

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VIỆT LINH

**PHÂN LẬP VÀ LƯU GIỮ GEN H5
CỦA HAI CHỦNG VIRUS CÚM
A/H5N1 THU NHẬN NĂM 2013 TẠI
KHÁNH HÒA – VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VIỆT LINH

**PHÂN LẬP VÀ LƯU GIỮ GEN H5
CỦA HAI CHỦNG VIRUS CÚM
A/H5N1 THU NHẬN NĂM 2013 TẠI
KHÁNH HÒA – VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

M. sè: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Bích Nga

THÁI NGUYÊN - 2014

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Thị Bích Nga – phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, PGS. TS. Lương Thị Hồng Vân – Viện Khoa học sự sống – Đại học Thái Nguyên là người thầy đã trực tiếp giúp đỡ và chỉ bảo tận tình cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận văn này.

Đặc biệt, tôi xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Lê Thanh Hòa – Trưởng phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã tạo mọi điều kiện và hướng dẫn tôi trong thời gian thực hiện đề tài.

Tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới tập thể cô, chú, anh, chị Phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ trong quá trình tiến hành thí nghiệm cũng như tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Cơ sở đào tạo Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên, Ban lãnh đạo Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên, cùng các thầy cô trong khoa Khoa học sự sống tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí đề tài cơ sở: “*Nghiên cứu đặc điểm phân tử virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 và clade 1.1 mới xuất hiện tại Việt Nam và lưu giữ gen để kiến tạo vaccin thế hệ mới*” (2012-2013) của Viện Công nghệ sinh học, do PGS. TS. Lê Thanh Hòa làm chủ nhiệm và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen về trang thiết bị .

Cuối cùng là lời cảm ơn đặc biệt, tôi xin được dành cho gia đình, người thân và bạn bè vì tình yêu thương, sự động viên và giúp đỡ hết lòng đối với tôi trong học tập cũng như trong cuộc sống.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 15 tháng 05 năm 2014

Học viên

Nguyễn Việt Linh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan toàn bộ kết quả của luận văn này do chính tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Bích Nga.

Các số liệu, kết quả đã công bố trong luận văn hoàn toàn trung thực và chính xác.

DANH MỤC CÁC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

| STT | Từ và thuật ngữ viết tắt | Nghĩa đầy đủ của từ và thuật ngữ viết tắt |
|-----|--------------------------|---|
| 1 | AI | Avian Influenza |
| 2 | WHO | Tổ chức y tế thế giới (World Trade Organization) |
| 3 | cDNA | Complementary Deoxyribonucleic |
| 4 | Ck | Chicken |
| 5 | Dal | Dalton |
| 6 | Dk | Duck |
| 7 | DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| 8 | DNA | Deoxyribonucleic acid |
| 9 | EtBr | Ethidium bromide |
| 10 | GP | Glycoprotein |
| 11 | HA | Hemagglutinin |
| 12 | HEF | Hemagglutinin esterase fusion |
| 13 | HPAI | Highly pathogenic avian influenza |
| 14 | Kb | Kilobase pair |
| 15 | LB | Luria Bertami |
| 16 | LPAI | Low pathogenic avian influenza |
| 17 | M | Matrix protein |
| 18 | MCS | Mutiple cloning site |
| 19 | MEGA | Molecular Evolutionary Gentics Analysis |
| 20 | N | Asparagin |
| 21 | NA | Neuraminidase |
| 22 | NP | Nucleoprotein |
| 23 | NS | Non-structural protein |
| 24 | ORF | Open reading frame (Khung đọc mở) |
| 25 | PA | Polymerase acidic protein |
| 26 | PB | Polymerase basic protein |
| 27 | PCR | Polymerase chain reaction |
| 28 | RNA | Ribonucleic acid |
| 29 | RNP | Ribonucleoprotein |
| 30 | RT-PCR | Reverse transcription – polymerase chain reaction |
| 31 | SHPT | Sinh học phân tử |
| 32 | NJ | Neighbour Joining |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | <i>Trang</i> |
|--|--------------|
| Bảng 1.1: Thống kê số lượng người bị nhiễm và chết do cúm gia cầm qua các năm | 4 |
| Bảng 2.1: Thành phần chuyển đổi cDNA trong nghiên cứu..... | 28 |
| Bảng 2.2: Danh sách các cặp môi sử dụng trong thu nhận gen H5 | 28 |
| Bảng 2.3: Thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt | 28 |
| Bảng 3.1: Minh họa kết quả truy cập ngân hàng Gen sử dụng trình tự nucleotide chuỗi gen H5 của 2 chủng A-Ck-VN-KH23-2013 và A- Dk-VN-KH24-2013 | 41 |
| Bảng 3.2: Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 của Việt Nam và thế giới sử dụng gen H5 xác định clade và mối quan hệ nguồn gốc phả hệ... | 43 |
| Bảng 3.3: Các vị trí nucleotide sai khác trong gen H5 giữa các chủng so sánh.... | 46 |
| Bảng 3.4: Tỷ lệ (%) tương đồng về thành phần nucleotid (trên đường chéo); acid amin (dưới đường chéo) ở gen H5 giữa các chủng H5N1 phân lập tại Việt Nam và các chủng H5N1 của thế giới..... | 51 |

