

BIỂU HIỆN GENE AQUAPORIN 1 (AQP1) TRÊN CÁ RÔ ĐỒNG (ANABAS TESTUDINEUS) NUÔI THỬ NGHIỆM TRONG NƯỚC MẶN

THE EXPRESSION OF GENE AQUAPORIN 1 (AQP1) ON ANABAS TESTUDINEUS EXPERIMENTALLY GROWN IN SALT WATER

TRƯƠNG THẾ QUANG(*) và HUỖNH NGỌC MỸ PHƯƠNG(**)

TÓM TẮT: Trình tự cDNA hoàn chỉnh mã hóa AQP1 thu được từ mang của *Anabas testudineus* bao gồm 786 nucleotide đã được GenBank USA cấp mã số gia nhập (Accession Number) MT012828, mã hóa cho AQP1 với 261 amino acid, có khối lượng phân tử ước tính là 27,4 kDa. Mức độ biểu hiện của AQP1 ở mang *Anabas testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau 6 ngày cao nhất $12,26.10^2$ bản/ng cDNA, ở da cá $10,65.10^2$ bản/ng cDNA, ở thận cá là $2,82.10^2$ bản/ng cDNA và thấp nhất là ở ruột cá $0,48.10^2$ bản/ng cDNA. Mức độ biểu hiện AQP1 khi *Anabas testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau 1 ngày cao nhất ở mang cá $7,16.10^2$ bản/ng cDNA, tiếp đến ở da và thận cá $4,13.10^2$ bản/ng cDNA và $4,47.10^2$ bản/ng cDNA, thấp nhất ở ruột cá $0,27.10^2$ bản/ng cDNA.

Từ khóa: cá rô đồng; gene đích AQP1; mức độ biểu hiện gene; real-time PCR.

ABSTRACT: The complete cDNA sequence encoding AQP1 obtained from the gills of *Anabas testudineus* consists of 786 nucleotides that have been granted accession number MT012828 by GenBank USA, encoded for AQP1 with 261 amino acids which have an estimated molecular weight of 27.4 kDa. The expression level of AQP1 in *Anabas testudineus* gills living in salt water (salinity 30) after 6 days was the highest with 12.26×10^2 copies/ng cDNA, the skin of fish was 10.65×10^2 copies/ng cDNA, the kidneys of fish was 2.82×10^2 copies/ng cDNA and the lowest was in the gut of fish 0.48×10^2 copies/ng cDNA. The AQP1 expression level when *Anabas testudineus* lived in salt water (salinity 30) after a day was highest in gill of fish 7.12×10^2 copies/ng cDNA, followed was in the skin and kidneys of fish 4.13×10^2 copies/ng cDNA and 4.47×10^2 copies/ng cDNA, the lowest was in the gut of fish 0.27×10^2 copies/ng cDNA.

Key words: *Anabas testudineus*; AQP1 target gene; gene expression level; real-time PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, tình hình nuôi trồng thủy sản ở nước ta đã gặp nhiều bất lợi do biến đổi khí hậu làm tình trạng xâm nhập mặn sâu vào các vùng nuôi cá nước ngọt ngày càng tăng. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra giống cá mới có khả năng thích nghi tốt, phát triển bình thường và có giá trị kinh tế cao ở môi trường

nước lợ, nước mặn là việc trăn trở của các nhà khoa học thủy sản. Nếu việc nghiên cứu này thành công thì có ý nghĩa rất lớn trong khoa học và thực tiễn. Cá rô đồng (*Anabas Testudineus*) là một loài cá nước ngọt, có kích thước nhỏ, không có xương dăm, được ưa chuộng trên thị trường do giá trị dinh dưỡng, thịt cá thơm ngon và có giá trị kinh tế cao. Cá

