

THIẾT KẾ CẶP MỒI ĐỂ NHÂN ĐOẠN GEN 18S ARNR CỦA HAI LOÀI TRÀ HOA VÀNG *CAMELLIA CRASSIPHYLLA* VÀ *CAMELLIA TAMDAOENSIS* Ở VƯỜN QUỐC GIA TAM ĐẢO

Nguyễn Văn Mùi, Nguyễn Trọng Bình

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

1. Mở đầu

Cây trà là tên gọi chung cho các loài thuộc chi *Camellia* (*Camellia*), họ chè (*Theaceae*), bộ chè (*Theales*), phân lớp số (*Dilleniidea*), lớp hai lá mầm (*Dicotyledoneae*), ngành thực vật hạt kín (*Angiospermae*) [1]. Chi *Camellia* có thân gỗ hay bụi, lá đơn mọc cách, mép khía rộng nông và đều, phiến lá, cứng màu đậm, bóng, không có lá kèm, chồi non do lá mọc úp lên nhau ở nách lá hay đầu cành, dai, màu nhạt, dễ nhận. Hoa to, mọc đơn độc ở nách lá, gốc có hai hay nhiều lá bắc.

Theo thống kê năm 1991, trong cuốn "Cây cỏ Việt Nam" của Phạm Hộ đã giới thiệu 30 loài dưới tên chi *Camellia*. Năm 1994, dựa trên công trình nghiên cứu của tác giả người Pháp cùng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Hữu Hiến đã thống kê tất cả các họ chè ở Việt Nam trong đó chi *Camellia* có 37 loài.

Cho đến nay trên thế giới cũng như nước ta, việc phân loại chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái, cấu tạo giải phẫu bên trong. Với sự phát triển của sinh học phân tử và công nghệ gen đã xuất hiện một số ngành khoa học mới: phân loại học phân tử- chủ yếu dựa trên các kỹ thuật phân tích ADN ... là những công cụ hỗ trợ đắc lực cho các nhà phân loại học trong việc phát hiện loài mới, giải quyết các mối nghi ngờ về vị trí phân loại đánh giá đầy đủ về tính đa dạng di truyền, quan hệ chủng loại tiến hoá của nhiều loài động vật, thực vật và vi sinh vật. Các công trình nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật phân loại phân tử đã và đang góp phần đánh giá tính đa dạng sinh học, định hướng khoa học cho việc bảo tồn và khai thác hợp lý nguồn tài nguyên động vật, thực vật trên thế giới cũng như ở nước ta, trong đó đã có một số nghiên cứu về phương pháp RAPD-PCR và thiết kế một số mồi để phân tích trình tự ADN cho phân loại trà [4,5].

Một số loài trà trong chi *Camellia* có giá trị kinh tế cao [6]. Đặc biệt gần đây do yêu cầu ngày càng cao về nghệ thuật cây cảnh một số loài trong chi *Camellia* đang là đối tượng bị khai thác. Do đó, cây trà là một trong những nguồn tài nguyên cần được bảo vệ, phân loại để đưa ra các biện pháp thích hợp cho việc bảo tồn nguồn gen, tính đa dạng sinh học, cách nuôi trong nhà và nhân giống chi *Camellia*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hai mẫu trà là:

- *Camellia crassiphyllia* Ninh et Hakida
- *Camellia tamdaensis*

Các mẫu này được lấy từ vườn Quốc gia Tam Đảo do TS. Trần Ninh cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thành tế bào thực vật bị phá vỡ bằng biện pháp cơ học kết hợp với sử dụng các chất tẩy rửa mạnh, ADN được giải phóng và làm sạch tạp chất nhờ proteinase K, dung dịch CHCl_3 - IsoA (24:1). ADN được kết tủa trong cồn tuyệt đối ở 20°C và thu được kết tủa tuyệt đối ở 20°C và thu được nhờ ly tâm cao tốc. ADN được tách chiết theo phương pháp của Roger J và cộng sự [8].

