

PHÂN TÍCH ĐA HÌNH MỘT SỐ GENE LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH TRẠNG SINH SẢN CỦA ĐÀN LỢN MÓNG CÁI BỐ MẸ PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG

Đặng Thị Hương Hà^{1*}, Vũ Thị Phương Ngoan¹, Phó Thị Thúy Hằng²

¹Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương
²Trường Đại học Y Dược – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Việc nghiên cứu để cải tạo giống vật nuôi nhằm mục đích cải thiện những tính trạng không mong muốn, duy trì và bảo tồn những tính trạng quý rất cần thiết. Để khắc phục nhược điểm của phương pháp chọn lọc truyền thống, các nhà khoa học đã ứng dụng kỹ thuật di truyền vào nghiên cứu của mình để tìm ra những chỉ thị di truyền liên quan tới tính trạng mong muốn ở vật nuôi. Đề tài nghiên cứu trên 80 cá thể lợn Móng Cái nuôi tại Hải Phòng với mục tiêu: khảo sát đa hình các gene ESR, BF, FUT1, RNF4 liên quan đến tính trạng sinh sản ở đàn lợn Móng Cái bố mẹ; xác định tần số alen và tần số kiểu gene của gene ESR, BF, FUT1, RNF4 để đánh giá ảnh hưởng của các alen và kiểu gene đến tính trạng sinh sản phục vụ cho công tác chọn giống. Đề tài sử dụng kỹ thuật PCR – RFLP. Kết quả nghiên cứu thu được sự đa hình của gene ESR, BF, RNF4 và không tìm thấy sự đa hình ở gene FUT1.

Từ khoá: Chỉ thị di truyền; lợn Móng Cái; đa hình; sinh sản; tính trạng

Ngày nhận bài: 17/5/2019; Ngày hoàn thiện: 29/7/2019; Ngày đăng: 30/7/2019

POLYMORPHIC ANALYSIS OF SOME GENES RELATED TO REPRODUCTIVE TRAITS OF MONG CAI PIG PARENTS TO SERVE THE WORK OF SELECTED BREEDS.

Dang Thi Huong Ha^{1*}, Vu Thi Phuong Ngoan¹, Pho Thi Thuy Hang²

¹Hai Duong Medical Technical University,
²University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

It is necessary to study on livestock breeds for the purpose of improving undesirable traits, maintaining and preserving the precious essential traits. In order to overcome the drawbacks of traditional selective methods, scientists have genetically engineered applications in their research to find out the genetic indication related to the desired traits in livestock. This study was carried out on 80 individuals of Mong Cai pigs raised in Hai Phong to survey genes polymorphism ESR, BF, FUT1, RNF4 related to reproductive traits in Mong Cai pig parents; determine the frequency of alleles and gene type frequency of gene ESR, BF, FUT1 RNF4 to assess the impact of the alleles and genotypes to reproductive trait serves for selecting breeds. The research used PCR-RFLP techniques. The study found out the polymorphism of the gene ESR, BF, RNF4 and did not find the polymorphism in gene FUT1.

Keywords: Genetic indication; Mong Cai pigs; polymorphism; reproductive; traits

Received: 17/5/2019; Revised: 29/7/2019; Published: 30/7/2019

* Corresponding author. Email: haphuong0206@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Gene ESR, FUT1, BF, RNF4 có liên kết với tính trạng sinh sản ở lợn như: Kích thước lứa đẻ (số con sơ sinh trên lứa), số con sơ sinh sống, số lứa đẻ trong năm...

Gene ESR (Oestrogenreceptor gene): Mã hoá cho thụ thể oestrogen cần thiết cho chức năng sinh sản, hoạt động sinh dục. *Gene FUT1* (Fucosyltransferase 1 gene): Được xem là một gene có tiềm năng liên quan nhiều đến tính trạng sinh sản ở lợn, đặc biệt là số con sơ sinh và sơ sinh sống. *Gene BF* (Properdin gene): đóng vai trò quan trọng trong phát triển biểu mô tử cung. *Gene RNF4* (The ring finger protein 4 gene): Đóng vai trò phát triển tế bào mầm của bào thai và quá trình chín của tế bào granulosa.

