

PHÂN LẬP VÀ ĐỌC TRÌNH TỰ GEN *RPOB* LOÀI BA KÍCH (*MORINDA OFFICINALIS*) TẠI THANH HÓA

Đinh Thị Tố Hương¹, Lê Đình Chấn², Trịnh Thị Hồng³

TÓM TẮT

Thuật ngữ “DNA barcode” được sử dụng nhiều trong nghiên cứu phân loại học phân tử. Về cơ bản, kỹ thuật này dựa vào việc sử dụng một trình tự DNA khoảng 400-800 bp như là một tiêu chuẩn để nhận dạng và xác định quan hệ chủng loài của các loài sinh vật một cách nhanh chóng và chính xác. Do đó, kỹ thuật DNA mã vạch không chỉ giúp các nhà phân loại học trong công tác phân loại và xác định loài, mà còn nâng cao năng lực kiểm soát, hiểu biết và tận dụng sự đa dạng sinh học. Trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến kết quả phân lập và đọc trình tự gen *rpoB* của 2 mẫu Ba kích thu tại Bến En và Pù Luông, Thanh Hóa. Kích thước gen *rpoB* chúng tôi thu được là 509 nucleotid và có sự tương đồng là 99% so với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên ngân hàng gen mã số KR689730 của loài *Morinda officinalis*.

Từ khóa: *rpoB*, DNA barcoding, gen *rpoB*, Gen lục lạc, Ba kích, *Morinda officinalis*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Y học cổ truyền Việt Nam, Ba kích (*Morinda officinalis*) có tác dụng cường dương, tăng cường sức khỏe, điều trị, ngăn ngừa một số bệnh như ung thư, tăng sức đề kháng, chống viêm, tăng sức dẻo dai, chống loãng xương, cân bằng nội tiết, cải thiện trí nhớ, chống oxy hóa, đau lưng, loãng xương, kích thích hệ thống miễn dịch... [1].

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, trong rễ Ba kích khô có acid hữu cơ, đường, nhựa, anthraglucoside, phytosterol, 1 ít tinh dầu, Morindin. Rễ tươi có Vitamin C... Gentianine, Carpaine, Choline, Trigonelline, Díogenin, Yamogenin, Gitogenin, Tigogenin, Vitexin, Orientin, Quercetin, Luteolin, Vitamin B1, acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE),... các protein như IL10, MAPK1, PTGS2, AKT1, APOE, PPARA, MAPK1, MIF, NOS3 và TNF- α ... [5, 6, 10, 13].

Công trình của Zhang JH và cộng sự cho thấy, trong Ba kích có chứa một số chất như: 1,2-Dihydroxy-3-metylanthraquinone, 1,3,8-trihydroxy-2-methoxy-anthraquinone, 1,6-dihydroxy-2,4-dimethoxyanthraquinone, 1,6-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone, 1F-fructofuranosyl-nystose, 1-hydroxy-2-methoxyanthraquinone, 1-hydroxy-2-metylanthraquinone, 1-hydro xyanthraquinone, 2,4-etylcholesterol, 2-hydroxy-1-methoxy-anthraquinon, 2-hydroxymetyl-3-hydroxyanthraquinon, 2-methoxyanthraquinon, 2-methyl-anthraquinone, arabinose...(13). Các hợp chất này được đánh giá là có tác dụng y học và

¹ Trường Trung cấp Kỹ nghệ, Thanh Hóa

^{2,3} Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức

được học cao. Tuy nhiên việc nghiên cứu đặc điểm di truyền học của loài cây này còn hạn chế, những dữ liệu khoa học về di truyền học của loài dược liệu quý này chưa được công bố nhiều trên thế giới và trong nước, đặc biệt là hệ thống mã vạch DNA (DNA barcode).

Đối với thực vật, trong hệ thống mã vạch DNA thì hệ gen lục lạp mang nhiều đặc điểm thích hợp đối với chỉ thị DNA và hệ gen nhân, vùng DNA nằm giữa các gen hay còn gọi *ITS* (Internal Transcribed Spacer) thường được sử dụng làm DNA chỉ thị trong một số nghiên cứu [3, 8, 11]. Trong những năm gần đây, nhiều vùng gen đã được nghiên cứu và đề xuất là chỉ thị DNA cho thực vật như *Matk*, *rpoC1*, *rpoB*... [4, 7, 9].

