

PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ HUYẾT THỐNG TRONG QUẦN THỂ BÒ BẰNG KỸ THUẬT MICROSATELLITE

Lê Quang Nam, Nguyễn Trọng Bình, Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Văn Ba,
Lê Anh Quỳnh, Phạm Doãn Lâm

Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật

Tóm tắt

Mục tiêu của nghiên cứu này là nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật microsatellite và các phần mềm phân tích phù hợp để xác định mối quan hệ huyết thống trong quần thể bò. Mười lăm locus microsatellite phù hợp đã được lựa chọn và kết hợp với phần mềm Cervus v3.0.3 để tiến hành phân tích trên 70 cá thể bò trong đó đã biết 27 mối quan hệ mẹ - con, 11 mối quan hệ bố - con và 4 mối quan hệ bố - mẹ - con. Với độ tin cậy 99% được xác lập của phần mềm kết quả thu được hoàn toàn trùng khớp với các mối quan hệ đã biết. Qua đó cho thấy kỹ thuật microsatellite mới các cặp môi đã được lựa chọn có thể sử dụng để xác định chính xác các mối quan hệ huyết thống trong quần thể bò góp phần trong công tác quản lý đàn bò giống.

1. Đặt vấn đề

Microsatellite là các đoạn lặp lại được phân bố trong toàn bộ hệ gen. Các trình tự lặp lại này bao gồm nhiều đơn vị lặp từ 1 - 6 bp và tổng độ dài không quá 100 bp, ví dụ như (CA)_n, (GAA)_m ... (Diethard Tautz, Manfred Renz, 1984). Microsatellite có thể tìm thấy ở tất cả mọi nơi trong hệ gen, bao gồm cả vùng mã hoá và không mã hoá (Toth và cs, 2000).

Việc xác định các mối quan hệ huyết thống giữa các cá thể trong quần thể vật nuôi nhằm hạn chế tối đa việc phối giống cận huyết và xác định được dòng giống của những cá thể mang lại lợi ích kinh tế cao. Phân tích huyết thống trên bò có thể được thực hiện bằng bất cứ loại chỉ thị di truyền nào đủ độ đa dạng. Các microsatellite thường được ưa dùng trong phân tích huyết thống hơn các isozyme, do chúng đa dạng hơn và hiện nay rất nhiều microsatellite đa hình cao đã được xác định và lập bản đồ trên bò (Barendse và cs. 1994; Bishop và cs. 1994; Georges và cs. 1995; Ma R.Z. và cs. 1996), tạo điều kiện dễ dàng cho việc sử dụng chúng trong phân tích huyết thống. Sử dụng microsatellite cũng hiệu quả hơn phân tích nhóm máu để xác định nguồn gốc đấng cha (Glowatzki-Mullis và cs, 1995), chúng cũng đơn giản và có khả năng nhận rộng hơn nhiều so với việc phân tích *fingerprinting* đa locus và Southern Blotting (O'Reilly P. & Wright J.M. 1995).

Tại Việt nam hiện nay chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu về quan hệ huyết thống trên các loại gia súc gia cầm, hiện chỉ có một số ít bài báo xác định quan hệ huyết thống trên người (Trần Văn Đôn (1999), Lê Đình Lương và cs (2003), Phạm Hải Sáng và Nguyễn Văn Mùi (2004)). Các nghiên cứu này được tiến hành trên vài cá thể. Nhằm góp phần vào việc xây dựng phương pháp xác định các mối quan hệ huyết thống ở các quần thể bò nuôi tại Việt nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “**Phân tích mối quan hệ huyết thống trong quần thể bò bằng kỹ thuật microsatellite**” với mục tiêu: nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật microsatellite và các phần mềm phân tích huyết thống để xác định số mối quan hệ huyết thống ở quần thể bò.

