

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



**LÊ HOÀNG ĐỨC**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN CHUỖI CHẾ TẠO  
KIT PHÁT HIỆN NHANH VIRUS CÚM A/H5N1**

**CHUYÊN NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**MÃ SỐ: 60 42 01 14**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội, Tháng 11-2013**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



**LÊ HOÀNG ĐỨC**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN CHUỖI CHẾ TẠO  
KIT PHÁT HIỆN NHANH VIRUS CÚM A/H5N1**

**CHUYÊN NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**MÃ SỐ: 60 42 01 14**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**PGS. TS. CHU HOÀNG HÀ**

**Hà Nội, Tháng 11-2013**

## LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Chu Hoàng Hà – Trưởng phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Phó viện trưởng Viện Công nghệ sinh học đã định hướng nghiên cứu, đồng thời tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin được cảm ơn TS. Lê Văn Sơn, Phó trưởng phòng Công nghệ ADN ứng dụng và TS. Phạm Bích Ngọc, Phó trưởng phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới sự giúp đỡ của ThS. Hoàng Hà cùng tập thể cán bộ phòng Công nghệ Tế bào thực vật và phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học đã dành cho tôi trong suốt quá trình làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Đào tạo, Ban lãnh đạo Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật, Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, các thầy cô giáo đang công tác tại Viện Công nghệ sinh học và Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện và tận tình giảng dạy cho tôi trong suốt khóa học.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và gửi lời cảm ơn chân thành tới những người thân trong gia đình và bạn bè – những người luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

*Hà Nội, ngày      tháng      năm 2013*

**Lê Hoàng Đức**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

**Tác giả**

**Lê Hoàng Đức**

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Tổng quan về virus cúm A.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Giới thiệu về bệnh cúm .....	3
1.1.2. Cấu trúc chung của virus cúm A .....	3
1.1.3. Cấu trúc hệ gen của virus cúm A .....	4
1.1.4. Lịch sử bệnh cúm A .....	6
1.1.5. Tình hình bệnh cúm A/H5N1 trên thế giới và tại Việt Nam.....	7
1.1.6. Các phương pháp chẩn đoán virus cúm A/H5N1.....	10
<b>1.2. Kháng thể đơn chuỗi và kỹ thuật phage display .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Kháng thể .....	11
1.2.2. Kháng thể đơn chuỗi .....	12
1.2.3. Một số nghiên cứu ứng dụng của kháng thể đơn chuỗi .....	13
1.2.4. Kỹ thuật phage display.....	14
1.2.4.1. Giới thiệu chung về kỹ thuật phage display .....	14
1.2.4.2. Filamentous phage M13.....	14
1.2.4.3. Tạo thư viện phage display .....	16
<b>1.3. Kỹ thuật ngưng kết ứng dụng trong chẩn đoán .....</b>	<b>18</b>
1.3.1. Hạt latex .....	19
1.3.2. Một số nghiên cứu ứng dụng hạt latex trong chẩn đoán.....	20
<b>CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Vật liệu.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Hóa chất, thiết bị, địa điểm nghiên cứu .....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Hóa chất.....	23
2.2.2. Thiết bị máy móc.....	27
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu .....	27
<b>2.3. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>27</b>

