

KHUẾCH ĐẠI CHỈ THỊ PHÂN TỬ MICROSATELLITE PHÂN LẬP TỪ HÀ THÁI BÌNH DƯƠNG (*CRASSOSTREA GIGAS*) TRÊN MỘT SỐ LOÀI NHUYỄN THỂ

LÚU THỊ HÀ GIANG, TRẦN THỊ THÚY HÀ, NGUYỄN HỮU NINH

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1

AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE MARKER ISOLATED FROM PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) IN SOME BIVALVIAE SPECIES

Summary

Microsatellites are widely used for population genetics purposes, especially when the scope of the study involves comparing closely related individuals. The development of microsatellite marker becomes a challenge in many fields of study including mollusk for various reasons related to the cost for the marker isolation. Cross-amplification of microsatellite marker becomes useful method that can save time, cost and help to underst DNA the relationship between the investigated species. In this study, three microsatellie loci (Kaki12, Kaki18, và Kacicgi2) isolated from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) have been tested for six bivalves species, including *Crassostrea rivularis*, *Meretrix lyrata*, *Austriella corrugate*, *Lutraria philipinarum*, *Anadara granosa* and *Semipallium fulvicostatum*. Five samples of each species were collected and DNA was extracted from muscle tissue. After that, it was amplified by PCR with three primers Kaki12, Kaki18 and Kacicgi2.

Result on electrophoresis of PCR products on 1% agarose gel showed that, the amplification of Kaki12, Kaki18 DNA Kacicgi2 on *Crassostrea rivularis* was successes. Although the PCR products appear for Kacicgi2 on *Anadara granosa* and *Semipallium fulvicostatum*, it was not clear. In case of other samples, there was no PCR product on the gel except Kaki18 for *Anadara granos* and *Semipallium fulvicostatum*. The success of cross-species amplification suggests that, these microsatellites should prove useful for studies in population genetics, pedigree analysis, gene mapping as well as the relationships between species of *Anadara granos*, *Semipallium fulvicostatum* and *Crassostrea gigas*. However, studies on different microsatellite markers for different species should be continued for the useful information on molecular genetics in many aspects.

1. Đặt vấn đề

Chỉ thị phân tử microsatellite ngày càng được sử dụng phổ biến trong phân tích cấu trúc di truyền học quần thể, lập bản đồ di truyền, là chỉ thị phân tử với độ tin cậy cao về sự đa dạng di truyền. Tuy nhiên, việc phát triển và sử dụng các chỉ thị phân tử microsatellite vẫn là một thách thức trong nhiều ngành, bao gồm ngành nghiên cứu động vật thân mềm vì gặp nhiều khó khăn khi phân lập microsatellite hoặc việc xuất hiện các alen vô hiệu đã làm phức tạp hóa việc ứng dụng các microsatellite (Launey và Hedgecock, 2001; Gaffney, 2002). Cho đến nay, đối với động vật thủy sản thân mềm, chỉ thị microsatellite mới được phát triển và thử nghiệm rộng rãi trên một số loài hào. Theo nghiên cứu của Hubert và Hedgecock, 2004 đã phát triển hơn 100 locus microsatellite trên hào Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas*) để xây dựng bản đồ liên kết di truyền; trong nghiên cứu

quần thể và lập bản đồ di truyền (Lallias và cộng sự, 2009) đã phân tích được 27 locus microsatellite trên hào phẳng châu Âu (*Ostrea edulis*).

Việc nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử microsatellite trên một loài và khuếch đại chúng trên các loài khác cùng chi, thậm chí khác chi là một trong những phương pháp rất hữu ích trong nghiên cứu di truyền quần thể, phân tích huyết thống và nghiên cứu lập bản đồ gen giữa các loài có liên quan với nhau (Qili và cộng sự, 2009). Năm 2003, Sekino và cộng sự đã xây dựng bộ chỉ thị phân tử microsatellite trên hào Thái Bình Dương để nghiên cứu cấu trúc di truyền của nó và một số locus microsatellite được khuếch đại thành công trên 3 loài hào khác. Cũng vào năm 2003, Li và cộng sự đã phân lập, xác định được 79 microsatellite trên hào Thái Bình Dương và kết quả khuếch đại của chúng trên 4 loài hào *C. angulata*, *C. sikamea*, *C. ariakensis*, *C. virginica* đã cho biết mối quan hệ thân thuộc giữa các loài. Cũng trên hào Thái Bình Dương, Qili và cộng sự (2009) đã phát triển 15 microsatellite đa hình từ các ESTs trên ngân hàng gen và khảo sát sự có mặt của các chỉ thị phân tử này trên 5 loài hào khác. Kết quả cho thấy, sự khuếch đại thành công và có 9 chỉ thị phân tử microsatellite giá trị trong lập bản đồ so sánh. Cruz và cộng sự (2007) lại nghiên cứu phân lập các locus microsatellite trên hào Thái Bình Dương và khuếch đại của chúng trên 4 loài hào khác cho thấy tính hữu ích trong nghiên cứu di truyền học quần thể.