2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Trong số 70 cá thể bò được lấy mô tai, theo ghi chép ban đầu có 27 mối quan hệ mẹ - con, 11 mối quan hệ bố - con và 4 mối quan hệ bố - mẹ - con.
- 15 locus microsatellite được chọn dùng theo FAO (2004) (xem bảng 1).
- Các mô tai được tách ADN bằng kit tách mô Qiagen (Đức)
- Sử dụng bộ kit phản ứng PCR đa môi của hãng Qiagen (Đức).
- Hóa chất sử dụng để xác định kích thước alen trên máy giải trình tự CEQ8000 của hãng Berman Coulter (Mỹ)
- Phân tích huyết thống được thực hiện bằng phần mềm Cervus 3.0.3 (Marshall và cs. 1998)

Bảng 1. Tên và vị trí các locus trên NST, khoảng alen, nhiệt độ gắn môi và màu huỳnh quang của các locus nghiên cứu theo FAO

Locus	NST	Khoảng alen	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Màu huỳnh quang
BM1824	1	176-197	55-60	D4
BM2113	2	122-156	55-60	D2
INRA23	3	195-225	55	D4
ETH152	5	181-211	55-60	D4
ILSTS6	7	277-309	55	D2
HEL9	8	141-173	52-57	D4
ETH225	9	131-159	55-65	D3
INRA37	11	112-148	57-58	D4
CSSM66	14	171-209	55-65	D2
SPS115	15	234-258	55-60	D3
TGLA227	18	75-105	55-56	D4
TGLA122	21	136-184	55-58	D4
BM1818	23	248-278	56-60	D3
HAUT27	26	120-158	57	D3
INRA63	18	167-189	55-58	D3

- Việc tiến hành thí nghiệm và phân tích kết quả trên phần mềm được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào – Động vật, viện Chăn Nuôi, từ tháng 4 năm 2009 đến tháng 12 năm 2009.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Tách ADN từ các mẫu mô tai thu được.
- Chạy 4 multiplex PCR 15 locus microsatellite.
- Xác định kích thước các alen từng locus trên máy CEQ8000 ở 70 cá thể bò.
- Xác định các mối quan hệ huyết thống bằng phần mềm Cervus.
- So sánh kết quả thu được từ phần mềm Cervus với kết quả ghi chép ban đầu

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- **Tách ADN** theo protocol trong bộ kit tách ADN từ mô của hãng Quiagen.

- **Phản ứng multiplex PCR:**

15 cặp mỗi microsatellite được chúng tôi chuẩn hoá trong 4 phản ứng PCR đa môi. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của 4 multiplex PCR cụ thể như sau:

Mix I: mastermix 7.5 ul, H₂O 3.7ul, CSSM66 0.6ul, INRA063 0.5ul, INRA037 0.3ul, SPS115 0.5ul.; Mix II: mastermix 7.5ul, H₂O 5.3ul, HAUT27 0.3ul, BM1824 0.5ul, TGLA227 0.3ul; Mix III: mastermix 7.5ul, H₂O 3.9ul, ILSTS 0.5ul, BM1818 0.4ul, ETH152 0.3ul HEL9 0.6ul; Mix IV: mastermix 7.5ul, H₂O 3.7ul, BM2113 0.6ul, ETH225 0.6ul, TGLA122 0.3ul, INRA023 0.4ul;

Chu trình nhiệt cho 4 multiplex PCR mix: tiền biến tính 95⁰ C 15', 30 chu kỳ gồm biến tính 94⁰ C 30", gắn môi 53⁰ C 1', kéo dài 72⁰ C 1', bảo quản 4⁰ C.

- **Xác định kích thước các alen của từng locus microsatellite trên máy giải trình tự CEQ8000**

1 μ l của tất cả các sản phẩm multiplex-PCR sau khi bổ sung 25 μ l đệm SLS (*Sample Loading Solution Beckman Coulter*) và 0.15 μ l thang ADN chuẩn (*DNA Size standard Beckman Coulter*) được tiến hành phân tách bằng hệ thống điện di mao quản trên máy giải trình tự tự động CEQ8000 của hãng Beckman Coulter. Kích thước các alen được phân tích tự động bằng phần mềm *Genetics analysis system* cho máy CEQ8000 (phiên bản 9.0).

