

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH DNA TRONG ĐỊNH LOẠI MẪU SỪNG TÊ GIÁC TẠI BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN VIỆT NAM

DƯƠNG VĂN TĂNG, TRẦN THỊ VIỆT THANH

*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Trên thế giới đã ứng dụng những phương pháp hiện đại trong việc phân loại và giám định mẫu vật, trong đó phương pháp phân tích DNA là hướng nghiên cứu phát triển mạnh trong những năm gần đây. Kỹ thuật phân tích DNA để xác định chính xác tên loài được hiểu là kỹ thuật DNA barcoding và được đánh giá có hiệu quả, chính xác trong việc giám định loài. Vì thế, đến nay cơ sở dữ liệu gen (GenBank, 2009) trên thế giới đã lưu giữ gần 100 triệu trình tự DNA với trên 100 tỷ nucleotide, trong đó có thông tin di truyền của khá nhiều loài quý hiếm của Việt Nam như tê giác (*Rhinoceros sondaicus* AY739619, *Rhinoceros sumatrensis* AY427961 – AY427974), Voọc xám (*Trachypithecus phayrei*, AY51946), Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*, AY576932, AF091635, AY670667...), Bò xám (*Bos sauveli*, AF281083),... đây là nguồn dữ liệu có giá trị để các nhà khoa học sử dụng trong nghiên cứu về tiến hóa phân tử, phân loại và bảo tồn nguồn gen.

Nguyên lý của phương pháp phân tích DNA dựa trên việc so sánh các trình tự DNA ngắn giữa mẫu chưa biết với ngân hàng Genbank bao gồm trình tự của các loài đã biết, từ đó xác định tên loài cho mẫu nghiên cứu. Về lý thuyết và thực nghiệm, phương pháp phân tích DNA đã được chứng minh trên nhiều đối tượng động vật khác nhau, từ động vật bậc thấp như động vật thân mềm, côn trùng, các loài lưỡng cư, bò sát, chim cho tới các loài động vật bậc cao như thú (<http://www.barcodeoflife.org>). Sự khác biệt về trình tự DNA của đa số các loài động vật là rất rõ ràng, do đó giải mã trình tự DNA sẽ cung cấp một công cụ giám định loài chính xác, hiệu quả và định loại được tên với các mẫu vật quý hiếm không còn nguyên vẹn của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam (BTTNVN), đồng thời hỗ trợ cho phương pháp hình thái. Phương pháp phân tử được xem là phương pháp hiệu quả, độ chính xác cao, ít phụ thuộc vào tình trạng mẫu. Đến nay ngân hàng Genbank đã có khá nhiều trình tự nucleotide được công bố, trong đó đoạn gen ty thể Cytochrome b với số lượng trình tự rất lớn.

Ở Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, thực tế mẫu động vật quý hiếm là tang vật các vụ án hình sự được chuyển đến ngày càng nhiều và rất nhiều mẫu vật không còn nguyên vẹn, không xác định được chính xác nguồn gốc và không nhận dạng được bằng hình thái hoặc không thể xác định chính xác tên loài. Vì vậy việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định loại loài đang được quan tâm. Trong bài báo này chúng tôi đề cập đến kết quả sử dụng trình tự đoạn gen ty thể cytochrome b để định loại 4 mẫu sừng tê giác đang lưu giữ tại BTTNVN.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

4 mẫu sừng tê giác có tại BTTNVN có ký hiệu tegiac1.bttvn; tegiac2.bttvn; tegiac3.bttvn và tegiac4.bttvn, được lấy 100mg mỗi mẫu ở dạng bột sừng mịn, bảo quản trong nhiệt độ phòng cho đến khi sử dụng.

Cặp mồi đặc hiệu dùng cho nhân bản đoạn gen Cytb bằng kỹ thuật PCR có ký hiệu RhiF-RhiR (bảng 1), được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của 5 loài tê giác đã công bố trên Ganbank (NC 001808, A 245723, X 56283, NC 001779, AJ 245725), nhân bản vùng gen có kích thước 530bp.

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ sừng theo quy trình của Zhang và Shi (1989) có cải tiến của Phòng PLHTN & ĐDNG – Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ hóa chất Genomic DNA Purification kit (#KO512, Fermentas).

