

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**NGUYỄN THỊ BÍCH NGÀ**

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM GEN H5 VÀ N1 CỦA VIRUS  
CÚM A/H5N1 PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM ĐỂ TẠO NGUỒN  
NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT VACCINE THỂ HỆ MỚI**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**





## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác.

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả.

Phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

*Ngày            tháng            năm 2012*

*Tác giả*

*Nguyễn Thị Bích Nga*

## MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bì	
Lời cảm ơn	i
Lời cam đoan	ii
Mục lục	iii
Danh mục các ký hiệu , các chữ viết tắt	vi
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình	viii
<b>MỞ ĐẦU</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b>	<b>4</b>
1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ VIRUS CÚM	4
1.1.1. Virus cúm và phân loại virus cúm	4
1.1.2. Đặc điểm tiến hóa tạo nên các phân dòng có độc lực cao của virus cúm A/H5N1	5
1.1.3. Sự hình thành genotype của virus cúm A/H5N1 trên thế giới và Việt Nam	7
1.1.4. Biến đổi thành phần gen hemagglutinin (HA) tạo nên các nhóm kháng nguyên (clade) của virus cúm A/H5N1	9
1.2. ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC VIRUS CÚM A	11
1.2.1. Đặc tính cấu trúc chung	11
1.2.2. Cấu trúc hệ gen của virus cúm A	13
1.2.3. Chức năng các phân đoạn trong hệ gen	14
1.3. CẤU TRÚC, CHỨC NĂNG CỦA HEMAGGLUTININ VÀ NEURAMINIDASE	15
1.3.1. Protein hemagglutinin (HA)	15
1.3.2. Protein neuraminidase (NA)	19
1.4. CÁC YẾU TỐ QUYẾT ĐỊNH ĐỘC LỰC	21
1.5. CÁC PHƯƠNG THỨC BIẾN ĐỔI KHÁNG NGUYÊN	22
1.5.1. Hiện tượng «lệch kháng nguyên»	22
1.5.2. Hiện tượng «trộn kháng nguyên»	24
1.5.3. Hiện tượng glycosyl hoá	24
1.6. BỆNH CÚM GIA CẦM	25
1.6.1. Lịch sử bệnh cúm gia cầm	25
1.6.2. Tình hình bệnh cúm A/H5N1 trên thế giới	27
1.6.3. Tình hình dịch cúm A/H5N1 ở Việt Nam	28
1.6.4. Đặc điểm của bệnh cúm gia cầm	28
1.6.4.1. Triệu chứng - bệnh tích ở cúm gia cầm	28

1.6.4.2. <i>Triệu chứng bệnh cúm gia cầm ở người</i>	29
1.6.5. Tính thích ứng đa vật chủ của virus cúm A/H5N1	29
1.6.6. Cơ chế xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A trong tế bào	31
1.6.7. Phương thức lây truyền của virus cúm gia cầm	32
1.6.8. Sức đề kháng của virus	33
1.7. CÁC LOẠI VACXIN PHÒNG BỆNH CHO GIA CẦM	33
1.8. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ VIRUS CÚM GIA CẦM A/H5N1 TẠI VIỆT NAM	36
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	39
2.1. ĐỐI TƯỢNG	39
2.2. NỘI DUNG	39
2.3. VẬT LIỆU	39
2.4. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU	40
2.4.1. Dụng cụ, trang thiết bị	40
2.4.2. Hóa chất	40
2.5. QUI TRÌNH NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH GEN H5 VÀ N1 CỦA VIRUS CÚM A/H5N1	40
2.6. CÁC PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ NGHIÊN CỨU GEN VIRUS CÚM A/H5N1	41
2.6.1. Phương pháp tách chiết ARN tổng số	41
2.6.2. Phương pháp RT-PCR	42
2.6.3. Phương pháp điện di kiểm tra và tinh sạch sản phẩm RT-PCR	42
2.7. PHƯƠNG PHÁP DÒNG HÓA	43
2.7.1. Nối sản phẩm RT-PCR/PCR vào vector tách dòng	43
2.7.2. Chuyển nạp sản phẩm dòng hóa vào tế bào khả biến	44
2.7.3. Chọn lọc, nuôi cấy khuẩn lạc và tách chiết ADN tái tổ hợp	45
2.7.4. Kiểm tra ADN tái tổ hợp	45
2.8. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE	45
2.9. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU	47
2.9.1. Xử lý chuỗi trong chương trình Chromas	47
2.9.2. Chương trình biên tập chuỗi nucleotide SeqEd	48
2.9.3. Hệ chương trình MacVector	48
2.9.4. Chương trình so sánh và phân tích chuỗi gen GeneDoc	48
2.9.5. Chương trình phân tích di truyền tiến hóa phân tử (MEGA)	49
2.9.6. Xử lý số liệu trong nghiên cứu	49
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN</b>	50
3.1. THU NHẬN VÀ LƯU GIỮ GEN H5 CỦA VIRUS CÚM A/H5N1	50