- **Xác định số mối quan hệ bố (mẹ) – con bằng phần mềm Cervus**

Danh sách kiểu gen các locus microsatellite sẽ được xử lý bằng phần mềm Cervus, thiết lập độ tin cậy cho mỗi cặp bố (mẹ) - con ở 2 mức 99% để tìm ra số mối quan hệ huyết thống theo các hướng sau:

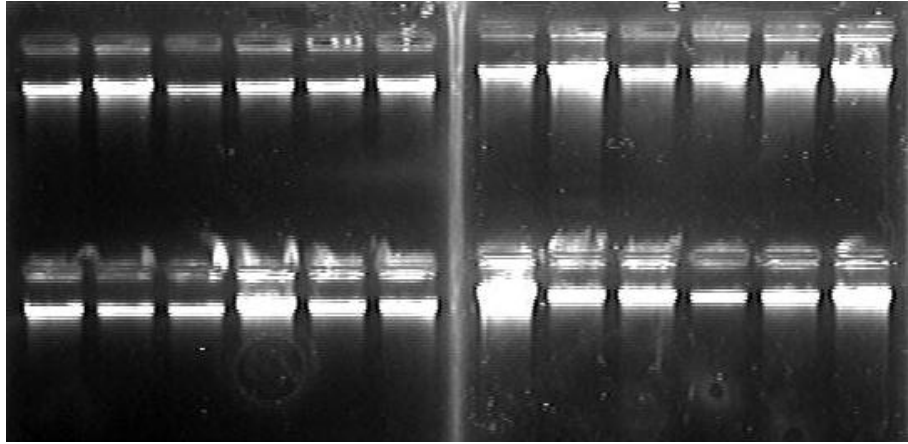
- + Xác định mối quan hệ mẹ - con
- + Xác định mối quan hệ bố - con
- + Xác định mối quan hệ bố - mẹ - con

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả tách ADN

Sau khi tách chiết ADN từ các mẫu mô tai, kết quả sẽ được kiểm tra trên gel điện di agarose 1% được nhuộm với ethydium bromid và chụp ảnh (ảnh 1)

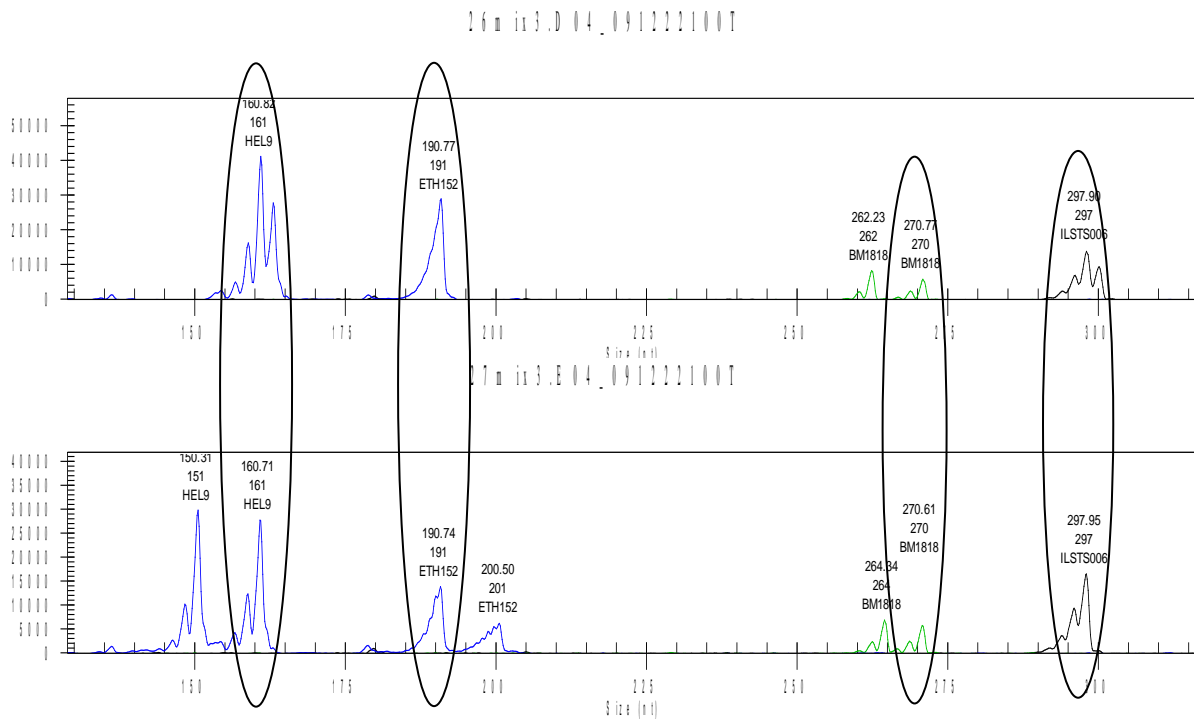
Kết quả ảnh 1 cho thấy các băng thu được sáng rõ, không bị đứt gãy nên đủ điều kiện chạy multiplex PCR.



