VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

****

NGUYỄN THỊ HOA

XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH NUCLEOTIDE ĐƠN (SNP) CÓ KHẢ NĂNG LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH TRẠNG TĂNG TRƯỞNG Ở CÁ TRA *PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS.*

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội – 2018

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

****

NGUYỄN THỊ HOA

XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH NUCLEOTIDE ĐƠN (SNP) CÓ KHẢ NĂNG LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH TRẠNG TĂNG TRƯỞNG Ở CÁ TRA *PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS.*

Chuyên ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
TS. KIM THỊ PHƯƠNG OANH

Hà Nội – 2018

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn phòng Đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã tạo điều kiện cho tôi học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến TS. Kim Thị Phương Oanh, trưởng phòng Hệ gen học môi trường, Viện Nghiên cứu hệ Gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã dành nhiều thời gian, tâm huyết, tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự quan tâm, giúp đỡ nhiệt tình của tập thể cán bộ Phòng Hệ gen học môi trường – Viện Nghiên cứu hệ Gen tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè và tập thể lớp Cao học K20 đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Hà Nội, ngày ..... tháng ..... năm 2018

Học viên

Nguyễn Thị Hoa

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này hoàn toàn được trình bày dựa trên kết quả nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn chuyên môn của TS. Kim Thị Phương Oanh, trưởng phòng Hệ gen học môi trường, Viện Nghiên cứu hệ Gen, cùng với sự giúp đỡ kỹ thuật của các cán bộ trong phòng Hệ gen học môi trường. Các số liệu hình ảnh, kết quả được trình bày, trong luận văn này là trung thực, không sao chép bất cứ tài liệu, công trình nghiên cứu của người khác mà không chỉ rõ nguồn tham khảo. Tôi xin chịu trách nhiệm về lời cam đoan của mình trước hội đồng.

Hà Nội, ngày… tháng… năm 2018

Học viên

Nguyễn Thị Hoa

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN ..... **i**
LỜI CAM ĐOAN ..... **ii**
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT ..... **v**
MỞ ĐẦU **1**
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU **3**
1.1. Đặc điểm sinh học và giá trị kinh tế của cá tra 3
1.1.1. Đặc điểm sinh học 3
1.1.2. Giá trị kinh tế của cá tra 4
1.2. Tình hình nghiên cứu về SNP marker trong thủy sản trên thế giới 5
1.3. Tình hình nghiên cứu về cá tra ở Việt Nam 7
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP **10**
2.1. Nguyên vật liệu 10
2.1.1. Thu thập mẫu cá tra 10
2.1.2. Các cặp mồi nhân các vùng trình tự có chứa SNP marker 10
2.1.3. Hóa chất thí nghiệm 11
2.1.4. Thiết bị, dụng cụ thí nghiệm 12
2.2. Phương pháp 12
2.2.1. Tách chiết DNA tổng số 12
2.2.2. Khuếch đại các vùng trình tự bằng phương pháp PCR 13
2.2.3. Xác định SNP bằng phương pháp Single Base Extension (SNapShot Multiplex Kit). 14
2.2.4. Thiết kế mồi SBE (Single Base Extension) 16
2.2.5. Thu thập dữ liệu và đánh giá 22
2.2.6. Phân tích số liệu trên quần thể 23
3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số 25
3.2. Kết quả khuếch đại các đoạn trình tự chứa SNP 26
3.3. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR 26
3.4. Kết quả điện di mao quản bộ mẫu chuẩn 27
3.5. Thiết lập 11 Binset cho 11 nhóm mẫu 29
3.6. Kết quả chạy Binset cho các sản phẩm SNapShot của 11 nhóm 33
3.7. Kết quả thống kê và tính xác suất theo thành phần kiểu gen và tần số alen tại các vị trí SNP cần kiểm nghiệm trên hai nhóm cá tra sinh trưởng nhanh và sinh trưởng chậm 35

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 41

4.1. Kết luận 41

4.2. Kiến nghị 41

TÀI LIỆU THAM KHẢO 42

PHỤ LỤC 1: Danh sách 96 mẫu cá tra (gồm 48 mẫu STN và 48 mẫu STC) 1

PHỤ LỤC 2: Danh sách các cặp mồi nhân đoạn trình tự DNA chứa SNP. 3

PHỤ LỤC 3: Kết quả tách chiết DNA tổng số của 96 mẫu cá tra (gồm 48 mẫu sinh trưởng nhanh và 48 mẫu sinh trưởng chậm 9

