

NHÂN DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ MỘT SỐ GEN THAM GIA VÀO QUÁ TRÌNH TẠO CƠ VÀ MỠ Ở BÒ VÀNG VIỆT NAM

Đào Văn Cường^{1,2}, Phạm Diệu Thùy¹, Dương Thị Hồng Duyên¹, Nguyễn Quang Tính¹, Từ Trung Kiên¹, Lưu Hồng Sơn³, Nguyễn Thị Thanh Hà⁴, Nguyễn Thanh Hải⁵, Nguyễn Ngọc Lương^{6,*}

¹ Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

² Văn phòng SPS Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

³ Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

⁴ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁵ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁶ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

* Email: luongnguyenbio@hueuni.edu.vn

TÓM TẮT

Tế bào gốc vệ tinh (satellite stem cell) đóng vai trò quan trọng trong quá trình duy trì và tái tạo cơ. Là một loại tế bào gốc thuộc nhóm trung mô, chúng có thể biệt hoá thành tế bào tiền thân của tế bào cơ, tiền thân tế bào sợi và tế bào mỡ. Ngày nay, với việc thịt bò Wagyu trở nên rất phổ biến trên thế giới cũng như tại Việt Nam, thịt bò có tỉ lệ mỡ giắt cao ngày càng được ưa chuộng. Tuy giống bò vàng Việt Nam được nuôi để lấy thịt, khả năng cho thịt cũng như tỉ lệ mỡ giắt của bò vàng còn chưa tối ưu. Nhằm đặt nền móng cho việc nghiên cứu sâu về cơ chế cho thịt cũng như tạo mỡ giắt ở giống bò vàng Việt Nam để cải thiện chất lượng thịt bò vàng thông qua lai giống, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Long-Range PCR nhằm tạo dòng và giải trình tự các gen tham gia vào quá trình phát triển cơ và tạo mỡ giắt, gồm các gen Pax3, Pax7, Mrf4, Myf5, Myod1, MyMyog và PPARy. Bài viết này trình bày kết quả tạo dòng, giải trình tự bằng phương pháp Sanger và phân tích đa hình 7 gen mã hoá protein liên quan đến quá trình phát triển cơ cũng như kiểm soát tỉ lệ mỡ giắt của giống bò vàng Việt Nam, sử dụng nguyên liệu là tế bào gốc vệ tinh nuôi cấy *in vitro*.

Từ khoá: Bò vàng Việt Nam, tế bào gốc vệ tinh, Long-range PCR, gen tham gia quá trình phát triển cơ và mỡ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bò vàng Việt Nam là tên gọi chung để chỉ nhiều nhóm bò bản địa được nuôi ở nhiều địa phương khác nhau tại Việt Nam. Chúng có thể có tên gọi khác nhau, thường theo tên địa phương hoặc dân tộc nuôi các giống bò này, ví dụ bò H'Mông, bò vàng Thanh Hoá, bò vàng Châu Đốc v.v... Theo giả thuyết hiện nay, bò vàng là con lai của 2 giống bò du nhập vào Việt Nam: Bò vàng Trung Quốc (*Bos taurus*) và bò u Ấn Độ (*Bos indicus*) [1]. Theo điều tra, hiện Việt Nam có bảy nhóm bò vàng khác nhau [2]. Tuy có nguồn gốc ngoại nhập, bò vàng đã tồn tại và phát triển tốt trên nhiều địa phương do đó được xem là giống bò bản địa. Ưu điểm của giống bò này là thích

ứng tốt với điều kiện khí hậu tại Việt Nam, thời gian lên giống sớm, không kén chọn thức ăn [1]. Tuy nhiên nhược điểm của giống bò này là khả năng cho thịt chưa cao và tỉ lệ mỡ giắt ít [1, 3].

