ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

---------ଓ▲ଓ----------

NGUYỄN THỊ HOA ÁNH

NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI THÀNH PHẦN GEN NHÂN ITS-2, 28S rRNA VÀ GEN TY THỂ COX1 CỦA LOÀI SÁN LÁ GAN LỚN *FASCIOLA SSP* DẠNG THUẦN VÀ DẠNG LAI GÂY BỆNH TRÊN ĐỘNG VẬT TẠI VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2016

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ HOA ÁNH

NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI THÀNH PHẦN GEN NHÂN ITS-2, 28S rRNA VÀ GEN TY THỂ COX1 CỦA LOÀI SÁN LÁ GAN LỚN *FASCIOLA SSP* DẠNG THUẦN VÀ DẠNG LAI GÂY BỆNH TRÊN ĐỘNG VẬT TẠI VIỆT NAM

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học**

Mã số: 60 42 02 01

Người hướng dẫn khoa học: **TS. NGUYỄN THỊ BÍCH NGA**

THÁI NGUYÊN - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu khoa học do tôi trực tiếp thực hiện và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác. Các số liệu trình bày trong luận văn là hoàn toàn trung thực và chính xác.

Ngày…… tháng ….. năm 201…

Học viên

Nguyễn Thị Hoa Ánh

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến:

- TS. Nguyễn Thị Bích Nga là người đã trực tiếp hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận văn.

- Cảm ơn các cán bộ của Phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học nơi tôi thực tập đã nhiệt tình giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn của mình.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến:

- Ban Giám đốc Đại học Thái Nguyên, Ban Giám hiệu Trường Đại học Khoa học, Phòng Đào tạo và Quan hệ Quốc tế, Khoa Khoa học sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên

- Sự tài trợ kinh phí của Quỹ phát triển Khoa học và công nghệ quốc gia (Nafosted) cho đề tài mã số 106-YS.02-2013.06 do TS Nguyễn Thị Bích Nga làm chủ nhiệm.

- Cuối cùng tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những người thân đã luôn khuyến khích,động viên cũng như chia sẻ những khó khăn với tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành nghiên cứu của mình.

Học viên

Nguyễn Thị Hoa Ánh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT v
DANH MỤC BẢNG BIỂU vi
DANH MỤC HÌNH ẢNH vii
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1:TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Giới thiệu về loài sán lá gan lớn 3
1.1.1.Vị trí phân loại sán lá gan lớn trong hệ thống phân loại động vật 3
1.1.2.Đặc điểm hình thái học của sán lá gan lớn Fasciola sp 3
1.1.3.Chu kỳ sinh trưởng và phát triển của sán lá. 5
1.1.4.Trứng sán lá gan lớn 8
1.1.5.Sán trưởng thành 9
1.2.Đặc điểm của bệnh do sán lá gan lớn 10
1.2.1.Cơ chế sinh bệnh 10
1.2.2. Đặc điểm dịch tễ bệnh sán lá Fasciola ở trâu, bò ở Việt Nam 12
1.3. Tầm quan trọng của nghiên cứu giám định loài bằng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự 17
1.3.1. Giới thiệu sơ bộ hệ gen nhân ribosomal DNA (rDNA) 18
1.3.2. Hệ gen DNA ty thể 19
CHƯƠNG 2:VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 22
2.1. Vật liệu nghiên cứu 22
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu 22
2.3. Dụng cụ và thiết bị và hóa chất 22
2.3.1. Dụng cụ, trang thiết bị 22
2.3.2. Hóa chất 22
2.4. Phương pháp nghiên cứu 23

2.4.1. Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu Fasciola sp 24
2.4.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số..... 24
2.4.3. Thiết kế mồi, thực hiện PCR gen ITS2, 28S và gen cox1 25
2.4.4. Phương pháp giải trình tự..... 27
2.4.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu 28
CHƯƠNG 3:KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN 30
3.1. Thu nhận gen ITS-2 trong chẩn đoán phân biệt..... 30
3.1.1. Thu thập mẫu sán lá gan lớn và phân loại hình thái 30
3.1.2. Sử dụng gen ITS-2 trong chẩn đoán phân biệt..... 30
3.2. Kết quả thu nhận gen 28s và xây dựng cây phả hệ..... 35
3.3. Kết quả thu nhận chuỗi gen ty thể COX1 39
3.3.1. Kết quả giải trình tự gen cox1 của Fasciola sp Việt Nam và so sánh với các loài thuộc lớp sán lá Trematoda..... 41
3.3.2. Xây dựng mối quan hệ phả hệ giữa các loài thuộc lớp sán lá..... 47
KẾT LUẬN 53
TÀI LIỆU THAM KHẢO..... 54

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DNA	***Deoxyribonucleotide***
AST	***Abnormal Spermatogenic Type***
NST	***Normal Spermatogenic Type***
Cox1	***cytochrome oxidase subunit 1***
ITS-2	***Second internal transcribed spacer***
Rdna	***Ribosome DNA***
SLGL	***Sán lá gan lớn***
PCR	***Polymerase chain reaction***
ddNTP	***dideoxyrinonucleotide triphosphate***
dNTP	***deoxyrinonucleotide triphosphate***
bp	***Cặp bazơ (base pair)***
TAE	***Tris base-Acetic-EDTA***
PAGE	***Điện di gel polyacylamid***
EtBr	***Ethidium Bromide***
EDTA	***Ethylene Diamine Tetraacemic Acid***
OD	***Mật độ quang học***
Kb	***Kilobase***
Kda	***Kilodalton***
µl	***Microlitre***
µm	***Micrometer***
mm	***Millimeter***

