

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM, SỰ KHÁC BIỆT DI TRUYỀN PHÂN TỬ BỎ THÊ pC8B VÀ TIỀM NĂNG CẢI TIẾN SỨC KHÁNG BỆNH Ở HEO

Đỗ Võ Anh Khoa¹, Klaus Wimmers²

¹Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Viện Sinh học gia súc FBN-Dummerstorf, Đức

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là phân tích cấu trúc, chức năng và đặc điểm di truyền của phân tử pC8B, hướng tới sự chọn lọc các kiểu gen có giá trị miễn dịch nhằm nâng cao sức khỏe cho heo. Nghiên cứu sử dụng phương pháp phân tích trình tự DNA để giải mã chuỗi cDNA và PCR-RFLP để xác định tần số kiểu gen/allele tại locus pC8B ở một vài giống heo nội và ngoại. Kết quả chỉ ra rằng, gen pC8B định vị ở vùng q3.3-3.5 của nhiễm sắc thể 6, với cDNA kích thước 1987 nt mã hóa 611 amino acid. Sự đa hình được tìm thấy tại vị trí 1244A→G tuân theo định luật Hardy-Weinberg ở các giống heo Châu Âu và Mường Khương. Đại phân tử protein pC8B được cấu trúc từ các đoạn protein nhỏ hơn, có chức năng miễn dịch và giàu cysteine như TSP1, LDLa, MACPF và EGF. Kết quả nghiên cứu gợi ý rằng pC8B là ứng viên tiềm năng cho hệ thống phòng vệ tự nhiên của heo chống lại mầm bệnh xâm nhiễm.

Từ khóa: cDNA, đa hình, gen pC8, heo, protein

ĐẶT VẤN ĐỀ

C8 là một trong những thành phần cuối cùng của hệ thống bổ thể, đóng vai trò quan trọng trong sự thành lập phức hợp tấn công màng (Membrane Attack Complex - MAC). Phân tử protein C8 có 3 chuỗi amino acid khác nhau: alpha (C8A), beta (C8B) và gamma (C8G). Giữa C8A và C8G có nối liên kết hóa trị, trong khi C8B kết nối với C8A-C8G không bằng liên kết này (Kaufmann *et al.*, 1993; Tschopp *et al.*, 1981). Dọc theo quá trình hình thành MAC (C5b-C9), C8B là chất trung gian cho sự kết dính C8 với C5b-C7 và C8A có chức năng tương tác với C9. MAC là một phức hợp tấn công màng tế bào vi sinh vật bằng cách tạo ra những lỗ hổng trên màng, tăng tính thấm thấu, xúc tác nhanh sự trao đổi chất bên trong-ngoài màng, dẫn đến sự tự hủy của tế bào (Abraham *et al.*, 1988; Esser, 1994). Đặc điểm phân tử và tính đa hình của gen C8B cũng đã được nghiên cứu ở người và chuột. Ví dụ: Đột biến có thể do allele 0 (null allele), do sự thay đổi allele làm gián đoạn quá trình sinh tổng hợp protein, hoặc do một allele bị xóa trong chuỗi nucleotide (Bellavia *et al.*, 1996; Kaufmann *et al.*, 1993; Rogde *et al.*, 1990). Người ta đã tìm thấy sự khác biệt di truyền trong gen C8 có mối quan hệ chặt chẽ với bệnh bang đỏ (systemic lupus erythematosus) và nhiễm khuẩn cầu não (meningococcus) do sự thiếu hụt của protein C8 trong huyết thanh ở người (Bellavia *et al.*, 1996; Jasin, 1977). Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là để i)

phân tích đặc điểm phân tử và chức năng của gen pC8B, ii) xác định vị trí gen pC8B trên nhiễm sắc thể và iii) đánh giá sự đa dạng di truyền của gen pC8B giữa các giống heo Á-Âu nhằm cung cấp thêm thông tin về sự đa dạng sinh học và làm cơ sở cho việc đánh giá vai trò của pC8B trong hệ miễn dịch tự nhiên của vật chủ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng thí nghiệm

Động vật thí nghiệm là heo từ các giống Hampshire (n = 1), Duroc (n = 1), Berlin Miniature (n = 1) Pietrain (n = 30), Landrace (n = 29), Mường Khương (n = 25). Trong quá trình thu thập, các mẫu gan, tai và chóp đuôi được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và sau đó được bảo quản ở -80°C cho đến khi phân tích.

