

SỬ DỤNG MÃ VẠCH DNA ĐỂ ĐỊNH LOẠI LOÀI MÀN MÀN VÀNG (*Cleome viscosa* L.) Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thu Nga*, Sỹ Danh Thường, Cao Thị Phương Thảo
Trưởng Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Các loài thực vật thường được định danh dựa vào các đặc điểm hình thái của cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản nhờ vào mô tả gốc của loài, mẫu type chuẩn và khóa định loại. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp, mẫu vật thu được không đủ các đặc điểm hình thái để phân loại, bị hư hỏng một số bộ phận hoặc bị cắt nhỏ. Do vậy, việc định loại chính xác tên khoa học của loài gặp rất nhiều khó khăn, thậm chí là không thể. Trong những trường hợp này, mã vạch DNA đã giúp giải quyết vấn đề trên vì trình tự DNA dễ dàng thu nhận được từ một mẫu lá nhỏ. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng trình tự gen *matK* để định loại mẫu cây Màn màn vàng thu thập tại tỉnh Thái Nguyên.

Từ khóa: DNA barcoding, gen *matK*, giám định loài, mã vạch, Màn màn vàng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Có nhiều phương pháp nghiên cứu khác nhau trong phân loại và xác định loài ở động vật và thực vật. Hầu hết các phương pháp này đều dựa trên nguyên tắc: những loài chung nguồn gốc có những đặc điểm giống nhau, các loài càng gần nhau thì đặc điểm giống nhau càng nhiều. Sự giống nhau có thể về đặc điểm hình thái ngoài, giải phẫu, sinh lý sinh hoá, phôi sinh học. Đối với thực vật, các loài được nhận biết dựa vào hình thái của rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt... có ưu điểm dễ quan sát trực tiếp bằng trực quan nhưng chỉ dựa vào thống kê phân tích một hoặc nhiều tính trạng được thể hiện ra bên ngoài nên hiệu quả thấp. Điều này thật sự gặp nhiều khó khăn khi các mẫu vật cần giám định không còn nguyên vẹn, thiếu các đặc điểm hình thái quan trọng. Do vậy, việc định danh dựa trên phương pháp hình thái so sánh và kinh nghiệm dân gian sẽ được hỗ trợ chính xác hơn nếu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại [1], [2].

Các phương pháp phân loại học phân tử và xác định loài là hướng nghiên cứu được phát triển mạnh trên thế giới hiện nay, được xây dựng dựa trên việc nhận biết thành phần và cấu trúc của các gen đặc hữu của các taxon sinh vật. Hiện nay, các kỹ thuật dựa trên phân tích DNA là phương pháp có hiệu quả cao trong việc định loại và giám định loài [2].

Phân loại học phân tử có thể dựa trên sự nghiên cứu các gen trong hệ gen nhân, hệ gen của các bào quan như ty thể, lục lạp hoặc các sản phẩm của gen như protein, enzyme. Mỗi loại gen, sản phẩm của gen lại phù hợp với từng đối tượng và mục đích nghiên cứu khác nhau. Do đó, việc lựa chọn gen nào, loại protein nào có ý nghĩa lớn đối với sự thành công của mỗi hướng nghiên cứu [4], [5], [6]. Gần đây, việc sử dụng các DNA mã vạch (DNA barcode) để định danh loài đang được các nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu và có những đóng góp đáng kể trong việc phân loại loài. Để nhận dạng gen hay đánh giá mức độ tiến hoá loài thì các nhóm gen chính thường được sử dụng là gen ribosome rRNA, gen ty thể, và gen lục lạp (thực vật) [7].

Kỹ thuật DNA barcode (DNA mã vạch) dựa vào việc sử dụng một khu vực DNA (400 - 800 bp) như là một tiêu chuẩn để nhận dạng các loài một cách nhanh chóng và chính xác. Phương pháp này vô cùng có ý nghĩa trong trường hợp các mẫu vật sinh học cần giám định loài đã được qua xử lý, chế biến như các dạng chế phẩm thuốc hay thực phẩm đã chế biến... [6], [8].

DNA barcode không thể thay thế các phương pháp phân loại truyền thống, nhưng nó là công cụ hữu ích để tạo ra thông tin về đơn vị phân loại chưa biết. Hiện nay trên thế giới, kỹ thuật

* Tel. 0976.714982, Email: nguyenthuhung-a-kstnh@disptn.edu.vn

này đang được sử dụng chủ yếu bởi các nhà phân loại học và nhiều nhà khoa học ở các lĩnh vực khác như khảo cổ học, công nghiệp sinh học, chế biến thực phẩm,... [5], [7], [8].

