

Xác định tên khoa học của cây Ô đầu bằng phương pháp giải trình tự gen ADN

Bùi Thanh Tùng¹, Nguyễn Tiến Vững², Vũ Đức Lợi^{1,*}

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Pháp y Quốc gia, số 41 Nguyễn Đình Chiểu, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 26 tháng 8 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 06 tháng 10 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 6 năm 2017

Tóm tắt: Từ mẫu lá cây ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang, đã chiết tách, phân tích, giải trình tự gen và so sánh với mẫu trình tự gen của loài thuộc chi *Aconitum*. Kết quả đã giải được trình tự gen của cây Ô đầu và khi so sánh với trình tự gen của loài *A. carmichaeli* Debx. thấy có sự tương đồng đến 99%. Như vậy bằng phương pháp giải trình tự gen ADN đã xác định được tên khoa học của cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang là: *A. carmichaeli* Debx. họ Ranunculaceae.

Từ khóa: Ô đầu, trình tự gen, ADN.

1. Đặt vấn đề

Cây Ô đầu thuộc chi *Aconitum*, đây là một chi lớn với hơn 500 loài đã được ghi nhận trên thế giới. Theo một tài liệu, cây Ô đầu ở Việt Nam được cho là có nguồn gốc từ Trung Quốc, di thực vào Việt Nam từ những năm 70 thế kỷ trước. Tuy nhiên, tên khoa học cây Ô đầu trồng ở Việt Nam ghi nhận dưới 2 tên là: *A. carmichaeli* Debx. và *A. fortunei* Hemsl [1, 2]. Để xác định tên khoa học của một loài cây, có thể thông qua phân tích đặc điểm hình thái, so sánh với khóa phân loại thực vật hoặc phân tích mã gen ADN và so sánh với gen ADN gốc trong ngân hàng gen. Bài báo này công bố kết quả giải trình tự gen ADN của cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang qua đó xác định tên khoa học của cây này.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

+ Lấy mẫu lá non tươi của cây ô đầu để chiết và phân tích ADN, giải trình tự gen, so sánh với mẫu trình tự gen của loài thuộc chi *Aconitum*

+ Hóa chất: đệm tách ADN

+ Thiết bị phân tách ADN điện di bằng bản gel agarose, thiết bị giải trình tự gen tự động Nextseq 500.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Tách chiết ADN tổng số:

ADN toàn phần được tách từ lá tươi theo quy trình tách chiết ADN DNeasy plant mini kits (QIAGEN, USA). ADN toàn phần được kiểm tra lại bằng phương pháp điện di trên gel agarose [3].

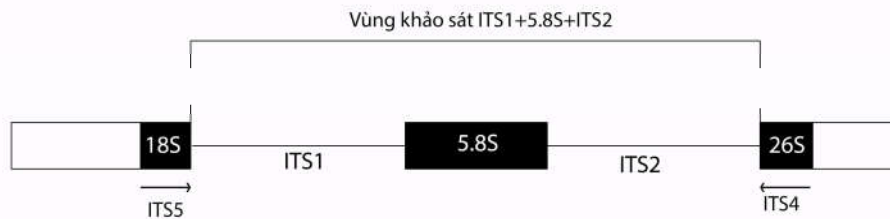
* Khuếch đại ADN bằng PCR:

Đoạn trình tự ADN mARN ITS1-5,8S-ITS2 được khuếch đại sử dụng cặp mồi ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' và ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-989313325.

Email: ducloi82@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4053>



Hình 1. Vùng gen khảo sát ITS1-5,8S-ITS2.

Chu trình nhiệt cho một phản ứng PCR dự kiến: Khởi động nhiệt 94 °C trong 3 phút. Tiến hành 35 chu kỳ (Biến tính: 94 °C trong 1 phút + Bắt cặp: 54 °C trong 1 phút + Khuếch đại: 72 °C trong 1 phút). Pha tổng hợp cuối cùng: 72 °C trong 8 phút.

* Điện di ADN trên gel agarose

Nguyên tắc: Các đoạn ADN mang điện tích âm nên di chuyển trong điện trường theo chiều từ cực âm sang cực dương. Trên bản gel agarose, các đoạn ADN có kích thước khác nhau sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau trong điện trường. Nhuộm ADN bằng Ethidium bromid để quan sát ADN dưới ánh sáng tử ngoại, bước sóng 254 nm.

Tiến hành: Đặt bản gel agarose vào trong máy điện di có dung dịch đệm TAE 1X, tra mẫu ADN cùng với chất chỉ thị xanh bromophenol vào giếng trên bản gel. Chạy điện di ở điện thế 110 V. Sau đó nhuộm bản gel bằng Ethidium bromid, rửa sạch bằng nước cất rồi quan sát dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm.

