

ĐA HÌNH DNA CỦA MỘT SỐ GEN Ở GÀ NUÔI VIỆT NAM

Đỗ Võ Anh Khoa¹, Nguyễn Thị Kim Khang¹, Nguyễn Thị Diệu Thúy²

¹Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Trục somatotrophic là một hệ thống các hormone kiểm soát và điều hòa sự tăng trưởng và phát triển bình thường, các hormone này rất cần thiết cho sự tăng trưởng, phát triển và điều hòa sự trao đổi chất và được xem là các tiềm năng đầy hứa hẹn cho việc tạo ra các tính trạng có giá trị kinh tế ở vật nuôi. Chính vì vậy, nghiên cứu này đã sử dụng 8 cặp mồi gen đặc hiệu để đánh giá các điểm đa hình gen GH, GHR, GHSR và insulin trên một số giống gà được nuôi ở Việt Nam như gà Tàu Vàng (công CTU-LA01 và CTU-LA01, n=152), gà Nòi (n=38) và gà thịt Cobb500 (n=32). Mẫu DNA được tách chiết từ cơ cớ của gà được sử dụng như là khuôn mẫu để khuech đại các đoạn mồi đặc hiệu bằng phương pháp PCR. Để xác định các điểm đa hình đơn trên các gen ứng viên, kỹ thuật PCR-RFLP được sử dụng dựa trên sự hỗ trợ của các enzyme phân cắt giới hạn. Tần số kiểu gen được xác định bằng phương pháp Chi-square. Kết quả phân tích gen cho thấy có sự khác nhau về kiểu gen giữa các giống gà ở 6/8 cặp mồi của các gen. Sự khác nhau này tuân theo định luật Hardy-Weinberg. Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng đa hình gen với các tính trạng năng suất và chất lượng thân thịt gà.

Từ khóa: các giống gà, đa hình, kiểu gen, gen, PCR-RFLP

MỞ ĐẦU

Sự đa dạng di truyền ở các giống địa phương là một trong những mối quan tâm chủ yếu trong việc bảo tồn các nguồn di truyền động vật, cung cấp thông tin di truyền hỗ trợ chọn tạo giống theo các tình trạng kinh tế quan tâm. Chính vì vậy, việc cung cấp các thông tin về sự đa dạng di truyền của các giống địa phương là rất cần thiết. Gà Tàu vàng, gà Nòi là một trong những giống gà địa phương ở Việt Nam được nuôi chủ yếu ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long và cũng là những giống cầm được bao tồn bởi những đặc tính quý của chúng về chất lượng thân thịt, sức khỏe.. nhưng cho đến nay các giống gà này chưa được nghiên cứu sâu.

Hormon sinh trưởng (GH) là một trong những chất điều tiết quan trọng của quá trình tăng trưởng và sự trao đổi chất ở vật nuôi được tổng hợp và tiết ra ở tuyến yên, có ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng, năng suất trứng, thành phần thân thịt, kiểm soát sự ngon miệng, tuổi và năng suất sinh sản (Vasaitos-Younken et al., 2000). Kết quả nghiên cứu của Fotouhi et al., (1993) đã xác định được bốn điểm đa hình nằm ở vùng intron trong đó có 3 điểm đa hình được xác định bởi enzyme *Msp*I và 1 điểm đa hình được cắt bởi *Sac*I. Các nghiên cứu cho thấy có sự kết hợp giữa các điểm đa hình này với các tính trạng về năng suất trứng, khối lượng cơ thể của gà, khối lượng ức, tỷ lệ thịt ức, tỷ lệ mỡ bụng, sức đề kháng... (Kuhnlein et al., 1997; Nie et al., 2002; Mehdi và Reza, 2012).

Sự liên kết giữa GH và GHR receptor (GHR) gây ra sự nhạy trung hóa thụ thể (receptor dimerization) bằng cách đợt tín hiệu thông qua tế bào chất ảnh hưởng đến sự điều hòa quá trình phiên mã của các gen khác như IGF-I, các enzyme trao đổi chất, và các nhân tố phân mầm. Ở gà gen GHR liên kết với tình trạng cơ thể của gà (Burnside et al., 1992) và khối lượng cơ thể (Feng et al., 1997).

