

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ CHUỖI NHẹ GEN FIBROIN CỦA MỘT SỐ GIỐNG TẦM LƯỠNG HỆ VÀ CÁC CẶP LAI TRONG SẢN XUẤT CỦA CHÚNG

Nguyễn Thị Thanh Bình, Đinh Thị Ngọc Thúy, Trần Thị Bích Hồng

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Fibroin của tằm dâu *Bombyx mori* L bao gồm chuỗi nặng FH có trọng lượng phân tử khoảng 350 kDa và chuỗi nhẹ FL khoảng 25 kDa, kết nối với nhau bởi liên kết disulfide. Liên kết H-L là yếu tố cần thiết để tiết ra lượng fibroin lớn hơn. Các bài báo trước, chúng tôi đã công bố kết quả nghiên cứu trình tự chuỗi nhẹ FL gen fibroin của một số giống tằm với năng suất chất lượng tơ kén khác nhau. Trong công trình này, chúng tôi thông báo kết quả phân tích trình tự chuỗi nhẹ FL gen fibroin của bốn giống tầm lưỡng hệ kén trắng nguyên chủng, các cặp lai cấp I F1 nhị nguyên xuôi ngược và F1 tứ nguyên trong sản xuất của chúng. DNA tổng số được tách chiết từ mô của các cá thể đực và cái của các mẫu giống. Một đoạn chuỗi nhẹ FL gen fibroin được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm kiểm tra bằng điện di và xác định có kích thước khoảng 752 bp, phù hợp với các công bố trước và tài liệu tham khảo. Sản phẩm được biến nạp vào vector TOPO 2.1 và xác định trình tự. Các trình tự FL gen fibroin phân tích được so sánh với trình tự FL trên GenBank mã số AF541967, độ tương đồng biến động trong khoảng từ 93,94% đến 99,65%. Trình tự chuỗi nhẹ FL gen fibroin được di truyền từ bố mẹ sang con cháu theo quy luật tại các vị trí nucleotide khác nhau và liên quan đến chỉ tiêu hình thái, sinh học của kén. Từ đó mở ra khả năng có thể sử dụng trình tự chuỗi nhẹ FL gen fibroin làm markers di truyền phân tử cho tằm. Kết luận của chúng tôi phù hợp với công bố của các tác giả Hàn Quốc và Nhật Bản.

Từ khóa: Chuỗi nhẹ FL gen fibroin, cặp lai cấp I F1 nhị nguyên, cặp lai F1 tứ nguyên, giống tầm nguyên chủng, *Bombyx mori* L., tách dòng, xác định trình tự

MỞ ĐẦU

Tằm dâu là vật nuôi có ý nghĩa kinh tế bởi sản phẩm tơ kén của chúng là mặt hàng xuất khẩu có giá trị. Hiện nay, nhu cầu sử dụng hàng hóa từ tơ tằm trong khu vực và thế giới gia tăng đã đẩy mạnh phát triển của sản xuất tơ kén (Đặng Đình Dân, 1997). Để nâng cao sản lượng tơ, người ta tập trung vào công tác giống (Đặng Đình Dân, 1997; Inoue *et al.*, 2000; Nguyễn Thị Thanh Bình *et al.*, 2003). Những năm gần đây, cùng với việc chọn tạo giống tằm bằng phương pháp truyền thống, người ta đã sử dụng kỹ thuật phân tử phân tích quan hệ di truyền và nghiên cứu những gen liên quan đến năng suất, chất lượng tơ (Kikuchi *et al.*, 1992; Quingyou, Zhang, 1996; Nguyễn Thị Thanh Bình *et al.*, 2003). Gen fibroin là một trong những gen được nghiên cứu bởi các chuỗi của nó là những chỉ thị phân tử có giá trị (Yamaguchi, Yun, 1989; Inoue *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2001).

