

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN MÃ HÓA 18S rRNA CỦA MỘT SỐ LOÀI CÁ KINH TẾ BIỂN ĐÔNG*

Cao Xuân Hiếu, Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương
Nguyễn Đăng Tôn, Lê Thị Thu Hiền, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG
Bùi Đình Chung
Viện Nghiên cứu Hải sản Hải Phòng
Trịnh Đình Đạt
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam có nguồn tài nguyên sinh vật biển rất phong phú và đa dạng. Việc nghiên cứu và định hướng khai thác một cách hợp lý nguồn tài nguyên này, trong đó có các loài cá có giá trị kinh tế cao (cá Nục, cá Ngừ, cá Bạc má, cá Song, cá Mối vạch, cá Chim trắng...) phục vụ nhu cầu chế biến thực phẩm và xuất khẩu, có ý nghĩa kinh tế xã hội cực kỳ quan trọng. Các hoạt động nghiên cứu về nguồn lợi cá biển và hải dương học đã và đang được Viện Nghiên cứu Hải sản [1], Viện Hải dương học Nha Trang, và các Viện nghiên cứu khác tiến hành. Bên cạnh các nghiên cứu về đặc điểm hình thái và sinh học, tính đa dạng của các loài cá kinh tế này, cấu trúc chủng quần của chúng cũng như các nghiên cứu về tập tính, di cư và đánh giá nguồn lợi kinh tế của chúng, đều cần thiết phải được nghiên cứu kỹ hơn.

Cho đến nay, các nghiên cứu về sinh vật biển ở nước ta vẫn chủ yếu là sử dụng các phương pháp nghiên cứu như: phương pháp hình thái so sánh, phương pháp giải phẫu so sánh, phương pháp cá thể phát triển, phương pháp sinh thái... Trong khi đó, những năm gần đây trên thế giới người ta đã và đang ứng dụng rộng rãi các kỹ thuật phân tích DNA (RAPD, SSR, AFLP, xác định trình tự nucleotit của các gen, vào các nghiên cứu về cá theo hướng trên và đã thu được nhiều kết quả khả quan, có giá trị mà với các phương pháp trước đây không thể có được [2,4].

Trong công trình này, chúng tôi thông báo một số kết quả nghiên cứu cơ bản về phân tích trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA ở một số loài cá kinh tế Biển Đông. Thông qua đó, công trình góp phần đánh giá quan hệ chủng loại phát sinh của chúng nhằm định hướng cho việc bảo tồn và khai thác nguồn tài nguyên cá biển của nước ta.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 5 mẫu cá từ các loài Bạc má (*Rastrelliger kanagurta*), Chim trắng (*Pampus argenteus*), Hồ (*Trichiurus haumela*), Nục sò (*Decapterus maruadsi*), và Sông gió (*Torpedo scad*) được thu thập tại Viện Nghiên cứu Hải sản Hải Phòng. Các trình tự đoạn gen 18S rRNA đã công bố trên ngân

Bảng 1. Các loài cá biển có trình tự gen mã hóa 18S rRNA được sử dụng để phân tích cây phát sinh chủng loại

TT	Tên loài	Viết tắt	Số hiệu taxon (*)	Tên Tiếng Việt	Mã số GENBANK (†)
1 ^a	<i>Pampus argenteus</i>	<i>P. argenteus</i>	206143	Chim trắng	
2 ^a	<i>Rastrelliger kanagurta</i>	<i>R. kanagurta</i>	70446	Bạc má	
3 ^a	<i>Trichiurus haumela</i>	<i>T. haumela</i>	13733	Hồ	
4 ^a	<i>Decapterus maruadsi</i>	<i>D. maruadsi</i>	58220	Nục sò	
5 ^a	<i>Torpedo scad</i>	<i>T. scad</i>	70732	Sông gió	
6 ^b	<i>Chrysophrys major</i>	<i>C. major</i>	143350		AB028214
7 ^b	<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>O. mossambicus</i>	8127		AF497908
8 ^b	<i>Oreochromis esculentus</i>	<i>O. esculentus</i>	40191		AF337051
9 ^b	<i>Acanthopagrus latus</i>	<i>A. latus</i>	8177		AB089345
10 ^b	<i>Lateolabrax japonicus</i>	<i>L. japonicus</i>	8164		AB089346
11 ^b	<i>Dentex dentex</i>	<i>D. dentex</i>	94951		AB089347
12 ^c	<i>Polyodon spathula</i>	<i>P. spathula</i>	7913	Tầm thia Mississippi	X98838

