PHÂN TÍCH ĐA HÌNH DI TRUYỀN GEN PIT1 (POU1F1) CỦA GIỐNG LỢN ĐEN ĐỊNH HÓA TỈNH THÁI NGUYÊN

Hà Bích Hồng[1], Bùi Văn Thắng[1], Nguyễn Thị Vân Anh[1], Nguyễn Thị Bích Ngà[2], Trần Viết Vinh[2], Trần Thảo Vân[2], La Văn Công[3]

[1]Trường Đại học Lâm nghiệp

[2]Công ty TNHH Phát triển Nông nghiệp Thảo Vân

[3]Đại học Nông lâm Thái Nguyên

TÓM TẮT

Giống Lợn đen Định Hóa của tỉnh Thái Nguyên là một giống lợn nhỏ, thịt thơm và ngon, đây cũng là giống lợn đặc hữu của tỉnh Thái Nguyên. Tuy nhiên, vì là giống lợn nhỏ và nuôi thả tự do nên số lượng Lợn đen Định Hóa đang bị suy giảm đáng kể, đặc biệt là những cá thể Lợn đen thuần chủng. Với mục đích quản lý, bảo tồn và phát triển giống Lợn đen đặc hữu này, chúng tôi đã tiến hành phân tích đa hình di truyền gen PIT1 (POU1F1) từ 60 mẫu mô (tai) của 60 cá thể Lợn đen Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên. Kết quả nghiên cứu cho thấy đoạn gen PIT1 được nhân bản thành công ở tất cả các cá thể Lợn đen với kích thước 1745 bp và chúng được đăng ký lên ngân hàng gen quốc tế với mã số MW167783. Ngoài ra, phân tích đa hình gen PIT1 trong quần thể Lợn đen Định Hóa tại huyện Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên bằng phương pháp PCR-RFLP chỉ ra gen PIT1-*Rsa*I có 03 kiểu gen chủ yếu. Trong đó, kiểu gen AA chiếm tần số lớn nhất (58%), AB chiếm tần số 35% và BB rất hiếm trong quần thể và chỉ chiếm 6,7%. Tần số alen A là 0,76 và alen B là 0,24. Trong đó, kiểu gen AA cho thấy trọng lượng trung bình của cá thể cao hơn so với kiểu gen AB và BB. Kết quả này bước đầu đánh giá được mức độ đa hình di truyền của gen PIT1 và mối tương quan giữa kiểu gen của gen PIT1 với tính trạng trọng lượng cơ thể. Lợn đen Định Hóa là giống Lợn có tiềm năng cho năng suất và khả năng mở rộng quần thể tốt khi lựa chọn cặp giao phối có kiểu gen phù hợp.

Từ khóa: đa hình di truyền, PCR-RFLP, *PIT*1, Lợn đen Định Hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống Lợn đen Định Hóa của tỉnh Thái Nguyên là giống lợn nhỏ, thịt thơm và ngon đang được quan tâm hiện nay, đây cũng là giống lợn đặc hữu của huyện Định Hóa tỉnh Thái Nguyên. Tuy nhiên, số lượng Lợn đen thuần chủng hiện đang suy giảm nhanh chóng xuống mức đáng lo ngại, do vậy cần có những biện pháp để cải thiện khả năng sinh trưởng, sinh sản và phát triển của giống lợn này nhằm mục đích bảo tồn cũng như phát triển quy mô chăn nuôi để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ của thị trường. Việc chọn giống hiện nay không chỉ dựa vào kiểu hình mà còn dựa vào các kỹ thuật hiện đại sử dụng các chỉ thị phân tử tăng độ chính xác, rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả chọn lọc. Trong đó, nghiên cứu các mối liên quan về đa hình gen là rất quan trọng trong công tác chọn giống, đây là cơ sở cho các nghiên cứu về mối tương quan giữa gen nghiên cứu với các tính trạng tương ứng của Lợn đen Định Hóa. Trong số các gen được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu thì gen PIT1 là một gen được quan tâm (Franco et al., 2005; Nie et al., 2008; Pierzchala et al., 2003; Yu et al., 1994). Đây là gen mã hóa nhân tố phiên mã chuyên biệt tuyến yên (Pituitary specific transcription factor), mã hóa cho các protein đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của cơ thể và điều hòa sự phiên mã các hóc môn sinh trưởng như GH, prolactin, TSH-β và GHRH, nồng độ GH trong huyết tương, giữa tính đa hình gen PIT1 và tỷ lệ mỡ trong thân thịt. Gen PIT1 ở lợn nằm trên nhiễm sắc thể 13, tại vị trí các locus tính trạng số lượng (QTLs) có liên quan tới tốc độ sinh trưởng và lượng mỡ thân thịt (carcass fatness). Gen PIT1 dài 19.723 bp (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/397325), kích thước phân tử mARN là 1518bp. Những nghiên cứu đa hình gen PIT1 được tiến hành trên nhiều đối tượng vật nuôi khác nhau như lợn, gà, dê, cừu, bò… vì gen này có ảnh hưởng lớn đến tốc độ tăng trọng và chất lượng thịt (Lê Thị Thu Hà et al., 2013; Nie. et al., 2008; Renaville et al., 1997; Stancekova et al., 1999; Song et al., 2005).