Ở Việt Nam, hiện chưa có nghiên cứu nào về chỉ thị phân tử, cấu trúc di truyền học hay bản đồ huyết thống trên đối tượng các loài nhuyễn thể nói chung cũng như các loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế nói riêng để phục vụ trong công tác di truyền chọn giống nuôi trồng thủy sản, bảo tồn lưu trữ nguồn gen. Nghiên cứu này sẽ góp phần hữu ích trong điều tra xây dựng các chỉ thị phân tử phục vụ phân tích di truyền một số loài nhuyễn thể hai mảnh vỏ ở vùng biển Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là các loài nhuyễn thể hai mảnh thu tại Hải Phòng, Nam Định và Quảng Ninh (bảng 1).

Bảng 1: các loài nhuyễn thể hai mảnh được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên thường gọi	Tên khoa học	Số mẫu thu	Địa điểm thu
1	Hàu cửa sông	<i>Crassostrea rivularis</i>	5	Hải Phòng
2	Ngao	<i>Meretrix lyrata</i>	5	Nam Định
3	Ngán	<i>Austriella corrugata</i>	5	Quảng Ninh
4	Tu Hải	<i>Lutraria philippinarum</i>	5	Quảng Ninh
5	Sò huyết	<i>Anadara granosa</i>	5	Nha Trang
6	Điệp giấy	<i>Semipallium fulvicostatum</i>	5	Quảng Ninh

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA

Mẫu thu về được lấy phần màng áo hoặc cơ thịt bảo quản trong ethanol 100%. Tách chiết DNA theo phương pháp kết tủa muối. Mẫu được thấm khô cồn và ủ ở 60°C trong hỗn hợp gồm 720 µl Cell Lysis Solution (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2% SDS pH 8,0), 5 µl Proteinase-K (20 mg/ml) đến khi mẫu tan hoàn toàn. Thêm vào ống chứa mẫu 240 µl dung dịch Protein Precipitate Solution (7,5 M Ammonium Acetate), lắc trộn đều mẫu và để ở 4°C trong 20 phút. Mẫu được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút và lấy phần dung dịch phía trên. Dung dịch có chứa DNA được kết tủa bằng isopropanol, ly tâm giữ lại kết tủa DNA. Sau đó, dùng ethanol 70% để rửa kết quả cho đến khi sạch. Hoà tan DNA bằng dung dịch đệm 1X TE và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm tách chiết được kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.2. Phản ứng khuếch đại DNA (PCR)

Chỉ thị phân tử microsatellite sử dụng trong nghiên cứu này được tham khảo từ nghiên cứu của Trần Thị Thúy Hà và cộng sự (2006).

Bảng 2: đặc điểm microsatellite phân lập từ hào Thái Bình Dương

Locus	Trình tự lặp	Trình tự mỗi	Nhiệt độ gắn (°C)	Mã số ngân hàng gen
<i>Kaki 12</i>	(GA) ₁₀	F: CATGGTCCAAGATTGGTCA R: CTGAAAAACCCAGCAGTTCTT	58	AB208691
<i>Kaki 18</i>	(GA) ₁₅	F: AAACCGGGTCACTCATTTTG R: CTGCGAGTGTGGAAACAACGG	56	AB208692
<i>Kakicgi 2</i>	(CT) ₁₇ (CA) ₂₂	F: CCACTCTACCGGCAGGTTTG R: GAGGGGAGAAAGAGAATG	60	AB209934

Phản ứng PCR bao gồm: 4 μ l nước, 4 μ l Go-taq green master mix 2x (Promega), 1 μ l mỗi mỗi loại và 2 μ l DNA khuôn. Chương trình nhiệt thực hiện phản ứng: 94°C trong vòng 1 phút, 35 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 56-60°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút, sản phẩm PCR được giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng.