Ghrelin (GHS) là gốc kết hợp nội sinh của GHSR, được tiết ra chủ yếu ở dạ dày nhằm phản ứng lại cảm giác đói của vật nuôi ngoài ra nó cũng được tổng hợp ở vùng dưới đồi và các tế bào ngoại vi khác. Ghrelin kích thích sự phóng thích GH bằng 2 hoạt động ở các tế bào GHRH dưới đồi và các tế bào somatotroph ở thùy trước tuyến yên. Hormon này làm tăng mức ăn vào và làm giảm sức tăng trưởng ở động vật (Pecker et al., 2004). Đối với gen GHSR bao gồm 2 exon và 1 intron (Tanaka et al., 2003).

Một gen khác là insulin cũng có vai trò quan trọng trong sự phát triển của tế bào gan, cơ và mô mỡ. Kết quả nghiên cứu của Qiu et al., (2006) cho thấy các điểm đa hình của insulin gen liên kết với sự tăng trưởng của gà giai đoạn 0 và 28 ngày tuổi và một số tính trạng khác thân thịt của gà.

Như đã đề cập ở trên, các gen GH, GHR, GHSR và insulin mã hóa các nhân tố chủ yếu kiểm soát sự sinh trưởng ở vật nuôi là những gen ứng viên quan trọng để xác định các dấu di truyền cho sự tăng trưởng, các tính trạng thân thịt và năng suất sinh sản của vật nuôi. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá sự đa hình của các gen này bằng phương pháp PCR-RFLP, đây sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu về phân tích tương quan giữa kiểu gen và tính trạng trên giống gà Tàu vàng nhằm thiết lập chương trình chọn giống hỗ trợ bởi các chỉ thị phân tử (Marker Assisted Selection – MAS).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Tổng cộng có 222 mẫu cơ ức gà được thu thập từ 03 giống gà khác nhau, trong đó có 152 con gà thuộc giống gà Tàu vàng (từ 2 dòng CTU-LA01 và CTU-BT01), 38 con gà Nòi (hai giống gà địa phương Việt Nam có tốc độ tăng trưởng thấp nhưng có phẩm chất thịt thơm ngon) và 32 con gà thịt Cobb500 (gà thịt công nghiệp với tốc độ tăng trưởng nhanh và hiếu chuộng hóa thức ăn thấp).

Phương pháp

Tách chiết ADN

Mẫu cơ cát của các gà được lấy ngay sau khi giết mổ và được sử dụng cho việc tách chiết DNA. Mẫu cơ được cắt thành những mảnh nhỏ và ủ với 700 µl dung dịch tiêu hóa, 70 µl sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% và 18 µl proteinase K. Khoản hợp được ủ ở tủ ấm 56°C qua đêm. Bổ sung thêm vào 700 µl phenol:chloroform (1:1), lắc nhẹ tuyp và ly tâm ở 10,000g trong 10 phút. Dùng pipette để chuyển dung dịch lỏng ở phía trên sang tuyp 2ml mới và cho vào 700 µl chloroform, lắc nhẹ để trộn đều mẫu sau đó đem ly tâm ở 10,000 g trong 10 phút. Dùng pipette để hút dung dịch lỏng ở phía trên sang tuyp 2ml mới và cho tiếp vào 700 µl Isopropanol và 70 µl 3M NaOAc, lắc nhẹ để dung dịch chứa DNA kết tủa hoàn toàn, đem ly tâm ở 10,000 g trong 5 phút. Dung dịch lỏng ở phía trên được loại bỏ sau khi ly tâm. Cho tiếp 70% Ethanol vào để loại bỏ phần Isopropanol và muối còn dinh dưỡng ở mẫu DNA, đem ly tâm 10,000 g trong 5 phút. Loại bỏ ethanol và làm khô mẫu DNA ở nhiệt độ phòng trong 15 – 20 phút. Cho 500 µl dung dịch hòa tan 1XTE vào và lưu giữ mẫu ở nhiệt độ phòng qua đêm, sau đó đem trú mẫu DNA đã tách chiết ở -20°C cho đến khi sử dụng. Nồng độ DNA được đo ở bước sóng 260 và 280 nm, và được đem đi pha loãng sao cho nồng độ DNA sử dụng có giá trị là 50 ng/µl.

