

ĐA DẠNG DI TRUYỀN GEN INSULIN - LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 2 TRÊN GÀ**Đỗ Võ Anh Khoa*, Nguyễn Thị Kim Khang, Nguyễn Minh Thông, Bùi Xuân Mến***Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ**Email*: dvakhoa@ctu.edu.vn*

Ngày gửi bài: 23.10.2012

Ngày chấp nhận: 28.12.2012

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên 3 giống gà khác nhau là Tàu Vàng (n=237), Nòi (n=34) và Cobb 500 (n=23) nhằm đánh giá sự đa hình di truyền của gen IGFBP2 (Insulin-like growth factor binding protein 2) bằng phương pháp PCR-RFLP. Kết quả đã phát hiện 3 đột biến điểm tại các vị trí g.639G>A (exon 2), g.1023C>T (intron 2) và g.738G>A (exon 3) nhờ sự nhận diện lần lượt của các enzyme phân cắt giới hạn Bsh1236I, Eco72I và Alw21I. Tần số kiểu gen tại các đột biến điểm trên các quần thể nghiên cứu tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Các điểm đa hình này cũng đã được nhận diện ở một số nghiên cứu trước đây và có ảnh hưởng đến các tính trạng kinh tế ở các quần thể gà khác nhau. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về việc thiết lập mối quan hệ đa hình di truyền gen IGFBP2 với các tính trạng sinh trưởng, năng suất thịt và chất lượng quày thịt gà Tàu Vàng.

Từ khóa: Đa hình di truyền, gà, IGFBP2.

Single Nucleotide Polymorphisms of Insulin - like Growth Factor Binding Protein 2 in Chicken**ABSTRACT**

The current study conducted on three different chicken breeds of Tau Vang (m=237), Noi (n=34) and commercial Cobb 500 (n=23) aimed at evaluating single nucleotide polymorphism in IGFBP2 (Insulin-like growth factor binding protein 2) using PCR-RFLP method. Three polymorphic positions, G639A (exon 2), C1023T (intron 2) and G738A (exon 3) were detected based on restriction enzymes Bsh1236I, Eco72I and Alw21I, respectively. Genotypic and allelic frequencies at these polymorphisms, were found in Hardy-Weinberg equilibrium. These polymorphisms exerted effect on economic traits in different chicken populations. They can be considered as important evidences for developing further studies on IGFBP2 polymorphic association with growth, meat yield and meat quality traits in Tau Vang chicken.

Keywords: Chicken, IGFBP2, polymorphisms.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

IGFBP-2 là một thành viên quan trọng của gia đình IGFBPs và có nhiều chức năng sinh học như kiểm soát các hoạt động sinh học của IGF (Hoeftlich & cs., 1999) và TGF- β (Rajaram & cs., 1997) thông qua các hoạt động nội tiết, đồng thời có ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng và phát triển của động vật. IGFBP2 biểu hiện cao trong các mô phôi của cơ mắt, cơ xương, não, và ruột (Schoen & cs., 1995) và có thể được tham gia vào quá trình chuyển đổi kiểu hình. Bằng kỹ thuật nhân dòng (cloning), Schoen & cs. (1995)

đã đọc được toàn bộ chiều dài của cDNA của gen IGFBP2 (1,6 kb) và mã hoá 311 amino acid. Chuỗi polypeptide của IGFBP2 ở gà có sự tương đồng cao (66-71%) với các loài động vật khác như chuột, bò, người,.. Bên cạnh đó, Nie & cs. (2005) đã phát hiện 35 điểm đa hình (SNPs: single nucleotide polymorphism) trên gen IGFBP2. Đây là tiền đề mở đầu cho những nghiên cứu tiếp theo về đặc điểm và chức năng của gen. Nhiều nghiên cứu tiếp theo cho thấy vai trò của các SNP gen IGFBP2 liên quan đến tính trạng năng suất ở nhiều giống gà. Lei & cs. (2005) đã chứng minh những haplotype được

hình thành từ 5 SNP (chọn lọc từ 40 SNPs của gen IGFBP2) có mối liên kết chặt chẽ với các tính trạng về năng suất thịt ở dòng gà lai White Recessive Rock (tăng trọng nhanh) x Xinghua (gà địa phương tăng trọng kém). Thêm vào đó, Li & cs. (2006) đã chỉ ra sự liên kết của điểm đột biến C>T nằm trên đoạn intron 2 với khối lượng cơ thể, chiều dài bàn chân (metatarsus length), chiều dài xương chân (shank length), chiều dài xương đùi (femur length), khối lượng móng chân (metatarsus claw weight), khối lượng mỡ bụng (abdominal fat weight) ở giống gà NEAURP F2 (các dòng gà của Northeast Agricultural University Resource Population x gà địa phương Baier). Tuy nhiên, đa hình gen IGFBP2 chưa được kiểm chứng trên các quần thể gà được nuôi ở Việt Nam và đó cũng là mục tiêu đề tài.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Động vật

