	<i>Penaeus monodon</i> Rab7
<i>P. pastoris</i>	Nấm men <i>Pichia pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
3'RACE	Khuếch đại nhanh đầu 3' cDNA	Rapid amplification of cDNA 3' ends
5'RACE	Khuếch đại nhanh đầu 5' cDNA	Rapid amplification of cDNA 5' ends
rALFpm3	ALF tái tổ hợp ở tôm sú dạng 3 từ tôm sú	Recombinant anti-lipopolisaccharide factor <i>Penaeus monodon</i> 3
RNA	Axit ribonucleic	Ribonucleic acid
RNAi	RNA can thiệp	RNA interference
RNase	Enzyme phân hủy RNA	Ribonuclease
RT	Enzyme phiên mã ngược	Reverse transcriptase
RT-PCR	PCR bằng enzyme phiên mã ngược	Reverse transcriptase-PCR
siRNA	RNA can thiệp nhỏ	Small interfering RNA
SNP	Đa hình các nucleotide đơn	Single-nucleotide polymorphism
SSC	Dung dịch Natri citrate	Solution sodium citrate
TSV	Virus gây hội chứng taura	Taura syndrome virus
UAP	Mồi khuếch đại chung	Universal amplication primer
UPM	Hỗn hợp mồi chung	Universal primer mix
v/p	vòng/phút	rotor/minute
WSSV	Virus gây bệnh đốm trắng	White spot syndrome virus
YHV	Virus gây bệnh đầu vàng	Yellow head virus
YP	Môi trường YP	Yeast peptone
YPD	Môi trường YPD	Yeast peptone dextrose

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Thông kê các gen liên quan đến hệ miễn dịch ở tôm	26
Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	34
Bảng 2.2. Trình tự các môi sử dụng trong nghiên cứu	47

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh tôm sú	3
Hình 1.2. Tôm sú nhiễm WSSV	10
Hình 1.3. Tôm sú nhiễm YHV	12
Hình 1.4. Tế bào máu tôm sú	17
Hình 1.5. Hệ thống hoạt hóa proPO và tổng hợp melanin	19
Hình 1.6. Cơ chế đông máu ở tôm	21
Hình 2.1. Sơ đồ phân lập gen	35
Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế môi từ gen đã biết trình tự.....	42
Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế môi từ gen đã biết một phần trình tự đầu 3' (Invitrogen).....	42
Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế môi từ gen đã biết một phần trình tự đầu 3' (Clontech).....	43
Hình 2.5. Sơ đồ thiết kế môi khi biết một phần trình tự đầu 5' của gen.....	43
Hình 2.6. Sơ đồ thiết kế môi phân lập gen <i>syntenin</i>	44
Hình 2.7. Sơ đồ thiết kế môi phân lập gen <i>hemocyanin</i>	44
Hình 2.8. Sơ đồ thiết kế môi phân lập gen <i>Ran</i>	45
Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế môi để phân lập gen hoàn toàn mới ở tôm sú.....	46
Hình 2.10. Sơ đồ thiết kế môi khuếch đại đoạn gen mã hóa peptide ALFPm3 trưởng thành.....	46
Hình 2.11. Sơ đồ biểu hiện <i>ALFPm3</i>	51
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại và tách dòng gen <i>Rab7</i>	57
Hình 3.2. Trình tự gen và amino acid suy diễn của <i>Rab7</i>	58
Hình 3.3. So sánh trình tự nucleotide ở gen <i>Rab7</i> của tôm sú Việt Nam với trình tự đã công bố.....	59
Hình 3.4. Mô phỏng cấu trúc bậc hai và phân tích các motif chức năng của protein <i>Rab7</i>	60
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại và tách dòng đoạn 5'- <i>syntenin</i>	62
Hình 3.6. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của đoạn 5'- <i>syntenin</i>	63
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại và tách dòng gen <i>syntenin</i>	64