2.3.1. Phương pháp biến nạp vào vi khuẩn <i>E. coli</i> chủng HB 2151 bằng sốc nhiệt .....	27
2.3.2. Phương pháp PCR trực tiếp (colony PCR) .....	28
2.3.5. Phương pháp tinh sạch virus cúm A/H5N1 nuôi sử dụng sắc ký ái lực .....	30
2.3.6. Phương pháp điện di trên agarose .....	31
2.3.5. Phương pháp lai Western blot .....	32
2.3.6. Phương pháp đo nồng độ protein bằng máy đo quang phổ .....	33
2.3.7. Phương pháp chế tạo bộ kit phát hiện nhanh virus cúm A/H5N1 dựa trên tính ngưng kết của hạt latex đã gắn protein lên bề mặt.....	34
<b>CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Biểu hiện và tinh sạch kháng thể đơn chuỗi VH10 .....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Tạo chủng <i>E. coli</i> HB2151 biểu hiện kháng thể VH10 tái tổ hợp .....	38
3.1.2. Tối ưu các điều kiện biểu hiện kháng thể đơn chuỗi VH10 .....	43
3.1.3. Tinh sạch kháng thể đơn chuỗi VH10.....	46
<b>3.2. Thử nghiệm tạo kit phát hiện nhanh cúm A/H5N1 theo nguyên lý ngưng kết miễn dịch.....</b>	<b>47</b>
3.2.1. Chuẩn hóa lượng kháng thể gắn lên bề mặt hạt latex .....	47
3.2.2. Xây dựng phương pháp chẩn đoán virus cúm A/H5N1 bằng phản ứng ngưng kết hạt latex .....	49
<b>3.3. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và thử nghiệm bộ kit latex .....</b>	<b>52</b>
3.3.1. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit latex .....	52
3.3.2. Đánh sự hoạt động của bộ kit latex với các mẫu thực địa .....	55
<b>CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>57</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>57</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>58</b>

## DANH MỤC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

bp	: base pair
cDNA	: Complementary DNA
DNA	: Deoxyribonucleotide acid
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDAC	: 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
Kb	: Kilo base
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria-Bertani
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
RNA	: Ribonucleotide acid
scFv	: Single-chain variable fragment
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TBS	: Tris Buffered Saline
TEMED	: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
WHO	: World Health Organization

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> (A) Các dạng hình thái của virus cúm A được nhuộm âm tính trên kính hiển vi điện từ truyền qua. (B) Cấu trúc của virus cúm A.....	4
<b>Hình 1.2.</b> Các vật chủ tự nhiên và khả năng lây nhiễm giữa các loài vật chủ của virus cúm A .....	6
<b>Hình 1.3.</b> Sơ đồ các chuỗi của một kháng thể .....	11
<b>Hình 1.4.</b> Các protein cấu thành virion của M13 .....	15
<b>Hình 1.5.</b> Chu kỳ sống của phage M13 trong <i>E. coli</i> .....	15
<b>Hình 2.1.</b> Sơ đồ vector pTI2+/VH10 .....	21
<b>Hình 2.2.</b> Quy trình gắn protein lên bề mặt hạt latex .....	33
<b>Hình 3.1.</b> Kết quả biến nạp vào tế bào <i>E.coli</i> HB 2151 .....	38
<b>Hình 3.2.</b> Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR dùng môi đặc hiệu (pTI-NcoI-F và pTI-NotI-R) từ dòng khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc.....	38
<b>Hình 3.3.</b> Hình ảnh điện di protein tổng số của tế bào <i>E. coli</i> HB2151 mang gen mã hóa cho các cấu trúc kháng thể đơn chuỗi VH10 .....	40
<b>Hình 3.4.</b> Kết quả lai Western blot kiểm tra protein tổng số của tế bào <i>E. coli</i> HB2151 mang vector pTI2+/VH10 với kháng thể anti polyhistidin. ....	41
<b>Hình 3.5.</b> Hình ảnh điện di protein VH10 được biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau. ....	42
<b>Hình 3.6.</b> Hình ảnh điện di protein VH10 được cảm ứng biểu hiện ở các nồng độ IPTG khác nhau.....	43
<b>Hình 3.7.</b> Hình ảnh điện di protein VH10 được cảm ứng biểu hiện ở các thời gian khác nhau .....	44
<b>Hình 3.8.</b> Hình ảnh điện di kiểm tra tính tan của protein VH10 .....	45
<b>Hình 3.9.</b> Hình ảnh điện di protein VH10 sau khi tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực His-tag. ..	45
<b>Hình 3.10.</b> Phản ứng ngưng kết giữa kháng nguyên H5 với hạt latex được gắn với 100, 200 và 400 $\mu$ g kháng thể đơn chuỗi VH10. ....	46
<b>Hình 3.11.</b> Mô hình kiểm tra tính ngưng kết của hạt latex đã gắn protein lên bề mặt.....	48
<b>Hình 3.12.</b> Kết quả phản ứng ngưng kết soi dưới kính hiển vi có độ phóng đại 10 $\times$ 10. ....	49
<b>Hình 3.13.</b> Hình ảnh bộ kit latex chẩn đoán virus cúm gia cầm H5N1.....	50



## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> Thống kê số lượng người bị nhiễm và chết do cúm A/H5N1 từ năm 2003-2013....	8
<b>Bảng 2.1.</b> Danh sách các mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu .....	22
<b>Bảng 2.2.</b> Thành phần phản ứng colony PCR.....	23
<b>Bảng 2.3.</b> Công thức pha gel cô và gel tách.....	25
<b>Bảng 2.4.</b> Công thức tính độ nhạy và độ đặc hiệu .....	33
<b>Bảng 3.1.</b> Kết quả thử nghiệm bộ kit latex với các mẫu nước trứng .....	50
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit latex.....	52
<b>Bảng 3.3.</b> Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ngưng kết hồng cầu .....	52
<b>Bảng 3.4.</b> Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu với kháng nguyên H5 của bộ kit latex .....	53
<b>Bảng 3.5.</b> Kết quả thử nghiệm bộ kit latex phát hiện virus cúm A/H5N1 với các mẫu thực địa .....	54

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúm gia cầm (Avian influenza) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính ở mọi loài chim, kể cả gia cầm và thủy cầm, do các phân type (subtype) của nhóm virus cúm A (Influenza virus A) thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây nên. Virus cúm A được chia thành các phân nhóm dựa trên hai glycoprotein bề mặt là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). HA được chia thành 16 phân nhóm (từ H1 đến H16) và NA được chia thành 9 phân nhóm (từ N1 đến N9). Trong số 16 phân nhóm của virus cúm A, các chủng trong phân nhóm H5 và H7 có thể gây ra thể cúm gia cầm độc lực cao, có khả năng lây lan mạnh, tử vong nhanh ở những loài lông vũ cảm nhiễm. Hầu hết các virus cúm gia cầm có ảnh hưởng đến người thường gây ra các triệu chứng đường hô hấp nhẹ hoặc viêm kết mạc mắt, trừ một ngoại lệ là chủng H5N1. Virus cúm A/H5N1 là thể độc lực cao (HPAI, highly pathogenic avian influenza) gây bệnh nặng với tỷ lệ tử vong cao ở người trong các vụ dịch diễn ra vào năm 1997 và năm 2003.

Theo số liệu của Tổ chức y tế thế giới (WHO), từ năm 2003 đến tháng 6 năm 2013 đã có 375 người tử vong do cúm gia cầm trong số 630 ca nhiễm H5N1 tại 15 nước. Tại Việt Nam, dịch cúm gia cầm do virus cúm A/H5N1 bắt đầu xuất hiện từ những tháng cuối năm 2003, đã có 62 ca tử vong trong số 125 người nhiễm cúm gia cầm. Đồng thời, bệnh cúm gia cầm cũng là nguyên nhân làm hàng chục triệu con gia cầm bị chết hoặc bị tiêu hủy gây thiệt hại kinh tế nặng nề cho ngành chăn nuôi.

Hệ gen của virus cúm A/H5N1 có cấu trúc đặc trưng của hệ gen virus cúm A là RNA sợi đơn âm (ss(-)RNA) có độ dài tổng số khoảng 13.500 ribonucleotide, bao gồm 8 phân đoạn gen riêng biệt mã hóa cho 11 protein khác nhau của virus. Trong đó, tên gọi của virus H5N1 dựa trên 2 protein quyết định tính kháng nguyên là hemagglutinin nhóm 5 (H5) và neuraminidase nhóm 1 (N1).