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2.1. Danh sách các mồi dùng trong phản ứng PCR thu nhận gen ITS-2, 28S và COX1..... 25
Bảng 3.1. So sánh các nucleotide ở các vị trí biến đổi của vùng giao gen ITS-2 của các mẫu sán lá gan lớn ở các vùng địa lý và vật chủ khác nhau 33
Bảng 3.2. Các mẫu cung cấp chuỗi gen 28S trong nghiên cứu 36
Bảng 3.3. Các mẫu sán lá Trematoda trong Ngân hàng gen cung cấp chuỗi *cox1* sử dụng so sánh đối chiếu trong nghiên cứu 40
Bảng 3.4. Tỷ lệ tương đồng trình tự amino acid gen cox1 của các loài sán lá thuộc lớp Trematoda 46

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Hình ảnh mô tả hình thái của sán lá gan lớn *Fasciola sp* 4
Hình 1.2. Chu kỳ sinh trưởng và phát triển của SLGL Fasciola sp ký sinh vật chủ ở động vật và người..... 5
Hình 1.3. Hình ảnh của trứng sán lá gan lớn *Fasciola sp* phóng đại 400 lần dưới kính hiển vi điện tử..... 8
Hình 1.4. Hình thể sán lá gan lớn *Fasciola sp* trưởng thành 9
Hình 1.5. Mô hình cấu trúc ribosome DNA của gen nhân và vùng gen cần nghiên cứu18
Hình 1.6. Mô hình cấu trúc DNA của hệ gen ty thể. 20
Hình 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu giải mã hệ gen ty thể *Fasciola sp.*..... 23
Hình 3.1. Hình ảnh sán lá gan lớn FspNB-VN và FspCB-VN trong nghiên cứu 30
Hình 3.2. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR của vùng gen ITS-2. 31
Hình 3.3. So sánh trình tự chuỗi nucleotide ITS-2của 16 mẫu Fasciola sp..... 32
Hình 3.4. Điện di sản phẩm PCR gen 28S với cặp mồi U28SF – U28SR..... 35
Hình 3.5. Mối quan hệ nguồn gốc phả hệ giữa mẫu *Fasciola* sp xác trên lập dựa trên thành phần nucleotide gen 28S ribosome bằng chương trình MEGA6.06 38
Hình 3.6. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR của gen cox1 với cặp mồiFSP12F – FGHR2. 40
Hình 3.7. Trình tự amino acid suy diễn của FspNB-VN và FspCB-VN so sánh với các chuỗi gen cox1 thuộc lớp sán lá Trematoda.....44
Hình 3.8. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ về loài giữa các mẫu sán lá dựa trên thành phần amino acid của gen *cox1* bằng chương trình MEGA6.. 48

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Bệnh sán lá gan lớn (fascioliasis) do hai loài *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* thuộc họ *Fasciolidae*kí sinh trên động vật nhai lại (trâu, bò, dê, cừu…) và đang dần thích ứng gây bệnh trên người.

Trước đây, các đặc tính hình thái học (morphology), sinh thái học (ecology) và huyết thanh học (serology) thường sử dụng trong chẩn đoán cũng đã đáp ứng được phần lớn yêu cầu về phân loại sinh vật trong đó có ngành ký sinh trùng [5],[18].

Tuy nhiên nếu phân loại sán lá gan chỉ dựa vào hình thái thì rất khó phân định. Đặc biệt đã có hiện tượng lai và dạng trung gian (hybrid form) trong quần thể sán lá gan đã được phát hiện, đó là hệ gen có sự trộn lẫn của *F. hepatica* và *F. gigantica* (Fh/Fg), trong đó hệ gen nhân tế bào mang gen từ dòng bố (*F. hepatica*) và hệ gen ty thể (*F. gigantica*) mang tính di truyền theo dòng mẹ [7].

Bệnh sán lá gan lớn hiện nay được coi là bệnh ký sinh trùng mới nổi bị lãng quên (neglected emerging infectious disease) và đang được tổ chức y tế thế giới (WHO) quan tâm.

Sán lá gan lớn gây bệnh ở người, ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng, do chúng gây ra các tổn thương bệnh lý ở hệ thống gan mật, gây can xi hóa đường mật, ký sinh lạc chỗ hoặc di chuyển lạc lên não… gây tổn thương nặng ở nhu mô gan làm suy gan dẫn đến tử vong [4], [7], [17]. Một số trường hợpdo bệnh sán lá gan lớn ở người gây phản ứng viêm, xơ hóa gan, dẫn đến chẩn đoán bị nhầm là bệnh ung thư gan [2], [5].

Đối với động vật ăn cỏ (trâu, bò, dê, cừu…) khi nhiễm sán lá gan lớn làm giảm trọng lượng của con vật, ốm yếu, thiếu máu bệnh lý, con vật không sinh sản, gây thiệt hại lớn về kinh tế [11].

Vì vậy việc phát hiện sớm và xác định chính xác loài *Fasciola* gây bệnh là rất cần thiết, có ý nghĩa thực tiễn trong chẩn đoán và điều trị. Chẩn đoán, giám định và phân biệt loài *Fasciola* được thực hiện bằng các phương pháp sinh học phân tử dựa trên các chỉ thị gen nhân và ty thể.