

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

PHAN TRỌNG HOÀNG

NGHIÊN CỨU SỰ BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH MỘT SỐ
KHÁNG NGUYÊN CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG
CÂY THUỐC LÁ NICOTIANA TABACUM

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội, 12/2010

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

PHAN TRỌNG HOÀNG

**NGHIÊN CỨU SỰ BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH MỘT SỐ
KHÁNG NGUYÊN CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG
CÂY THUỐC LÁ NICOTIANA TABACUM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 62.42.30

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC
Giáo viên hướng dẫn khoa học: GS.TS. Lê Trần Bình

Hà Nội, 12/2010

MỤC LỤC

MỤC LỤC	1
THUẬT NGỮ VIẾT TẮT	3
DANH MỤC BẢNG.....	3
LỜI CẢM ƠN.....	4
MỞ ĐẦU	5
NỘI DUNG.....	8
Chương I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	8
I.1. Virus cúm A.....	8
I.1.1. Hemagglutinin (HA).....	9
I.1.2. Neuraminidase (NA).....	11
I.1.3. Vacxin phòng virus cúm.....	11
I.2. Trang trại phân tử-Molecular farming.....	13
I.3. Vacxin có nguồn gốc từ thực vật.....	15
I.4. Elastin-like polypeptid.....	17
Chương II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	19
II.1. Vật liệu	19
II.1.1. Chủng vi khuẩn	19
II.1.2. Các vector và gen sử dụng	19
II.1.3. Vật liệu thực vật	20
II.1.4. Các đoạn môi sử dụng trong nghiên cứu.....	20
II.1.5. Thành phần môi trường.....	20
II.1.6. Thành phần dung dịch đệm.....	21
II.1.7. Các enzym và kit phản ứng.....	22
II.1.8. Kháng sinh.....	22
II.1.9. Kháng thể	22
II.1.10. Trang thiết bị	22
II.2. Phương pháp.....	23
II.2.1. Thiết kế vector biểu hiện H5, N1 và M1 trong thực vật	23
II.2.2. Biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá	24
II.2.3. Chuyển gen H5, N1 và M1 vào cây thuốc lá	25
II.2.4. Phân tích Western blot	25
II.2.5. Đánh giá sự phân ly ở thế hệ thứ nhất.....	26
II.2.6. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng chu trình chuyển đổi trạng thái thuận nghịch	27
Chương III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
III.1. Thiết kế cấu trúc biểu hiện phục vụ chuyển gen vào tế bào thực vật	28
III.2. Biểu hiện tạm thời protein H5, N1 và M1 trong lá cây thuốc lá.....	33
III.3. Biểu hiện M1, N1 và H5 tái tổ hợp trong cây thuốc lá chuyển gen.....	36
III.3.1. Sự biểu hiện protein H5, N1 và M1-ELP trong cây trồng chuyển gen ở thế hệ T0	36
III.3.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen ở thế hệ thứ nhất	40
III.4. Tinh sạch protein tái tổ hợp theo chu trình chuyển đổi trạng thái thuận nghịch .	43
Chương IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
KẾT LUẬN.....	46

KIẾN NGHỊ	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO	47
Tài liệu tiếng Việt	47
Tài liệu tiếng Anh	47
PHỤ LỤC.....	53
Lý lịch cá nhân	
Công trình nghiên cứu liên quan đến luận văn thạc sĩ khoa học	
Nhận xét về quá trình học tập	

THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

Amp	Ampicillin
Kan	Kanamycin
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
HA	Hemagglutinin
NA	Neuraminidase
<i>npt</i> II	Neomycin Phosphotransferase II
kDa	Kilo Dalton
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
dNTP	Deoxynucleotide triphosphat
ELP	Elastin like polypeptid

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Các vector sử dụng trong nghiên cứu	19
Bảng 2. Các đoạn môi dùng cho PCR.....	20
Bảng 3. Các đoạn môi dùng cho đọc trình tự	20
Bảng 4. Tổng kết kết quả phân tích cây chuyển gen T0 bằng kỹ thuật Western blot	38
Bảng 5. Đánh giá khả năng phân ly của gen chuyển ở các dòng cây thế hệ thứ nhất.....	39

LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Lê Trần Bình-Chủ nhiệm Bộ môn Công nghệ sinh học nanô, Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội đã định hướng nghiên cứu đồng thời tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin được cảm ơn TS. Udo Conrad, trưởng nhóm nghiên cứu “Phytoantibody”, viện Leibniz về di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng (IPK) tại Gatersleben, Cộng hoà liên bang Đức đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong khoá thực tập ngắn hạn tại Đức.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới sự giúp đỡ của các cô chú, các anh chị, các bạn đồng nghiệp đang công tác tại phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, phòng phytoantibody tại Viện IPK đã dành cho tôi trong suốt quá trình làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Đào tạo, Ban Lãnh đạo Viện Sinh thái & tài nguyên sinh vật, Ban Lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, các thầy cô giáo đang công tác tại Viện Công nghệ sinh học và Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện và tận tình giảng dạy tôi trong suốt khóa học.