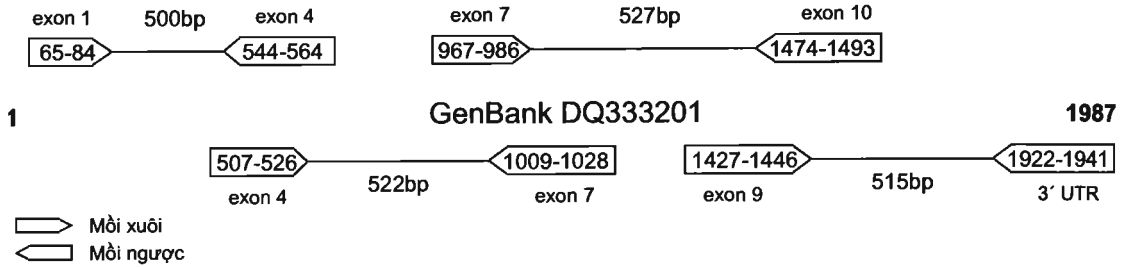
Giải mã trình tự chuỗi cDNA

DNA hệ gen được tách chiết từ mẫu đuôi/tai heo, mRNA và cDNA từ mẫu gan (Wimmers *et al.*, 2003). Bốn cặp mỗi đặc hiệu (Do, 2010) có chiều dài từ 500-527 nt được thiết kế bằng phần mềm primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Các cặp mỗi được sắp đặt đan xen dọc theo chuỗi cDNA của pC8B (GenBank DQ333201) và/ hoặc GenBank ti: 775597740 (Hình 1).

Phản ứng PCR (20 μ l) gồm 50 ng cDNA/DNA, 0,2 mM mỗi (mỗi xuôi và ngược), 50 μ M dNTP (Roth, Karlsruhe, Đức), 0,5 U *Taq* polymerase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Đức), 1x*Taq* buffer và 1,5 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Đức).

Chu trình nhiệt được thực hiện trên T1 Research Thermocycler (Biometra, Göttingen,

Đức): 94°C/ 4'; 40x (94°C/ 30'', 60°C/ 30'', 72°C/ 1'); 72°C/ 5'. Sản phẩm PCR được đánh giá trên gel 1% agarose và nhuộm với ethidium bromide. Trước khi đọc trình tự DNA bằng ABI 310 Gene Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Đức), sản phẩm PCR được tinh sạch bằng phương pháp kết tủa ethanol.



Hình 1. Trình tự của các đoạn mỗi (khung mũi tên) dọc theo chuỗi cDNA của pC8B (GenBank DQ333201).

Đánh giá kiểu gen

Tính đa hình của gen được phát hiện nhờ vào sự so sánh trình tự chuỗi cDNA ở các mẫu của những giống heo khác nhau. Để đánh giá sự khác biệt kiểu gen trên các quần thể, các mẫu DNA được cắt bởi enzyme cắt hạn chế *MaeII* (Fementas, Đức) theo phương pháp PCR-RFLP. Sau đó sản phẩm PCR đã phân cắt được chạy điện di trên gel 3% agarose để xác định các dạng allele. Tần số kiểu gen và tần số allele được tính toán bằng phương pháp Chi-bình phương (χ^2) dựa theo định luật Hardy-Weinberg.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm phân tử cDNA

Chuỗi cDNA của gen pC8B dài 1987 nucleotide (nt) bao gồm 28 nt của vùng 5'-UTR và 123 nt của vùng 3'-UTR. Vùng mã hóa gồm 1836 nt với bộ ba mã hóa khởi đầu ATG (nt 29-31) và bộ ba mã hóa kết thúc TGA (nt 1862-1864) (GenBank DQ333201). cDNA của pC8B được hình thành từ 12 exon, trong đó exon 4 và 5 có cùng kích thước (142 nt). Các exon được xác định dựa trên sự so sánh chuỗi cDNA của pC8B với GenBank CU570701 theo nguyên tắc liên kết exon 1-GT intron AG-exon2. Gen C8B ở heo, người, chó và chuột (12 exon) có số exon nhiều hơn bò (9 exon) (Hình 4). Cấu trúc phân tử cDNA của pC8B thể hiện sự khá tương đồng với các loài động vật hữu nhũ như người

(84%, NM_000066), chó (87%, XM_536694), bò (79%, BC112600) và chuột (79%, AB077306).

