

ĐA HÌNH GEN HORMON SINH TRƯỞNG CỦA MỘT SỐ GIỐNG BÒ NUÔI Ở VIỆT NAM

Trần Xuân Hoàn¹, Đinh Đoàn Long², Nguyễn Thị Quỳnh Châu¹,
Phạm Phương Mai¹ và Trần Xuân Toàn¹

¹ Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

² Bộ môn Di truyền học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Tác giả liên hệ: Trần Xuân Hoàn

Tel: (04) 2.116.165 / 0914.873.684; Fax: (04) 8.389.775; Email: hoantranvcn@yahoo.com

ABSTRACT

The polymorphisms of growth hormone gene in some cattle breeds in Vietnam

Two breeds of dairy cow were analyzed for polymorphisms in the growth hormone gene (GH): the hybrid dairy cows and HF dairy cows. The DNA polymorphisms were identified, one at a *MspI* restriction site and one at an *AluI* restriction site. The GH genotype frequencies of the hybrid dairy cows and HF dairy cows were quite different. Analysis of the hybrid dairy cows revealed the frequency of heterozygous genotype (AB) of *MspI* digestion was quite high 0.48 and the frequency of homozygous genotype (LL) of *AluI* digestion was highest 0.93. Analysis of the Moc Chau HF dairy cows indicated the frequencies of homozygous genotypes of *MspI* digestion (AA) and *AluI* digestion (LL) were very high 0.79 and 0.69, respectively. The GH genotypes of Tuyen Quang HF dairy cows was quite similar to Moc Chau HF dairy cows: the frequencies of homozygous genotypes of *MspI* digestion and *AluI* digestion were high 0.63 and 0.62, respectively. The results indicated that the GH homozygous genotypes of dairy cows had high frequency in three populations.

Keywords: DNA polymorphisms; growth hormone gene; genotype frequencies; PCR- RFLP

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, chăn nuôi bò để lấy sữa đang là một nghề rất phổ biến và được tiến hành trên nhiều tỉnh thành trong cả nước. Chọn lọc ra bò có tiềm năng di truyền cho năng suất và chất lượng sữa cao để nâng cao hiệu quả chăn nuôi bò sữa là thiết thực. Với sự phát triển nhanh của các ngành khoa học đặc biệt là công nghệ sinh học, cho phép chúng ta có thể nghiên cứu sâu đến mức độ phân tử, đánh giá được tiềm năng di truyền các gen của vật nuôi. Gần đây, nhiều gen có tiềm năng đã được phát hiện có ảnh hưởng tới các quá trình sinh lý và tình trạng sản xuất. Một trong số các gen đã chọn để tiến hành nghiên cứu là gen hormon sinh trưởng (GH) ở bò.

Nhiều nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành nghiên cứu về đa hình gen GH ở bò, cho thấy gen này có ảnh hưởng đến nhiều tính trạng sản xuất, trong đó có năng suất sữa. Andrzej Dybus (2002) đã tiến hành nghiên cứu đa hình gen hormon sinh trưởng của bò lang trắng đen của Ba Lan, cho thấy đa hình gen có ảnh hưởng tới các tính trạng sản xuất sữa của bò. Zhou và cs (2005), nghiên cứu gen GH ở bò Holstein Bắc Kinh cũng nhận thấy đa hình gen có liên quan với các tính trạng sản xuất sữa. Lucy (1993) và Yao (1996) đã phát hiện hai điểm đa hình nằm trong exon 5 của gen GH có ảnh hưởng tới tính trạng sản xuất sữa.

Từ những kết quả thu được của các nhà nghiên cứu, với mục đích đánh giá mức độ đa hình gen GH của một số giống bò sữa ở Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: *Phân tích tính đa hình gen hormon sinh trưởng của một số giống bò nuôi ở Việt nam.*

Nhằm xác định đa hình ADN và xác định kiểu gen cho từng cá thể.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng và địa điểm nghiên cứu: tổng số 206 con bò gồm:

14 bò đực giống nuôi ở trung tâm tinh đông lạnh Moncada

62 bò sữa lai nuôi ở Trung tâm nghiên cứu Bò và đồng cỏ Ba Vì

70 bò sữa thuần nuôi ở Công ty giống bò sữa Mộc Châu

60 bò sữa thuần nuôi ở Trại bò sữa Tiên Phong Tuyên Quang

Thời gian nghiên cứu: từ 9/2006 – 9/2007

Phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu máu: Máu bò lấy khoảng 0,5ml và được chống đông bằng dung dịch EDTA 0,5 M theo tỷ lệ 1 EDTA: 20 máu.