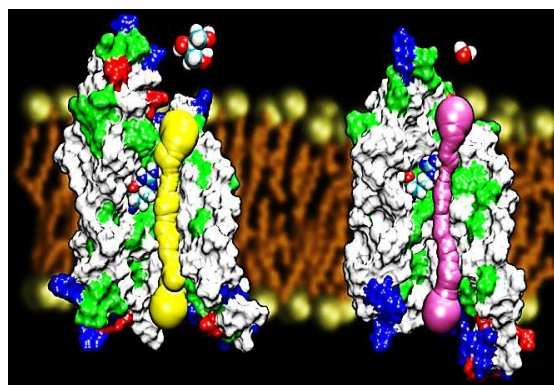
(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, truongthequang@vanlanguni.edu.vn

(**) KS. Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Mã số: TCKH21-05-2020

rô đồng sống rất khỏe, dễ nuôi, có thể chịu đựng được điều kiện nước cực kỳ bất lợi nhờ cơ quan hô hấp phụ trên mang. Chúng có khả năng di chuyển xa trên cạn để tìm chỗ thích hợp cho việc sinh sống. Trên đất liền, cá rô đồng có thể sử dụng amino acid làm nguồn năng lượng để hỗ trợ hoạt động vận động và tích cực bài tiết amoniac qua mang và da [9, tr.4475-4489]. Ngoài ra, chúng có thể tích lũy từ nước ngọt đến nước biển thông qua sự tăng dần về độ mặn trong phòng thí nghiệm [1, tr.708-723]. Hiện nay, phong trào nuôi cá ngày càng có xu hướng phát triển cùng với những ưu điểm trên thì cá rô đồng đang được quan tâm. Cũng giống như nhiều loài thủy sản khác trong quá trình sinh trưởng và phát triển thì yếu tố môi trường sống luôn có sự thay đổi và ảnh hưởng đến quá trình sinh hóa, sinh lý trong cơ thể. Trong đó, độ mặn là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự phân bố, tỷ lệ sống và trao đổi chất trong suốt quá trình phát triển của cá. Tuy nhiên, hiện nay loài cá này chủ yếu nuôi ở vùng nước ngọt, chưa có nghiên cứu sâu về sự sinh trưởng và phát triển của cá rô đồng ở các vùng nước mặn, nước lợ.

Protein aquaporin (AQP) có cấu trúc ba chiều đặc trưng. AQP là một lớp màng các kênh protein làm trung gian chịu trách nhiệm vận chuyển nước ra vào tế bào để đáp ứng sự thay đổi áp suất thẩm thấu [5]. Aquaporin có kích thước monome nhỏ dao động từ 26 đến 30 kDa, chuỗi polypeptide dài khoảng 300 amino acid [12]. Cho đến nay, có 17 loại phân tử AQP (AQP0-16) đã được mô tả trong nhiều loài động vật [2]. Trong đó AQP0-12 đã được phân loại thành ba nhóm chính [6, tr.327-358]. Nhóm 1: AQP - protein đặc trách chuyển nước qua màng gồm AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 và AQP5; Nhóm 2: Aquaglyceroporins - protein chuyển nước và các chất có khối lượng phân tử nhỏ khác gồm AQP3, AQP7, AQP9 và AQP10 thấm vào glycerol, urê và amoniac ngoài nước; Nhóm 3: Siêu AQP - superaquaporin gồm

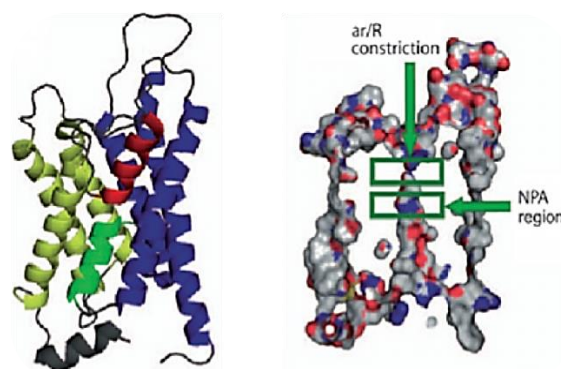
AQP6, AQP8, AQP11 và AQP12. Đặc biệt, Aquaporin là kênh nước quan trọng trong mang của nhiều loài cá và chúng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc tạo điều kiện cho dòng nước điều tiết khối lượng tế bào hơn trong vận chuyển nước qua màng phôi [7, tr.70-92].