PHỤ LỤC 4: Kết quả đo nồng độ DNA tổng số 96 mẫu cá tra sinh trưởng nhanh và chậm 10

PHỤ LỤC 5: Kết quả PCR khuếch đại các vùng trình tự có chứa SNP 12

PHỤ LỤC 6: Danh sách 11 nhóm mồi SBE 14

PHỤ LỤC 7: Kết quả chạy điện di mao quản của 11 nhóm 100

PHỤ LỤC 8: Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR của 11 nhóm mẫu 107

PHỤ LỤC 9 100

Các chỉ số về thành phần kiểu gen và tần số alen của 84 SNP (thuộc 11 nhóm) của nhóm cá tra sinh trưởng nhanh và nhóm cá tra sinh trưởng chậm (NN:kí hiệu cho kiểu gen chưa được xác định rõ do kỹ thuật) 100

phụ 103

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Từ đầy đủ
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Complementary DNA
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
EBV	Estimates of breeding value – Giá trị chọn giống của tính trạng
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên Hợp Quốc
FET	Fisher Exact Test
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymer Chain Reaction
RAPD	Random – Amplified Polymorphic DNA
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBE	Single Base Extension
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UTR	Unified Genotyper

DANH MỤC HÌNH

Hình 1: Sơ đồ tổng quát các bước tiến hành thí nghiệm 12

Hình 2: Sơ đồ minh họa chu trình nhiệt 14

Hình 3: Hình ảnh minh họa quá trình thực hiện thí nghiệm SBE sử dụng SNapShot [38]..... 16

Hình 4: Sơ đồ quy trình xử lý thiết kế mồi SBE 17

Hình 5: Sơ đồ minh họa chu trình nhiệt trong phản ứng SNapShot..... 20

Hình 6: Kết quả điện di mẫu DNA tổng số trên gel agarose 0,8% một số mẫu đại diện 25

Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm PCR của một mồi đại diện trên gel agarose 0.8% 26

Hình 8: Kết quả điện di tinh sạch của đại diện một nhóm mẫu trên gel Agarose 0.8%..... 27

Hình 9: Kết quả điện di mao quản bộ mẫu chuẩn 6 sản phẩm trên hệ thống phân tích ABI 3500 28

Hình 10: Kết quả điện di mao quản của một nhóm mẫu đại diện G1 34

Hình 11: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G2 của 9 mồi SBE (S024, S089, SV14, S037, S125, S013, S105, S079 và S006) từ một mẫu cá tra sinh trưởng nhanh: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 75, 70, 65, 53, 48, 42, 36, 30 và 24 nucleotide 100

Hình 12: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G3 của 9 mồi SBE (SV12, S004, S067, S127, S097, S082, S017, S030, S038) từ một mẫu cá tra sinh trưởng nhanh: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 78,72, 61, 55, 50, 44, 38, 31 và 24 nucleotide..... 101

Hình 13: Binset G4 gồm 10 mồi SBE (S048, S122, S113, S056, S077, S039, S012, S047, S076 và S046) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 76, 71, 66, 61, 55, 49, 43, 37, 31 và 24 nucleotide..... 101

Hình 14: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G5 của 10 mồi SBE (S005, S034, SV06, SV03, S114, S109, SV08, SV04, S078 và S098) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 77,71, 65, 59, 53, 47, 41, 36, 30 và 24..... 102

Hình 15: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G6 của 8 mồi SBE (S081, S008, SV15, S058, SV13, S011, S063 và S124) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 64, 58, 53, 47, 42, 37, 30 và 24 nucleotide..... 103

Hình 16: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G7 của 6 mồi SBE (S100, S095, S020, S086, S001 và S042) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 53, 47, 42, 237, 31 và 24 nucleotide 103

Hình 17: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G8 của 7 mồi SBE (S090_4109, S033_1077, S090_3990, S060, S033_992, S044 và S036) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 59, 54, 48, 42, 36, 30 và 24 nucleotide 104

Hình 18: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G9 của 7 mồi SBE (S085, SV07, S126, S053, S118, S019 và S071) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 58, 52, 47, 42, 37, 31 và 24 nucleotide..... 105

