

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

**NGUYỄN THỊ THU HIỀN**

**NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA  
KHÁNG NGUYÊN BÈ MẶT CỦA TIÊN MAO TRÙNG  
(TRYPANOSOMA EVANSI) LƯU HÀNH Ở VIỆT NAM**

**TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ THÚ Y**

**Chuyên ngành: Thú y**

**Mã số: 60.64.01.01**

Người hướng dẫn khoa học: **1. GS.TS Nguyễn Thị Kim Lan**  
**2. TS Phạm Thị Tâm**

Thái Nguyên, năm 2013

**Công trình được hoàn thành tại:  
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC - VIỆN ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học : **1. GS.TS Nguyễn Thị Kim Lan**  
**2. TS Phạm Thị Tâm**

Phản biện 1: PGS.TS Đặng Xuân Bình

Phản biện 2: TS. Phan Hồng Phúc

Luận văn sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận văn họp tại:

*Vào hồi..... giờ..... ngày..... tháng..... năm 2013*

Có thể tìm hiểu luận văn tại trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên

Và thư viện Trường/Khoa:.....

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu này là của chúng tôi.

Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này mà tôi sử dụng chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

**Tác giả luận văn**

**Nguyễn Thị Thu Hiền**

## LỜI CẢM ƠN

Trong thời gian thực hiện đề tài, ngoài sự nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, hướng dẫn tận tình của các thầy giáo, cô giáo, các tập thể, cá nhân, bạn bè đồng nghiệp trong và ngoài trường.

Nhân dịp hoàn thành luận văn Thạc sĩ khoa học nông nghiệp chuyên ngành Thú y tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Nguyễn Thị Kim Lan. Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên và TS. Phạm Thị Tâm, khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội, đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình chỉ bảo, tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin trân trọng cảm ơn:

- Các thầy cô giáo trong Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên đã giúp tôi hoàn thành khóa học và nâng cao chất lượng luận văn.
- Phòng quản lý đào tạo sau đại học đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập tại trường.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến những người thân, gia đình đã động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

***Xin trân trọng cảm ơn!***

*Thái Nguyên, tháng 08 năm 2013*

**Tác giả luận văn**

***Nguyễn Thị Thu Hiền***

## Mục lục

	Trang
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Mục tiêu của đề tài.....	2
3. Điểm mới của đề tài.....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	3
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	4
1.1. TIÊN MAO TRÙNG VÀ BỆNH TIÊN MAO TRÙNG Ở GIA SÚC .....	4
1.1.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc và phân loại tiên mao trùng .....	4
1.1.2. Dịch tễ học bệnh tiên mao trùng.....	8
1.1.3. Đặc điểm bệnh lý và lâm sàng của bệnh .....	10
1.1.4. Chẩn đoán bệnh tiên mao trùng .....	13
1.1.5. Phương pháp phát hiện ADN của tiên mao trùng bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	19
1.1.6. Phòng trị bệnh tiên mao trùng cho trâu, bò, ngựa .....	19
1.2. VECTOR TÁCH DÒNG.....	22
1.2.1. Khái niệm .....	22
1.2.2. Các loại vector tách dòng .....	23
1.2.3. Plasmid pCR 2.1 .....	24
1.3. VECTOR BIỂU HIỆN .....	27
1.3.1. Khái niệm .....	27
1.3.2. Các hệ thống biểu hiện gen .....	27
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	30
2.1. VẬT LIỆU .....	30
2.1.1. Sinh phẩm trong nghiên cứu.....	30
2.1.2. Hóa chất và môi trường .....	30
2.1.3. Thiết bị.....	33

2.1.4. Cặp môi dùng trong nghiên cứu. ....	34
2.2. ĐỊA ĐIỂM, THỜI GIAN NGHIÊN CỨU .....	34
2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU.....	34
2.3.1. Nghiên cứu các điều kiện tách dòng gen mã hóa kháng nguyên bề mặt của <i>Trypanosoma evansi</i> .....	34
2.3.2. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên bề mặt của <i>Trypanosoma evansi</i> .....	34
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	35
2.4.1. Sơ đồ nghiên cứu .....	35
2.4.2. Tách chiết ADN tổng số .....	35
2.4.3 Kiểm tra ADN hệ gen bằng máy đo quang phổ. ....	36
2.4.4 Khuếch đại đoạn gen mã hóa kháng nguyên RoTAT 1.2 bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction). ....	37
2.4.5 Phương pháp điện di trên gel agarose.....	38
2.4.6 Tạo dòng gene mã hóa kháng nguyên RoTAT 1.2 .....	39
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	47
3.1. Tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng nguyên RoTAT 1.2 .....	47
3.2 Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên RoTAT 1.2 .....	57
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</b> .....	64
1. Kết luận.....	64
2. Đề nghị .....	65
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	66

**CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU**

ADN	Acid deoxyribonucleic
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
cDNA	DNA bổ xung (complementary DNA)
dNTP	Deoxynucleotid triphotphat
ddNTP	Dideoxynucleotid triphotphat
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetic
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test
IPTG	Isopropyl $\beta$ – D – thiogalactoside
MCS	Multi clonding site
PBS	Phosphat Buffered Saline
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS – PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Poly Acrylamide
TEA	Tris – axit acetic - EDTA
VAT	Variant Antigen Tupe
VSG	Variant Surface Glucoprotein

