

XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA *Cytochrome b* CỦA HỆ GEN TY THỂ VÀ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA LOÀI CÁ HEO ÔNG SƯ (*Orcaella brevirostris* Gray, 1866) VÙNG BIỂN KIÊN GIANG, VIỆT NAM

CÙ NGUYỄN ĐỊNH⁽¹⁾, NGUYỄN THỊ BÍCH NGÀ⁽²⁾, NGUYỄN THỊ NGÀ⁽³⁾,
TRẦN LINH THUỐC⁽⁴⁾, **BÙI LAI**⁽⁵⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá heo Ông Sư (*Orcaella brevirostris* Gray, 1866) còn có tên là cá heo Irrawaddy, cá nước Minh Hải là một loài động vật có vú thuộc họ cá heo Delphinidae. Đánh giá chung tình trạng của loài cá heo này theo Danh lục Đỏ IUCN, cá heo Ông Sư được xếp vào bậc sẽ nguy cấp (VU - Vulnerable) và loài này được bảo tồn ở Việt Nam theo Quyết định số 82/2008/QĐ-BNN của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

Tuy nhiên, ở Việt Nam việc nghiên cứu về động vật biển nói chung trong đó có loài cá heo Ông Sư vẫn còn rất ít các nghiên cứu. Bên cạnh đó kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái chưa đủ để định loại chính xác và đánh giá mối quan hệ di truyền giữa quần thể cá heo Ông Sư Việt Nam với các quần thể cá heo Ông Sư khác. Các tư liệu nghiên cứu di truyền loài cá heo này cũng không có nhiều [2]. Vì vậy, nghiên cứu về đặc điểm hình thái kết hợp với phương pháp giám định phân tử trong định loại và đánh giá mối quan hệ di truyền giữa quần thể cá heo Ông Sư Việt Nam với các quần thể cá heo Ông Sư khác là cần thiết và có ý nghĩa khoa học.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sử dụng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự gen *cytochrome b* (*cytb*) và xác định mối quan hệ phả hệ của loài cá heo Ông Sư tại vùng biển Kiên Giang, Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cá heo Ông Sư được nuôi dưỡng tại Câu lạc bộ cá heo Vinpearl - Nha Trang. Đây là loài cá heo thu nhận tại vùng biển Kiên Giang - Việt Nam đã được thuần dưỡng. Ký hiệu 02 mẫu cá heo là OBRE1-VN và OBRE2-VN.

Phương pháp lấy mẫu: Lấy mẫu máu toàn phần của cá cho vào ống có chất chống đông, bảo quản trong hộp xốp có đá để vận chuyển về tách DNA tổng số.

2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng bộ kit “Qiagen Genomic DNA Extraction Kit” của hãng QIAGEN Inc. (USA-Mỹ) để tách DNA tổng số.

2.3. Phương pháp PCR thu nhận vùng gen đích

Gen *cytochrome b* của hệ gen ty thể cá heo Ông Sư được lựa chọn để thu nhận gen bằng phương pháp PCR và giải trình tự, sau đó sử dụng chuỗi nucleotide của gen *cytochrome b* đã được giải trình tự để phân tích và so sánh với các chuỗi gen đã công bố trên Ngân hàng gen (Gen Bank).

Môi thực hiện PCR được thiết kế dựa trên trình tự bảo tồn của gen *cytochrome b*. Cặp môi được sử dụng có trình tự trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các môi thu nhận gen cytochrome b

TT	Tên môi (primer)	Trình tự môi thiết kế
1	OBREF	5'-CAC ATC CCA TAG CAC CAC CC-3'
2	OBRER	5'-AAT GGG GTC CTC CTT TTC GG-3'

Gen *cytochrome b* có kích thước khoảng 1.200 nucleotide (base pair - bp).

Thực hiện phản ứng PCR với DNA tổng số thu nhận làm khuôn, sử dụng cặp môi OBREF - OBRER để nhân đoạn gen đích bằng bộ kit AccuPower®ProFi Taq PCR Premix do hãng BIONEER (Hàn Quốc) cung cấp. Thành phần phản ứng PCR gồm: Khuôn DNA tổng số: 2 µl; Môi xuôi (10pmol/µl): 2 µl; Môi ngược (10pmol/µl): 2 µl; DMSO: 2 µl; Nước tinh khiết: 42 µl. Tổng thể tích là 50 µl. Chu trình nhiệt thực hiện PCR gồm: 1 chu kỳ 94°C - 5 phút; 35 chu kỳ 94°C - 30 giây; 52°C - 30 giây; 68°C - 7 phút; giai đoạn tổng hợp chuỗi: 72°C - 10 phút; Sản phẩm được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

Điện di trên thạch agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR và tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR để loại bỏ các thành phần phụ không mong muốn chỉ giữ lại DNA tinh khiết. Tinh sạch sản phẩm bằng bộ QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc.). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ được dòng hóa vào vector tách dòng pCR2.1TOPO (hãng Invitrogen - Mỹ) để thu nhận DNA tái tổ hợp và gửi đọc trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc).