Cùng với sự phát triển của thị trường thảo dược, sự già mao các nguyên liệu thuốc thảo dược trở thành vấn đề toàn cầu [6], [7]. Việc nhận biết các nguyên liệu thảo dược sử dụng phương pháp mã vạch DNA có thể bảo vệ người dùng tránh khỏi tác dụng độc hại của các loại thuốc giả mao, đặc biệt trong nhiều trường hợp có thể nguy hiểm đến tính mạng [6].

Trong số các gen lục lạp, *matK* là một trong những gen tiến hoá nhanh nhất, có kích thước khoảng 1550 bp và mã hóa cho enzyme maturase liên quan đến quá trình phiên mã RNA. Do *matK* tiến hoá nhanh và có mặt hầu hết trong thực vật nên đã được sử dụng như một chỉ thị trong nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài và phát sinh loài ở thực vật. CBOL đã thử nghiệm *matK* trên gần 550 loài thực vật và thấy rằng 90% mẫu thực vật hạt kín dễ dàng khuếch đại trình tự bằng cách sử dụng một cặp mồi đơn và đề nghị sử dụng *matK* là một trong những locus barcode chuẩn cho thực vật [3], [8], [9].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng trình tự gen *matK* để định loại mẫu Mần mần Vàng thu thập tại xã Linh Sơn, huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá non của loài Mần mần vàng được thu thập tại xã Linh Sơn, huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên. Mẫu sau khi được lấy cho vào túi bóng miết với lượng silicagel vừa đủ để hút ẩm và bảo quản mẫu. Ký hiệu mẫu sử dụng trong nghiên cứu là KSTN27.

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được đặt từ các hãng uy tín đảm bảo về chất lượng và độ tin cậy như Qiagen, Fermentas, Sigma,...

Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Các thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm: Căn điện tử Satorius (Thụy Sĩ), bể ổn nhiệt, máy đo quang phổ, máy đo pH, máy li tâm, máy PCR, máy giải trình tự.

Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Cặp mồi được sử dụng để nhân bản đoạn gen đích là gen *matK*, trình tự và thông tin về cặp mồi được thể hiện ở bảng 1.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu Mần mần vàng được tách chiết DNA tổng số bằng kit DNeasy® Plant Mini Kit của hãng Qiagen.

Kiểm tra sản phẩm DNA sau tách chiết

DNA tổng số sau khi tách chiết được điện di trên gel agarose 0,8%, trong đệm TBE 1X, ở hiệu điện thế 90 V với marker 1 kb. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra qua phương pháp đo mật độ quang phổ hấp phụ bước sóng 260 và 280 nm. Mỗi mẫu đo ba lần và giá trị trung bình của ba lần đo được lấy làm kết quả cuối cùng. Độ tinh sạch của mẫu thể hiện qua thông số A260/280 (A260/280=1,6 - 2,0 được coi là mẫu tinh sạch).

Phương pháp nhân gen bằng kỹ thuật PCR

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR 9700. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: master mix (2X) - 7,5 µl, mồi xuôi (10 pmol/µl) - 0,5 µl, mồi ngược (10 pmol/µl) - 0,5 µl, DNA khuôn (10 ng/µl) - 0,5 µl, H₂O - 6 µl. Tổng thể tích phản ứng là 15 µl.

Bảng 1. Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước dự kiến đoạn gen <i>matK</i>
matK-F	5'- CGATCTATTCATTCAATATTTTC-3'	60 °C	800 bp
matK-R	5'- TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'		

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR nhân gen *matK*: 98 °C/2 phút; lặp lại 35 chu kì với (98°C/10 giây, 60°C/15 giây, 68°C/60 giây); 72°C/10 phút và giữ ở 4°C.

Trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự gen được phân tích, so sánh và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình Bioedit và DNASTar.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Kết quả tách chiết DNA tổng số và khuếch đại đoạn gen nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR

Từ nguồn mẫu cây Mần mần vàng thu thập được, chúng tôi đã tách chiết thành công DNA. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số của mẫu Mần mần vàng nghiên cứu

Sau khi tách chiết DNA, chúng tôi kiểm tra chất lượng sản phẩm tách chiết bằng phương pháp điện di và đo quang phổ hấp phụ. Kết quả sau khi điện di trên gel agarose 0,8%

(hình1) cho thấy, DNA thu được sau khi tách có chất lượng tốt, DNA không bị đứt gãy, băng sáng rõ. Quang phổ hấp phụ OD A260/280 của mẫu KSTN27 đạt 1,89. Như vậy mẫu DNA thu được đảm bảo độ tinh sạch cho các nghiên cứu tiếp theo.

