

PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÙNG D-LOOP TRONG TY THỂ (*mtADN*) CỦA 4 GIỐNG GÀ NỘI VIỆT NAM: GÀ RI, GÀ TRE, GÀ CHỢI VÀ GÀ TÀU VÀNG

Lê Thị Thúy¹, Trần Thị Kim Anh¹,
Nguyễn Đăng Tôn² và Địch Thị Kim Hương²

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này đã phân tích hiện tượng đa hình của 4 giống gà bản địa Việt Nam bằng cách xâu chuỗi các PCR của chúng được giới hạn bởi các vùng D-loop với các đặc tính đó của các giống gà khác sẵn có trong ngân hàng gen. Các mẫu máu của các giống gà bản địa như “Ri”, “Tre”, “Chọi” và “Tàu vàng” (mỗi giống với n=50) sưu tập ở Thanh Hoá, Bến Tre, Bình Định và Long An. Nhiễm sắc thể của nhân chiết xuất từ các tế bào máu với quá trình chiết xuất DNA. Bảo tồn những đoạn mỗi PCR: L16750: (5'-AGGACTCGGCTTGAAAGC-3') H1255: (5'-CATCTTGCATCTTCAGT-GCC-3')

Đã thử thanh lọc sản phẩm PCR của khoảng 1.3 kb của vùng D-loop của 4 giống gà bản địa và làm tiêu hoá với enzyme có giới hạn DraI, KpnI và TaqI. Không có hiện tượng đa hình nào được quan sát thấy ở vị trí giới hạn của các enzyme đó trong vùng D-loop của tất cả 4 giống gà bản địa của Việt Nam. Có 21 vị trí đặc trưng bởi sự chuyển vị với 4,45% của chuỗi phân hướng được ghi nhận trong số 20 chuỗi DNA, chỉ thị một quá trình biến dị tương đối chậm ở các giống gà bản địa. Có 9 kiểu đơn trong các giống gà bản địa. Bốn giống thuộc về hai dòng mẹ khác nhau, một dòng bao gồm “Ri” và gà Lơ Go trắng, còn một dòng gồm “Tre”, “Tàu vàng” và “Chọi”. Những chuỗi D-loop với chiều dài đầy đủ của các mẫu gà đó cùng với một số giống khác đang được nghiên cứu.

Từ khoá: *Vùng mt-D-loop, biến dị di truyền, giống gà Ri, Chọi, Tre, Tàu vàng.*

1. BẬT VẤN ĐỀ

1.1. Đặc điểm cấu tạo hệ gen ty thể gà

Ở động vật, ngoài hệ gen trong nhân còn có hệ gen tế bào chất nằm trong ty thể chiếm tỉ lệ 1-5% ADN của tế bào. Mỗi ty thể có chứa một số bản sao của ADN và bởi vì mỗi tế bào chứa nhiều ty thể nên số lượng ADN ty thể có thể rất lớn.

¹Viện Chăn nuôi

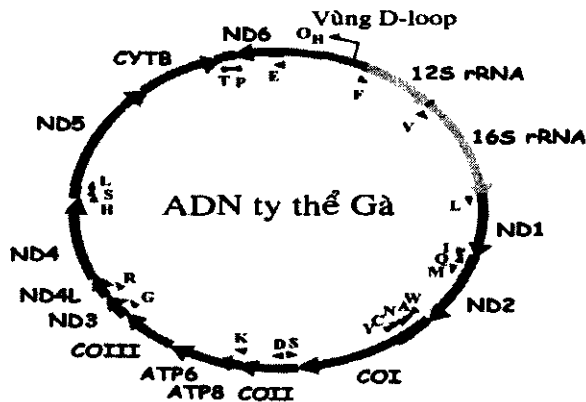
²Viện Công nghệ Sinh học

Trong tế bào trứng của động vật có xương sống, ước tính con số này lên đến 108. Hệ gen ty thể là phân tử ADN trần, kép, mạch vòng gồm 2 chuỗi: chuỗi nặng (H strand) giàu guanin và chuỗi nhẹ (L strand) giàu cytosin.