Gen fibroin bao gồm chuỗi nặng FH có khối lượng phân tử khoảng 350 kDa và chuỗi nhẹ FL khoảng 25 kDa, kết nối với nhau bởi liên kết

disulfide (Hwang *et al.*, 2001). Liên kết H-L là yếu tố cần thiết để tiết ra lượng fibroin lớn hơn (Mori *et al.*, 1995), nó được gắn với glycoprotein khoảng 30 kDa bằng hóa trị không tương tác (Yamaguchi *et al.*, 1989). Trình tự mã hóa gen fibroin gồm lõi giàu Guanine mang tính lặp lại cao và bên ngoài là đầu 3' và 5' không lặp lại đã được công bố (Inoue *et al.*, 2000). Việc nghiên cứu trình tự gen fibroin mở ra khả năng cải tạo giống tằm dâu theo hướng nâng cao chất lượng tơ kén (Hwang *et al.*, 2001).

Ở Việt Nam, hướng nghiên cứu này mới bắt đầu trong vài năm gần đây do nhóm nghiên cứu thuộc Viện Công nghệ Sinh học chúng tôi thực hiện với các công trình về xác định trình tự gen fibroin của một số giống tằm có năng suất chất lượng tơ kén khác nhau (Nguyễn Thị Thanh Bình *et al.*, 2004; 2005). Tiếp theo là so sánh trình tự gen fibroin của một số giống tầm nguyên chủng và các cặp lai cấp I F1 nhị nguyên, F1 tứ nguyên trong sản xuất của chúng. Bài báo này trình bày về chuỗi nhẹ FL gen fibroin của một số cặp lai và các giống tạo ra chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Bốn giống tằm lưỡng hệ kén trắng V5.6, V7.8, V9.10, V11.12, các cặp lai F1 nhĩ nguyên xuôi V1.2, V13.14, F1 nhĩ nguyên ngược V3.4, F1 tứ nguyên V15.16 (V: ký hiệu tên, số lẻ: con đực, số chẵn: con cái) do Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông Lâm nghiệp Lâm Đồng cung cấp. Đây là các cặp lai được sử dụng rộng rãi trong sản xuất tại Lâm Đồng nhiều năm và đã được công nhận giống quốc gia. Về hình thái, các mẫu V1.2, V9.10, V11.12 thuộc hệ Trung Quốc, các mẫu V5.6, V7.8, V3.4, V13.14, V15.16 thuộc hệ Nhật Bản. Cặp mỗi FL1 và FL2 thiết kế theo Yasucochi (1999) có trình tự như sau: FL1: 5' AGA AAA TAC ACG AAA GAA AT 3', FL2: 5' ATA AGC GAC ATA CTG AAA CA 3'. Vector tách dòng pCR® 2.1 TOPO mua của Invitrogen. Chủng *E. coli* TOP 10F' mua từ Gibco BRL Life Technologies. Bộ hóa chất chuẩn xác định trình tự nucleotide mua của Applied Biosystems (ABI).

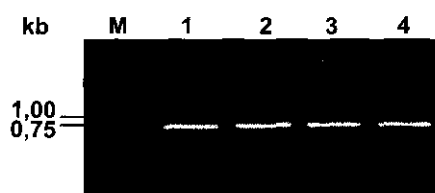
Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số từ mô, sử dụng proteinase K/ phenol/ chloroform (Herni, 1989). Độ tinh khiết và nồng độ nucleotide xác định bằng máy quang phổ hấp thụ (Hewlett Parkard). PCR được tiến hành với tổng thể tích là 20 µl, dùng cặp mỗi FL₁ và FL₂. Thành phần của phản ứng bao gồm 20 ng DNA tổng số, 2 U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTP và đệm tương ứng. Chu trình PCR: biến tính ban đầu 4 phút ở 94°C, sau đó 40 chu kỳ gồm biến tính 40 giây ở 94°C, gắn mỗi 1 phút ở 56°C, kéo dài mạch 1 phút 30 giây ở 72°C, kết thúc kéo dài mạch 7 phút ở 72°C, ngừng phản ứng ở 4°C (Honer *et al.*, 1989; Herni, 1989; Kikuchi *et al.*, 1992). Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector pCR 2.1.TOPO®, sau đó plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP 10F'. Các kỹ thuật dùng trong tách dòng gen đối với vật chủ là *E. coli* tiến hành theo Sambrook, Russell (2001). Trình tự nucleotide của chuỗi nhẹ FL gen fibroin xác định trên máy tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer với bộ kit BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing. Trình tự nucleotide của mỗi mẫu xác định từ chiều xuôi và ngược rồi xử lý bằng các phần mềm ABI PRISM® 3100-Avant Data Collection V1.0 và DNA sequencing Analysis, sau đó phân tích bằng phần mềm CLUSTALX (1.81) và BLAST.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng chuỗi nhẹ FL gen fibroin của các mẫu giống tằm dâu