Tế bào gốc vệ tinh thường không hoạt động nhưng khi cơ bị tổn thương, tế bào gốc vệ tinh sẽ được hoạt hoá, đi vào chu trình phân bào. Chúng sẽ di chuyển, biệt hoá và hợp nhất để tạo thành các tế bào cơ mới [4]. Các chỉ thị phân tử đặc trưng cho tế bào gốc vệ tinh gồm các nhân tố phiên mã paired box (Pax3, Pax7) là các chỉ thị nội bào, và một số nhân tố phiên mã khác như Myf5 và Myod1. Trong số này Pax7 thường được sử dụng làm chỉ thị nội bào để nhận biết tế bào vệ tinh đang hoạt động [4].

Ngoài ra, vai trò của các gen *Mrf4*, và *Myog* trong quá trình phát triển cơ cũng đã được xác nhận. Ở bò đã xác định được *Myod1* và *Myf5* đóng vai trò quan trọng nhất trong quá trình cho thịt [5].

Ngoài khả năng biệt hoá thành tế bào cơ, tế bào gốc vệ tinh còn có thể biệt hoá thành tế bào mỡ, đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành mỡ giết, tức là mỡ trong cơ, ở bò [6]. Quá trình hình thành mỡ được chứng minh là do gen mã hoá thụ thể PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ) chi phối [7]. PPAR γ được cho là tạo ra nhiều circRNA (circular RNA-circRNA) có khả năng kích thích biệt hoá thành tế bào mỡ [8].

Sự điều hoà biểu hiện khác nhau của các gen tham gia vào quá trình tạo cơ và mỡ ở gia súc được cho là nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt về khả năng tạo thịt và chất lượng thịt [9]. Nhiều nghiên cứu cho thấy cơ chế của sự điều hoà khác nhau này là do đa hình nucleotide ở các gen tham gia vào quá trình tạo thịt và tạo mỡ, trong đó có PPAR γ , Pax3, Pax7, Myf5. Sự đa hình không chỉ nằm ở vùng mang mã mà có thể nằm ở vùng điều hoà của gen [10, 11]. Để thay thế cho việc phát hiện các đa hình này bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen, một cách tiếp cận phổ biến khác là nghiên cứu đa gen (gene panel) bằng cách khuếch đại gen quan tâm bằng PCR [12].

Do bò vàng là bò lai giữa *Bos taurus* và *Bos indicus* nên bộ gen bò vàng có khả năng mang các nhiễm sắc thể (NST) của cả hai giống bò [1, 13]. Nhằm tìm hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của quá trình phát triển cơ và biệt hoá mỡ ở giống bò vàng Việt Nam, nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật Long-range PCR [14] để khuếch đại nhóm đa gen gồm Pax3, Pax7, *Mrf4*, Myf5, Myod1, Myog, và PPAR γ nhằm tìm kiếm những đa hình có khả năng liên quan đến khả năng cho thịt và tỉ lệ mỡ giết của thịt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là tế bào gốc vệ tinh bò vàng Việt Nam được phân lập và nuôi cấy bởi phòng thí nghiệm chuyên sâu, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên. Tế bào được

duy trì trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bổ sung 15% huyết thanh bào thai bò (FBS). Chai nuôi T-flask (25 cm²) chứa tế bào gốc vệ tinh của bò vàng Việt Nam ở độ bão hoà giả thể nuôi 80%.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

Tế bào được tách khỏi bình nuôi bằng enzyme collagenase (BioLegend Acutase cat No 424201) và rửa sạch enzyme bằng đệm PBS, sau đó tái huyền phù tế bào vào 800 μ l đệm PBS. Tiến hành tách ADN tổng số bằng kit FavorPrepTM Tissue Genomic ADN Extraction kit (Favorgen, cat No FATGK 001-2) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ ba bình nuôi cấy đại diện cho ba dòng tế bào gốc vệ tinh của bốn cá thể bò vàng tách chiết được tổng cộng 200 μ l ADN tổng số mỗi bình. Nồng độ ADN tổng số được xác định bằng phương pháp quang phổ UV 260/280 và điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