DANH MỤC CÁC HÌNH

| | <i>Trang</i> |
|--|--------------|
| Hình 1.1: Mô hình và ảnh chụp các tiểu phần virus cúm A | 9 |
| Hình 1.2: Môi quan hệ lây nhiễm và thích ứng vật chủ của biến chủng virus cúm A | 13 |
| Hình 1.3: Quá trình xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A trong tế bào. | 15 |
| Hình 1.4: Mô hình cấu trúc hemagglutinin | 17 |
| Hình 1.5: Sơ đồ minh họa đột biến điểm của các phân đoạn gen virus cúm A | 21 |
| Hình 1.6: Sơ đồ minh họa hiện tượng trộn kháng nguyên của virus cúm A/H5N1 và A/H3N2 | 22 |
| Hình 2.1: Sơ đồ qui trình nghiên cứu phân tích gen H5 virus cúm A/H5N1 | 27 |
| Hình 2.2: Cấu trúc của vector pCR [®] 2.1- TOPO [®] (Invitrogen Inc.) | 30 |
| Hình 3.1: Điện di sản phẩm PCR của gen H5 trên thạch agarose 1% | 35 |
| Hình 3.2: Điện di kiểm tra sản phẩm cắt DNA plasmid tái tổ hợp mang gen H5 bằng enzyme <i>EcoRI</i> | 37 |
| Hình 3.3: Trình tự chuỗi gen H5 của chủng cúm A-Ck-VN-KH23-2013 | 39 |
| Hình 3.4: Trình tự chuỗi gen H5 của chủng cúm A-Dk-VN-KH24-2013 | 40 |
| Hình 3.5: So sánh đối chiếu trình tự amino acid gen H5 của hai chủng A-Ck-VN-KH23-2013 và A-Dk-VN-KH24-2013 với các chủng liên quan có trong Ngân hàng gen | 49 |
| Hình 3.6: Môi quan hệ nguồn gốc phả hệ giữa các chủng cúm A/H5N1 xác lập dựa trên thành phần nucleotide gen H5 | 54 |
| Hình 3.7: Môi quan hệ nguồn gốc phả hệ giữa các chủng cúm A/H5N1 dựa trên thành phần amino acid của polypeptide H5 | 55 |

MỤC LỤC

| | <i>Trang</i> |
|---|--------------|
| MỞ ĐẦU | 1 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 3 |
| 1.1. Bệnh cúm và cúm gia cầm A/H5N1 | 3 |
| 1.1.1. Lịch sử bệnh cúm gia cầm | 3 |
| 1.1.2. Bệnh cúm ở người và cúm gia cầm..... | 5 |
| 1.1.3. Tình hình bệnh cúm A/H5N1 trên thế giới và ở Việt Nam..... | 7 |
| <i>1.1.3.1. Tình hình bệnh cúm A/H5N1 trên thế giới</i> | <i>7</i> |
| <i>1.1.3.2. Tình hình dịch cúm A/H5N1 ở Việt Nam</i> | <i>7</i> |
| 1.2. Virus cúm A | 8 |
| 1.2.1. Cấu tạo chung và danh pháp | 8 |
| 1.2.2. Cấu trúc hệ gen của virus cúm A | 10 |
| <i>1.2.2.1. Cấu trúc chung hệ gen của virus cúm.....</i> | <i>10</i> |
| <i>1.2.2.2. Chức năng các phân đoạn trong hệ gen</i> | <i>11</i> |
| 1.2.3. Độc lực và tính thích ứng đa vật chủ của virus cúm A/H5N1 | 12 |
| 1.2.4. Sức đề kháng của virus | 14 |
| 1.2.5. Cơ chế xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A trong tế bào | 14 |
| 1.2.6. Phương thức lây truyền của virus cúm gia cầm A/H5N1 | 16 |
| 1.3. Cấu trúc, chức năng của gen kháng nguyên Hemagglutinin (HA/H5) | 17 |
| 1.4. Các phương thức biến đổi kháng nguyên..... | 20 |
| 1.5. Một số nghiên cứu về virus cúm A/H5N1 tại Việt Nam | 23 |
| CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 25 |
| 2.1. Nguyên liệu | 25 |
| 2.2. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất | 25 |
| 2.2.1. Dụng cụ, trang thiết bị..... | 25 |
| 2.2.2. Hóa chất | 25 |
| 2.3. Quy trình nghiên cứu | 26 |
| 2.4. Phương pháp nghiên cứu..... | 27 |
| 2.4.1. Phương pháp chuyển đổi cDNA | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.2. Phương pháp PCR | 28 |
| 2.4.3. Phương pháp điện di kiểm tra và tinh sạch sản phẩm PCR..... | 29 |
| 2.4.4. Phương pháp dòng hóa..... | 29 |
| 2.4.4.1. Nối sản phẩm PCR vào vector tách dòng | 29 |
| 2.4.4.2. Chuyển nạp sản phẩm dòng hóa vào tế bào khả biến..... | 31 |
| 2.4.4.3. Chọn lọc, nuôi cấy khuẩn lạc và tách chiết DNA tái tổ hợp..... | 31 |
| 2.4.4.4. Kiểm tra DNA tái tổ hợp | 31 |
| 2.4.5. Phương pháp giải trình tự..... | 32 |
| 2.4.6. Phương pháp xử lý số liệu sử dụng các phần mềm tin-sinh học..... | 32 |
| 2.4.6.1. Nguyên tắc chung | 32 |
| 2.4.6.2. Chương trình phân tích di truyền tiến hóa phân tử (MEGA) | 33 |
| 2.4.6.3. Chương trình so sánh và phân tích chuỗi gen GeneDoc | 34 |
| 2.4.6.4. Xử lý số liệu trong nghiên cứu | 34 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN..... | 35 |
| 3.1. Kết quả thu nhận và lưu giữ gen H5 của chủng virus cúm A/H5N1 trong vector tách dòng | 35 |
| 3.1.1. Kết quả chuyển cDNA và thực hiện PCR..... | 35 |
| 3.1.2. Kết quả dòng hóa và lưu gen trong vector tách dòng | 36 |
| 3.2. Kết quả giải trình tự gen H5..... | 38 |
| 3.3. Kết quả truy cập Ngân hàng Gen (GenBank) | 41 |
| 3.4. Kết quả so sánh, phân tích thành phần nucleotide và amino acid của gen H5 với các chuỗi đăng ký trong Ngân hàng gen | 43 |
| 3.5. Phân tích tương đồng về nucleotide và amino acid của gen H5 | 50 |
| 3.6. Phân tích mối quan hệ phả hệ và xác định kháng nguyên của hai chủng phân lập năm 2013 | 53 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ | 57 |
| KẾT LUẬN | 57 |
| KIẾN NGHỊ | 57 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 58 |