Tinh sạch ADN: Mỗi mẫu máu đã chống đông lấy 200 µl tách ADN theo kit của Hãng Fermentas.

Nhân ADN đặc hiệu (phản ứng PCR)

Sử dụng cặp mồi ký hiệu là GH1 để nhân vùng intron 3 của gen GH có trình tự như sau:

5'-CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3' Xuôi

5'-TGAGGAACTGCAGGGGCCCA-3' Ngược

Chu trình nhiệt: Sau khi biến tính ở 94°C 5', thực hiện phản ứng 35 chu kỳ như sau: 94°C trong 1', 60°C trong 50s và 72°C trong 1'. Sau đó kết thúc ở 72°C trong 10'.

Sử dụng cặp mồi ký hiệu là GH2 để nhân vùng exon 5 của gen GH có trình tự như sau:

5'-GCTGCTCCTGAGGGCCCTTCG-3' Xuôi

5'-GCGGCGGCACTTCATGACCCT-3' Ngược

Chu trình nhiệt: Sau khi biến tính ở 94°C trong 3', thực hiện phản ứng 35 chu kỳ như sau: 94°C trong 1', 61°C trong 1', 72°C trong 1'. Sau đó kết thúc ở 72°C trong 5'.

Sản phẩm PCR được cắt bằng enzym giới hạn

Sản phẩm PCR từ cặp mồi GH1 được cắt bởi enzym *MspI*

Sản phẩm PCR từ cặp mồi GH2 được cắt bởi enzym *AluI*

Điện di trên gel agarose : nhằm xác định các chỉ tiêu sau

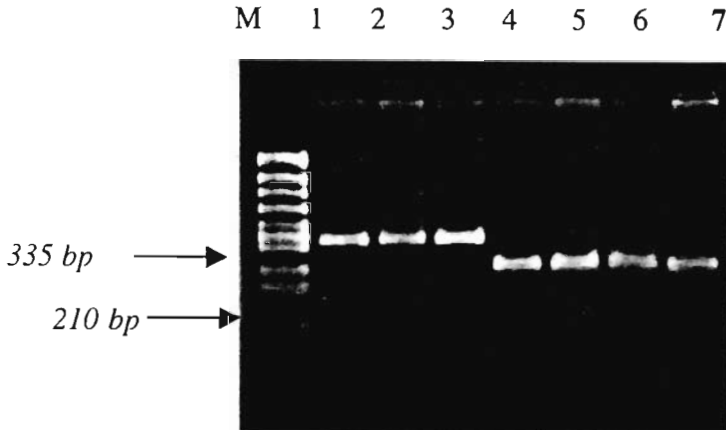
Xác định đa hình ADN: Sản phẩm PCR từ cặp mồi GH1, GH2 được cắt bằng Enzym , độ lớn các đoạn ADN được xác định bằng phương pháp điện di trên thạch agarose 2% và 2,5%, với điện thế 65v trong 60 phút trên hệ đệm TBE 1X, nhuộm bằng ethidium bromide. Các băng điện di được so đối chứng với các thang ADN chuẩn.

Xác định kiểu gen cho từng cá thể dựa vào kết quả điện di.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân ADN đặc hiệu

Sản phẩm PCR nhân lên từ hai cặp môi GH1, GH2 có kích thước tương ứng là 329 bp, 223 bp phù hợp với kết quả của Zhou (2005) và Mattos (2004). Kết quả được trình bày ở Hình 1.



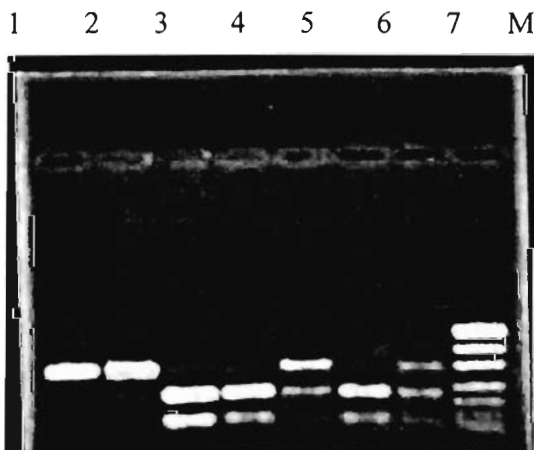
Hình 1: Sản phẩm PCR được nhân lên từ các cặp môi
M: Marker 5; 1, 2, 3: PCR môi GH1; 4, 5, 6, 7: PCR môi GH2

Qua hình 1 cho thấy sản phẩm PCR nhân lên từ cặp môi GH1 và GH2 của bò sữa lai, bò HF thuần và bò đực giống nuôi ở Việt Nam so với tài liệu đã công bố, không chỉ phù hợp về kích thước của đoạn ADN, mà còn phản ánh tính đặc hiệu của hai cặp môi. Kết quả này cho thấy các sản phẩm PCR hoàn toàn thích hợp để phân tích mức độ đa hình gen GH.