Hình 1. Giống Lợn đen Định Hóa tỉnh Thái Nguyên

Chỉ thị RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là phương pháp nghiên cứu đa hình chiều dài dựa trên các phân đoạn sản phẩm PCR được cắt bởi các enzyme giới hạn thích hợp (Botstein et al., 1980). Phương pháp PCR-RFLP có thể phát hiện một số thay đổi trong trình tự nucleotide liên quan đến vị trí nhận biết của enzyme giới hạn, phương pháp này hiện nay được ưa thích và sử dụng phổ biến trong nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới do tính đơn giản và chi phí thấp, có khả năng tiến hành phân tích đồng thời với số lượng mẫu lớn, thời gian cho kết quả nhanh (Lê Thị Thúy et al., 1999). Yu và cộng sự (1994) thực hiện nhân bản đoạn ADN từ vùng intron 4 đến vùng 3'UTR có kích thước 1745 bp ở Lợn, sau đó sản phẩm PCR được cắt bởi enzym *Rsa*I cho kiểu gen AA (1 vạch 710 bp), kiểu gen AB (3 vạch 710 bp, 388 bp và 322 bp), kiểu gen BB (2 vạch 388 bp và 322 bp). Kiểu gen AB và alen A xuất hiện phổ biến hơn với tần suất là 0,72 và 0,63. Nhóm lợn có kiểu gen AA có tăng trọng trung bình hằng ngày, độ dày mỡ lớn hơn nhóm có kiểu gen AB. Cũng tác giả này năm 1995 đã nhân đoạn ADN từ vùng cuối exon 3 – intron 3 – đầu exon 4 của gen PIT1 ở lợn. Sử dụng enzym *Msp*I phân tích đa hình gen của lợn được phân tích bằng phương pháp PCR – RFLP sử dụng enzyme *Msp*I và *Taq*I để kiểm tra với 120 mẫu ADN từ máu lợn và 10 mẫu ADN từ lông cho kết quả lợn mang gen DD có độ dày mỡ lưng cao nhất so với hai kiểu gen CC, CD trong quần thể lợn phân tích. Sử dụng enzym *Rsa*I đa hình không có sự khác biệt đối với tỷ lệ mỡ, nạc. Sản phẩm PCR có kích thước 2100 bp sau khi được cắt bởi enzymm *Msp*I có các kiểu gen CC 20%, kiểu gen DD 34,2%, kiểu gen CD 45,8%. Sản phẩm PCR được cắt bởi enzym *Rsa*I có các kiểu gen EE 39,2%, kiểu gen EF 52,3%, kiểu gen FF 8,5% (Yu et al., 1995). Song và cộng sự (2005) sử dụng enzym *Msp*I phân tích đa hình trong intron 3 của gen POU1F1 (PIT1) của lợn cho thấy lợn mang kiểu gen DD có khối lượng cơ thể ở 180 ngày và tốc độ tăng trọng trung bình hàng ngày cao nhất. Qua đó cho thấy gen PIT1 là một gen chỉ thị có hiệu quả để xác định tốc độ tăng trưởng cũng như độ dày mỡ và tỷ lệ nạc ở vật nuôi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện giải trình tự nucleotide vùng gen PIT1 (POU1F1) và sử dụng chỉ thị phân tử PCR-RFLP để phân tích mức độ đa hình gen PIT1 trong quần thể Lợn đen Định Hóa tại huyện Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên làm cơ sở khoa học cho đề xuất các giải pháp chọn giống, nhân giống và phát triển bền vững giống Lợn này ở Thái Nguyên nói riêng và ở Việt Nam nói chung.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu mô tai của các cá thể Lợn đen Định Hóa được thu thập làm vật liệu tách chiết ADN tổng số (Bảng 1).

Tại thực địa, phương pháp lấy mẫu mô tai được tiến hành như sau: dùng kìm chuyên dụng lấy một mẩu mô tai đưa vào ống eppendorf 2ml chứa cồn tuyệt đối, bảo quản lạnh trong khoảng 24 giờ. Tại phòng thí nghiệm, dùng nước cất rửa sạch, để khô rồi đưa vào ống eppendorf 2 ml chứa cồn tuyệt đối mới đem bảo quản trong tủ lạnh âm sâu (-20^{o}C) cho đến khi sử dụng phân tích ADN.