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về chỉ thị di truyền liên quan tới tính trạng sinh sản ở lợn. Nguyễn Đăng Vang và cs (2005) [1] đã sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP phân tích đa hình gen của các giống lợn cho thấy ở gene ESR kiểu gene BB có số con sơ sinh/lứa cao hơn kiểu gene AA. Rothschild và cs (1996) [2] phân tích đa hình gene ESR của lợn cho thấy kiểu gene BB có số con sinh ra và số con sống sót cao hơn kiểu gene AA. Short và cs (1997) [3] nghiên cứu ảnh hưởng của các locus gene ESR đến các tính trạng sinh sản và sản xuất của các dòng lợn thương phẩm cho biết có mối liên quan của tổng số con sơ sinh và số con sơ sinh sống với các alen có lợi của gene ESR.

Việc phân tích đa hình các gene liên quan đến tính trạng sinh sản giúp cho việc chọn giống được tốt hơn nên chúng tôi thực hiện: “*phân tích đa hình một số gen liên quan đến tính trạng sinh sản của đàn lợn Móng Cái bố mẹ phục vụ cho công tác chọn giống*”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên tổng số 80 cá thể lợn Móng Cái được nuôi tại trại giống Tràng Duệ - Hải Phòng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lấy mẫu mô

Mẫu mô tai lợn được bảo quản trong cồn tuyệt đối và cất trong tủ lạnh -20°C đến khi sử dụng.

2.2.2. Tách chiết và tinh sạch DNA

DNA được tách chiết từ mẫu mô tai lợn bằng kit của hãng Bio Neer.

2.2.3. Kiểm tra chất lượng DNA

Chất lượng DNA được kiểm tra độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Biomate của hãng Thermo ở bước sóng 260 nm và 280 nm

2.2.4. Phản ứng PCR

Thành phần của phản ứng PCR gồm: Đệm (buffer), enzyme Taq – polymerase, Mg²⁺, dNTP, nước tinh khiết, môi (primer) và DNA khuôn. Tổng thể tích hỗn hợp cho mỗi phản ứng là 25 µl.

2.2.5. Phản ứng PCR - RFLP

Sản phẩm PCR nhân đoạn gene ESR, FUT1, BF, RNF4 thu được sau phản ứng PCR sẽ được cắt bởi enzyme giới hạn đặc hiệu đối với từng gene tương ứng *PvuII*, *Hin6I*, *SmaI*, *SacI*. Các thành phần của phản ứng cắt enzyme: dung dịch đệm Tango, nước tinh khiết, enzyme giới hạn và sản phẩm PCR. Tổng thể tích cho mỗi phản ứng cắt là 15 µl. Phản ứng cắt được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C.

Sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn, kích thước các đoạn DNA được xác định bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 60 V trong 65 phút trên hệ đệm TBE 1X.

2.2.6. Tần số kiểu gene và tần số alen

Tần số kiểu gene trong quần thể được tính theo công thức:

$$\text{Tần số kiểu gene} = \frac{\text{Số cá thể mang kiểu gen tương ứng}}{\text{Tổng số cá thể trong quần thể}} \times 100$$

Tần số alen A, kí hiệu f(A) được tính theo công thức:

$$f(A) = f(AA) + \frac{1}{2} f(AB) + \frac{1}{2} f(AC) + \dots + \frac{1}{2} f(AN)$$

Trong đó: $f(AA)$ là tần số xuất hiện kiểu gene đồng hợp tử alen A trong quần thể.

