

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

---- oOo----

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

**NGHIÊN CỨU HỆ PHIÊN MÃ TỪ MÔ CƠ CỦA TÔM SÚ
PENAEUS MONODON TẠI VIỆT NAM.**

NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

MÃ NGÀNH: 60420114

Giáo viên hướng dẫn: PGS.TS Đinh Duy Kháng

Học viên thực hiện : Nguyễn Thị Minh Thư

Khóa học : 2012 - 2014

Hà Nội, 2014

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành được luận văn này trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới PGS.TS Đinh Duy Kháng Phòng vi sinh vật học phân tử, Viện công nghệ sinh học người luôn tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn. Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS Đồng Văn Quyền, Trưởng Phòng vi sinh vật học phân tử, Phó viện trưởng Viện công nghệ sinh học đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi được nghiên cứu và thực hiện luận văn tại phòng. Qua đây tôi xin cảm ơn TS. Nguyễn Thị Tuyết Nhung, ThS. Hà Thị Thu, ThS. Nguyễn Thị Hoa, các cô chú, anh chị đang công tác tại phòng Vi sinh vật học phân tử, những người luôn tận tình chỉ bảo và giúp đỡ tôi trong lĩnh vực chuyên môn cùng với tinh thần làm việc khoa học và nghiêm túc. Trong thời gian thực tập, lãnh đạo phòng và các cô chú, anh chị trong phòng đã giúp tôi trưởng thành hơn rất nhiều.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy, cô giáo Trường Đại Học Thái Nguyên, Viện Sinh Thái và Tài Nguyên Sinh Vật, Viện Công Nghệ Sinh Học đã hướng dẫn và truyền thụ kiến thức cho tôi trong thời gian học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới những người thân trong gia đình tôi, bạn bè và đồng nghiệp đã tạo điều kiện, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó./.

Hà nội, ngày 21 tháng 12 năm 2014

Học viên:

Nguyễn Thị Minh Thu

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ
cDNA	Complementary
ddNTP	Dideoxyribonucleotide
DNA	Deoxyribonucleotide axit
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EST	Expressed sequence tag
FC	Flow Cell
GO	Gene Ontology
Kb	Kilo base
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
mRNA	RNA thông tin
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragement Length Polymorphism
RNA	Ribonucleotide axit
SBL	Sequencing By Ligation
SBS	Sequencing By Synthesis
TF	Transcription factor

MỤC LỤC

CHƯƠNG I: MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục tiêu đề tài.....	3
CHƯƠNG II: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1. Đại cương về Tôm Sứ.....	4
2.1.1. Đặc điểm sinh học của Tôm Sứ.....	4
2.1.2. Khả năng thích ứng với điều kiện môi trường	8
2.1.3. Đặc điểm sinh trưởng của Tôm Sứ.....	9
2.2. Tầm quan trọng của việc lập bản đồ và giải mã hệ gen của Tôm Sứ....	10
2.3. Các công trình nghiên cứu về Tôm Sứ.....	12
2.3.1. Tình hình nghiên cứu trên Thế giới.....	13
2.3.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam.....	14
2.4. Khái quát về hệ phiên mã	16
2.5. Giới thiệu về công nghệ giải trình tự thế hệ mới	18
CHƯƠNG III: VẬT LIỆU, NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU...	27
3.1. Vật liệu	27
3.1.1. Đối tượng.....	27
3.1.2. Trang thiết bị	27
3.1.3. Sinh phẩm.....	27
3.2. Nội dung nghiên cứu	28
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	29
3.3.1. Phương pháp tách chiết và tinh chế mRNA tổng số từ mô Cơ.....	29
3.3.3. Gắn Adaptor	32
3.3.4. Khuếch đại các đoạn DNA đã gắn Adaptor	32
CHƯƠNG IV : KẾT LUẬN VÀ THẢO LUẬN	
KẾT LUẬN	
KIẾN NGHỊ	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	50