Tính đa hình gen GH

Phân tích đa hình gen GH bằng *MspI*

Sản phẩm PCR từ cặp môi GH1 khi cắt bằng *MspI* sẽ thu được 3 kiểu gen tương ứng như sau: AA khi chạy điện di thu được 2 băng có kích thước là 224 bp và 105 bp, AB thu được 3 băng có kích thước là 329 bp, 224 bp và 105 bp và BB thu được 1 băng 329 bp. Kết quả cắt sản phẩm PCR từ cặp môi GH1 được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2: Sản phẩm PCR từ cặp môi GH1 cắt bằng *MspI*
M: Marker 11; 1: Sản phẩm PCR; 2: Kiểu gen BB; 3,4,6: Kiểu gen AA; 5,7: Kiểu gen AB

Sau khi sử dụng enzym *MspI* cắt sản phẩm PCR từ cặp mồi GH1 của 206 bò, chúng tôi thấy mức độ đa hình có sự khác nhau giữa các giống bò. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Các kiểu gen GH được nhân lên bằng cặp mồi GH1 của bò

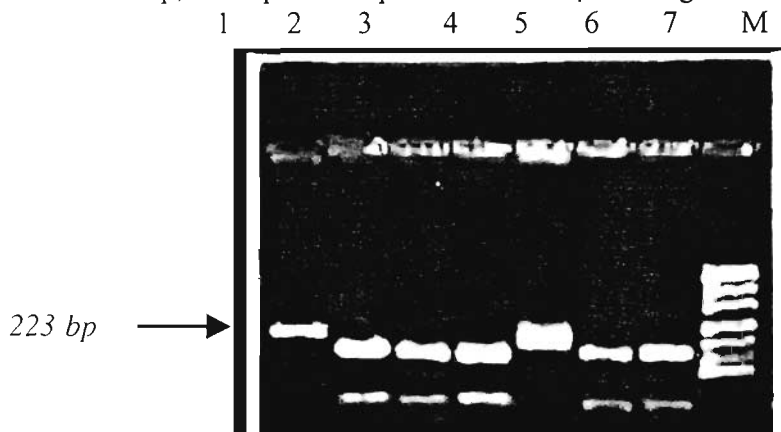
Đối tượng bò	n (cá thể)	Tỷ lệ kiểu gen AA (%)	Tỷ lệ kiểu gen AB (%)	Tỷ lệ kiểu gen BB (%)
Bò sữa lai	62	41,94	48,38	9,68
Bò sữa thuần Mộc Châu	70	78,57	20,00	1,43
Bò sữa thuần Tuyên Quang	60	63,33	31,67	5,00
Bò đực giống	14	0	100	0

Qua bảng 1 cho thấy, trong đàn bò sữa lai nuôi ở trung tâm nghiên cứu bò và đồng cỏ Ba vì có tần số kiểu gen đồng hợp AA chiếm tỷ lệ khá cao 41,94%, kiểu gen AB chiếm tỷ lệ cao nhất 48,38% và thấp nhất là kiểu gen BB chiếm tỷ lệ 9,68%. Trong khi đó, bò sữa HF thuần nuôi ở Mộc Châu và Tuyên Quang có kiểu gen AA cũng chiếm tỷ lệ cao nhất 78,57% và 63,33% và thấp nhất cũng là kiểu gen BB chiếm 1,43% và 5%. Nhưng bò đực giống thuần và lai tất cả chỉ mang kiểu gen AB. Zhou (2005) sử dụng *MspI* để phân tích đoạn gen nhân lên từ cặp mồi GH1 trên đàn bò Holstein Bắc Kinh cho thấy kiểu gen AA, AB và BB có tần số tương ứng là 0,77; 0,21 và 0,02. Tác giả cho biết bò HF mang kiểu gen AA có năng suất sữa cao hơn so với các cá thể có kiểu gen AB và BB trong cả 3 chu kỳ I, II và III.

