

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

HÀ ĐĂNG CHIẾN

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH
PROTEIN TÁI TỔ HỢP GLYCOPROTEIN (GP5)
CỦA VIRUS GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN HÔ
HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN (PRRSV)**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60 42 02 01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. LÊ VĂN SƠN

Thái Nguyên, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Lê Văn Sơn. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận văn

Hà Đăng Chiến

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS LÊ VĂN SƠN** đã tận tình chỉ bảo và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình triển khai, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các Thầy, Cô giáo – Các nhà khoa học đã trực tiếp giảng dạy truyền đạt những kinh nghiệm, kiến thức khoa học quý báu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy cô, đồng nghiệp và bạn bè đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn này. Tôi luôn trân trọng và biết ơn sự giúp đỡ hết mình đó.

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh, chị cán bộ nghiên cứu thuộc Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và các cán bộ của cơ sở đào tạo thuộc Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên. Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tác giả luận văn

Hà Đăng Chiến

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
bp	Base pairs	Cặp bazơ nitơ
CS		Cộng sự
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	
EtBr	Ethidium bromide	
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	
GP5	Glycoprotein 5	
IPTG	IsoPropylThio- β -Galactoside	
kb	Kilo base	
kDa	Kilodalton	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MES	2-(N-morpholino)etansulfonic acid	
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PRRS	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome	Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn
PRRSV	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus	Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn
RNA	Ribonucleic acid	
RNase	Ribonuclease	
SDS	Sodium dodecyl sulphate	

TAE	Tris-acetate-EDTA	
TBS	Tris-buffered saline	
TTBS	Tween tris-buffered saline	
v/p		Vòng/ phút
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galacto-pyranoside	

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	iv
MỤC LỤC	vi
DANH MỤC HÌNH.....	viii
DANH MỤC BẢNG	ix
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục đích nghiên cứu:	2
3.Nội dung nghiên cứu:.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về PRRS.....	4
1.1.1. Khái niệm PRRS	4
1.1.2. Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn.....	4
1.1.3. Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRSV)	10
1.2. Protein tái tổ hợp.....	15
1.2.1. Giới thiệu	15
1.2.2. Glycoprotein (GP5).....	15
1.2.3. Sản xuất protein tái tổ hợp dựa trên ORF5.....	16
1.2.4. Phương pháp nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp.....	17

1.2.5. Vector biểu hiện pET 32a(+) và chủng biểu hiện BL21	17
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1. Vật liệu.....	20
2.1.1. Nguyên liệu	20
2.1.2. Hóa chất và môi trường.....	22
2.1.3 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu	24
2.2.1. Tạo dòng gen GP5.....	24
2.2.2. Tạo vector tái tổ hợp mang gen GP5	25
2.2.3. Phương pháp biểu hiện và tinh sạch protein GP5	28
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. Tạo dòng vector mang gen mã hóa protein GP5	34
3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen mã hóa protein GP5	37
3.3. Biểu hiện và tinh sạch protein GP5 trong <i>E.coli</i>	39
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	44
1. Kết luận.....	44
2. Kiến nghị.....	44
TÀI LIỆU THAM KHẢO	45

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hệ gen của virus PRRS	13
Hình 1.2. Cấu tạo phân tử virion	15
Hình 2.1. Vector tách dòng pBT	20
Hình 2.2. Cấu trúc vector biểu hiện pET 32a(+).....	21
Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc mang plasmid pBT-GP5	35
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm colony- PCR khuẩn lạc mang gen GP5	35
Hình 3.3. Kết quả cắt kiểm tra và tinh sạch pBT-GP5.....	36
Hình 3.4. Kết quả cắt kiểm tra plasmid pET 32a(+) với enzyme cắt giới hạn	38
Hình 3.5. Kết quả cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn	39
Hình 3.6. Kết quả điện di SDS-PAGE	40
Hình 3.7. Kết quả phân tích Western blot với kháng thể anti-His-tag.....	41
Hình 3.8. Khảo sát nồng độ Imidazol để tinh sạch sản phẩm	42
Hình 3.9. Kết quả điện di kiểm tra GP5 tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA.....	44

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Tên thiết bị thí nghiệm	23
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR	24
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR	25
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng cắt pBT mang gen GP5	26
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng cắt pET 32a(+)	26
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối gen	27
Bảng 2.7. Thành phần gel điện di protein (SDS-PAGE).....	31

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS - *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*), tại Việt Nam còn gọi là bệnh “lợn tai xanh” (Blue Ear), được xem là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất trên lợn từng được ghi nhận trên thế giới và được ghi nhận lần đầu tiên tại Bắc Mỹ năm 1987 [23], do lợn mắc bệnh thường bị xung huyết ở tai, lúc đầu đỏ sẫm sau đó tím xanh. Đặc trưng của bệnh, với lợn nái, PRRS gây hậu quả nghiêm trọng như sảy thai, đẻ non, lợn con sinh ra yếu ớt, chết non, tình trạng bệnh âm ỉ gây rối loạn sinh sản như động dục kéo dài, chậm động dục trở lại. Đối với lợn đực giống, PRRS làm giảm số lượng tinh dịch, chất lượng tinh dịch kém, ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ thai và chất lượng đàn con [3]. “Lợn tai xanh” là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, do virus PRRS (PRRSV), thuộc họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales* gây ra. Bệnh lây lan nhanh và làm chết nhiều lợn nhiễm bệnh [1].

Hiện nay, PRRS đã và đang trở thành dịch ở nhiều nước trên thế giới, gây tổn thất nặng nề cho nền kinh tế. PRRS lần đầu tiên được phát hiện ở Hoa Kỳ vào năm 1987 [31], ở châu Âu (tại Đức năm 1990, tại Hà Lan năm 1991) và tại châu Á vào đầu những năm 1990. Tại Việt Nam, PRRSV được phát hiện trên đàn lợn nhập từ Mỹ năm 1997 bằng phản ứng huyết thanh học. Gần đây, từ tháng 3 năm 2007 đến nay, liên tiếp xảy ra các đợt dịch bệnh ở nhiều địa phương trong cả nước, gây thiệt hại hàng trăm tỷ đồng cho ngành chăn nuôi do phải tiêu huỷ lợn bệnh nhằm ngăn chặn nguồn virus lây nhiễm [8].

Virus PRRS có tính thích ứng rất cao đối với các đại thực bào ở phổi. Hệ gen của PRRSV là phân tử RNA sợi đơn dương, cấu trúc tương tự các khung đọc mở (open reading frame, ORF) của *Coronavirus*, gồm 7 khung đọc mở gối lên nhau, mã hóa cho 7 protein của virus gồm: GP1, GP2, GP3, GP4,