

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS. TS Lê Quang Huân và PGS. TS Nguyễn Bích Nhi. Các số liệu trình bày trong luận án là trung thực.

Một số kết quả đã được công bố riêng hoặc đồng tác giả, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận án này!

Thái Nguyên, ngày 05 tháng 03 năm 2014

Nghiên cứu sinh

Hoàng Phú Hiệp

LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới PGS. TS Lê Quang Huân, PGS. TS Nguyễn Bích Nhi đã hướng dẫn, chỉ bảo tận tình ngay từ những bước đi đầu tiên và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ, dạy bảo tận tình của các anh chị và các em trong Phòng Công nghệ Tế bào Động vật – Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu thực hiện đề tài luận án.

Tôi xin cảm ơn Bộ môn Di truyền và SHHD, Khoa Sinh-KTNN, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè tôi đã tạo mọi điều kiện và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!!!

Thái Nguyên, ngày 05 tháng 03 năm 2014

Nghiên cứu sinh

Hoàng Phú Hiệp

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. VI KHUẨN <i>E. COLI</i> O157:H7.....	3
1.1.1. Đặc điểm chung của chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	3
1.1.2. Độc tố Shiga-like toxin: Bản chất và tác hại.....	7
1.1.3. Nguyên nhân và diễn biến khi ngộ độc	11
1.1.4. Tình hình ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn ở Việt Nam.....	13
1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN <i>E. COLI</i> O157:H7	14
1.2.1. Phương pháp PCR dựa trên DNA	14
1.2.2. Kỹ thuật LAMP	18
1.2.3. Sử dụng kháng thể tái tổ hợp trong phát hiện <i>E. coli</i> O157:H7	19
1.3. KHÁNG THỂ.....	23
1.3.1. Mảnh kháng thể	25
1.3.2. Kháng thể tái tổ hợp	26
1.3.3. Kỹ thuật phage display	27
1.3.4. Tình hình nghiên cứu sử dụng kháng thể ở Việt Nam.....	32
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Vật liệu nghiên cứu	35
2.1.1. Sinh phẩm.....	35

2.1.2. Hóa chất.....	35
2.1.3. Các cặp môi được sử dụng	36
2.2. Thiết bị	36
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	37
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu DNA	37
2.3.2. Kỹ thuật bộc lộ trên thực khuẩn thể (phage display)	43
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu protein	45
2.3.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu	51
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	52
Sơ đồ nghiên cứu của luận án:	52
3.1. XÁC ĐỊNH VI KHUẨN <i>E. COLI</i> O157:H7 BẰNG KỸ THUẬT GEN	52
3.1.1. Xác định chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7 bằng kỹ thuật phân tích gen mã hóa 16S rRNA	52
3.1.2. Sử dụng đoạn gen <i>Stx1</i> và <i>Stx2</i> để xác định <i>E. coli</i> O157:H7	58
3.1.3. Sử dụng kỹ thuật LAMP xác định vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	63
3.2. NGHIÊN CỨU THU NHẬN KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU ĐỐI VỚI VI KHUẨN <i>E. COLI</i> O157:H7 VÀ TÁCH DÒNG XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA KHÁNG THỂ	69
3.2.1. Sàng lọc kháng thể từ thư viện Griffin.1.....	70
3.2.2. Chọn dòng phage kháng thể đặc hiệu với vi khuẩn <i>E. coli</i> O157: H7.....	72
3.2.3. Nhân bản gen mã hóa kháng thể bằng PCR.....	74
3.2.4. Giải trình tự gen mã hoá kháng thể	75
3.3. TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP	79
3.3.1. Tạo dòng gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp	79
3.3.2. Thiết kế vector pET28a-TRX biểu hiện gen mã hóa kháng thể.....	80

3.3.3. Biểu hiện gen kháng thể tái tổ hợp.....	82
3.3.4. Tối ưu hoá các điều kiện biểu hiện gen mã hóa kháng thể	83
3.4. TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH CỦA KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP	85
3.4.1. Kiểm tra độ hòa tan và tinh sạch kháng thể tái tổ hợp.....	85
3.4.2. Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng các phương pháp lai blot.....	88
3.4.3. Kiểm tra hoạt tính của kháng thể tái tổ hợp bằng ELISA	90
3.4.4. Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng gắn hạt nano.....	91
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	93
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN	94
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	95
PHỤ LỤC.....	108

THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu	Tên đầy đủ
1	Amp	Ampicillin
2	bp	Base pair
3	CDC	Centers for Disease Control and Prevention- Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống Dịch bệnh Mỹ
4	CDR	Complementarity Determining Region- Vùng quyết định tính bổ trợ
5	Cfu	Colony forming unit
6	ddNTP	Dideoxynucleotide
7	DNA	Deoxyribonucleic Acid
8	dNTP	Deoxynucleotide
9	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
10	EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
11	EHEC	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> - <i>E. coli</i> gây xuất huyết ruột
12	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
13	EtBr	Ethidium Bromide
14	FDA	Food and Drug Administration
15	HRP	Horseradish peroxidase
16	HC	Hemorrhagic Colitis- Viêm đại tràng xuất huyết
17	HUS	Hemolytic Uremic Syndrome- Hội chứng dung huyết và suy thận
18	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
19	Kana	Kanamycin
20	Kb	Kilo base pair
21	kDa	Kilo Dalton
22	LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
23	LB	Lauria Bertani
24	mAb	Monoclonal antibody- kháng thể đơn dòng
25	OD	Optical Density
26	PBS	Phosphate buffer saline
27	PCR	Polymerase Chain Reaction
28	PEG	Polyethylene Glycol
29	rRNA	Ribosomal RNA
30	SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
31	SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamide gel electrophoresis
32	STEC	Shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i>
33	TAE	Tris - Acetate – EDTA
34	TE	Tris – EDTA
35	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethyl ethylenediamine
36	v/p	Vòng/phút
37	V _H	Variable heavy - Vùng biến đổi chuỗi nặng
38	V _L	Variable light - Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

DANH MỤC BẢNG

Số hiệu bảng	Tên bảng	Trang
1.1	Các thông số hệ gen của vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	06
1.2	Đặc điểm của các mảnh kháng thể	26
2.1	Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu	36
2.2	Thành phần phản ứng PCR	39
2.3	Thành phần phản ứng xử lý DNA bằng enzyme giới hạn	40
2.4	Thành phần phản ứng nối ghép	40
2.5	Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng LAMP	42
2.6	Thành phần gel polyacrylamide	46
3.1	Kết quả so sánh trình tự gen HQ658163 với các trình tự gen 16S rRNA từ GenBank	56
3.2	Kết quả so sánh trình tự gen <i>Stx1</i> với các trình tự gen <i>Stx1</i> từ GenBank	61
3.3	Kết quả so sánh trình tự gen <i>Stx2</i> với các trình tự gen <i>Stx2</i> từ GenBank	62
3.4	Kết quả của phản ứng ELISA xác định độ nhạy của kháng thể tái tổ hợp và kháng thể chuẩn	90

DANH MỤC HÌNH

Số hiệu hình	Tên hình	Trang
1.1	Hình ảnh vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7 trên kính hiển vi điện tử	03
1.2	Hình ảnh vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7 trên môi trường có MUG	04
1.3	Bản đồ hệ gen (genome) của vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	05
1.4	Cấu trúc độc tố Shiga-like toxin	07
1.5	Nguyên lý gây chết tế bào của Shiga-like toxin	08
1.6	Nguyên lý gây bệnh của <i>E. coli</i> O157:H7	12
1.7	Cấu trúc chung của một số loại kháng thể	24
1.8	Sơ đồ cấu tạo của mảnh kháng thể đơn chuỗi	25
3.1	Sơ đồ bố trí thí nghiệm của luận án	52
3.2	Hình ảnh điện di tách DNA tổng số của vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	53
3.3	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa 16S rRNA	53
3.4	Hình ảnh điện di kiểm tra kết quả tách chiết DNA plasmid	54
3.5	Hình ảnh điện di kiểm tra DNA plasmid bằng enzyme giới hạn <i>Bam</i> HI	55
3.6	Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ giữa <i>E. coli</i> O157:H7 với chủng khác được xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự gen 16S RNA của chủng <i>E. coli</i> O157:H7 nghiên cứu (mã số HQ658163) và các chủng khác trên Ngân hàng Gen Quốc tế	57
3.7	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>Stx1</i> và <i>Stx2</i>	58
3.8	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>Stx1</i> với cặp mồi vector pJET	59
3.9	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>Stx2</i> với cặp mồi vector pJET	60
3.10	Vị trí và trình tự cặp mồi FIP/BIP	64
3.11	Hình ảnh điện di tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn	64
3.12	Hình ảnh điện di sản phẩm phản ứng LAMP	65
3.13	Hình ảnh điện di sản phẩm LAMP xác định hàm lượng DNA	66
3.14	Sản phẩm LAMP khi nhuộm bằng SYBR Green I	68
3.15	Khả năng gắn kết của hỗn hợp phage thu được sau mỗi vòng sàng lọc với dòng tế bào <i>E. coli</i> O157:H7	71
3.16	Sơ đồ nguyên lý kỹ thuật ELISA dùng trong xác định ái lực của phage với <i>E. coli</i> O157:H7	72
3.17	Kết quả của phản ứng ELISA đánh giá ái lực của hỗn hợp phage vòng	73