Tất cả động vật có xương sống đã được phân tích đều có 37 gen trên phân tử ADN ty thể và thường không có intron. Tuy nhiên, trật tự sắp xếp các gen trong phân tử ADN dạng vòng có thể không giống nhau giữa các loài, điều này được thể hiện rõ khi so sánh trình tự hệ gen ty thể các taxon bậc bộ trở lên.

Vì thế, các đặc điểm về trật tự các gen trên ty thể có triển vọng được sử dụng như một dấu hiệu phân loại đối với các Taxon bậc cao (Mindell D. P. và cs, 1998).

Toàn bộ hệ gen thể gà (*Gallus gallus*) được tổ chức như sơ đồ trong hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tổ chức của ADN ty thể Gà

1.2. Đặc điểm di truyền

Di truyền ty thể là di truyền theo dòng mẹ, trong thực tế có đến 99% ty thể của tế bào con thừa hưởng từ mẹ do bào quan này nằm trong tế bào chất của tế bào trứng. Tốc độ biến đổi của ADN ty thể nhanh hơn nhiều so với ADN trong nhân, có thể là do, ty thể thiếu hụt các cơ chế sửa chữa ADN. Tốc độ đột biến cao dẫn đến nhiều biến dị trong ty thể, không chỉ giữa các loài mà còn xảy ra ngay cả trong cùng một loài.

1.2.1. ADN ty thể và vai trò của vùng D-loop trong nghiên cứu đa dạng sinh học gà

Thuật ngữ D-loop được dùng để chỉ một vùng có chức năng điều khiển nằm trong mtADN. Đây là vùng không mã hóa duy nhất trong ADN ty thể.

của lớp chim và cũng là vùng liên quan đến sự mở đầu tái bản của mtADN. Ở gà nhà, vùng này có kích thước 1227 bp (Fuhimito và cs, 1994), nó chứa điểm khởi đầu sao chép và các promoter (chất hoạt hóa) cho quá trình phiên mã của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vùng điều khiển của ADN ty thể có tốc độ tiến hóa nhanh gấp 5-10 lần với các gen ty thể khác. Trình tự nucleotit của vùng D-loop là một công cụ rất hữu hiệu để đánh giá tính đa dạng di truyền và sự phân hóa bên trong loài và giữa các quần thể cùng loài. Chính vì thế mà các gen trong genôm ty thể và vùng D-loop đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong các nghiên cứu thuộc lĩnh vực phân loại học phân tử.

Moiseyeva và cs (2003) đã tìm được ít nhất 13 gen giả (pseudogene hay Numt) trong hệ gen của *G. gallus* với kích thước dao động từ 131 đến 1733 nucleotit. Đây là các đoạn ADN ty thể được tìm thấy trong hệ gen nhân của sinh vật nhân thật. Một số trong chúng có nhiều điểm tương đồng với các đoạn trong ty thể. Tuy nhiên, người ta vẫn chưa xác định được tần số bắt gặp của Numt cũng như đóng góp của nó đối với hệ gen trong nhân.

1.2.2. Nghiên cứu ADN gà trên thế giới và Việt Nam

Gà là một trong những vật nuôi phổ biến và được nuôi ở nhiều vùng trên toàn thế giới. Tuy nhiên nguồn gốc của gà nuôi chưa được thống nhất và vẫn đang được tranh cãi giữa nhiều giả thuyết khác nhau Fuhimito A. và cs. (1994). Trong hơn 30 năm qua, việc nghiên cứu ADN ty thể đã và đang được phát triển tương đối rộng rãi.