DANH MỤC HÌNH

Hình 1 Hình ảnh tôm sú	4
Hình 2: Vòng đời của Tôm sú	8
Hình 3: Tôm sú thu từ vùng biển Nghệ An.....	27
Hình 4. FC chứa 8 kênh (A), trong mỗi kênh của FC (B) đã được gắn hàng triệu primer xuôi (F) và ngược (R) bằng liên kết cộng hóa trị. Các môi này bắt cặp bổ sung với đầu gắn adaptor trên các đoạn cDNA tổng hợp từ phân đoạn mRNA tôm sú	34
Hình 5. Tổng hợp sợi DNA mới nhờ Taq DNA polymerase, primer gắn FC và khuôn là cDNA sợi đơn gắn adaptor tổng hợp từ mRNA mô cơ tôm sú.	35
Hình 6. Sợi DNA tổng hợp mới gắn với một vị trí nhất định trên FC.....	35
Hình 7. Đầu 3' của sợi mới tổng hợp bắt cặp bổ sung với primer xuôi (F) gắn trên FC và quá trình kéo dài chuỗi nhờ Taq lại xảy ra.....	36
Hình 8. Quá trình hình thành cụm (Cluster) DNA đồng nhất trên mỗi vị trí của FC nhờ hình thành cầu nối (A) và khuếch đại cầu nối (B), biến tính tạo mạch thẳng (C) và cắt bỏ sợi nghĩa khỏi FC (D).	36
Hình 9. Giải trình tự bằng việc bổ sung các primer giải trình tự bắt cặp bổ sung với adaptor ở đầu 3' của các sợi gắn FC (A) và kéo dài chuỗi nhờ Taq DNA polymerase với 4 bazơ gắn 4 chất màu khác nhau theo nguyên lý kết thúc hồi tính (Reversible Terminator, B).	37
Hình 10. Các bước tách chiết, tinh chế phân cắt và tổng hợp cDNA	39
Hình 11. Các bước gắn adaptor, khuếch đại bằng PCR và chọn đoạn gen có độ dài thích hợp để giải trình tự.	41
Hình 15. Chất lượng trình tự theo vị trí trên trình tự đọc mô cơ sau khi tiền xử lý	45
Hình 16. Chất lượng trình tự theo vị trí trên trình tự đọc mô cơ sau khi tiền xử lý	45
Hình 17. Thống kê độ dài của toàn bộ trình tự đọc mô cơ sau khi tiền xử lý ...	45
Hình 18. Phân bố Contigs theo độ dài lắp ráp	46

CHƯƠNG I: MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Nuôi trồng thủy sản là ngành kinh tế quan trọng đóng góp một phần đáng kể trong thị phần xuất khẩu của Việt Nam cũng như nhiều quốc gia trong khu vực. Trong đó, ngành nuôi tôm là một trong những ngành mũi nhọn mang lại nguồn ngoại tệ lớn. Chiến lược phát triển ngành nuôi trồng tôm sú ở Việt Nam cũng như của các nước trong khu vực là làm sao để có được ngành sản xuất tôm sú bền vững, hạn chế được tối thiểu các tác động tiêu cực đến môi trường, sinh thái. Nền tảng cho chiến lược phát triển này là phát triển nguồn tôm bản địa với các chương trình nhân giống khoa học để nâng cao tỷ lệ sống và sự tăng trưởng. Để đạt được mục đích này, việc nghiên cứu cấu trúc và chức năng của toàn bộ hệ gen (genome) tôm sú là một vấn đề khoa học cơ bản có định hướng ứng dụng hết sức quan trọng.

Tôm sú (*Penaeus monodon*) là loài thủy sản được nuôi trồng và mang lại lợi nhuận rất lớn nhờ xuất khẩu cho nhiều quốc gia ở châu Á - Thái Bình Dương (Thái Lan, Việt Nam, Hàn Quốc, Đài Loan, Malaysia, Indonesia, Ấn Độ, Australia v.v...). Năm 2008, tổng sản lượng tôm trên toàn thế giới đạt 6 triệu tấn, đạt giá trị thương mại 10 tỷ USD, chiếm 16% tổng kim ngạch xuất khẩu hải sản (Leu và cs, 2010). Riêng ở Việt Nam, theo Hội nghị tổng kết xuất khẩu tôm năm 2012 do VASEP tổ chức vào ngày 28/12/2012 tại thành phố Hồ Chí Minh thì kim ngạch xuất khẩu tôm năm 2012 đạt khoảng 2,25 tỷ USD. Ngày 2/11/2014, tại hội nghị tổng kết nuôi tôm nước lợ 2014 cho biết: 9 tháng đầu năm 2014 xuất khẩu tôm của Việt Nam đạt gần 2,94 tỷ USD, tăng 42% so với cùng kỳ. Đến cuối năm dự báo xuất khẩu tôm sẽ đạt mức 3,8 tỷ USD. Xuất khẩu tôm nhiều năm liền độc chiếm ngôi đầu, chiếm trên 50% tỷ trọng xuất khẩu thủy sản của cả nước. Ở nước ta nghề nuôi tôm sú *Penaeus monodon* đã và đang phát triển mạnh trong những năm gần đây. Thống kê cho thấy, năm 2012 tổng diện tích nuôi tôm trên cả nước là 530000 héc ta (ha). Dự kiến năm 2014, con số này sẽ tăng lên