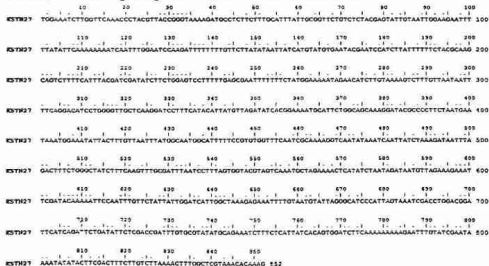
Chúng tôi đã khuếch đại thành công đoạn gen nghiên cứu với cặp mồi *matK-F*; *matK-R*, nhiệt độ bắt cặp mồi đặc hiệu ở 60°C. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR được trình bày trên hình 2. Kết quả khuếch đại đoạn gen với cặp mồi *matK-F*; *matK-R* cho thấy, trên hình ảnh điện di chỉ xuất hiện một băng sản phẩm với kích thước tính toán như dự đoán (khoảng hơn 800 bp).



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen *matK* của mẫu KSTN27 trên gel agarose 1%. M⁺ marker 1kb

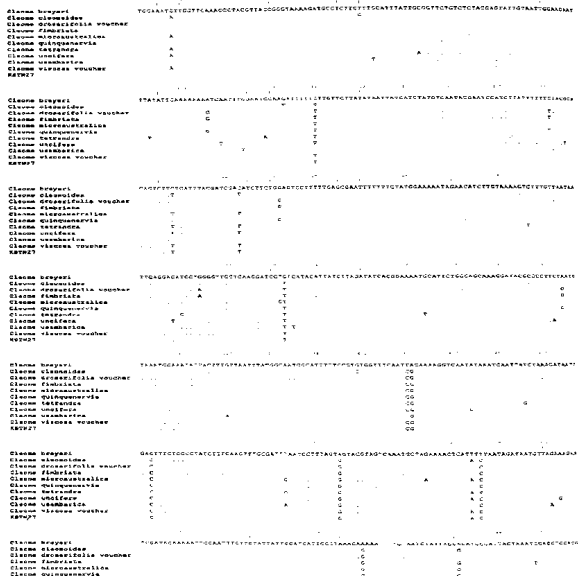
Giải trình tự đoạn gen thu được từ phản ứng PCR

Sản phẩm thu được từ phản ứng khuếch đại được chúng tôi gửi đọc trình tự trực tiếp. Kết quả giải trình tự trình bày trong hình 3. Kết quả giải trình tự cho thấy, đoạn gen *matK* phân lập được từ mẫu KSTN27 có chiều dài 852 nucleotide.



Hình 3. Kết quả giải trình tự gen *matK* mẫu KSTN27

So sánh trình tự gen thu được từ mẫu KSTN27 với các trình tự gen matK trên ngân hàng gen thế giới (Genbank)



Hình 4. Kết quả so sánh trình tự gen matK của mẫu KSTN27 với 10 trình tự trên Genbank

Nhằm kết luận chính xác trình tự gen thu được thuộc nhóm gen matK (tên cùng đối tượng nghiên cứu thuộc chi Mãn mãn), chúng tôi tiến hành so sánh với các trình tự đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế. Sự dung phân mềm Bioedit để xử lý, chúng tôi thu được kết quả trình bày trong hình 4

Kết quả phân tích và so sánh cho thấy, trình tự thu được trong nghiên cứu có độ tương đồng cao với các trình tự gen matK thuộc chi Mãn mãn đã được công bố trên ngân hàng

gen quốc tế. Qua quan sát trên hình phân tích, trình tự thu được từ mẫu KSTN27 có ít sự sai khác nhất (gần gũi nhất) với trình tự gen matK từ mẫu Cleome viscosa voucher trên Genbank. Sự sai khác chi quan sát thấy tại vị trí nucleotide 852, tại đây mẫu KSTN27 là nucleotide loại G, trình tự từ mẫu Cleome viscosa voucher là nucleotide loại A. Điều này phù hợp với kết quả so sánh bằng phần mềm blast trên Genbank với độ tương đồng là 99%, giữa 2 trình tự này. Qua kết quả thu được, chúng tôi kết luận trình tự gen thu được

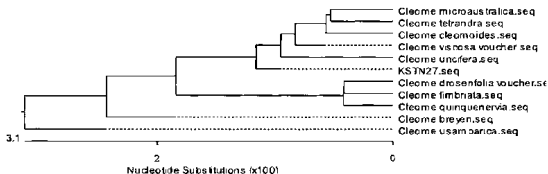
nữ mẫu KSTN27 là trình tự gen *matK*, dựa trên các nghiên cứu đã công bố, chi Mần mần đã được định loại bằng chi thị barcode này.