## DANH MỤC BẢNG BIỂU

	Trang
Bảng 3.1. Thành phần và điều kiện phản ứng PCR sàng lọc khuẩn lạc mang đoạn chèn RoTAT 1.2 .....	52
Bảng 3.2. Thành phần và điều kiện phản ứng giải trình tự gen .....	54
Bảng 3.3. Tổng hợp mức độ tương đồng của gen RoTAT 1.2 của các chủng <i>T.evansi</i> phân lập với các trình tự của NCBI .....	56
Bảng 3.4. Thành phần và điều kiện cho phản ứng cắt sản phẩm PCR chứa gen RoTAT 1.2/ pET32a (+) bằng enzyme <i>Bam</i> HI .....	59
Bảng 3.5. Thành phần và điều kiện cho phản ứng cắt sản phẩm PCR chứa gen RoTAT 1.2/ pET32a (+) bằng enzyme <i>Xho</i> I.....	59
Bảng 3.6. Thành phần và điều kiện phản ứng nối gen.....	59

## DANH MỤC HÌNH VẼ

	Trang
Hình 1.1. Vector tách dòng pCR 2.1 .....	25
Hình 1.2. Sơ đồ thiết kế vector tái tổ hợp pJET1.2-RoTAT 1.2 .....	26
Hình 3.1. Hình ảnh ký sinh trùng trong máu chuột bạch .....	47
Hình 3.2. Kết quả tách chiết ADN tổng số .....	48
Hình 3.3. Kết quả sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% .....	49
Hình 3.4. Kết quả biến nạp gen RoTAT 1.2 vào vi khuẩn <i>E.coli</i> DH10b .....	51
Hình 3.5. Kết quả tách chiết ADN plasmid .....	51
Hình 3.6. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng PCR với cặp mồi F1.2 /R1.2 .....	53
Hình 3.7. So sánh trình tự gen RoTAT 1.2 của chủng <i>T.evansi</i> HB với trình tự GeneBank .....	54
Hình 3.8 So sánh trình tự gen RoTAT 1.2 của chủng <i>T.evansi</i> LS với trình tự GeneBank .....	55
Hình 3.9. So sánh trình tự gen RoTAT 1.2 của chủng <i>T.evansi</i> TN với trình tự GeneBank .....	55
Hình 3.11. Hình ảnh điện di gen RoTAT 1.2 cắt bằng các anzyme giới hạn Bam HI và Xho I .....	58
Hình 3.12. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme Bam HI và Xho I .....	60
Hình 3.13 Sơ đồ cấu trúc của vector pET 32a(+) .....	61
Hình 3.14 Kết quả điện di protein tái tổ hợp RoTAT 1.2 trên gel SDS-PAGE.....	62
Hình 3.15 Kết quả Western blot giữa protein tái tổ hợp RoTAT 1.2 với kháng thể kháng 6xHis .....	63
Hình 3.16 Kết quả Western blot giữa protein tái tổ hợp RoTAT 1.2 với kháng thể kháng <i>T.evansi</i> .....	63

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh do *Trypanosoma* (*Trypanosomiasis*) là bệnh truyền lây giữa người và gia súc do ký sinh trùng đơn bào (*Protozoa*) lớp trùng roi (*Flagellata*) gây ra. Có nhiều loài thuộc giống *Trypanosoma*, như: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma vavax*, *Trypanosoma siminae*...

Bệnh tiên mao trùng do *Trypanosoma evansi* thấy ở những loài động vật, trong đó trâu, bò là các động vật khá mẫn cảm với động vật đơn bào này. Trâu, bò mắc bệnh thể cấp tính thường sốt cao 41 – 41,7<sup>0</sup>C với các triệu chứng thần kinh như ngã quy, kêu rống, đi vòng tròn, thủy thũng ở hầu, ức, nách, chân, háng. Trường hợp bệnh nặng, con vật đột ngột sốt cao, bụng chướng to rồi lăn ra chết.

Trâu, bò mắc bệnh ở thể cấp tính có thể chết sau 7 – 15 ngày. Ở thể mãn tính, triệu chứng lâm sàng nhẹ hơn và bệnh kéo dài 1 – 2 tháng, con vật ngày càng gầy, da khô mốc, niêm mạc mắt tụ máu màu đỏ tía, đôi khi có chấm máu, chảy nước mắt và mắt có nhiều dử đặc như keo, niêm mạc mắt vàng nhạt hay sẫm. Sức khỏe trâu, bò suy yếu dần, kém ăn, kém nhai lại, đi phân táo có lẫn máu hoặc đi tháo phân lỏng, mùi thối khắm, có khi con vật ỉa ra cả màng ruột, nát từng đoạn.

Theo số liệu của Phạm Sỹ Lăng (1982), Phan Địch Lâm và cs (2004), Phan Văn Chinh (2006), bệnh tiên mao trùng xuất hiện ở nhiều vùng trên cả nước, với tỷ lệ mắc khá cao: trên trâu là 13 – 30%, trên bò là 7 – 14%, trong đó tỷ lệ gia súc chết/gia súc mắc lên tới 6,3 – 20%.

Cũng theo báo cáo của các tác giả trên, tỷ lệ mắc *Trypanosoma evansi* ở gia súc vùng núi và trung du cao hơn các vùng đồng bằng và ven biển. Trong khi đó, ở nước ta, chăn nuôi gia súc nhai lại để cung cấp sức kéo, thịt, sữa lại tập trung chủ yếu ở các tỉnh miền núi và trung du là các vùng có điều kiện tự nhiên thích hợp cho sự phát triển chăn nuôi gia súc nhai lại, nhưng cơ sở hạ tầng phục vụ công tác chẩn đoán và điều trị tại địa phương còn yếu kém; dẫn tới hệ quả là bệnh tiên mao trùng trở nên phổ biến hơn, nghiêm trọng hơn và gây thiệt hại lớn hơn.