* Phương pháp tinh sạch ADN

Để tinh sạch ADN, sử dụng kit tinh sạch của hãng Fermentas (Đức) gồm các bước tiến hành như sau:

1. Lấy 100 µL đệm tách ADN, cùng với 100µL ADN rồi trộn đều.
2. Chuyển lên cột Genne Jet[™]. Sau đó ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ phần dịch bên dưới
3. Thêm 700 µL đệm rửa để loại tạp chất. Sau đó ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, bỏ phần dịch bên dưới.
4. Đặt cột vào trong ống 1,5 µL. Cho 30µL H₂O vào cột sau đó ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút.
5. Bảo quản ADN ở -20 đến -80 °C

* Phương pháp giải trình tự

Nguyên tắc: Dựa theo phương pháp Sanger cải tiến có sử dụng các dideoxynucleotid. Mỗi loại dideoxynucleotid được đánh dấu bằng chất huỳnh quang có màu khác nhau. Nhờ vậy tất cả các oligonucleotid cùng chấm dứt tại một dideoxynucleotid sẽ có cùng một màu. Trình tự ADN được giải trình tự bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc) trên máy đọc trình tự tự động.

* So sánh trình tự ADN

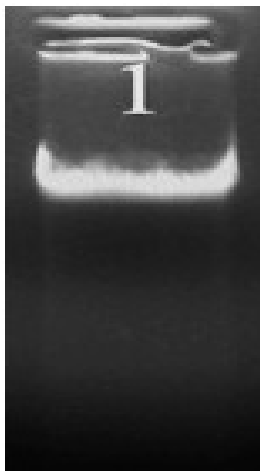
Trình tự ADN của các mẫu được phân tích bằng phần mềm MEGA 6,0 và so sánh với ADN của loài thuộc chi *Aconitum* đã công bố trên ngân hàng gen bằng công cụ NCBI/BLAST, công cụ này sẽ chỉ ra độ tương đồng của các gen giữa loài nghiên cứu với các công bố trước đây [6].

3. Kết quả và bàn luận

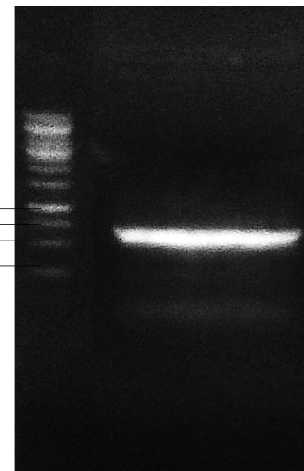
Mẫu lá tươi cây ô đầu được chiết xuất, phân tách ADN, giải trình tự gen, so sánh với mẫu trình tự gen đã công bố của các loài thuộc chi *Aconitum* cho kết quả như sau:

* Tách chiết ADN tổng số và thực hiện phản ứng nhân gen PCR:

ADN tổng số sau khi tách được điện di trên gel agarose 1 % cho vạch ADN rõ, băng điện di sạch, không lẫn ARN. ADN tổng số sau khi thực hiện phản ứng nhân gen với đoạn ITS1-5,8S-ITS2 được điện di so sánh với thang ladder chuẩn 100 bps, cho thấy kích thước đoạn trình tự thu được vào khoảng hơn 600 bps. Vạch sản phẩm trên băng điện di đậm, rõ nét nên đủ điều kiện để tiếp tục tinh sạch để thực hiện phản ứng giải trình tự.



Hình 2. Điện di ADN tổng số.