- Nguyên tắc của phản ứng PCR là sử dụng enzym ADN polymerase chịu nhiệt để tổng hợp trong ống nghiệm các đoạn ADN mới từ mạch khuôn trong môi trường dư thừa các dNTP và cặp mồi đặc hiệu [7].

Phản ứng PCR được thực hiện như sau: 25µl đệm 10X; 8µl MgSO_4 10mM; 2,5µl dNTP nồng độ 2,5 mM mỗi loại; 2µl primer mỗi loại và 2µl Taq ADN polymerase. Chu trình nhiệt bao gồm 90°C: 30", (95°C: 1', 52°C: 1'30"; 72°C: 1'30"), lặp lại 35 chu kỳ; 72°C:10; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

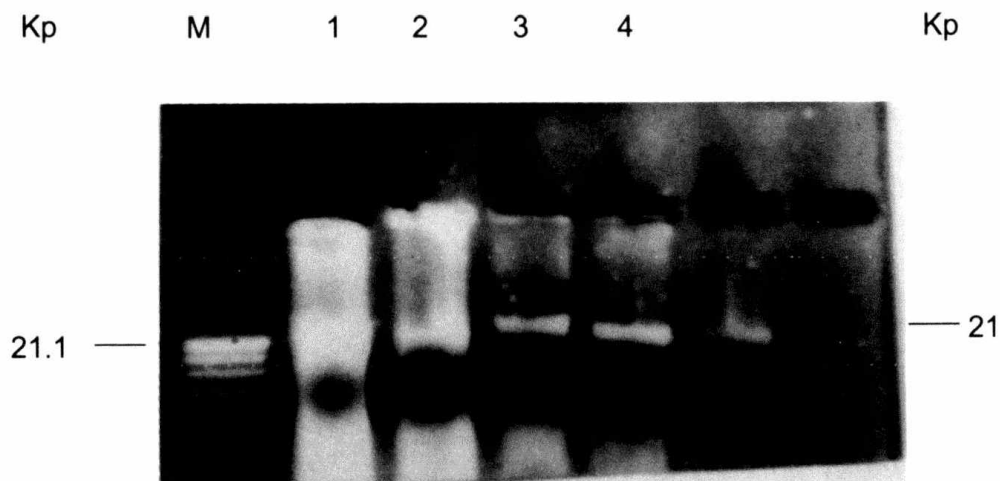
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách chiết và tinh chế adn tổng số từ lá trà

Việc tách chiết và tinh chế ADN được chúng tôi thực hiện trên hai loài trà là *Camellia crassiphyllia* Ninh et Hakoda và *Camellia tamdaonensis*.

Mọi nghiên cứu trên toàn bộ gen đều được bắt đầu từ việc tách chiết được ADN tổng số ở dạng tinh sạch và không bị đứt hay phân huỷ bởi các tác nhân cơ học hay hoá học. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp tách chiết ADN thực vật, mỗi phương pháp có những ưu điểm phù hợp cho từng đối tượng. Vì vậy, việc lựa chọn phương pháp thích hợp cho đối tượng nghiên cứu của mình là rất quan trọng. Do mô lá trà có nhiều protein và sắc tố, nên chúng tôi đã sử dụng proteinase K, SDS và PVP để tiến hành tách chiết ADN tổng số.

Sau khi tiến hành loại ARN, chúng tôi kiểm tra độ sạch của sản phẩm ADN trên gel agarose 1%. Kết quả điện di được thể hiện trong hình 1:



Hình 1: ADN tổng số trước và sau loại ARN

M: Marker - Thang chuẩn (ADN cắt bằng Eco RI)

Giếng 1: ADN tổng số của loài *Camellia crassiphylla* chưa loại bỏ ARN

Giếng 2: ADN tổng số của loài *Camellia crassiphylla* chưa loại bỏ ARN

Giếng 3: ADN tổng số của loài *Camellia crassiphylla* loại ARN

Giếng 4: ADN tổng số của loài *Camellia tamdaonensis* loại ARN

Kết quả trên hình 1 cho thấy ở giếng 1, 2, 3, 4 đều xuất hiện 1 băng ADN tương ứng với băng có kích thước 21,1Kb của băng ADN chuẩn. Như vậy, chúng tôi nhận được ADN tổng số của 2 mẫu trà trong chi *Camellia*.