Cuối cùng, tôi xin được tỏ lòng biết ơn sâu sắc và gửi lời cảm ơn chân thành tới những người thân trong gia đình và bạn bè - những người luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Hà Nội, ngày 05 tháng 12 năm 2010

Phan Trọng Hoàng

MỞ ĐẦU

Đặt vấn đề

Bệnh cúm là một trong những bệnh thường gặp nhất ở người, do virus cúm gây ra. Virus cúm A là tác nhân gây bệnh cúm chủ yếu và chúng có khả năng biến đổi hệ gen của mình rất linh hoạt. Trong quá khứ virus cúm A đã gây lên hàng loạt các trận đại dịch đối với con người như dịch cúm Tây Ban Nha (năm 1918), dịch cúm châu Á (năm 1957-1958), hay dịch cúm Hồng Kông (năm 1968) do virus H1N1, H2N2 và H3N2 gây lên. Hiện nay virus cúm A/H5N1 có độc lực rất cao gây chết hàng loạt với các loài gia cầm, thủy cầm. Nguy hiểm hơn nữa, loại virus này còn có khả năng truyền từ gia cầm sang người gây tỷ lệ tử vong cao trên 60 %. Virus cúm A/H5N1 là kết quả của việc tái tổ hợp giữa hemagglutinin 5 và neuraminidase 1, do vậy chúng còn được gọi tắt với tên cúm H5N1. Sự lây lan của loại virus này đối với gia cầm và người vẫn đang là mối lo ngại sâu sắc đối với sức khỏe cộng đồng. Các nhà khoa học còn lo ngại sự tái tổ hợp giữa loại virus cúm A/H5N1 này với loại virus cúm A chuyên gây bệnh cho người sẽ tạo ra loại virus cúm mới có độc lực cao như virus cúm H5N1 và có khả năng lây lan giữa người và người. Nếu điều này xảy ra thì nguy cơ bùng phát đại dịch đối với con người là rất cao.

Tiêm phòng là biện pháp hữu ích nhất để giảm thiểu mắc bệnh và tử vong do virus cúm gây ra. Hemagglutinin và neuraminidase là hai kháng nguyên quan trọng nhất trong việc gây đáp ứng miễn dịch do đó chúng là hai kháng nguyên đích cho việc phát triển các vaccin dự phòng. Hiện nay, vaccin phòng bệnh cúm hầu hết được sản xuất trong phôi trứng gà. Tuy nhiên, khả năng sản xuất vaccin trên toàn cầu chỉ là 900 triệu liều đơn giá và chủ yếu tập trung ở các nước phát triển. Trong khi đó, dân số trên toàn cầu là khoảng 6 tỷ người. Nếu như tất cả mọi người đều được tiêm phòng vaccin để phòng đại dịch thì lượng vaccin cần dùng lên tới 12 tỷ liều vaccin đơn giá (vì mỗi người ít nhất phải tiêm 2 lần). Như vậy, nguồn sản xuất vaccin trên toàn cầu sẽ bị thiếu trầm trọng nếu như đại dịch cúm xảy ra.

Trong khi đó, hệ thống biểu hiện ở thực vật rất hữu dụng vì vaccin được tạo ra hứa hẹn sẽ có giá thành thấp vì sử dụng các công cụ nông nghiệp đã có sẵn thay vì phải đầu tư các trang thiết bị tốn kém. Hơn nữa, sản lượng sản xuất có thể nâng

cao bằng cách tăng diện tích trồng cây chuyển gen. Tuy nhiên, protein tái tổ hợp được tích lũy trong cây trồng chuyển gen lại không cao và thiếu một phương thức tinh sạch protein tái tổ hợp hiệu quả.

Elastin like-polypeptid (ELP) là polymer sinh học nhân tạo, cấu tạo từ sự lặp lại của 5 amino acid Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG), Xaa là bất kỳ amino acid nào ngoại trừ proline. ELP có khả năng chuyển đổi trạng thái từ dạng tan thành không tan và ngược lại bằng cách thay đổi nhiệt độ và nồng độ muối. Tính chất này của ELP rất hữu ích cho việc tinh sạch các protein tái tổ hợp gắn với ELP. Hơn nữa, protein tái tổ hợp sẽ tăng khả năng tích lũy trong tế bào thực vật khi được gắn với ELP.