Bảng 1. Danh sách mẫu Lợn đen Định Hóa thu thập tại 6 xã của huyện Định Hóa

STT	Kí hiệu mẫu	Ngày thu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Số lượng mẫu
1	BN (BN1-BN10)	30/09/2019	Bộc Nhiêu - Định Hoá	10
2	PĐ (PĐ1-PĐ10)	30/09/2019	Phú Đình - Định Hoá	10
3	PT (PT1-PT10)	30/09/2019	Phượng Tiến - Định Hóa	10
4	PC (PC1-PC10)	30/09/2019	Phúc Chu - Định Hoá	10
5	QK (QK1-QK10)	30/09/2019	Quy Kỳ - Định Hóa	10
6	TT (TT1-TT10)	30/09/2019	Tân Thịnh - Định Hoá	10
		Tổng cộng		**60**

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết theo quy trình của bộ kit G – spin^{TM} Total DNA Extraction, Intron, Hàn Quốc. Sản phẩm ADN sau khi tách chiết được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0%.

2.2.2. Phương pháp khuếch đại PCR và xác định trình tự nucleotide

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR GX100 (Biologix) với thể tích mỗi phản ứng là 20µl, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như sau: 10µl PCR Master mix 2X, 10µM mồi xuôi và 10µM mồi ngược, 50ng ADN khuôn, bổ sung H_2O deion tới 20µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95^{o}C trong 5 phút; 35 chu kì lặp lại của ba bước 95^{o}C – 30 giây, 63^{o}C – 1 phút, 72^{o}C – 3 phút; kết thúc tổng hợp ở 72^{o}C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4^{o}C. Trình tự cặp mồi sử dụng để nhân bản đoạn gen PIT1 từ vùng intron 4 đến vùng 3' UTR của gen PIT1, đoạn nhân bản có kích thước 1745bp: Mồi xuôi: 5' – AGTGTAGCCAGAGCATCT – 3', Mồi ngược: 5' – ACCACATCTGCACACTCA – 3' (Yu et al., 1994).

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

Những sản phẩm PCR sau khi khuếch đại thành công sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Prification Kit của hãng Intron, Hàn Quốc.

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự theo cả hai chiều. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xác định tại bằng máy giải trình tự tự động theo nguyên lý Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

2.2.3. Phương pháp phân tích số liệu

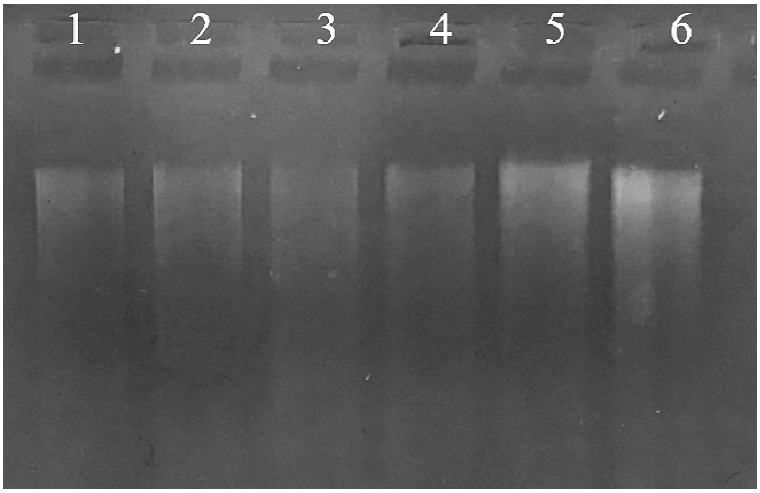
Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999), Mega7 (Kumar et al., 2015), và các công cụ trên NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số

Tách chiết ADN tổng số là bước quan trọng, vì chất lượng ADN tổng số thu được (hàm lượng, độ tinh sạch) có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của phản ứng PCR. Trong nghiên cứu này, vật liệu dùng để tách chiết ADN là 60 mẫu

tai được thu từ 60 cá thể Lợn đen của huyện Định Hóa tỉnh Thái Nguyên. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ 06 mẫu tai đại diện cho 06 cá thể Lợn đen Định Hóa tại 06 xã của huyện Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ mẫu mô tai của 06 các thể Lợn đen Định Hóa
Giếng 1 đến giếng 6: tương ứng với các mẫu BN01, PĐ01, PT01, PC01, QK01, TT01

Kết quả tách chiết ADN từ mẫu tai được thể hiện như hình 2. Trong đó, các mẫu có chất lượng và hàm lượng ADN khác nhau. Cụ thể tại giếng số 5, 6 tương ứng với mẫu QK01, TT01 có chất lượng ADN tốt hơn, dải sáng rõ hơn. Với giếng số 1, 2, 3, và 4 tương ứng mẫu BN01, PĐ01, PT01, PC01 có xuất hiện băng ADN mờ hơn, tối hơn so với 02 mẫu còn lại, điều này cho thấy hàm lượng ADN của 04 mẫu BN01, PĐ01, PT01, PC01 thấp hơn so với mẫu QK01 và TT01. Tuy nhiên, dựa trên hình 2 ta có thể thấy các mẫu ADN vẫn còn bị đứt gãy thể hiện ở dải smear sáng mờ bên dưới mỗi vạch ADN tổng số.

