

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

-----

**NGUYỄN THỊ HOÀI THU**

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP  
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) DẠNG KHÔNG ĐỘC  
TỪ ĐOẠN GEN SEB TỰ NHIÊN ĐỂ LÀM NGUYÊN LIỆU PHỤC VỤ  
CHO VIỆC CHẾ TẠO QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH ĐỘC TỐ SEB**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 12/2014**

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

**NGUYỄN THỊ HOÀI THU**

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP  
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) DẠNG KHÔNG ĐỘC  
TỪ ĐOẠN GEN SEB TỰ NHIÊN ĐỂ LÀM NGUYÊN LIỆU PHỤC VỤ  
CHO VIỆC CHẾ TẠO QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH ĐỘC TỔ SEB**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm  
Mã số : 60420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
PGS. TS. NGHIÊM NGỌC MINH

**Hà Nội – 12/2014**

## *LỜI CAM ĐOAN*

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và nhóm nghiên cứu, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Thị Hoài Thu

### ***Lời cảm ơn!***

*Để hoàn thành luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. **Nguyễn Ngọc Minh**, Phó Viện trưởng Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn, sửa luận văn và tạo mọi điều kiện hóa chất, thiết bị, cũng như kinh phí để giúp tôi thực hiện và hoàn thành luận văn này.*

*Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể Phòng Công nghệ sinh học Môi trường, Viện Công nghệ sinh học và đặc biệt là TS. **Bùi Văn Ngọc** đã chỉ bảo, giúp đỡ tận tình cho tôi trong quá trình thực nghiệm cũng như chia sẻ những kinh nghiệm chuyên môn.*

*Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo thuộc chuyên ngành Hóa sinh, các thầy cô giáo của Khoa đào tạo sau đại học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật cùng với Lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi học tập cũng như hoàn thành đề tài nghiên cứu.*

*Đề tài được thực hiện trong khuôn khổ của đề tài cấp Nhà nước KC.04.14/11-15: “Nghiên cứu chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố Staphylococcal enterotoxin B (SEB) của tụ cầu vàng” do PGS. TS. Nguyễn Ngọc Minh làm chủ nhiệm giai đoạn 2013 – 2015.*

*Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn đặc biệt tới gia đình, người thân và bạn bè đã giúp đỡ, tạo điều kiện, động viên tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn!*

*Hà nội, ngày        tháng        năm 2014*

*Học viên*

*Nguyễn Thị Hoài Thu*

## MỤC LỤC

	Trang
<b>DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....</b>	<b>i</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>v</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Ngộ độc thực phẩm do tụ cầu vàng (<i>Staphylococcus aureus</i>) .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Trên thế giới .....	3
1.1.2. Tại Việt Nam.....	6
<b>1.2. Giới thiệu về <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Phân loại.....	8
1.2.2. Hình thái, đặc điểm sinh hóa.....	8
1.2.3. Các độc tố của <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
<b>1.3. Độc tố ruột Staphylococcal enterotoxin B .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. Đặc điểm cấu trúc .....	15
1.3.2. Cơ chế gây độc .....	16
1.3.3. Những triệu chứng thường gặp .....	17
1.3.4. Các phương pháp phát hiện <i>S. aureus</i> và SEB.....	17
1.3.5. Protein tái tổ hợp SEB và tiềm năng ứng dụng.....	21
<b>1.4. Hệ biểu hiện gen .....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Hệ biểu hiện <i>E. coli</i> .....	23
1.4.2. Chủng biểu hiện <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	24
1.4.3. Vector biểu hiện pET22b(+) .....	25

