

**SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR-RFLP TRONG NGHIÊN CỨU ĐA HÌNH GEN
LIÊN QUAN ĐẾN CHẤT LƯỢNG THỊT LỢN**

*Hồ Trung Thông, Hồ Lê Quỳnh Châu
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm xác định đa hình các kiểu gen PSS và leptin liên quan đến chất lượng thịt lợn. Chín mẫu DNA tổng số của lợn Kiêng Sắt đã được nhận dạng kiểu gen bằng kỹ thuật RFLP-PCR với các cặp primer đặc hiệu. Kết quả nghiên cứu đa hình gen leptin cho thấy, tần số kiểu gen AA chiếm tỉ lệ cao nhất (77,78%), kiểu gen GA và GG chiếm tỉ lệ thấp (11,11%). Ngoài ra, phân tích đa hình gen PSS cũng chỉ ra rằng hầu hết các mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử NN, chỉ có 1 mẫu có kiểu gen dị hợp tử Nn. Kết quả nghiên cứu này là dữ liệu quan trọng trong công tác phát triển giống lợn Kiêng Sắt theo định hướng cho chất lượng thịt cao, đồng thời là cơ sở để đưa ra các phương án bảo tồn nguồn gen quý ở giống lợn bản địa này.

Từ khóa: chất lượng thịt lợn, đa hình gen, PCR-RFLP.

1. Đặt vấn đề

Theo Sellier (1998), chất lượng thịt chịu sự tác động của nhiều nhân tố như đặc điểm của cơ (loại và kích thước sợi cơ, mỡ và mô liên kết), điều kiện sản xuất và môi trường (tốc độ sinh trưởng, dinh dưỡng, tuổi, các điều kiện trước khi giết mổ, quá trình chín sau khi mổ thịt) và di truyền động vật (giống, kiểu gen). Việc nhận biết các gen điều khiển chất lượng là hướng tiếp cận có nhiều triển vọng trong nghiên cứu cải thiện các tính trạng chất lượng thịt (Fávero 2002, trích dẫn theo Band và cs 2005). Đến nay, nhiều gen ảnh hưởng đến chất lượng thịt đã được xác định. Gen PSS (porcine stress syndrome) hay *ryr1* là một trong những vị trí tính trạng đầu tiên ở lợn được mô tả ở mức độ phân tử. Fujii và cs (1991) đã đề xuất một test quan trọng giúp sàng lọc chất lượng thịt lợn dựa vào việc xác định đột biến gây bệnh trên gen PSS. Test này giúp các nhà chọn giống tách chính xác ba kiểu gen PSS (*NN*, *Nn* và *nn*) và cho phép nghiên cứu chi tiết hơn về tác động của đột biến gen PSS lên chất lượng thịt. Bên cạnh đó, mối liên quan giữa đa hình gen *leptin* với các tính trạng về tốc độ sinh trưởng, tỉ lệ nạc và mức tiêu thụ thức ăn trong quần thể lợn cũng đã được phát hiện (Hardge và cs 1998). Kết quả phân tích mối tương quan giữa đa hình gen *leptin* với tính trạng chất lượng thịt từ 249 mẫu của nhiều giống lợn khác nhau của Kuryl và cs (2003) cũng đã cho thấy gen *leptin* liên quan đến tính trạng chất lượng thịt lợn và khả năng tăng trọng. Sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP có thể giúp nhận biết chính xác các cá thể mang kiểu gen khác nhau

trong thời gian ngắn. Vì vậy, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm xác định đa hình các kiểu gen *PSS* và *leptin* trên giống lợn Kiềng Sắt, làm cơ sở cho việc chọn giống chính xác hơn theo định hướng nâng cao chất lượng thịt ở giống lợn bản địa sau này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu máu lợn

Mẫu máu của 9 con lợn Kiềng Sắt được sử dụng để nghiên cứu đa hình hai gen *leptin* và *PSS*. Bề mặt da vùng tai lợn được sát trùng bằng dung dịch alcohol 70%. Sau đó, dùng kim tiêm vô trùng lấy 1 ml máu ở tĩnh mạch tai lợn cho vào ống EDTA nắp xanh (HEMATOLOGIE: NFS-FLAQ), đảo ống vài lần để trộn đều mẫu máu và dung dịch chống đông. Mẫu máu được giữ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ trước khi được sử dụng để tách chiết DNA tổng số hoặc ở -20°C nếu chưa dùng ngay.

2.2. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu máu toàn phần bằng EzWayTM Genomic DNA kit (Koma Biotech). Nồng độ dung dịch DNA tổng số được xác định trên máy quang phổ (SmartSpecTM300, Biorad) ở bước sóng $\lambda_{260/280\text{nm}}$. Chất lượng DNA được kiểm tra thông qua điện di trên agarose gel 0,8% ở 100V.

2.3. Phân tích đa hình gen *leptin* ở lợn Kiềng Sắt

Đoạn gen *leptin* (*LEP*) mã hóa hormone Leptin liên quan đến khả năng tích lũy mỡ và chất lượng thịt ở lợn được tiến hành phân tích đa hình gen bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Phản ứng khuếch đại DNA được thực hiện dựa trên cặp primer đặc hiệu LEP1: 5' CCCTGCTTGCAAGTTGGTAGC 3' và LEP2: 5' CTGCCACACAAGTCTTGCTC 3' (Lê Thị Thúy và cs, 2004), sản phẩm khuếch đại có kích thước 658 bp. PCR được thực hiện trong 25 μl gồm 1,25 đơn vị Taq DNA polymerase, 10 pmol mỗi loại primer, 1 \times đệm PCR, 200 μM dNTPs, 2 mM MgCl_2 và 200 ng DNA tổng số. Điều kiện PCR: $94^{\circ}\text{C}/4$ phút; tiếp theo là 30 chu kỳ: $94^{\circ}\text{C}/1$ phút, $68^{\circ}\text{C}/1$ phút và $72^{\circ}\text{C}/1$ phút; cuối cùng $72^{\circ}\text{C}/10$ phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên agarose gel 1% ở 100V.

Sản phẩm PCR của gen *leptin* được phân tích đa hình bằng kỹ thuật RFLP với *Hind* III (Lê Thị Thúy và cs, 2004). Phản ứng được thực hiện trong 25 μl bao gồm 1 \times đệm, 5 đơn vị *Hind* III, 20 μl sản phẩm PCR và được ủ qua đêm ở 37°C , sau đó điện di trên agarose gel 2% ở 80V.

2.4. Phân tích đa hình gen *PSS* ở lợn Kiềng Sắt

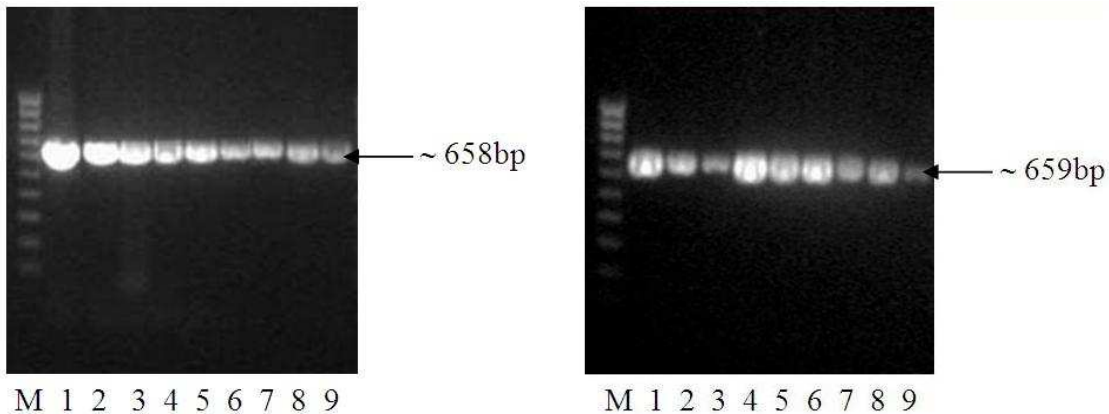
Đoạn gen *ryr-1* chứa đột biến C \rightarrow T kích hoạt gen *PSS* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp primer PSS1: 5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3' và PSS2: 5'-TTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAGT-3' (O'Brien và cs- 1993), sản phẩm PCR có kích thước 659bp. PCR được thực hiện trong 25 μl gồm 1,25 đơn vị Taq DNA polymerase, 10 pmol mỗi loại primer, 1 \times đệm PCR, 200 μM dNTPs, 2 mM MgCl_2 và

200 ng DNA tổng số. Điều kiện PCR: 94°C/4 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ: 94°C/1 phút, 68°C/1 phút và 72°C/1 phút; cuối cùng 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên agarose gel 1% ở 100V.

Sản phẩm phản ứng khuếch đại được tiến hành phân tích đột biến bằng kỹ thuật RFLP với *BsiHKA I* (Band và cs 2005). Phản ứng được tiến hành trong 25 µl bao gồm 1× đệm, 5 đơn vị enzyme *BsiHKA I*, 20 µl sản phẩm PCR. Hỗn hợp dung dịch phản ứng được ủ qua đêm ở 37°C, sau đó điện di trên agarose gel 2% ở 80V.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khuếch đại PCR gen leptin và PSS



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR

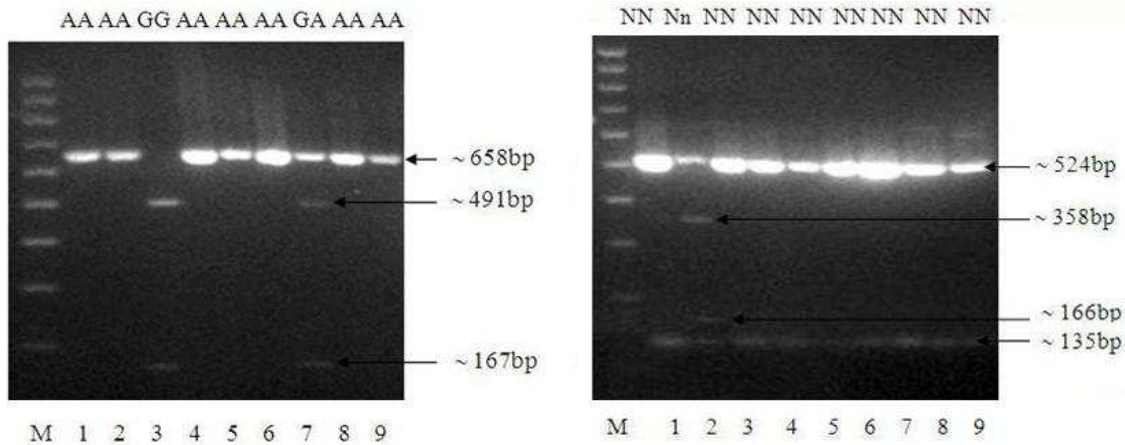
A: gen leptin, B: gen PSS, M: thang chuẩn DNA (1kb), 1-9: các mẫu máu lợn Kiềng Sắt.

Nồng độ các thành phần trong phản ứng PCR có vai trò rất quan trọng, quyết định hiệu quả của phản ứng khuếch đại. Kết quả cho thấy sự khuếch đại thành công DNA ở cả 9 mẫu DNA của lợn. Trong đó, việc sử dụng cặp primer LEP1 và LEP2 đã nhận được đoạn gen có kích thước khoảng 658 bp (Hình 1A). Ngoài ra, các đoạn gen kích thước khoảng 659bp cũng đã được phát hiện trên hình ảnh điện di khi sử dụng cặp primer PSS1 và PSS2 (Hình 1B).

3.2. Xác định đa hình gen leptin và PSS ở lợn bằng kỹ thuật RFLP

Kết quả xác định đa hình gen *leptin* trên 9 mẫu của lợn Kiềng Sắt được trình bày ở hình 2A. Kiểu gen AA cho 1 băng có kích thước 658 bp; kiểu gen GG cho 2 băng có kích thước 491 bp và 167 bp; kiểu gen GA cho 3 băng có kích thước 658 bp, 491 bp và 167 bp. Như vậy, có thể thấy rằng trong 9 mẫu được nghiên cứu đa hình gen *leptin*, tần số kiểu gen AA chiếm tỉ lệ cao nhất (77,78%), kiểu gen GA và GG chiếm tỉ lệ thấp (11,11%). Nghiên cứu của Lê Thị Thúy và cs (2004) cũng cho thấy ở 2 giống lợn nội địa (lợn Móng Cái và lợn Bản), tần số kiểu gen AA là rất cao (100% đối với lợn Bản và 85% đối với lợn Móng Cái), tần số kiểu gen GA ở lợn Móng Cái chỉ chiếm 15%, kiểu

gen *GG* hoàn toàn không xuất hiện ở cả 2 giống lợn nội nói trên. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Lê Thị Thúy và cs (2004) cũng chỉ ra rằng kiểu gen *GG* liên quan đến tính trạng chất lượng thịt tốt (tỉ lệ nạc cao) và khả năng tăng trọng nhanh ở lợn. Như vậy, việc nghiên cứu đa hình gen *leptin* ở lợn Kiềng Sắt có giá trị rất lớn trong việc phát hiện những đối tượng mang gen có tiềm năng cho chất lượng thịt tốt, từ đó góp phần định hướng phát triển đàn giống lợn bản địa đáp ứng yêu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng.



Hình 2. Kết quả phản ứng cắt hạn chế sản phẩm PCR

A: gen *leptin*, *B:* gen *PSS*, *M:* thang chuẩn DNA (1 kb), 1-9: các mẫu máu lợn Kiềng Sắt.

Kết quả nghiên cứu đa hình gen *PSS* trên 9 mẫu của lợn Kiềng Sắt cho thấy hầu hết các mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử *NN*, chỉ có 1 mẫu có kiểu gen dị hợp tử *Nn*. Đặc điểm này được nhận dạng thông qua kết quả phản ứng cắt hạn chế. Với kiểu gen *NN*, sản phẩm PCR của gen *PSS* dài 659 bp được enzyme *BsiHKA* I cắt thành 2 phân đoạn có kích thước là 524 bp và 135 bp. Trong trường hợp kiểu gen *PSS* là *Nn*, sản phẩm PCR sẽ được enzyme hạn chế *BsiHKA* I cắt thành 4 phân đoạn có kích thước 534 bp, 358 bp, 166 bp và 135 bp (Hình 2B). Theo Franco và cs (1998) (trích dẫn theo Band và cs 2005), sự hiện diện của allele *n* sẽ làm tăng khả năng mất nước ở cơ bán mạc, làm giảm chất lượng thịt. Ngoài ra, nghiên cứu của Lundstrom và cs (1995) cũng cho thấy gen *PSS* gây tác động đến chất lượng của cơ dài lưng, làm giảm độ mềm của thịt. Theo kết quả nghiên cứu của Fisher và cs (2000), thịt từ lợn mang kiểu gen *Nn* thường ít mềm hơn và có màu tái hơn so với thịt của các con lợn mang kiểu gen *NN*.

Như vậy, việc sử dụng các chỉ thị phân tử có thể giúp chọn lọc các cá thể mang gen quy định các đặc tính mong muốn. Các kết quả nghiên cứu về đa hình gen *leptin* và *PSS* ở lợn có thể giúp loại bỏ các cá thể mang kiểu gen làm giảm chất lượng thịt. Từ đó các nhà chọn giống có cơ sở để quản lý, bảo tồn và phát triển đàn giống theo từng mục tiêu cụ thể, phục vụ tốt hơn cho ngành nông nghiệp nói chung và ngành công nghiệp thịt nói riêng.

4. Kết luận

Đã khuếch đại thành công và xác định được đa hình gen *leptin* và *PSS* ở lợn Kiềng Sắt. Trong 9 mẫu DNA tổng số của lợn Kiềng Sắt được nghiên cứu đa hình gen *leptin*, tần số kiểu gen *AA* chiếm tỉ lệ cao nhất (77,78%), kiểu gen *GA* và *GG* chiếm tỉ lệ thấp (11,11%). Ngoài ra, kết quả phân tích đa hình gen *PSS* cũng cho thấy hầu hết các mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử *NN*, chỉ có 1 mẫu có kiểu gen dị hợp tử *Nn*. Kết quả nghiên cứu này là dữ liệu quan trọng trong công tác phát triển giống lợn Kiềng Sắt theo định hướng cho chất lượng thịt cao, đồng thời là cơ sở để đưa ra các phương thức bảo tồn nguồn gen quý ở giống lợn bản địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Band GO, Guimaraxes SEF, Lopes PS, Schierholt AS, Silva KM, Pires AV, Jusnior AAB, Gomide LAM, *Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality traits of pig F2 resulting from divergent crosses*, Genetics and Molecular Biology, 28(1), (2005), 88-91.
- [2]. Fisher P, Mellett, FD and Hoffman LC, *Halothane genotype and pork quality. 1. Carcass and meat quality traits from the three halothane genotypes*, Meat Science, 54, (2000), 97-105.
- [3]. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al, *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*, Science, 253, (1991), 448-451.
- [4]. Hardge T, Kopke K, Wimmer K, *Asociation between polymorphism of the Leptin gene (LEP) and performace traits in a porcine resource family and in comercial outbred population*, Animal Genetic, 29, (1998), 60-74.
- [5]. Kuryl J, Kapela SW, Pierzchala M, Bocian M, Grajewska S, *A relationship between genotypes at the GH and LEP loci and carcass meat and fat deposition in pigs*, Animal Science, 21, (2003), 15-26.
- [6]. Lê Thị Thúy, Lư Quang Minh, Trần Thu Thủy, Nguyễn Trọng Bình, Nguyễn Văn Ba, *Đa hình kiểu gen Leptin liên quan đến tình trạng kinh tế của một số giống lợn nuôi tại Việt Nam*, Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, số 4, (2004). <http://www.sinhhocvietnam.com/vn/modules.php?go=page&name=Pages1&pid=1>.
- [7]. Lundstrom K, Andersson A, and Hansson I, *Effect of the RN gene on technological and sensory meat quality in crossbred pigs with Hampshire as terminal sire*, Meat Science, 42, (1996), 145-153.
- [8]. O'Brien PT, Shen H, Cory CR and Zhang X, *Use of a DNA-based test for the mutation associated with Porcine Stress Syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine*, JAVMA, 203, (1993), 842-851.

- [9]. Sellier P, *Genetics of meat and carcass traits*, In: Rotschild MF, Ruvinsky A (eds). *The Genetics of the Pig*. Wallingford, UK, CAB International, (1998), 463–510.

STUDY ON THE POLYMORPHISM OF *PSS* AND *LEPTIN* GENES RELATED TO PORK QUALITY

*Ho Trung Thong, Ho Le Quynh Chau
College of Agriculture and Forestry, Hue University*

SUMMARY

*The aim of this study was to determine the polymorphism of *PSS* and leptin genotypes associated with pork quality. A total of nine DNA genomic samples of Kieng Sat pig breed were characterized in the genotypes by using the PCR-RFLP technique with specific primers. With regard to leptin genotype polymorphism, the highest frequency belonged to AA genotype (77,78%); the other genotypes (GA and GG) had the equal ratio with 11,11%. Besides, the result of *PSS* gene polymorphism indicated that the most of samples were homozygote pigs (NN genotype), only 1 carrier was Nn pig. The results will be important for the strategies of future conservation, management and uses of the genetic resource of this indigenous pig breed.*

Keywords: *gene polymorphism, PCR-RFLP, pork quality.*