DNA tổng số của các mẫu giống sau khi tách chiết và xác định mức độ hấp thụ tử ngoại (OD) bằng máy đo quang phổ, được pha loãng tới nồng độ cần thiết để làm khuôn trong PCR với cặp mỗi FL1 và FL2. Theo lý thuyết, sử dụng cặp mỗi này sẽ nhân được đoạn gen có kích thước khoảng 0,75 kb. Sản phẩm PCR hoàn thành được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1). Kết quả hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, kích thước phân tử của đoạn được nhân khoảng 0,75 kb, như vậy phù hợp với tính toán lý thuyết và tài liệu tham khảo.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR. M: Marker 1 kb; 1-4: Đoạn gen FL.

Sản phẩm PCR sau khi gắn vào vector pCR® 2.1 TOPO, được biến nạp vào tế bào *E. coli* dòng TOP 10F' rồi cấy trải trên môi trường thạch LB có chứa ampicillin và các thành phần thiết yếu khác. Một số khuẩn lạc trắng và xanh được nhặt ngẫu nhiên để tách chiết DNA plasmid và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Dựa vào điện di đồ, các mẫu mang các plasmid tái tổ hợp có kích thước lớn hơn các mẫu mang vector pCR® 2.1 được chọn và kiểm tra bằng cách cắt với enzyme *EcoRI* để chắc chắn rằng trong quá trình gắn sản phẩm PCR vào vector không có sản phẩm phụ nào khác. Sau khi cắt, sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose 0,8%, trên đó những mẫu từ khuẩn lạc xanh chỉ cho ra một băng có trọng lượng phân tử đúng bằng trọng lượng phân tử của vector pCR® 2.1, còn các mẫu từ khuẩn lạc trắng cho ra hai băng, một băng có kích thước tương ứng với kích thước của vector pCR® 2.1, băng thứ hai có kích thước đúng bằng của băng sản phẩm PCR. Điều đó cho phép khẳng định sản phẩm PCR đã được gắn vào vector pCR® 2.1.

Xác định trình tự nucleotide chuỗi nhẹ FL gen fibroin của các mẫu giống tằm dâu

Những plasmid mang chuỗi nhẹ FL gen fibroin

của 16 mẫu giống đã được tách với số lượng lớn để xác định trình tự nucleotide, sau đó so sánh với các trình tự FL khác trên GenBank, độ tương đồng của các mẫu giống thay đổi từ 93,94 đến 99,65%. Các trình tự của chúng tôi đã được đăng ký vào GenBank mã số từ EF421129 đến EF421144. Hình 2 trình bày kết quả so sánh giữa các mẫu giống với trình tự FL tằm dâu trên GenBank mã số AF541967 của các tác giả Hàn Quốc (Cho, Kang, 2003) cho thấy, các sản phẩm nhận được có kích thước từ 732 đến 735 bp. Các mẫu giống tằm nuôi tại Việt Nam có 7 vị trí nucleotide thay đổi giống nhau và khác so với AF541967. Tại vị trí 79: nucleotide C của AF541967 chuyển thành T ở các mẫu giống tằm nuôi ở Việt Nam, tại vị trí 221: các mẫu giống Việt Nam chèn thêm A, vị trí 283: nucleotid A chuyển thành G, vị trí 476: A thành T, vị trí 483: T thành A, vị trí 525 - 526: mất TA, điều này thể hiện rõ trên sơ đồ quan hệ chủng loại ở hình 3. Theo sơ đồ, các mẫu giống tằm phân tích được chia thành 3 nhóm, nhóm 1 là các mẫu giống thuộc hệ Nhật Bản bao gồm V3.4, V5.6, V7.8, V13.14, V15.16 với đặc điểm chất lượng tơ kén tốt. Nhóm 2 là các mẫu

giống thuộc hệ Trung Quốc bao gồm V1.2, V9.10, V11.12 với đặc điểm sức sống cao, còn nhóm 3 là AF541967.