Niu D và cs, (2002) đã giải trình tự 539 nucleotit đầu tiên trong vùng D-loop của 6 chủng gà nhà (*Gallus gallus domesticus*) của Trung Quốc và so sánh dữ liệu này với trình tự ADN của 4 loài khác: *Gallus gallus*, *Gallus sonneratii*, *Gallus varius*, *Gallus lafayettei* đã được công bố trong ngân hàng gen quốc tế.

Kết quả cho thấy, 4 loài thuộc giống *Gallus* có rất nhiều điểm khác nhau. *G. g. domesticus* có mối quan hệ thân thuộc nhất với *G.g.gallus* của Thái Lan và các vùng lân cận. Nhóm nghiên cứu đã giả thiết rằng, gà nhà Trung Quốc có thể có nguồn gốc từ loài *G. gallus* ở các nơi này và hai loài phụ *G.g. gallus*, *G. g. spadiceus* có thể thuộc một loài phụ do tính tương đồng cao giữa chúng theo Olivier H. và cs. (2006).

Ở Việt Nam, các nghiên cứu ở mức độ tế bào, phân tử trên đối tượng chim nói chung và gia cầm nói riêng còn rất ít. Đã có một số nghiên cứu về sự khác biệt di truyền ở ba loài thuộc giống Gà lôi: Gà lôi lam đuôi

trắng Hà Tĩnh (*Lophura hatinhensis*), Trĩ bạc (*L nycthemera*) và gà lôi hồng tía (*L diardi*) theo Kim Thị Phương Oanh (1999).

Tác giả đã chỉ ra sự thay đổi nucleotit trên vùng D-loop ty thể của chúng dựa trên vị trí nhận biết của các enzym giới hạn *SmaI* và *EcoRI* theo (Kim Thị Phương Oanh, 1999).

Mục đích nghiên cứu này là nhằm xác định sự đa hình vùng D-Loop trong ty thể, giúp phân biệt được quan hệ di truyền và xuất xứ một số giống gà nội tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp tách chiết ADN từ mẫu máu gà

Mẫu máu của 4 giống gà nội (mỗi giống 50 mẫu) của giống gà Ri, gà Chọi, gà Tre và gà Tàu Vàng được thu thập từ các tỉnh: Thanh Hóa, Bến Tre, Bình Định và Long An. Tách chiết ADN tổng số từ mẫu máu gà, sử dụng bộ kit của Hãng Fermentas.

2.2. Nhân bản đoạn D-loop bằng kỹ thuật PCR và cắt bằng enzym giới hạn

Phản ứng PCR nhân bản đoạn D-loop với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt thích hợp.

Bảng 1. Thành phần của một hỗn hợp phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	13,25
Đệm PCR 10X	2,5
dNTPs (25 mM)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
Mồi (10 pmol/ μl) F-R	1 - 1
<i>Taq</i> Polymeraza (5 u/ μl)	0,25
ADN mẫu	3
Tổng thể tích	25

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Các bước	Khởi động hóng	Biến tính	Gắn mồi	Kéo dài	Ổn định	Giữ mẫu
Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	95	95	55	72	72	4
Thời gian	4'	1'	1'10"	1'20"	10'	∞
Số chu kỳ	1		35		1	

2.3. Tinh sạch sản phẩm PCR

Điện di toàn bộ sản phẩm PCR trên gel agarosa 0,8%, sau đó tiến hành cắt gel trên máy soi ADN, thu lấy các vạch ADN đặc hiệu. Thêm 10 μl

dung dịch MBS (Membrane Binding Solution) đối với 10 mg gel và ủ hỗn hợp ở 60 - 65°C để gel tan hoàn toàn.

Hút dịch gel hoà tan vào các vi cột, giữ ở nhiệt độ phòng trong vài phút, sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút ở 4°C và đổ dịch thừa. Bổ sung 700 µl dung dịch MWS (Membrane Wash Solution) có bổ sung ethanol 100%. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút ở 4°C, đổ dịch thừa.