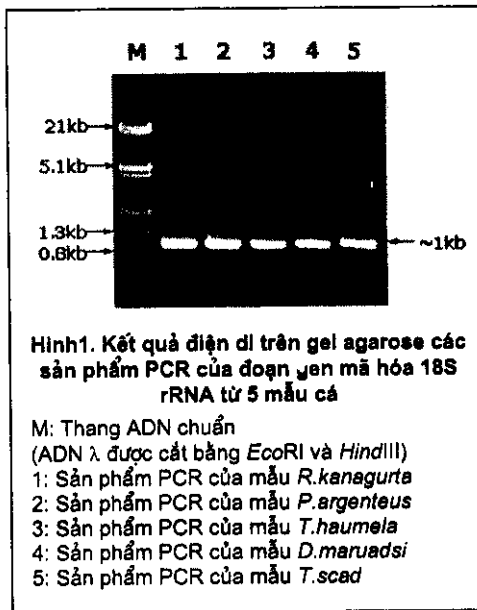
^a Các loài cá được xác định trình tự gen mã hóa 18S rRNA là kết quả của nghiên cứu này
^b Các loài cá thuộc Bộ Cá Vược (Perciformes) có trình tự gen mã hóa 18S rRNA đã được công bố trên ngân hàng Genbank; ^c Loài cá thuộc Bộ Cá Tầm (Acipenseriformes) được sử dụng đóng vai trò là nhóm ngoại trong các phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại
(*) Số hiệu của loài trong ngân hàng Taxonomy; (†) Số hiệu trong ngân hàng Genbank của các trình tự gen mã hóa 18S rRNA của loài được sử dụng

* Đề tài thuộc chương trình NCCB trong khoa học tự nhiên.

hàng gen EMBL/GENBANK/DDBJ sử dụng trong nghiên cứu phân loại được thống kê trong bảng 1.

Phương pháp nghiên cứu

DNA genom từ các 5 mẫu cá được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp proteinase K/Phenol của Ausubel và cộng sự (Ausubel L. G. et al., 1993). Đoạn gen mã hóa 18S rRNA được nhân bằng PCR sử dụng cặp primer CA18R(5'- GAG AGG GAG CCT GAG AAA CG-3')/ CA18F(5'- GGC ATC ACA GAC CTG TTA TTG C-3'). Thành phần phản ứng gồm 500ng DNA tổng số, 10pM mỗi primer, 0,625 unit Taq polymerase, 2,4mM MgCl₂, 1mM dNTP và đệm tương ứng trong tổng thể tích 25μl với chu trình nhiệt trên máy luân nhiệt GenAmp® PCR System 9700 như sau: 94°C 3 phút, 30 chu kỳ (94°C 30 giây, 48°C 30 giây, 72°C 1 phút 20 giây), 72°C 10 phút, sau đó giữ ở 4°C.



Sản phẩm PCR được chọn dòng bằng vector pCR®2.1-TOPO® trong chủng *E.coli* TOP10F'. Đoạn gen mã hóa 18S rRNA được xác định trình tự trên máy tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer bằng cách sử dụng Bộ hóa chất sinh chuẩn BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Phản ứng PCR đọc trình tự được tiến hành trên máy luân nhiệt GenAmp® PCR System 9700 trong 25 chu kỳ gồm các bước luân nhiệt: 96°C, 10 giây; 50°C, 5 giây; 60°C 4 phút. Sản phẩm được tinh sạch bằng phương pháp tủa EtOH/EDTA và biến tính bằng Hi-Di™ Formamide tại 95°C trong 5 phút. Các mẫu được điện di trong ống mao quản 80-cm X 50-μm với polymer POP-4™ của hãng ABI, USA.