Những thay đổi ở DNA lục lạp (cpDNA) đã và đang được sử dụng cho các nghiên cứu về tiến hóa, sinh thái và phát sinh chủng loại ở thực vật. CpDNA có mức độ bảo thủ trong việc thay thế cho các nucleotide. Điều này tạo điều kiện cho sự so sánh những thay đổi ở phạm vi rộng trong phân loại thực vật. Một số chỉ thị cpDNA như *microsatellite* lục lạp, một số vùng không mã hóa, một số phân đoạn của chuỗi đơn lớn (*trnC - trnD*, *trnD - trnT*, *psaA - trnS*, *petB - petD*, *trnH - psaA*, *trnD - trnT*) và một số vùng đệm giữa các gen (*trnL - trnF*) đã được sử dụng trong các nghiên cứu về đa dạng di truyền và phát sinh loài ở thực vật [2]. Vì vậy trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến việc phân lập và đọc trình tự gen *ropB* loài Ba kích (*Morinda officinalis*) tại Thanh Hóa nhằm cung cấp dữ liệu thực vật học về loài dược liệu quý này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu Ba kích (*Morinda officinalis*) được thu thập tại Thanh Hóa.

Cấp môi đặc hiệu *rpoB* và các hóa chất cần thiết trong nghiên cứu sinh học phân tử như: Tris HCl, EDTA, phenol, ethanol (100%), agarose... thuộc các hãng: Merck, Sigma, Biolabs của các nước Mỹ, Anh, Đức.

Bảng 1. Trình tự cặp môi nhân bản *rpoB*

Tên môi		Trình tự môi (5' - 3')
<i>rpoB</i>	F	AAGTGCATTGTTGGAAGCTGG
	R	GATCCCAGCATCACAATTCC

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ lá non theo phương pháp của Shanghai Maroof và cộng sự (1984).

2.2.2. Phương pháp nhân gen *proC1* bằng kỹ thuật PCR

Theo phương pháp của Peter và co (2011) và bảng các cặp môi DNA Barcoding [15].

Trong đó, đoạn gen *rpoB* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp môi đặc hiệu *rpoB-1f/rpoB-3r* với kích thước dự kiến là khoảng 500 nucleotide.

Phản ứng PCR được tiến hành với thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen *rpoB*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μ l)
1	PCR Masster Mix	2X	12,5
2	Mồi xuôi	10 pmol/ml	1
3	Mồi ngược	10 pmol/ml	1
4	DNA khuôn	10ng/ ¹	1
5	Nước khử ion	-	9,5
Tổng thể tích			25

2.2.3. Phương pháp chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng DNA trên gel agarose 0,8% được phát hiện bằng cách nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới tia UV.

Sau khi chạy điện di, lấy bản gel ra khỏi máy điện di, nhẹ nhàng lấy riêng phần gel agarose cho vào hộp chứa dung dịch Ethidium bromide. Nhuộm trong 10 phút. Lấy bản gel ra, rửa bằng cách ngâm trong nước 2 - 3 phút. Đem vào máy quan sát dưới đèn tử ngoại (UV) và chụp ảnh.

2.2.4. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Sau khi nhân được gen *rpoB* bước tiếp theo cần thu nhận gen ở dạng tinh sạch và không lẫn gel agarose. Quá trình tinh sạch được thực hiện theo Kit GenJET PCR Purification của hãng Thermo Scientific.

2.2.5. Phương pháp xác định trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB*

Trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự gen đó được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình Bioedit, BLAST, DNASTAR.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo phương pháp của Shanghai Maroof và cộng sự (1984), sau đó DNA được đo nồng độ và xác định độ sạch bằng máy đo NanoDrop (Thermo Scientific).