Phương pháp PCR-RFLP

Phản ứng nhân bản các đoạn DNA của các giống gà với các cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1) được thực hiện với tổng thể tích cho mỗi phản ứng là 20 µl trong đó chứa 2 µl PCR buffer, 0,5 µl 200mM dNTPs, 0,5 µl mồi xuôi, 0,5 µl mồi ngược, 0,25 µl 1U Taq polymerase, 2 µl mẫu DNA (50ng/µl) và nước cất 2 lần vừa đủ. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu ở 94°C trong 3 phút, tiếp tục 35 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, 58-62°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây, và kết thúc chu kỳ cuối ở 72°C trong 5 phút, và được lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được chạy trên mài trường thạch agar 2% nhuộm với ethidium bromide trong 15 phút và được quan sát dưới tia tử ngoại (UV) và được so sánh với kích thước của thang chuẩn DNA.

Các sản phẩm PCR được ủ với 1 µl enzyme giới hạn ở 37°C (Bảng 1). Sản phẩm PCR-RFLP được đếm điện di trên màng trường thạch agar 3% được nhuộm với ethidium bromide trong 30 phút và các band DNA được quan sát và ghi nhận dưới tia UV (Hình1).

Bảng 1. Thông tin các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Xử lý số liệu

Các điểm đa hình về tần số kiểu gen của các gen ở các giống gà được phân tích bằng phần mềm SNPStats (Solé et al., 2006) và định luật cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) được đánh giá bằng kiểm định Chi-square.

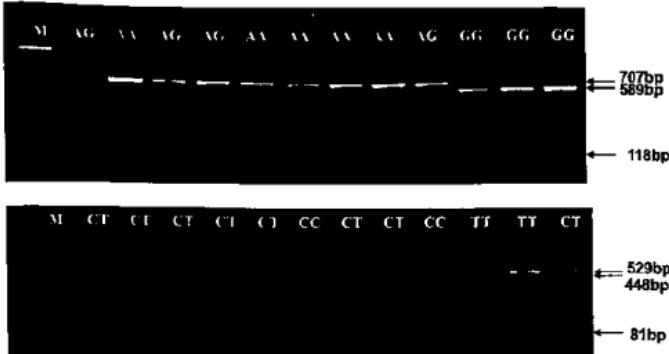
KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Chia: điểm đe hình ở bốn gen ứng viên quan trọng đã được nhận diện tại các locus (i) G662A (intron 1), T3094C và C3198T của gen GH, (ii) G565A của gen GHR, (iii) G565A của gen GHRs, và (iv) A3971G của gen insulin. Ngoài ra, tại các vị trí C3587T của gen GHRS, vị trí C1549T và T3737C của gen insulin (Bảng 1).

Tần số alien và kiểu gen của các gen được thể hiện qua Bảng 2 trong đó có sự khác nhau về kiểu gen giữa các giống gà chủ yếu là ở các điểm đếm hinh C319RT của gen GH và G565A của gen GHR và sự khác nhau này tuân theo định luật không cân bằng Hardy-Weinberg.

So sánh tần số kiểu gen tại các điểm đa hình của các gen giữa hai giống gà Tàu vàng và gà Nòi với giống gà thịt Cobb500 nhận thấy da số các kiểu gen của các các giống gà này có tần số xuất hiện với khuynh hướng tương tự giống gà thịt Cobb500, mặc dù tần số của chúng có thể thấp hơn hoặc cao hơn so với giống gà thịt Cobb500 và kết quả cũng cho thấy qua giống gà Tàu vàng và gà Nòi Cobb500 có mức độ tương đồng gần như nhau so với giống gà Nòi.