Trong quá trình làm thử nghiệm phản ứng PCR, chúng tôi nhận thấy các mẫu ADN tổng số tách chiết được đều không cho kết quả nhân bản đoạn gen mong muốn. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc tách chiết ADN từ mẫu mô động vật có thể vẫn còn lẫn một số protein gây ức chế enzyme polymerase dẫn đến phản ứng PCR bị thất bại. Do đó, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch lại tất cả các mẫu ADN tách chiết được bằng isopropanol lạnh (-20^{o}C) thêm một lần nữa. Sau khi tinh sạch, các mẫu ADN này được kiểm tra bằng cách tiến hành thử phản ứng PCR với cặp mồi phổ quát là *CO*I_F/R (cặp mồi nhân bản đoạn gen *CO*I trên ty thể của tế bào động vật) (Folmer et al., 1994). Kết quả cho thấy tất cả sáu mẫu ADN đều cho sản phẩm PCR đặc hiệu như mong đợi. Từ kết quả này, chúng tôi nhận thấy việc tách chiết ADN từ mẫu mô động vật không phải lúc nào cũng đạt được độ tinh sạch như mong đợi mặc dù sử dụng bộ kit tách chiết có hiệu quả cao. Chúng tôi khuyến cáo nên tinh sạch ADN lại một lần nữa sau khi hoàn thành tách chiết ADN theo chỉ dẫn của bộ kit tách chiết để loại bỏ được các chất gây ức chế phản ứng PCR.

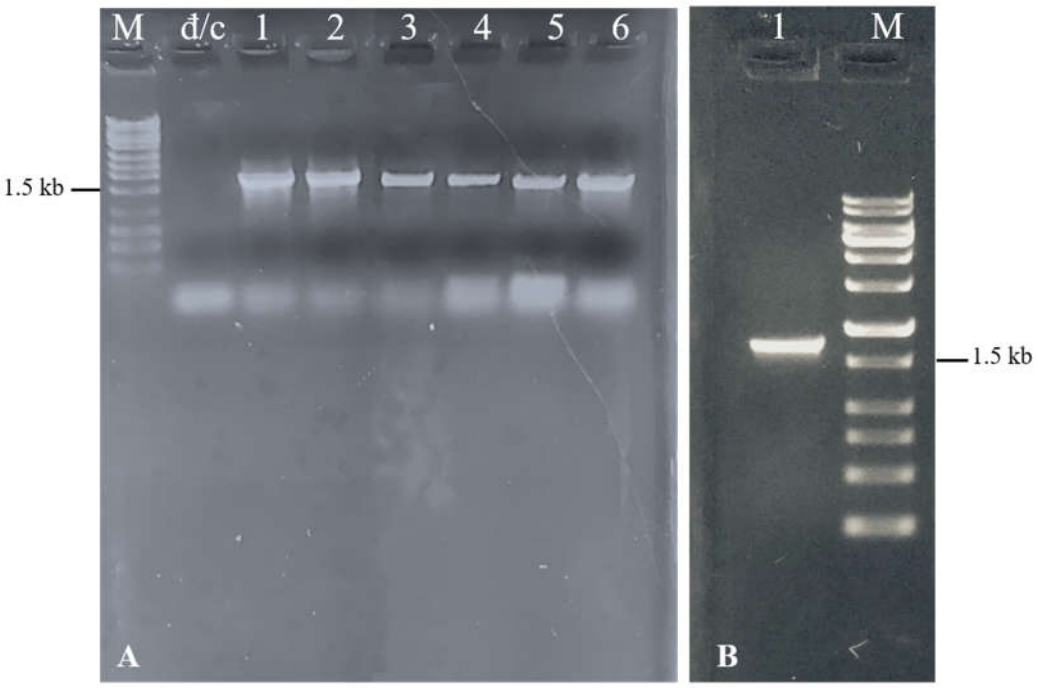
3.2. Nhân bản các đoạn gen PIT1

Yu và cộng sự (1994) thiết kế cặp mồi nhân bản đoạn gen PIT1 có trình tự bao gồm từ vùng intron 4 đến vùng 3'UTR, kích thước đoạn nhân bản dài 1745 bp, nhiệt độ gắn mồi là 61^{o}C. Đối với cặp mồi PIT1_F/R được sử dụng cho Lợn đen Định Hóa ở nhiệt độ 63^{o}C cũng nhân bản đặc hiệu được đoạn gen mong muốn, thu được một băng duy nhất, do đó việc lựa chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu với cặp mồi PIT1_F/R có thể dao động từ 61 – 63^{o}C.