Trình tự nucleotit của mỗi mẫu được xác định từ cả 2 chiều xuôi và ngược, và được xử lý bằng các phần mềm ABI PRISM® 3100-Avant Data Collection v1.0 và DNA sequencing Analysis. Các trình tự của 5 mẫu trong thí nghiệm được phân tích về mặt phân loại học phân tử với 7 trình tự đã được công bố trên ngân hàng GenBank bằng phần mềm ClustalX, bộ phần mềm PC/GENE v1.8 và bộ phần mềm PHYLIP v3.6.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi đã tách chiết và tinh sạch DNA genom từ các mẫu cá đủ chất lượng để làm khuôn cho quá trình nhân đoạn gen mã hóa 18S rRNA. Kết quả điện di đồ cho thấy bằng DNA chứa đoạn gen này được nhân đặc hiệu và có nồng độ cao (hình 1). Sản phẩm PCR được chọn dòng trong vector pCR®2.1 TOPO® của hãng Invitrogen và được xác định trình tự bằng Bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing của hãng ABI, USA.

Các trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA của 5 mẫu cá được so sánh bắt cặp dựa trên đoạn trình tự của loài *O.esculentus* bằng phần mềm ClustalX cho thấy các điểm đa dạng của đoạn trình tự này giữa các loài cá biển thuộc Bộ Cá Vược trong nghiên cứu này (hình 2). Bằng cách so sánh bắt cặp 11 loài cá thuộc Bộ Cá Vược đã công bố đoạn gen tương ứng và 1 loài cá thuộc Bộ Cá Tầm bằng phần mềm ClustalX với giá trị Bootstrap là 1000 và các thông số so sánh mặc định (Thompson và cs, 1997), chúng tôi đã phác họa sơ bộ cây phân loại cladogram xây dựng bằng thuật giải Liên kết Nhóm bên (Neighbour-Joining) trong hình 3a.

Bảng 2. Bảng thống kê tỉ lệ % tương đồng (ma trận tam giác dưới) và khoảng cách di truyền (D) (ma trận tam giác trên) giữa các loài cá trong Bộ Cá Vược (Perciformes)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*
1. AF51	-	0.0009	0.0066	0.0094	0.0113	0.0113	0.0142	0.0085	0.0171	0.0133	0.0210
2. AF08	99.91	-	0.0056	0.0085	0.0104	0.0104	0.0132	0.0075	0.0161	0.0123	0.0200
3. <i>P.argenteus</i>	98.78	98.88	-	0.0028	0.0066	0.0066	0.0094	0.0038	0.0123	0.0085	0.0161
4. <i>R.kanagurta</i>	99.06	99.16	99.16	-	0.0056	0.0075	0.0047	0.0113	0.0113	0.0113	0.0171
5. <i>T.haumela</i>	98.78	98.88	98.06	99.25	-	0.0094	0.0104	0.0066	0.0132	0.0113	0.0190
6. <i>D.maruadsi</i>	98.97	99.06	98.78	99.25	98.88	-	0.0066	0.0085	0.0152	0.0132	0.0210
7. <i>T.scad</i>	98.59	98.69	98.05	99.16	98.78	99.34	-	0.0094	0.0161	0.0161	0.0219
8. AB14	99.16	99.25	99.06	99.53	99.25	99.25	99.06	-	0.0123	0.0066	0.0123
9. AB46	98.31	98.41	98.22	98.88	98.50	98.50	98.41	98.78	-	0.0123	0.0161
10. AB45	98.50	98.59	98.41	98.69	98.41	98.59	98.22	99.16	98.59	-	0.0104
11. AB47	97.75	97.84	97.66	98.13	97.84	97.84	97.66	98.59	98.22	98.59	-

Tỷ lệ phần trăm tương đồng của từng cặp trình tự của các loài trong Bộ Cá Vược từ chương trình NALIGN của PC/GENE được thống kê dưới dạng ma trận tam giác dưới (bảng 2). Độ tương đồng cao giữa các loài trong Bộ (trung bình khoảng 98.68%) cho thấy đoạn gen này tương đối bảo thủ và thích hợp cho các nghiên cứu với các đơn vị phân loại trên loài.