Chín điểm da hình ở bốn gen ứng viên quan trọng đã được nhận diện tại các locus (i) G662A (intron 1), T3094C và C3199T (intron 4) của gen GH, (ii) G565A của gen GHR, (iii) G56A và C3678T của gen GHRs, và (iv) C1549T, R3737C và A3971G của gen insulin (Bảng 1).



Hình 1. Mẫu PCR-RFLP của gen GHR và Insulin 1. Sản phẩm cắt của cặp mồi GHR (hình trên) và cặp mồi Insulin 1 (hình dưới)

Bảng 2. Tần số allele và kiểu gen của các gen ứng viên và các giống gà

	Kiểu gen			Allele	P
GH1 (G662A)	AA	AG	GG	A	G
Tàu vàng (n=152)	0,44	0,45	0,11	0,66	0,43
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,53	0,39	0,08	0,72	0,28
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,32	0,53	0,15	0,59	0,41
Nòi (n=38)	0,24	0,42	0,34	0,45	0,55
Cobb500 (n=32)	0,56	0,31	0,13	0,72	0,28
GH2 (T3094C)	CC	CT	TT	C	T
Tàu vàng (n=152)	0,05	0,33	0,62	0,22	0,78
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,04	0,29	0,68	0,18	0,82
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,07	0,38	0,54	0,26	0,74
Nòi (n=38)	0,00	0,14	0,86	0,07	0,93
Cobb500 (n=32)	0,13	0,33	0,53	0,30	0,70
GH3 (C3199T)	CC	CT	TT	C	T
Tàu vàng (n=152)	0,05	0,22	0,74	0,15	0,85
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,06	0,17	0,77	0,14	0,86
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,03	0,28	0,69	0,17	0,83
Nòi (n=38)	0,07	0,14	0,79	0,14	0,86
Cobb500 (n=32)	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
GHR (G585A)	AA	AG	GG	A	G
Tàu vàng (n=152)	0,86	0,11	0,03	0,92	0,08
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,89	0,06	0,05	0,92	0,08
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,82	0,18	0,00	0,91	0,09
Nòi (n=38)	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Cobb500 (n=32)	0,10	0,17	0,73	0,18	0,82
GHSR1 (G556A)	AA	AG	GG	A	G
Tàu vàng (n=152)	0,01	0,13	0,87	0,07	0,93
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,01	0,17	0,82	0,10	0,90
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,00	0,07	0,93	0,04	0,96
Nòi (n=38)	0,00	0,18	0,82	0,09	0,91
Cobb500 (n=32)	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
GHSR2 (C3678T)	CC	CT	TT	C	T
Tàu vàng (n=152)	0,82	0,18	0,00	0,91	0,09
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,87	0,13	0,00	0,93	0,07
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,76	0,24	0,00	0,88	0,12
Nòi (n=38)	0,88	0,13	0,00	0,94	0,06
Cobb500 (n=32)	0,58	0,36	0,00	0,76	0,24
Insulin 1 (C1549T)	CC	CT	TT	C	T
Tàu vàng (n=152)	0,20	0,40	0,40	0,40	0,60
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,20	0,40	0,39	0,40	0,60
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,19	0,40	0,41	0,39	0,61
Nòi (n=38)	0,13	0,54	0,33	0,40	0,60
Cobb500 (n=32)	0,04	0,50	0,43	0,29	0,71
Insulin 2 (T3737C)	CC	CT	TT	C	T
Tàu vàng (n=152)	0,03	0,28	0,69	0,17	0,83
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,01	0,23	0,76	0,13	0,88
Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,04	0,35	0,60	0,22	0,78
Nòi (n=38)	0,03	0,20	0,78	0,13	0,88
Cobb500 (n=32)	0,00	0,48	0,52	0,24	0,76
Insulin 3 (A3971G)	AA	AG	GG	A	G
Tàu vàng (n=152)	0,27	0,53	0,20	0,53	0,47
Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,27	0,54	0,19	0,54	0,46

Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,26	0,51	0,22	0,52	0,48	NS
Nòi (n=38)	0,51	0,33	0,15	0,68	0,32	NS
Cobb500 (n=32)	0,18	0,64	0,18	0,50	0,50	NS

NS: sự sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$); *: sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$)

Đối với gen GH, kiểu gen AA và TT tại các điểm đà hình G662A, T3094C và C3199T có tần số xuất hiện cao ở cả ba giống gà Tàu vàng, gà Nòi và gà thịt Cobb500. Các đà hình của gen GH được nghiên cứu rất nhiều trên các giống gà khác nhau và người ta cũng đã tìm thấy một số kết hợp giữa các tính trạng về năng suất của vật nuôi với các đà hình này. Kết quả nghiên cứu của Mehdi và Reza (2012) cho thấy điểm đà hình G662A có mối liên kết có ý nghĩa với khối lượng cơ thể gà địa phương Iranian Fars, giài đoạn 1 và 8 tuần tuổi, trong khi đó các điểm đà hình nằm ở intron 4 có mối quan hệ mật thiết với các tính trạng về thân thịt của gà (Yan et al., 2003). Kết quả phân tích mối quan hệ giữa các đà hình này với các tính trạng trọng thân thịt của gà Tàu đã được nghiên cứu (kết quả không trình bày trong nghiên cứu này).

Đối với gen GHRS, kiểu gen GG và CC đều có tần số cao trong quần thể quan sát, ngoại ra tại vị trí C3678T cả ba giống gà đều không có kiểu gen TT. Các nghiên cứu gần đây cho thấy các điểm đà hình của gen GHSR liên kết với một số tính trạng gây mập mỡ ở gà (Lei et al., 2007). Trong khi đó, ở gen insulin cả hai kiểu gen CT và TT xuất hiện với tần số tương đương nhau tại mỗi điểm đà hình C1549T và T3737C. Tuy nhiên, gà thịt Cobb500 chỉ có duy nhất một kiểu gen duy nhất là TT tại vị trí C3199T của gen GH và GG ở vị trí G656A của gen GHSR.

Điểm khác biệt có thể nhận thấy rõ ràng giữa các giống gà địa phương Việt Nam và giống gà thịt Cobb500 là ở vị trí G656A của gen GHR, kiểu gen GG có tần số cao ở giống gà thịt Cobb500 (0,73) trong khi đối với các giống gà địa phương là kiểu gen AA. Các nghiên cứu trước đây đã đưa kết luận rằng các điểm đột biến của gen GHR có liên kết với tình trạng còi cọc của gà (Burnside et al., 1992) và khối lượng cơ thể (Feng et al., 1997), điều này là bằng chứng trực tiếp có liên quan đến sự tăng trưởng của gà. Chính vì vậy sự khác biệt về kiểu gen giữa các giống gà có thể là sự khác biệt về đặc điểm di truyền nhằm phù hợp với sự tăng trưởng và phát triển của chúng và cần phải được làm sáng tỏ.

