

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
----------

BÙI THỊ KIỀU VÂN

**SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM HÓA SINH TRÚNG VÀ TRÌNH TỰ
VÙNG ĐIỀU KHIỂN D-LOOP CỦA BA GIỐNG GÀ RI,
GÀ MÔNG VÀ GÀ SAO NUÔI TẠI THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2008

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
----------

BÙI THỊ KIỀU VÂN

**SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM HÓA SINH TRỨNG VÀ TRÌNH TỰ
VÙNG ĐIỀU KHIỂN D-LOOP CỦA BA GIỐNG GÀ RI,
GÀ MÔNG VÀ GÀ SAO NUÔI TẠI THÁI NGUYÊN**

Chuyên ngành: DI TRUYỀN HỌC

Mã số: 60.42.70

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

Người hướng dẫn: PGS.TS Nguyễn Trọng Lạng

THÁI NGUYÊN - 2008

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới tới PGS.TS. Nguyễn Trọng Lạng, giảng viên khoa sinh - KTNN trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên, PGS.TS. Nông Văn Hải, Phó Viện trưởng, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người thầy đã tận tình dìu dắt và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận văn.

Trong thời gian học tập và nghiên cứu vừa qua, tôi đón nhận được sự giúp đỡ hết lòng, chỉ bảo tận tình và sâu sắc của CN. Địch Thị Kim Hương, ThS.NCS. Nguyễn Đăng Tôn cùng tập thể các cô, chú, anh, chị cán bộ nghiên cứu Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam những người đã tạo nhiều điều kiện thuận lợi và nhiệt tình hướng dẫn tôi trong quá trình nghiên cứu. Tôi rất cảm ơn sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa và các thầy, cô giáo, kỹ thuật viên khoa Sinh - KTNN trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã ủng hộ và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Cho phép tôi được tỏ lòng biết ơn tới Ths. Ngôn Thị Hoán, giảng viên chính khoa Chăn nuôi - Thú y trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong việc nghiên cứu thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ tình cảm của mình bằng lời cảm ơn chân thành đến gia đình, người thân và bạn bè, những người luôn dành cho tôi những tình cảm nồng ấm, thân thương nhất trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Thái Nguyên, tháng 9 năm 2008

BÙI THỊ KIỀU VÂN

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương I TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. NGUỒN GỐC GIA CẦM	3
1.2. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC GIỐNG GÀ NGHIÊN CỨU....	4
1.2.1. Gà Ri	4
1.2.2. Gà Mông.....	4
1.2.3. Gà Sao	5
1.3. CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI.....	6
1.3.1. Cơ sở của việc nghiên cứu các tính trạng ở trứng.....	6
1.3.2. Phân tích trình tự vùng điều khiển (D-loop) ty thể	8
1.3.2.1. Ty thể - đặc điểm cấu tạo DNA ty thể.....	8
1.3.2.2. Đặc điểm cấu tạo hệ gen ty thể gà	9
1.3.2.3. Ý nghĩa của DNA ty thể trong nghiên cứu phân loại ở gà	12
1.3.2.4. Tình hình nghiên cứu DNA ty thể gà trên thế giới.....	12
1.3.2.5. Tình hình nghiên cứu DNA ty thể gà ở Việt Nam.....	15
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. VẬT LIỆU	17
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ	17
2.2.1. Hóa chất	17
2.2.2. Thiết bị	18
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.3.1. Các phương pháp hóa sinh.....	19
2.3.1.1. Phương pháp xác định tỷ lệ lòng trắng, lòng đỏ, vỏ.....	19
2.3.1.2. Phương pháp xác định hàm lượng vật chất khô.....	19

2.3.1.3. Định lượng lipid tổng số	19
2.3.1.4. Định lượng Protein.....	20
2.3.1.5. Phương pháp xử lý số liệu	21
2.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử	22
2.3.2.1. Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ máu động vật	22
2.3.2.2. Kỹ thuật điện di DNA trên gel agarose	23
2.3.2.3. Nhân vùng điều khiển D-loop bằng kỹ thuật PCR	24
2.3.2.4. Kỹ thuật tách dòng gen	26
2.3.2.5. Phương pháp xác định trình tự DNA	28
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM HÓA SINH TRÚNG CỦA 3 GIỐNG GÀ	29
3.1.1. Tỷ lệ lòng trắng, lòng đỏ, vỏ tươi.....	29
3.1.2. Hàm lượng vật chất khô	30
3.1.3. Hàm lượng lipit tổng số.....	31
3.1.4. Hàm lượng protein tổng số	32
3.2. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA BA MẪU GIỐNG GÀ.....	34
3.2.1. Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ máu gà.....	34
3.2.2. Nhân đoạn trình tự của vùng D-loop của DNA ty thể	36
3.2.3. Tách dòng và xác định trình tự vùng D- loop của DNA ty thể.....	39
3.2.3.1. Tách dòng vùng D-loop	39
3.2.3.2. Xác định trình tự vùng D-loop của DNA ty thể	44
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	51
Kết luận.	51
Đề nghị	52
CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	53
PHỤ LỤC.....	57