Động vật thí nghiệm là những gà từ ba giống Tàu Vàng (n=237), Nòi (n=34) và Cobb 500 (n=23).

2.2. Tách chiết DNA

Mẫu cơ đùi sau khi lấy được trữ ở -20°C cho đến khi phân tích. DNA được trích ly từ cơ theo phương pháp phenol-chloroform. Các bước thực hiện gồm (i) cắt khoảng 50 - 100mg mẫu cho vào ống nghiệm 2ml, (ii) ủ mẫu với 700µl digestion buffer, 70µl SDS 10% và 18µl proteinase K ở nhiệt độ 37°C trong 12-24 giờ, (iii) cho vào ống nghiệm 700µl phenol:chloroform, lắc đều, ly tâm 10.000 vòng/10 phút. Hút dịch lỏng phía trên cho qua ống nghiệm mới, (iv) cho vào ống nghiệm 700µl chloroform, lắc đều, ly tâm 10.000 rpm/10 phút. Hút phần dịch lỏng phía trên cho qua ống nghiệm mới, (v) cho vào ống nghiệm 700µl isopropanol + 70µl NaOAc, ly tâm 10.000 vòng/5 phút. Gạn bỏ dịch nổi, thu lấy kết tủa, (vi) cho vào ống nghiệm 700µl ethanol 70%, lắc nhẹ, ly tâm 10.000 vòng/5 phút. Bỏ phần dịch nổi, thu lấy kết tủa DNA, (vii) để khô DNA ở nhiệt độ phòng, rồi thêm 500µl TE 1x và bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích.

2.3. Kiểm tra nồng độ DNA

Nồng độ DNA được xác định bằng máy UV-180 (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan). Sản phẩm DNA được xác định nồng độ bằng phương pháp đo quang phổ (UV-180. Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) ở bước sóng 260nm và 280nm. Nồng độ DNA được tính theo công thức sau:

$$C_{DNA} = OD_{260} \times K \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Trong đó,

C_{DNA} : nồng độ DNA

OD_{260} : chỉ số OD ở bước sóng 260

K: hệ số pha loãng

Độ tinh sạch của DNA sau khi trích ly được xác định thông qua giá trị OD_{260}/OD_{280} , các mẫu đạt độ tinh sạch cao khi giá trị OD_{260}/OD_{280} nằm trong khoảng 1,8 đến 2. Chỉ sử dụng các mẫu có độ tinh sạch cao ($1,8 < OD_{260}/OD_{280} < 2$) và đạt nồng độ lớn hơn 50ng/µl cho các công đoạn tiếp theo.

2.4. Thiết kế primer

Sử dụng các cặp primer chuyên biệt được tham khảo từ Lei & cs. (2005). Các cặp mỗi đặc hiệu sau khi thiết kế lại được gửi đến hãng Fermentas để tổng hợp.

2.5. Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện gồm có 1µl 1xPCR dung dịch đệm (15mM $MgCl_2$), 0,25µl dNTPs, 0,25µl mỗi xuôi và mỗi ngược 0,25µm, 0,1µl Taq polymerase 1U, 2µl DNA 100ng. Mỗi phản ứng PCR gồm 40 chu kỳ với chu trình nhiệt 95°C-3', 95°C-30", 58/60°C-30", 72°C-45" và 75°C-5'.