KẾT LUẬN

Từ kết quả phân tích trên cho thấy các gen GH, GHR, GHRS và insulin có sự đa dạng về kiểu gen giữa giống gà Tàu vàng, gà Nòi và gà thịt Cobb500. Với các kết quả nghiên cứu trước cho thấy các gen này là những gen ứng viên quan trọng để xác định các dấu di truyền cho các tính trạng về năng suất sinh trưởng và thân thịt của gà. Đây là các ứng cử gen quan trọng liên quan các tính trạng về năng suất sinh trưởng và thân thịt của gà. Vì thế, nghiên cứu này là cơ sở cho việc phân tích mối quan hệ di truyền giữa kiểu gen và các tính trạng năng suất như sinh trưởng, thân thịt trên giống gà Tàu vàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burnside J, Liu SS, Zhong C, Cobgum LA (1992). Abnormal growth hormone receptor gene expression in the sex-linked dwarf chicken. *Gen Comp Endocrinol* 88: 20–28
- Feng XP, Kuhnlein U, Aggrey SE, Gavora JS, Zadworny D (1997). Trait association of genetic markers in the growth hormone and growth. *Poult Sci* 76(12): 1770-1775.
- Fotouhi N, Karatzas CN, Kuhnlein U, and Zadworny D (1993). Identification of growth hormone DNA polymorphisms which response to divergent selection for abdominal in chickens. *Theor Appl Genet* 85: 931–936
- Kuhnlein U, Ni L, Weigend S, Gavora JS, Fairfull W, Zadworny D (1997). DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene response to selection for disease resistance and association with egg production. *Anim Genet* 28: 116-123.
- Lei M, Luo C, Peng X (2007). Polymorphism of growth correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens. *Poult Sci* 86: 835-842.
- Mehdi A, Reza FA (2012). Single nucleotide Polymorphisms in intron 1 of growth hormone gene and its association with economic important traits in Iranian Fars native fowl. *Ann Biol Res* 3: 4028-4032
- Nie Q, Stephen CY, Zhang X, Leung FC, Yang G (2002). New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. *J Heredity* 93: 277-279
- Pecker F (2004). Ghrelin in the heart and growth hormone: Which is chicken, which is egg? *Cardiovasc Res* 62:442-443.
- Qiu FF, Nie QH, Luo CL, Zhang DX, Lin SM, Zhang XQ (2006). Association of single nucleotide polymorphisms of the insulin gene with chicken early growth and fat deposition. *Poult Sci* 85: 980–985
- Tanaka M, Miyazaki T, Yamamoto I, Nakai N, Ohta Y, Tsushima N, Wakita M, Shimadac K (2003). Molecular characterization of chicken growth hormone secretagogue receptor gene. *Gen Comp Endocrinol* 134: 198–202
- Vasiolatos-Younken R, Zhou Y, Wang X, McMurry JP, Rosebrough RW, Decuyper E, Buys N, Darras VM, Van Der Geyten S, Tomas F (2000). Altered chicken thyroid hormone metabolism with chronic GH enhancement in vivo: consequences for skeletal muscle growth. *J Endocrinol* 166(3): 609-620.
- Yan B, Deng X, Fei Q, Hu X, Wu C, Li N (2003). Association between single nucleotide polymorphisms of the chicken growth hormone. *Chin Sci Bull* 48: 1561-1564.

DNA POLYMORPHISMS OF CANDIDATE GENES IN SOME VIETNAMESE CHICKEN BREEDS

Do Vo Anh Khoa¹, Nguyen Thi Kim Khang¹, Nguyen Thi Dieu Thuy²

¹ Can Tho University

² Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The somatotrophic axis is a system of hormones that control and regulate normal growth and development, these hormones are necessary to growth, development and regulation of the metabolism and have promising potentials for producing valuably economical traits in farm animals. Therefore, the current study has used 8 specific primer sets to identify DNA single nucleotide polymorphisms of the candidate genes GH, GHR, GHRs and Insulin in different chicken breeds raised in Vietnam such as the local Tauvaong chickens (from two different lines CTU-LA01 and CTU-HT01, n=152), the local Noi chickens (n=38) and the commercial Cobb500 broilers (n=32). These genes are known as the good candidates for growth performance and carcass quality, egg production and reproduction in animals. Therefore, DNA samples extracted from breast muscles were used as templates for amplifying specific gene segments by using PCR method. To identify the single nucleotide polymorphism within the candidate genes, PCR-RFLP in presence of the specific restriction enzyme was used. The genotypic frequencies obtained at 6/8 marker locus in different chicken breeds were fixed to Hardy-Weinberg equilibrium by using Chi-square test. These results have been opening continuous investigation on the effects of genes' polymorphisms on growth performance and carcass quality in chicken.

Keywords: candidate genes, chicken breeds, single nucleotide polymorphisms, genotype, PCR-RFLP

* Author for correspondence: Tel: +84-918 026 653; Email: dvakhoa@ctu.edu.vn