Ở giếng 3 và giếng 4, ADN tổng số tách chiết không bị đứt gãy và ARN đã bị loại bỏ hoàn toàn, có thể đảm bảo yêu cầu chất lượng cho phản ứng PCR. Còn ở giếng 1 và giếng 2, ngoài ADN tổng số vẫn còn ARN chưa bị loại bỏ và ARN tạo vệt sáng cuối cùng ở bản gen.

3.2. Nhân đoạn trình tự của gen 18S ARNr bằng kỹ thuật PCR

Ở các loài thực vật nói chung, đoạn gen 18S ARNr được các nhà khoa học đánh giá là vùng có ý nghĩa ổn định về mặt tiến hóa. Do vậy, trình tự nucleotide trên vùng này thường được sử dụng để xác định mối quan hệ tiến hóa và phát sinh chủng loại giữa các loài. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn trình tự nucleotide trên đoạn gen 18 ARNr để nghiên cứu nhằm hướng tới những phân loại trà trong chi *Camellia*.

3.2.1. Thiết kế và tổng hợp cặp môi đặc hiệu cho gen 18S ARNr của cây trà.

Để thực hiện được phản ứng PCR cần phải có đầy đủ các yếu tố: đoạn ADN khuôn (template DNA), cặp môi (primer), ADN polymerase, các loại dNTP và dung dịch đệm thích hợp. Vì vậy, cùng với việc tách chiết ADN tổng số chúng tôi đã tiến hành thiết kế cặp môi để nhận được đoạn ADN của gen 18S ARNr.

Dựa trên một số trình tự ở 2 đầu đoạn gen 18S ARNr của một số loài thực vật bậc cao đã được công bố, chúng tôi đã thiết kế cặp môi có kích thước 21bp. Đây là vùng bảo thủ cao trong tiến hóa. Vì vậy, chúng tôi dự đoán vùng bảo thủ này cũng có mặt trong trình tự gen 18S ARNr của các loài trong chi *Camellia*. Theo lý thuyết, sử dụng cặp môi này sẽ nhận được đoạn gen 18S ARNr có kích thước khoảng 1,7 Kb.

Cặp mồi chúng tôi thiết kế được có kích thước và trình tự như sau:

Mồi xuôi (ký hiệu BVB): 3' - GCGATCCGAACACTTCACCGG-5'

Mồi ngược (ký hiệu BVF): 5' - GCTTGTTCTCAAGTTAAGCC-3'

TC18S	NNNNGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCAAAGATTAAGCCATGCA	55
MC18S	GTCATATGCTTGTCAAAGATTAAGCCATGCA	33
TC18S	TGTGTAAGTATGAACTAATTCAGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG	110
MC18S	TGTGTAAGTATGAACTAATTCAGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG	88
TC18S	TTATAGTTTGTGGATGGTATCTGCTACTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCT	165
MC18S	TTATAGTTTGTGGATGGTATCTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCT	143
.....		
TC18S	AAGCGCGAGTCATCCAGCTCGCNNTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC	1648
MC18S	AAGCGCGAGTCATCAGCTCANNNTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCFCC	1627
TC18S	CGTCGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCCGGATCGCNGCGACGTGG	1703
MC18S	CGTCGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCCGGATCGCGGCGACGTGG	1682

MC: *Menispermum canadense*

TC: *Tinospora caffra*

Hình 2: So sánh trình tự nucleotit ở đoạn đầu và đoạn cuối của đoạn gen 18S ARNr của 2 loài thuộc 2 chi trong họ *Menispermaceae* để thiết kế đoạn mồi 18S ARNr.