So sánh trình tự DNA vùng gen *matK* của mẫu nghiên cứu (KSTN27) cùng với 10 trình tự DNA vùng gen *matK* của các loài (thuộc chi *Cleome* đã được công bố trên GenBank bằng phần mềm Bioedit cho thấy, chiều dài đoạn gen *matK* giữa các loài dao động từ 800 đến 1500 bp, GC trong vùng này dao động trong khoảng từ 31,57% đến 32,16%, có 4 điểm sai khác giữa mẫu nghiên cứu với các loài đem so sánh, chiếm 0,47% trên toàn bộ trình tự. Tại đây xảy ra các biến đổi như thay thế một hoặc một vài nucleotide. Vùng từ nucleotide 10 đến 100; 140 đến 1180; 723 đến 838 trên trình tự gen mẫu KSTN27 là các vùng bảo thủ

cao, với sự biến đổi rất ít trong trình tự ở tất cả các loài, điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó [3], [6], [7].

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Dựa trên bảng kết quả phân tích về mối quan hệ di truyền và cây chủng loại phát sinh cho thấy, mẫu nghiên cứu KSTN27 nằm cùng nhánh gần hơn với *Cleome uncifera* và *Cleome viscosa*, nằm xa hơn một chút với nhánh *Cleome cleomoides*, *Cleome tetrandra* và *Cleome microaustratica*, và nằm tách biệt với các nhánh còn lại. Điều này phù hợp với kết quả phân tích tính đa dạng trong trình tự vùng gen *matK*. Sự tương đồng về di truyền trong trình tự nucleotide đạt cao nhất là 99,8% giữa mẫu KSTN27 và trình tự của mẫu *Cleome viscosa* voucher.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại xây dựng bằng phần mềm DNASTar

KẾT LUẬN

1. Đã khuếch đại thành công vùng gen *matK* của mẫu KSTN27. Kết quả phân tích sơ bộ hình vùng gen *matK* ở mẫu KSTN27 có kích thước 852 nucleotide.

2. Từ kết quả so sánh và phân tích trình tự DNA vùng gen *matK* có thể tạm xác định mẫu nghiên cứu (KSTN27) thuộc loài *Cleome viscosa*.

3. Đã xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên phần mềm DNASTar trên khung đọc gen *matK* và xác định mẫu nghiên cứu thuộc loài *Cleome viscosa*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.03-2015.20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trần Thị Việt Thanh, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu, Phan Kế Long (2015), "Sử dụng mã vạch DNA trong việc định loại cá biển tại bảo tàng thiên nhiên Việt Nam", *Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái & Tài nguyên Sinh vật lần thứ 6*, tr. 855 - 864.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., Ward J. R (2003), "Biological identifications through DNA barcodes", *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, pp. 313-321.
- Hilu K. W., L. H. (1997), "The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics", *American Journal of Botany*, 84, pp. 830-839.
- Hollingsworth P. M., Little D. P. (2011), "Choosing and using a Plant DNA Barcode", *PLoS ONE*, 6(5), pp. 1 - 11.
- Kress W. J., Erickson D. L. (2008), "DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics", *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(8), pp. 2761-2762.

6. Li M., Cao H., But P. P. H., and Shaw P. C. (2011), "Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes", *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), pp. 271-283.
7. Mark Y. S., H. P. D. N. (2008), "Barcode of life", *Scientific American*, 299, pp. 82-88.
8. Vijayan K. and Tsou C. H. (2010), "DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective", *Current science*, 99, pp. 1530-1540.
9. Yong H. L., Jinlan R., Shilin C. (2010) "Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique", *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), pp. 2706 - 2709.

SUMMARY

USING *matK* DNA BARCODES TO IDENTIFY *Cleome viscosa* L. IN VIETNAM

Nguyễn Thị Thu Nga*, Sy Danh Thuong, Cao Thị Phương Thảo
University of Education – TNU

Plants are usually identified based on morphological characteristics of vegetative and reproductive organs by original description, type and key. However, in many cases, collected specimens have not enough morphological characteristics, are damaged or chopped into several parts, so they cannot be identified. Therefore, the exact identification of the scientific names encountered many difficulties, even impossible. In these cases, the DNA barcoding has helped to solve problems because DNA sequences can be acquired easily from a small leaf sample. In this paper, we present results using the gene sequence *matK* to identify sample of *Cleome viscosa* collected in Thai Nguyen province.

Keywords: *barcodes, Cleome viscosa, DNA barcoding, matK genes, species identification.*

Ngày nhận bài: 17/02/2017; Ngày phản biên: 02/3/2017; Ngày duyệt đăng: 27/4/2017

* Tel 0976.714982, Email: nguyenthunga-ksinh@dhsptn.edu.vn