$f(AB) \dots f(AN)$ là tần số xuất hiện các kiểu gene dị hợp của alen A với các alen khác.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách chiết DNA

Bảng 1. Tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} và nồng độ DNA

Ký hiệu mẫu nghiên cứu	Tỉ số OD- $260nm/OD_{280nm}$	Nồng độ DNA (ng/ μ l)
2	1,94	30,7
12	1,91	36,1
20	1,80	32,5
28	1,88	27,6
37	1,97	32,8
48	1,92	32,5
59	1,94	26,6
66	1,99	29,6
80	1,98	25,1
102	1,92	33,2
Trung bình	1,92	30,6

Sau khi lấy ngẫu nhiên 10 mẫu để tách chiết DNA, kiểm tra độ tinh sạch và ước lượng hàm lượng DNA bằng máy đo mật độ quang OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm bằng máy quang phổ kế NaNoDrop 2000. Kết quả (bảng 1) cho thấy tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} dao động từ 1,88 – 1,99 (trung bình là 1,92). Kết quả này chứng tỏ DNA thu được tương đối đồng đều và có độ sạch cao. Chúng tôi thấy các mẫu thu được đều có tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 – 2,0; nên các mẫu thu được hoàn toàn có thể thực hiện phản ứng PCR và các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ứng cử gene liên quan đến tính trạng sinh sản

3.2.1. Ứng cử gene ESR



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gene ESR

Đã nhân được đoạn gene ESR từ cặp môi do Short và CS (1997) [3] thiết kế có độ dài 120 bp (hình 1).

Sản phẩm PCR đoạn gene được xử lý cắt bởi enzyme *PvuII* (bảng 2). Enzyme *PvuII* cắt tại 1 điểm tạo ra hai đoạn có kích thước 65 bp và 55 bp tạo thành alen B. Trong trường hợp không có điểm cắt nào sẽ tạo nên sản phẩm có kích thước 120 bp và tạo thành alen A.

Bảng 2. Điểm cắt của *PvuII* ở đoạn gene ESR

Alen	Số điểm cắt	Độ dài đoạn cắt (bp)
A	0	120
B	1	65/55

Kết quả điện di (hình 2) cho thấy mẫu 1, 3, 4 xuất hiện 2 băng vạch có kích thước 65 bp và 55 bp mang kiểu gene đồng hợp BB, mẫu 2, 7 có một băng kích thước 120 bp có kiểu gene AA, mẫu 5, 6 có ba băng kích thước 120 bp, 65 bp và 55 bp sẽ có kiểu gene dị hợp AB.

M 1 2 3 4 5 6 7



Hình 2. Kết quả điện di các sản phẩm cắt đoạn gene ESR bằng enzyme giới hạn *PvuII*
M: Chỉ thị DNA 100 bp. 1,3,4: BB; 2,7: AA; 5,6: AB

Theo nghiên cứu của G. Horogh (2005) [4] đã đưa ra kết quả: Các kiểu gene mang alen B có xu hướng cho số lượng con sống cao hơn, kiểu gene BB có số con sinh ra, số lượng con sống và số lượng con cai sữa cao hơn hai kiểu gene còn lại. Trong số 80 cá thể lợn nghiên cứu đoạn gene ESR, có 3 cá thể có kiểu gen AA; 26 cá thể có kiểu gen AB và 51 cá thể có kiểu gen BB. Tần số kiểu gene BB chiếm tỷ lệ cao 63,75% và tần số alen B chiếm 0,8 (bảng 3). Kết quả này chứng tỏ phương pháp chọn lọc truyền thống đã ảnh hưởng đến tính trạng số lượng con sinh ra trên một lứa, số lượng con sống sót và số lượng con cai sữa ở

lợn. Tính trạng sinh sản này có ý nghĩa rất lớn trong công tác chọn giống, cần chọn đàn lợn giống bố mẹ có kiểu gene BB để cải thiện chất lượng đàn lợn giống ở thế hệ sau.

Bảng 3. Tần số kiểu gen và tần số alen của đoạn gene ESR ở lợn Móng Cái

Tần số kiểu gen (%)			Tần số alen	
AA	AB	BB	A	B
3,75	32,50	63,75	0,2	0,8

3.2.2. Ứng cử gene FUT1

Nhận được đoạn gene FUT1 có kích thước 421 bp (hình 3).