3.2.2. Nhân đoạn ADN bằng kỹ thuật PCR

Chúng tôi tiến hành phản ứng PCR để nhân đoạn gen 18S ARNr từ ADN tổng số của 2 loài trong chi *Camellia* là *Camellia crasiphyla* và *Camellia tamdaonensis* nhờ sử dụng cặp mồi đã được thiết kế và tổng hợp và BVF và BVB.

Phản ứng nhân đoạn gen 18S ARNr gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn chính như sau:

- Giai đoạn 1: giai đoạn làm biến tính ADN
- Giai đoạn 2: giai đoạn gắn mồi

Nhiệt độ gắn mồi phải thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của các mồi để cho các đoạn mồi gắn với nhau theo trình tự tương hợp trên phân tử ADN làm khuôn. Đồng thời nhiệt độ gắn mồi cũng không được quá thấp khiến cho khuôn bị tiến tính, nó phụ thuộc vào từng loại mồi, cụ thể có thể tính toán dựa trên nhiệt độ nóng chảy (Tm) của đoạn mồi.

Tuy nhiên, để dễ dàng trong việc tính toán nhiệt độ nóng chảy của đoạn mồi, chúng tôi sử dụng công thức tính đơn giản của Chaw S. M:

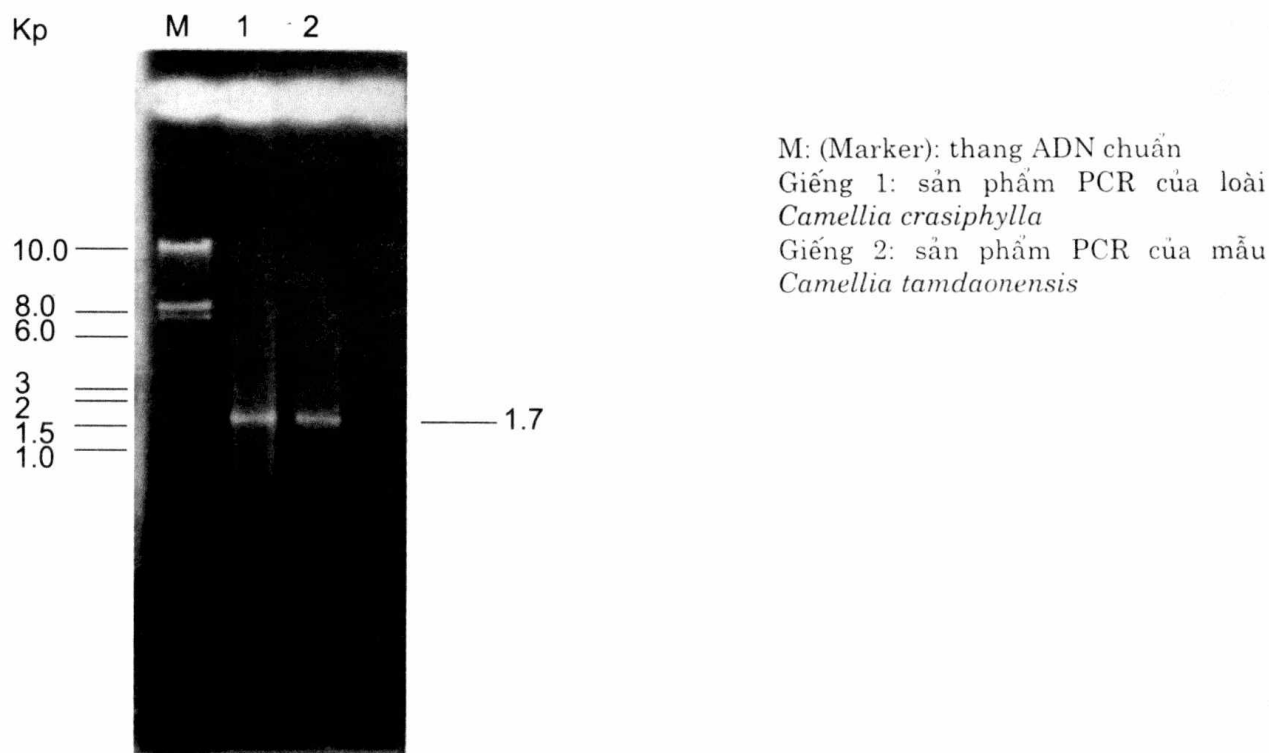
$$T_m = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C) + 3,3^{\circ}C$$