Dựa vào kết quả thu được từ thí nghiệm tối ưu nhiệt độ gắn mồi của cặp PIT1_F/R, từ đó chọn nhiệt độ 63^{o}C để tiến hành phản ứng PCR nhân bản đoạn gen PIT1 ở Lợn đen Định Hóa

với 06 mẫu tai (BN01, PĐ01, PT01, PC01, QK01, TT01) đã được tách chiết từ 06 cá thể Lợn đen Định Hóa. Kết quả PCR được thể hiện trên hình 3.

Kết quả thu được 06/06 mẫu ADN nhân bản thành công đoạn gen PIT1 với kích thước khoảng 1745 bp, tương ứng với kích thước đoạn gen PIT1 đã tham khảo. Từ Hình 3A có thể thấy kết quả điện di ở cả 06 giếng đều cho các băng ADN rõ nét, không xuất hiện băng phụ và các băng có kích thước tương đồng, trong đó các giếng số 1, 2, 5, và 6 cho băng ADN sáng, rõ nét hơn so với giếng số 3 và số 4. Điều này cho thấy nồng độ ADN ở các mẫu BN01, PĐ01, QK01, và TT01 cao hơn so với mẫu PT01 và PC01. Từ đó có thể thấy cặp mồi được sử dụng là đặc hiệu và nhiệt độ bắt mồi đã được tối ưu hóa (63^{o}C) thu được sản phẩm PCR duy nhất có kích thước như dự kiến (1745 bp).



Hình 3. Kết quả nhân bản đoạn gen PIT1 ở các cá thể Lợn đen Định Hóa

(A): M: ADN marker 1kb, đ/c: mẫu đối chứng âm trong đó ADN được thay thế bằng H_2O, giếng 1 – 6 tương ứng với mẫu ADN của các mẫu BN01, PĐ01, PT01, PC01, QK01, TT01;(B): giếng 1: tinh sạch sản phẩm PCR từ mẫu T5, M: ADN marker 1kb.

Qua đó cho thấy: đã nhân bản thành công đoạn gen PIT1 ở 06 mẫu ADN đại diện cho các cá thể Lợn đen Định Hóa thu thập tại 06 xã trong địa bàn huyện Định Hóa, kích thước đoạn gen nhân bản khoảng 1745 bp. Kết quả này được áp dụng thành công cho tất cả 60 mẫu ADN tổng số tách từ 60 cá thể Lợn đen Định Hóa trong nghiên cứu để phục vụ cho nội dung nghiên cứu đa hình di truyền bằng kỹ thuật PCR-RFLP, đồng thời giải trình tự nucleotide của đoạn gen PIT1 ở Lợn đen Định Hóa. Sản phẩm PCR của mẫu số 5 (QK01) được lựa chọn để tinh sạch và giải trình tự nucleotide, kết quả tinh sạch sản phẩm PCR của mẫu QK01 được thể hiện trên hình 3B.

3.3. Trình tự nucleotide của đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa và xây dựng cây quan hệ di truyền với một số giống Lợn trên ngân hàng gen quốc tế

Sản phẩm PCR của mẫu QK01 được tinh sạch và gửi đi giải trình tự nucleotide. Mục đích của việc giải trình tự nucleotide đoạn gen PIT1 là để xác định mối quan hệ di truyền của giống Lợn đen Định Hóa với các giống Lợn khác đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế và xác định enzyme giới hạn thích hợp cho nghiên cứu

đa hình đoạn gen này bằng phương pháp PCR – RFLP, đồng thời đăng ký trình tự đoạn gen PIT1 lên ngân hàng gen quốc tế phục vụ đăng ký nhãn hiệu sản phẩm đặc quyền sau này.

So sánh kích thước tham khảo cặp mồi của Yu và cộng sự (1994) với khi phân tích trình tự gen thực tế bằng công cụ BioEdit đều thu được đoạn gen PIT1 với kích thước là 1745 bp. Từ đó, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự PIT1 với các trình tự đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI và xây dựng cây quan hệ di truyền.

Trình tự đoạn gen PIT1 được BLAST trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để xác định các trình tự tương đồng. Kết quả cho thấy có 100 trình tự tương đồng với đoạn gen PIT1 của mẫu QK01 (ký hiệu là T5 trong hình 4). Từ đó lựa chọn 03 trình tự có độ tương đồng cao nhất với trình tự PIT1 để so sánh và xây dựng cây quan hệ di truyền được thể hiện trên bảng 2.

