

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHẠM VĂN PHÚC

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR
PHÁT HIỆN NHANH VÀ ĐỒNG THỜI *Staphylococcus aureus*
VÀ *Salmonella typhi* GÂY BỆNH TRONG THỰC PHẨM

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2013

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHẠM VĂN PHÚC

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR
PHÁT HIỆN NHANH VÀ ĐỒNG THỜI *Staphylococcus aureus*
VÀ *Salmonella typhi* GÂY BỆNH TRONG THỰC PHẨM**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã Số: 60420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. NGUYỄN VĂN DUY

Thái Nguyên - 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan: Luận văn này là công trình nghiên cứu thực sự của cá nhân, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Nguyễn Văn Duy. Các số liệu, những kết luận nghiên cứu được trình bày trong luận văn này là trung thực.

Tôi xin chịu trách nhiệm về nghiên cứu của mình.

Học viên

Phạm Văn Phúc

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành chương trình cao học và viết luận văn này tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Văn Duy, Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và hướng dẫn tận tình tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến TS. Lê Quang Hòa, trưởng phòng Công nghệ gen, Viện CNSH&CNTP, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội; TS. Nguyễn Đắc Trung, phó trưởng khoa Y học Cơ sở, Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên; ThS. Nguyễn Thị Lan Hương, cán bộ Trung tâm Y tế dự phòng tỉnh Thái Nguyên; ThS. Đỗ Bích Huệ, cán bộ phòng Vi sinh, Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã cung cấp các chủng vi sinh vật để thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ phòng Vi sinh, Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên; các cán bộ Bộ môn Vi sinh, Khoa Y học Cơ sở, Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên; các cán bộ phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ Sinh học & Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

Tôi xin chân thành cảm ơn bố mẹ và những người bạn đã luôn ở bên cạnh động viên và giúp đỡ tôi học tập làm việc và hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 8 năm 2013

Học viên

Phạm Văn Phúc

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài:	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Ý nghĩa khoa học, thực tiễn của đề tài	2
4.1. Ý nghĩa khoa học	2
4.2. Ý nghĩa thực tiễn	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tình hình ngộ độc thực phẩm do <i>Staphylococcus</i> và <i>Salmonella</i>	3
1.1.1. Trên thế giới	3
1.1.2. Ở Việt Nam	6
1.2. Tổng quan về <i>Salmonella typhi</i> và <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.2.1. <i>Salmonella typhi</i>	7
1.2.1.1. Hình thái, cấu tạo của <i>Salmonella typhi</i>	7
1.2.1.2. Cấu trúc di truyền của <i>Salmonella typhi</i>	10
1.2.1.3. Các chỉ thị phân tử của <i>Salmonella typhi</i>	11
1.2.1.4. Đặc tính sinh học của <i>Salmonella typhi</i>	12
1.2.1.5. Đặc tính gây bệnh của <i>Salmonella typhi</i>	14
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2.2.1 Hình thái , cấu tạo của <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2.2.2. Cấu trúc di truyền của <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.2.2.3. Các chỉ thị phân tử của <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.2.2.4. Đặc tính sinh học <i>Staphylococcus aureus</i>	19

1.2.2.5. Đặc tính gây bệnh do <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.3. Các phương pháp phát hiện <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	24
1.3.1. Các phương pháp vi sinh	24
1.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử	25
1.4. Tổng quan về kỹ thuật multiplex PCR	27
1.4.1. Nguyên lý của kỹ thuật multiplex PCR.....	27
1.4.2. Ứng dụng của kỹ thuật multiplex PCR trong phát hiện nhanh vi sinh vật gây bệnh.....	28
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	31
2.1. Đối tượng nghiên cứu	31
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	31
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu	31
2.2.2. Thời gian nghiên cứu.....	31
2.3. Vật liệu nghiên cứu.....	31
2.3.1. Các cặp môi sử dụng trong đề tài	31
2.3.2. Hóa chất sử dụng trong đề tài	32
2.3.3. Dụng cụ, thiết bị.....	33
2.4. Phương pháp nghiên cứu	33
2.4.1. Phương pháp thiết kế cặp môi	33
2.4.1.1. Thiết kế cặp môi đặc hiệu cho vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.4.1.2. Thử nghiệm khả năng khuếch đại của các cặp môi sử dụng bằng phản ứng PCR.....	34
2.4.2. Phương pháp tách chiết DNA.....	35
2.4.2.1. Phá vỡ tế bào vi khuẩn bằng sốc nhiệt	35
2.4.2.2. Tách chiết DNA vi khuẩn bằng hóa chất	36

2.4.2.3. Định lượng, kiểm tra chất lượng tách chiết DNA	37
2.4.3. Phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	38
2.4.4. Phương pháp xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex PCR	39
2.4.5. Phương pháp xác định độ đặc hiệu của multiplex PCR.....	39
Chương 3: KẾT QUẢ - BIỆN LUẬN	40
3.1. Thiết kế cặp mồi cho phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	40
3.2. Xây dựng quy trình phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i> bằng phản ứng multiplex PCR.....	43
3.2.1. Tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn	43
3.2.2. Nghiên cứu nồng độ DNA tối thiểu của các phản ứng PCR đơn phát hiện riêng rẽ <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	45
3.2.3. Tối ưu phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	47
3.2.4. Thử nghiệm quy trình kỹ thuật multiplex PCR với các chủng vi khuẩn thuần	53
3.2.5. Thử nghiệm quy trình kỹ thuật multiplex PCR với các phương pháp tách chiết DNA khác nhau.....	54
3.3. Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	56
3.4. Xác định độ đặc hiệu của phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời <i>Staphylococcus aureus</i> và <i>Salmonella typhi</i>	57
Chương 4: KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ	60
4.1. Kết luận.....	60
4.2. Kiến nghị	61

TÀI LIỆU THAM KHẢO	62
---------------------------------	-----------

DANH MỤC CÁC TỪ, CÁC CỤM TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ
ATTP	An toàn thực phẩm
ATVSTP	An toàn vệ sinh thực phẩm
CIAA	Hỗn hợp gồm 24 chloroform : 1 isoamylalcohol
CFU	Colony Forming Unit - Đơn vị đo khuẩn lạc
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
NDTP	Ngộ độc thực phẩm
OD	Optical Density - Giá trị mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Bảng phân loại <i>Salmonella</i> và vật chủ theo danh pháp KauffmannWhite.	8
Bảng 1.2. Những đặc tính của <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> và <i>Micrococci</i>	22
Bảng 2.1. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu	32
Bảng 2.2. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu	32
Bảng 2.3. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	33
Bảng 3.1. Kết quả xác định nồng độ DNA tổng số của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.	44