đến 600000 ha và sản lượng dự kiến sẽ là 270000 tấn. Sản lượng nuôi tôm sú qua các năm tăng mạnh kéo theo giá trị xuất khẩu tôm sú cũng tăng nhanh tạo ra nguồn lợi đáng kể cho kinh tế nước ta. Việt Nam xuất khẩu tôm vào 92 thị trường, trong đó tôm sú chiếm trên 50% giá trị xuất khẩu mặt hàng tôm.

Tuy nhiên, nghề nuôi tôm của nước ta hàng năm chịu thiệt hại rất lớn do dịch bệnh, trong đó dịch bệnh do virus đóng vai trò chủ yếu. Vì vậy, việc kiểm tra, phát hiện kịp thời các tác nhân gây bệnh để đề ra biện pháp phòng chống, giảm thiểu thiệt hại tới mức thấp nhất cho ngành nuôi tôm là vấn đề được nhiều cơ sở nghiên cứu quan tâm. Cho đến nay, những hiểu biết cơ bản về sự sinh sản, hệ miễn dịch và đặc biệt là sự điều khiển sinh trưởng của tôm sú còn rất hạn chế do những thiếu sót thông tin về genome và sự biểu hiện gen của chúng. Kích thước genome của tôm sú cũng rất lớn (khoảng trên 2 tỉ cặp base = 2/3 bộ gen người), nên việc giải mã toàn bộ genome tôm sú đòi hỏi nhiều thời gian và chi phí rất lớn, ước tính hàng chục triệu đô la. Vì vậy một trong những hướng nghiên cứu được lựa chọn là lập bản đồ di truyền liên kết genome tôm sú, lập bản đồ di truyền từ DNA vi vệ tinh hay lập bản đồ gen tôm sú từ giải mã EST/cDNA, bằng việc lựa chọn những gen ứng viên dự báo phù hợp với mục đích nghiên cứu, ta có thể xây dựng được các chỉ thị phân tử phục vụ cho công tác chọn giống, nghiên cứu cấu trúc và chức năng của các gen liên quan. Việc nghiên cứu giải mã và lập bản đồ bộ gen thường tập trung vào các đối tượng có giá trị kinh tế cao. Như đã trình bày ở trên, tôm sú là đối tượng nuôi trồng có giá trị kinh tế mang tính chiến lược. Chính vì vậy việc phối hợp giữa các quốc gia nhằm giải mã và lập bản đồ gen tôm sú sẽ mang lại lợi ích chung cho cộng đồng và cũng là cho mỗi quốc gia.

Nghiên cứu hệ gen phiên mã (transcriptome) là một hướng nghiên cứu quan trọng, tập chung nghiên cứu gen mã hóa protein và mức độ biểu hiện của chúng trong từng loại mô cơ quan, từng giai đoạn của quá trình phát triển hay trong các điều kiện môi trường khác nhau.

Trong khuôn khổ của đề tài chúng tôi tiến hành nghiên cứu mô Cơ của Tôm Sú. Hiện nay, kết quả nghiên cứu từ mô Cơ của Tôm Sú là những dữ liệu quan trọng phục vụ cho việc giải trình tự hệ phiên mã.

Chính vì vậy chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu hệ phiên mã từ mô Cơ của Tôm Sú (*penaues monodon*) tại Việt Nam”***

1.2. Mục tiêu đề tài

- Tách chiết và tinh sạch được ARN thông tin (mRNA) từ mô cơ của Tôm Sú.
- Đánh giá được chất lượng mRNA đủ tiêu chuẩn cho việc giải trình tự hệ phiên mã của Tôm Sú bằng máy xác định trình tự gen thế hệ mới
- Chuẩn bị được mẫu, cho đi giải trình tự gen bằng máy xác định trình tự gen thế hệ mới
- Phân tích hệ phiên mã mô cơ của Tôm Sú

CHƯƠNG II: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Đại cương về Tôm Sú

2.1.1. Đặc điểm sinh học của Tôm Sú

Cơ thể tôm sú có màu xanh đậm, có những vân sặc tổ trắng đen ở các đốt bụng. Phần còn lại của thân biến đổi từ màu nâu sang màu xanh hoặc đỏ.