2.2.2. Thiết kế môi khuếch đại

Trình tự đầy đủ của các gen Pax3, Pax7, PPAR γ , Myf5, *Mrf4*, Myod1 và Myog của *B. taurus* và *B. indicus* được thu nhận từ cơ sở dữ liệu (CSDL) Gene của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (NCBI). Để tìm hiểu thêm về trình tự điều hoà (promoter & terminator) của các gen này, đối với các gen có kích thước bé (<7 kb), mở rộng trình tự gen tham chiếu trên NCBI về hai phía thêm từ 1 - 2 kb. Đối với các gen có kích thước lớn (>60 kb), mở rộng trình tự gen tham chiếu về hai phía thêm 10 kb. Đối với các gen có kích thước bé, tiến hành thiết kế môi và chọn một cặp môi đặc hiệu duy nhất để thử nghiệm. Đối với gen có kích thước lớn, tiến hành thiết kế các cặp môi có khả năng khuếch đại sản phẩm kích thước từ 6 – 10 kb sao cho các sản phẩm chồng lấp nhau ít nhất 200 bp. Phần mềm PrimerBLAST được sử dụng để thiết kế các cặp môi này [15].

Quy trình thiết kế môi đặc hiệu được tiến hành bằng hai bước: ở bước 1, sử dụng khuôn là mã truy cập trình tự gen quan tâm có kéo dài thêm ở hai đầu 5' và 3' và sử dụng phần mềm PrimerBLAST để tìm kiếm môi đặc hiệu theo các thông số định sẵn gồm chiều dài, tỉ lệ phần trăm GC, nhiệt độ gắn môi, vị trí

mỗi trên khuôn và “GC clamp” (GC bắt buộc ở đầu 3’ của mỗi); nếu bước 1 không tìm thấy mỗi đặc hiệu, sử dụng một phần mềm thứ 3: Ví dụ Primer3Plus hoặc PrimerQuest để thiết kế mỗi theo thông số định sẵn, sau đó dùng PrimerBLAST để chọn cặp mỗi đặc hiệu.

2.2.3. Quy trình phản ứng Long-range PCR

Quy trình PCR được thực hiện như sau. Chuẩn bị khoảng 80 - 100 ng khuôn (DNA tổng số) cho mỗi phản ứng. Enzyme AND Polymerase được thăm dò để tìm ra enzyme tối ưu gồm 3 enzyme có khả năng đọc lỗi và khuếch đại các sản phẩm nhiều GC: Phusion™ High Fidelity AND Polymerase, Platinum™ Superfi™ AND Polymerase (Thermofish scientific, Cat No lần lượt là F530S và 12351010) và Q5® của NEB (Cat No M0491S). Tổng thể tích phản ứng là 50 µl trong đó gồm: Dệm (5 - 10 µl), mỗi (2 µl, nồng độ 10 pmol), dNTP (2 µl, nồng độ 200 µM), enzyme AND Polymerase (0,25-0,3 µl), DMSO (tuỳ trường hợp), khuôn (2 µl) và nước cất. Mỗi enzyme nói trên được sử dụng cho hai quy trình phản ứng PCR trong trường hợp sản phẩm phản ứng không đặc hiệu sau khi đã thăm dò nhiệt độ gắn mỗi, hoặc không đủ lượng sản phẩm. Quy trình phản ứng PCR thứ nhất gồm: 2 phút biến tính ở 98°C theo sau bởi 30 chu kỳ gồm 98°C trong 10 giây, 58 - 65°C trong 30 giây, 72°C với 15 giây/1 kb - 72°C trong 10 phút và 4°C trong 10 phút. Nếu quy trình này chưa cho kết quả tối ưu, tiến hành quy trình phản ứng PCR như sau: 2 phút biến tính ở 98°C, 10 chu kỳ gồm 98°C trong 10 giây, 58 - 65°C trong 30 giây, 72°C với 15 giây/1 kb theo sau bởi 25 chu kỳ gồm 98°C trong 10 giây, 58 - 65°C trong 30 giây, 72°C với 1 phút/1 kb - 72°C trong 10 phút và 4°C trong 10 phút [16].

