

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

**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

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 cán bộ nghiên cứu thuộc Phòng Công nghệ DNA ứng dụng - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện luận văn. Tôi cũng xin cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen đã cung cấp kinh phí, thiết bị cũng như cho phép tôi sử dụng các kết quả nghiên cứu thuộc đề tài NV07-PTNTDD2015.

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 đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như quá trình thực hiện đề tài.

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>	<i>Escherichia coli</i>	
EtBr	Ethidium Bromide	
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	
GP5	Glycoprotein 5	
IPTG	Isopropylthio- β -Galactoside	
kb	Kilobase	
kDa	Kilodalton	
LB	Luria Bertani	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	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	iii
MỤC LỤC	iv
DANH MỤC HÌNH.....	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu:	2
3. Nội dung nghiên cứu:	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tổng quan về PRRS	3
1.1.1. Khái niệm PRRS.....	3
1.1.2. Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn.....	3
1.1.3. Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRSV).....	8
1.2. Protein tái tổ hợp	11
1.2.1. Giới thiệu	11
1.2.2. Glycoprotein (GP5)	12
1.2.3. Sản xuất protein tái tổ hợp dựa trên ORF5	13
1.2.4. Vector biểu hiện pET 32a(+) và chủng biểu hiện BL21	14
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	16

2.1. Vật liệu.....	16
2.1.1. Nguyên liệu.....	16
2.1.2. Hóa chất và môi trường.....	18
2.1.3. Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	19
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.2.1. Tạo dòng gen gp5.....	19
2.2.2. Tạo vector tái tổ hợp mang gen gp5.....	21
2.2.3. Phương pháp biểu hiện và tinh sạch protein GP5.....	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Tạo dòng vector mang gen mã hóa protein GP5.....	29
3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen mã hóa protein GP5.....	32
3.3. Biểu hiện và tinh sạch protein GP5 trong <i>E.coli</i>	34
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	41
1. Kết luận.....	41
2. Đề nghị.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hệ gen của virus PRRS	10
Hình 2.1. Sơ đồ vector tách dòng pBT	16
Hình 2.2. Cấu trúc vector biểu hiện pET 32a(+)	17
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR khuẩn lạc mang gen GP5	30
Hình 3.2. Kết quả cắt kiểm tra và tinh sạch pBT-GP5	31
Hình 3.3. Kết quả cắt kiểm tra plasmid pET 32a(+) bằng enzyme cắt giới hạn <i>SacI</i> và <i>HindIII</i>	32
Hình 3.4. Kết quả cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn <i>SacI</i> và <i>HindIII</i>	34
Hình 3.5. Kết quả điện di SDS-PAGE dịch nuôi vi khuẩn mang vector tái tổ hợp	35
Hình 3.6. Kết quả phân tích Western blot với kháng thể anti-His-tag (pha loãng 1:1000 lần)	36
Hình 3.7. Khảo sát nồng độ Imidazol để tinh sạch sản phẩm	38
Hình 3.8. Kết quả điện di kiểm tra GP5 tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA.....	39

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Tên thiết bị thí nghiệm	19
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR	20
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR	20
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng cắt pBT mang gen GP5	22
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng cắt pET 32a(+)	22
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối gen	24
Bảng 2.7. Thành phần gel điện di protein (SDS-PAGE).....	26

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, do lợn mắc bệnh thường bị xung huyết ở tai, lúc đầu đỏ sẫm sau đó tím xanh. Đặc trưng của bệnh, với lợn cái, 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 [9]. “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, châu Âu tại Đức năm 1990, tại Hà Lan năm 1991 và tại châu Á vào đầu những năm 1990 [36]. 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 [7].

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, có cấu trúc tương tự cấu trúc của *Coronavirus*, gồm 7 khung đọc mở gói lên nhau mã hóa cho 7 protein của virus gồm: GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, M và N. Trong số đó, protein GP5 (glycoprotein 5) được mã hoá bởi ORF5, là một protein được

glycosyl hoá, gắn với màng bọc ngoài của PRRSV, có tính kháng nguyên mạnh và chịu trách nhiệm gây bệnh của virus.

Protein GP5 là đích chủ yếu của các kháng thể trung hoà, tham gia vào cơ chế “lẩn tránh” đáp ứng miễn dịch cơ thể vật chủ của PRRSV, do ngăn cản hiện tượng trình diện kháng nguyên virus của các đại thực bào với các tế bào có thẩm quyền miễn dịch trong cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và qua trung gian tế bào (CMI-cell mediated immunity). Ngoài ra, GP5 còn tham gia hiện tượng “chết theo chương trình” (apoptosis) của các tế bào trong cơ thể bị nhiễm PRRSV. Sự biến đổi của GP5 là một trong những nguyên nhân làm gia tăng khả năng lây nhiễm và gây bệnh của PRRSV, làm cho bệnh dịch PRRS ngày càng phức tạp, do làm giảm hiệu quả phòng bệnh của các vaccine phòng bệnh đang lưu hành.

Chính vì vậy, nghiên cứu protein tái tổ hợp GP5 của PRRSV là thực sự cần thiết, giúp cho chẩn đoán xác định bệnh và sản xuất vaccine tái tổ hợp thế hệ mới nhằm khống chế, giảm bớt thiệt hại do virus PRRSV gây ra.

Từ những cơ sở lý luận khoa học và những nghiên cứu của các nhà khoa học trong và ngoài nước chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: **“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)”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Thiết kế được vector biểu hiện protein tái tổ hợp GP5. Biểu hiện và tinh sạch được protein tái tổ hợp GP5 của *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* virus.

3. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu tạo dòng vector mang gen gp5: Dựa trên thông tin về trình tự nucleotide của gen gp5 đã công bố, thiết kế các cặp môi phù hợp để phân lập kiểm tra và nhân gen bằng PCR.