Bảng 1

Ký hiệu và trình tự cặp mồi dùng trong nghiên cứu

Ký hiệu mồi	Trình tự
RhiF	GCCGATAATGATAAAATGGGTGTTC
RhiR	TACCCGATTCTTTGCCTTCCAC

Nhân bản PCR và đọc trình tự: Dung lượng hỗn hợp PCR là 50 µl, với các thành phần: 2,5 µl mỗi mồi (10 pmol/µl), 5 µl dNTPs (10 mM), 5 µl MgCl₂ (20 mM), 5U Taq ADN polymerase (MBI) và 5,0 µl Taq buffer 10X + (NH₄)₂SO₄. Chu trình nhiệt: 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ lặp lại gồm: 94°C trong 40 giây, 50°C trong 50 giây và 72°C trong 55 giây; chu kỳ cuối ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%, cắt sản phẩm PCR trên gel và tinh sạch bằng Kit Extraction Gel (QIAGEN). Giải trình tự cả 2 chiều gen qua công ty Macrogen – Hàn Quốc.

Xử lý số liệu: Dữ liệu trình tự thu được sắp xếp, so sánh bằng phần mềm Bioedit, Clustal W, Mega 5.2.2 và chương trình Blast trên ngân hàng Genbank, lập cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Neighbor – Joining, giá trị bootstrap với số lặp lại (replicate) là 1000 lần.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân bản đoạn gen đích

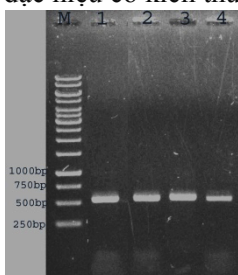
DNA tổng số thu được đều có tỷ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ nằm trong phạm vi cho phép 1,8 – 2,0. Các thông số của ADN tổng số được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2

Kết quả đo OD và xác định hàm lượng DNA

STT	Ký hiệu mẫu	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Nồng độ DNA tổng số (ng/µl)
1	tegiac1.bttvn	0,013	0,0070	1,85	130
2	tegiac2.bttvn	0,012	0,0065	1,84	120
3	tegiac3.bttvn	0,013	0,0068	1,91	130
4	tegiac4.bttvn	0,014	0,0075	1,86	140

Sau khi tinh sạch các mẫu DNA tách chiết từ 4 mẫu sừng tê giác, DNA tổng số được dùng làm khuôn cho phản ứng. Các mẫu sừng tê giác được nhân bản bằng kỹ thuật PCR với với cặp mồi RhiR/RhiF cho kết quả điện di sản phẩm PCR trình bày trong hình 1 và cho thấy đoạn DNA đặc hiệu có kích thước lớn hơn 500bp, phù hợp với kích thước theo lý thuyết.



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1,2%

(Ký hiệu: giếng 1- 4: tegiac1.bttvn, tegiac2.bttvn, tegiac3.bttvn, tegiac 4.bttvn; M: Marker DNA 1kb)

Với kết quả thực hiện phản ứng PCR thành công, chúng tôi kết luận đã tách DNA thành công cho các mẫu sừng tê giác. Đây là một kết quả quan trọng bởi việc tách chiết DNA với các mẫu như sừng, ngà, da là rất khó. Việc PCR thành công đã khẳng định phương pháp tách chiết DNA từ sừng là hiệu quả, loại bỏ được các chất ức chế phản ứng PCR, những chất này thường có trong các vật liệu sừng, ngà, da.

Kết quả sản phẩm PCR (hình 1) của 4 mẫu sừng tê giác cho thấy các phân đoạn DNA rất rõ nét, thu được một băng đặc hiệu đảm bảo cho việc giải trình tự trực tiếp.

Xác định trình tự nucleotide cho các mẫu nghiên cứu

Đọc trình tự được thực hiện theo 2 chiều, sau khi loại bỏ các trình tự của đoạn mồi, chúng tôi thu được trình tự nucleotide của vùng gen cytochrome b là 456 bp cho 4 mẫu sừng tê giác. Tất cả các sản phẩm PCR đều được giải trình tự trực tiếp thành công. Các đỉnh huỳnh quang thu được rất rõ, tương ứng với từng loại nucleotide cụ thể. Điều này cho thấy kết quả xác định trình tự có độ tin cậy cao.