Hình 1. Cấu trúc 3D của aquaporin

Nguồn: <https://www.ks.uiuc.edu>

Aquaporin được nghiên cứu rộng rãi phổ biến nhất là aquaporin 1 (AQP1). Aquaporin 1 là AQP đặc trưng nhất, có một cấu trúc chỉ cho phép các phân tử nước di chuyển qua màng mà không cho các phân tử nhỏ hơn hoặc dạng khác đi qua. AQP1 đầu tiên được phát hiện khi đang xác định polypeptide nhóm máu Rh trong màng huyết tương hồng cầu [8, tr.11110-11114]. AQP1 ở người có 269 amino acid, khối lượng phân tử 28 kDa, chứa 6 vùng xuyên màng với 5 vòng kết nối, trong đó 3 vòng (A, C và E) nằm bên ngoài tế bào và 2 vòng (B và D) trong tế bào chất [4, tr.623-630].



Hình 2. Cấu trúc của phân tử aquaporin1

Nguồn: <https://www.semanticscholar.org/>

2. NỘI DUNG

2.1. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu tách chiết và tinh sạch RNA (Ribonucleic Acid) aquaporin 1 (AQP1) ở cá rô đồng (*Anabas Testudineus*). Phiên mã ngược tổng hợp được trình tự cDNA (Complementary Deoxyribonucleic Acid) AQP1 của cá rô đồng. Phân tích quan hệ phát sinh AQP1 của *Anabas testudineus* với các loài động vật có xương sống khác. Xác định biểu hiện mRNA của gene AQP1 của cá rô đồng bằng phương pháp qPCR. Đánh giá được mức độ biểu hiện chịu mặn của gene aquaporin 1a ở mang, da, thận và ruột cá rô đồng (*Anabas Testudineus*). Mục tiêu nghiên cứu cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo, góp phần xây dựng quy trình nuôi cá rô đồng ở các vùng nước nhiễm mặn. Thúc đẩy nghề nuôi cá rô đồng phát triển, đưa loài cá này là đối tượng nuôi trong môi trường nước nhiễm mặn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện thí nghiệm và thu thập

Cá rô đồng (*Anabas Testudineus*) được nuôi trong nước ngọt để làm đối chứng. Các thí nghiệm sẽ cho tiếp xúc dần với nước mặn, chúng được chọn ngẫu nhiên và chuyển vào bể thủy tinh có chứa nước ngọt (pH 7,0) vào ngày 0 và sau đó, tăng độ mặn lên 10 (pH 7,4) vào ngày thứ 1, vào ngày thứ 2 độ mặn là 15 (pH 7,6), ngày thứ 3 tăng độ mặn lên 20 (pH 7,8), tiếp tục tăng độ mặn lên 25 (pH 8,1) vào ngày thứ 4 và cuối cùng tăng độ mặn lên 30 (pH 8,3) vào ngày thứ 5. Cá sẽ được giữ trong nước có độ mặn 30 từ 1 – 6 ngày nữa để lấy mẫu đo mức độ biểu hiện AQP1. Độ mặn hay độ muối được ký hiệu S (ppt hoặc g/kg) là tổng lượng tính theo gram các chất hòa tan chứa trong 1 kg nước.

Nước mặn tự nhiên được thu thập từ các vùng nước xâm nhập mặn, vùng nước lợ. Nước có độ mặn khác nhau được chuẩn bị bằng cách pha nước mặn với một lượng nước ngọt nhất định. Độ mặn được theo dõi bằng máy đo độ mặn. Cá sẽ bị giết để lấy mẫu sau 1 hoặc 6

ngày trong nước mặn. Trong thời gian thích nghi với độ mặn, cá được cho ăn trùng huyết đông lạnh vào những ngày xen kẽ nhưng nhịn ăn 2 ngày trước khi lấy mẫu. Cá đối chứng sẽ được chọn ngẫu nhiên giữ trong nước ngọt để chuyển vào bể thủy tinh. Cá được gây mê và bị giết bằng một cú đánh mạnh vào đầu. Các bộ phận mang, da, thận, ruột nhanh chóng được cắt bỏ, làm lạnh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở -80°C .