2.2.4. Tinh sạch và giải trình tự

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% và tinh sạch bằng kit FavorPrep™ GEL/PCR purification kit (Favorgen FAEPK cat No 001-1B). Do kích thước sản phẩm lớn, để có đủ lượng ADN đáp ứng yêu cầu giải trình tự Sanger (nồng độ tối thiểu 20 ng/µl), tiến hành dồn từ 3 - 5 mẫu PCR và rửa bằng phương pháp Ethanol/Natri acetate. Sản phẩm được gửi đi giải trình tự Sanger dịch vụ Primerwalk (FirstBase) với mỗi được thiết kế hai chiều sao cho tổng chiều dài đọc được khoảng từ

1,2 - 1,4 kb và các vùng trình tự được đọc chồng lấp nhau để có thể lắp ráp. Kết quả đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm Snapgene version 7.0 để loại bỏ các base có chất lượng kém, sau đó lắp ráp thành contig. Các trình tự lắp ráp được đăng ký ở ngân hàng Genbank Nucleotide.

2.2.5. Phân tích đa hình

Để xác định các đa hình có ảnh hưởng đến sự khác biệt trong quá trình tạo mỡ và phát triển cơ của bò vàng Việt Nam, tiến hành sắp giống cột nhiều trình tự các gen đã giải trình tự với trình tự tham chiếu của *Bos taurus* và *Bos indicus* sử dụng phần mềm MEGA 11 [17]. Các vị trí đa hình được tổng kết vào một bảng và đối chiếu với các đa hình đã được ghi nhận trước đây.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết AND tổng số

Từ 3 dòng tế bào gốc vệ tinh bò vàng Việt Nam thu nhận được 3 mẫu AND tổng số. Kết quả đo quang phổ cho nồng độ AND khoảng 30-40 ng/µl với tỉ lệ A260/280 đạt 1,9. Như vậy, lượng ADN tổng số thu được khoảng từ 6 - 8 µg cho mỗi chai T-flask. Kết quả điện di kiểm tra ADN tổng số được trình bày ở hình 1A. Dựa trên kết quả này có thể thấy, ADN có độ nguyên vẹn cao, ít bị đứt gãy.

3.2. Thiết kế mỗi

Bảng 1 trình bày một số thông tin về khuôn sử dụng để thiết kế mỗi, bao gồm mã truy cập trình tự cho *Bos taurus* và *Bos indicus*, độ dài gen (chưa tính vùng mở rộng về hai phía) và tổng số exon của gen. Bảng 1 cũng trình bày số lượng cặp mỗi cần thiết để có thể nhân dòng toàn bộ gen bao gồm cả vùng mở rộng, với kích thước sản phẩm PCR là từ 6 - 10 kb. Mặc dù các cặp mỗi thiết kế đều đặc hiệu dựa trên đánh giá của PrimerBLAST, qua đánh giá thực tế không phải cặp mỗi nào cũng cho sản phẩm đặc hiệu hoặc khuếch đại thành công, do đó cứ mỗi sản phẩm PCR dự kiến, thiết kế ba cặp mỗi đặc hiệu và đánh giá hiệu quả khuếch đại của chúng để từ đó chọn ra một cặp mỗi tốt nhất.