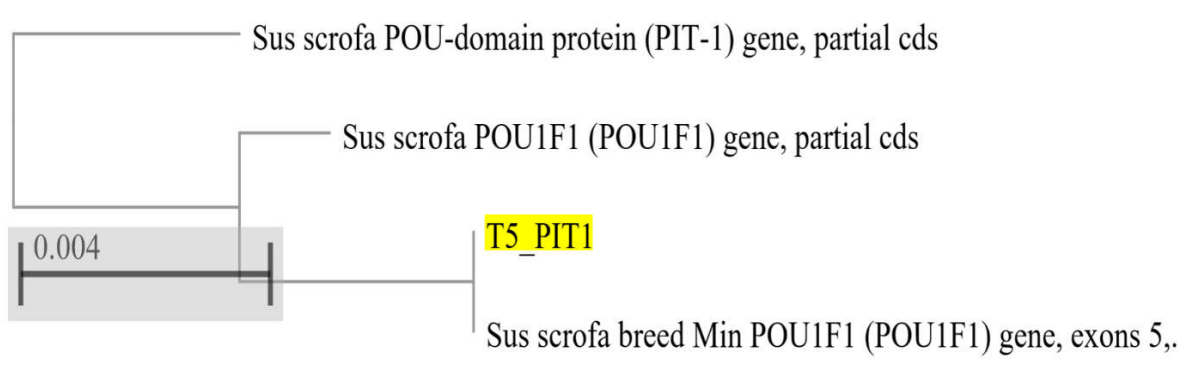
Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa với các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI

STT	Tên trình tự	Mã số trên ngân hàng gen quốc tế	Tỷ lệ tương đồng
1	*Sus scrofa* breed Min POU1F1 gene, exons 5, 6	DQ485155.1	100,00%
2	*Sus scrofa* POU1F1 gene	AH015830.2	99,14%
3	*Sus scrofa* POU – domain protein (PIT1) gene	U00793.1	98,46%

Trình tự đoạn gen PIT1 của giống Lợn đen Định Hóa có tỷ lệ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen PIT1 (Sus scrofa DQ485155.1) của một giống Lợn có xuất xứ tại Trung Quốc, tương đồng 99,14% với một giống Lợn khác tại Trung Quốc (mã số Genbank AH015830.2) , và tương đồng 98,46% với một giống Lợn tại Mỹ (mã số Genbank U00793.1) (Bảng 2). Kết quả này khẳng định chúng tôi đã nhân bản thành công đoạn gen PIT1 của giống Lợn đen Định Hóa và trình tự đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa tương đồng rất cao với các giống lợn có xuất xứ tại Trung Quốc và Mỹ.

Sự sai khác về trình tự nucleotide của đoạn gen PIT1 ở Lợn đen Định Hóa so với 02 trình tự trên ngân hàng gen quốc tế có thể do sự ảnh hưởng môi trường, ở các vùng địa lí với điều kiện sinh thái khác nhau, trong quá trình tiến hóa sẽ xuất hiện sự sai khác ở một hay một vài vị trí nucleotide dẫn đến sự sai khác nhỏ về tỷ lệ tương đồng. Trình tự đoạn gen PIT1 của giống Lợn đen Định Hóa đã được đăng ký bản quyền lên ngân hàng gen quốc tế (NCBI) với mã số MW167783.

Dựa trên kết quả so sánh trình tự đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa với 03 trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI, chúng tôi tiến hành xây dựng cây quan hệ di truyền giữa 04 trình tự dựa trên kiểu phân nhóm NJ trên NCBI. Các mẫu có hệ số tương đồng di truyền cao sẽ được xếp thành một nhóm, giữa các nhóm có sự liên hệ với nhau (Hình 4).



Hình 4. Kết quả cây quan hệ di truyền giữa Lợn đen Định Hóa và 03 loài trên ngân hàng gen quốc tế NCBI

Kết quả phân tích cho thấy biểu đồ hình cây từ 04 trình tự được chia thành 2 nhóm chính, trong đó trình tự đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa cùng nhóm với 02 trình tự có mã số là DQ485155.1 và AH015830.2 và cả hai trình tự này đều là các giống Lợn xuất xứ từ Trung Quốc; còn trình tự có mã số U00793.1 (giống Lợn xuất xứ từ Mỹ) tách riêng thành một nhóm. Qua đó, chúng tôi nhận thấy trình tự đoạn gen PIT1 của Lợn đen Định Hóa có sự tương đồng rất cao với trình tự đoạn gen PIT1 của hai giống lợn tại Trung Quốc và tương đồng cao với giống lợn tại Mỹ. Điều này cho thấy có thể giống Lợn đen Định Hóa và Lợn đen Trung Quốc có thể có cùng nguồn gốc và trình tự đoạn gen PIT1 ở lợn là tương đối bảo thủ, xảy ra ít sự biến đổi về trình tự nucleotide.