2.2.2. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Các mẫu cá rô đồng sau khi vận chuyển đến phòng thí nghiệm, được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ -70°C cho đến khi tiến hành tách chiết RNA. RNA tổng số được trích ly từ mô thịt cá bằng bộ kit PHUSA theo quy trình của Công ty Sinh hóa Phù Sa. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu RNA tổng số bằng phương pháp đo hai bước sóng 260 nm và 280 nm trên máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS hãng Bio-Rad, Mỹ. cDNA được tổng hợp từ 1 μg của RNA tổng số bằng cách sử dụng môi Oligo (dT)₁₈ và tổng hợp với bộ kit của Công ty Sinh hóa Phù Sa.

2.2.3. Khuếch đại phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA

Phương pháp RT-PCR (reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) cho phép phát hiện và định lượng RNA đặc hiệu là điều rất quan trọng trong việc nghiên cứu mức độ biểu hiện gene trong sinh vật.

Khác với phương pháp PCR, RT-PCR là phương pháp PCR mà vật liệu ban đầu là RNA. Để thực hiện RT-PCR thì trước hết RNA đích phải được phiên mã ngược (RT - Reverse Transcription) thành cDNA nhờ xúc tác của enzyme reverse transcriptase, sau đó PCR khuếch đại trình tự đích trong cDNA bằng cặp mồi đặc hiệu cho trình tự này nhờ enzyme taq polymerase.

Giai đoạn phiên mã ngược (RT) là một giai đoạn hết sức quan trọng quyết định sự thành công của RT-PCR. Enzyme được sử dụng trong giai đoạn này là reverse transcriptase. Đây là loại enzyme DNA polymerase không chịu nhiệt, sử

dụng mạch RNA đơn làm sợi khuôn để tổng hợp nên sợi DNA bổ sung (cDNA, Complementary DNA), do vậy giai đoạn RT còn được gọi là giai đoạn tổng hợp cDNA. Sự phiên mã ngược được thực hiện với bộ kit RNA PCR (AMV) của Công ty Sinh Hóa Phù Sa, Việt Nam.

2.2.4. Khuếch đại nhanh các đầu cDNA (RACE) – PCR

RNA tổng (1µg) được phân lập từ cá rô đồng trong nước ngọt đã được phiên mã ngược thành cDNA. Điều kiện thực hiện theo chu trình của RACE - PCR là 25 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây và 72°C trong 4 phút. Các sản phẩm RACE - PCR được tách bằng điện di gel, tinh chế và giải trình tự.

Việc hiệu chỉnh và phân tích trình tự AQP1 thu từ mang của cá rô đồng được thực hiện bằng phần mềm BioEdit để thu được vùng mã hóa nucleotide có độ dài đầy đủ, sau đó dịch mã sang trình tự amino acid. Trình tự amino acid được hiệu chỉnh và so sánh với AQP1 chọn từ các loài động vật khác nhau bằng cách sử dụng phần mềm BioEdit. Các trình tự được nhận dạng ra dùng sử dụng để nhận diện AQP1 từ cá rô đồng.

2.2.5. Phân tích cây phát sinh loài

Trình tự amino acid của AQP1 từ động vật khác được lấy từ GenBank hoặc UniProtKB/TrEMBL như là một nhóm ngoài. Các trình tự này được hiệu chỉnh và phân tích mối quan hệ phát sinh loài giữa các trình tự amino acid được dịch từ cá rô đồng và các loài động vật khác dựa trên phần mềm Mega X version 10.0.4 theo mô hình Kimura 2 - parameter và bằng thuật toán Neighbor - Joining Tree, với chỉ số bootstrap là 1000 lần lặp lại để tăng độ tin cậy [10].