Đặc điểm chuỗi polypeptide

Vùng mã hóa của gen pC8B có chứa 611 amino acid (GenBank ABD13969). Peptide tín hiệu (SignalP 3.0, Emanuelsson *et al.*, 2007) được nhận diện đến amino acid (a.a) 44 hoặc 45. Với cấu trúc nguyên tử $C_{3040}H_{4735}N_{855}O_{915}S_{39}$ và khối lượng phân tử pC8B (Swiss-Prot/TrEMBL, Gasteiger *et al.*, 2005) được ước lượng khoảng 69,15 kDa, lớn hơn so với người (khoảng 64 kDa, Schreck *et al.*, 2000). Protein pC8B bao gồm 27 cysteine và vì thế 13 cầu nối disulfide (DiANNA 1.1, Ferre và Clote, 2005) có thể được hình thành giữa Cys¹-Cys¹⁵, Cys²-Cys⁹, Cys³-Cys²⁶, Cys⁴-Cys²⁴, Cys⁵-Cys¹³, Cys⁶-Cys⁷, Cys⁸-Cys²⁷, Cys¹⁰-Cys¹², Cys¹¹-Cys²³, Cys¹⁴-Cys¹⁶, Cys¹⁷-Cys²², Cys¹⁸-Cys²¹ và Cys²⁰-Cys²⁵. Bộ ba chuỗi Asn-Glu-Ser (a.a 56-58), Asn-Phe-Ser (a.a 113-115) và Asn-Val-Thr (a.a 255-257) là những dấu hiệu để nhận biết N-glycosylation (NetNGlyc 1.0, Gupta *et al.*, 2004). Các tryptophan tại a.a 82, 85 và 563 có thể hình thành C-mannosylation motifs (NetCGlyc 1.0, Julenius 2007) ở dạng WP⁸²SSW và WP⁵⁶³. Nhờ vào sự phân tích của phần mềm NetGlycate 1.0 (Johansen *et al.*, 2006), các vị trí glycation đã được tiết lộ cho các lysine 61, 94, 168, 172, 173, 224, 271, 286, 288, 301, 319, 334, 374, 407, 416, 423, 427, 453, 476, 502, 529, 552, 559, và 599. Cấu trúc phân tử pC8B chứa đựng những miền protein chức năng giàu cysteine như