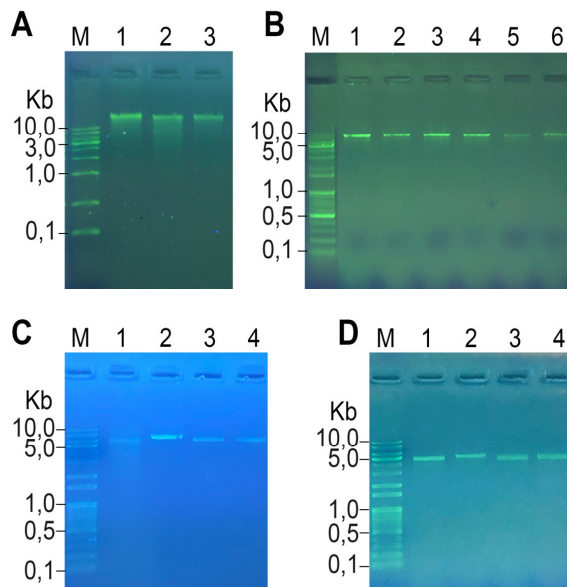
Do số lượng cặp mỗi thiết kế khá lớn, chọn không trình bày tất cả trình tự của chúng ở đây. Bên cạnh đó, một số cặp mỗi không cho kết quả khuếch đại như ý muốn dựa trên khảo sát 3 loại enzyme AND Polymerase đã sử dụng. Bảng 2

trình bày trình tự của một số cặp mỗi khuếch đại enzyme nói trên.
thành công sản phẩm bằng một trong 3 loại

Bảng 1. Thông tin gen tham gia vào quá trình phát triển cơ và tạo mỡ giắt ở hai giống bò

STT	Tên gen	Mã truy cập <i>B. taurus</i> / <i>B. indicus</i>	Độ dài (kb) <i>B. taurus</i> / <i>B. indicus</i>	Tổng số exon <i>B. taurus</i> / <i>B. indicus</i>	Tổng số cặp mỗi cần thiết
1	Mrf4	281336/109558938	1818/1840	3/3	1
2	Myf5	281335/109558941	3236/6770	3/4	1
3	Myod1	281938/109569822	2648/2698	3/3	1
4	Myog	281343/-	2841/-	3/-	1
5	Pax3	540951/109576904	101773/103727	9/8	14/14
6	Pax7	536229/109576201	67126/107645	8/9	9/16
7	PPAR γ	281993/109576385	65233/132241	7/8	10/22

3.3. Nhân dòng và giải trình tự



Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số và sản phẩm long-range PCR của 7 gen điều hoà phát triển cơ và biệt hoá mỡ của giống bò vàng Việt Nam

Sử dụng các cặp mỗi được thiết kế, 4 gen Myf5, Mrf4, Myod và Myog được nhân dòng thành công. Kết quả điện di được trình bày ở hình 1D. Các gen được khuếch đại thành công theo thứ tự trên gel lần lượt là: Từ đường chạy số 1 đến số 4, Mrf4, Myf5, Myod1, Myog. Đối với 3 gen có kích thước >60 kb, chỉ một số cặp mỗi (Bảng 2) cho kết quả khuếch đại thành công dùng một trong ba enzyme sau khi đã tối ưu điều kiện phản ứng cho enzyme này. Kết quả này tương tự đối với một số loại enzyme thương mại đã được khảo sát trong

một nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu này chỉ ra rằng, chỉ có enzyme GXL của Takara có thể khuếch đại một cách đáng tin cậy các sản phẩm có kích thước > 9 kb còn các enzyme khác cần tối ưu rất nhiều điều kiện [15].

Với gen PPAR γ có kích thước dự đoán khoảng 65,2 kb đối với *B. taurus* và khoảng 150 kb đối với *B. indicus*, trong số các cặp mỗi được thiết kế, chỉ có 4 cặp mỗi có khả năng khuếch đại thành công với kích thước sản phẩm PCR xấp xỉ 6 kb. Kết quả khuếch đại PPAR γ được trình bày ở hình 1C. Với gen Pax3 có kích thước dự đoán khoảng 100 kb cho cả hai giống bò, chỉ có 3 cặp mỗi cho sản phẩm đặc hiệu, với kích thước từ 8,6 - 8,9 kb. Kết quả khuếch đại Pax3 được trình bày ở hình 1B, đường chạy số 4 - 6. Với gen Pax7, kích thước dự đoán là 67 kb cho *B. taurus* và 107 kb cho *B. indicus*, chỉ có 3 cặp mỗi cho sản phẩm đặc hiệu, với kích thước từ 8,8 - 9,1 kb. Kết quả khuếch đại Pax7 được trình bày ở hình 1B, đường chạy số 1 - 3. Thông tin các cặp mỗi khuếch đại thành công các sản phẩm của 7 gen này được trình bày ở bảng 2. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger kết hợp primer-walking (giải trình tự các đoạn ngắn chồng lấp nhau để lắp ráp thành gen đầy đủ), trình tự của các gen Mrf4, Myf5, Myod1 và Myog được giải trình tự tương đối đầy đủ với vùng giải trình tự có kích thước từ 3 - 4,4 kb. Trong khi đó, giải trình tự các đoạn gen của Pax3, Pax7 và PPAR chỉ cho kết quả khoảng 2,6 - 5,4 kb do nhiều vùng trình tự chứa tỉ lệ GC cao. Căn cứ vào việc không thể giải đầy đủ trình tự các đoạn gen bằng phương pháp Sanger, chúng tôi đề xuất giải trình tự các gen này

bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong nghiên cứu tiếp theo, như đã thực hiện trong một nghiên cứu sử dụng long-range PCR trước đây [15]. Kết quả giải trình tự Sanger 7 gen nói trên được đăng ký ở ngân hàng NCBI Genbank. Mã truy cập cho các gen này lần lượt là: Mrf4

(OR554977), Myf5 (OR631211), Myod1 (OR554978), Myog (OR554979), Pax3 (OR631213), Pax7 (PP766426) và PPARy (OR641253).

Bảng 2. Thông tin trình tự mỗi của các sản phẩm được khuếch đại thành công

Tên gen	Mỗi xuôi (5'→3')	Mỗi ngược (5'→3')	Kích thước sản phẩm (bp)
Mrf4	GACATAGCCTTATGCTTTCC	TCTCTGCTCCAAAGTATCC	4850
Myf5	GTTAGTTTGCCTGAAAGC	TATCAAGTACATTTGCAAGC	5176
Myod1	CCTCTATGTGTGTGTGTCC	TGTTGGTCTGCAAACTCC	4564
Myog	TCAAGCCTGTTGTGAAGG	TGGTGTCTAAATTGGGTAGG	4746
Pax3	CCAGTACACTCAGTCCCCGTGC	AGAGCCCAAGTTCTGGTGACTTTC	8826
	GGCATTCCTGAGAAGTGGTCAGTC	AGGGAGAGGGCCACTAGCTTTCC	8637
	GAGCAAACCTGCAGCAGAGAATGGC	CCAGAGGATCCCCAGTTGTTTGG	8965
Pax7	CCTCCGAGGTCTAGTATTGTCC	CACCCTCGACAGATCAGTTTCC	8962
	GAAACGCGCTTCCTGACTTCTCC	ATACGGGTCCCCCGAAAGGAC	9101
	GCAGAAAGGTGGTTGAACGCTGC	CAGCCTTCCTCACCCAGACGTG	8804
PPARG	CACCCAAACTAAGCACCTCG	GCCCCGAATCAAGCATACC	5705
	GTCCTGTGGTTCTTACTACCC	TCAGTTTTCCCACAGATCGC	6792
	TAGCTCTTAGTGACCACAACCC	TGAATCCAGAGGAGTCCTTACC	6203
	AGTATTGTTGGTGAGCTAAGGC	AGCAGCGTAGGGTTTGTACC	6054

3.4. Phân tích đa hình

Kết quả giải trình tự của 7 gen của bò vàng Việt Nam được sắp giống cột với các gen tương ứng của *B. taurus* và *B. indicus*. Vị trí đa hình được xác định là vị trí có sự sai khác nucleotide của bò vàng Việt Nam với một trong hai giống bò nói trên. Vị trí đa hình được đánh số theo số thứ tự của trình tự gen bò vàng Việt Nam đã đăng ký trên ngân hàng GenBank. Bảng 3 tổng kết các vị trí đa hình được phát hiện. Ký hiệu ins tương đương với chèn nucleotide, ký hiệu - tương đương mất nucleotide. Trong các vị trí đa hình này, một số vị trí đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Cụ thể, vị trí đa hình 1196A→T của Myf5 (đa hình 526T/A theo nghiên cứu của Ujan và cs (2011) [18] được cho là có liên quan đến độ dày mỡ và độ mềm thịt của bò (*B. taurus*) và 2535G→A (1948A/G theo Li và cs (2004) [19] của gen Myf5 đã được chứng minh là có liên quan đến khối lượng bò mới sinh và tốc độ sinh trưởng sau