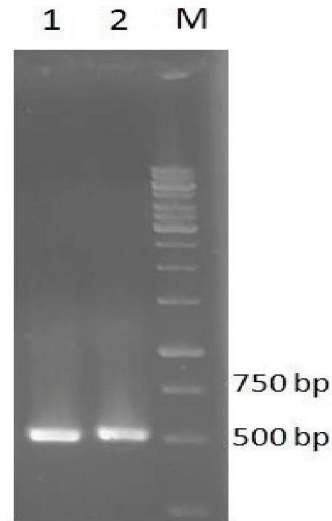
Bảng 3. Nồng độ và độ tinh sạch các mẫu

Tên mẫu	OD260/280	Nồng độ (ng/ μ l)
BKBE	2,04	103,5
BKPL	1,99	159,0

Kết quả bảng 3 cho thấy, DNA được tách chiết với độ tinh sạch cao nằm trong khoảng từ 1,99 đến 2,04. Nồng độ DNA được tách chiết đạt từ 159,0 đến 103,5. DNA này sẽ được pha loãng đến nồng độ cuối cùng là 100 ng/ μ l cho phản ứng PCR tiếp theo.

3.2. Kết quả nhân bản gen *rpoB* các mẫu Ba kích

Sau khi thực hiện PCR sản phẩm được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả PCR với các cặp mồi đặc hiệu được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Kết quả PCR 2 mẫu với cặp mồi *rpoB*

M: Marker (1kb, Thermo);

*1: Sản phẩm nhân bản từ cặp mồi *rpoBF/R* từ mẫu Ba kích Bến En;*

*2: Sản phẩm nhân bản từ cặp mồi *rpoBF/R* từ mẫu Ba kích Pù Luông*

Kết quả PCR từ 2 mẫu Ba kích với cặp mồi *rpoB* F/R thu được một băng duy nhất ở vị trí khoảng 500 bp, kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết và làm cơ sở cho việc đọc trình tự gen *rpoB* phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Kết quả đọc trình tự gen *rpoB* của 2 mẫu Ba kích thu được

Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng phương pháp điện di, cho thấy sản phẩm thu được là đặc hiệu đúng kích thước so với tính toán lý thuyết, là cơ sở để chúng tôi tiến hành đọc trình tự gen *rpoB* trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được như sau:

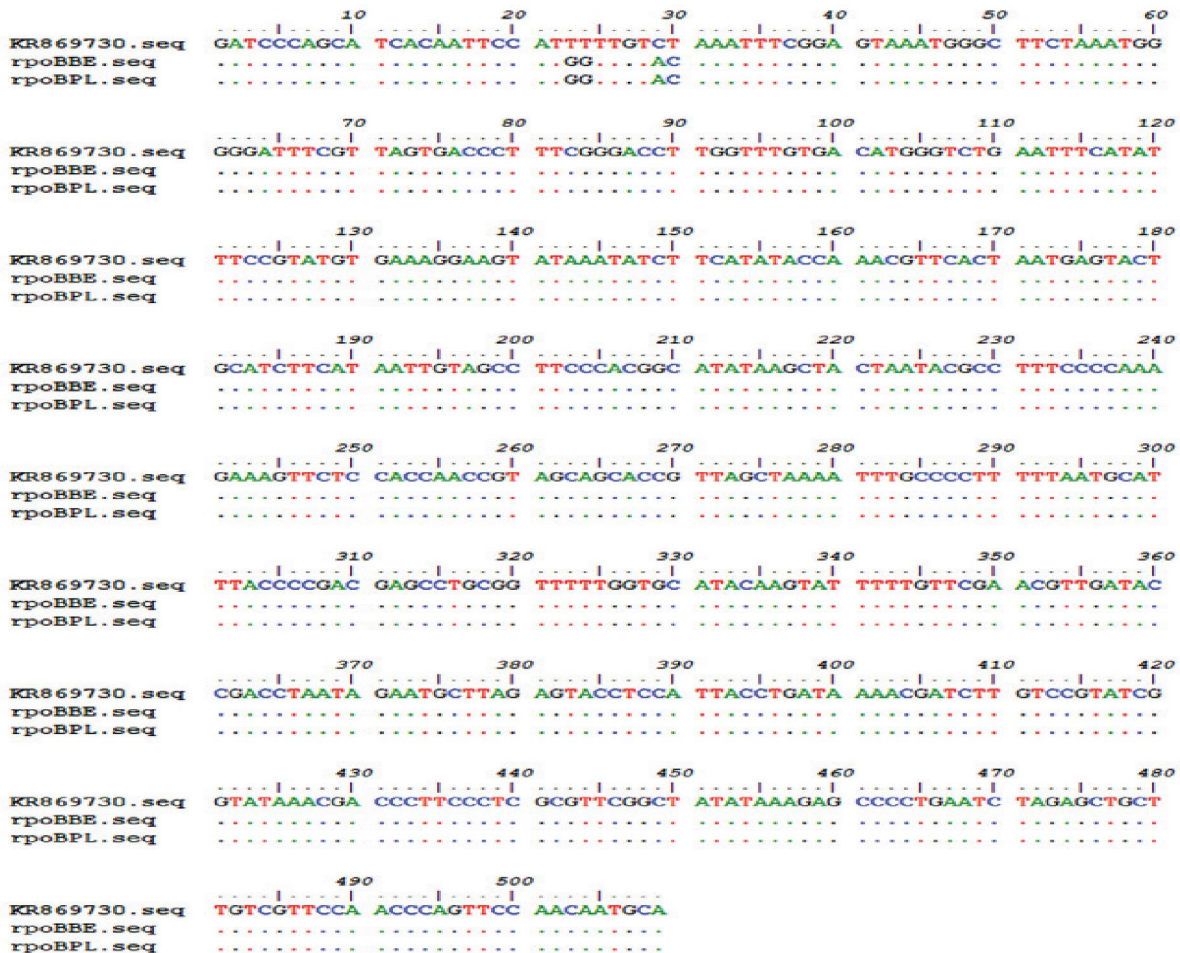
*Trình tự gen *rpoB* của cây Ba kích thu tại Pù Luông*

```
GATCCCAGCATCACAATTCCATGGTTGTACAAATTTTCGGAGTAAATGGGCTTCTAAATGGGG
GATTTTCGTTAGTGACCCTTTCGGGACCTTGTTTTGTGACATGGGTCTGAATTTTCATATTTCC
GTATGTGAAAGGAAGTATAAATATCTTCATATACCAAACGTTCACTAATGAGTACTGCATCT
TCATAATTGTAGCCTTCCCACGGCATATAAGCTACTAATACGCCCTTCCCCAAAGAAAGTTC
TCCACCAACCGTAGCAGCACCGTTAGCTAAAATTTGCCCTTTTTAATGCATTTACCCCGAC
GAGCCTGCGGTTTTTGGTGCATACAAGTATTTTTGTTCGAACGTTGATACCGACCTAATAGA
ATGCTTAGAGTACCTCCATTACCTGATAAACGATCTTGTCCGTATCGGTATAAACGACCCT
TCCCTCGCGTTTCGGCTATATAAAGAGCCCCTGAATCTAGAGCTGCTTGTTCGTTCCAACCCAG
TTCCAACAATGCA
```

Trình tự gen rpoB của cây Ba kích thu tại Bến En

GATCCCAGCATCACAATTCCATGGTTGTACAAATTTCCGGAGTAAATGGGCTTCTAAATGGGG
 GATTTTCGTTAGTGACCCTTTCGGGACCTTGGTTTGTGACATGGGTCTGAATTTTCATATTTCC
 GTATGTGAAAGGAAGTATAAATATCTTCATATACCAAACGTTCACTAATGAGTACTGCATCT
 TCATAATTGTAGCCTTCCCACGGCATATAAGCTACTAATACGCCTTTCGCCAAAGAAAGTTC
 TCCACCAACCGTAGCAGCACCGTTAGCTAAAATTTGCCCTTTTTAATGCATTTACCCCGAC
 GAGCCTGCGGTTTTTGGTGCATAACAAGTATTTTTGTTCGAACGTTGATACCGACCTAATAGA
 ATGCTTAGAGTACCTCCATTACCTGATAAAACGATCTTGTCCGTATCGGTATAAACGACCCT
 TCCCTCGGTTTCGGCTATATAAAGAGCCCCTGAATCTAGAGCTGCTTGTTCGTTCCAACCCAG
 TTCCAACAATGCA

Với hai mẫu thu được từ kết quả phân lập, chúng tôi nhận được trình tự nucleotide của mẫu đều bằng nhau và bằng 509 nucleotit, để khẳng định mối quan hệ di truyền của các trình tự này so với các trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Gen banks, chúng tôi tiến hành so sánh bằng phần mềm tin học Bioedit, kết quả thu được trên hình 2 để làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Kết quả so sánh hai trình tự gen *rpoB* của hai mẫu Ba kích thu được tại Bến En và Pù Luông với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen banks, mã số KR869730

Kết quả phân tích trên hình 2 cho thấy, độ tương đồng của hai trình tự gen *rpoB* thu được là hoàn toàn giống nhau. Như vậy, các trình tự gen *rpoB* của 2 mẫu ở Bến En và Pù Luông là cùng loài, và có sự sai khác không nhiều so với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Gen banks mã số KR869730 của loài *Morinda officinalis*. Sự sai khác này được thể hiện trên bảng 4.