Xem xét theo hệ kén, các mẫu giống thuộc hệ Trung Quốc: V9.10, V11.12, V1.2 có sự thay đổi nucleotide tại 25 vị trí giống hệt nhau so với với AF541967 và các mẫu giống thuộc hệ kén khác, đó là A thành C tại vị trí 273 và 592, A thành T ở vị trí 532 và 634, A thành G ở vị trí 512, 604, 610, C thành T tại vị trí 63, C thành A ở vị trí 412, T thành C tại vị trí 135, 519, 576, 622, G thành A ở vị trí 462, 463, 556, 614, 620, G thành T ở vị trí 584, mất TTTA tại các vị trí từ 624 đến 627 và chèn thêm A tại vị trí 438, 439. Các mẫu giống thuộc hệ Nhật Bản gồm V3.4, V5.6, V7.8, V13.14, V15.16 có các nucleotide thay đổi giống hệt nhau và không giống với AF541967 cũng như các giống khác, đó là tại hai vị trí 577 và 595 C thành T, ở vị trí 659 A thành G. Như vậy, sự khác biệt về trình tự nucleotide của FL giữa các giống theo hệ kén có thể sử dụng để nhận dạng và đánh giá giống. Kết quả của chúng tôi phù hợp với công bố của Cho, Kang (2003).

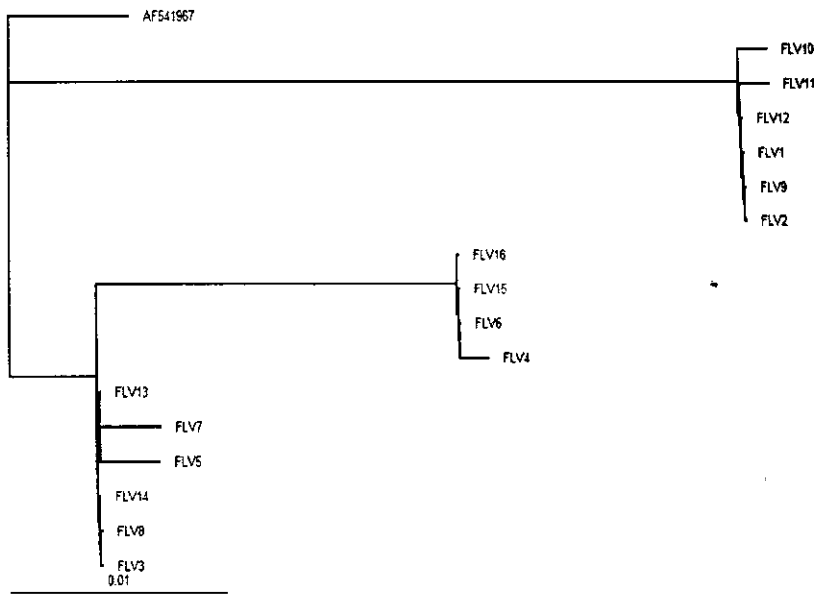
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AF541967	gacaaaagca	tcgccatcct	caacgttcaa	gagatcttga	aggacatggc	cagccagggc	gactatgcaa	gtcaagcacc	agcgggtggcc	caaaccggcg	gaattatcgc
FLV1							..T.....	T..			
FLV2							..T.....	T..			
FLV3								T..			
FLV4								T..			
FLV5								T..			
FLV6								T..			
FLV7								T..			
FLV8								T..			
FLV9							..T.....	T..			
FLV10							..T.....	T..			
FLV11							..T.....	T..			
FLV12							..T.....	T..			
FLV13								T..			
FLV14								T..			
FLV15								T..			
FLV16								T..			