Trong các loài tôm nuôi, tôm sú là loài có kích thước lớn (có thể lên đến 330 mm hoặc lớn hơn về chiều dài cơ thể) và là loài tôm thương mại quan trọng.



Hình 1 Hình ảnh tôm sú

2.1.1.1. Phân loại

Tôm sú có tên tiếng Anh là Black tiger shrimp. Chúng thuộc ngành *Arthropoda*; phân ngành *Crustacea*; lớp *Malacostraca*; bộ *Decapoda*; phân bộ *Dendrobranchiata*; họ *Penaeidea*; giống *Penaeus*; loài *Penaeus Monodon*.

2.1.1.2. Cấu tạo

Phần đầu trên của tôm sú *Penaeus Monodon* có chủy cứng với các răng cưa. Phía trên của chủy có từ 7 đến 8 răng và phía dưới chủy có 3 răng. Ở tôm sú, mũi khứu giác và râu là cơ quan nhận biết và giữ thăng bằng cho tôm. Trong khi đó 3 cặp chân hàm của tôm có tác dụng lấy thức ăn và giúp cho việc bơi lội thì 5 cặp chân ngực ngoài tác dụng để lấy thức ăn chúng còn được tôm sử dụng

khi chúng bò. Ngoài ra một cặp chân bụng khác cũng được dùng để bơi. Phần đuôi của tôm sú có 1 cặp chân đuôi để tôm có thể nhảy xa và điều chỉnh lên cao hay xuống thấp khi bơi. Bộ phận sinh dục của tôm sú thì nằm ở dưới bụng.

Tôm sú thuộc loại dị hình. Tôm cái có kích thước to hơn tôm đực. Khi tôm trưởng thành, sự khác biệt giữa tôm đực và tôm cái rất rõ ràng thông qua sự khác biệt của cơ quan sinh dục bên ngoài. Ở con đực, cơ quan sinh dục chính nằm ở phía trong phần đầu ngực. Bên ngoài có cơ quan giao phối phụ nằm ở nhánh ngoài đôi chân ngực thứ 2. Lỗ sinh dục đực mở ra hốc hang đôi chân ngực thứ 5. Tinh trùng của loài này thường được chứa trong túi. Ở tôm cái, buồng trứng nằm dọc theo mặt lưng phía trên với hai ống dẫn trứng mở ra ở khớp hang đôi chân ngực thứ 3. Bộ phận chứa túi tinh gồm 2 tấm phòng lên ở đôi chân ngực thứ 4 và thứ 5 dưới bụng tôm.

2.1.1.3. Phân bố

Tôm sú có phạm vi phân bố rộng, từ Ấn Độ Dương qua hướng Nhật Bản, Đài Loan, phía Đông Tahiti, phía Nam châu Úc và phía Tây châu Phi (Racek - 1955, Holthuis và Rosa - 1965, Motoh - 1981, 1985) Nhìn chung, tôm sú phân bố từ kinh độ 30E đến 155E từ vĩ độ 35N tới 35S xung quanh các nước vùng xích đạo, đặc biệt là Indonesia, Malaixia, Philippines và Việt Nam. Riêng ở Việt Nam Tôm Sú phân bố rộng từ Bắc tới Nam, từ ven bờ đến vùng có độ sâu 40m. Tròn đó vùng phân bố chính là vùng biển miền Trung.

Tôm bột, tôm giống (Juvenile) và tôm gần trưởng thành có tập tính sống gần bờ biển và rừng ngập mặn ven bờ. Tuy nhiên, khi tôm trưởng thành di chuyển xa bờ vì những vùng nước sâu là nơi sống ưa thích của chúng. Sự phân bố của Tôm Sú phụ thuộc vào giai đoạn phát triển

2.1.1.4. Chu kỳ sống của Tôm Sú

Ấu trùng tôm sú (Nauplii) được biến đổi theo 5 giai đoạn trong vòng từ 36 đến 51 giờ. Các ấu trùng tôm này thường bơi từng đoạn ngắn rồi nghỉ. Đối với giai đoạn này, người ta không cần cung cấp thức ăn vì chúng tự sống bằng noãn hoàng. Chúng lột vỏ 4 lần, mỗi lần khoảng 7 giờ. Về kích thước, nauplii 1 dài