Lặp lại bước trên với 500 µl dung dịch MWS, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Đổ dịch thừa và ly tâm lại trong 1 phút. Chuyển vi cột sang 1 ống 1,5 ml sạch, thêm 30 µl, giữ ở nhiệt độ phòng trong 5-10 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C, sau đó giữ mẫu ADN tinh sạch ở -20°C.

2.4. Xác định trình tự đoạn D-loop

Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng phương pháp của Sanger để xác định trình tự của đoạn D-loop. Thực hiện phản ứng PCR sử dụng Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit có chứa các hoá chất cần thiết như dNTP, ddNTP, ADN polymeraza... trên máy GenAmp PCR system 9.700.

Thành phần phản ứng

Gồm mỗi 3,2 pM, 200 ng ADN khuôn, BigDye® và nước, tổng thể tích là 15 µl.

Bảng 3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Các bước	Khởi động nóng	Biến tính	Gắn mới	Kéo dài	Giữ mẫu
Nhiệt độ (°C)	96	96	51	60	4
Thời gian	1'	10"	5"	4'	∞
Số chu kỳ	1	-	25	-	-

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng phương pháp tủa Ethanol/EDTA. Bổ sung 5µl EDTA 125 mM, 60 µl ethanol 100%, để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút, 15 phút để thu tủa ADN. Bổ sung 60 µl ethanol 70%, ly tâm 10.000 vòng/phút, 10 phút để rửa tủa. Làm khô tủa ADN và thêm 10 µl Hi_Di™ Formamide để làm tan tủa và biến tính trong 5 phút ở 95°C. Sau đó các mẫu được xác định trình tự bằng máy xác định trình tự tự động ABI PRISM™ 3.100 Genetic Analyzer. Các mẫu được điện di trong các vi mao quản 80 cm x 50 µm.

2.5. Xử lý số liệu

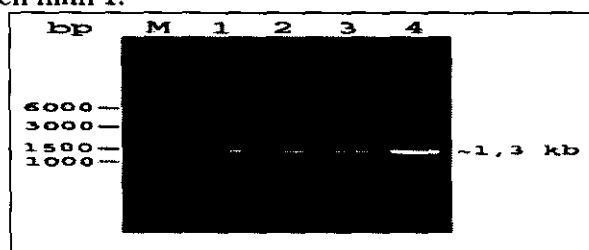
Sử dụng các phần mềm ABI PRISM™ 3.100 data collection 2.0, ADN Sequencing Analysis và sử dụng phần mềm Seqscape và BioEdit của Goudet J, (2001) để xử lý số liệu. Đánh giá đa hình gen theo Nei M, (1987) và vẽ cây phân loài theo Felsenstein L. (1993).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhân đoạn D-loop bằng kỹ thuật PCR

Để có đủ lượng mẫu phục vụ cho các thí nghiệm, tiến hành kỹ thuật PCR với sản phẩm ADN tách được từ mẫu máu của 4 giống gà nói trên, sử dụng cặp mồi H1255 và L16725. Cặp mồi này được thiết kế dựa trên trình tự hai đầu đoạn D-loop ở gà nhà và là cặp mồi bảo thủ, do đó có thể sử dụng cho nhiều đối tượng khác trong bộ gà. Theo lý thuyết, sản phẩm thu được khi nhân bản bằng cặp mồi trên có chiều dài khoảng 1,3 kb.

