HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐẬU NINH THUẬN

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) TỪ CHỦNG TỤ CẦU VÀNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ĐƯỢC PHÂN LẬP TẠI THÁI NGUYÊN

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐẬU NINH THUẬN

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) TỪ CHỦNG TỤ CẦU VÀNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ĐƯỢC PHÂN LẬP TẠI THÁI NGUYÊN

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. NGHIÊM NGỌC MINH

Thái Nguyên - 2016

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 luận văn

Đậu Ninh Thuận

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS. TS. Nghiêm Ngọc Minh** - Phó Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen, người thầy tâm huyết đã luôn giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi để tôi thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học tại phòng Công nghệ Sinh học Môi trường thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thầy luôn tận tình hướng dẫn, dành thời gian trao đổi, định hướng cũng như động viên, nhắc nhở và dìu dắt tôi trong quá trình nghiên cứu, thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến toàn thể các anh chị trong phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, đặc biệt là **ThS. Nguyễn Thị Hoài Thu** và **KS. Phạm Thùy Linh** đã luôn tạo điều kiện, giúp đỡ, chỉ bảo tận tình cho tôi trong suốt quá trình thực hiện, nghiên cứu, hoàn thành luận văn của mình.

Bên cạnh đó, tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Khoa Khoa học sự sống - Trường ĐH Khoa học - Đại học Thái Nguyên cùng với Ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu tại trường cũng như tại viện.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới gia đình và bạn bè đã động viên, giúp đỡ tôi cả về vật chất lẫn tinh thần để tôi có thể hoàn thành tốt luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2016

HỌC VIÊN

Đậu Ninh Thuận

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT v
DANH MỤC HÌNH vii
DANH MỤC BẢNG viii
MỞ ĐẦU 1
Chương I TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Tình hình ngộ độc thực phẩm do *Staphylococcus aureus* và độc tố ruột SEB trên thế giới và tại Việt Nam *3*
1.1.1. Khái quát tình hình ngộ độc thực phẩm *3*
1.1.2. Tình hình ngộ độc thực phẩm do S. aureus và độc tố ruột SEB trên thế giới và tại Việt Nam *5*
1.2. Giới thiệu về *Staphylococcus aureus* *9*
1.2.1. Lịch sử phát hiện *9*
1.2.2. Đặc điểm phân loại *10*
1.2.3. Đặc điểm vi khuẩn học *12*
1.3. Độc tố ruột staphylococcal enterotoxin B *17*
1.3.1. Cấu trúc phân tử và cơ chế gây độc của SEB *18*
1.3.2. Gen seb *19*
1.3.3. Triển vọng ứng dụng của SEB *20*
1.4. Các kỹ thuật xác định *S. aureus* trong phòng thí nghiệm *21*
1.4.1 Các kỹ thuật thông thường xác định S. aureus *21*
1.4.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử *22*
1.4.3. Một số kỹ thuật dựa trên miễn dịch *24*
Chương II VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 27
2.1. Vật liệu, trang thiết bị và dụng cụ nghiên cứu *27*
2.1.1. Vật liệu *27*
2.1.2. Các bộ kit *27*
2.1.3. Hóa chất, máy móc và thiết bị sử dụng *27*
2.2. Phương pháp nghiên cứu *29*
2.2.1. Phương pháp tách DNA tổng số *29*
2.2.2. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) *30*
2.2.3. Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (Colony - PCR) *31*
2.2.4. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose *31*

2.2.5. Phương pháp tinh sạch sản phẩm từ gel agarose.....32
2.2.6. Phương pháp tách dòng gen seb trong vector pTZ57R/T.....32
2.2.7. Phương pháp xử lý enzym hạn chế trên gen seb và vector biểu hiện pET22b(+).....33
2.2.8. Phương pháp ghép nối gen ngoại lai vào vector pET22b(+).....37
2.2.9. Phương pháp biến nạp DNA plasmid vào tế bào khả biến E. coli.....37
Chương III KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....43
3.1. Tách chiết DNA tổng số chủng *Staphylococcus aureus*.....43
3.2. Tách dòng gen seb534.....43
3.2.1. Nhân gen seb534 từ chủng vi khuẩn Staphylococcus aureus.....43
3.2.2. Tinh sạch sản phẩm PCR.....44
3.2.3. Gắn đoạn gen đích seb534 vào vector tách dòng pTZ57R/T.....45
3.2.4. Xác định trình tự gen seb534.....46
3.3. Thiết kế vector biểu hiện pET22(b+) mang gen *seb534*.....48
3.3.1. Xử lý enzym cắt hạn chế tạo đầu cắt so le trên gen seb534 và vector pET22(b+).....48
3.3.2. Gắn đoạn gen đích seb534 vào vector biểu hiện pET22(b+).....50
3.3.3. Chọn lọc dòng tế bào chứa vector tái tổ hợp seb534/pET22(b+).....51
3.4. Tối ưu các điều kiện biểu hiện của gen seb534 trong tế bào E. coli BL21(DE3).....53
3.4.1. Biểu hiện gen seb534 trong tế bào E. coli BL21(DE3).....53
3.4.2. Tối ưu các điều kiện biểu hiện của gen seb534.....55
3.5. Tinh sạch protein tái tổ hợp SEB534.....59
KẾT LUẬN.....62
KIẾN NGHỊ.....62
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....63