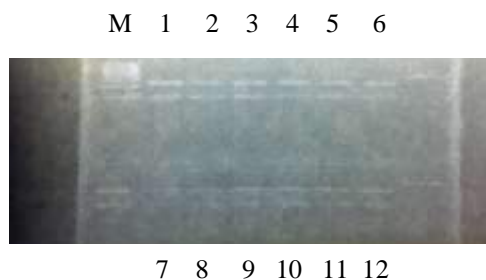
Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR nhận đoạn gene FUT1

Sản phẩm PCR đoạn gen FUT1 được xử lý bằng enzyme giới hạn *Hin6I* (bảng 4). Enzyme *Hin6I* cắt tại 1 điểm cho ra 2 đoạn có kích thước 328 bp và 93 bp tạo thành alen A; nếu có hai điểm cắt sẽ tạo ra 3 đoạn có kích thước 87 bp, 241 bp và 93 bp tạo thành alen G. Như vậy, với hai alen A và G sẽ tạo thành 3 kiểu gene AA, AG và GG.

Bảng 4. Điểm cắt của *Hin6I* ở đoạn gene FUT1

Alen	Số điểm cắt	Độ dài đoạn cắt (bp)
A	1	328/93
G	2	87/241/93

Kết quả điện di sản phẩm cắt đoạn gene FUT1 bằng enzyme *Hin6I* cho thấy các mẫu từ 1 - 12 đều xuất hiện 3 băng vạch có kích thước 87 bp, 93 bp và 241 bp là cá thể đồng hợp GG (trong thực nghiệm hai đoạn 87 bp và 93 bp không tách nên thu được 1 băng) (hình 4).



Hình 4. Kết quả cắt đoạn gene FUT1 bằng enzyme giới hạn *Hin6I*

M: Chi thị DNA 100bp; 1 - 12: GG

Tần số alen và tần số kiểu gene FUT1 được thể hiện dưới bảng 5 thì thấy kiểu gene GG chiếm 100%. Kết quả này có thể là do kiểu gene GG có ảnh hưởng đến kiểu hình của lợn, nên sự chọn lọc theo kiểu hình để có lợn cho năng suất cao đã ảnh hưởng đến tần số kiểu gene của cả đàn, dẫn tới kiểu gene GG chiếm tỷ lệ 100%. Tuy nhiên, để đánh giá ảnh hưởng của kiểu gene GG tới các tính trạng sinh sản ở lợn cần tiếp tục phân tích trên số lượng mẫu lớn hơn và khảo sát năng suất của từng cá thể để tìm mối liên quan giữa kiểu gene với tính trạng này.

Bảng 5. Tần số kiểu gene và tần số alen của gen FUT1

Tần số kiểu gene (%)			Tần số alen	
AA	AG	GG	A	G
0	0	100	0	1

100% cá thể lợn có kiểu gene đồng hợp GG với tần số alen G là 1. Như vậy không có sự đa hình gene FUT1.

3.1.3. Ứng cử gene BF

Nhận được đoạn gene BF có kích thước 390 bp (hình 5).



Hình 5. Điện di đồ sản phẩm PCR nhận đoạn gene BF

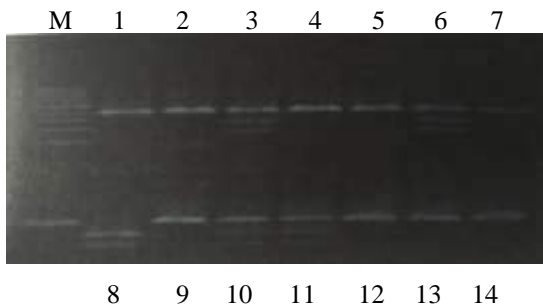
Sản phẩm PCR đoạn gene BF được xử lý cắt bằng enzyme giới hạn *SmaI* (bảng 6).

Enzyme *SmaI* cắt tại 1 điểm sẽ cho hai đoạn có kích thước 237 bp và 153 bp tạo thành alen A; nếu *SmaI* không có điểm cắt sẽ cho sản phẩm là 1 đoạn có kích thước 390 bp tạo thành alen B.