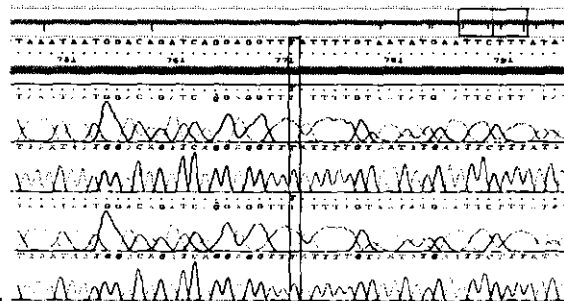
Sau khi nhân bản, tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR theo phương pháp đã trình bày và điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Kết quả được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Nhân bản đoạn D-loop bằng kỹ thuật PCR kích thước gần 1,3 kb

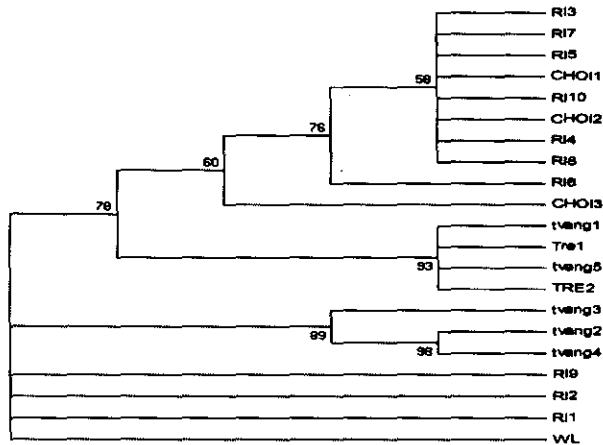
Kết quả điện di cho thấy, đã thu được sản phẩm PCR đặc hiệu. Kích thước sản phẩm PCR khoảng 1,3 kb, phù hợp với lý thuyết và kết quả của các nghiên cứu trước đó có sử dụng cặp mồi trên để nhân bản đoạn trình tự D-loop. Sản phẩm PCR được cắt bởi 3 enzym giới hạn *DraI*, *KpnI*, và *TaqI*, nhưng không xác định được đa hình tại các vị trí cắt của các enzym trên. Ngoài ra, sản phẩm PCR sau khi tinh sạch không lẫn các sản phẩm phụ không đặc hiệu, do đó có thể sử dụng trực tiếp cho thí nghiệm xử lý enzym giới hạn và xác định trình tự đoạn D-loop.

3.2. Xác định trình tự đoạn D-loop



Hình 2. Định một số điểm đa hình trên vùng D-loop ở một số mẫu nghiên cứu

1 và Tàu vàng 5). Có thể nói, trong quá trình tiến hóa và phát triển đã có một tổ tiên dòng mẹ khác lẫn vào hoặc bị tạp giao.



Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh loài của 5 giống gà

(4 giống gà nội và giống gà Leghorn lấy từ ngân hàng gen quốc tế)

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ trình tự hệ gen ty thể của giống gà nhà *Gallus gallus domesticus* đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế đã thiết kế nhân thành công đoạn D-Loop có kích thước 1,3 kb. Sản phẩm PCR được tinh sạch và cắt bởi *DraI*, *KpnI*, và *TaqI* và không xác định được đa hình tại các vị trí cắt của các enzym trên.

Xác định trình tự 300 nucleotit đoạn mt D-Loop, kết quả phân tích từ mẫu 4 giống gà Ri, Tre, Chọi và Tàu Vàng cho thấy, tuy không có sự đa hình trong các vị trí cắt của các enzym hạn chế *DraI*, *KpnI* và *TaqI* của khu vực mt D-loop nhưng có sự đột biến tại các vị trí khác nhau của chúng.

Có 21 vị trí, đặc trưng bởi sự đột biến với 4,45%, được phát hiện trong 20 trình tự ADN. Điều này chỉ ra rằng không có sự khác nhau nhiều giữa các giống và có thể chúng chỉ xuất phát từ 1 giống. Có chín kiểu đơn bội (haplotypes) trong các giống nội được nghiên cứu.

Sơ đồ cây phát sinh loài chỉ ra bốn giống gà có thể thuộc về hai dòng mẹ khác nhau, một dòng gồm có gà Ri và gà Leghorn trắng, dòng còn lại gồm: gà Tre, Tàu vàng và gà Chọi.