2.4. Phương pháp giải trình tự

Cặp môi dùng để giải trình tự DNA plasmid tái tổ hợp gồm:

- Môi xuôi (M13F) : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' hoặc
- Môi ngược (M13R) : 5'-CAGGAAACAGCATTTGAC-3'

Chuỗi DNA sản phẩm được xác định trình tự theo chiều 5' → 3' và dùng thuốc nhuộm huỳnh quang (fluorescent dye) để đánh dấu, sử dụng thạch polyacrylamide và quét tia laser dọc theo chuỗi để đọc trình tự, phân tích tự động bằng máy với các chương trình phần mềm tin - sinh học.

2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

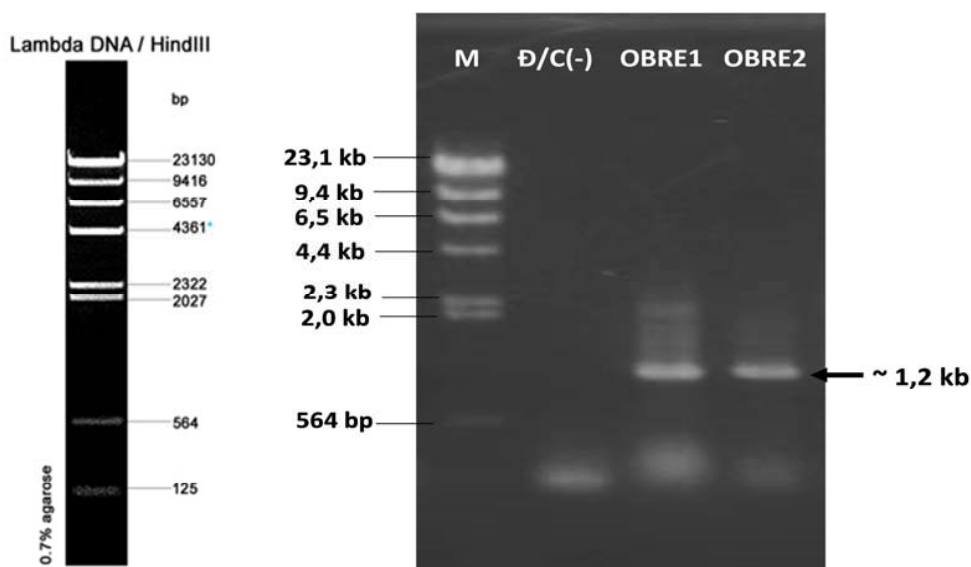
Sau khi giải trình tự các chuỗi nucleotide được thu nhận và xử lý bằng các phần mềm Chromas LITE v2.01, so sánh đối chiếu và xử lý số liệu các chuỗi từ nghiên cứu và từ Ngân hàng gen (GenBank) bằng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) [3].

Sử dụng chương trình MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) để xây dựng cây phả hệ. Các phân tích được thực hiện dựa trên tập hợp các trình tự gen *cytochrome b* trong hệ gen ty thể (mtDNA) của một số loài cá heo đã công bố trong Ngân hàng gen (GenBank). Phân tích được tiến hành dựa trên thuật toán Neighbour joining (NJ) bằng phần mềm MEGA6.06 [4].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu nhận gen *cytochrome b* của các mẫu nghiên cứu

Thực hiện phản ứng PCR thu nhận đoạn DNA với cặp mồi đặc hiệu của gen *cytochrome b* có độ dài dự kiến khoảng 1,2 kb (hình 1).



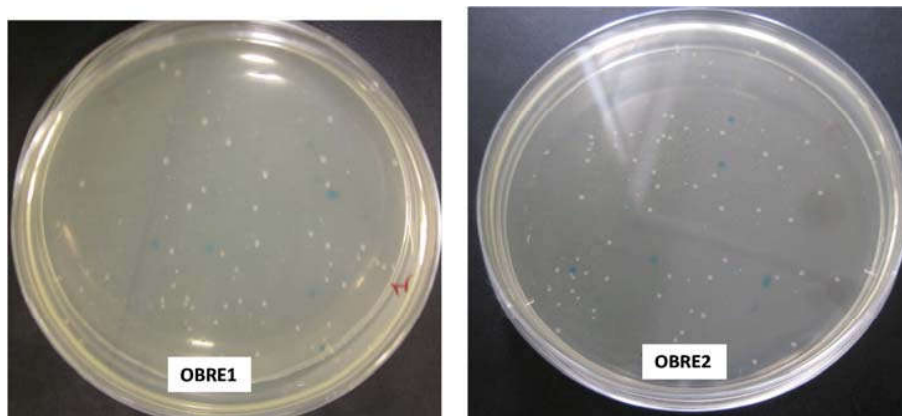
Hình 1. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR gen *cytochrome b* của hai mẫu cá heo Ông Sư (ký hiệu OBRE1-VN và OBRE2-VN) trên thạch agarose 1%.

