

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

ĐINH THỊ NGA

TÁCH DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA ĐỘC TỐ
TIÊU CHẢY VÀ ĐỘC TỐ NÔN CỦA CHỦNG *BACILLUS*
CEREUS PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2015

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

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

ĐINH THỊ NGÀ

**TÁCH DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA ĐỘC TỐ
TIÊU CHẢY VÀ ĐỘC TỐ NÔN CỦA CHỦNG *BACILLUS*
CEREUS PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM**

Chuyên ngành: **Vi sinh vật**

Mã số: **60420103**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **T.S Phùng Tôn Quyền**

Hà Nội - 2015

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

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn thạc sĩ tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu, nhân dịp này tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới những sự giúp đỡ này.

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ biết ơn sâu sắc tới TS Phùng Tôn Quyền là người thầy đã hướng cho tôi những ý tưởng khoa học, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã chia sẻ, động viên, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành tốt công việc nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bè bạn, những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2015

Học viên

Đinh Thị Nga

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực.

Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2015

Tác giả

MỤC LỤC

Lời cảm ơn	
Lời cam đoan	
Danh mục hình	
Danh mục bảng	
MỞ ĐẦU	1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Khái niệm ngộ độc thực phẩm và nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm ..	3
1.1.1. Khái niệm ngộ độc thực phẩm (Food poisoning).....	3
1.1.2. Nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm	3
1.2. Tổng quan về <i>Bacillus cereus</i>	5
1.2.1. Lịch sử nghiên cứu <i>Bacillus cereus</i>	5
1.2.2. Đặc điểm hình thái.....	7
1.2.3 Đặc điểm nuôi cấy	7
1.2.4. Đặc điểm sinh trưởng	8
1.2.5. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá.....	10
1.2.6. Đặc điểm huyết thanh học	11
1.2.7. Đặc điểm phân loại	12
1.3. Các nhân tố gây độc của <i>Bacillus cereus</i>	12
1.3.1. Các loại độc tố ruột (enterotoxin).....	12
1.3.2. Độc tố gây nôn (cereulide)	16
1.3.3. Những bệnh gây ra bởi <i>Bacillus cereus</i> , không liên quan tới ngộ độc thực phẩm.....	18
1.4. Ngộ độc thực phẩm do <i>Bacillus cereus</i>	19
1.4.1. Nguồn gốc lây nhiễm <i>B. cereus</i>	19
1.4.2. Cơ chế gây ngộ độc thực phẩm của <i>Bacillus cereus</i>	20
1.4.3. Liều lượng gây ngộ độc	21
1.4.4. Triệu chứng.....	22
1.5. Biện pháp phòng ngừa sự lây nhiễm và phát triển của <i>Bacillus cereus</i> trong thực phẩm	23

1.5.1. Phương pháp xử lý bằng nhiệt độ cao	23
1.5.2. Phương pháp xử lý bằng nhiệt độ thấp	24
1.5.3. Sử dụng chất bảo quản.....	25
1.5.4. Thực hiện điều kiện vệ sinh tốt GHP (good hygienic practices) và thực hành sản xuất tốt GMP (good manufacturing practices) [45]	25
1.6. Một số phương pháp nghiên cứu để nhận biết <i>Bacillus cereus</i>	26
1.6.1. Phương pháp dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa.....	26
1.6.2. Phương pháp dựa trên đặc điểm huyết thanh học.....	28
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	31
2.1. Vật liệu.	31
2.1.1. Sinh phẩm.	31
2.1.2. Hóa chất và thiết bị.	31
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	34
2.2.1. Phương pháp phân lập	34
2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn.....	34
2.2.3. Phương pháp tách DNA tổng số	34
2.2.4. Phương pháp tinh sạch plasmid của E. coli.....	35
2.2.5. Phương pháp PCR khuếch đại gen.	36
2.2.6. Phương pháp điện di trên gel agarose.....	36
2.2.7. Phương pháp tách dòng gen <i>nhe</i> , <i>hblA</i> , <i>bcet</i>	36
2.2.8. Phương pháp xác định trình tự nucleotit của đoạn gen đã tách dòng....	37
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	39
3.1. Phân lập <i>Bacillus cereus</i> trên môi trường MYP	39
3.2. Phát hiện gen mã hóa độc tố của <i>Bacillus cereus</i> bằng phản ứng PCR... 39	
3.3. Tách dòng và đọc trình tự gen <i>bceT</i> , <i>nhe</i> và <i>hblA</i>	41
3.3.1. Tách dòng gen <i>bceT</i> , <i>nhe</i> và <i>hblA</i>	41
3.3.2. Đọc trình tự gen mã hóa các độc tố	44
KẾT LUẬN	47
KIẾN NGHỊ	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	49