Trong dòng mẹ tiếp sau đó, gà Chọi có quan hệ gần với gà Ri hơn gà Tàu vàng và gà Tre. Gà Chọi khả năng rất cao có nguồn gốc dòng mẹ từ gà Ri.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu toàn bộ chiều dài đoạn D-loop số lượng mẫu lớn hơn ở tất cả 9 giống để đưa ra bức tranh hoàn chỉnh phân loại, xác định nguồn gốc các giống gà nội Việt Nam so với các giống gà khác trong khu vực và thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Felsenstein L., 1993. Phylip (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. University of Washington, Washington.D.C.

2. Fuhimito A., Miyake T., Sumi S., Takada M., Ohno S. and Kondo N., 1994. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, p.12.505 -12.509.

3. Goudet J., 2001. FSTAT, a program to estimate ADN test gene diversities ADN fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

4. Kim Thị Phương Oanh, 1999. Ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử trong nghiên cứu sự khác biệt di truyền ở một số loài gà Lôi Việt Nam. Luận văn Thạc sĩ Khoa học Sinh học. Trường Đại học Sư phạm Hà Nội - Đại học Quốc Gia Hà Nội.

5. Mindell D. P., Sorenson M. D. and Dimcheff D. E., 1998. Multi independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Mol. Biol. Evol.*, 95, p.10693 -10697.

6. Moiseyeva I. G., Romanov M. N., Nikiforov A. A., Sevastyanova A. A. and Semyenova S. K., 2003. Evolutionary relationships of Red Jungle Fowl and chicken breeds. *Genet. Sel. Evol.*, 35 (4), p.403-423.

7. Niu D., Fu Y., Luo J., Ruan H., Yu X. P., Chen G. and Zhang Y. P., 2002. The origin ADN genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genet.* 40 (5), p.163-174.

8. Nei M., 1987. Estimation of average heterozygosity ADN genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 (1978) p.583 - 590.

9. Olivier Hanotte, G. Björnstad, H. Jianlin and Thuy Le Thi, 2006. Chicken genomics & development - Origin and diversity of domestic chicken: a worldwide perspective - Brazil - May 7 - 10, 2006.

**ANALYSIS THE POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL DNA
CONTROL (D-LOOP) REGION IN FOUR VIETNAMESE
CHICKEN BREEDS: RI, CHOI, TRE AND TAU VANG**

**Le Thi Thuy, Tran Thi Kim Anh,
Nguyen Dang Ton, Dich Thi Kim Huong**

Summary

In this study, we analyzed polymorphism of four native Vietnamese chicken breeds by sequencing of their PCR amplified D-loop regions as compared with those of other chickens available in Genbank. Blood samples of native chicken breeds: "Ri", "Tre", "Choi", and "Tau Vang" (each with n=50) collected from Thanh Hoa, Ben Tre, Binh Dinh, and Long An provinces of Vietnam. Genomic DNA extracted from the blood tissues with DNA extraction kit. Conserved PCR primers:

L16750: (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3');

H1255: (5'-CATCTTGGCATCTTCAGT-GCC-3')

We attempted to purify PCR products of about 1.3 kb of D-loop region of four native chicken breeds and to digest with restriction enzymes DraI, KpnI, and TaqI. No polymorphism was observed at the restriction site of these enzymes in the D-loop region of all four native Vietnamese chicken breeds. There were 21 sites, characterized by transitions with 4.45% sequence divergence, are detected among the 20 DNA sequences, indicating a relatively low variability in the native chicken breeds. There were nine haplotypes in the native breeds studied. Four breeds belong to two different maternal lineages, one including "Ri" and White Leghorn chicken, and the other including "Tre", "Tau Vang", and "Choi" chicken. The full length D-loop sequences of these and of more chicken samples are under investigation.

Key words: *Mt-D-loop regions, genetic variation, Ri, Choi, Tre, tauvang chickens.*