2.2.6. Định lượng qPCR

RNA từ các mẫu đã được xử lý bằng Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), để loại bỏ DNA gây tạp nhiễm. Trình tự cDNA được tổng hợp từ 1µg RNA tổng số bằng cách sử dụng môi hexamer ngẫu nhiên và tổng hợp theo bộ kit của Công ty Sinh hóa Phù Sa.

qPCR được thực hiện ba lần bằng Hệ thống Real-time PCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Mẫu chuẩn cDNA là huyết thanh được pha loãng trong dung dịch đệm 1X TE (1 mmol/l Tris, 0,1 mmol/l EDTA, pH 8.0) (từ 10⁶ đến 10² bản/2µl). Các phản ứng qPCR chứa 5 ml 2X Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 mmol/l mỗi xuôi (5'-AATTCAAGAGCAAGAAGCTTCTG-3') hoặc mỗi ngược (5'-GAGCGACACCTTCACCTC-3'), và cDNA tương đương với 1 ng RNA hoặc 2µl mẫu chuẩn trong tổng khối lượng 10 µl. Thực hiện theo chu trình như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 20 giây, tiếp theo là 45 chu kỳ 95°C trong 3 giây và 60°C trong 30 giây. Dữ liệu chu kỳ ngưỡng là giá trị Ct được thu thập tại mỗi bước kéo dài. Các lần chạy được theo sau bởi phân tích đường cong tan chảy bằng cách tăng từ 60°C đến 95°C với gia số 0,3°C để xác nhận sự hiện diện của một sản phẩm. Các sản phẩm PCR được tách trong gel agarose 2% để xác minh sự hiện diện của một band đơn.

Để xác định chính xác số lượng của bản sao gene AQP1 trong phản ứng qPCR, trước đó tiến hành khuếch đại tinh khiết ở vùng xác định của AQP1 cDNA từ mẫu các bộ phận của cá rô đồng theo phương pháp của Gerwick [3, tr.157-171]. PCR được thực hiện với một bộ môi AQP1aa qPCR và cDNA với các điều kiện chu trình sau: Biến tính ban đầu 95°C trong 3 phút, sau đó là 40 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây và 1 chu kỳ kéo dài cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được tách ra trong gel agarose 2%, sau đó chúng được loại bỏ và tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tách chiết của Công ty Sinh hóa Phù Sa. Số lượng bản DNA đích ban đầu Sq (Starting Quantity) trong mẫu được ước lượng bằng phương pháp định lượng tuyệt đối từ phương trình đường chuẩn (1).

$$\begin{cases} Y = \alpha \cdot X + \beta \\ Y = Ct ; X = \lg(Sq) \end{cases} \quad (1)$$

Trong đó: Ct là chu kỳ ngưỡng (Threshold Cycle), Sq là số lượng bản DNA đích ban đầu trong mẫu, α và β là các hệ số cần phải ước lượng trong thí nghiệm.

Kiểm định đường chuẩn (1) bằng các tham số bình phương hệ số tương quan R^2 và hiệu quả PCR (PCR Efficiency) E. Bình phương hệ số tương quan R^2 không được nhỏ hơn 0,99 để thao tác pipetting đạt độ chính xác cho phép. Hiệu quả PCR (E) được tính theo công thức (2) phải đạt từ 90% đến 105%.

$$E(\%) = \left(10^{-\frac{1}{\alpha}} - 1\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Số lượng bản DNA đích ban đầu Sq trong mẫu được ước lượng bằng công thức (3).

$$Sq = 10^{\frac{Ct - \beta}{\alpha}} \quad (3)$$

2.2.7. Phân tích thống kê

Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình và sai số chuẩn. Xử lý số liệu bằng

phương pháp phân tích phương sai (Anova) để đánh giá sự khác biệt giữa các giá trị trung bình mẫu, sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

2.3. Kết quả và thảo luận

2.3.1. Phân tích phát sinh AQP1 của *Anabas Testudineus*

Trình tự cDNA hoàn chỉnh mã hóa AQP1 thu được từ *Anabas testudineus* bao gồm 786 nucleotide đã được GenBank cấp mã số gia nhập (Accession Number) MT012828, mã hóa cho AQP1 với 261 amino acid, có khối lượng phân tử ước tính là 27,4 kDa (Hình 3) [11]. Sự liên kết của trình tự amino acid AQP1 của *Anabas Testudineus* với các loài người, ếch và các loài cá khác như cá phổi, cá nóc, cá tráp,... cho thấy 6 vùng xuyên màng, 6 vị trí phosphoryl hóa tiềm năng và một vị trí N-glycosyl hóa.

