

MỤC LỤC

Lời giới thiệu.....	5
Lời nhà xuất bản	13
Lời cảm ơn	15
Lời nói đầu.....	17
Abstract.....	23
Danh mục từ viết tắt	29
Danh mục bảng.....	31
Danh mục hình	32
Chương 1. CÚM GIA CẦM VÀ VACCINE PHÒNG BỆNH.....	37
Giới thiệu	37
1.1. Bệnh cúm gia cầm do virus cúm A	38
1.1.1. <i>Lịch sử bùng phát và tình hình dịch cúm gia cầm trên thế giới.....</i>	<i>38</i>
1.1.2. <i>Tình hình dịch cúm gia cầm ở Việt Nam</i>	<i>41</i>
1.1.3. <i>Đặc điểm của bệnh cúm gia cầm.....</i>	<i>49</i>
1.2. Đại cương về virus cúm A	50
1.2.1. <i>Phân loại virus cúm.....</i>	<i>50</i>
1.2.2. <i>Đặc tính cấu trúc chung của virus cúm A.....</i>	<i>51</i>
1.2.3. <i>Cấu trúc hệ gen của virus cúm A.....</i>	<i>53</i>
1.2.4. <i>Chức năng các phân đoạn trong hệ gen của virus cúm A</i>	<i>55</i>
1.2.5. <i>Cấu trúc, chức năng của protein hemagglutinin</i>	<i>56</i>
1.2.6. <i>Biến đổi thành phần hemagglutinin tạo nên các clade của virus cúm A/H5N1 và A/H5N6.....</i>	<i>60</i>
1.2.7. <i>Sự hình thành genotype của virus cúm A.....</i>	<i>63</i>
1.2.8. <i>Các yếu tố quyết định độc lực của virus cúm A.....</i>	<i>67</i>
1.2.9. <i>Cơ chế xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A trong tế bào</i>	<i>68</i>
1.2.10. <i>Các phương thức biến đổi kháng nguyên của virus cúm A</i>	<i>70</i>

1.2.11. Tính thích ứng đa vật chủ của virus cúm.....	74
1.2.12. Phương thức lây truyền của virus cúm gia cầm.....	76
1.2.13. Sức đề kháng của virus.....	76
1.3. Các loại vaccine phòng bệnh cho gia cầm.....	77
1.3.1. Vaccine truyền thống.....	77
1.3.2. Vaccine thể hệ mới hay vaccine công nghệ gen.....	77
1.3.3. Vaccine từ thực vật.....	81
Kết luận.....	83
Tài liệu tham khảo.....	84
Chương 2. TỐI ƯU QUÁ TRÌNH BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH PROTEIN HA TÁI TỔ HỢP TỪ THỰC VẬT.....	99
Giới thiệu.....	99
2.1. Các hệ thống biểu hiện protein ở thực vật.....	100
2.2. Biểu hiện protein tạm thời thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	101
2.3. Ứng dụng hệ thống thực vật trong việc sản xuất protein có hoạt tính sinh học.....	104
2.4. Kết quả lựa chọn các điều kiện cho sự biểu hiện tạm thời kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 trên cây thuốc lá.....	111
2.4.1. Điều kiện nuôi cây thuốc lá thủy canh.....	111
2.4.2. Tuổi cây thuốc lá thủy canh cho biến nạp khuẩn.....	113
2.4.3. Mật độ vi khuẩn trong dung dịch biến nạp.....	115
2.4.4. Thời gian biến nạp.....	115
2.4.5. Thời gian thu hoạch lá sau biến nạp.....	117
2.5. Các phương pháp tách chiết, thu hồi và tinh sạch protein từ thực vật.....	119
2.5.1. Các phương pháp tách chiết và thu hồi protein tổng số từ thực vật.....	120
2.5.2. Các phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp từ thực vật.....	123
2.6. Kết quả lựa chọn điều kiện tinh sạch kháng nguyên HA dung hợp ELP từ cây thuốc lá bằng màng mITC.....	131
2.6.1. Lựa chọn nồng độ PEG 8000 cho tinh sạch protein.....	131
2.6.2. Lựa chọn giai đoạn làm giàu protein tinh sạch.....	133
2.6.3. Hiệu suất thu hồi protein HA bằng mITC.....	134

Kết luận	136
Tài liệu tham khảo	136
Chương 3. TĂNG CƯỜNG SỰ BIỂU HIỆN VÀ KHẢ NẢNG TINH SẠCH CỦA PROTEIN HA TRIMER BẰNG CÁCH DUNG HỢP ELP.....	151
Giới thiệu	151
3.1. Thiết kế các cấu trúc mang gen mã hóa protein H5 của virus cúm A/H5N1 trong cây thuốc lá.....	153
3.2. Biểu hiện các dạng protein H5 của virus cúm A/H5N1 trong cây thuốc lá.....	155
3.3. Tinh sạch các dạng protein H5 tái tổ hợp.....	159
3.4. Phân tích đặc điểm cấu trúc và chức năng của các protein H5 tái tổ hợp.....	163
3.5. Đáp ứng miễn dịch của các protein H5 tái tổ hợp.....	165
3.6. Tiềm năng tạo ra các kháng thể trung hòa sau khi tiêm tăng cường với các dạng protein H5 của H5N1 tái tổ hợp khác nhau.....	170
3.7. Các protein H5 của virus cúm A/H5N1 từ thực vật cũng tạo ra các kháng thể trung hòa chống lại các chủng virus H5N1 khác nhau.....	171
Kết luận	174
Tài liệu tham khảo	175
Chương 4. SỰ TƯƠNG TÁC CỦA S-Tag VÀ S-Protein TẠO HA OLIGOMER GIÚP TĂNG CƯỜNG TÍNH SINH MIỄN DỊCH TRÊN CHUỘT.....	181
Giới thiệu	181
4.1. Thiết kế và biểu hiện các protein H5 trimer dung hợp S-Tag và S-Protein ở thực vật.....	183
4.2. Sàng lọc protein H5 oligomer bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu	186
4.3. Xác nhận sự hình thành của H5 oligomer trong thực vật....	189
4.4. Xác định đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học của protein H5 oligomer tinh sạch.....	191