Bảng 4. Sự sai khác của các trình tự gen *rpoB* thu được và trình gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế mang mã số KR869730

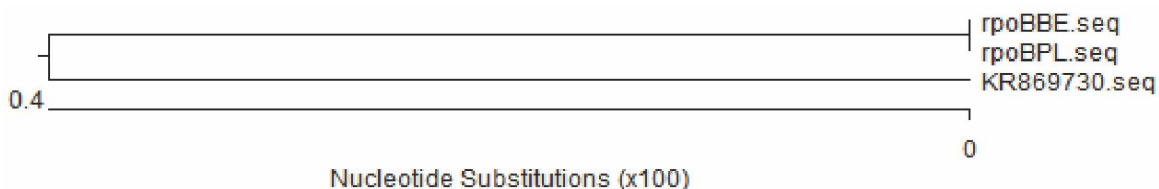
TT	Vị trí	KR869730	BE	PL
1	23	T	G	G
2	24	T	G	G
3	29	C	A	A
4	30	T	C	C

Kết quả trên bảng 4 cho thấy, sự khác nhau trong trình tự các cặp nucleotide gen *rpoB* chúng tôi thu được với trình tự gen *rpoB* đã công bố có mã số KR869730 tại các nucleotide số 23, 24, 29 và 30. Để phân tích sự khác nhau và sự tương đồng của các trình tự gen *rpoB* thu được với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Gen banks mã số KR869730, chúng tôi tiếp tục sử dụng phần mềm Biodit để phân tích, kết quả được thể hiện trên bảng 5.

Bảng 5. So sánh trình tự gen *rpoB* thu được với trình tự gen *rpoB* công bố trên Ngân hàng gen banks mã số KR869730

		Percent Identity			
		1	2	3	
Divergence	1	█	99.2	99.2	1 KR869730.seq
	2	0.8	█	100.0	2 rpoBBE.seq
	3	0.8	0.0	█	3 rpoBPL.seq
		1	2	3	

Kết quả trên bảng 5 cho thấy, sự tương đồng của các trình tự gen *rpoB* chúng tôi thu được là 100% và có sự sai khác 0,8 % so với trình tự gen *rpoB* loài *Morinda officinalis* đã công bố trên Gen banks mã số KR869730. Mối quan hệ di truyền của các trình tự này được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Sơ đồ cây dựa trên trình tự nucleotide của gen *rpoB* của các mẫu thu được với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen banks mã số 869730

Kết quả trên hình 3 cho thấy, các mẫu Ba kích thu được tại Pù Luông và Bến En là cùng loài và có quan hệ di truyền cùng loài *Morinda officinalis* được Ding,P và cs nghiên cứu năm 2015 tại Trung Quốc, điều này được thể hiện ở kết quả phân tích Blast trong NCBI.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc phân lập và đọc trình tự gen *rpoB* của loài Ba kích (*Morinda officinalis*) tại Thanh Hóa, kích thước gen *rpoB* thu được là 509 nucleotid và có sự tương đồng 99% so với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mã số KR689730 của loài *Morinda officinalis*;

