

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN PHƯỢNG MINH

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *PAGA* MÃ HÓA
KHÁNG NGUYÊN BẢO VỆ PA CỦA VI KHUẨN
BACILLUS ANTHRACIS TRONG VI KHUẨN *E. COLI* BL21**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 60 42 01 03

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS NGÔ ĐÌNH BÌNH

HÀ NỘI - 2013

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và thực hiện luận văn, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ, hỗ trợ của thầy cô, bạn bè, đồng nghiệp và gia đình. Tôi xin trân trọng cảm ơn tất cả những tình cảm quý báu đó.

Trước tiên, tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS Ngô Đình Bính, người thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ phòng Di truyền Vi sinh, Viện công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt thời gian dài thực tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn Thủ trưởng và cán bộ Viện Hóa học - Môi trường Quân sự nơi tôi công tác đã tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành luận văn của mình.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn bạn bè và gia đình, những người đã luôn ủng hộ tôi trong suốt thời gian qua!

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2013

Học viên

Nguyễn Phương Minh

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATP	Acid Adenozin Triphosphate
<i>B. anthracis/ Ba</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
bp	base pair
CA	Casamino Acid
dH ₂ O	deion water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EF	Edema Factor
FAO	Food Agricultural Organisation
h	giờ
kDa	Kilo Dalton
LB	Lauria Betani
LF	Lethal Factor
MPA	Meat Pepton Agar
MPB	Meat Pepton Broth
ORF	Open Reading Frame
PA	Protective Antigen
PCR	Polymerase Chains Reaction
SDS	Sodium Dodecylsulphate
TAE	Tris – Acetate EDTA

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Sơ lược về bệnh than.....	3
1.1.1. Lịch sử xuất hiện và phát triển của bệnh than	3
1.1.2. Các dạng bệnh than	4
1.1.2.1. Bệnh than thể da	5
1.1.2.3. Bệnh than hô hấp	7
1.1.2.4. Bệnh than thể màng não	7
1.1.3. Bệnh than và chiến tranh sinh học	8
1.2. Tác nhân gây bệnh than	9
1.2.1. Đặc điểm vi khuẩn <i>Bacillus anthracis</i>	10
1.2.2. Độc tố của vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	11
1.2.2.1. Độc tố vỏ nhày	11
1.2.2.2. Độc tố than.....	12
1.2.2.2.1. Kháng nguyên bảo vệ PA (<i>Protective antigen – PA</i>)	12
1.2.2.2.2. Tác nhân gây phù thũng (<i>Edema factor – EF</i>)	13
1.2.3. Biểu hiện của các gen gây độc trong vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	15
1.3. Kháng nguyên bảo vệ PA	17
1.3.1. Vai trò của kháng nguyên bảo vệ PA	17
1.3.2. Cấu trúc kháng nguyên bảo vệ PA.....	18
1.3.3. Cơ chế dẫn truyền độc tố của kháng nguyên bảo vệ PA	20
1.4. Gen mã hoá kháng nguyên bảo vệ PA	22
1.5. Biểu hiện gen <i>pagA</i>	23
1.5.1. Vector biểu hiện	23
1.5.2. Lựa chọn chủng biểu hiện	25
1.5.3 Phương pháp biểu hiện.....	26

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	28
2.1. Vật liệu	28
2.1.1. Sinh Phẩm	28
2.2. Hoá chất và môi trường	29
2.2.1. Hoá chất, dung dịch	29
2.2.2. Môi trường	34
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	34
2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn [30].....	35
2.3.2. Phương pháp tinh sạch plasmid [30].....	35
2.3.3. Phương pháp PCR	36
2.3.4. Phương pháp điện di trên gel agarose [30].....	36
2.3.5. Phương pháp cắt bằng enzym giới hạn [30]	37
2.3.7. Phương pháp làm tế bào khả biến <i>E. coli</i>	39
2.3.8. Phương pháp biến nạp vào tế bào khả biến [30].....	39
2.3.9. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 12,6 % [30]	40
2.3.10. Phương pháp biểu hiện gen.....	41
2.3.11. Khảo sát điều kiện biểu hiện thích hợp cho quá trình biểu hiện.....	41
2.3.12. Xác định khả năng hoà tan của protein	42
2.3.13. Tinh chế protein dung hợp bằng cột Probond Nikel Resin	42
2.3.14. Phương pháp Western Blot [3, 25]	44
CHƯƠNG 3-KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	46
3.1. Tách chiết DNA tổng số	46
3.2. Khuếch đại đoạn gen <i>pagA</i> bằng phản ứng PCR.....	46
3.3. Tách dòng gen <i>pagA</i>	47
3.3.1. Biến nạp vector mang gen <i>pagA</i> vào tế bào khả biến <i>E. coli</i> chủng DH5 α	47
3.3.2. Kiểm tra sự tồn tại của gen <i>pagA</i> trong vector tái tổ hợp.....	47