	sàng lọc 5	
3.18	Kết quả đánh giá ái lực của dòng phage 20 với tế bào <i>E. coli</i> O157:H7 và tế bào <i>E. coli</i> ATCC 25922	74
3.19	Kết quả điện di sản phẩm PCR của dòng 20 với cặp môi LABF/LABR	75
3.20	Cấu trúc 3D kháng thể tái tổ hợp	77
3.21	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen mã hóa kháng thể	80
3.22	Thiết kế vector pET28a-TRX biểu hiện gen mã hóa kháng thể	81
3.23	Hình ảnh điện di xác định dòng biểu hiện bằng điện di SDS-PAGE	82
3.24	Hình ảnh điện di SDS-PAGE xác định nồng độ IPTG cảm ứng biểu hiện kháng thể tái tổ hợp	83
3.25	Khảo sát nhiệt độ biểu hiện của kháng thể tái tổ hợp	84
3.26	Hình ảnh điện di SDS-PAGE kiểm tra độ hòa tan của kháng thể tái tổ hợp	86
3.27	Hình ảnh kết quả điện di SDS-PAGE quá trình tinh sạch protein tái tổ hợp bằng phương pháp Hybrid	87
3.28	Hình ảnh điện di kết quả phản ứng Western blot của kháng thể tái tổ hợp với anti His-tag	88
3.29	Hình ảnh kết quả phản ứng Dot blot của kháng thể tái tổ hợp với kháng thể chuẩn mã số AB75244 (Hãng Abcam).	89
3.30	Hình ảnh phức hợp kháng thể- silica bắt với tế bào <i>E. coli</i> O157:H7	91

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ngộ độc thực phẩm xảy ra khi chúng ta sử dụng thức ăn, nước uống không được bảo quản đúng cách dẫn đến sản phẩm bị hư thối do nhiễm khuẩn hoặc hóa chất độc hại... Các nghiên cứu gần đây đã xác định một trong những nguyên nhân của nhiều trường hợp ngộ độc thức ăn là do vi khuẩn *E. coli*.

E. coli thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*, có nhiều trong tự nhiên, trong ruột của người và gia súc. Trong đường ruột, chúng hiện diện chủ yếu ở đại tràng nên còn được gọi là vi khuẩn đại tràng. *E. coli* nhiễm vào đất, nước... từ phân của động vật. Khi gặp điều kiện thuận lợi cho sự phát triển chúng sẽ gây bệnh. Đa số các chủng *E. coli* là những chủng ít độc hại, tuy nhiên cũng có vài chủng rất độc như chủng *E. coli* O157:H7 có thể tìm thấy trong ruột và trong phân của các loài gia súc, đặc biệt là trong phân bò, chất thải của bò và các sản phẩm như thịt bò, sữa bò chưa khử trùng... [49].

Các bệnh có liên quan đến *E. coli* là tiêu chảy, viêm phổi, viêm đường dẫn tiểu và một số bệnh khác. Triệu chứng bị nhiễm trùng vi khuẩn thường khác nhau, nhưng nhìn chung, bệnh nhân hay có các triệu chứng như: nôn, đau bụng, sốt, xuất huyết dưới da, tăng huyết áp, tiêu chảy thường có máu... Đại đa số bệnh nhân phục hồi sau 5 đến 7 ngày. Vì vi khuẩn *E. coli* quá phổ biến, nên hàng năm trên khắp thế giới đều có người mắc bệnh do vi khuẩn này. Các chuyên gia ước tính rằng ở Mỹ mỗi năm có khoảng 70 nghìn người mắc bệnh liên quan đến *E. coli* O157:H7 [106].

Ở Việt Nam, theo thống kê của Cục Vệ sinh An toàn Thực phẩm, năm 2010 có 175 vụ ngộ độc với 5664 người mắc, trong đó có 3978 người phải nhập viện và 51 người tử vong. Năm 2011 có 148 vụ ngộ độc, trong đó có 4700 người mắc với 3663 người phải nhập viện và 27 người tử vong. Năm 2012 có 168 vụ ngộ độc, trong đó có 5541 người mắc với 4335 người nhập viện và 34 người tử vong. Như vậy, trong ba năm liên tiếp có 491 vụ ngộ độc với 112 người tử vong. Trong năm 2013 nước ta xảy ra nhiều vụ ngộ độc nghiêm trọng nhất là những tháng cuối năm. Số liệu thống kê trong quý III năm 2013 cho thấy, trong 40 vụ ngộ độc thực phẩm thì 23 vụ do vi sinh vật gây ra. Chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được xác định lần đầu tiên ở Việt Nam