4.5. H5 oligomer có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn dạng H5 trimer	193
Kết luận.....	199
Tài liệu tham khảo	200
Chương 5. SỰ DUNG HỢP IgM_{FC} VỚI PROTEIN HA GIÚP TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG BẢO HỘ TRÊN GÀ.....	203
Giới thiệu	203
5.1. Thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa protein H5TG oligomer.....	205
5.2. Sự biểu hiện và khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu của protein H5TG trong dịch chiết protein thực vật.....	207
5.3. Tinh sạch các protein H5TG từ thực vật	209
5.4. Đặc điểm cấu trúc và chức năng sinh học của protein H5TG tinh sạch	211
5.5. Đáp ứng miễn dịch trên gà khi công cường độc với chủng virus cúm A/duck/TG/NAVET(3)/2013 clade 1	213
<i>5.5.1. Phát hiện kháng thể trung hoà trong huyết thanh gà bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI).....</i>	<i>217</i>
<i>5.5.2. Phân tích tỷ lệ bảo hộ trên gà được tiêm vaccine với virus cúm A/H5N1 clade 1.1</i>	<i>218</i>
Kết luận.....	220
Tài liệu tham khảo	221
Chương 6. DỊCH CHIẾT THÔ THỰC VẬT CHỨA HA OLIGOMER DUNG HỢP TP CÓ KHẢ NĂNG BẢO HỘ CAO TRÊN GÀ.....	223
Giới thiệu	223
6.1. Thiết kế và biểu hiện các protein H5 oligomer trong thực vật.....	224
6.2. Đánh giá đặc điểm sinh học và đặc điểm cấu trúc của các protein H5 oligomer trong thực vật.....	226
6.3. Đánh giá tính sinh miễn dịch của H5 oligomer trong dịch chiết thực vật thô ở chuột.....	229

6.4. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của H5 oligomer trong dịch chiết thực vật thô ở gà	232
6.5. Đánh giá độ ổn định của dịch chiết thực vật biểu hiện H5 oligomer và H5 trimer	237
Kết luận	239
Tài liệu tham khảo	240
Chương 7. PHỨC HỆ HẠT NANO KIM CƯƠNG VÀ PROTEIN HA CÓ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH TÍNH SINH MIỄN DỊCH MẠNH TRÊN CHUỘT	243
Giới thiệu	243
7.1. Thiết kế và biểu hiện protein H7pII trimer trên cây thuốc lá <i>N. benthamiana</i>	246
7.2. Tinh sạch, xác định đặc điểm cấu trúc và chức năng của protein H7pII trimer.....	247
7.3. Tạo phức hệ protein H7pII trimer với hạt ND.....	249
7.4. Sàng lọc tỷ lệ trộn protein H7pII trimer và hạt ND	252
7.5. Đánh giá khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của phức hệ kháng nguyên H7pII trimer:ND	255
Kết luận.....	258
Tài liệu tham khảo	258
Chương 8. TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG BẢO HỘ ĐỒNG THỜI MỘT SỐ CHỦNG CÚM GIA CẦM THÔNG QUA VIỆC TẠO TRÌNH TỰ HA NHÂN TẠO.....	261
Giới thiệu	261
8.1. Lựa chọn các gen mã hoá kháng nguyên HA của các chủng virus cúm A/H5N1	262
8.1.1. Thu thập và phân loại trình tự theo từng năm	263
8.1.2. Phân loại trình tự thành các clade và subclade	263
8.1.3. Lựa chọn gen mã hóa kháng nguyên HA tự nhiên của chủng virus cúm A/H5N1.....	264
8.1.4. Lựa chọn gen mã hóa kháng nguyên HA nhân tạo của chủng virus cúm A/H5N1.....	271
8.1.5. Phân tích và so sánh trình tự của các gen HA đã lựa chọn.....	277

8.2. Thiết kế, biểu hiện và đánh giá hoạt tính sinh học của protein HA trong dịch chiết thô thực vật.....	281
8.3. Đặc điểm cấu trúc và chức năng của các protein HA tinh sạch	285
8.4. Protein H5.c1 kích thích mạnh mẽ việc tạo ra kháng thể IgG đặc hiệu HA và kháng thể trung hoà.....	288
Kết luận	294
Tài liệu tham khảo	295
KẾT LUẬN CHUNG.....	297
DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH CỦA NHÓM TÁC GIẢ ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG CUỐN SÁCH.....	299