Hình 19: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G10 của 7 mồi SBE (SV02, S066, SV05, S121, S066, SV10 và SV16) từ một mẫu cá tra sinh trưởng nhanh: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 69, 62, 55, 48, 41, 33 và 25 nucleotide 105

Hình 20: Kết quả điện di mao quản nhóm sản phẩm SNapShot G11 của 6 mồi SBE (S029, S028, S070, S080, S099 và S096) từ một mẫu cá tra sinh trưởng chậm: kích thước sản phẩm thực tế lần lượt là 54, 48, 43, 38, 31 và 24 nucleotide 106

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1: Thông số kỹ thuật cài đặt mặc định cho kỹ thuật SNapShot trên hệ thống ABI 3500 ... 21

Bảng 2: Danh sách 6 mồi SBE trong bộ mồi chuẩn 22

Bảng 3: Bảng kết quả đo nồng độ DNA tổng số của một số mẫu đại diện 25

Bảng 4: Kết quả điện di mao quản đối với bộ sản phẩm chuẩn trên hệ thống phân tích ABI 3500 28

Bảng 5: Danh sách 11 bộ Binset cho 11 nhóm sản phẩm SNapShot 29

Bảng 6: Các SNP được lựa chọn với điều kiện xác suất (FET<0.01, FST ≥ 0.05) 38

Bảng 7: Chú giải chức năng transcript chứa 4 chỉ thị SNP và dự đoán ảnh hưởng của SNP 40

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Cá tra nuôi (*Pangasianodon hypophthalmus*), thuộc họ cá tra (*Pangasiidae*), bộ cá da trơn hay cá nheo (*Siluriformes*). Cá tra nuôi là một trong những loài cá đặc hữu của vùng lưu vực sông Mê Kông (Việt Nam, Thái Lan, Lào, Campuchia), có giá trị kinh tế lớn và được nuôi phổ biến ở vùng này và một số nước khác thuộc khu vực miền nam châu Á. Theo thống kê của FAO, Việt Nam là nước có sản lượng cá tra nuôi *Pangasianodon hypophthalmus* lớn nhất thế giới và xuất khẩu sang hơn 140 nước trên thế giới. Mặc dù xuất khẩu ra hàng trăm thị trường nhưng sản phẩm cá tra Việt Nam vẫn chưa có chỗ đứng bền vững. Một phần do chất lượng cá giống đầu vào chưa cao, tình hình dịch bệnh, thời tiết thất thường… dẫn đến hiệu quả sản xuất thấp, giá cả không ổn định, mặt khác, ngành hàng cá tra Việt Nam còn chịu sự cạnh tranh gay gắt khi mà một số nước khác đã và đang đẩy mạnh sản xuất loại thủy sản này. Do đó việc tìm ra giải pháp đột phá để nâng cao giá trị ngành hàng cá tra là yêu cầu cấp bách hiện nay. Việc phát triển và ứng dụng rộng rãi Công nghệ sinh học trong lĩnh vực thủy sản đang là hướng đi mà chính phủ, lãnh đạo các cấp các ngành liên quan cũng như các doanh nghiệp thủy sản đặc biệt quan tâm. Một trong những vấn đề cấp thiết và có ý nghĩa cực kỳ quan trọng đối với công tác giống là thông tin về đặc điểm cấu trúc phân tử của bộ gen (genome) của cá tra. Nghiên cứu genome sẽ cung cấp những thông tin chính xác nhất cho việc xác định các tính trạng quan trọng như tính kháng bệnh, tính chống chịu đối với điều kiện môi trường, các tính trạng liên quan đến năng suất, chất lượng sản phẩm cá tra. Để tạo tiền đề cho các nghiên cứu về hệ gen cá tra, góp phần cho công tác nghiên cứu và ứng dụng Công nghệ sinh học trong thủy sản, Viện Nghiên cứu hệ gen đã xây dựng và thực hiện đề tài nghiên cứu cấp nhà nước: "Phân tích hệ gen biểu hiện (exome + transcriptome) của cá tra nhằm phát triển chỉ thị phân tử phục vụ chọn giống cá tra theo hướng tăng trưởng" thuộc Chương trình phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong thủy sản của Bộ nông nghiệp và Phát triển nông thôn, do TS. Kim Thị Phương Oanh làm chủ nhiệm (thời gian thực hiện đề tài 8/2014 đến 4/2018). Dựa trên dữ liệu toàn bộ hệ gen (genome) và hệ gen biểu hiện