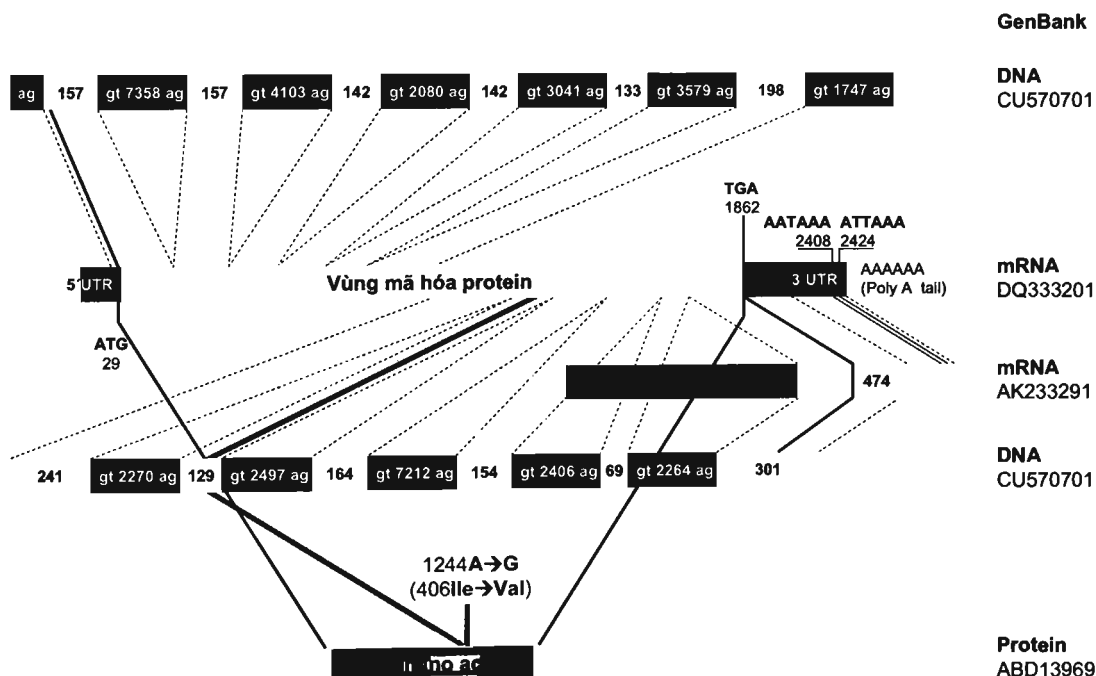
thrombospondin-1 (TSP1, a.a 79-129, 5 cysteine), low-density lipoprotein A (LDL_A, a.a 133-169, 6 cysteine), membrane-attack complex/ perforin (MACPF, a.a 303-510, 2 cysteine), và epidermal growth factor (EGF, a.a 519-547, 5 cysteine) (SMART, Schultz *et al.*, 1998). Rosado và đồng sự (2007) cho rằng những protein chứa miền MACPF đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch ở động vật có xương sống. Sự đồng dạng cao của protein C8 được tìm thấy giữa heo và người (79%, AAI30576)/ chó (79%, XP_536694)/ bò (85%, AAI12601)/ chuột (71%, BAC41371).

Sự đa dạng di truyền

Quá trình sàng lọc chiều dài cDNA của gen pC8B đã phát hiện một đột biến điểm tại vị trí nucleotide 1244A→G (codon 406ATC→GTC) trên exon 8 ở những giống heo khác nhau (Hình 2). Đột biến này đã làm thay đổi thành phần của amino acid 406Ile→Val trong chuỗi polypeptide của pC8B. Qua phân tích cấu trúc protein, sự thay đổi amino acid này nằm trong vùng mã hoá MACPF. Điều này có thể dẫn đến sự thay đổi cấu trúc và chức năng của MACPF, protein pC8B, cũng như MAC nói riêng và hệ thống bổ thể nói chung trong hệ miễn dịch ở heo.

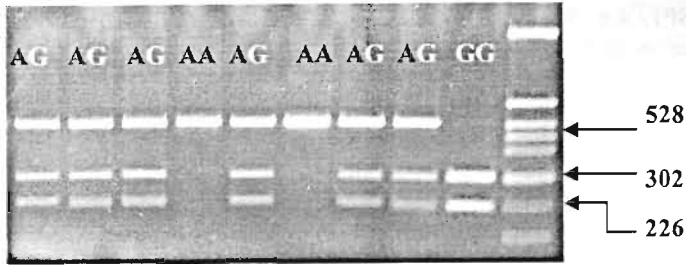
chung trong hệ miễn dịch ở heo.

Qua phân tích kiểu gen trên các giống heo Landrace, Pietrain và Mùong Khương bằng phương pháp PCR-RFLP/*MaeII* (Hình 3), tần số kiểu gen tại vị trí 1244A→G tuân theo định luật Hardy-Weinberg. Các giống heo Châu Âu có sự đa dạng kiểu gen hơn giống heo Mùong Khương, đặc biệt là ở kiểu gen dị hợp AG. Ngược lại, heo Mùong Khương có tần số kiểu gen đồng hợp GG cao hơn các giống heo khác (Bảng 1). Sự khác biệt lớn về tần số giữa các allele ở các giống heo Châu Âu và Mùong Khương có thể là yếu tố làm nên sự kháng bệnh khác nhau giữa các giống. Điều này có thể là kiểu gen đột biến bất lợi "AA" đã được đào thải dần thông qua quá trình chọn lọc tự nhiên ở heo Mùong Khương. Theo Lemke *et al.* (2005), các giống heo bản địa Việt Nam có nguồn gen quý với giá trị kinh tế cao. Một số tác giả cho rằng sức kháng bệnh tự nhiên ở các giống heo nội tốt hơn giống heo ngoại nhưng chưa được minh chứng cụ thể. Yếu tố khác biệt di truyền là một trong các nguyên nhân có thể chi phối các thông số miễn dịch, hứa hẹn tiềm năng cải tiến sức khỏe cho heo trong tương lai. Thực tế điều này đã được chứng minh ở người (Bellavia *et al.*, 1996; Jasin, 1977).