Qua kết quả ban đầu trên cho thấy, bò đực giống mang kiểu gen AB là 100%, nên ở đàn bò lai kiểu gen AB chiếm tỷ lệ cao nhất. So với bò HF của Bắc Kinh, đàn bò sữa thuần nuôi ở Tuyên Quang và đàn bò lai của chúng ta có tỷ lệ kiểu gen BB khá cao, nhưng tỷ lệ kiểu gen BB trong đàn bò HF Mộc Châu lại khá thấp chỉ chiếm 1,43%. Trong đàn bò thuần HF tuy số n chưa lớn nhưng khả năng đàn bò sữa HF nuôi tại Mộc Châu và Tuyên Quang đã được chọn lọc tương đối tốt, nên tần số kiểu gen AA chiếm tỷ lệ cao nhất. Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của kiểu gen AA tới năng suất sữa của bò cần tiếp tục phân tích số lượng mẫu nhiều hơn và thu thập năng suất sữa của từng cá thể để tìm mối liên quan của kiểu gen với tính trạng này.

Phân tích đa hình gen GH bằng *AluI*

Cắt sản phẩm PCR từ cặp mồi GH2 bằng *AluI* thu được ba kiểu gen tương ứng như sau: LL khi chạy điện di thu được 2 băng có kích thước là 171 bp và 52 bp, LV thu được 3 băng có kích thước là 223 bp, 171 bp và 52 bp và VV thu được 1 băng là 223 bp.



Hình 3: Sản phẩm PCR từ cặp mồi GH2 cắt bằng *AluI*
M: Marker 11; 1: Sản phẩm PCR; 2,3,4,6,7: Kiểu gen LL; 5: Kiểu gen VV

Kết quả chạy điện di cắt sản phẩm PCR từ cặp mỗi GH2 bằng *AluI* được thể hiện ở Hình 3. Hình 3 cho thấy, các kiểu gen thu được sau khi sử dụng enzym cắt giới hạn *AluI* phân tích đa hình trong đoạn gen nhân lên từ cặp mỗi GH2 trên tổng số 206 con bò trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Các kiểu gen GH được nhân lên bằng cặp mỗi GH2 của bò

Đối tượng bò	n (cá thể)	Tỷ lệ kiểu gen LL (%)	Tỷ lệ kiểu gen LV (%)	Tỷ lệ kiểu gen VV (%)
Bò sữa lai	62	95,2	3,2	1,6
Bò sữa thuần Mộc Châu	70	68,57	28,57	2,86
Bò sữa thuần Tuyên Quang	60	61,67	35,0	3,33
Bò đực giống	14	0	100	0

Qua bảng 2 cho thấy bò sữa lai và bò sữa HF thuần Mộc Châu, Tuyên Quang có kiểu gen LL tương ứng là 95,2%; 68,57% và 61,67%. Kiểu gen VV ở cả hai giống bò của ba quần thể tương ứng là 1,6%; 2,86% và 3,33%. Nhưng bò đực giống cũng chỉ duy nhất có một kiểu gen LV. Andrzej Dybus (2002) cho biết bò đen-trắng Ba lan có kiểu gen LL chiếm tỷ lệ cao nhất 65,3% và thấp nhất là kiểu gen VV 2,3%. Tác giả cho biết bò mang kiểu gen LL cho năng suất sữa cao hơn so với kiểu gen LV và VV. Theo Lucy (1993) bò Holstein-Friesian mang kiểu gen LL có năng suất sữa cao hơn bò có kiểu gen LV.

Qua kết quả phân tích đa hình gen GH của đàn bò sữa lai và bò sữa thuần HF cho thấy bò đực giống chỉ có một kiểu gen dị hợp tử, nhưng bò sữa có kiểu gen đồng hợp LL khá cao ở cả hai giống, điều này cho thấy khả năng kiểu gen này có ảnh hưởng đến kiểu hình của bò sữa, nên sự chọn lọc theo kiểu hình để có bò cho năng suất sữa cao của chúng ta đã ảnh hưởng đến tần số kiểu gen của cả đàn, dẫn đến các kiểu gen cho năng suất sữa cao đã chiếm tỷ lệ cao nhất.

