

**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

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

**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**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 12/2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

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. **Nghiêm Ngọc Minh**, Phó Viện trưởng Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa*

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

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. Nghiêm 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
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	i
DANH MỤC HÌNH.....	iii
DANH MỤC BẢNG.....	v

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Ngộ độc thực phẩm do tụ cầu vàng (<i>Staphylococcus aureus</i>)	3
1.1.1. Trên thế giới	3
1.1.2. Tại Việt Nam.....	6
1.2. Giới thiệu về <i>Staphylococcus aureus</i>	8
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
1.3. Độc tố ruột Staphylococcal enterotoxin B	15
1.3.1. Đặc điểm cấu trúc	15
1.3.2. Cơ chế gây độc	15
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
1.4. Hệ biểu hiện gen	23
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
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Vật liệu, trang thiết bị và dụng cụ nghiên cứu.....	25
2.1.1. Vật liệu.....	25
2.1.2. Hóa chất	26
2.1.3. Môi trường nuôi cấy	28
2.1.4. Thiết bị máy móc	28
2.2. Các phương pháp nghiên cứu.....	28
2.2.1. Tách chiết DNA tổng số.....	28

2.2.2. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)	29
2.2.3. PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (Colony – PCR)	30
2.2.4. Tách dòng bằng vector pJET1.2/blunt	30
2.2.5. Xác định trình tự acid nucleic	31
2.2.6. Tạo đột biến điểm định hướng theo phương pháp Mega-primer	31
2.2.7. Phản ứng nối ghép gen	32
2.2.8. Phương pháp biến nạp DNA plasmid vào tế bào khả biến <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.9. Phương pháp tách chiết DNA plasmid	33
2.2.10. Cắt plasmid bằng enzym giới hạn	34
2.2.11. Tinh sạch phân đoạn DNA	34
2.2.12. Phương pháp biểu hiện gen đích trong chủng <i>E. coli</i> BL21(DE3)	35
2.2.13. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose	35
2.2.14. Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide	36
2.2.15. Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp.....	37
2.2.16. Phương pháp định lượng protein theo phương pháp Bradford	37
2.2.17. Phương pháp kiểm tra độc tính của protein tái tổ hợp	38
2.2.18. Phương pháp Western blot	39
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	41
3.1. Tách chiết DNA tổng số <i>S. aureus</i> và nhân dòng gen <i>seb</i>.....	41
3.1.1. Tách chiết DNA tổng số <i>S. aureus</i>	41
3.1.2. Nhân dòng gen <i>seb</i>	42
3.1.3. Xác định trình tự gen <i>seb</i>	43
3.2. Tạo đột biến điểm trên gen <i>seb</i>	45
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
3.3. Thiết kế vector biểu hiện pET22b(+) mang gen <i>seb</i> đột biến	47

3.3.1. Thiết kế vector <i>pET22(b+)</i> mang gen <i>seb</i> đột biến	47
3.3.2. Giải trình tự gen <i>seb</i> đột biến trên vector biểu hiện.....	49
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	50
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	56
3.5. Đánh giá tính kháng nguyên của protein mtSEB	57
3.6. Đánh giá độc tính của protein mtSEB trên động vật thử nghiệm.....	58
3.6.1. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm $1xLD_{50}$ và lô đối chứng	58
3.6.2. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm $3xLD_{50}$	59
3.6.3. Đánh giá độc tính giữa protein wtSEB và mtSEB ở liều tiêm $10xLD_{50}$	60
KẾT LUẬN	62
KIẾN NGHỊ	62
TÀI LIỆU THAM KHẢO	63
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN	74

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

μl	Microliter
APS	Ammonium persulphate
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
dH ₂ O	Nước khử ion
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotide
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetate Axit
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria - Bertani
LD ₅₀	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

DANH MỤC HÌNH

Tên hình	Trang
Hình 1.1. Hình ảnh các vi khuẩn <i>S. aureus</i> dưới kính hiển vi điện tử	9
Hình 1.2. Các yếu tố gây bệnh của <i>S. aureus</i>	13
Hình 1.3. Cấu trúc tinh thể của protein SEB	15
Hình 1.4. Cơ chế gây độc của siêu kháng nguyên	16
Hình 3.1. Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số của chủng <i>S. aureus</i>	42
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại gen <i>seb</i> từ DNA tổng số của <i>S. aureus</i>	43
Hình 3.3. Điện di đồ plasmid mang gen <i>seb</i> được tách chiết từ thể biến nạp	43
Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm cắt pJET1.2/ <i>seb</i> bằng enzym hạn chế <i>EcoRI</i> và <i>HindIII</i> .	44
Hình 3.5. Trình tự gen <i>seb</i> của chủng <i>S. aureus</i>	44
Hình 3.6. Quy trình tạo đột biến H12Y trên gen <i>seb</i>	46
Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm PCR trên gel agarose 1 %	47
Hình 3.8. Trình tự amino acid sai khác giữa dòng đột biến (mtSEB) và dòng chưa đột biến (wtSEB)	47
Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc để chọn dòng mang plasmid tái tổ hợp pET22(b+)/mtSEB	48
Hình 3.10. Điện di đồ DNA plasmid tái tổ hợp cắt bằng enzym <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	49
Hình 3.11. So sánh trình tự nucleotide của wtSEB và mtSEB	50
Hình 3.12. Protein tổng số từ chủng tái tổ hợp <i>E. coli</i> BL21 (DE3) sau 5 giờ cảm ứng	51
Hình 3.13. Protein tổng số từ chủng <i>E. coli</i> BL21 mang gen mã hóa mtSEB được nuôi cấy cảm ứng ở các nhiệt độ khác nhau	52