Trong đó:

- A: Adenin - T: Timin
- G: Guanin - C: Cytosin

- Giai đoạn 3: giai đoạn kéo dài chuỗi

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, chúng tôi đã kiểm tra sản phẩm ADN trên gel agarose 1% và thu được kết quả trên hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Kết quả phổ điện di cho thấy ở cả hai loại trà chúng tôi đều thu được sản phẩm PCR vào khoảng 1,7 kb. Đây là kích thước đặc trưng cho gen mã hóa 18S ARNr có tính bảo thủ cao trong quá trình tiến hóa và phát sinh chủng loại nên phương pháp phân loại phân tử có thể đánh giá sự khác nhau giữa các loài dựa trên những trình tự sắp xếp của các nucleotide trên gen 18S ARNr. Tuy nhiên, để đánh giá sự khác biệt các đoạn trình tự 18S ARNr của các loài trong chi *Camellia* đã được nêu lên, cần nghiên cứu sâu hơn thông qua các phương pháp phân tích chọn dòng và giải trình tự nucleotide của các đoạn gen này.

4. Kết luận

1. Tách chiết và tinh sạch được ADN tổng số từ hai loại trà trong chi *Camellia* là *Camellia crassiphylla* Ninh et Hakoda và *Camellia tamdaonensis*

2. Thiết kế được cặp mồi BVF và BVB đặc hiệu để nhân đoạn gen mã hóa 18S ARNr ở chi *Camellia*

3. Nhân được đoạn gen mã hóa 18S rARN có kích thước 1.7kb của hai loài thuộc chi *Camellia* bằng kỹ thuật PCR.

Cặp mồi chúng tôi thiết kế được có kích thước và trình tự như sau:

Mồi xuôi (ký hiệu BVB): 3' - GCGATCCGAACACTTCACCGG-5'

Mồi ngược (ký hiệu BVF): 5' - GCTTGTCTCAAGTTAAGCC-3'

		Primer BVB →	
TC18S	NNNNGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCAAAGATTAAGCCATGCA		55
MC18S	GTCATATGCTTGTCAAAGATTAAGCCATGCA		33
TC18S	TGTGTAAGTATGAACTAATTCAGACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG		110
MC18S	TGTGTAAGTATGAACTAATTCAGACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG		88
TC18S	TTATAGTTTGTGGATGGTATCTGCTACTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCT		165
MC18S	TTATAGTTTGTGGATGGTATCTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCT		143
.....			
TC18S	AAGCGCGAGTCATCCAGCTCGCENNTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC		1648
MC18S	AAGCGCGAGTCATCAGCTCENNTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCFCC		1627
TC18S	CGTCGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCCGGATCGCNGCGACGTGG		1703
MC18S	CGTCGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCCGGATCGCGGCGACGTGG		1682
		← Primer BVF	

MC: *Menispermum canadense*

TC: *Tinospora caffra*

Hình 2: So sánh trình tự nucleotit ở đoạn đầu và đoạn cuối của đoạn gen 18S ARNr của 2 loài thuộc 2 chi trong họ *Menispermaceae* để thiết kế đoạn mồi 18S ARNr.

3.2.2. Nhân đoạn ADN bằng kỹ thuật PCR

Chúng tôi tiến hành phản ứng PCR để nhân đoạn gen 18S ARNr từ ADN tổng số của 2 loài trong chi *Camellia* là *Camellia crasiphyla* và *Camellia tamdaonensis* nhờ sử dụng cặp mồi đã được thiết kế và tổng hợp và BVF và BVB.