Nhận thấy việc nghiên cứu biểu hiện các kháng nguyên của virus cúm A/H5N1 trong tế bào thực vật là rất cấp thiết. Với mục đích tạo cơ sở cho việc nghiên cứu sản xuất vacxin từ thực vật và căn cứ vào các luận cứ khoa học trên, chúng tôi đã lựa chọn đề tài cho luận văn thạc sỹ là “Nghiên cứu sự biểu hiện và tinh sạch một số kháng nguyên của virus cúm A/H5N1 trong cây thuốc lá *Nicotiana tabacum*”

Mục tiêu nghiên cứu

- Biểu hiện hemagglutinin (rH5), neuraminidase (rN1) và matrix protein (rM1) tái tổ hợp trong cây thuốc lá chuyển gen bằng cách gắn với đuôi ELP.
- Bước đầu tiến hành tinh sạch protein tái tổ hợp M1-ELP, N1-ELP bằng chu trình chuyển đổi trạng thái thuận nghịch dưới sự điều chỉnh nhiệt độ và nồng độ muối NaCl.

Nội dung nghiên cứu

- Thiết kế các vector biểu hiện trong thực vật mang cấu trúc biểu hiện: CaMV 35S promoter – peptide tín hiệu – H5/N1/M1- c myc tag - 100xELP hoặc không 100xELP và KDEL.

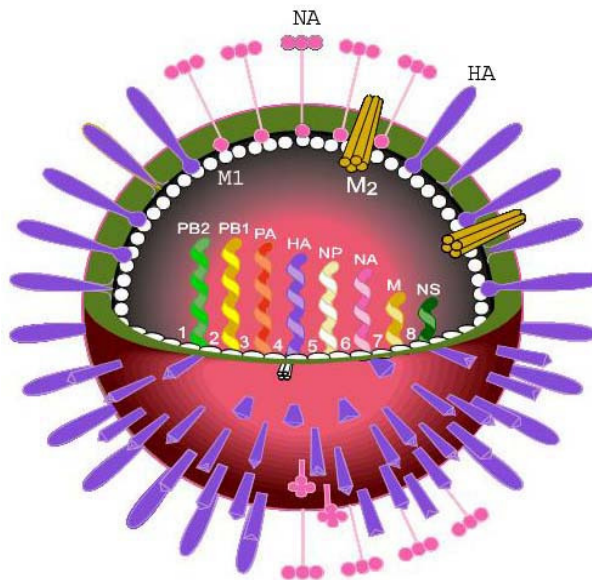
- Biểu hiện tạm thời các protein tái tổ hợp trong tế bào thực vật bằng phương pháp tiêm dịch khuẩn *Agrobacterium* vào phiến lá cây thuốc lá. Bước này để đánh giá sự hoạt động của các cấu trúc vector vừa được thiết kế đồng thời đánh giá khả năng biểu hiện của chúng trong tế bào thực vật.
- Chuyển cấu trúc biểu hiện vào genome của tế bào thực vật để tạo ra các cây trồng chuyển gen và đánh giá khả năng biểu hiện của chúng trong các cây trồng biến đổi gen này.
- Bước đầu tinh sạch các protein tái tổ bằng chu trình chuyển đổi trạng thái thuận nghịch với qui mô nhỏ dưới sự có mặt của NaCl ở nồng độ 2 M và ở các nhiệt độ khác nhau.

NỘI DUNG

Chương I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

I.1. Virus cúm A

Bệnh cúm có khả năng lây lan cao cho các loài chim và các loài động vật có vú. Bệnh cúm do virus cúm gây ra, chúng có hệ gen là sợi RNA đơn, âm, thuộc họ *Orthomyxoviridae* (Swayne và Suarez, 2000; Ng và đồng tác giả., 2006). Họ virus cúm có 3 týp: A, B và C. Hệ gen của virus cúm bao gồm 8 sợi RNA riêng biệt (týp C chỉ có 7 sợi). Trong đó, virus cúm A có thể được chia thành các phân týp dựa vào sự khác nhau của hai kháng nguyên bề mặt là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Ngoài hai kháng nguyên bề mặt, hệ gen của virus cúm còn mã hóa cho các protein khác như nucleoprotein (NP), protein màng (M1 và M2), polymerase (PA, PB1 và PB2), protein phi cấu trúc (NS1 và NS2). Cấu trúc cơ bản của virus cúm A được thể hiện như hình 1. Hiện nay, có 16 phân týp của kháng nguyên HA (ký hiệu H1 đến H16) và 9 phân týp của kháng nguyên NA (ký hiệu từ N1 đến N9) (Fouchier và đồng tác giả., 2005). Sự tổ hợp của hai loại kháng nguyên HA, NA sẽ tạo ra các chủng virus cúm rất đa dạng.



Hình 1. Cấu trúc của virus cúm A với 8 sợi RNA và 4 trong 10 protein.