BẢNG KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Amp	Ampicilline
bp	Base pair (cặp bazơ)
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribo Nucleic Axit
D-loop	Displacement loop
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Epp	Eppendorf
EtBr	Ethidium Bromide
EtOH	Ethanol (cồn)
IPTG	Isopropyl thio- β -D- galactoside
kb	Kilo base
LB	Luria - Bertani
mtDNA	DNA ty thể (mitochondrial DNA)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
PBS	Phosphate - buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleaxit
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Melting Temperature (nhiệt độ nóng chảy)
v/p	vòng/phút

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sự khác nhau giữa mã di truyền trong nhân và ngoài ty thể	11
Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong đề tài.....	18
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng khuếch đại gen	25
Bảng 3.1. Tỷ lệ lòng đỏ, lòng trắng, vỏ tươi	29
Bảng 3.2. Hàm lượng vật chất khô trong trứng gà	30
Bảng 3.3. Hàm lượng lipid tổng số ở thịt gà thí nghiệm	31
Bảng 3.4. Hàm lượng protein thô trong trứng gà thí nghiệm	33
Bảng 3.5. Thống kê các điểm đa hình ở 2 mẫu nghiên cứu so với trình tự tham khảo mã số AB268515	49
Bảng 3.6. So sánh tỷ lệ sai khác trình tự nucleotide của một số giống gà.....	50

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ tổ chức của DNA ty thể Gà.....	10
Hình 2.1. Sơ đồ vector tách dòng pJET1/blunt.....	26
Hình 3.1. Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ lòng đỏ, lòng trắng của trứng gà	29
Hình 3.2. Biểu đồ biểu diễn hàm lượng vật chất khô của trứng gà	30
Hình 3.3. Biểu đồ biểu diễn hàm lượng lipid tổng số ở trứng gà thí nghiệm	32
Hình 3.4. Biểu đồ biểu diễn hàm lượng protein thô trong thịt gà thí nghiệm	33
Hình 3.5. Ảnh kết quả điện di DNA tổng số.....	36
Hình 3.6. Ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR	39
Hình 3.7. Ảnh điện di một số DNA plasmid trên gel agarose 0,8%.....	42
Hình 3.8. Ảnh kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng <i>XhoI</i> và <i>XbaI</i>	44
Hình 3.9. So sánh trình tự D-loop của hai mẫu nghiên cứu Ri (Rhy), Mông (Mna) với trình tự tham khảo mã số AB268515.....	48
Hình 3.10. Quan hệ di truyền của một số giống gà.....	50

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong những năm gần đây ngành chăn nuôi gia cầm nước ta phát triển nhanh, đạt được những tiến bộ rõ rệt, số lượng đầu gia cầm cũng như sản lượng thịt, trứng của ngành tăng hàng năm. Theo Hoàng Kim Giao và Nguyễn Thanh Sơn (Cục chăn nuôi - Bộ nông nghiệp: Thông tin Hiệp hội chăn nuôi gia cầm Việt Nam - 2005) trong những năm gần đây tốc độ tăng đầu con của đàn gia cầm từ năm 1990 đến năm 2000 là 5%/năm, năm 2002 là 6,69%, năm 2003 là 8,9%. Tổng đàn gia cầm trong cả nước 254,057 triệu con năm 2003, sản lượng trứng 4,85 tỷ quả năm 2003.

Bên cạnh việc phát triển các giống gà nhập nội có năng suất cao như gà Lergho, Lương Phượng, Lương Phượng Sasso, gà Brown, Tam hoàng... thì việc bảo tồn và phát triển các giống gà nội có khả năng thích ứng tốt với điều kiện chăn nuôi của địa phương, chất lượng thịt, trứng tốt như gà Đông Tảo, gà Ác, gà Tè, gà Ri, gà Mông, gà Mía, gà Tre, gà Hồ, gà Tàu vàng, gà Móng, gà Chọi... cũng đang được quan tâm. Gần đây việc nhập nội các giống gà có năng suất cao, chất lượng thịt, trứng tốt, có khả năng thích ứng cao với điều kiện chăn nuôi ở địa phương như gà Sao, gà Ai cập cũng đã và đang thu hút sự chú ý của người nông dân.

Việc đánh giá chất lượng trứng, thịt cũng như tìm hiểu sự đa dạng di truyền ở mức phân tử của các giống gà trên là cần thiết cho ngành chọn giống gia cầm.