3.3.3. Đọc trình tự nucleotide của gen <i>pagA</i>	51
3.4. Biểu hiện gen <i>pagA</i> mã hóa kháng nguyên bảo vệ PA.....	54
3.4.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen <i>pagA</i>	54
3.4.2. Gắn đoạn gen <i>pagA</i> vào vector biểu hiện pET-TRX-FUS	54
3.4.3. Tạo chủng <i>E. coli</i> BL21 tái tổ hợp mang gen <i>pagA</i>	55
3.4.3.1. Biến nạp vector tái tổ hợp pET-TRX-FUS- <i>pagA</i> vào chủng trung gian <i>E. coli</i> DH5 α	55
3.4.3.2. Kiểm tra sự tồn tại của <i>pagA</i> trong plasmid tái tổ hợp	55
3.4.3.3. Kiểm tra khung đọc của vector tái tổ hợp pET-TRX-FUS- <i>pagA</i> ..	57
3.4.3.4. Biến nạp plasmid tái tổ hợp pET-TRX- <i>pagA</i> vào <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ..	58
3.4.4. Nghiên cứu biểu hiện gen <i>pagA</i> trong <i>E. coli</i> BL21	59
3.4.4.1. Nghiên cứu điều kiện biểu hiện gen <i>pagA</i>	59
3.4.4.2. Xác định khả năng hoà tan và định khu của protein	62
3.5. Tinh chế protein tái tổ hợp bằng cột sắc kí ái lực Probond Nikel Resin..	63
3.6. Khẳng định sự biểu hiện của protein tái tổ hợp PA bằng phản ứng Western blot.....	64
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	66
KẾT LUẬN	66
KIẾN NGHỊ	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO	67

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Hình ảnh bệnh than thể da	5
Hình 1.2: Manh tràng của bệnh nhân nhiễm than đường tiêu hóa.....	6
Hình 1.3: Phổi bị nhiễm bệnh than	7
Hình 1.4: Não của người bị nhiễm bệnh	8
Hình 1.5: Hình thái tế bào (A) và bào tử (B) của vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	10
Hình 1.6: Nhân tố gây chết EF.....	13
Hình 1.7: Nhân tố gây chết LF.....	14
Hình 1.8: Cấu trúc đơn phân kháng nguyên bảo vệ PA.....	18
Hình 1.9: Cấu trúc vòng heptam của kháng nguyên bảo vệ PA	20
Hình 1.10: Cơ chế dẫn truyền độc tố của kháng nguyên bảo vệ PA	20
Hình 1.11: Vector biểu hiện	23
Hình 1.12: Sơ đồ cấu trúc và vị trí cắt giới hạn của vector pET-28a(+)......	25
Hình 2.1: Mô hình phản ứng Western blot	44
Hình 3.1. Điện di DNA tổng số trên gel 0,8% agarose.....	46
Hình 3.2. Điện di sản phẩm PCR của gen <i>pagA</i> trên gel 0,8% agarose	46
Hình 3.3. Khuẩn lạc <i>E. coli</i> DH5 α trên môi trường LBA chứa X - gal và ampicillin	47
Hình 3.4. Điện di DNA plasmid từ các dòng khuẩn lạc xanh và trắng trên gel 0,8 % agarose	48
Hình 3.5. Điện di sản phẩm cắt bằng <i>EcoRI</i> trên gel 1,5% agarose	49
Hình 3.6. Điện di sản phẩm cắt DNA plasmid tách chiết từ các khuẩn lạc trắng dòng 1, 10 bằng enzyme BamHI và XhoI trên gel 1 % agarose	50
Hình 3.7. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>pagA</i> với cặp mồi BA1 và BA2 từ các dòng khuẩn lạc 1,2 trên gel 0,8% agarose.....	51
Hình 3.8. So sánh trình tự gen <i>pagA</i> của chủng <i>B. anthracis</i> VCM1167 với	