Bảng 6. Điểm cắt của *SmaI* ở đoạn gene BF

Alen	Số điểm cắt	Độ dài đoạn cắt (bp)
A	1	237/153
B	0	390

Kết quả điện di sản phẩm cắt đoạn gene BF (hình 6) cho thấy: mẫu 8 xuất hiện 2 băng có kích thước 237 bp và 153 bp (kiểu gene AA); mẫu 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 14 chỉ xuất hiện 1 băng vạch có kích thước 390 bp (kiểu gene BB); mẫu 3, 6, 10, 11 xuất hiện 3 băng vạch có kích thước 390 bp, 237 bp, 153 bp (kiểu gene AB).



Hình 6. Kết quả cắt đoạn gene BF bằng enzyme giới hạn *SmaI*

B. Buske (2005) [5] đã tiến hành nghiên cứu phân tích mối liên quan của các kiểu gene BF với số con sơ sinh của quần thể lợn thương phẩm. Kết quả cho thấy kiểu gene BB có năng suất cao hơn kiểu gene AA, còn kiểu gene AB là trung gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy: kiểu gene BB xuất hiện với tần số cao (50%), tần số alen B là 0,72 (bảng 7). Kết quả này có thể do chọn lọc ngẫu nhiên của người chăn nuôi để thu được cá thể lợn có năng suất sinh sản cao đã dẫn đến làm cho kiểu gene BB chiếm tỷ lệ cao.

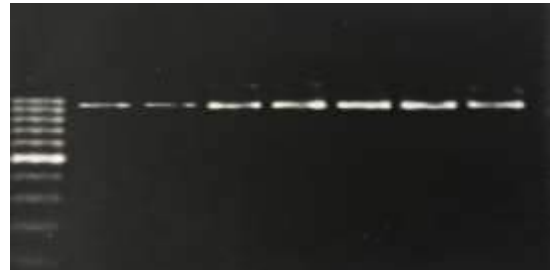
Bảng 7. Tần số kiểu gene và tần số alen của gen BF

Tần số kiểu gene (%)			Tần số alen	
AA	AB	BB	A	B
6,25	43,75	50	0,28	0,72

3.1.4. Ứng cử gene RNF4

Nhân được đoạn gene RNF4 có kích thước 937 bp (hình 7).

M 1 2 3 4 5 6 7



Hình 7. Điện di đồ sản phẩm nhân đoạn gene RNF4 bằng PCR

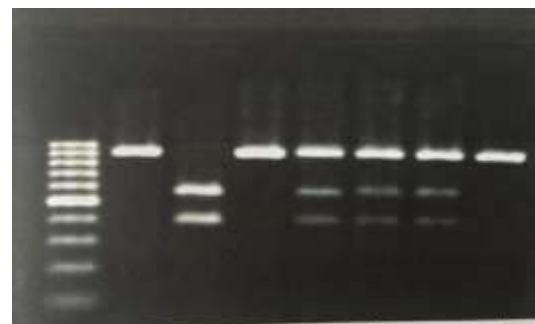
Sản phẩm PCR đoạn gene RNF4 được xử lý cắt bằng enzyme giới hạn *SacI* (bảng 8). Enzyme *SacI* cắt tại 1 điểm cho ra hai đoạn có kích thước 545 bp và 392 bp, tạo thành alen C; nếu không có điểm cắt nào sẽ cho ra 1 đoạn có kích thước 937 bp tạo thành alen T.

Bảng 8. Điểm cắt của *SacI* ở gene RNF4

Alen	Số điểm cắt	Độ dài đoạn cắt (bp)
C	1	545/392
T	0	937

Kết quả điện di sản phẩm cắt đoạn gene RNF4 bằng enzyme giới hạn *SacI* cho thấy (hình 8): mẫu 1, 3, 7 xuất hiện 1 băng có kích thước 937 bp (kiểu gene TT); mẫu 2 xuất hiện 2 băng có kích thước 545 bp và 392 bp (kiểu gene CC); mẫu 4, 5, 6 xuất hiện 3 băng vạch kích thước 937 bp, 545 bp và 392 bp (kiểu gene dị hợp TC).