Hiện nay đã có các công trình nghiên cứu về thành phần hóa sinh trứng gà Ri, gà Ác, Lergho... [5], [9], [10], [27], [32], [36].

Xác định sự đa dạng di truyền ở mức phân tử của các giống gà qua nghiên cứu vùng điều khiển D-loop ty thể trên thế giới được chú ý từ những năm 1990 và đang phát triển rộng rãi. Ở Việt Nam các xác định đa dạng di truyền ở mức phân tử ở gà qua các nghiên cứu liên quan đến vùng điều khiển D-loop

mới bắt đầu từ những năm 1999 trên đối tượng gà lôi [4]. Đến nay việc giải trình tự nucleotide vùng D-loop để đánh giá mức đa dạng di truyền đang được quan tâm. Hiện nay TS. Lê Thị Thúy - Viện Chăn Nuôi đang làm chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu sự đa dạng di truyền các giống gà nội" trong đó có giống gà Mông và gà Ri.

Trong phạm vi nghiên cứu của luận văn này chúng tôi lựa chọn đề tài: "*So sánh thành phần hóa sinh trứng và trình tự vùng điều khiển D-Loop của ba giống gà Ri, gà Mông và gà Sao nuôi tại Thái Nguyên*".

2. Mục tiêu của đề tài

- So sánh chất lượng trứng của ba giống gà.
- So sánh trình tự đoạn điều khiển trong DNA ty thể giữa các giống gà.
- Xác định mối quan hệ di truyền của một số giống gà.

3. Nội dung nghiên cứu

- Xác định các chỉ tiêu hóa sinh trứng: Hàm lượng vật chất khô; tỷ lệ lòng trắng; lòng đỏ; hàm lượng lipid; protein.
- Tách DNA tổng số từ máu của các giống gà trên.
- Nhân toàn bộ vùng D-loop bằng kỹ thuật PCR.
- Tạo dòng phân tử vùng D-loop.
- Phân tích, so sánh trình tự vùng D-loop gen ty thể với trình tự đã được công bố trong ngân hàng genbank.
- Vẽ cây phát sinh về mối quan hệ di truyền của một số giống gà.

Chương I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. NGUỒN GỐC GIA CẦM

Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu về nguồn gốc gia cầm và đưa ra kết luận rằng: Gà nhà hiện nay có chung nguồn gốc từ gà rừng Gallus gallus. Gà rừng có thân hình nhỏ bé, đẻ dòn theo mùa, trứng bé, có khả năng bay xa. Cơ sở của kết luận trên là gà nhà có nhiều đặc điểm giống gà rừng về mặt hình thái đến cấu tạo giải phẫu các bộ phận bên trong cơ thể, tiếng gáy, tập tính hoạt động.

Theo loại hình gà có thể chia thành 3 kiểu: Kiểu Bakira (gà nguyên thủy): nhiều lông, ức nở, mào và dái tai lớn, mỏ hơi cong và nhọn. Kiểu Malaysia (gà chọi): ít lông và cứng, mào và dái tai nhỏ, đầu nhỏ, mắt lõm vào hốc mắt, mỏ ngắn khoẻ. Kiểu Cochinchina: nhiều lông bông, lông tơ, mào và dái tai vừa, tai nhỏ màu đỏ, mỏ tương đối ngắn. Từ 3 loại hình trên, người ta chọn lọc, dần dần hình thành nên các giống gà chuyên thịt, chuyên trứng hay kiêm dụng ngày nay.

Theo Nguyễn Ân (1983) [1] và nhiều tác giả đã sắp xếp vị trí của gà nhà trong hệ thống giới động vật như sau: Giới động vật (Animal); Ngành động vật có xương sống (Chordata); Lớp chim (Aves); Bộ gà (Galliformes); Họ Trĩ (Fasina nidea); Chủng Gallus; Loài Gallus gallus.

Gà được thuần hoá đầu tiên ở Ấn Độ cách đây 5000 năm, sau đó là Ba Tư. Nhờ sự tiến bộ trong công tác chọn giống, từ các giống gà địa phương của châu Á, sau khi nhập vào châu Âu thế kỷ XVIII và XIX, đầu tiên là ở nước Anh, sau đó là nước Mỹ, các giống gà được lai tạo thành nhiều giống gà có năng suất cao hơn. Ở nước ta, gà rừng được thuần hoá và nuôi sớm nhất ở vùng Vĩnh Phú, Hà Bắc, Hà Tây... Từ giống gà nuôi ban đầu là tiền thân của gà Ri hiện nay nhân dân ta đã tạo được nhiều giống gà: gà Mía, gà Ác, gà Ri, gà Tre, gà Đông Tảo, gà Vàng....