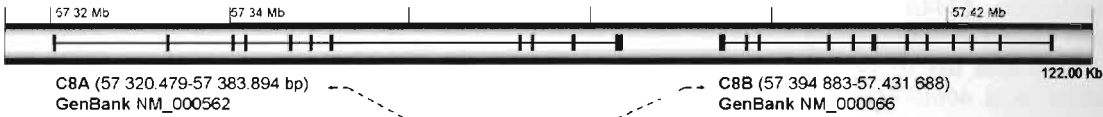
gt ag Những con số bên trong chỉ chiều dài đoạn intron (bp)
Những con số bên trong chỉ chiều dài đoạn exon (bp)

Hình 2. Cấu trúc phân tử DNA của pC8B.

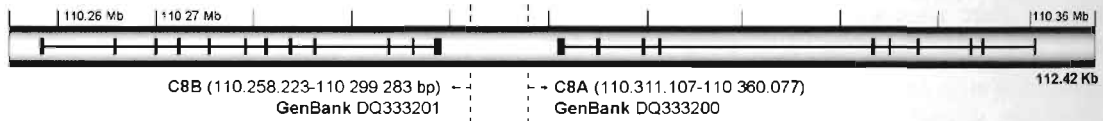


Hình 3. Sản phẩm PCR cắt bởi *Mae*II.

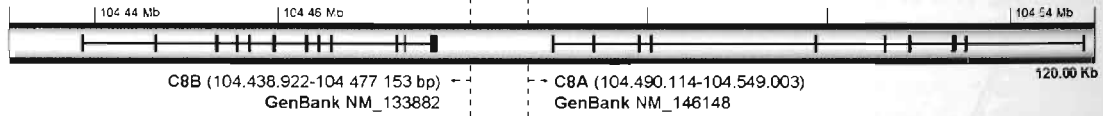
Người, nhiễm sắc thể 1: p32.2



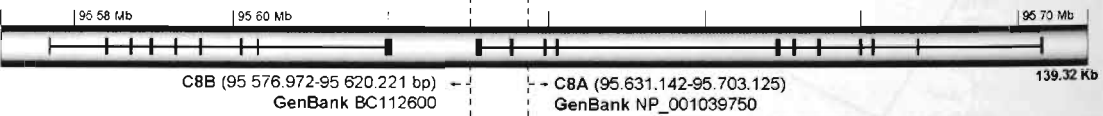
Hèo, nhiễm sắc thể 6: q33



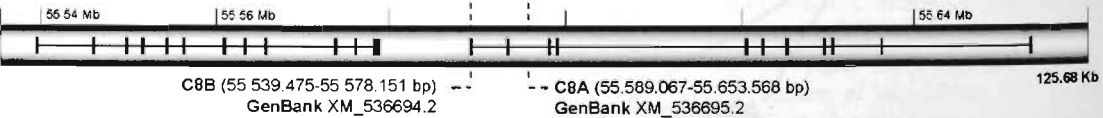
Chuột, nhiễm sắc thể 4: C6



Bò, nhiễm sắc thể 3



Chó, nhiễm sắc thể 5



Hình 4. Vị trí các locus C8A và C8B trên bản đồ gen của người, heo, chuột, bò và chó. Bản đồ được thiết kế dựa vào các thông số, dữ liệu từ www.ensembl.org.

Bảng 1. Đặc điểm kiểu gen ở các giống heo.