<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. Vật liệu, trang thiết bị và dụng cụ nghiên cứu</b> .....	<b>26</b>
2.1.1. <i>Vật liệu</i> .....	26
2.1.2. <i>Hóa chất</i> .....	26
2.1.3. <i>Môi trường nuôi cấy</i> .....	28
2.1.4. <i>Thiết bị máy móc</i> .....	28
<b>2.2. Các phương pháp nghiên cứu</b> .....	<b>28</b>
2.2.1. <i>Tách chiết DNA tổng số</i> .....	28
2.2.2. <i>Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)</i> .....	29
2.2.3. <i>PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (Colony – PCR)</i> .....	30
2.2.4. <i>Tách dòng bằng vector pJET1.2/blunt</i> .....	30
2.2.5. <i>Xác định trình tự acid nucleic</i> .....	31
2.2.6. <i>Tạo đột biến điểm định hướng theo phương pháp Mega-primer</i> .....	31
2.2.7. <i>Phản ứng nối ghép gen</i> .....	32
2.2.8. <i>Phương pháp biến nạp DNA plasmid vào tế bào khả biến Escherichia coli</i> .....	33
2.2.9. <i>Phương pháp tách chiết DNA plasmid</i> .....	33
2.2.10. <i>Cắt plasmid bằng enzym giới hạn</i> .....	34
2.2.11. <i>Tinh sạch phân đoạn DNA</i> .....	34
2.2.12. <i>Phương pháp biểu hiện gen đích trong chủng E. coli BL21(DE3)</i> .....	35
2.2.13. <i>Phương pháp điện di DNA trên gel agarose</i> .....	35
2.2.14. <i>Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide</i> .....	36
2.2.15. <i>Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp</i> .....	37
2.2.16. <i>Phương pháp định lượng protein theo phương pháp Bradford</i> .....	38

2.2.17. Phương pháp kiểm tra độc tính của protein tái tổ hợp .....	38
2.2.18. Phương pháp Western blot .....	40
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Tách chiết DNA tổng số <i>S. aureus</i> và nhân dòng gen <i>seb</i>.....</b>	<b>42</b>
3.1.1. Tách chiết DNA tổng số <i>S. aureus</i> .....	42
3.1.2. Nhân dòng gen <i>seb</i> .....	42
3.1.3. Xác định trình tự gen <i>seb</i> .....	44
<b>3.2. Tạo đột biến điểm trên gen <i>seb</i> .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Tạo gen <i>seb</i> đột biến.....	45
3.2.2. Xác định trình tự gen <i>seb</i> đột biến.....	47
<b>3.3. Thiết kế vector biểu hiện pET22b(+) mang gen <i>seb</i> đột biến .....</b>	<b>48</b>
3.3.1. Thiết kế vector pET22(b+) mang gen <i>seb</i> đột biến .....	48
3.3.2. Giải trình tự gen <i>seb</i> đột biến trên vector biểu hiện.....	49
<b>3.4. Tối ưu các điều kiện biểu hiện gen <i>seb</i> đột biến trong tế bào <i>E. coli</i> BL21 và tinh sạch protein mtSEB .....</b>	<b>50</b>
3.4.1. Biểu hiện gen <i>seb</i> đột biến trong tế bào <i>E. coli</i> BL21 .....	50
3.4.2. Tối ưu các điều kiện biểu hiện gen <i>seb</i> đột biến .....	51
3.4.3. Tinh sạch protein tái tổ hợp mtSEB .....	55
3.4.4. Xác định hàm lượng protein mtSEB theo phương pháp Bradford .....	57
<b>3.5. Đánh giá tính kháng nguyên của protein mtSEB .....</b>	<b>58</b>
<b>3.6. Đánh giá độc tính của protein mtSEB trên động vật thử nghiệm.....</b>	<b>58</b>
3.6.1. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm 1xLD <sub>50</sub> và lô đối chứng .....	58
3.6.2. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm 3xLD <sub>50</sub> .....	60
3.6.3. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm 10xLD <sub>50</sub> .....	61

<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>63</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>63</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>64</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN .....</b>	<b>75</b>



**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT**

$\mu\text{l}$	Microliter
APS	Ammonium persulphate
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
dH <sub>2</sub> O	Nước khử ion
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotide
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetate Axit
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria - Bertani
LD <sub>50</sub>	Lethal dose, 50%
ml	Milliliter
mtSEB	Mutant SEB
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SEs	Staphylococcal enterotoxins
TAE	Tris-acetate-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
v/p	Vòng/phút
v/v	volume/volume
w/v	Weight/volume
wtSEB	Wild type SEB