3.4. Đa hình Gen PIT1 và mối tương quan với tính trạng tương ứng

Áp dụng quy trình của Yu và cộng sự (1994) là sử dụng enzyme *Rsa*I để nghiên cứu kiểu gen của gen PIT1 ở giống Lợn đen Định Hóa. Sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen PIT1 của 60 mẫu ADN tách từ 60 cá thể Lợn đen Định Hóa được cắt bằng enzyme *Rsa*I, các kiểu gen được quy định dựa trên các băng ADN thu được sau khi cắt enzyme *Rsa*I bao gồm: kiểu gen AA (tương ứng với băng ADN có kích thước 710 bp), kiểu gen AB (tương ứng với 3 băng ADN có kích thước lần lượt là 710 bp, 388 bp, 322 bp), kiểu gen BB (tương ứng với 2 băng ADN có kích thước 388 bp và 322 bp), trong cả ba kiểu gen đều có 3 băng ADN với kích thước 774 bp, 153 bp và 108 bp. Kết quả thống kê kiểu gen PIT1-*Rsa*I của quần thể Lợn đen Định Hóa được thể hiện ở bảng 3. Kiểu gen AA có tần số là 0,58; kiểu gen AB có tần số là 0,35; kiểu gen BB rất hiếm trong quần thể và chỉ chiếm 0,067. Tần số của alen A là 0,76 và alen B là 0,24. Kết quả kiểm tra giữa tần số thực tế và tần số kỳ vọng của kiểu gen PIT1-*Rsa*I bằng phép kiểm đinh chi bình phương (χ^2) cho thấy tần số kiểu gen và tần số alen PIT1-*Rsa*I ở trạng thái cân bằng theo định luật Hardy-Weinberg.

Bảng 3. Tần số kiểu gen và tần số alen của gen PIT1 được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP với enzyme RsaI

Địa điểm lấy mẫu	Kiểu gen			Alen	
	AA	AB	BB	A	B
Bộc nhiêu	6	4	0	16	4
Phú Đình	7	2	1	16	4
Phượng Tiến	6	2	2	14	6
Phúc Chu	4	5	1	13	7
Quy Kỳ	7	3	0	17	3
Tân Thịnh	5	5	0	15	5
Tổng	**35**	**21**	**4**	**91**	**29**
Tần suất	**0,58**	**0,35**	**0,067**	**0,76**	**0,24**

Gen PIT1 có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của lợn do gen này có liên quan đến mức độ tuần hoàn hoocmon sinh trưởng trong máu, thông qua mối tương quan dương giữa PIT1-alpha mARN và nồng độ hoocmon sinh trưởng trong huyết tương (Stancekova et al., 1999). Với kết quả phân tích mối tương quan của kiểu gen PIT1 với trọng lượng cá thể Lợn đen trong quần thể Lợn đen Định Hóa như ở bảng 4 cho thấy: kiểu gen AA có trọng lượng cao hơn so với kiểu gen AB, còn kiểu gen BB xuất hiện với tần suất rất thấp và cũng có trọng lượng thấp hơn so với kiểu gen AA. Qua đó có thể kết luận rằng nhóm kiểu gen AA có tác động tích cực đến trọng lượng cơ thể của Lợn đen Định Hóa và do đó alen A ảnh hưởng dương tính lên tính trạng trọng lượng của lợn. Kết quả này phù hợp với kết luận của Brunsch và cộng sự (2002), cho rằng allele A có đóng góp dương trên tất cả các chỉ số về đặc điểm thịt-thân thịt, khối lượng mỡ và đặc điểm

hình thái khảo sát, khi đàn heo Pietrain x đực European Wild có kiểu gene AB cho các chỉ số tính trạng nêu trên cao hơn so với kiểu gen BB. Quần thể Lợn đen Định Hóa cũng có đủ các kiểu gen như đã được công bố bởi Yu và cộng sự (1995) về gen PIT1 cắt bởi enzyme *Rsa*I.

Bảng 4. Trọng lượng của Lợn đen Định Hóa có các kiểu gen PIT1-RsaI khác nhau

Các chỉ tiêu	Kiểu gen PIT1-*Rsa*I		
	AA	AB	BB
Số lượng mẫu	35	21	4
Trọng lượng trung bình (kg)	51,17	45,43	38,50

4. KẾT LUẬN

- Đã phân lập, giải trình tự và đăng ký thành công trình tự nucleotide đoạn gen PIT1 của giống Lợn đen Định Hóa tỉnh Thái Nguyên lên ngân hàng gen quốc tế với mã số MW167783.

- Phân tích đa dạng di truyền của gen PIT1 ở giống Lợn đen Định Hóa cho thấy: Đối với gen PIT1-*Rsa*I có 03 kiểu gen: AA có tần số là 0,58, AB có tần số là 0,35, BB rất hiếm trong quần thể và chỉ chiếm 0,067. Tần số của alen A là 0,76 và alen B là 0,24. Trong đó, kiểu gen AA cho thấy trọng lượng trung bình của cá thể cao hơn so với kiểu gen AB và BB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Lệ Hằng, Lê Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Thị Thu (2013) Ảnh hưởng của đa hình gen PIT1 đến tính trạng năng suất của gà tàu vàng. *Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, số 6: 8-15.