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AF541967	ccatctatct	gccggtatcc	ccggtgatgc	ctgtgcagcc	gctaacgtaa	gtagatgccg	ctgttagaaa	caataaaaca	gtacgtctaa	atatattatta	cccgaaacta
FLV1											
FLV2											
FLV3											
FLV4											
FLV5											
FLV6											
FLV7											
FLV8											
FLV9											
FLV10											
FLV11											
FLV12											
FLV13											
FLV14											
FLV15											
FLV16											

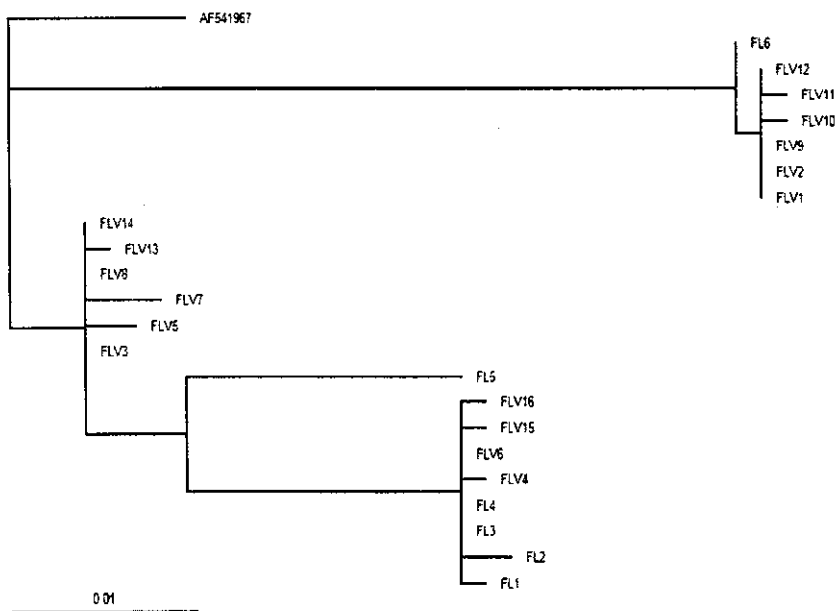
	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
AF541967	-gaagaagca	gtgtcacttt	tcgcagactt	tagaagaaaa	aatcggtacc	gtagattgga	ggaatcggg	accctttcta	aatccgacac	aaattttcaa	tggttagggg
FLV1	A.....										
FLV2	A.....										
FLV3	A.....										
FLV4	A.....										
FLV5	A.....										
FLV6	A.....										

[illegible]

Hình 2. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen FL của 16 mẫu giống tằm và AF541967. Các trình tự giống với trình tự của AF541967 được biểu thị bằng dấu(.) và khác được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng.



Hình 3. Sơ đồ quan hệ giữa 8 mẫu giống theo 16 trình tự nucleotide chuỗi nhẹ FL gen fibroin.



Hình 4. Sơ đồ quan hệ giữa 14 mẫu giống theo 22 trình tự nucleotide chuỗi nhẹ FL gen fibroin.

Phân tích theo quan hệ di truyền giữa giống nguyên với các cặp lai cấp I F1 nhị nguyên và F1 tứ nguyên cho thấy, các giống nguyên V9.10, V11.12 và cặp lai cấp I F1 nhị nguyên V1.2 có 25 vị trí nucleotide giống hệt nhau và khác với các mẫu giống khác. Mẫu cái của giống nguyên thuộc hệ Nhật Bản

V6, mẫu cái của cấp I F1 nhị nguyên V4 và mẫu đực, cái của F1 tứ nguyên V15.16 có các nucleotide ở 10 vị trí giống nhau và khác so với các mẫu giống khác. Đó là A thành C ở vị trí 547, C thành A ở vị trí 294, 710, C thành T tại vị trí 676, T thành A ở vị trí 446, T thành C tại vị trí 370, G thành A ở vị trí 274, 357,

499, 693. Mẫu đực, cái của các giống nguyên hệ Trung Quốc V9.10, V11.12, mẫu cái của giống nguyên V6, của cặp I F1 nhị nguyên V4 hệ Nhật Bản, mẫu đực, cái của cặp I F1 nhị nguyên hệ Trung Quốc V1.2 và mẫu đực, cái của F1 tứ nguyên hệ Nhật Bản V15.16 có nucleotids giống nhau tại hai vị trí 359, 418 đó là G thành A và C thành A. Tại vị trí 485 G chuyển thành A ở các mẫu đực, cái giống nguyên hệ Trung Quốc, các mẫu đực, cái cặp I F1 nhị nguyên và mẫu đực ở F1 tứ nguyên.