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

µl	Microliter
APS	Ammonium persulphate
Bp	Base pair
dH_2O	Nước khử ion
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotide
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetace Acid
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria - Bertani
Ml	Milliliter
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SEs	Staphylococcal enterotoxins
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TE	Tris EDTA

TEMED	Tetramethylethylenediamine
v/p	Vòng/phút
v/v	volume/volume
w/v	Weight/volume
WHO	World Health Organization
wtSEB	Wild type SEB

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* 12
Hình 1.2. Vi khuẩn tụ cầu *S. aureus* Gram dương dưới kính hiển vi 12
Hình 1.3. Các độc tố quyết định của *S. aureus* 16
Hình 1.4. Cấu trúc tinh thể của protein SEB.....18
Hình 1.5. Cơ chế gây độc của siêu kháng nguyên 19
Hình 2.1. Chu trình nhiệt phản ứng PCR.....31
Hình 2.2. Cấu trúc vector tách dòng pTZ57R/T 32
Hình 2.3. Cấu trúc vertor biểu hiện pET22(b+).....35
Hình 3.1. Sản phẩm tách DNA tổng số của chủng *S. aureus* 43
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen *seb534* 44
Hình 3.3. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR.....44
Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra DNA plasmid tái tổ hợp trên gel agarose 1%....45
Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm cắt *seb534*/pTZ57R/T 46
bằng enzym hạn chế *EcoR*I và *Hind*III 46
Hình 3.6. Trình tự gen *seb534* của chủng *S. aureus* 47
Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm *seb534* sau tinh sạch.....49
Hình 3.8. Điện di đồ plasmid pET22(b+) sau khi cắt bằng các enzym hạn chế.....49
Hình 3.9. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp *seb534*/pET22(b+).....50
Hình 3.10. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc.....52
để chọn dòng mang plasmid tái tổ hợp *seb534*/pET22(b+) 52
Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid *seb534*/pET22(b+) của các dòng khuẩn lạc 53
Hình 3.12. Điện di đồ kiểm tra biểu hiện protein SEB534 54
Hình 3.13. Điện di đồ ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cảm ứng tới hàm lượng protein SEB534.....56
Hình 3.14. Điện di đồ ảnh hưởng của nồng độ IPTG tới hàm lượng protein SEB543 57
Hình 3.15. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cảm ứng.....58
Hình 3.16. Điện di đồ sản phẩm protein SEB534 tái tổ hợp sau tinh sạch.....60

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Báo cáo tình hình ngộ độc thực phẩm ở Việt Nam từ năm 2007 - 2014....4
Bảng 1.2. Sơ bộ tình hình nhiễm độc *S. aureus* trên thế giới trong những năm gần đây 6
Bảng 1.3. Sơ bộ tình hình nhiễm độc tụ cầu vàng trên toàn quốc từ 2007 - 2016. 8
Bảng 1.4. Phân loại khoa học *S. aureus* 10
Bảng 2.1. Cặp mồi sử dụng cho tách dòng 27
Bảng 2.2. Các hóa chất sử dụng chính 28
Bảng 2.3. Các máy móc và thiết bị sử dụng.....29
Bảng 2.4. Thành phần PCR.....30
Bảng 2.5. Thành phần gel tách 12% 40
Bảng 2.6. Thành phần gel cô 5% 40
Bảng 3.1. Độ tương đồng của gen *seb534* ở chủng *S. aureus* nghiên cứu với một số chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen thế giới (NCBI) 47