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một nước đang phát triển, phần lớn dân số sinh sống bằng ngành nghề nông nghiệp, trong đó chăn nuôi gia cầm chiếm một vị trí quan trọng. Tuy nhiên, cùng với sự gia tăng về nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm thực phẩm gia cầm an toàn thì sự xuất hiện các bệnh của gia cầm hiện nay đang là một thách thức lớn đối với ngành chăn nuôi gia cầm. Nhiều nhân tố dịch bệnh làm ảnh hưởng đến chất lượng và sản lượng thịt, nhiều đàn gia cầm, thủy cầm mắc bệnh bị tiêu hủy toàn bộ để hạn chế khả năng lây lan dịch.

Năm 2003, dịch cúm gia cầm A/H5N1 đã bùng phát ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Dịch cúm gia cầm liên tục tái phát hàng năm với tốc độ lây lan nhanh và diễn biến phức tạp tại nhiều quốc gia. Đặc biệt, chủng virus cúm A/H5N1 có khả năng gây bệnh ở người với tỉ lệ tử vong rất cao và đang trở thành mối đe dọa nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng.

Các công trình nghiên cứu về hệ gen virus cũng như về dịch tễ học dịch cúm gia cầm A/H5N1 đã cho thấy, chủng virus cúm A/H5N1 hiện đang lưu hành gây bệnh có độc lực cao, thích ứng lây nhiễm gây bệnh chủ yếu ở quần thể chim hoang dã và gia cầm, mặc dù chưa có được khả năng dễ dàng thích ứng lây nhiễm trên người, nhưng trong quá trình tiến hóa các chủng virus cúm A/H5N1 luôn có sự biến đổi hệ gen, đặc biệt là các gen kháng nguyên hemagglutinin (HA(H5)) và neuraminidase (NA(N1)), để có thể trở thành virus cúm thích ứng lây truyền ở người.

Hai protein (H5 và N1) trên bề mặt vỏ capsid của hạt virus cúm A/H5N1, có vai trò quan trọng liên quan đến khả năng xâm nhiễm, độc lực gây bệnh của virus trên vật chủ và mang đặc tính kháng nguyên đặc trưng của chủng virus. Trong đó, protein kháng nguyên H5 được mã hóa bởi phân đoạn 4, có vai trò quyết định độc lực, tính gây bệnh và khả năng thích ứng xâm nhiễm của virus ở các loài vật chủ khác nhau tại vị trí qui định trình tự các nucleotide của gen H5 ở điểm cắt protease (chuỗi nối HA1-HA2).

Sự xuất hiện và tích lũy các đột biến nucleotide trong trình tự gen H5, có thể dẫn đến sự thay đổi amino acid trong trình tự protein H5 được mã hóa, làm thay đổi