khi cai sữa. Các gen nói trên không mang các đa hình đã được báo cáo trước đây bởi Wang và cs (2010) [20] và Du và cs (2013) [21], bao gồm: Đa hình các vị trí cắt của *Xba*I ở Mrf4, đa hình 782G/A ở exon 1 của Myod1 và 186T/C ở exon 1 của Myog. Tuy nhiên, đánh giá sự biểu hiện các gen Mrf4, Myf5, Myod1, Myog ở tế bào gốc vệ tinh thu nhận từ bò vàng Việt Nam và tế bào gốc vệ tinh thu nhận từ bò Hanwoo cho thấy sự biểu hiện của các gen nói trên ở tế bào gốc vệ tinh bò vàng Việt Nam thấp hơn so với ở tế bào gốc vệ tinh Hanwoo [22]. Điều này cho thấy có khả năng những đa hình khác cũng đóng vai trò điều hoà chưa được làm rõ đối với sự biểu hiện của các gen này. Trong tương lai cần có sự nghiên cứu trên nhiều cá thể bò vàng Việt Nam hơn để xác định các đa hình đặc trưng cho giống bò vàng Việt Nam, đồng thời có thể đóng vai trò điều hoà quá trình tạo thịt ở bò.

Bảng 3. Đa hình của gen điều hoà phát triển cơ và mỡ ở Bò vàng Việt Nam

Gen (Mã truy cập)	Việt Nam	<i>B.</i> <i>taurus</i>	<i>B.</i> <i>indicus</i>	Gen (Mã truy cập)	Việt Nam	<i>B.</i> <i>taurus</i>	<i>B.</i> <i>indicus</i>
Mrf4 (OR554977)	151G	A	A	Myf5 (OR631211)	527C	A	A
	152A	A	-		606G	A	A
	167C	G	G		857A	C	C
	226T	C	C		860G	T	T
	360 Ins (GTGG)	-	-		1196A	T	T
	593G	C	S		1415T	G	G
	599C	C	G		1422T	A	A
	756G	A	A		1461T	G	G
	874T	C	C		1917C	T	C
	914C	G	G		1959A	G	G
	1696C	T	T		1980G	A	A
	2123A	C	C		2294C	T	T
	2137G	T	T		2382T	C	C
	2420G	C	S		2513A	G	G
	2884-	Ins (A)	-		2535G	A	R
	3007-	T	T		2542C	G	G
	3015C	T	T		2560A	G	G
	3016A	C	C		3455C	T	T
	3017-	AT	AT		3501G	A	A
	3026G	T	T				
Myod1 (OR554978)	1139C	C	T	Myog (OR554979)	964T	C	C
	1867G	A	G		1056C	G	G
	1901A	C	M		1592T	C	C
	2043A	A	G		1619-	-	Ins (C)
	2366T	C	Y		1671G	G	A
	3527G	T	K		1749-C	-	CC
	3749G	A	A		1753TC	CT	CT
	3829C	C	T		1960G	G	-
	3867 Ins (T)	-	-		2302T	C	C
	4046A	T	A		2763A	G	G
	4050C	G	C	Pax7 (PP766426)	410C	G	S
	4143G	C	S		460T	G	T
	4167A	G	A		500C	G	S
	4301C	G	G		748C	T	Y
	4308CA	TG	CA		846G	-	G
	4338G	A	G		1097C	T	C
	4340-	Ins	Ins		1200A	G	A
Pax3	62A	G	A		1222—	GG—	GGGA
	76 Ins (T)	-	-		1244A	T	A
	415A	T	A		2414C	T	C
	681A	C	C		2910C	T	Y
	702A	T	A		3364G	T	K
	958T	C	Y		3657T	C	Y
	979G	T	K	PPARG	440—	GTTCCA	GTTCCA