>aqp1 [organism=*Anabas testudineus*] *Anabas testudineus* aquaporin 1 (aqp1) mRNA, complete cds
 ATGAGAGAATTCAAGAGCAAGAACTTCTGGAAGGCCGTTCTGGCCGAGCTGGTTGGCATGACCCCTT
 TTTATTTTCCTCAGCCTCTCTGCAGCCATTGGAATAAAAACAGCACCAACCCAGACCAGGAGGTG
 AAGGTGTCGCTCGCATTGGCTTGGCCATTGCTACACTGGCTCAGAGTTTAGGCCACATCAGTGGA
 GCTCACCTGAATCCTGCAGTTACCCTTGGGATGCTTGCCAGCTGCCAGATCAGTGTGTTGAAGGCC
 GTCATGTACATTGTGGCCCAGATGCTTGGCTCAGCCCTGGCCAGCGGCATTGTTTATGGAACACGT
 CCAAATGGCAATGCAAATCTGGGGCTTAACGCTCTAAGTGGTGTACCCCAAGCCAAGGCGTGGG
 CATAGAGCTCCTGGCAACATTCCAGCTGGTGCTGTGTGTCATTGCAGTCACTGATAAAAGGCGGCG
 TGATGTCACTGGTTCAGCACCCCTTGGCCATTGGCCTCTCAGTGTGCCTGGGACACTTGGCAGCTATC
 AGCTACACAGGCTGTGGCATCAATCCCGCCCGCTCCTTTGGTCCAGCTTTGATCCTGAACAACCTTG
 AAAACCACTGGGTGTACTGGGTTGGGCCAATGTGCGGTGGTGTAGCAGCAGCTCTCATCTATGATT
 TCCTGCTGGCCCCAAATTTGATGACTTTCCTGAACGCATCAAGGTGCTGGTCACTGGTCCAGTGG
 GCGATTATGATGTTAATGGAGGCAACGATACTACAACCTGTGGAAATGACGTCTGAAGTAG

Hình 3. Trình tự AQP1 của *Anabas testudineus* nghiên cứu đã được GenBank cấp mã số gia nhập MT012828 [11]

Các vị trí phân biệt tại cấu trúc aromatic/arginine và asparagine – proline – alanine được bảo tồn. So sánh trình tự amino acid AQP1 của *Anabas testudineus* với các loài *Acanthopagrus schlegelii*, *Diplodus sagus*, *Takifugu obscurus* có tỷ lệ tương đồng là 92,23% và của *Salmo salar* có tỷ lệ tương đồng là 67,76%; so sánh với AQP1a của *Sparus*

aurata có tỷ lệ tương đồng là 92,23%; so sánh với AQP1b của *Heteropneustes fossilis* và *Anguilla anguilla* có tỷ lệ tương đồng lần lượt là 57,51% và 64,43% (Bảng 1). Phân tích phát sinh gene chứng tỏ AQP1 của *Anabas testudineus* được nhóm lại với AQP1/AQP1a của cá tráp (*Sparus Aurata*), được tách ra từ AQP1b của cá tráp (*Sparus Aurata*) hoặc cá

phổi châu Phi (*Protopterus Annectens*) và vậy, có thể định danh AQP của *Anabas* AQP1 của cá nóc (*Takifugu Obscurus*). Như *Testudineus* là AQP1aa [11].