2.6. Điện di

Sản phẩm PCR và sản phẩm PCR phân cắt bằng enzyme giới hạn được kiểm tra và đánh giá trên gel agarose nhuộm với ethium bromide. Nồng độ và các thông số trong quá trình chạy điện di được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 1. Các cặp primer sử dụng trong nghiên cứu

Trình tự primer (5' - 3')	Tm, °C	Chiều dài, bp	Vị trí khuếch đại
Primer 1: F: ACCGGTCTGAGAGCATCCTG R: GGGAAAAGGGTGTGCAAAG	60	540	Intron 1 và exon 2
Primer 2: F: TTTGGTTGAGTCCTAGGCTTG R: GCGTACTACACTGCAGAGG	58	526	Intron 2

Bảng 2. Nồng độ agarose, thời gian và hiệu điện thế cho quá trình chạy điện di và các enzyme giới hạn được sử dụng để nhận diện các điểm đa hình

Sản phẩm	Nồng độ agarose, %	Thời gian, phút	Hiệu điện thế, V	Enzyme giới hạn	Vị trí đa hình
Sản phẩm PCR	2	10	110		
Sản phẩm PCR/RFLP 1	2	15	110	Bsh1236 I	Exon 2 (g.639G>A)
Sản phẩm PCR/RFLP 2	3	15	110	Eco72 I	Intron 2 (g.1023C>T)
Sản phẩm PCR/RFLP 3	3	15	110	Alw21I	Exon 3 (g.738G>A)

2.7. Kỹ thuật PCR/RFLP

Sản phẩm PCR đạt chất lượng tốt (thông qua kiểm tra trên gel agarose 2%) sẽ được ủ với enzyme giới hạn để nhận diện điểm đa hình. Phản ứng enzyme cắt giới hạn gồm 1µl dung dịch đệm 10x, 0,5µl enzyme 10u/ul, 8,5µl nước khử ion được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ để enzyme cắt hoàn toàn sản phẩm PCR. Sau đó, sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose. Kết quả được đánh giá dựa vào kích thước các đoạn DNA trên gel.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

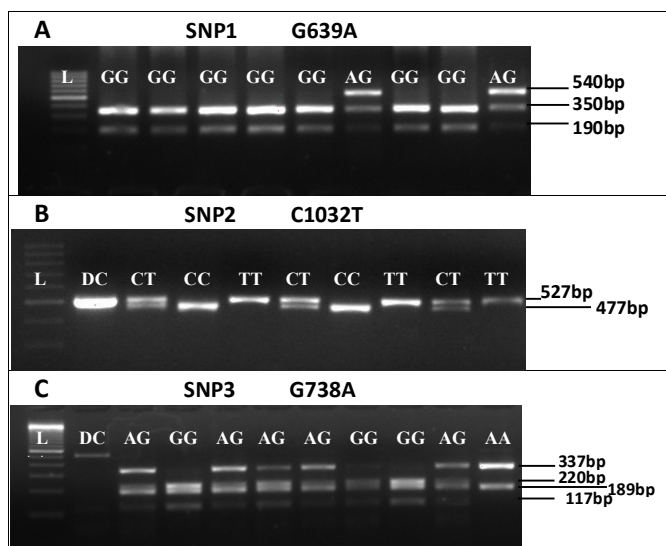
3.1. Đa hình gen

Primer 1 được sử dụng để khuếch đại vùng exon 2 và intron 2 thuộc gen IGF2BP2 với kích thước 540 bp chứa vị trí đa hình g.639G>A (GenBank số GGU15086). Sản phẩm PCR sau đó được ủ với enzyme Bsh1236I. Kết quả kiểm tra trên gel 2% cho thấy có 2 dạng alen A (540 bp) và G (350bp, 190bp), tương ứng với 3 kiểu gen AA (1 băng có độ dài 540bp), AG (3 băng có với chiều dài 540bp, 350bp, 190bp) và GG (2 băng có chiều dài 350bp, 190bp) (gọi tắt là đột biến Bsh). Nghiên cứu của Lei & cs. (2005) cũng cho thấy tồn tại điểm đột biến ở vị trí tương tự trên quần thể F2 White Recessive Rock x Xinghua. Trong khi đó, Khadem & cs. (2010) thiết kế một cặp primer khác (alen A: 950bp,

alen B: 100bp và 850bp) và cũng nhận diện được điểm đa hình này trên quần thể gà địa phương Mazandaran ở Iran.

