

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ  
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



**TRẦN TRUNG THÀNH**

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GEN CỦA TÔM SÚ  
(*PENAEUS MONODON*) SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP  
PHÂN TÍCH THƯ VIỆN cDNA/EST**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

**TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

**TS. KIM THỊ PHƯƠNG OANH**

Hà Nội - 12/2013

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>



## LỜI CẢM ƠN

*Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Kim Thị Phương Oanh, Trưởng phòng Hệ gen học Môi trường, Viện Nghiên cứu hệ gen, đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt thời gian qua.*

*Tôi xin cảm ơn tới PGS. TS. Nông Văn Hải, Trưởng phòng Hệ gen học người, Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen, đã tạo mọi điều kiện để tôi có thể hoàn thành khóa luận này.*

*Trong quá trình thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự chỉ bảo chuyên môn nhiệt tình của các cán bộ nghiên cứu tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình tới sự giúp đỡ quý báu đó.*

*Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến những người thân trong gia đình và bạn bè đã động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và làm việc vừa qua.*

*Xin chân thành cảm ơn!*

*Hà Nội, ngày tháng năm 2013*

**Trần Trung Thành**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan rằng số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và không trùng lặp với các đề tài khác. Tôi cũng xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ trong việc thực hiện đề tài đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đã được ghi rõ nguồn gốc.

**Ký tên**

**Trần Trung Thành**

## MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	I
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....	III
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	IV
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	V
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA TÔM SÚ .....	3
1.1.1. Vị trí phân loại và phân bố .....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học .....	3
1.1.2.1. Đặc điểm sinh trưởng và sinh sản .....	3
1.1.2.2. Chu kỳ sống.....	3
1.1.2.3. Tập tính dinh dưỡng.....	5
1.1.2.4. Điều kiện môi trường sống.....	5
1.2. TÌNH HÌNH NUÔI TRỒNG TÔM SÚ TRÊN THẾ GIỚI VÀ.....	6
VIỆT NAM.....	6
1.2.1. Diện tích, sản lượng của tôm trên thế giới và Việt Nam.....	6
1.2.2. Giá trị kinh tế của tôm sú.....	7
1.2.3. Những thách thức của nghề nuôi trồng tôm sú.....	9
1.2.3.1. Vấn đề dịch bệnh.....	9
1.2.3.2. Vấn đề chọn giống .....	11
1.2.3.3. Gia hóa tôm sú.....	13
1.3. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG NUÔI TRỒNG TÔM SÚ .....	17
1.3.1. Chẩn đoán và kiểm soát dịch bệnh .....	17
1.3.2. Phát triển các chỉ thị phân tử .....	19
1.3.3. Nghiên cứu chức năng của những gen liên quan tới một số tính trạng quan trọng .....	27
1.4. XU HƯỚNG PHÁT TRIỂN VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG NUÔI TRỒNG TÔM SÚ .....	33
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP .....	35
2.1. VẬT LIỆU .....	35
2.1.1. Thu thập mẫu .....	35
2.1.2. Hóa chất.....	35
2.1.3. Thiết bị.....	36
2.2. PHƯƠNG PHÁP .....	37
2.2.1. Tách chiết RNA tôm sú .....	39
2.2.2. Tinh sạch mRNA .....	40
2.2.3. Tạo thư viện cDNA/EST tôm sú từ các mô sử dụng plasmid vector với các vị trí tái tổ hợp đặc hiệu.....	43