Bảng 1. Tỷ lệ tương đồng AQP1 của *A. testudineus* so với các loài có xương sống khác

Loài cá	Tỷ lệ tương đồng AQP1 của <i>A. testudineus</i> so với các loài
<i>Acanthopagrus schlegelii</i> AQP1 (ABO38816.1)	92,23%
<i>Diplodus sagus</i> AQP1 (AEU08496.1)	92,23%
<i>Takifugu obscurus</i> AQP1 (ADG86337.1)	92,23%
<i>Sparus aurata</i> AQP1a (ABM26907.1)	92,23%
<i>Dicentrarchus labrax</i> AQP1 (ABI95464.2)	91,55%
<i>Rhabdosargus sarba</i> AQP1 (AEG78286.1)	91,21%
<i>Fundulus heteroclitus</i> AQP1 (ACI49538.1)	91,21%
<i>Cynoglossus semilaevis</i> AQP1 (ADG21868.1)	86,95%
<i>Anguilla anguilla</i> AQP1 (CAD92028.1)	82,87%
<i>Anguilla japonica</i> AQP1 (BAC82109.1)	82,21%
<i>Salmo salar</i> AQP1 (NP_001133472.1)	67,76%
<i>Anguilla anguilla</i> AQP1b (ABM26906.1)	64,43%
<i>Anguilla japonica</i> AQP1b (BAK53383.1)	64,15%
<i>Sparus aurata</i> AQP1b (ABM26908.1)	60,12%
<i>Protopterus annectens</i> AQP1 (BAI48049.1)	59,17%
<i>Heteropneustes fossilis</i> AQP1b (ADK87346.1)	57,51%

2.3.2. Mức độ biểu hiện AQP1 tại các bộ phận của *Anabas testudineus*

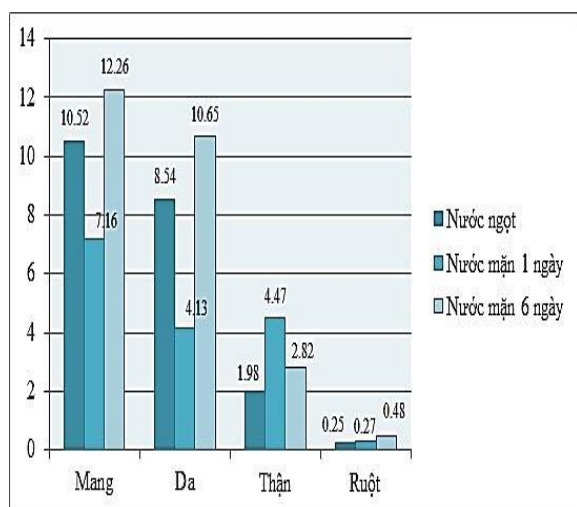
Mức độ biểu hiện AQP1 (bản×10² / ng cDNA) tại các bộ phận mang, da, thận và ruột của cá rô đồng sống trong môi trường nước

ngọt, nước mặn (độ mặn 30) 1 ngày, nước mặn (độ mặn 30) 6 ngày được ước lượng bằng phương pháp định lượng tuyệt đối từ phương trình đường chuẩn, với hiệu quả PCR E = 97,50% (Bảng 2).

Bảng 2. Mức độ biểu hiện AQP1 tại các bộ phận cá rô đồng trong môi trường và thời gian sống khác nhau

Bộ phận cá	Mức độ biểu hiện AQP1 (bản×10 ² / ng cDNA)		
	Nước ngọt	Nước mặn 1 ngày	Nước mặn 6 ngày
Mang	10,52 ^a	7,16 ^a	12,26 ^a
Da	8,54 ^b	4,13 ^b	10,65 ^b
Thận	1,98 ^c	4,47 ^b	2,82 ^c
Ruột	0,25 ^d	0,27 ^c	0,48 ^d

Kết quả xử lý số liệu bằng thống kê sinh học cho thấy, mức độ biểu hiện của AQP1 ở mang *A. testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau 6 ngày cao nhất $12,26 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, đứng thứ nhì là ở da cá $10,65 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, ở thận cá là $2,82 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA và thấp nhất là ở ruột cá $0,48 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA. Mức độ biểu hiện AQP1 khi *A. testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau 1 giờ cao nhất ở mang cá $7,16 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, tiếp đến ở da và thận cá $4,13 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA và $4,47 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, thấp nhất ở ruột cá $0,27 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA (Hình 4) [11].