2. Lê Thị Thuý, Nguyễn Văn Hậu, Eiji Kobayshi, Mitsuzu Minezawwa. (1999) Phân tích sự sai khác di truyền trong các giống lợn nuôi tại Việt nam bằng kỹ thuật di truyền phân tử PCR - RFLP. *Thông tin khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, Thông tin Viện chăn nuôi, 1999.

3. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet*. 32: 314 - 331.

4. Brunsch C., Sternstein I., Reinecke P., Bieniek J. (2002) Analysis of associations of PIT1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs. *Journal of Applied Genetics* 43 (1): 85-91.

5. Franco MM., Antunes RC., Silva HD., Goulart LR., (2005) Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. *Journal of Applied Genetics* 46 (2): 195-200.

6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294-299.

7. Hall TA. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

8. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

9. Nie QH., Fang MX., Xie L., Zhou M., Liang ZM., Luo ZP., Wang GH., Bi WS., Liang CJ., Zhang W., Zhang XQ (2008) The PIT1 gene polymorphisms were associated with chiken growth traits. *BMC Genetic* 9: 20-24.

10. Pierzchala M., Blicharski T. and Kuryl J. (2003) Growth rate and carcass quality in pigs as related to genotype at loci POU1F1/*Rsa*I (PIT1/*Rsa*I) and GHRH/*Alu*I. *Animal Science Papers and Reports* 21 (3): 159-166.

11. Renaville R., Gengler N., Parmentier I. (1997) PIT – 1 gene HinfI RFLP and growth traits in double – muscled Belgian Blue cattle. *Journal of Animal Science* 75.

12. Song CY., Gao B., Teng Y., Wang XY. (2005) MspI polymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their associations with growth performance. *Journal of Applied Genetics* 46: 285 – 289.

13. Song CY., Gao B., Teng SH., Wang XY., Xie F., Chen GH., Wang ZY., Jing RB., Mao JD. (2007) Polymorphisms in intron 1 of the porcine POU1F1 gene. *Journal of Applied Genetics* 48 (4): 371-374.

14. Stancekova K., Vasicek D., Peskovicova D., Bulla J., Kubek A. (1999) Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (PIT-1) on carcas traits in pigs. *Animal Genetics* 30 (4): 313-315.

15. Yu TP., Schmitz CB., Rothschild MF., Tuggle CK. (1994) Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine PIT – 1 gene. *Animal Genetics* 25 (4): 229-233.

16. Yu TP., Tuggle CK., Schmitz CB., Rothschild MF. (1995) Association of PIT1 Polymorphisms with Growth and Carcass Traits in pigs. *Journal of Animal Science* 73 (5): 1282-1288.

GENETIC POLYMORPHIMSM ANALYSIS OF PIT1 (POU1F1) GENE IN DINH HOA BLACK PIGS IN THAI NGUYEN PROVINCE

Ha Bich Hong[1], Bui Van Thang[1], Nguyen Thi Van Anh[1], Nguyen Thi Bich Nga[2]
Tran Viet Vinh[2], Tran Thao Van[2], La Van Cong[3]
[1]Vietnam National University of Forestry
[2]Thao Van Agriculture Development Limited Liability Company
[3]Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

SUMMARY

Dinh Hoa black Pig variety of Thai Nguyen province is a breed of a small pig, with fragrant and delicious meat. This is also an endemic pig breed in Thai Nguyen province. However, because the Pigs are small and freely raised, the number of Dinh Hoa Black Pigs is significantly reduced, especially the thoroughbred black Pigs. For the purpose of managing, preserving and developing this endemic black Pig breed, we conducted research on genetic polymorphism analysis of PIT1 (POU1F1) gene from 60 tissue samples (ear tissue) of 60 individuals of Dinh Hoa black Pig, Thai Nguyen province. The results showed that the PIT1 gene fragment was successfully amplified in all studied black Pigs, the size of the fragment was 1745 bp, the PIT1 nucleotide sequence of Dinh Hoa black Pig was published on international gene bank with accession number MW167783. Besides, analysis of PIT1 gene polymorphism in Dinh Hoa black Pig population in Dinh Hoa district, Thai Nguyen province by PCR-RFLP method showed that for PIT1-*Rsa*I gene, there are 03 genotypes: AA with the highest frequency (58%), AB accounts for 35%, and BB is very rare in the population and accounts for only 6.7%. The frequency of allele A is 0.76 and allele B is 0.24. Among them, genotype AA showed a higher average weight of the individual than the genotypes AB and BB. This result initially assessed the correlation between the genotype of PIT1 gene with body weight traits. Dinh Hoa black Pig is a breed with high potential for productivity and the ability to expand the population when choosing mating pairs with the right genotype.

Key words: Dinh Hoa Black Pigs, genetic polymorphism, PCR-RFLP, *PIT*1.

Ngày nhận bài	**: 21/12/2020**
Ngày phản biện	**: 19/01/2021**
Ngày quyết định đăng	**: 01/02/2021**