2.2.3.1. Tổng hợp cDNA có chứa trình tự attB1 và attB2 (DNA recombination sites) ở hai đầu .....	43
2.2.3.2. Phân đoạn cDNA theo kích thước.....	46
2.2.3.3. Tinh sạch cDNA.....	48
2.2.3.4. Đưa cDNA vào vector (pDONR222) bằng phản ứng tái tổ hợp giữa các điểm attB và attP.....	49
2.2.3.5. Biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn .....	51
2.2.3.6. Kiểm tra thư viện cDNA/EST bằng phản ứng cắt enzyme giới hạn.....	52
2.2.4. Xác định trình tự cDNA/EST .....	54
2.2.5. Phương pháp phân tích dữ liệu trình tự .....	55
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	57
3.1. TÁCH CHIẾT RNA TỔNG SỐ TÔM SÚ.....	57
3.2. TẠO THƯ VIỆN cDNA/ EST .....	58
3.3. KIỂM TRA THƯ VIỆN cDNA/ EST BẰNG PHẢN ỨNG CẮT ENZYME GIỚI HẠN .....	59
3.3.1. Tách chiết plasmid tái tổ hợp.....	59
3.3.2. Cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn .....	60
3.3.3. Số liệu thống kê các thư viện cDNA/EST tôm sú đã tạo lập .....	62
3.4. GIẢI MÃ CÁC cDNA/EST TỪ CÁC THƯ VIỆN ĐÃ TẠO LẬP .....	63
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	80
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	81

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

aa	amino acid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Đa hình chiều dài đoạn DNA)
AHPNS	Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome
ddNTPs	Dideoxynucleoside triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	Dissolve oxygen
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	Early Mortality Syndrome
EST	Expressed sequence tag (Đoạn trình tự gen biểu hiện)
EtBr	Ethidium bromide
GAS	Gene Assisted Selection
GAV	Gill associated virus
HPV	Hepatopancreatic parvovirus
IHHNV	Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus
IMNV	Infectious meonecrosis virus
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
Mab	Monoclonal antibodies
MAS	Marker Assisted Selection
MBV	Monodon baculovirus
MCS	Multiple cloning site (Vùng cắt gắn đa vị trên vector)
mtDNA	Mitochondrial DNA (DNA ty thể)
OD	Optical Density (Mật độ quang học)
ORF	Open Reading Frame (Khung đọc mở)
Pab	Polyclonal antibodies
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
pH	Potential hydrogen
QTL	Quantitative trait locus
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends (khuếch đại các đầu 5' và 3' của cDNA)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Đa hình đoạn DNA được nhân ngẫu nhiên)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Đa hình chiều dài đoạn DNA cắt bằng enzyme giới hạn)
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR (PCR bằng enzyme phiên mã ngược)
SNP	Single-nucleotide polymorphism (Đa hình các nucleotide đơn)
WSSV	White spot syndrome virus (virus gây bệnh đốm trắng)
YHV	Yellow head virus (virus gây bệnh đầu vàng)

## DANH MỤC CÁC HÌNH

### Chương I

Hình 1. 1. Chu kỳ sống của tôm.....4

### Chương II

Hình 2. 1. Sơ đồ quy trình tạo ngân hàng cDNA tôm sử dụng plasmid vector với các vị trí tái tổ hợp đặc hiệu..... 38

Hình 2. 2. Dụng cụ nghiền mẫu (Homogenizer).....39

Hình 2. 3. Sơ đồ nguyên lý quá trình tinh sạch mRNA từ RNA tổng số..... 41

Hình 2. 4. Sơ đồ nguyên lý của quá trình tổng hợp cDNA.....43

Hình 2. 5. Đánh dấu đĩa thạch agarose 1% dùng để xác định nồng độ cDNA..... 48

Hình 2. 6. Bản đồ vector pDONR222.....50

Hình 2. 7. Nguyên lý của quá trình đưa cDNA vào vector pDONR222..... 50

Hình 2. 8. Sơ đồ phân tích dữ liệu trình tự nucleotide cDNA/EST..... 56

### Chương III

Hình 3. 1. Điện di đồ các mẫu RNA tổng số tách chiết từ các mô khác nhau.....57

Hình 3. 2. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn.....59

Hình 3. 3. Master plate.....59

Hình 3. 4. Một số hình ảnh điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp tác từ các dòng tế bào trong thư viện cDNA/EST tôm sú.....60

Hình 3. 5. Điện di đồ kiểm tra kích thước cDNA đã được đưa vào vector pDONR222 .....61

Hình 3. 6. Thống kê thành phần và phân loại các trình tự cDNA/EST .....75

Hình 3. 7. So sánh (alignment) trình tự amino acid của protein *antimicrobial peptide* ở tôm sú Việt Nam với trình tự đã công bố.....76

Hình 3. 8. So sánh (alignment) trình tự nucleotide gen *hemocyanin* của tôm sú Việt Nam với trình tự đã công bố .....77

Hình 3. 9. So sánh (alignment) trình tự amino acid của protein *hemocyanin* ở tôm sú Việt Nam với trình tự đã công bố .....78

Hình 3. 10. So sánh (alignment) trình tự amino acid của protein *c-type lectin* ở tôm sú Việt Nam với trình tự đã công bố.....79



## DANH MỤC CÁC BẢNG

### Chương I

Bảng 1. 1. Một số chương trình gia hóa tôm sú trên thế giới [63].....16

### Chương III

Bảng 3. 1. Các mẫu mô tôm sú sử dụng trong nghiên cứu .....57

Bảng 3. 2. Kết quả kiểm tra nồng độ một số mẫu RNA tổng số bằng phương pháp đo quang phổ (độ pha loãng 100 lần).....58

Bảng 3. 3. Bảng thống kê số lượng dòng tế bào phân tích ở các thư viện cDNA/EST từ các mẫu mô tôm sú.....62

Bảng 3. 4. Bảng phân tích kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng của các protein suy diễn (Kết quả BLASTP).....64

Bảng 3. 5. Bảng phân tích kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng của các trình tự EST (Kết quả BLASTN).....70

Bảng 3. 6. Chú giải chức năng các protein theo GO.....73

## MỞ ĐẦU

Tôm sú (*Penaeus monodon*) thuộc giống *Penaeus*, họ *Penaeidae* là loài có đặc điểm sinh trưởng nhanh, được nuôi rộng rãi nhất trên thế giới. Nghề nuôi tôm là một thế mạnh của thủy sản, các chuyên gia ngành thủy sản đánh giá, tôm sú là đối tượng xuất khẩu chủ lực ở nước ta. Duy trì sự ổn định của nghề nuôi tôm phụ thuộc rất nhiều vào nguồn tôm khỏe mạnh và sự kiểm soát dịch bệnh hiệu quả. Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành. Tuy nhiên, việc chọn và tạo giống tôm sú vẫn còn nhiều khó khăn, nguồn tôm giống chủ yếu là đánh bắt tự nhiên. Nền tảng cho các chương trình chọn giống là những nghiên cứu về gen và hệ gen. Nghiên cứu về hệ gen sẽ cung cấp những thông tin di truyền về các gen liên quan đến tính trạng sinh trưởng, sinh sản, kháng bệnh và chống chịu với các điều kiện tự nhiên. Có nhiều phương pháp nhằm tiếp cận nghiên cứu hệ gen tôm sú trong đó, phương pháp phân lập và phân tích các đoạn trình tự gen biểu hiện (Expressed Sequence Tag, EST) là một trong các phương pháp sinh học phân tử hiện đại nhằm tập trung nghiên cứu các gen chức năng. Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về cDNA/EST của tôm sú đã đạt được một số kết quả góp phần làm sáng tỏ một số cơ chế phân tử liên quan đến sinh trưởng, sức sinh sản và khả năng kháng bệnh.

Để tạo tiền đề cho các nghiên cứu cơ bản về genome tôm sú, chúng tôi xây dựng đề tài nghiên cứu: “*Nghiên cứu xác định một số gen của tôm sú (Penaeus monodon) sử dụng phương pháp phân tích thư viện cDNA/EST*”.

Nghiên cứu được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “*Nghiên cứu giải trình tự một phần bộ gen và xây dựng cơ sở dữ liệu genome tôm sú (P.monodon)*” thuộc chương trình “*Phát triển và Ứng dụng Công nghệ sinh học ngành Thủy sản*”, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

### **Mục tiêu nghiên cứu:**

- Xây dựng thư viện cDNA/EST của tôm sú tự nhiên/nuôi tại Việt Nam.
- Xác định trình tự cDNA/EST.
- Chú giải chức năng một số gen thu thập được từ thư viện cDNA/EST.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>