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
1	Bp	Base pair
2	<i>Bc</i>	<i>Bacillus cereus</i>
3	CFU	Colony Forming Unit
4	dH ₂ O	Deion water
5	DNA	Deoxyribonucleotide acid
6	dNTP	deoxyribo Nucleotide 5' - Triphosphate
7	ĐC	Đối chứng
8	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
9	EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid
10	EtBr	Ethidium Bromide
11	kDa	Kilo Dalton
12	OD	Optical density - mật độ quang học
13	PCR	Polymerase Chain Reaction - phản ứng chuỗi
14	SDS	Sodium dodecyl sulphate
15	Sol	Solution
16	TE	Tris EDTA
17	X-gal	5- bromo- 4 Cloro- 3 indolyl β - d galactoside

Danh mục hình

Hình 1.1: Tế bào (A) và bào tử (B) của <i>B. cereus</i>	7
Hình 1.2: Khuẩn lạc <i>B. cereus</i> trên môi trường thạch huyết	8
Hình 1.3 : Kháng nguyên tiêm mao của <i>B. cereus</i>	11
Hình 1.4. Cấu trúc hoá học của cereulide [24]	17
Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc <i>B. cereus</i> trên môi trường MYP sau 12 giờ nuôi.....	39
Hình 3.2. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại các gen độc tố của gen <i>bceT</i> (0,7 bp), <i>nhe</i> (1.4 kb) và <i>hblA</i> (319 bp)	40
Hình 3.3. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi Khuẩn <i>E.coli</i> DH5 α	41
Hình 3.4. Điện di sản phẩm cắt DNA plasmid các dòng khuẩn lạc trắng trên gel 1% agarose	42
Hình 3.5 . Điện di sản phẩm PCR của các dòng khuẩn lạc trắng trên <i>gel 1% agarose</i>	43
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid của protein BCET với trình tự BAA041341 trên ngân hàng gen quốc tế.....	44
Hình 3.7. So sánh trình tự amino acid của protein NHE với trình tự DQ153257.1 trên ngân hàng gen quốc tế	45
Hình 3.8. So sánh trình tự amino acid của protein HBL với trình tự EEK50059.1 trên ngân hàng gen quốc tế	46

Danh mục bảng

Bảng 1.1. Một số đặc điểm phân biệt các loài trong nhóm 1 chi <i>Bacillus</i>	10
Bảng 1.2. Đặc điểm một số độc tố ruột của <i>Bacillus cereus</i>	13
Bảng 2.2: Các thiết bị sử dụng trong quá trình nghiên cứu.	32

MỞ ĐẦU

Bacillus cereus thuộc nhóm 1 chi *Bacillus* là vi khuẩn hình que, Gram dương và sinh bào tử. *B. cereus* thường xuất hiện trong đất, trong sữa nguyên liệu, trong các sản phẩm từ sữa và trong các loại ngũ cốc. *B. cereus* có khả năng liên quan đến các bệnh về đường ruột như gây nôn và tiêu chảy nhờ khả năng sản sinh 4 loại enterotoxin trong đó có 2 tổ hợp hemolysin BL (HBL), nonhemolytic enterotoxin (NHE) và 2 enterotoxic protein là enterotoxin T (BCET) và cytotoxin K (Beecher, Wong, 1994). Ngoài ra, *B. cereus* còn có khả năng sản sinh một loại độc tố chịu nhiệt non-riposome peptide synthetase (NRPS-cereulide) (Agata et al., 1995).

Ở nước ta hiện nay theo báo cáo từ bộ y tế, chỉ có khoảng 38 trung tâm y tế có khả năng kiểm nghiệm được loài vi khuẩn này, khoảng 60% các tỉnh thành có năng lực kiểm nghiệm. Tuy nhiên hiện nay phương pháp xét nghiệm vẫn dựa trên phương pháp đếm tổng số khuẩn lạc trên môi trường thạch dinh dưỡng kết hợp với các xét nghiệm hóa sinh khác. Phương pháp này có nhược điểm là thời gian lâu, có thể mất nhiều ngày hoặc vài tuần và độ chính xác không cao. Trong những năm gần đây, các phương pháp xét nghiệm vi sinh vật dựa trên nguyên tắc di truyền phân tử và miễn dịch học đã được thiết lập như: lai phân tử, PCR (Polymerase Chain Reaction), Elisa cho kết quả rất khả quan với độ chính xác cao, thời gian rút ngắn có thể xuống vài giờ, không đòi hỏi nhiều máy móc thiết bị do đó khả năng cơ động là rất cao. Những phương pháp trên đã mở ra cho ngành vi hóa sinh học nói riêng và cả ngành công nghệ thực phẩm hiện đại.

xuất phát từ tính cấp thiết chúng tôi tiến hành đề tài: “Tách dòng và giải trình tự gen mã hóa độc tố tiêu chảy và độc tố gây nôn của chủng *Bacillus cereus* phân lập tại Việt Nam”. Với mục đích tạo nguồn gen cho sản xuất nguyên liệu chế tạo kit phát hiện các độc tố của vi khuẩn *B. cereus* sau này.