Khoảng cách di truyền (D) giữa các loài được xác định theo thuật giải Kimura 2 thông số (Kimura, 1980) với tính đa hình đồng đều ở mọi vị trí trên đoạn gen và tỷ lệ đặt tỷ trọng đa hình (weighted) của đột biến hoán đổi (transition) đối với đột biến chuyển ngược (transversion) là 2,0. Các khoảng cách này được thống kê dưới dạng ma trận tam giác trên (bảng 2). Cây chủng loại phát sinh từ khoảng cách di truyền

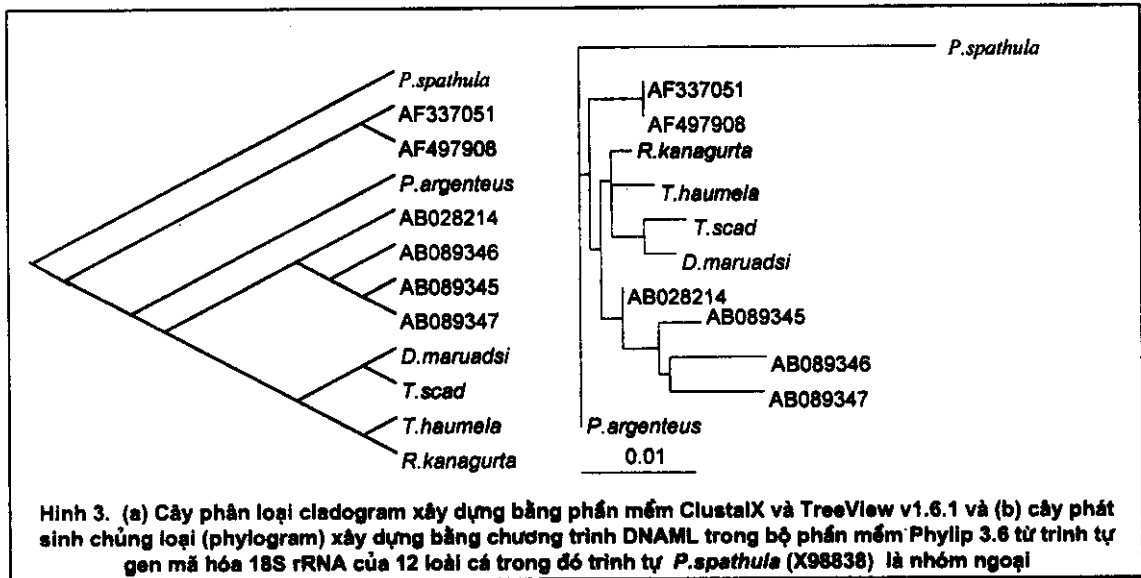
CCAGCAGCCCGGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATCTTAAAGTGTGTCAGTTAAAAAG	AF337051
.....	Pampus
.....	Rastrelliger
.....	Trichiurus
.....C.....	Decapterus
.....	Torpedo
CTCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGACGGTCCGCCGCGAGGAG-GCTACCGTCTGTC	AF337051
.....C.A.....	Pampus
.....C.A.....	Rastrelliger
.....G.....	Trichiurus
.....C.A.....C.....	Decapterus
.....C.A.....C.....	Torpedo
CCAGCCCCCTGCCTCTCGGGCCCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCGGGGGTCCGA	AF337051
.....A.....	Pampus
.....A.....A.....	Rastrelliger
.....C.....	Trichiurus
.....	Decapterus
.....	Torpedo
AGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCMAAGCAGGCCGGTCCGCTGAATACCGCAG	AF337051
.....	Pampus
.....	Rastrelliger
.....	Trichiurus
.....T.....	Decapterus
.....T.....	Torpedo
CTAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTTCTATTTTGGGGTTTCT--CTCTGAACTGGG	AF337051
.....--.....	Pampus
.....T--.....	Rastrelliger
.....T-.....	Trichiurus
.....TT.....	Decapterus
.....T--.....	Torpedo
GCCATGATTAGAGGGACGCCGGGGGCATTTCGTATTGTGCCGCTAGAGGTGAAATCTT	AF337051
.....	Pampus
.....	Rastrelliger
.....	Trichiurus
.....	Decapterus
.....	Torpedo