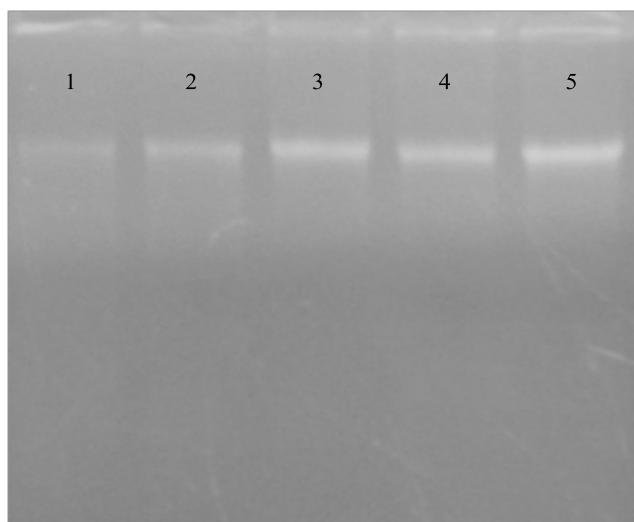
2.2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

Sản phẩm tách chiết DNA và PCR được kiểm tra sản phẩm trên gel agarose theo nồng độ gel lần lượt là 1%. Cân 1 g agarose cho vào 100 ml dung dịch đệm 1x SB (Sodium, Boric acid) và đun đến khi agarose tan hoàn toàn. Thêm vào dung dịch 2 μ l Ethidium bromide, để nguội đến 55-60°C và đổ gel vào khuôn. Mẫu được nạp vào các giếng và điện di trong dung dịch đệm 1x SB trong 10 phút với điện thế 120 V, 60 mA. Sản phẩm DNA được soi, kiểm tra và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn UV.

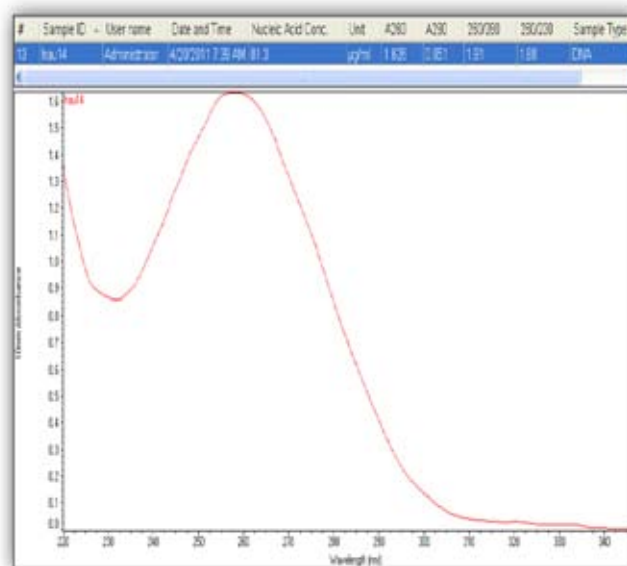
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kiểm tra sản phẩm DNA

Tách chiết DNA là một bước quan trọng, quyết định phản ứng PCR và các khâu phân tích tiếp theo. Kết quả kiểm tra hàm lượng DNA trên gel agarose 1% (hình 1) cho thấy, các vạch băng sáng, rõ nét, chứng tỏ DNA tách chiết đảm bảo cho phản ứng PCR và các thử nghiệm khác.



Hình 1: sản phẩm DNA của các mẫu điện di trên gel agarose 1%
 Chú thích: 1- Mẫu DNA ngao, 2- Mẫu DNA ngán, 3- Mẫu DNA tu hài, 4- Mẫu DNA sò huyết, 5- Mẫu DNA diệp giấy



Hình 2: kết quả đo nồng độ DNA mẫu hầu cửa sông bằng NanoDrop 2000c
 Trục hoành: chiều dài bước sóng hấp phụ (nm)
 Trục tung: độ hấp phụ của bước sóng (10 mm)

Hình 2 thể hiện kết quả kiểm tra nồng độ DNA tách chiết trên máy quang phổ Nanodrop 2.000c ở bước sóng 260/280 và 260/230, nồng độ DNA của mẫu kiểm tra đạt 81,3 μ g/ml, phù hợp cho việc nhân đoạn gen cần kiểm tra.