M 1 2 3 4 5 6 7



Hình 8. Kết quả cắt đoạn gene RNF4 bằng enzyme giới hạn *SacI*

Niu (2008) [6] sử dụng *SacII* để phân tích đoạn gene RNF4 trên 36 lợn Meishan Trung Quốc cho thấy kiểu gene TT, TC và CC có tần số tương ứng là 0,08; 0,45; 0,47. Tác giả cho biết, lợn nái có kiểu gene CC có nhiều con sơ sinh và sơ sinh sống hơn lợn nái có kiểu gene TT. Nhiều phân tích cũng đã chỉ ra rằng, số con sinh ra trên một lứa của lợn nái mang kiểu gene CC cao hơn nhiều so với kiểu gene TT và TC. Vì vậy trong công tác chọn giống cần lựa chọn lợn bố mẹ có kiểu gene CC.

Kết quả nghiên cứu được thể hiện qua bảng 9 cho thấy: tỷ lệ kiểu gene TT chiếm tỷ lệ 50%, CC thấp nhất là 7,5% và tần số của alen T là 0,71. Như vậy, đàn lợn Móng Cái bố mẹ không đáp ứng được yêu cầu chọn lọc với tính trạng kích thước lứa đẻ.

Bảng 9. Tần số kiểu gene và tần số alen của gen RNF4

Tần số kiểu gene (%)			Tần số alen	
TT	TC	CC	T	C
50	42,5	7,5	0,71	0,29

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Nhân được đặc hiệu đoạn gene ESR có độ dài 120 bp. Đa hình di truyền gene ESR có tỷ lệ kiểu gene BB cao nhất chiếm 63,75%. Có thể sử dụng chỉ thị gene ESR để chọn giống lợn có kích thước lứa đẻ cao hơn mang kiểu gene BB và đàn lợn Móng Cái bố mẹ nghiên cứu đáp ứng được yêu cầu chọn lọc.

Nhân được đặc hiệu đoạn gene FUT1 có độ dài 421 bp. Đa hình di truyền gene FUT1 có tỷ lệ kiểu gene GG là 100%.

Nhân được đặc hiệu đoạn gen BF có độ dài 390 bp. Đa hình di truyền gene BF có tỷ lệ

kiểu gene AA là 6,25%; AB là 43,75% và BB là 50%.

Nhân được đặc hiệu đoạn gene RNF4 có độ dài 937 bp. Đa hình di truyền gene RNF4 có tỷ lệ kiểu gene TT là 50%, TC là 42,5% và CC là 7,5%.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục kiểm định các chỉ thị được phát triển bằng phân tích di truyền.

Kiểm tra sự tương quan giữa chỉ thị di truyền phân tử với tính trạng trên số lượng mẫu lớn.

Xây dựng hệ thống chương trình chọn lọc dựa trên các chỉ thị di truyền phân tử để tạo ra giống lợn có khả năng sinh sản tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đăng Vang, “Phân tích đa hình gene mã hóa thụ thể oestrogene ở một số giống lợn nuôi tại Việt Nam”, *Tạp chí công nghệ sinh học*, 1 (3). 45-50, 2005.
- [2]. M. F Rothschild, “The estrogen receptor locus of economic importance in domestic livestock”, *Probe*, 8, pp. 13-20, 1996.
- [3]. T. H. Short, “Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig line”, *J. Anim. Sci.*, 75, pp. 3138-3142, 1997.
- [4]. G. Horogh, “Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarien Large White pigs”, *J. Anim. Breed. Genet.*, 122, pp. 56-61, 2005.
- [5]. B. Buske, “Analysis of properdin (BF) genotypes associated with litter size in a commercial pig cross population”, *J. Anim. Breed. Genet.*, 125, pp. 427-430, 2005.
- [6]. B. Y. Niu a,b, *Identification of polymorphism and association analysis with reproductive traits in the porcine RNF4 gene*, Animal reproduction science, 2008.