	Landrace n (%)	Pietrain n (%)	Mường Khương n(%)
Tần số kiểu gen			
AA	7 (0,23)	6 (0,21)	0 (0,00)
AG	19 (0,63)	17 (0,58)	4 (0,16)
GG	4 (0,13)	6 (0,21)	21 (0,84)
p-value	2,343 ^{ns}	0,862 ^{ns}	0,189 ^{ns}
Tần số allele			
A	33 (0,55)	29 (0,50)	4 (0,08)
G	27 (0,45)	29 (0,50)	46 (0,92)

Vị trí của gen pC8B trên nhiễm sắc thể

Gen pC8A đã được định vị trên vùng q3.3-3.5 của nhiễm sắc thể 6 theo phương pháp lai tại chỗ *in situ* (Nakajima *et al.*, 1998). Trên bản đồ gen (www.ensembl.org), vị trí của gen pC8A được xác định trong vùng 110.311.107-110.360.077 nt của nhiễm sắc thể 6. Cũng trên nhiễm sắc thể này, pC8B tại vị trong khoảng 110.258.223-110.299.383 nt. Hai gen pC8A và pC8B nằm rất gần nhau, khoảng cách giữa hai gen được ước lượng là 11.824 nt. Điều này chứng tỏ gen pC8B cũng nằm trên nhiễm sắc thể 6q3.3-3.5. So sánh bản đồ gen giữa các loài động vật nhận thấy có sự hoán đổi trật tự giữa locus C8A và C8B trên nhiễm sắc thể của người so với heo, chuột, chó hoặc bò (Hình 4).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã giải mã trình tự cDNA, dự đoán chuỗi protein và khám phá SNP trên gen pC8 ở những giống heo khác nhau. Kết quả phân tích chỉ ra rằng C8 là một glycoprotein có cấu trúc phân tử khá tương đồng giữa heo, người và một số loài động vật hữu nhũ ở cả hai mức độ cDNA và protein. Và vì thế có lẽ chức năng miễn dịch của pC8B ở heo cũng giống như các loài động vật có xương sống. Cụ thể là đại phân tử pC8B được cấu thành từ những phân tử nhỏ hơn, giống như các protein chức năng TSP1, LDLa, MACPF và EGF. Các miền này giữ vai trò trong sự kết nối/tương tác của pC8B với các thành phần bổ thể cuối cùng (C5b-9) để hình thành phức hợp MAC, hỗ trợ cho cơ thể vật chủ chống lại mầm bệnh. Sự đa hình trong trình tự DNA của gen pC8B được tìm thấy giữa các giống heo có nguồn gốc Á-Âu thực sự có giá trị trong việc cung cấp thêm thông tin di truyền về sự đa dạng sinh học ở heo cũng như là cầu nối cho những nghiên cứu về sự liên kết di truyền với các tính trạng

miễn dịch. Nghiên cứu đã cung cấp bằng chứng khẳng định pC8B là một trong những gen ứng viên tốt cho hệ miễn dịch tự nhiên ở heo.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hoàn thành dưới sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Nghiên Cứu Giáo Dục Đức (BMBF), sự chỉ dẫn khoa học của GS. TS. Klaus Wimmers (Viện Sinh học Gia súc FBN-Dummerstorf, Đức), sự hỗ trợ của PGS. TS. Nguyễn Văn Đức (Viện Chăn nuôi), và TS. Nguyễn Thị Diệu Thủy (Viện Công nghệ sinh học) và chị Đào Thị Uyên (Công ty Nhâ Phong, Lào Cai).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abraha A, Morgan BP, Luzio JP (1988) The preparation and characterization of monoclonal antibodies to human complement component C8 and their use in purification of C8 and C8 subunits. *Biochem J* 251: 285-292.

Bellavia D, Schneider PM, Rittner C, Malfitano G, Kaufmann TJ, Brai M (1996) Detection of heterozygous C8 beta deficiency by PCR in a healthy Italian population. *Exp Clin Immunogenet* 13: 173-180.

Do VAK (2010) Porcine terminal complement genes C6-9: Molecular characterization of terminal complement genes and their association with hemolytic complement activity in pigs. VDM Verlag Dr. Müller Publisher. ISBN-10 3836494019, ISBN-13 978-3-8364-9401-4, ASIN: 3836494019. Berlin, Germany.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2: 953-971.

Esser AF (1994) The membrane attack complex of complement: assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 87: 229-247.