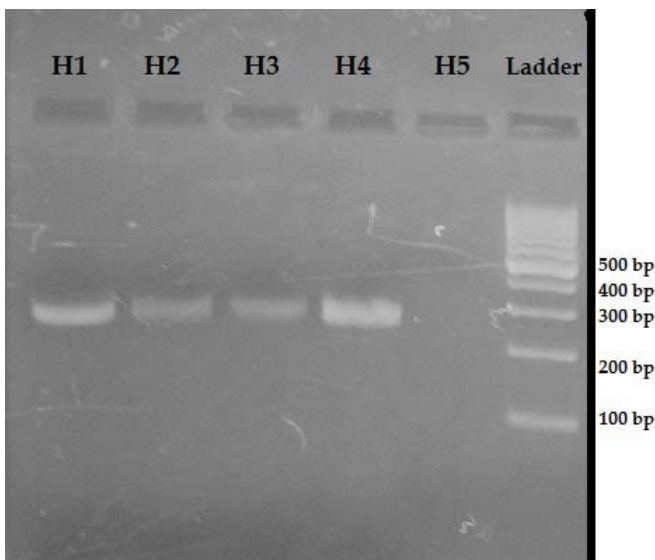
3.2. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Bảng 3 và hình 3 cho thấy, cả 3 locus Kaki 12, Kaki 18 và Kacicgi 2 được khuếch đại thành công trên hầu cửa sông. Locus Kaki 18 và Kacicgi 2 xuất hiện các vạch băng trên sò huyết và diệp giấy, tuy nhiên locus Kacicgi 2 mờ nhạt và không được rõ ràng. Ở ba loài ngao, ngán và tu hài đều không thấy xuất hiện sản phẩm điện di ở cả 3 locus.

Bảng 3: kết quả khuếch đại 3 microsatellite trên các loài nhuyễn thể

	Hầu cửa sông	Ngao	Ngán	Tu hài	Sò huyết	Diệp giấy
Kaki 12	+	-	-	-	-	-
Kaki 18	+	-	-	-	+	+
Kacicgi 2	+	-	-	-	+?	+?

Ghi chú: (+) Có sản phẩm PCR, (-) Không có sản phẩm PCR, (+?) Sản phẩm PCR không rõ nét



Hình 3: kết quả PCR Kaki 18 trên hào cửa sông

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, có thể sử dụng chỉ thị microsatellite Kaki 12, Kaki 18 và Kacicgi 2 trong nghiên cứu di truyền phân tử cho các loài hào cửa sông và chỉ thị Kaki 18 trong nghiên cứu trên sò huyết và điệp giáy. Bên cạnh đó, có thể sử dụng các chỉ thị này để xây dựng cây phát sinh, từ đó nghiên cứu mối quan hệ thân thuộc giữa các loài trên.

4. Kết luận và đề xuất

Nghiên cứu giải trình tự các đoạn gen được khuếch đại thành công nhằm xác định biến dị di truyền, từ đó xây dựng cây phát sinh loài, nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài.

Có thể sử dụng chỉ thị microsatellite Kaki 12, Kaki 18 và Kacicgi 2 để nghiên cứu di truyền phân tử của các loài hào cửa sông và chỉ thị Kaki 18 trong nghiên cứu trên sò huyết và điệp giáy.

Cần tiếp tục nghiên cứu trên nhiều đối tượng cũng như trên nhiều locus microsatellite khác để làm phong phú thêm bộ chỉ thị phân tử cho các loài, làm cơ sở ứng dụng trong các nghiên cứu khác ■

Tài liệu tham khảo

1. Cruzr P, Yanez JB, Ibarra AM, Rangel BJ (2007). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Molecular Ecology Notes* (7), 448-450.
2. Gaffney PM (2002). Associations between microsatellites and repetitive elements in bivalve genomes. *Plant, Animal and Microbe Genome X Abstracts*, January 12-16, 2002, San Diego CA, USA. (Abstract only).
3. Ha TTT, Morishima K, Murakami T, Akashige S, Kajihara T, Umino T (2006). Genetic characteristics of Cultured and Wild Japanese Oyster *Crassostrea gigas* in Hiroshima Bay as inferred by Microsatellite ADN Markers. *Fish Genetics and Breeding Science* No. 35.
4. Hubert S and Hedgecock D (2004). Linkage Maps of Microsatellite ADN Markers for the Pacific Oyster *Crassostrea giga*. *Genetics* 168: 351-362.
5. Huvet A, Boudry P, Ohresser M, Delsert C, Bonhomme F (2000). Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics* 31(1): 71-72.
6. Lallias D, Stockdale R, Boudry P, Beaumont AR, Lapègue S (2009). Characterization of 27 microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology Resources* (9), 960-963.
7. Launey S and Hedgecock D (2001). High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 159: 155-165.
8. Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V, Hedgecock D (2003). Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* *Molecular Ecology Notes* 3, (2): 228-232.
9. Sekino M, Hamaguchi M, Aranishi F, Okoshi K (2003). Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 5(3): 227-233.
10. Qili, Liu K, Kong L (2009). Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.12 No.3.