

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

HOÀNG PHÚ HIỆP

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT PHÁT HIỆN
CHỨNG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VÀ TẠO
KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP ĐẶC HIỆU

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Lê Quang Huân
2. PGS. TS. Nguyễn Bích Nhi

Thái Nguyên- 2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

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 29 tháng 09 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 29 tháng 09 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	12
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	15
1.2.1. Phương pháp PCR dựa trên ADN	15
1.2.2. Kỹ thuật LAMP	19
1.2.3. Sử dụng kháng thể tái tổ hợp trong phát hiện <i>E. coli</i> O157:H7	20
1.3. KHÁNG THỂ.....	25
1.3.1. Mảnh kháng thể	27
1.3.2. Kháng thể tái tổ hợp	28
1.3.3. Kỹ thuật biểu lộ trên phage	30
1.3.4. Tình hình nghiên cứu sử dụng kháng thể ở Việt Nam.....	35
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Vật liệu nghiên cứu	37
2.1.1. Sinh phẩm.....	37

2.1.2. Hóa chất.....	37
2.1.3. Các cặp môi được sử dụng	38
2.2. Thiết bị	38
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu ADN	39
2.3.2. Kỹ thuật bộc lộ trên thực khuẩn thể (phage display)	45
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu protein	48
2.3.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu	53
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	54
3.1. XÁC ĐỊNH VI KHUẨN <i>E. COLI</i> O157:H7 BẰNG KỸ THUẬT GEN	54
3.1.1. Xác định chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7 bằng kỹ thuật phân tích gen mã hóa 16S rARN	54
3.1.2. Sử dụng đoạn gen <i>Stx1</i> và <i>Stx2</i> để xác định <i>E. coli</i> O157:H7	60
3.1.3. Sử dụng kỹ thuật LAMP xác định vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7	66
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	72
3.2.1. Sàng lọc kháng thể từ thư viện Griffin.1.....	72
3.2.2. Chọn dòng phage kháng thể đặc hiệu với vi khuẩn <i>E. coli</i> O157: H7.....	75
3.2.3. Nhân bản gen mã hóa kháng thể bằng PCR.....	77
3.2.4. Giải trình tự gen mã hoá kháng thể.....	78
3.3. TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP	82
3.3.1. Tạo dòng gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp	82
3.3.2. Thiết kế vector pET28a-TRX biểu hiện gen mã hóa kháng thể.....	83
3.3.3. Biểu hiện gen kháng thể tái tổ hợp.....	85

3.3.4. Tối ưu hoá các điều kiện biểu hiện gen mã hóa kháng thể	86
3.4. TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH CỦA KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP	89
3.4.1. Kiểm tra độ hòa tan và tinh sạch kháng thể tái tổ hợp.....	89
3.4.2. Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng các phương pháp lai blot.....	92
3.4.3. Kiểm tra hoạt tính của kháng thể tái tổ hợp bằng ELISA	94
3.4.4. Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng gắn hạt nano.....	95
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	97
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN	98
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	99
PHỤ LỤC.....	112

THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
bp	Base pair	Cặp base
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống Dịch bệnh Mỹ
CDR	Complementarity Determining Region	Vùng quyết định tính bổ trợ
Cfu	Colony forming unit	Đơn vị khuẩn lạc
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphat	Dideoxynucleotide triphosphat
ADN	Deoxyribonucleic Acid	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphat	Deoxynucleotide triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i>	<i>E. coli</i> gây xuất huyết ruột
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
EtBr	Ethidium Bromide	Ethidium Bromide
FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
HRP	Horseradish peroxidase	Horseradish peroxidase
HC	Hemorrhagic Colitis	Xuất huyết ruột
HUS	Hemolytic Uremic Syndrome	Hội chứng dung huyết và suy thận
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
Kb	Kilo base pair	Kilo base pair
kDa	Kilo Dalton	Kilo Dalton
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification	Phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt đặc hiệu
LB	Lauria Bertani	Lauria Bertani
mAb	Monoclonal antibody	kháng thể đơn dòng
OD	Optical Density	Mật độ quang
PBS	Phosphate buffer saline	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PEG	Polyethylene Glycol	Polyethylene Glycol
rARN	Ribosomal RNA	Ribosomal RNA
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamide gel electrophoresis	SDS- Polyacrylamide gel electrophoresis
STEC	Shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i>	Shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i>
TAE	Tris - Acetate – EDTA	Tris - Acetate – EDTA
TE	Tris – EDTA	Tris – EDTA
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyl ethylenediamine	N, N, N', N' - Tetramethyl ethylenediamine
v/p		Vòng/phút
V _H	Variable heavy	Vùng biến đổi chuỗi nặng

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	27
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 ADN bằng enzyme giới hạn	41
2.4	Thành phần phản ứng nối ghép	41
2.5	Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng LAMP	43
2.6	Thành phần gel polyacrylamide	47
3.1	Kết quả so sánh trình tự gen HQ658163 với các trình tự gen 16S rARN 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	05
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	25
1.8	Sơ đồ cấu tạo của mảnh kháng thể đơn chuỗi	26
3.1	Sơ đồ các bước nghiên cứu của luận án	52
3.2	Hình ảnh điện di tách ADN 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 rARN	53
3.4	Hình ảnh điện di kiểm tra kết quả tách chiết ADN plasmid	54
3.5	Hình ảnh điện di kiểm tra ADN 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 ARN của chủng <i>E. coli</i> O157:H7 nghiên cứu (mã số HQ658163) và các chủng khác trên Ngân hàng Gen	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 ADN 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 ADN	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 độ nhạy của phage	72