Ngoài ra, so sánh các trình tự FL trên với 6 giống tầm cao sản đã phân tích trước đó trên sơ đồ quan hệ chủng loại ở hình 4 cho thấy, chúng được chia thành 3 nhóm, trong đó nhóm giống hệ Nhật Bản và hệ Trung Quốc đứng riêng biệt. Các giống tầm cao sản số 1, 2, 3, 4 thuộc hệ Nhật Bản, còn giống số 6 thuộc hệ Trung Quốc. Điều này phù hợp với các thông tin được cung cấp từ đơn vị giống.

Phân tích quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu

Từ các trình tự nhận được, chúng tôi phân tích quan hệ di truyền giữa các mẫu giống theo khoảng cách di truyền trình bày trên bảng 1. Bảng 1 cho thấy, chỉ số này dao động từ 0 đến 0,0529 nghĩa là các mẫu giống có hệ số tương đồng cao về trình tự FL, thể hiện tính ổn định về chất lượng tơ, theo báo cáo đánh giá của đơn vị giống thì các mẫu giống này thuần cao về năng suất, chất lượng tơ kén (Tô Thị Tường Vân *et al.*, 2002).

Quan sát trên bảng 1 còn thấy, giữa các giống nguyên thuộc hệ Trung Quốc V9.10, V11.12 và cặp lai cấp I F1 nhị nguyên V1.2 có khoảng cách di truyền từ 0 đến 0,0014, còn giữa các giống nguyên

thuộc hệ Nhật Bản V5.6, V7.8 và cặp lai cấp I F1 nhị nguyên V3.4 chỉ số này là 0 đến 0,0209, nghĩa là chúng có khoảng cách di truyền rất thấp, bởi chúng được lai gần và cùng hệ kén. Cặp lai F1 tứ nguyên V15.16 có khoảng cách di truyền với giống nguyên thuộc hệ Trung Quốc là 0,0485 - 0,0529 và giống nguyên thuộc hệ Nhật Bản là 0,0014 - 0,0209, như vậy chúng gần gũi hay nói cách khác là giống với giống nguyên thuộc hệ Nhật Bản hơn. Thực tế phù hợp với các số liệu nhận được vì chúng có chất lượng tơ kén tốt và dạng kén như giống nguyên thuộc hệ Nhật Bản. Trên cơ sở các số liệu về khoảng cách di truyền và sơ đồ quan hệ giữa các mẫu giống có thể đánh giá mức độ di truyền của gen FL từ giống nguyên sang cấp I F1 nhị nguyên và F1 tứ nguyên. Điều này nếu được khai thác sẽ hỗ trợ cho việc dự đoán ưu thế lai và nhóm cặp lai theo định hướng chọn tạo giống năng suất chất lượng tơ kén cao. Một số nghiên cứu về gen fibroin cho biết, trong fibroin tơ của tằm kết kén bình thường, tỷ số phân tử giữa chuỗi nặng, chuỗi nhẹ và glycoprotein là 6: 6: 1, còn trong trường hợp “nhộng trần”- hiện tượng tằm hóa nhộng không kết kén, tỷ số trên thay đổi vì thiếu hụt chuỗi nhẹ, mặc dù tỷ lệ 6: 1 giữa chuỗi nặng và glycoprotein vẫn được duy trì (Yasucocchi, 1999). Các tác giả Nhật Bản phát hiện: liên kết H-L là yếu tố cần thiết cho sự tiết ra lượng lớn fibroin bởi vì tằm mang đột biến Nd-s hoặc Ns-s^D của gen fibroin chuỗi nhẹ không thể tạo ra liên kết disulfide kết nối với chuỗi nặng và lượng fibroin được tiết ra giảm 1% so với bình thường (Mori *et al.*, 1995). Người ta hy vọng về khả năng cải tạo giống tầm trong tương quan đến chất lượng tơ kén được nghiên cứu ở mức độ sâu hơn (Hwang *et al.*, 2001).