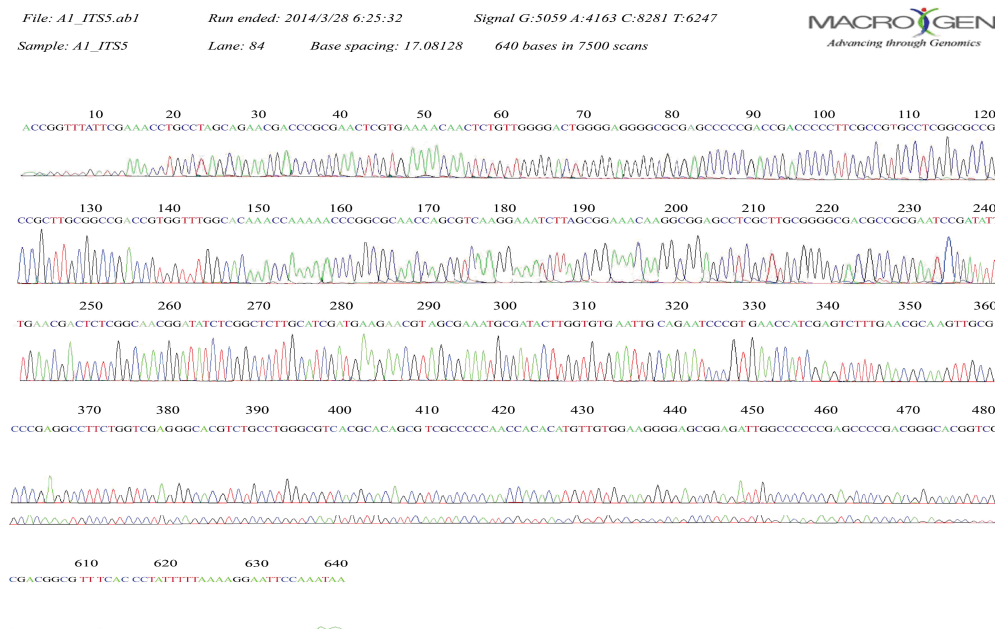


Hình 3. Điện di sản phẩm PCR.

* Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2:

Trình tự ADN sau khi giải trình tự thu được gồm 640 bps trong đó có 609 bps hiện rõ, được đưa vào để so sánh với trình tự công bố, trong đó tỷ lệ G-C là 62,3 %, tỷ lệ A-T là 37,7 %. Công cụ NCBI/Blast được sử dụng để so sánh

với trình tự đã công bố trên ngân hàng gen thế giới (mã hiệu ngân hàng gen: FJ424223) cho thấy trình tự gen thu được tương đồng với trình tự loài *A. carmichaeli* Debx. đã công bố với số nucleotid tương đồng là 606/609 (tương ứng tỷ lệ tương đồng 99%).



Hình 4. Kết quả giải trình tự gen ADN.

Range 1: 2 to 607 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1125 bits(585)	0.0	606/609(99%)	3/609(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGAAACCTGCCTAGCAGAACGACGCGCGAACTCGTGAAAAACAACCTCTGTTGGGGACTGG	60		
Sbjct 2	CGAAACCTGCCTAGCAGAACGAC-CCGCGAACTCGTGAAAAACAACCTCTGTTGGGGACTGG	60		
Query 61	GGAGGGGCGCGAGCCCCCGACACGACCCCCCTTCGCCGTGCCTCGGCGCCGGCCGCTTGCG	120		
Sbjct 61	GGAGGGGCGCGAGCCCCCGAC-CGACCCCCCTTCGCCGTGCCTCGGCGCCGGCCGCTTGCG	119		
Query 121	GCCGACCCGTGGTTTGGCACAAAACAAAACCCCGGCGCAACCAGCGTCAAGGAAATCTTAG	180		
Sbjct 120	GCCGACCCGTGGTTTGGCACAAAACAAAACCCCGGCGCAACCAGCGTCAAGGAAATCTTAG	179		
Query 181	CGGAAACAAGGCGGAGCCTCGCTTGGGGGCGACGCGCGAATCCGATATTTGAACGACT	240		
Sbjct 180	CGGAAACAAGGCGGAGCCTCGCTTGGGGGCGACGCGCGAATCCGATATTTGAACGACT	239		
Query 241	CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTG	300		
Sbjct 240	CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTG	299		
Query 301	GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC	360		
Sbjct 300	GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC	359		
Query 361	TTCTGGTCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACAGCGTCGCCCCCAACCACACATG	420		
Sbjct 360	TTCTGGTCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACAGCGTCGCCCCCAACCACACATG	419		
Query 421	TTGTGGAAGGGGAGCGGAGATTGGCCCCCGAGCCCCGACGGGCACGGTCGGGCACAAATG	480		
Sbjct 420	TTGTGGAAGGGGAGCGGAGATTGGCCCCCGAGCCCCGACGGGCACGGTCGGGCACAAATG	479		
Query 481	CCCGTCCCTGGCAGCGGTGCGCCGCGGTCAAGTGGTGGCTTCAAATACCATTTGCGGTGACC	540		
Sbjct 480	CCCGTCCCTGGCAGCGGTGCGCCGCGGTCAAGTGGTGGCTTCAAATACCATTTGCGGTGACC	539		
Query 541	GGTTGGCGCCGACGCCCTAGTTGGGACAGAATCGACCCGACAGGCGCTTCCGACGGCG	600		
Sbjct 540	GGTTGGCGCCGACGCCCTAGTTGGGACAGAATCGACCCGACAGGCGC-GTTCCGACGGCG	598		
Query 601	TTTCACCCT	609		
Sbjct 599	TTTCACCCT	607		

Hình 5. So sánh trình tự đoạn gen ITS1-5,8S- ITS2 của mẫu nghiên cứu với trình tự loài đã công bố trên thế giới.

Trong đó: Query là trình tự mẫu nghiên cứu và Sbjct là trình tự loài *A. carmichaeli* Debx. đã công bố trên ngân hàng gen thế giới (mã hiệu ngân hàng gen: FJ424223) [4, 6].