Trình tự gen *rpoB* của các mẫu Ba kích thu được tại Xuân Liên và Pù Luông Thanh Hóa có độ tương đồng là 100%, điều này cho thấy trình tự gen *rpoB* các mẫu Ba kích chúng tôi thu được có độ tinh sạch cao và là cùng loài *Morinda officinalis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Viện dược liệu (2001), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 1, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [2] Aron J. F., Kevin S. B., Prasad R. K., Sean W. G., Steven G. N., Brian C. H., Diana M. P., Mehrdad Hajibabaei, Spencer C. H. B. (2008), *Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well*, PLoS ONE, 3(7), 2802.
- [3] Borsch T., Hilu K.W., Quandt D., Wilde V., Neinhuis C., Barthlott W. (2003), *Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms*, J. Evol. Biol, (6), 558-576.
- [4] Chase M. W., Nicolas S., Mike W., James M. D., Rao P. K., Nadia H., and Vincent S. (2005), *Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 360 (1462), 1889-1895.
- [5] Chen D, Yang X, Yang J, Lai G, Yong T, Tang X, Shuai O, Zhou G, Xie Y, Wu Q. (2017), *Prebiotic Effect of Fructooligosaccharides from *Morinda officinalis* on Alzheimer's Disease in Rodent Models by Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis*, Front Aging Neurosci. Dec 8;9:403. doi: 10.3389/fnagi.eCollection.
- [6] Cheng D, Murtaza G, Ma S, Li L, Li X, Tian F, Zheng J, Lu Y. (2017), *In Silico Prediction of the Anti-Depression Mechanism of a Herbal Formula (Tiansi Liquid) Containing Morinda officinalis and Cuscuta chinensis*, Molecules. ep 26;22(10). pii: E1614. doi: 10.3390/molecules22101614.
- [7] German Serino and Pal Maliga (1998), *RNA Polymerase Subunits Encoded by the Plastid rpo Genes Are Not Shared with the Nucleus- Encoded Plastid Enzyme*, PlantPhysiol. Aug, 117(4): 1165-1170.
- [8] Kim S, Kim J, Liu J (2009), *Genetic discrimination of Catharanthus roseus cultivars by pyrolysis mass spectrometry*, J Plant Biol 52: 462465. doi:10.1007/s12374-009-9059-1.
- [9] Kress W. J., Erickson D. L. (2008), *DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics*, Proc Natl Acad Sci U S A, 105(8), 2761-2762.

- [10] Lee YK, Bang HJ, Oh JB, Whang WK. (2017), *Bioassay-Guided Isolated Compounds from Morinda officinalis Inhibit Alzheimer's Disease Pathologies*, *Molecules*. Sep 29;22(10). pii: E1638. doi: 10.3390/molecules22101638.
- [11] Ole S. and Gitte P. (2009), *How many loci does it take to DNA barcode a crocus?*, *PLoS ONE*, 4(2), 4598.
- [12] Taberlet P., Eric C., François P., Ludovic G., Christian M., Alice V., Thierry V., Gérard C., Christian B., and Eske W. (2007), *Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding*, *Nucleic Acids Res*, 35(3), 14.
- [13] Zhang Z, Zhang Q, Yang H, Liu W, Zhang N, Qin L, Xin H. (2016), *Monotropein isolated from the roots of Morinda officinalis increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice*, *Fitoterapia*;110:166-72, doi: 10.1016/j.fitote.2016.03.013.
- [14] Zhang JH, Xin HL, Xu YM, Shen Y, He YQ, Hsien-Yeh, Lin B, Song HT, Juan-Liu, Yang HY, Qin LP, Zhang QY, Du J. (2018), *Morinda officinalis How-A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology*, *J Ethnopharmacol*, Epub 2017 Nov 7. 213:230
- [15] <http://europepmc.org/articles/pmc2063462>.

AMPLIFICATION AND NUCLEOTIDE SEQUENCING OF RPOB GENE FROM MORINDA OFFICINALIS IN THANH HOA

Dinh Thi To Huong, Le Dinh Chac, Trinh Thi Hong

ABSTRACT

The term “DNA barcode” is applied extensively in molecular taxonomy research. Basically, this technique is based on the use of a DNA sequence of about 400-800 bp as a standard for quickly and accurately recognizing and identifying subspecies of species. Thus, DNA barcoding techniques not only help taxonomists in classifying and identifying species, but also improve their capacity to control, understand and utilize biodiversity. Therefore, in this article, we refer to the results of isolation and sequencing of rpoB genes of the Morinda officinalis, in Thanh Hoa province. We isolated two rpoB gene samples in Ben En and Pu Luong Thanh Hoa. The rpoB gene size we obtained was 509 nucleotides and was 99% similar to the published rpoB gene sequence. Found gene bank code KR689730.

Keywords: *rpoB, DNA barcoding, rpoB gene, chloroplast gene.*

Ngày nộp bài: 23/10/2018; Ngày gửi phản biện: 19/11/2018; Ngày duyệt đăng: 6/8/2019.