Ferre F, Clote P (2005) DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* 33: W230-232.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. In Walker JM, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571-607.

Gupta R, Jung E, Brunak S (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/abstract.php>.

Jasin HE (1977) Absence of the eighth component of complement in association with systemic lupus erythematosus-like disease. *J Clin Invest* 60: 709-715.

Johansen MB, Kiemer L, Brunak S (2006) Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology* 16: 844-853.

Julienius K (2007) NetCGlyc 1.0: Prediction of mammalian C-mannosylation sites. *Glycobiology* 17: 868-876.

Kaufmann T, Rittner C, Schneider PM (1993) The human complement component C8B gene: structure and phylogenetic relationship. *Hum Genet* 92: 69-75

Lemke U, Huyen LTT, Roessler R, Thuy LT, Zárate V (2005) Impact of the use of exotic compared to local pig breeds on socio-economic development and biodiversity in Vietnam. In *Conference on International Agricultural Research for Development*. Stuttgart-Hohenheim, October 11-13: 1-4.

Nakajima E, Itoh T, Suzuki K, Kawakami K, Takeda K, Onishi A, Komatsu M (1998) Characterization,

chromosomal localization, and genetic variation of the [alpha] subunit of porcine eighth component of complement. *Anim Genet* 29: 377-380.

Rogde S, Høiby EA, Teisberg P, Olaisen B (1990) Genetic aspects of complement component C8 in Norwegian meningococcal disease patients. *Scand J Infect Dis* 22: 673-679.

Rosado CJ, Buckle AM, Law RH, Butcher RE, Kan WT, Bird CH, Ung K, Browne KA, Baran K, Bashtannyk-Puhalovich TA, Faux NG, Wong W, Porter CJ, Pike RN, Ellisdon AM, Pearce MC, Bottomley SP, Emsley J, Smith IA, Rossjohn J, Hartland EL, Voskoboinik I, Trapani JA, Bird PI, Dunstone MA, Whisstock JC (2007) A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* 317: 1548-1551.

Schreck SF, Parker C, Plumb ME, Sodetz JM (2000) Human complement protein C8 gamma. *Biochim Biophys Acta* 1482: 199-208.

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5857-5864.

Tschopp J, Esser AF, Spira JJ, Moller-Eberhard HJ (1981) Occurrence of an incomplete C8 molecule in homozygous C8 deficiency in man. *J Exp Med* 154: 1599-1607.

Wimmers K, Supamit M, Schellander K, Ponsuksili S (2003) Molecular characterization of the pig C3 gene and its association with complement activity. *Immunogenetics* 54: 714-724.

STUDY ON CHARACTERISTIC, GENETIC VARIATION OF pC8B COMPLEMENT MOLECULE AND ITS POTENTIAL SOURCE FOR IMPROVING DISEASE RESISTANCE IN PIG

Do Vo Anh Khoa^{1,*}, Klaus Wimmers²

¹Cantho University, Vietnam

²Research Institute for the Biology of Farm Animals, Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf, Germany

SUMMARY

The aim of study was to analyze structure, function and genetic characteristics of the porcine C8B complement gene (pC8B) forward to selecting immune valuable genotypes for health improvement in pig. Sequencing and PCR-RFLP methods were used to identify cDNA sequence and to evaluate genotypic frequency of the locus pC8B, respectively. As result, the pC8B macromolecule physically located on the chromosome 6q3.3-3.5 has a cDNA sequence of 1987 nucleotides encoding 611 amino acids. A single nucleotide polymorphism at position 1244A→G agreeing with Hardy-Weinberg equilibrium was detected between European breeds and Muong Khuong. It seems to be the pC8B was mosaic protein constructed from smaller immune rich-cysteine protein segments such as TSP1 (thrombospondin-1), LDLa (lipoprotein A), MACPF (membrane-attack complex/perforin), and EGF (epidermal growth factor). The results, therefore, promote the pC8B as a greatly potential candidate gene for natural defence system of host body against invading pathogens.

Keywords: cDNA, complement pC8B, pig, polymorphism, protein

* Author for correspondence: Tel: 84-918026653; Fax: 84-710-3830814; E-mail: dvakhoa@ctu.edu.vn