Sản phẩm khuếch đại của primer 2 cho ra sản phẩm DNA có kích thước 527 bp thuộc vùng intron 2 và exon 3 của gen IGF2BP2 chứa 2 vị trí đột biến g.1032C>T (GenBank số AY 326194) và g.738G>A (GenBank số GGU15086). Vì vậy, qua phân tích in silico cho thấy enzyme Eco72I và Alw có thể sử dụng để nhận diện lần lượt hai điểm đa hình trên. Qua phân tích bằng kỹ thuật PCR-RFLP cho thấy (i) tại điểm đa hình C1032T, enzyme Eco72I đã phân cắt sản phẩm PCR của primer 2 thành các đoạn có chiều dài phân biệt tương ứng với các kiểu gen CC (hai đoạn 477 và 50 bp), TT (1 đoạn dài 527bp) và CT (3 đoạn có chiều dài 527, 477 và 50 bp) (gọi tắt là đột biến Eco), (ii) tại điểm đột biến G738A, enzyme Alw đã nhận diện và phân cắt các alen G, vì thế có 3 kiểu gen được nhận diện đó là AA (2 đoạn có chiều dài 337 và 198bp), AG (4 đoạn có chiều dài 337, 220, 189 và 117bp) và GG (3 đoạn có chiều dài 220, 189 và 117bp) (gọi tắt là đột biến Alw). Nghiên cứu của Lei & cs. (2005) và Li & cs. (2006) trên quần thể F2 White Recessive Rock x Xinghua cũng cho thấy có sự hiện diện của điểm đột biến này bằng phương pháp SSCP.

Đánh giá tần số kiểu gen và tần số alen là một bước rất quan trọng trong quá trình nghiên



Hình 1. Đa hình gen IGFBP2 được nhận diện bằng kỹ thuật PCR-RFLP

Ghi chú: A, B, C lần lượt là đa hình G639A, C1032T và G738A
(L: Thang chuẩn 100bp; DC: đối chứng; AA, AG, GG, CC, CT, TT: kiểu gen)

cứu chọn tạo giống. Nó sẽ cung cấp thông tin về sự đa dạng di truyền giữa các cá thể trong quần thể nghiên cứu, giúp các nhà chọn giống xây dựng chiến lược quản lý giống thích hợp, tăng tần số kiểu gen mong muốn trong đàn để cải thiện tốt hơn kiểu hình mong muốn.

3.2. Tần số gen tại đột biến Bsh

Kết quả đánh giá kiểu gen đa hình g.1032C>T cho thấy sự hiện diện tần số kiểu gen nhất là GG và thấp nhất là AA ở cả 3 quần thể nghiên cứu Tàu Vàng, gà Nòi và gà Cobb 500. Điều này đồng nghĩa với với tần số alen G sẽ cao hơn tần số alen C ở các quần thể. Đặc biệt ở quần thể gà Nòi không tìm thấy kiểu gen AA và tần số alen được ghi nhận ở mức độ 0,15. Khi so sánh giữa tần số kiểu gen quan sát với tần số kiểu gen quần thể thì thấy rằng tần số kiểu gen ở các quần thể nghiên cứu tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Kết quả nghiên cứu của Lei & cs. (2005) cũng cho thấy tần số alen G chiếm tỷ lệ cao hơn tần số alen T trong quần thể F2 (White Recessive Rock x Xinghua).

3.3. Tần số gen tại đột biến Eco

Qua đánh giá đa hình g.1032C>T cho thấy tần số alen T cao hơn tần số alen C ở tất cả quần

thể nghiên cứu. Tuy nhiên, sự khác biệt về tần số giữa 2 alen C và T không nhiều bởi sự xuất hiện kiểu gen dị hợp tử CT với tần số cao hơn các kiểu gen đồng hợp tử CC và TT. Tần số kiểu gen quan sát ở tất cả các quần thể đều tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Điều này ngụ ý rằng đa hình Eco có sự ổn định cao ở các quần thể gà trong nghiên cứu. Đa hình Eco cũng được tìm thấy trên các dòng gà lai Trung Quốc (Li & cs., 2006; Lei & cs., 2005). Trong nghiên cứu của Li & cs. (2006) trên quần thể lai NEAURP F2 (Northeast Agricultural University Resource Population x gà địa phương Baier), tần số các kiểu gen CC, CT và TT lần lượt là 0,23, 0,53 và 0,24. Nhìn chung, không có khác biệt nhiều về tần số alen T và C ở các quần thể gà, ở đó alen T có khuynh hướng cao hơn so với alen C.