các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế	52
Hình 3.9. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pET-TRX-FUS-pagA	54
Hình 3.10. Điện di sau khi thôi gel trên gel 1% agarose	55
Hình 3.11. Khuẩn lạc của <i>E. coli</i> DH5 α trên môi trường LBA	55
Hình 3.12. Điện di plasmid từ các khuẩn lạc <i>E. coli</i> DH5a trên gel 1 % agarose	56
Hình 3.13. Điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp trên gel 1 % agarose	56
Hình 3.14. Điện di sản phẩm PCR trên gel 1 % agarose	57
Hình 3.15. Trình tự acid amin của protein kháng nguyên bảo vệ trên lý thuyết...	58
Hình 3.16. Khuẩn lạc của vi khuẩn <i>E. coli</i> chủng BL21 trên môi trường LBA ..	58
Hình 3.17. Điện di sự biểu hiện protein PA trên gel 12,6 % polyacrylamide	59
Hình 3.18. Điện di protein tái tổ hợp PA theo nhiệt độ trên gel 12,6 % polyacrylamide	60
Hình 3.19. Điện di biểu hiện protein tái tổ hợp PA theo nồng độ IPTG	61
Hình 3.20. Điện di mẫu protein PA theo thời gian trên gel 12,6 % polyacrylamide	62
Hình 3.21. Điện di protein tan và không tan trên gel 12,6 % polyacrylamide	63
Hình 3.22. Điện di protein sau khi tinh sạch trên gel 12,6 % polyacrylamide	64
Hình 3.22a. Phản ứng của protein tái tổ hợp PA gắn Thioredoxin với kháng thể kháng Thioredoxin trên màng lai PVDF	65
Hình 3.22b. Phản ứng của protein tái tổ hợp PA gắn Thioredoxin với kháng thể kháng PA trên màng lai PVDF	65
Hình 3.22c. Phản ứng western blot giữa protein tái tổ hợp PA với kháng thể kháng PA tự nhiên	65

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh than là một căn bệnh nhiễm khuẩn cấp tính do vi khuẩn *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) gây ra cho gia súc, đặc biệt là cho các động vật ăn cỏ như trâu, bò, dê cừu ngựa... Bệnh than có khả năng lây nhiễm sang người thành dịch với tỷ lệ tử vong cao. Bệnh có nhiều dạng biểu hiện khác nhau tùy theo cách tiếp xúc với bệnh, nhưng nhìn chung, bệnh than bao gồm 4 dạng: than thể da, than thể hô hấp, than thể tiêu hoá và than thể màng não.

Bệnh than là một căn bệnh vô cùng nguy hiểm. Nó mang một số đặc điểm được trung tâm kiểm soát và ngừa bệnh Hoa Kỳ dùng để nhận biết các trường hợp có thể làm vũ khí sinh học như thời gian lây nhiễm nhanh, tỷ lệ gây chết cao, tác nhân gây bệnh có thể chống chịu được với điều kiện khắc nghiệt. Chính vì vậy, việc nghiên cứu phát hiện, chẩn đoán bệnh than và tác nhân gây bệnh than là rất quan trọng

Kháng nguyên tái tổ hợp Protective Antigen (PA) là một trong 3 loại độc tố than của vi khuẩn *Bacillus anthracis*. PA là nhân tố quyết định tính độc của vi khuẩn than. Bản thân PA không gây độc nhưng khi kết hợp với nhân tố gây chết Lethal Factor (LF) hay nhân tố gây phù thũng Edema Factor (EF) lại sinh sản độc tố gây chết hoặc phù thũng cho tế bào vật chủ. Ngoài ra, PA còn có chứa vùng liên kết thụ thể và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống bệnh than. Chính vì vậy, hiện nay có nhiều nghiên cứu sử dụng kháng nguyên bảo vệ PA để tạo protein tái tổ hợp làm nguyên liệu để tạo kit chuẩn đoán bệnh than cũng như tạo vaccine phòng chống bệnh than.

Xuất phát từ tính cấp thiết chúng tôi tiến hành đề tài: “ **Nghiên cứu biểu hiện gen *pagA* mã hóa kháng nguyên bảo vệ PA của vi khuẩn *Bacillus anthracis* trong vi khuẩn *E. coli* BL21** ”.

Mục tiêu của đề tài:

1. Biểu hiện Protein PA của vi khuẩn *Bacillus anthracis* trong vi khuẩn *E. coli* BL21,

2. Thu nhận kháng nguyên bảo vệ PA tái tổ hợp phục vụ các nghiên cứu chuyên sâu.

Nhiệm vụ của đề tài:

1. Tách dòng và giải trình tự gen *pagA* mã hóa kháng nguyên bảo vệ PA,
2. Thiết kế vector biểu hiện pET-TRX-FUS mang gen *pagA*,
3. Nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *pagA*,
4. Nghiên cứu tìm ra điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện về nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng (IPTG), thời gian,
5. Tinh sạch được protein PA trên cột sắc ký ái lực Probond Nickel Resin,
6. Kiểm tra khả năng phản ứng của protein PA tái tổ hợp với kháng thể đặc hiệu kháng PA bằng phản ứng Western blot.