Kết quả giải trình tự gen và so sánh trình tự gen của cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang với trình tự gen loài là *A. carmichaeli* Debx. là cơ sở tin cậy để khẳng định tên khoa học của cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang là: *Aconitum carmichaeli* Debx. Họ Ranunculaceae.

4. Bàn luận

Chi *Aconitum* là một chi lớn thuộc họ Ranunculaceae với khoảng 331 loài, đặc điểm thực vật giữa các loài khác nhau ở một số điểm nhất định. Chi này phân bố ở khu vực phía bắc

ôn đới, khu vực lạnh ở bán cầu bắc, chủ yếu ở vùng núi Đông Á, Đông Nam Á, Trung Âu, một số ở phía tây bắc Mỹ. Ở Việt Nam cũng ghi nhận cây Ô đầu có ở một số tỉnh vùng núi cao, khí hậu lạnh mát như: Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu, Cao Bằng. Hiện nay trên thế giới, chi *Aconitum* ghi nhận có khoảng 948 loài nhưng số loài được chấp nhận chỉ có khoảng 331 loài [5]. Do các loài thuộc chi *Aconitum* được đặt tên khác nhau và trước kia không công bố rộng rãi nên một loài lại có thể có nhiều tên khác nhau. Mặt khác căn cứ vào đặc điểm thực vật để phân loại cũng khó khăn, do đặc điểm giữa các loài khác nhau không nhiều, cùng một loài sống trong các điều kiện khác nhau, có thể có sự thay đổi về hình thái.

Mặt khác, một số nước như Trung Quốc, Hàn Quốc đã xây dựng cơ sở dữ liệu về ADN

của các loài thuộc chi *Aconitum*. Để góp phần khẳng định tên khoa học của cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang, ngoài phương pháp phân tích đặc điểm hình thái thực vật, chúng tôi tiến hành giám định ADN của mẫu cây này. Đối với cây Ô đầu trồng ở Việt Nam đây là lần đầu tiên, phương pháp giám định ADN được sử dụng để giám định tên khoa học của cây. Sau khi chiết xuất, phân tách ADN và giải trình tự gen của mẫu lá cây Ô đầu, cho kết quả trình tự gen. So sánh trình tự đoạn gen ITS1-5,8S- ITS2 này với trình tự gen đã công bố của loài *A. carmichaeli* Debx [4]. cho thấy có sự trùng khớp nhau đến 99 %. Theo tác giả của công trình nghiên cứu về xác định tên các loài *Aconitum* bằng ADN, đây là phương pháp có độ tin cậy, tính chọn lọc cao.

5. Kết luận

Đây là lần đầu tiên, trình tự gen cây Ô đầu tại Việt Nam được nghiên cứu và công bố. Nghiên cứu này đã góp phần đưa ra cơ sở khoa học về tên loài cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang. Bằng phương pháp giám định ADN, khẳng định tên khoa học của cây Ô đầu trồng ở

tỉnh Hà Giang là: *A. carmichaeli* Debx. họ Ranunculaceae.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Tiến Bân (Chủ biên) (2013), Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tập II, tr.153.
- [2] Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV, Nxb Y học, tr. 857-858, 860-862.
- [3] Doyle J.J., Doyle J.L. (1990), "Isolation of Plant DNA from fresh tissue", *Focu*, 12(6), 13 – 15.
- [4] Jun H., Ka-Lok W., Pang-Chui S. (2010), "Identification of the Medicinal Plants in *Aconitum* L. by DNA Barcoding Technique" *Planta Medica*, 76(8), 1622-1628.
- [5] Neelofar J., Mohammad I. K., Ghulam H. D., Abdul S. S. K. (2012), "Distribution and Taxonomy of Genus *Aconitum* in Kashmir: Potent Medicinal Resource of Himalayan", *Chiang Mai Journal Sciences*, 40(2), 173 - 186.
- [6] Zheng Z., Stephen F. A., Thomas L. M., Alejandro A. S., Jinghui Z., Webb M., and David J. L. (1997), "Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Reserch*, 25(6), 3389-3402.

Determined the Scientific Name of the *A. carmichaeli* Debx. by Method of DNA Sequencing

Bui Thanh Tung¹, Nguyen Tien Vung², Vu Duc Loi¹

¹VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Forensic Medicine, 41 Nguyen Dinh Chieu, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Abstract: From the leaf of the “O dau” plant growing in Ha Giang province, was extracted, analyzed, sequenced and compared with gene sequence samples of the species *Aconitum* genus. The result was the genomic sequence of “O dau” plant and compared to the genetic sequences of *A. carmichaeli* Debx. that there is a similarity to 99%. Thus by method of DNA sequencing have identified the scientific name of the “O dau” plant growing in the Ha Giang province as *Aconitum carmichaeli* Debx.

Keywords: *A. carmichaeli*, DNA, sequencing.