So sánh trình tự nucleotide 4 mẫu sừng tê giác đang lưu giữ tại BTTNVN với dữ liệu Genbank bằng chương trình ClustalW trong phần mềm Bioedit, kết quả cho thấy 4 mẫu sừng có mức độ tương đồng di truyền giống nhau 100% với loài tê giác trắng đã công bố trên Genbank (*Ceratotherium simum* - JF718874). Từ kết quả này, chúng tôi kết luận 4 mẫu sừng nghiên cứu (tegiac1.bttvn; tegiac2.bttvn; tegiac3.bttvn; tegiac4.bttvn) là loài tê giác trắng (*Ceratotherium simum*) có nguồn gốc và phân bố ở đông bắc và miền nam Châu Phi.

<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CACCCACCTA	CTATTCCTTC	ACGAAACAGG
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	40	50	60
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	ATCCAATAAC	CCATCAGGAA	TCCCATCCAA
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	70	80	90
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CATAGACAAA	ATCCCATTCC	ACCCATACTA
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	100	110	120
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CACAATCAAA	GACATCCTGG	GAATTTTACT
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	130	140	150
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CCTAATCCTA	GCACTACTCG	CCCTAGTTCT
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	160	170	180
<i>Ceratotherium simum</i>	ATTCTACCA	GACATCCTAG	GAGACCCTGA
tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)

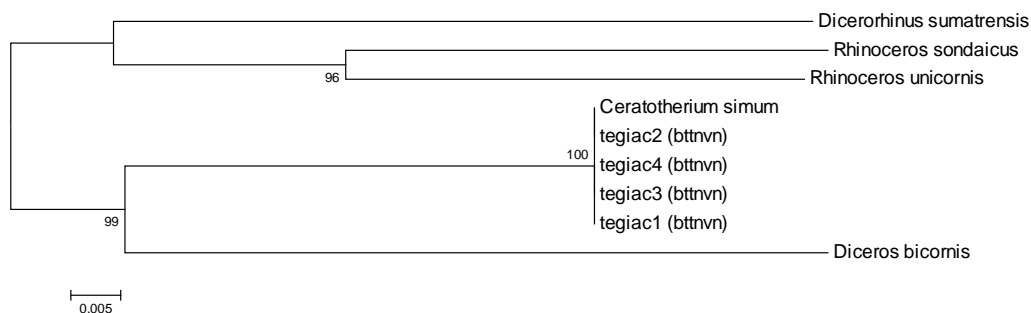
tegiac4 (bttvn)		
	190	200	210
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CAACTACACC CCTGCCAATC CTCTCAGCAC		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	220	230	240
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	TCCCCACAT ATCAAACCAG AATGATACTT		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	250	260	270
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	TCTATTTGCT TACGCAATCC TACGATCCAT		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	280	290	300
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CCCTAACAAA CTAGGCGGCG TACTAGCCCT		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	310	320	330
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	AGTACTATCC ATCCTAACCC TACTTATTAT		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	340	350	360
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CCCCTTTCTC CACACATCAA AACAAACGAAG		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	370	380	390
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	CATAATATTC CGACCCCTAA GCCAATGCAT		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	400	410	420
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	ATTCTGACTA CTAGTAGCTG ACCTACTCAC		
tegiac1 (bttvn)		
tegiac2 (bttvn)		
tegiac3 (bttvn)		
tegiac4 (bttvn)		
	430	440	450
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	ACTCACATGA ATCGGAGGTC AACCACTAGA		

tegiac1 (bttvn)
tegiac2 (bttvn)
tegiac3 (bttvn)
tegiac4 (bttvn)
	456	
<i>Ceratotherium simum</i> (JF718874)	ACACCC	
tegiac1 (bttvn)	
tegiac2 (bttvn)	
tegiac3 (bttvn)	
tegiac4 (bttvn)	

Hình 2: So sánh trình tự DNA 4 mẫu sừng tê giác với trình tự loài tê giác trắng trong Genbank

Bốn mẫu nghiên cứu (tegiac1.bttvn, tegiac2. bttvn, tegiac3. bttvn và tegiac4. bttvn) cùng với 5 loài tê giác được tái dựng mối quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGA 5.2.2 theo phương pháp Neighbor-Joining. Mã số trình tự của các loài đã công bố trên Genbank gồm: *Ceratotherium simum*: JF718874.1; *Diceros bicornis*: JF718876.1; *Dicerorhinus sumatrensis*: JF718875.1; *Rhinoceros sondaicus*: AJ245725.1 và *Rhinoceros unicornis*: JF718877.1.

Kết quả thu được (hình 3) cho thấy 4 mẫu nghiên cứu có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài tê giác trắng *Ceratotherium simum*.



Hình 3: Cây tiến hóa được xây dựng bằng phương pháp Neighbor – Joining giữa 4 mẫu nghiên cứu (BTTNVN) với các loài tê giác công bố trên Genbank (JF718874)

III. KẾT LUẬN

Giải trình tự vùng gen ty thể cytochrome b, so sánh kết quả giải trình tự với dữ liệu đã công bố trên ngân hàng gen (Genbank), chúng tôi đã xác định được trình tự nucleotide cho 4 mẫu sừng tê giác của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam khi sử dụng với cặp mồi RhiF-RhiR. Kết quả xác định được trình tự DNA vùng gen Cytochrome b ở sừng tê giác là 456 bp. Mức độ tương đồng nucleotide là 100% so sánh giữa mẫu nghiên cứu (tegiac1.bttvn, tegiac2. bttvn, tegiac3. bttvn và tegiac4. bttvn) với loài tê giác trắng *Ceratotherium simum* (JF718874). Kết quả này cho phép nhận định 4 mẫu sừng tê giác nghiên cứu thuộc loài tê giác trắng *Ceratotherium simum*. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho việc sử dụng cặp mồi RhiF - RhiR để nhận dạng các mẫu sừng tê giác còn lại ở BTTNVN và khả năng định loại mẫu vật quý hiếm là rất hiệu quả. Kết quả 4 mẫu nghiên cứu đã đăng ký thành công với Genbank và các mã số công bố KF986484, KF986485, KF986486, KF986487.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài cơ sở 2012-2013 “Xây dựng quy trình giám định DNA cho một số mẫu vật tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Avise, J. C.**, 1995. Conservation Biology, 9 (3): 686-690;
2. **Banks, R. C., C. Cicero, J. L. Dunn, A. W. Kratter, P. C. Rasmussen**, 2003. The Auk, 120: 923–931.
3. **Folmer O., M. Black, W. Hoeh, Lutz R., Vrijenhoek R.**, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. (5):294-9.
4. **Gill, F. B., B. Slikas**, 1992. Condor 94: 20–28.
5. **Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. deWaard**, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 270: 313–321.
6. **Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, J. R. deWaard**, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 270(Suppl.): S96–S99.
7. **Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak, C. M. Francis**, 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. PLOS Biology 2, e312.
8. **Mindell, D. P., M. D. Sorenson, C. J. Huddleston, H. C. Miranda, Knight A.**, 1997. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. In: Mindell DP, editor. Avian molecular evolution and systematics. New York: Academic Press. p. 214–247.
9. **Murray, B. W., W. B. McGillivray, J. C. Barlow, R. N. Beech, C. Strobeck**, 1994. Condor, 96: 1037–1054.
10. **Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar**, 2011. Molecular Biology and Evolution , vol. 28 2731–2739.
11. **Zhang Y. P., L. M. Shi**, 1989. Mitochondrial DNA polymorphism in five species of the genus *Macaca*. Chinese J. Genet. 16. 325.
12. Web: www.DNABarcodeoflife.org; www.NCBI.nlm.nih.gov

APPLICATION OF THE DNA ANALYSIS METHOD IN THE FORM OF RHINO HORN AT VIET NAM NATIONAL MUSEUM OF NATURE

DUONG VAN TANG, TRAN THI VIET THANH

SUMMARY

We have analysed 4 samples of rhinoceros horns, which are preserved at the Vietnam National Nature Museum (VNMN) with focus on DNA sequence analysis of cytochrome b. DNA was extracted from 100 mg of horn specimens, then carried out PCR, purified and sequenced. The BioEdit 7.2.5 and 5.2.2 MEGA software were used to compared and analyzed the DNA sequences from the samples with the DNA sequences of the rhino from the GenBank. The results showed that the sequences from the four studied samples are identical to the one of White Rhino, *Ceratotherium simum*, which distributes in Africa. All DNA sequences from the present study are registered at the GenBank with following codes KF986484, KF986485, KF986486, KF986487. Based on the obtained results, we believe that DNA analysis is a useful method to identify the remaining patterns rhinoceros horns at VNMN.