Hình 2. Kết quả so sánh một đoạn gen mã hóa 18S rRNA của 5 loài cá với trình tự của loài *Oreochromis esculentus* (AF337051)

của các đoạn trình tự (khoảng 1kb) của gen mã hóa 18S rRNA từ 11 loài cá biển thuộc Bộ Cá Vược (Perciformes) và 1 loài từ Bộ Cá Tầm (Acipenseriformes) theo phương pháp maximum likelihood (ML) bằng chương trình DNAML thuộc bộ phần mềm PHYLIP v3.6. Trên cây phân loại (Hình 3b), hai loài *O. mossambicus* (AF497908) và *O. esculentus* (AF337051) thuộc chi *Oreochromis* (D: 0,0009) cũng như hai loài Cá Nục *D. maruadsi* và Cá sòng *T. scad* nằm cùng họ Carangidae (D: 0,0066) đều nằm cạnh nhau trong nhánh tiến hóa.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập và xác định trình tự của đoạn gen mã hóa 18S rRNA từ 5 loài cá kinh tế biển (Bạc má (*Rastrelliger kanagurta*), Chim trắng (*Pampus argenteus*), Hồ (*Trichiurus haumela*), Nục sò (*Decapterus maruadsi*), và Sòng gió (*Torpedo scad*)). Các trình tự này là hoàn toàn mới đối với các loài cá nói trên và đang được đăng ký trên ngân hàng EMBL/GenBank/DBJ. Kết quả phương pháp so sánh bắt cặp ClustalX và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng chương trình DNAML của bộ phần mềm Phylip cho thấy có thể sử dụng đoạn trình tự gen này để phục vụ các nghiên cứu phân loại học phân tử đối với các loài cá kinh tế biển Đông trong Bộ Cá Vược.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Đình Chung, Chu Tiến Vinh, Nguyễn Phi Đình, 1998. *Đặc điểm sinh học của một số loài cá nổi di cư thuộc giống cá Nục, Cá Bạc má và Cá Ngừ ở vùng biển Việt Nam*. Tuyển tập các công trình nghiên cứu nghề cá biển. Nxb Nông nghiệp, T1, tr132-141.
2. Nông Văn Hải, Lê Thị Thu Hiền, Kim Thị Phương Oanh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Đăng Tôn, Đặng Văn Hạnh, Nguyễn Huy Hoàng, Trần Thị Phương Liên, Lê Trần Bình, 1999. *Ứng dụng công nghệ ADN trong nghiên cứu tài nguyên động vật và thực vật Việt Nam*. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, tr 1197-1204.
3. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Mocr D., Seidman J.G., Smith J.A., Stürl, 1993. *Short protocol in molecular biology. Third edition*.
4. David M. Hillis, Craig Moritz, Barbara K.Mabke, 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc., Second edition.

SUMMARY

SEQUENCE ANALYSIS OF 18S rRNA GENES FROM FIVE EASTERN SEA FISHES

**Cao Xuan Hieu, Nguyen Dinh Cuong, Nguyen Thuy Duong
 Nguyen Dang Ton, Le Thi Thu Hien, Le Tran Binh, Nong Van Hai
 Institute of Biotechnology, NCST
 Bui Dinh Chung
 Research Institute of Marine Products, Haiphong
 Trinh Dinh Dat
 University of Natural Sciences, VNU, HN**

An approximate 1kb partial sequences of the 18S rRNA gene from five Eastern sea economic fish species (*Rastrelliger kanagurta*, *Pampus argenteus*, *Trichiurus haumela*, *Decapterus maruadsi* and *Torpedo scad*) were determined by the ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer. These novel nucleotide sequences were aligned with those known from others of Perciformes species and used to infer phylogenetic relationships by using maximum likelihood method DNAML. Phylogenetic analyses are congruent with the data based on morphological evidence. We suggest that this partial 18S rRNA gene sequences may be too conserved for phylogenetic inference among species, but are well suited for the analysis within and among closely related Perciformes genera of marine fishes.