Bảng 1. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu giống

	AF541967	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16
AF541967	0.0000																
FLV1	0.0396	0.0000															
FLV2	0.0395	0.0000	0.0000														
FLV3	0.0096	0.0380	0.0380	0.0000													
FLV4	0.0280	0.0515	0.0514	0.0181	0.0000												
FLV5	0.0123	0.0409	0.0408	0.0027	0.0209	0.0000											
FLV6	0.0267	0.0501	0.0501	0.0167	0.0014	0.0195	0.0000										
FLV7	0.0124	0.0410	0.0409	0.0027	0.0209	0.0055	0.0195	0.0000									
FLV8	0.0096	0.0380	0.0380	0.0000	0.0181	0.0027	0.0167	0.0027	0.0000								
FLV9	0.0395	0.0000	0.0000	0.0380	0.0514	0.0408	0.0501	0.0409	0.0380	0.0000							
FLV10	0.0410	0.0014	0.0014	0.0394	0.0529	0.0423	0.0501	0.0424	0.0394	0.0014	0.0000						
FLV11	0.0410	0.0014	0.0014	0.0394	0.0529	0.0423	0.0516	0.0424	0.0394	0.0014	0.0027	0.0000					
FLV12	0.0395	0.0000	0.0000	0.0380	0.0514	0.0408	0.0501	0.0409	0.0380	0.0000	0.0014	0.0014	0.0000				
FLV13	0.0110	0.0395	0.0394	0.0014	0.0195	0.0041	0.0181	0.0041	0.0014	0.0394	0.0408	0.0409	0.0394	0.0000			
FLV14	0.0096	0.0381	0.0380	0.0000	0.0181	0.0027	0.0167	0.0027	0.0000	0.0380	0.0395	0.0395	0.0380	0.0014	0.0000		
FLV15	0.0280	0.0486	0.0485	0.0181	0.0027	0.0209	0.0014	0.0209	0.0181	0.0485	0.0500	0.0500	0.0485	0.0195	0.0181	0.0000	
FLV16	0.0280	0.0515	0.0514	0.0181	0.0027	0.0209	0.0014	0.0209	0.0181	0.0514	0.0529	0.0529	0.0514	0.0195	0.0181	0.0027	0.0000

KẾT LUẬN

Trình tự nucleotide đoạn chuỗi nhẹ FL gen fibroin của một số giống tằm nguyên chủng và các cặp lai F1 nhĩ nguyên, F1 tứ nguyên của chúng có kích thước 732 bp đến 735 bp. Độ tương đồng với các đoạn chuỗi nhẹ khác trên GenBank dao động từ 93,94% đến 99,65%.

So sánh với trình tự nucleotide trên GenBank mã số AF541967 có sự thay đổi nucleotide tại nhiều vị trí khác nhau liên quan đến hệ kén, giống tằm nuôi tại Việt Nam và quan hệ di truyền giữa giống nguyên chủng với cặp lai F1 nhĩ nguyên cũng như F1 tứ nguyên, có thể sử dụng để nhận dạng và đánh giá giống.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn TTNCTNNLN Lâm Đồng và TS. Tô Thị Tường Vân đã cung cấp mẫu giống, cảm ơn Phòng Công nghệ ADN Ứng dụng và PGS. TS. Nông Văn Hải đã giúp đỡ trong giải trình tự. Công trình thực hiện với kinh phí của đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, hướng Công nghệ Sinh học 2005 - 2006.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Choi KH, Kang SW (2003) The use of fibroin Light Chain Gene Sequence for the Genetic Marker of the silkworm Races. *Int J Indust Entomol* 6(1): 45-49.

Đặng Đình Đan (1997) Tạo giống tằm lưỡng hệ xuân thu N 12- N 16. *Kết quả nghiên cứu khoa học đầu tằm từ 1986-1996*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội: 74-84.

Herni AE (1989) PCR technology principles and application for DNA amplification. *Mol Biol* 17: 221.

Honer B, Burke WD, Eickbush TH (1991) Sequence identity in an early chorion multigene family is the result of localized gene conversion. *Genetics* 128: 595-606.