3.4. Tần số gen tại đột biến Alw

Kết quả phân tích đa hình tại đột biến điểm g.738G>A nhờ sự phân cắt của enzyme giới hạn Alw21I cho thấy tần số alen G biểu hiện cao nhất ở cả 3 quần thể: gà Tàu Vàng (0,74), gà Nòi (0,85) và Gà Cobb 500 (0,55). Vì thế, tần số cao nhất được tìm thấy ở kiểu gen GG, kể đến là AG là cuối cùng là AA trên các quần thể nghiên cứu. .

Bảng 3. Tần số kiểu gen và alen tại các điểm đột biến ở các quần thể nghiên cứu

	Quần thể quan sát					Quần thể mong đợi			HWB
	Tần số kiểu gen			Tần số alen		Tần số kiểu gen			
Đột biến Bsh	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	
Gà Tàu Vàng (n=237)	0,05	0,26	0,69	0,18	0,82	0,03	0,30	0,66	NS
- Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,08	0,27	0,64	0,22	0,78	0,05	0,34	0,61	NS
- Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,04	0,19	0,76	0,14	0,86	0,02	0,24	0,74	NS
Gà nòi (n=34)	0,00	0,29	0,71	0,15	0,85	0,02	0,25	0,73	NS
Gà Cobb 500 (n=23)	0,09	0,17	0,74	0,17	0,83	0,03	0,29	0,68	NS
Đột biến Eco	CC	CT	TT	C	T	CC	CT	TT	
Tàu Vàng (n=237)	0,18	0,50	0,32	0,43	0,57	0,19	0,49	0,32	NS
- Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,23	0,42	0,36	0,43	0,57	0,19	0,49	0,32	NS
- Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,21	0,59	0,21	0,50	0,50	0,25	0,50	0,25	NS
Gà nòi (n=34)	0,12	0,47	0,47	0,33	0,67	0,11	0,44	0,44	NS
Gà Cobb 500 (n=23)	0,22	0,48	0,48	0,39	0,61	0,15	0,48	0,37	NS
Đột biến Alw	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	
Tàu Vàng (n=152)	0,06	0,42	0,58	0,26	0,74	0,07	0,38	0,55	NS
- Dòng CTU-LA01 (n=84)	0,06	0,43	0,51	0,27	0,73	0,08	0,40	0,52	NS
- Dòng CTU-BT01 (n=68)	0,06	0,35	0,59	0,24	0,76	0,06	0,36	0,58	NS
Gà nòi (n=36)	0,00	0,31	0,69	0,15	0,85	0,02	0,26	0,72	NS
Gà Cobb 500 (n=27)	0,26	0,39	0,35	0,45	0,55	0,20	0,50	0,30	NS

Đặc biệt, kiểu gen AA không xuất hiện ở quần thể gà Nòi. Kết quả phân tích cho thấy tần số kiểu gen và tần số alen trong các quần thể khảo sát tuân theo định luật cân bằng Hardy Weinberg

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát hiện 3 điểm đa hình khác nhau trên gen IGFBP2 ở các quần thể gà Tàu Vàng, Nòi và Cobb 500. Tần số kiểu gen và alen tại các điểm đa hình này tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg Đây là tiền đề để phát triển các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng đa hình di truyền lên các tính trạng kinh tế ở gà.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Hậu Giang và Công ty Cổ phần GreenFeed Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hoeflich, A., M. Wu, S. Mohan, J. Foll, R. Wanke, T. Froehlich, G.J. Arnold, H. Lahm, H.J. Kolb, E. Wolf (1999). Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in trans-genic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinol* 140: 5488-5496.

Khadem, A., H. Hafezian, G. Rahimi-Mianji (2010). Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. *Afri J Biotech* 9 (6): 805-810.

Lei, M. M., Q.H. Nie, X. Peng, D.X. Zhang, X.Q. Zhang (2005). Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. *Poult Sci* 84: 1191-1198

Li, Z.H., H. Li, H. Zhang, S.Z. Wang, Q.G. Wang, Y.X. Wang (2006). Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. *J Anim Sci* 84: 2902-2906.

Nie, Q., M. Lei, J. Ouyang, H. Zeng, G. Yang, X. Zhang (2005). Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-related genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet Sel Evol* 37: 339-360.

Rajaram, S., D.J. Baylink, S. Mohan (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocr Rev* 18: 801-831.

Schoen, T.J., K. Mazuruk, R.J. Waldbillig, J. Potts, D.C. Beebe, G.J. Chader, I.R. Rodriguez (1995). Cloning and characterization of a chick embryo cDNA and gene for IGF-binding protein-2. *J Mol Endocrinol* 15: 49-59.