

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

TRẦN THỊ THANH HUỆ

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GEN MÃ HÓA YẾU TỐ
QUYẾT ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN CỦA
XOẮN KHUẨN *Leptospira interrogans*
GÂY BỆNH LEPTOSPIROSIS TẠI VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - NĂM 2017

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

TRẦN THỊ THANH HUỆ

**XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GEN MÃ HÓA YẾU TỐ
QUYẾT ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN CỦA
XOẮN KHUẨN *Leptospira interrogans*
GÂY BỆNH LEPTOSPIROSIS TẠI VIỆT NAM**

**CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
MÃ SỐ: 60.42.02.01**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. Võ Thị Bích Thủy

THÁI NGUYÊN, NĂM 2017

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp này, tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất của mình tới **TS.Võ Thị Bích Thủy** phó trưởng phòng Hệ gen học vi sinh - Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tác giả xin trân trọng cảm ơn quý thầy cô trong Ban giám hiệu Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên; Ban chủ nhiệm khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên; Quý thầy, cô trực tiếp giảng dạy, giúp đỡ trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu khoa học.

Tác giả xin chân thành cảm ơn PGS. TS Nghiêm Ngọc Minh, KS. Phạm Thùy Linh và các anh chị em, cán bộ phòng Hệ gen học vi sinh - Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã nhiệt tình hướng dẫn, giúp đỡ và đóng góp nhiều ý kiến quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, xin được bày tỏ lòng yêu thương và biết ơn sâu sắc đến gia đình, đồng nghiệp - những người đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ, động viên tác giả trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2017

Tác giả

Trần Thị Thanh Huệ

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi trực tiếp thực hiện với sự giúp đỡ của cán bộ, nhân viên phòng Hệ gen học vi sinh - Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Võ Thị Bích Thủy. Các tư liệu trích dẫn đều có nguồn gốc rõ ràng, các kết quả trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố ở bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận văn

Trần Thị Thanh Huệ

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	
LỜI CAM ĐOAN	
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	iii
DANH MỤC BẢNG	iv
DANH MỤC HÌNH	v
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	3
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Đặc điểm của xoắn khuẩn <i>Leptospira</i>	4
1.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	6
1.2.1. Tình hình bệnh <i>Leptospirosis</i>	6
1.2.2. Tình hình nghiên cứu vắc xin phòng bệnh <i>Leptospirosis</i>	10
1.3. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	12
1.3.1. Tình hình bệnh <i>Leptospirosis</i>	12
1.3.2. Tình hình nghiên cứu vắc xin phòng bệnh <i>Leptospirosis</i>	14
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Vật liệu nghiên cứu	15
2.2. Hóa chất, thiết bị	16
2.2.1. Hóa chất	16
2.2.2. Thiết bị.....	17
2.3. Địa điểm nghiên cứu	17
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.4.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	18

2.4.2. Định lượng và kiểm tra độ tinh sạch của DNA tổng số	19
2.4.3. Thiết kế các cặp môi của các gen 16S rDNA, <i>OmpL1</i> , <i>LipL32</i> , <i>LipL41</i> , <i>LipL21</i> , <i>LigA</i> , <i>LigB</i>	20
2.4.4. Kỹ thuật PCR.....	20
2.4.5. Tinh sạch sản phẩm PCR của gen 16S rDNA.....	21
2.4.6. Giải trình tự gen 16S rDNA của 6 chủng xoắn khuẩn.....	22
2.4.7. Phân tích và xây dựng sơ đồ hình cây phân loại 6 chủng <i>Leptospira</i> ..	23
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	24
3.1. Phân loại học phân tử 6 chủng <i>Leptospira</i>	24
3.1.1. Kiểm tra chất lượng DNA tổng số.....	24
3.1.2. Trình tự các cặp môi của các gen 16S rDNA, <i>OmpL1</i> , <i>LipL32</i> , <i>LipL41</i> , <i>LipL21</i> , <i>LigA</i> , <i>LigB</i>	26
3.1.3. Nhân gen với các cặp môi của gen 16S rDNA.....	27
3.1.4. Tinh sạch sản phẩm PCR gen 16S rDNA.....	28
3.1.5. Giải trình tự gen 16S rDNA của 6 chủng xoắn khuẩn.....	29
3.1.6. Phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại của 6 chủng xoắn khuẩn	30
3.2. Xác định sự có mặt của các gen <i>LigA</i> , <i>LipL32</i> , <i>LigB</i> , <i>OmpL1</i> , <i>LipL21</i> , <i>LipL41</i>	34
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	41
1. Kết luận	41
2. Đề nghị	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	1
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp	Base pair
dH ₂ O	Nước khử ion
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetate Axit
EMJH	Ellinghausen - McCullough-Johnson-Harris
EtBr	Ethidium Bromide
F-	Forward Primer : Mũi xuôi
R-	Reverse Primer: Mũi ngược
Kb	Kilobase
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
MLST	Multilocus Sequence Typing
OMP	Protein ngoài màng (outer membrane protein)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris-acetate-EDTA

DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Danh mục các thiết bị đã sử dụng	17
2.2	Thành phần phản ứng nhân gen	21
3.1	Giá trị mật độ quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260nm và 280nm của 6 chủng <i>Leptospira</i>	25
3.2	Trình tự cặp môi dùng để nhân các đoạn gen	27
3.3	Các loài <i>Leptospira</i> quốc tế tham khảo từ cơ sở dữ liệu GenBank	30

DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1	<i>Leptospira interrogans</i>	4
2	Chu kì nhiệt của phản ứng PCR nhân gen	21
3.1	Hình ảnh điện di DNA tổng số của 6 chủng <i>Leptospira</i>	24
3.2	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa <i>rRNA 16S</i>	28
3.3	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa <i>rRNA 16S</i> tinh sạch	29
3.4	Hình ảnh cây phát sinh chủng loại của 6 chủng xoắn khuẩn	32
3.5.a	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>LigA</i>	35
3.5.b	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>LipL32</i>	35
3.5.c	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>LigB</i>	36
3.5.d	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>OmpL1</i>	36
3.5.e	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>LipL21</i>	37
3.5.f	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>LipL41</i>	37

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Bệnh Leptospirosis (bệnh Xoắn khuẩn) là một trong những bệnh truyền nhiễm cấp tính, lan truyền từ động vật sang người phổ biến trên thế giới, được Tổ chức Sức khỏe động vật Thế giới (World Organisation for Animal Health-OIE) xếp vị trí thứ 2 trong nhóm bệnh nguy hiểm và được bổ sung vào nhóm bệnh nghề nghiệp ở Việt Nam. Nguyên nhân gây ra bởi một loại xoắn khuẩn *Leptospira interrogans*.

Leptospira interrogans là loài gây bệnh thường kí sinh ở người và động vật, bao gồm hơn 200 typ, được chia thành 23 nhóm (trong đó *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae thường gặp nhất). Xoắn khuẩn này có khả năng gây bệnh trên động vật và có thể lây sang người. Bệnh do xoắn khuẩn gây ra còn gọi là bệnh vàng da, nó gây ảnh hưởng đến các cơ quan và có thể gây sẩy thai ở thú nuôi. Bệnh xoắn khuẩn lây nhiễm sang người qua niêm mạc, da, mắt hoặc các màng nhầy tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp với nước tiểu hoặc mẫu mô động vật mắc bệnh. Bệnh phát triển ở khắp mọi nơi trên thế giới, gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của con người. Do tính đa dạng về triệu chứng nên bệnh Leptospirosis khó chẩn đoán và tỷ lệ tử vong cao. Việc điều trị bệnh này rất khó khăn nên đòi hỏi những biện pháp phòng ngừa bệnh có hiệu quả cao. Vì vậy, việc sản xuất vắc xin phòng bệnh do xoắn khuẩn *Leptospira* là một yêu cầu cấp thiết.

Trong quá trình nghiên cứu ứng dụng, các nhà khoa học đang tập trung vào các loại vắc xin có khả năng phòng chống dịch bệnh mang tính dịch tễ vùng, an toàn, mức độ bảo hộ cao và lâu dài, giá thành hạ, đảm bảo sức khỏe cộng đồng và động vật. Đặc biệt quan tâm với loại vắc xin nhược độc được thiết kế dựa trên cơ sở trình tự gen và các yếu tố độc lực của các tác nhân gây bệnh để tối ưu hóa mức độ an toàn của các loại vắc xin. Đây là một bước đột