Ghi chú: M: Marker Lamda cắt bằng enzyme *HindIII*; Đ/C(-): mẫu đối chứng âm.

Kết quả ở hình 1 cho thấy hai mẫu OBRE1-VN và OBRE2-VN trong nghiên cứu đã được tách DNA tổng số, phản ứng PCR thu nhận gen *cytochrome b* đã được thực hiện thành công, sản phẩm PCR có độ dài khoảng 1,2 kb đúng với dự kiến. Sản phẩm đơn băng, rõ nét với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt phù hợp. Các sản phẩm này được tinh sạch bằng bộ QIAquick purification (Mỹ).

3.2. Kết quả dòng hóa và giải trình tự

Sản phẩm PCR của gen *cytochrome b* được dòng hóa (cloning) vào vector pCR2.1TOPO của hãng Invitrogen, sau đó được chuyển nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α -T1. Sản phẩm sau chuyển nạp được nuôi cấy trên đĩa thạch LB-agar 1,5% có bổ sung X-gal (40 mg/ml) và Kanamycin (40 mg/ml), ủ ở 37°C trong 18 đến 20 giờ (hình 2). Chọn lọc các khuẩn lạc trắng (đây là những khuẩn lạc có thể mang gen *cytochrome b* được tái tổ hợp) nuôi cấy vào môi trường LB khoảng 20 giờ và tiến hành tách chiết DNA plasmid, cắt kiểm tra sản phẩm DNA tái tổ hợp bằng enzym giới hạn *EcoRI* và điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%.



Hình 2. Hình ảnh chuyển nạp sản phẩm PCR của mẫu OBRE1-VN và OBRE2-VN vào tế bào *E. coli* chủng DH5 α -T1.

Ghi chú: trên đĩa petri các khuẩn lạc dương tính có khả năng chứa đoạn chèn (insert) sản phẩm PCR của gen *cytochrome b* có màu trắng. Những khuẩn lạc không mang sản phẩm có màu xanh.

Sản phẩm DNA plasmid tái tổ hợp sau khi tách dòng, được chọn các clone đại diện làm nguyên liệu giải trình tự. Các DNA tái tổ hợp được gửi đọc trình tự tại công ty Macrogen - Seoul, Hàn Quốc.

3.3. Kết quả giải trình tự và xây dựng cây phả hệ nguồn gốc

Sau khi giải trình tự nucleotide, thu nhận chuỗi gen *cytochrome b*, tiến hành BLAST vào Ngân hàng gen để thu thập các chuỗi thuộc họ cá heo đã công bố so sánh với chuỗi gen của OBRE1-VN và OBRE2-VN trong nghiên cứu.

Kết quả thu nhận chuỗi gen *cytochrome b* của hai mẫu nghiên cứu OBRE1-VN và OBRE2-VN sau khi giải trình tự có kích thước là 1.140 nucleotide. Gen *cytochrome b* mã hóa cho protein *cytochrome b* gồm 379 amino acid, khởi đầu là ATG mã hóa cho Methionin và kết thúc bằng bộ ba TGA (hình 3).

Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới, Số 14, 11 - 2017 115



1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 278: 1019-1024.

•

1. *Journal of the American Medical Association*, 2000; 283: 2689-2696.

[illegible]

3. Nicholas K.B., Nicholas H.B., *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*, Distributed by authors, 1997.
4. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*, Mol Biol Evol, 2013, **30**:2725-2729.
5. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2016.3. <http://www.iucnredlist.org/details/15419/0>. Truy cập 5/4/2017.

SUMMARY

DETERMINING THE MITOCHONDRIAL *Cytochrome b* GENE SEQUENCE AND THE HEREDITARY RELATIONSHIP OF IRRAWADDY DOLPHINS (*Orcaella brevirostris* Gray, 1866) IN KIEN GIANG WATERS, VIETNAM

In this study, two samples of Irrawaddy dolphins (*Orcaella brevirostris* Gray, 1866) in Kien Giang waters, Vietnam were collected. The phylogenetic tree showed that Irrawaddy dolphins in Vietnam had a close genetic relationship to Irrawaddy dolphins in Indonesia and Laos which have been registered in the Gene Bank.

This is the latest research in Vietnam about determining the mitochondrial *cytochrome b* gene sequence and the hereditary relationship of Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris* Gray, 1866) in Kien Giang waters. This results contributed to the conservative research and development of this valuable and rare marine mammal species.

Từ khóa: Cá heo Ông Sư, phả hệ, phát sinh loài, ty thể, *Orcaella brevirostris*, *cytochrome b*, Irrawaddy dolphin, family tree, phylogenetic, mitochondria.

Nhận bài ngày 24 tháng 8 năm 2017

Hoàn thiện ngày 12 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Chi nhánh Phía Nam, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁽³⁾ Đại học Quốc tế Hồng Bàng

⁽⁴⁾ Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG.HCM

⁽⁵⁾ Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam