

NGHIÊN CỨU ĐA HÌNH KIỂU GENE ENDOTHELIN - B RECEPTOR (EDNRB) QUY ĐỊNH MÀU LÔNG TRẮNG CỦA NGỰA Ở KHU VỰC MIỀN NÚI ĐÔNG BẮC VIỆT NAM

Nguyễn Văn Noi^{1*}, Trần Xuân Hoàn², Trần Văn Phùng¹

¹Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. ²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi Quốc gia.

Tóm Tắt

Ngựa Bạch là đối tượng vật nuôi có giá trị kinh tế cao và cũng là nguồn dược liệu quý dùng để chữa trị một số chứng bệnh nan y ở người. Đề tài tiến hành nghiên cứu đa hình kiểu gene Endothelin-B Receptor (EDNRB) quy định màu lông trắng của ngựa giúp phân biệt ngựa bạch với ngựa bạch tạng, trong đó ngựa bạch tạng mang đột biến thay thế hai nucleotit TC353-354AG (gây ra Hội chứng chết ở ngựa con màu trắng - Overo Lethal White Foal). Tiến hành lấy mẫu máu và tách DNA 50 cá thể ngựa trắng chia làm hai nhóm, nhóm 1 gồm 42 cá thể ngựa bạch và nhóm 2 gồm 8 cá thể ngựa trắng nghi ngờ bị bạch tạng. Phân tích kiểu gene EDNRB bằng phương pháp PCR-RFLP sử dụng cặp mồi ps2/hex1 và cắt bởi enzyme giới hạn *BfaI* (Yang và cs, 1998) kết quả thu được 100% ngựa mang gene đồng hợp tử E^NE^N. Các kết quả thu được cho thấy, 50 cá thể ngựa đều có kiểu gene EDNRB quy định màu lông trắng bình thường không mang đột biến và 8 cá thể ngựa thuộc nhóm 2 không phải ngựa bạch tạng.

Từ khóa: Đa hình gene, EDNRB gene, kiểu gene, màu lông của ngựa ở khu vực Đông Bắc Việt Nam

1. Đặt vấn đề

Các gene kiểm soát màu lông ngựa đã được nghiên cứu từ lâu. Tuy nhiên gần đây các alen hay marker chức năng mới được phát hiện ở mức phân tử DNA. Các kết quả nghiên cứu chỉ ra tính trạng màu lông trắng của ngựa do một số gene quy định trong đó có gene EDNRB, gene KIT, gene W (Haase và cs, 2007, 2009).

Trong chăn nuôi ngựa, nhiều ngựa con sinh ra có kiểu hình màu lông trắng là do bị bạch tạng. Điều này sẽ gây khó khăn cho người chăn nuôi trong việc phân biệt giữa ngựa bạch và ngựa bạch tạng. Trong khi ngựa bạch có giá trị cao cả về dinh dưỡng lẫn kinh tế thì ngựa bạch tạng lại không, chúng thường không có khả năng sinh sản, ngựa con màu trắng sinh ra thường bị chết (hội chứng Overo Lethal White Foal Syndrome-OLWFS) do mang kiểu gene đồng hợp tử về đột biến gene Endothelin B receptor (thay thế 2 nucleotit TC >AG tại vị trí nucleotit 353-354) dẫn đến thay thế axit amin Isoleucine thành Lysine tại vị trí 118 (Yang và cs, 1998; Santschi và cs, 1998; Metallinos và cs, 1998), không tìm thấy ngựa trưởng thành mang kiểu gene đồng hợp tử này. Do đó, loại bỏ ngựa bạch tạng ra khỏi đàn ngựa bạch là mong muốn cấp thiết của người chăn nuôi ngựa. Vấn đề này cũng đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Nghiên cứu của Yang và cs (1998) cho thấy sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP nhân gene EDNRB từ cặp mồi ps2/hex1 thu được sản phẩm PCR kích thước 155 bp, kết quả khi cắt bằng enzym giới hạn *BfaI* cho thấy ngựa trắng mang alen chết có hai kích thước băng 136 bp và 19 bp, nhưng ngựa bình thường sản phẩm PCR không bị cắt 155bp. Kiểm tra DNA là cách duy nhất để xác định chắc chắn liệu các con ngựa màu trắng sinh ra có mắc hội chứng OLWFS hay không.

Như vậy sử dụng các kỹ thuật di truyền phân tử PCR-RFLP (Yang và cs, 1998), đã xác định được các kiểu gene khác nhau quy định màu lông trắng ở ngựa. Do đó nghiên cứu đa hình gene EDNRB của ngựa là cơ sở khoa học cho việc xác định kiểu gene quy định màu lông trắng và góp phần giúp người chăn nuôi phân biệt, chọn lọc đúng giống ngựa bạch không bị nhầm với ngựa bạch tạng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là giống ngựa bạch là giống ngựa địa phương của nước ta (Đặng Đình Hanh và cs, 2006) và ngựa nghi ngờ bạch tạng, đều có màu lông trắng. Số lượng: 50

* Tel: 0979177598; Email: vannoi85bn@gmail.com

con ngựa chia làm hai nhóm trong đó 42 con ngựa bạch và 8 con nghi ngờ ngựa bị bạch tạng (dựa trên các đặc điểm về ngoại hình).

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp lấy mẫu: Lấy mẫu máu của 50 cá thể ngựa được chọn, mỗi cá thể lấy 100 - 200µl máu được bảo quản trong dung dịch chống đông bằng EDTA. Các mẫu máu được đánh số thứ tự ống nghiệm từ 1 đến 50.

Phương pháp tách chiết DNA: Từ mỗi mẫu máu đã được chống đông, lấy 100µl hỗn hợp máu để tiến hành tách DNA bằng kit của hãng Bioners. Sản phẩm DNA này được sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp PCR-RFLP phân tích đa hình gene Endothelin-B Receptor (EDNRB): Sử dụng cặp mồi ps2/hex1 (Yang và cs, 1998) nhân phân đoạn gene EDNRB nằm trên NST 17 của ngựa (www.geneome.ucsc.edu), thu được sản phẩm PCR có kích thước 155 bp. Cặp mồi ps2/hex1 có trình tự như sau:

Mồi xuôi (ps2): 5' AGTGTTTCGTGCTGGGCATC'3

Mồi ngược (hex1): 5' TCAAGATATTAGGGCCGTTCC'3

Thành phần phản ứng PCR nhân gene EDNRB gồm (tổng thể tích 25 µl): 5 µl ADN; 1,1 µl ps2/hex1 primers (10 pmol/µl mồi xuôi và mồi ngược); 1,7 µl MgCl₂ (25mM); 2,5 µl Buffer (10X); 0,4 µl Hot start Taq polymeras (5U/ µl); 3,5 µl dNTPs; và 10,8 µl H₂O.

Chu trình nhiệt thực hiện theo các bước: biến tính ở 94 °C trong 15 phút, 30 chu kỳ lặp lại gồm: biến tính ở 94 °C trong 40 giây; gắn mồi ở 63 °C trong 40 giây, tổng hợp chuỗi DNA ở 72 °C trong 40 giây; kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 8 phút, sau đó chuyển nhiệt độ về 4 °C.

Sản phẩm PCR sau khi nhân lên được kiểm tra bằng điện di agarose 1,5% (trong thời gian 45 phút, hiệu điện thế 60 vôn), xử lý với enzym giới hạn *Bfa*I ủ qua đêm ở 37°C, kiểm tra sản phẩm cắt bằng điện di agarose 4% sử dụng dung dịch đệm TBE.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm thống kê STATGRAPH version 4.0 (Cục thống kê USA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chọn cá thể ngựa lấy mẫu dựa theo đặc điểm ngoại hình

Kết quả chọn 50 cá thể ngựa lấy mẫu được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu với tiêu chí chọn hai nhóm cá thể ngựa là nhóm ngựa bạch và nhóm các cá thể ngựa có màu lông trắng nhưng không xác định chính xác là ngựa bạch hay không, nhóm này gọi là nhóm ngựa nghi ngờ bị bạch tạng. Kết quả chọn và phân loại 50 cá thể ngựa lấy mẫu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả chọn ngựa lấy mẫu

Stt	Nhóm ngựa	Số cá thể (n)	Đánh số mẫu
1	Ngựa bạch	42	1-4; 6-18; 22-32; 34-40; 44-50
2	Ngựa nghi ngờ bạch tạng	08	5, 19, 20, 21, 33, 41, 42, 43

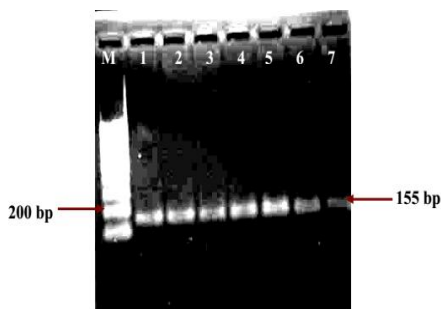
Theo kết quả nghiên cứu của nhóm nghiên cứu cho biết ngựa bạch có một số đặc điểm ngoại hình đặc trưng sau: Kết cấu ngoại hình thanh sấn, toàn thân màu trắng hồng hoặc trắng mây, xung quanh con người có một vành màu đồng lửa, con người mắt màu xanh đen ban đêm soi đèn có màu đỏ rực, cả bốn móng đều có màu trắng ngà, các lỗ tự nhiên có màu hồng nhuận. Đặc điểm này không có sự sai khác giữa đời bố mẹ và con cái (Đặng Đình Hanh và cs, 2009). Nhóm ngựa bạch đã được chọn dựa theo các tiêu chí trên, còn nhóm ngựa nghi ngờ bạch tạng chủ yếu được chọn ra dựa trên kinh nghiệm nghiên cứu, chủ yếu chọn các ngựa cái sinh con hay bị chết non và con của chúng để lấy mẫu, tuy nhiên không phân biệt được chính xác hai nhóm ngựa này.

Theo một số nhà nghiên cứu về ngựa trên thế giới thì rất khó để phân biệt ngựa bạch với ngựa bạch tạng, vì thông thường toàn thân chúng cũng có màu trắng tuyết, da màu hồng, duy chỉ những con ngựa bạch tạng là mang dạng đồng hợp đột biến gene EDNRB sinh ra tính trạng gây chết ở ngựa con màu trắng. Cho đến nay vẫn chưa có tài liệu nào mô tả hoàn chỉnh đặc điểm của ngựa bạch tạng.

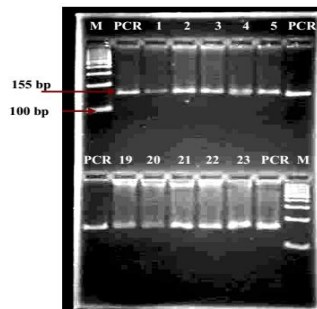
3.2. Phân tích sai khác di truyền

Kết quả nhân sản phẩm PCR của phân đoạn gene EDNRB

Điện di trên thạch agarose 1,5% sản phẩm PCR nhân phân đoạn gene EDNRB từ cặp mồi ps2/hex1 của 50 mẫu máu ngựa, kết quả chỉ thu được một phân đoạn DNA duy nhất có kích thước 155 bp (Yang và cs, 1998). Điều này cho thấy chúng tôi đã nhận được đúng phân đoạn gene EDNRB mong muốn để sử dụng trong nghiên cứu (thể hiện ở hình 1).



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gene EDNRB (M: thang DNA chuẩn (Marker-100); 1-7: sản phẩm PCR các mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)



Hình 2. Phân tích đa hình gene EDNRB bằng enzyme *BfaI* (M: Marker 100 bp; sản phẩm PCR đối chứng; Mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 19, 20, 21, 22, 23: Kiểu gene $E^N E^N$)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

Phân tích đa hình gene Endothelin B Receptor bằng enzym giới hạn *BfaI*

Sau khi sử dụng enzym giới hạn *BfaI* cắt sản phẩm PCR được nhân lên từ cặp mồi ps2/hex1 của 50 cá thể ngựa, kết quả điện di được thể hiện trong hình 2.

Sản phẩm PCR được cắt bằng enzym giới hạn *BfaI* có thể thu được các kiểu gene sau (Yang và cs, 1998): Kiểu gene đồng hợp $E^N E^N$ (kiểu gene bình thường không mang đột biến, chỉ có duy nhất một kích thước băng 155 bp); kiểu gene đồng hợp $E^M E^M$ (kiểu gene mang đột biến, PCR bị cắt bởi enzym giới hạn *BfaI*, thu được hai băng có kích thước 136 bp và 19 bp); và kiểu gene dị hợp $E^N E^M$ (gồm một alen bình thường và một alen đột biến, sản phẩm cắt thu được ba băng có các kích thước 155 bp, 136 bp và 19 bp. Nếu chọn những cá thể ngựa này làm giống thì đời con sẽ có nguy cơ cao bị mắc hội chứng OLWFS).

Kết quả phân tích đa hình gene EDNRB từ 50 mẫu ngựa nghiên cứu chúng tôi thu được tỷ lệ kiểu gene và tần số alen trình bày ở bảng 2.

Qua bảng 2 cho thấy phân tích đa hình gene EDNRB của hai nhóm ngựa chúng tôi chỉ thu được duy nhất một kiểu gene đồng hợp: 100% $E^N E^N$ - kiểu gene không bị cắt bởi enzym giới hạn *BfaI*, tất cả 50 cá thể đều không mang alen gây chết. Như vậy, tần số alen $f(E^N)=1,0$ và $f(E^M)=0$. Kết quả thu được cho thấy 8 ngựa trắng của nhóm hai không phải ngựa bạch tạng.

Bảng 2: Tỷ lệ kiểu gene và tần số alen của gene EDNRB

Stt	Nhóm ngựa	Số cá thể (n)	Tỷ lệ kiểu gene (%)			Tần số alen	
			$E^N E^N$	$E^M E^M$	$E^N E^M$	E^N (Bình thường)	E^M (Đột biến)
1	Ngựa bạch	42	100	0	0	1,0	0
2	Ngựa nghi ngờ bạch tạng	08	100	0	0	1,0	0

Metallinos và cs (1998) phân tích đa hình gene EDNRB trên 138 cá thể giống ngựa Frame Overo kết quả thu được: 3/138 ngựa con lông trắng bị chết có kiểu gene đột biến $E^M E^M$, 40/138 ngựa mang kiểu gene dị hợp tử về đột biến $E^N E^M$, như vậy alen đột biến xuất hiện khá phổ biến ở ngựa trắng ở Châu Mỹ.

Yang và cs (1998) phân tích đa hình gene EDNRB trên 19 cá thể ngựa Overo (Mỹ) kết quả: 10 cá thể ngựa mắc OLWFS và 9 cá thể ngựa bình thường. Tất cả ngựa con có hội chứng OLWFS đều có kiểu gene đồng hợp tử của đột biến Ile118Lys và không tìm thấy ngựa trưởng thành mang kiểu gene đồng hợp tử này.

Mối liên quan của kiểu gene với màu lông trắng của ngựa:

Phân tích mối liên quan của kiểu gene EDNRB với tình trạng màu lông trắng của 50 cá thể ngựa nghiên cứu kết quả thu được 100% cá thể ngựa nghiên cứu đều có cùng một kiểu gene $E^N E^N$ EDNRB quy định màu lông trắng.

4. Kết luận

Đã chọn và lấy mẫu 50 cá thể ngựa lông trắng dựa theo đặc điểm ngoại hình, gồm hai nhóm: 42 ngựa bạch và 8 ngựa nghi ngờ bạch tạng.

Phân tích đa hình gene EDNRB bằng enzym *BfaI* của 50 cá thể ngựa nghiên cứu, thu được 100% kiểu gene $E^N E^N$. 50 cá thể ngựa đều có kiểu gene bình thường không mang đột biến gây chết. Như vậy 8 cá thể ngựa nhóm 2 không phải ngựa bạch tạng.

Không phát hiện đột biến thay thế hai nucleotit -TC thành -AG tại vị trí nucleotit 353-354 từ kết quả nghiên cứu đa hình gene EDNRB của 50 cá thể ngựa nghiên cứu.

Kết quả 100% cá thể ngựa trắng nghiên cứu đều có cùng một kiểu gene $E^N E^N$ EDNRB quy định màu lông trắng.

Tài liệu tham khảo

1. Đặng Đình Hanh, Nguyễn Đức Ước, Võ Văn Sự, Vũ Văn Tý, Nguyễn Đức Chuyên, Nguyễn Hữu Trà, Nguyễn Thị Tuyết (2006). Nghiên cứu một số đặc điểm ngoại hình, khả năng sinh trưởng, sinh sản và sinh lý, sinh hóa máu của ngựa bạch nuôi tại trung tâm NC&PTCN miền núi. Báo cáo khoa học năm 2006, Viện Chăn Nuôi.
2. Đặng Đình Hanh, Nguyễn Văn Đại, Nguyễn Hữu Trà, Vũ Đình Ngoan, Dương Thị Thư, Tạ Văn Cần, Nguyễn Thị Thúy Hằng (2009). Đặc điểm ngoại hình và khả năng sinh sản, sinh trưởng của ngựa bạch nuôi tại Trung tâm NC&PTCN miền núi, Báo cáo khoa học năm 2009, Phần Di truyền-giống vật nuôi, trang 157-162.
3. Haase B., Brooks S.A., Schlumbaum A., Azor P.J., Bailey E., Alaeddine F., Mevissen M., Burger D., Poncet A., Rieder S., Leeb T. (2007): Allelic heterogeneity at the equine KIT locus in dominant white (W) horses. PLOS Genet., 3, e195, 1–8.
4. Haase B., Brooks S.A., Tozaki T., Burger D., Poncet P.A., Rieder S., Hasegawa T., Penedo C., Leeb T. (2009a): Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. Anim. Genet., 40, 623–629.
5. Marklund S., Moller M.J., Sandberg K., Andersson L. (1996): A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. Mamm. Genome, 7, 895–899.
6. Metallinos D.L., Bowling A.T., Rine J. (1998): A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome: an equine version of hirschsprung disease. Mamm. Genome, 9, 426–431.
7. Santschi E.M., Purdy A.K., Valber S.J., Vrotsos P.D., Kaese H., Mickelson J.R. (1998): Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. Mamm. Genome, 9, 306–309.
8. Yang G.C., Croaker D., Zhang A.L., Manglick P., Cartmill T., Cass D. (1998): A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS) – a horse variant of Hirschsprung-disease (HSCR). Hum. Mol. Genet., 7, 1047–1052.
9. “Introduction to Coat Color Genetics” from Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, website accessed January 12, 2008.

Summary

TO STUDY ON ENDOTHELIN – B RECEPTOR (EDNRB) GENE POLYMORPHISMS DEFINED WHITE COAT OF THE HORSE IN NORTH EAST MOUNTAINOUS AREAS OF VIETNAM

Nguyen Van Noi^{1*}, Tran Xuan Hoan², Tran Van Phung¹

¹University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, Viet Nam.

²Key laboratory of animal cell technology, National Institute of Animal Husbandry, Viet Nam

White horse is a pet subject of high economic value and a source of medicinal herbs used to treat a number of illnesses in humans. Subject conducted to determine the type of the endothelin-B receptor gene (EDNRB) defined white coat of horses distinguishes white albino with horses, in which the mutant albino horse replacing two nucleotides TC353-354AG (caused death syndrome in white pony - Overo Lethal white Foal). Take samples of blood and separated white horse DNA of 50 individuals divided into two groups, one group of 42 individual white horses and the second group consists of 8 individual horse white albino doubt. EDNRB genotype analysis by PCR-RFLP used pair bait ps2/hex1 and cut restriction by enzymes BfaI (Yang et al, 1998). The results are 100% horses homozygous E^NE^N gene. Through the results obtained showed that 50 horses are individuals EDNRB genotype defined normal white coat mutation and 8 individual horses of group 2 is not albino.

Key words: Polymorphisms, EDNRB gene, genotype, Color coat of the horse in North East mountainous areas of Vietnam

* Tel: 0979177598; Email: vannoi85bn@gmail.com