Hwang JS, Lee JS, Goo TW, Yun EY, Lee KS, Kang SW (2001) Cloning of the fibroin gene from the oak silkworm and its complete sequence. *Biotech Lett* 23: 1321-1326.

Inoue S, Tanaka K, Arisaca F, Kimura S, Ohmoto K, Mizuno S (2000) Silk Fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary

unit consisting of H-chain, L chain, and P 25, with a 6: 6: 1 Molar Ratio. *J Biol Chem* 275(51): 17- 28.

Kikuchi Y, Mori K, Suzuki S, Yamaguchi K, Mizuno S (1992) Structure of the *Bombyx mori* fibroin light chain encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. *Mol Gen Genet* 110: 151-158.

Mori K, Tanaka K, Kikuchi Y, Waga M, Misuno S, (1995) Production of a chimeric fibroin light chain polypeptide in a fibroin secretion- deficient naked pupae mutant of the silkworm *Bombyx mori* L. *J Mol Biol* 251: 217-228.

Nguyễn Thị Thanh Bình, Hoàng Thị Hằng, Nông Văn Hải, Hà Văn Phúc (2003) Ứng dụng chỉ thị phân tử nghiên cứu đa hình và sàng lọc các giống tằm đa hệ Việt nam. *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 16-17/12/2003*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 1159-1163.

Nguyễn Thị Thanh Bình, Hoàng Thị Hằng (2004) Phân tích trình tự chuỗi nặng gen fibroin của một số giống tằm *Bombyx mori* L. Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(2): 177-183.

Nguyễn Thị Thanh Bình, Đinh Thị Ngọc Thúy, Vũ Thị Thu Hương (2005), Xác định và phân tích trình tự chuỗi nhẹ gen fibroin của một số giống tằm cao sản. *Hội nghị Toàn quốc Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Sự sống*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 1441-1444.

Quingyou X, Zhang S (1996) Study on the molecular genetic diversity of *Bombyx mori* L.. *International Symposium on Sericulturral. Science* 2: 76-79.

Sambrook J, Russell DW (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Tô Thị Tường Vân (2002), *Các công trình nghiên cứu khoa học về lai tạo giống tằm trong 15 năm 1988-2002*. Nhà xuất bản Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh: 88-92.

Yamaguchi K, Yun G (1989) Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J Mol Biol* 210: 127-139.

Yasucochi Y (1999) A simple and accurate method for generating co-dominant marker: an application of conformation- sensitive gel electrophoresis to linkage analysis in the silkworm. *Mol Gen Genet* 261: 796-802.

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF LIGHT CHAIN FIBROIN GENE OF SEVERAL VIETNAMESE BIVOLTINE SILKWORM STRAIN AND THEIR TETRA-PARENTAL HYBRIDS

Nguyen Thi Thanh Binh*, Dinh Thi Ngoc Thuy, Tran Thi Bich Hong

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Fibroin of the silkworm *Bombyx mori* L. consists of a heavy chain FH fibroin of about 350 kDa and a light chain FL fibroin gene of about 25 kDa, linked by a disulfide bond. The H-L linkage is essential for the secretion of a vast amount of fibroin. Total genomic DNA was extracted from sixteen individual tissue samples of four Vietnamese bivoltine silkworm strains and their double cross hybrids. A primer set (FL1 and FL2) designed by Yasuochi (1999) was applied to amplify a portion of the FL gene. The DNA fragment of 752 bp was obtained from genomic DNA and inserted into pCR[®] 2.1 TOPO vector for sequencing. The results showed that the sizes of amplified gene fragments range from 733bp to 735bp. Their sequence similarities compared to those in GenBank vary from 93,94 to 99,65%. We also confirmed that the FL gene sequences of sixteen samples were mutated at many positions compared with the sequence of AF541967 deposited in GenBank. There is a correlation between above-mentioned variations and cocoon's shapes, Vietnamese bivoltine silkworm strains as well as genetic traits of pure strains and their tetra-parental hybrids. This genetic marker may be used in breeding and selection of silkworm. These sequences have been registered in GenBank.

Keywords: *Bombyx mori* L., nucleotide sequence, light chain fibroin gene, tetra-parental hybrid, Vietnamese silkworm strains

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7564333-1102; E-mail: binhttn2000@yahoo.com