Ảnh 1. Ảnh chụp kết quả điện di kiểm tra ADN trên agarose 1%

3.2 Kết quả xác định kích thước alen trên máy giải trình tự CEQ8000

Kết quả phân tích alen của 15 locus microsatellite trên toàn bộ các mẫu bò nghiên cứu đều cho định của các alen rõ ràng và sắc nét. Ảnh 2 đại diện cho các kết quả phân tích kích thước microsatellite, là kết quả chạy mix 3 ở mẫu 26 và 27, với 4 mỗi HEL9, ETH152, BM1818 và ILSTS006.



Ảnh 2. Kết quả xác định kích thước alen trên máy CQ8000. Các khoanh tròn chỉ các alen chung ở 4 locus giữa 2 cá thể

3.3. Kết quả xác định các mối quan hệ huyết thống

3.3.1. Xác định số cặp mẹ - con

Kết quả phân tích trên 27 mối quan hệ mẹ –con đã biết theo ghi chép ban đầu cho thấy với độ tin cậy 99%, phần mềm Cervus cho kết quả chỉ định trùng khớp hoàn toàn 27/27 cặp mẹ - con đúng theo ghi chép ban đầu. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định mối quan hệ mẹ - con với độ tin cậy 99%

Số cặp mẹ - con theo ghi chép	Số locus so sánh mẹ - con	Kết quả chỉ định	Độ tin cậy kết quả chỉ định huyết thống từ phần mềm
27	13, 14, 15	27/27	99%

3.3.2. Xác định số cặp bố - con

Tương tự, với độ tin cậy 99%, phần mềm Cervus đã xác định được toàn bộ 11/11 mối quan hệ bố - con theo ghi chép.

Bảng 3. Kết quả xác định mối quan hệ bố - con với độ tin cậy 99%

Số cặp bố con theo ghi chép	Số locus so sánh bố - con	Kết quả chỉ định	Độ tin cậy kết quả chỉ định huyết thống từ phần mềm
7	12, 13, 15	11/11	99%

3.3.3. Xác định quan hệ bố - mẹ - con

Với độ tin cậy 99% được xác nhận thì phần mềm Cervus cũng định được 4/4 mối quan hệ bố - mẹ - con theo ghi nhân ban đầu

Bảng 4. Kết quả xác định quan hệ bố - mẹ -con với độ tin cậy 99%

Số mỗi quan hệ bố mẹ con theo ghi chép	Số locus so sánh bố- mẹ- con	Số mỗi quan hệ bố mẹ con được chỉ định	Độ tin cậy kết quả chỉ định huyết thống từ phần mềm
4	13, 14, 15	4	99%

Như vậy qua phân tích trên các mẫu bò đã biết thông tin về các mối quan hệ mẹ-con, bố-con và bố mẹ con trong quần thể, kết quả đều được xác định hoàn toàn trùng khớp 100%. Vì vậy có thể khẳng định kỹ thuật microsatellite với số lượng 15 cặp mỗi được lựa chọn ở trên có thể được sử dụng để xác định chính xác các mối quan hệ trong quần thể.