Phản ứng nhân đoạn gen 18S ARNr gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn chính như sau:

- Giai đoạn 1: giai đoạn làm biến tính ADN
- Giai đoạn 2: giai đoạn gắn mồi

Nhiệt độ gắn mồi phải thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của các mồi để cho các đoạn mồi gắn với nhau theo trình tự tương hợp trên phân tử ADN làm khuôn. Đồng thời nhiệt độ gắn mồi cũng không được quá thấp khiến cho khuôn bị tiến tính, nó phụ thuộc vào từng loại mồi, cụ thể có thể tính toán dựa trên nhiệt độ nóng chảy (Tm) của đoạn mồi.

Tuy nhiên, để dễ dàng trong việc tính toán nhiệt độ nóng chảy của đoạn mồi, chúng tôi sử dụng công thức tính đơn giản của Chaw S. M:

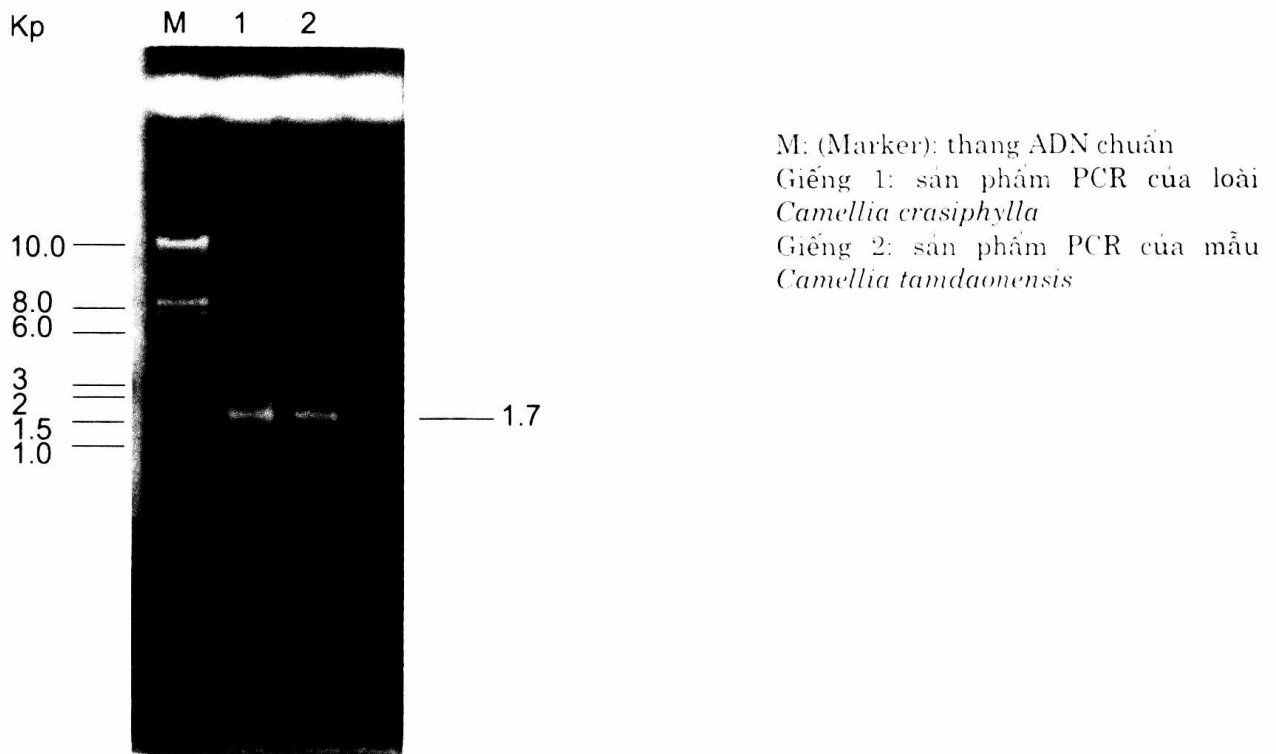
$$Tm = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C) + 3,3^{\circ}C$$

Trong đó:

- A: Adenin - T: Timin
- G: Guanin - C: Cytosin

- Giai đoạn 3: giai đoạn kéo dài chuỗi

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, chúng tôi đã kiểm tra sản phẩm ADN trên gel agarose 1% và thu được kết quả trên hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Kết quả phổ điện di cho thấy ở cả hai loại trà chúng tôi đều thu được sản phẩm PCR vào khoảng 1,7 kb. Đây là kích thước đặc trưng cho gen mã hóa 18S ARNr có tính bảo thủ cao trong quá trình tiến hóa và phát sinh chủng loại nên phương pháp phân loại phân tử có thể đánh giá sự khác nhau giữa các loài dựa trên những trình tự sắp xếp của các nucleotide trên gen 18S ARNr. Tuy nhiên, để đánh giá sự khác biệt các đoạn trình tự 18S ARNr của các loài trong chi *Camellia* đã được nêu lên, cần nghiên cứu sâu hơn thông qua các phương pháp phân tích chọn dòng và giải trình tự nucleotide của các đoạn gen này.

4. Kết luận

1. Tách chiết và tinh sạch được ADN tổng số từ hai loại trà trong chi *Camellia* là *Camellia crassiphylla* Ninh et Hakoda và *Camellia tamdaonensis*

2. Thiết kế được cặp mồi BVF và BVB đặc hiệu để nhân đoạn gen mã hóa 18S ARNr ở chi *Camellia*

3. Nhân được đoạn gen mã hóa 18S rARN có kích thước 1.7kb của hai loài thuộc chi *Camellia* bằng kỹ thuật PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vô Văn Chi và Trần Hợp, *Cây cỏ có ích ở Việt Nam*, NXB Giáo dục, Hà Nội, 1999, 700tr
2. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, MeKong Printing Montrea, 1991, 430tr.
3. Nguyễn Văn Mùi, Bùi Thị Mai Hương, Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của một số loài trà hoa trắng (*Camellia*) ở vườn quốc gia Tam Đảo bằng kỹ thuật RAPD-PCR, *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Hội nghị khoa học toàn quốc 2004, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2004, tr. 529-532.
4. Trương Quốc Phong, Nguyễn Văn Mùi, Nhân đoạn ITS₁-AND_r 5,85-ITS₂ bằng kỹ thuật PCR để phân loại một số loài trà (*Camellia*), *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2003, tr.1191-1194.
5. Trương Quốc Phong, Nguyễn Văn Mùi, Tách dòng 2 đoạn gen ITS₁-5,85-ITS₂ và microsatellite locus 37 dùng để phân loại hai loài trà vàng *Camellia cucphuongensis* và *Camellia Hava*. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Hội nghị khoa học toàn quốc 2004, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2004, tr. 192-195.
6. Nguyễn Nghĩa Thìn và Đặng Thị Sy, *Hệ thống thực vật*, NXB Giáo dục, Hà Nội, 1998, 250tr.
7. Carl W. Dieffenbach and Gabriela S. Drexler, *PCR primer a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, 390p.
8. Roger J et al. Extraction of total cellular DNA from plant, algae and fungi. *Plant Molecular Biology*. Khoner Acedemic Publishers, 1994, 280p.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N_o4, 2004

DESIGNING PAIR OF PRIMER TO AMPLIFY 18S RRNA GENE OF TWO YELLOW TEA SPECIES BELONG TO CAMELLIAGENUS AT TAM DAO NATIONAL PARK. (*CAMELLIA CRASSIPHYLLA* AND *CAMELLIA TAMDAONENSIS*)

Nguyen Van Mui, Nguyen Trong Binh

Department of Biology, College of Science, VNU

Camellia genus has high economic value. It is necessary to accurately classify it into correct categories in order to find out suitable conservative methods of camellia gene source and biodiversity. Typically, it is classified by traditional methods but it is neither economic nor accurate. Therefore, molecular biology methods are employed. To do this, genomic DNA was first extracted from two yellow tea species (*Camellia crassiphylla* and *Camellia tamdaonensis*).

A pair of primers based on conservative sequence at two terminals of 18S rRNA gene of high class plants were designed.

18S rRNA gene was amplified using above pair of primers, resulting in one 1.7kb length band.