Hình 4. Sơ đồ mức độ biểu hiện AQP1 trên các bộ phận *Anabas testudineus* sống trong nước mặn

3. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

3.1. Kết luận

Trình tự cDNA hoàn chỉnh mã hóa AQP1 thu được từ mang của *A. testudineus* bao gồm 786 nucleotide đã được GenBank USA cấp mã số gia nhập (Accession Number) MT012828, mã hóa cho AQP1 với 261 amino acid, có khối lượng phân tử ước tính là 27,4 kDa.

Mức độ biểu hiện của AQP1 ở mang *A. testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau sáu ngày cao nhất $12,26 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, đứng thứ nhì là ở da cá $10,65 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, ở thận cá là $2,82 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA và thấp nhất là ở ruột cá $0,48 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA. Mức độ biểu hiện AQP1 khi *A. testudineus* sống trong nước mặn (độ mặn 30) sau một ngày cao nhất ở mang cá $7,16 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, tiếp đến ở da và thận cá $4,13 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA và $4,47 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA, thấp nhất ở ruột cá $0,27 \cdot 10^2$ bản/ng cDNA.

3.2. Kiến nghị

Nghiên cứu mở rộng mức độ biểu hiện của các gene AQP1, AQP1a, AQP1b, AQP1ab cũng như cơ chế vận chuyển $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ cân bằng nội mô. Khảo sát khả năng chịu mặn của một số dòng cá rô đồng dựa trên gene AQP để chọn giống cá rô đồng có khả năng chịu mặn cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chang E.W.Y., Loong A.M., Wong W.P., Chew S.F., Wilson J.M., and Ip Y.K. (2007), *Changes in tissue free amino acid contents, branchial $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity and bimodal breathing pattern in the freshwater climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch), during seawater acclimation*, J. Exp. Zool, 207A, 10.1002/jez.a.424.
- [2] Finn R.N., Chauvigné F., Hlilberg J.B., Cutler C.P., and Cerdà J. (2014), *The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation*, PLoS ONE 9: e113686. 10.1371/journal.pone.0113686.
- [3] Gerwick L., Corley-Smith G., and Bayne C.J. (2007), *Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus*, Fish Shellfish Immunol 22.
- [4] Herrera M., and Garvin J.L. (2011), *Aquaporins as gas channels*, Eur J Physiol 462.

- [5] King S.L. and Agre P. (2001), *Water Channels*, Baltimore, MD: John Wiley & Sons, Ltd.
- [6] Litman T., Sogaard R., and Zeuthen T. (2009), *Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins*, Handb. Exp. Pharmacol, 10.1007/978-3-540-79885-9_17.
- [7] Madsen S.S., Engelund M.B., and Cutler C.P. (2015), *Water transport and functional dynamics of aquaporins in osmoregulatory organs of fishes*, Biol. Bull. 229, 10.1086/BBLv229n1p70.
- [8] Preston G.M., and Agre P. (1991), *Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family*, Proc Natl Acad Sci USA 88.
- [9] Tay Y.L., Loong A.M., Hiong K.C., Lee S.J., Tng Y.Y.M. and et al. (2006), *Active ammonia transport and excretory nitrogen metabolism in the climbing perch, Anabas testudineus, during 4 days of emersion or 10 minutes of forced exercise on land*, J. Exp. Biol. 209.
- [10] Trương Thế Quang (2018), *Tin sinh học (Bioinformatics)*, Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [11] Trương Thế Quang, Huỳnh Ngọc Mỹ Phương (2020), *Expression of the aquaporin 1 (aqp1) mRNA of the brackishwater climbing perch (Anabas testudineus)*, Accession MT012828, GenBank, The National Center for Biotechnology Information, USA.
- [12] Verkman A.S., Mitra Alok K. (2000), *Structure and function of aquaporin water channels*, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 278: F13-F28.

Ngày nhận bài: 12-3-2020. Ngày biên tập xong: 28-4-2020. Duyệt đăng: 26-5-2020