4. Kết luận và đề nghị

4.1. Kết luận

- Đã chọn được mười lăm locus microsatellite có độ đa hình cao, phù hợp và đã hoàn thiện được phương pháp để xác định mối quan huyết thống trong quần thể bò.

- Phương pháp phân tích này cho phép xác định được các mối quan hệ huyết thống trong quần thể ở 3 trường hợp sau: xác định được mỗi quan hệ mẹ - con; mỗi quan hệ bố-con và mỗi quan hệ bố - mẹ-con

- Nếu việc xác định quan hệ huyết thống tiến hành trên số ít cá thể (2, 3, 4) thì chỉ cần so sánh trực tiếp không qua phần mềm là có thể nhanh chóng phát hiện ra.

4. Đã áp dụng thành công phương pháp này để hỗ trợ Tòa Án Nhân Dân Tỉnh Sơn La trong một vụ xử kiện tranh chấp bò nuôi.

4.2. Đề nghị

- Ứng dụng phương pháp này trong việc quản lý đàn giống phục vụ công tác lai tạo và các vụ án tranh chấp vật nuôi đang xảy ra ở một số địa phương.

- Cần tiếp tục mở rộng nghiên cứu phương pháp xác định mối quan hệ huyết thống ở các loài vật nuôi khác nhau.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Đình Lương, Lưu Xuân Hoà, Nguyễn Xuân Hùng, Trịnh Đức Anh (2003). “Nghiên cứu xác định dấu ADN ở người Việt bằng các locut trên nhiễm sắc thể giới tính, Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống”. Hội nghị toàn quốc lần thứ hai nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học. Huế.
2. Phạm Hải Sáng, Nguyễn Văn Mùi (2004). “Sơ bộ nghiên cứu sử dụng một số mồi để xác định huyết thống ở người”. Tạp chí di truyền học và ứng dụng, số 3.
3. Trần Văn Đôn (1999). “Góp phần nghiên cứu một số dấu di truyền người phục vụ công tác xác định huyết thống”. Tạp chí thông tin bộ nội vụ, số 12, tr. 4 - 8.
4. Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M. et al. (1994). “A genetic linkage map of the bovine genome”. Nature Genetics, 6, 227–35.
5. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. et al. (1994). “A genetic linkage map for cattle”. Genetics, 136, 619–39.
6. Diethard Tautz, Manfred Renz (1984). “Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes”. Nucleic Acids Research, 12, 4127-4138
7. FAO. (2004). “Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers”.
8. Georges M., Nielsen D., Mackinnon M. et al. (1995). “Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing”. Genetics, 139, 907–20.
9. Glowatzki-Mullis M.-L., Gaillard C., Wigger G. & Fries R. (1995). “Microsatellite-based parentage control in cattle”. Animal Genetics, 26, 7-12).
10. Ma R.Z., Beever J.E., Da Y. et al. (1996). “A male linkage map of the cattle (Bos taurus) Genome”. Journal of Heredity, 87, 261–71.
11. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998). “Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations”. Molecular Ecology, 7, 639–655.
12. O'Reilly P. & Wright J.M. (1995). “The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture”. Journal of Fish Biology, 47(A), 29±55.)
13. Toth, G. Gaspari, Z and Jurka, J. (2000). “Microsatellite in different eukaryotic genome: survey and analysis”. Genome res, 10 , pp. 967-981.