TRONG VECTOR TÁCH DÒNG	
3.1.1. Tách ARN tổng số và thực hiện RT-PCR	50
3.1.2. Dòng hoá sản phẩm và lưu gen H5 trong vector tách dòng	52
3.1.3. Giải trình tự và phân tích thành phần amino acid của HA (H5) so sánh về thành phần nucleotide và amino acid với các chuỗi đăng ký trong Ngân hàng gen	54
3.1.4. Phân tích vị trí điểm cắt protease, bám dính thụ thể, epitope và glycosyl hoá của polypeptide H5 trên cơ sở trình tự amino acid suy diễn	65
3.1.5. Phân tích tương đồng về nucleotide và amino acid ở H5	67
3.1.6. Phân tích mối quan hệ phả hệ và nguồn gốc giữa các chủng của Việt Nam và thế giới	69
3.2. XÁC ĐỊNH CÁC PHÂN NHÁNH NHÓM KHÁNG NGUYÊN (CLADE) XUẤT HIỆN MỚI TẠI VIỆT NAM	73
3.2.1 Kết quả sự hình thành phân nhóm kháng nguyên mới 1.1 của clade 1	74
3.2.2 Kết quả sự hình thành phân nhóm kháng nguyên mới của clade 2.3.2 và 2.3.4	76
3.3. THU NHẬN, GIẢI TRÌNH TỰ VÀ LƯU GIỮ GEN N1 CÁC CHỦNG VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG VECTOR TÁCH DÒNG	79
3.3.1. Thực hiện RT-PCR thu nhận gen N1	79
3.3.2. Dòng hoá sản phẩm gen N1 trong vector tách dòng	81
3.3.3. Phân tích thành phần nucleotide và amino acid của gen N1	83
3.3.3.1. <i>Phân tích thành phần nucleotide gen N1</i>	83
3.3.3.2. <i>Phân tích thành phần amino acid gen N1</i>	85
3.3.4. Phân tích đột biến trượt-xoá gen của N1 qua thời gian tiến hoá	89
3.3.5. Phân tích mối quan hệ phả hệ gen N1 của các chủng virus cúm A/H5N1 giai đoạn 1996 - 2011	92
KẾT LUẬN	98
ĐỀ XUẤT VÀ KIẾN NGHỊ	99
TÀI LIỆU THAM KHẢO	100
DANH SÁCH CÁC BÀI BÁO LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ	114
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
bp	base pair	Cặp bazơ
Ck	Chicken	Gà
dNTP	Deoxy Nucleotide Triphosphate	Deoxy Nucleotide Triphosphate
ddNTP	dideoxy Nucleotide Triphosphate	dideoxy Nucleotide Triphosphate
Dk	Duck	Vịt
DNA	Acid deoxyribonucleic	Axit deoxyribonucleic
FAO	Food and Agricultural Organization	Tổ chức nông lương thế giới
Gs	Goose	Ngỗng
HA	Hemagglutinin	Kháng nguyên HA
HI	Hemagglutination Inhibition	Phản ứng ngưng kết hồng cầu
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza	Cúm gia cầm thể độc lực cao
kb	Kilo base	Kilo base
kDa	Kilodalton	Đơn vị khối lượng kilodalton
LB	Luria-Bertani medium	Môi trường LB
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza	Cúm gia cầm thể độc lực thấp
M	Matrix protein	Protein đệm M
Md	Muscovy duck	Ngan
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis	Phân tích di truyền tiến hoá phân tử
NA	Neuraminidase	Kháng nguyên NA
NEP	Nuclear Export Protein	Nuclear Export Protein
NP	Nucleoprotein	Nucleoprotein
NS	Non-structural protein	Protein không cấu trúc
OIE	<a href="#">Office International des Epizooties</a>	Tổ chức dịch tễ thế giới
PA	Polymerase acidic protein	Protein PA
PB1	Polymerase basic protein 1	Protein PB1
PB2	Polymerase basic protein 2	Protein PB2
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
RNP	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
RT-PCR	Revertranscription Polymerase Chain Reaction	Phản ứng trùng hợp chuỗi PCR ngược
SPF	Specific Pathogen Free	Không tác nhân mầm bệnh
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y thế thế giới





## DANH MỤC CÁC BẢNG

	<b>Trang</b>
<b>Bảng 1.1</b> Thống kê số lượng người bị nhiễm và chết do cúm gia cầm qua các năm.	26
<b>Bảng 2.1</b> Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 phân lập giai đoạn 2004 – 2011.	39
<b>Bảng 2.2</b> Danh sách các cặp môi sử dụng trong thu nhận gen kháng nguyên H5 và N1.	42
<b>Bảng 2.3</b> Thành phần phản ứng RT-PCR và chu trình nhiệt.	42
<b>Bảng 2.4</b> Danh sách các cặp môi sử dụng trong giải trình tự gen kháng nguyên H5 và N1.	47
<b>Bảng 2.5</b> Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt giải trình tự.	47
<b>Bảng 3.1</b> Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 của Việt Nam và thế giới sử dụng chuỗi H5 trong phân tích so sánh thành phần gen và mối quan hệ nguồn gốc phả hệ.	54
<b>Bảng 3.2</b> Các vị trí nucleotide sai khác trong chuỗi H5 giữa các chủng so sánh.	56
<b>Bảng 3.3</b> Kết quả tổng hợp phát hiện 41 vị trí sai khác amino acid của chuỗi H5 so sánh ở 32 chủng phân lập tại Việt Nam từ năm 2004 - 2011.	64
<b>Bảng 3.4</b> Các vị trí amino acid quan trọng trong chuỗi polypeptide H5	65
<b>Bảng 3.5</b> Tỷ lệ (%) tương đồng về nucleotide (trên đường chéo) và amino acid (dưới đường chéo) của gen H5.	68
<b>Bảng 3.6</b> Kết quả thống kê 14 chủng virus cúm AH5N1 được xác định gen H5 và các nhóm kháng nguyên giai đoạn 2004 – 2011 trong nghiên cứu.	78
<b>Bảng 3.7</b> Danh sách các chủng cúm A/H5N1 thu thập qua các năm 2004-2011 đã giải trình tự và cung cấp chuỗi gen N1 sử dụng để so sánh nucleotide và amino acid.	83
<b>Bảng 3.8</b> Kết quả thống kê 14 chủng virus cúm A/H5N1 giai đoạn 2004-2011 đã được giải trình tự và đăng ký gen N1	97