Các kiểu gen GH của bò

Như vậy về mặt lý thuyết khi sử dụng các enzym *MspI* và *AluI* để cắt các sản phẩm PCR từ cặp mỗi GH1, GH2 tương ứng của gen GH tối đa sẽ thu được 9 kiểu gen khác nhau. Nhưng trong thực tế khi phân tích trên 62 bò sữa lai, 130 bò sữa HF và 14 bò đực giống chúng tôi thu được 7 kiểu gen. Số cá thể mang các kiểu gen này cũng khác nhau ở các giống. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Phân bố các kiểu gen GH của bò

Các kiểu gen		Bò sữa lai (cá thể)	Bò sữa thuần Mộc Châu (cá thể)	Bò sữa thuần Tuyên Quang (cá thể)	Bò đực giống (cá thể)
GH1	GH2				
BB	LL	6	1	3	
AA	VV		2	1	
AA	LL	24	38	18	
AA	LV	2	15	19	
AB	VV	1		1	
AB	LL	25	9	16	
AB	LV	4	5	2	14
Tổng số cá thể		62	70	60	14

Qua bảng 3 cho thấy, bò sữa lai có 6 kiểu gen/9 tổ hợp theo lý thuyết trong đó kiểu gen AA LL và AB LL có tần số xuất hiện cao nhất. Trong khi đó bò sữa HF Mộc Châu có 6 kiểu

gen/ 9 tổ hợp theo lý thuyết và kiểu gen AA LL có tần số xuất hiện cao nhất (38/70 cá thể). Bên cạnh đó, bò sữa thuần Tuyên Quang thu được 7 kiểu gen/9 tổ hợp theo lý thuyết và kiểu gen AA LL và AA LV có tần số xuất hiện cao nhất. Còn bò đực chỉ có duy nhất 1 kiểu gen/ 9 tổ hợp gen. Kết hợp các kết quả nghiên cứu của Zhou (2005) và Lucy (1993) cho thấy bò mang kiểu gen AA LL có năng suất sữa cao nhất. Trong khi đó tỷ lệ kiểu gen này ở một số quần thể bò của chúng ta là khá cao. Điều này phản ánh tiến bộ di truyền của chúng ta trong công tác chọn giống bò sữa.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Sử dụng enzym *MspI* phân tích đa hình gen GH cho thấy mức độ đa hình giữa các giống bò là khác nhau. Bò HF Mộc Châu và Tuyên Quang kiểu gen AA chiếm tỷ lệ cao nhất 78,57% và 63,33%, ở bò sữa lai kiểu gen AA và AB có tỷ lệ tương ứng là 41,94% và 48,38%, nhưng bò đực giống chỉ có kiểu gen AB.

Sử dụng enzyme *AluI* phân tích đa hình gen GH cho thấy bò sữa có tỷ lệ kiểu gen LL rất cao 95,2% ở bò sữa lai, 68,57% và 61,67% tương ứng ở bò sữa HF thuần Mộc Châu, Tuyên Quang và kiểu gen LV thấp nhất, trong khi đó ở bò đực giống chỉ có một kiểu gen LV.

Phân tích đa hình gen GH của bò bằng hai enzyme *MspI* và *AluI* đã phát hiện được 6 kiểu gen ở bò sữa lai, 6 kiểu gen ở bò sữa HF Mộc Châu, 7 kiểu gen bò sữa thuần Tuyên Quang và một kiểu gen ở bò đực giống trên tổng số 9 kiểu gen mong đợi, trong đó kiểu gen AA LL có tần số cao nhất ở bò sữa lai và bò sữa HF.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andrzej Dybus (2002). "Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and-White cattle." *Arch. Tierz, Dummerstorf* 45: pp. 421-428
- Lucy M.C, Hauser S.D, Eppard P.J, Krivi G.G, Clark J.H, Bauman D.E, Collier R.J (1993). "Variant of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breed and associated milk production." *Domestic Animal Endocrinology*, 10: pp.325-333
- Mattos K. K, Silvia Nassif Del Lama, Mario Luiz Martinez and Ary Ferreira Freitas (2004). "Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls." *Pesq. agropec. bras.*, Brasilia version 39, 2: pp.147-150
- Yao J, Aggerrey S.E, Zadworny D, Hayes J. E and Kuhnlein U (1996). "Sequence variation in the bovine growth hormone gene characterized by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holstein." *Genetics* 144: pp.1809-1816
- Zhou G.L, Jin H. G, Chen L, Guo S. L, Zhu Q and Wu Y. H (2005). " Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows." *J. Biosci*, 30 (5): pp.595-598

*Người phản biện: Ths. Phạm Doãn Lâm ; Ths: Nguyễn Trọng Bình