Pax3 (OR631213)	1103G	A	A		1261A	C	C
	1111A	G	G		1681T	C	C
	1368G	A	R		1693CC	TT	TT
	1422-1426-	AAAT	AAAT		2031G	A	G
	1460G	A	R		2156G	A	A
	1721T	C	Y		2398TT	-	-T
	2069C	T	C		2490C	G	G
	2238 Ins (TC)	-	-		2499 Ins (AA)	-	-
	2374A	G	A		2548-	G	G
					2596T	C	C
					22793T	-	C
					3746-3752 Ins (ACACAT	ACAC-	—
					4093A	A	G
					4286C	A	A
					4288GA	AG	AG
					4292-	AG	AG
					4302-4306 (GA-)	AGAT	AGAT
					4308-4319 TTGGAA GGGT-	CTGAAT GAGTA	CTGAAT GAGTA
					4320G	A	A
					4986C	T	T

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này nhân dòng gen gồm Mrf4, Myf5, Myod1, Myog, Pax3, Pax7 và PPAR γ từ tế bào gốc vệ tinh bò vàng nuôi cấy. Kết quả bước đầu dựa trên khảo sát 3 enzyme ADN Polymerase thương mại là PhusionTM và PlantinumTM SuperfiTM của Thermofisher và Q5® của Neb đã xác định được điều kiện PCR tối ưu cho mỗi loại enzyme để nhân dòng thành công đoạn gen đầy đủ của Mrf4, Myf5, Myod1 và Myog và một phần các gen Pax3, Pax7 và PPAR γ . Những gen này sau đó được giải trình tự bằng kỹ thuật trình tự Sanger kết hợp primer walking. Lắp ráp kết quả giải trình tự và so sánh chúng với trình tự tham chiếu trên ngân hàng GenBank đã phát hiện được một số đa hình nucleotide đã được một số nghiên cứu trước đây xác nhận có liên quan đến chất lượng thịt cũng như khả năng cho thịt. Đồng thời nghiên cứu cũng

phát hiện một số đa hình mới chưa rõ chức năng. Đối với các biến dị này, cần nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn và kết hợp với phân tích biểu hiện gen để xác định chức năng của chúng. Đối với các gen có trình tự dài như Pax3, Pax7 và PPAR γ , phương pháp thích hợp để giải trình tự đầy đủ các gen này là sử dụng các enzyme Long-range mạnh hơn và giải trình tự bộ đa gen bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn: i) Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Mã số nhiệm vụ Nghị định thư: NĐT.91.KR/20); ii) Phòng thí nghiệm chuyên sâu, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên và Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế đã tạo điều kiện để thực hiện một số thí nghiệm liên quan đến nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Bình Trường, Phạm Ngọc Du (2017). Một góc nhìn về bảo tồn giống bò vàng Việt Nam. *Tạp chí Chăn nuôi* số 216: 95 - 97.
2. Pham D. L., Do D. N., Nguyen T. B., Le Q. N., Nguyen V. B., Tran T. T. T., Tran X. H., Vu C. C., Kadarmideen H. (2013). Assessment of genetic diversity and population structure of Vietnamese indigenous cattle populations by microsatellites. *Livestock Science*, 155: 17 - 22.
3. Nguyễn Thị Thuỷ, Đậu Văn Hải, Hoàng Thị Ngân, Phạm Văn Quyển, Nguyễn Thanh Tùng, Huỳnh Văn Thảo (2024). Khảo sát hàm lượng mỡ giắt, dày cơ thân và dày mỡ lưng của một số nhóm bò lai hướng thịt nuôi tại Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, số 143: 57 - 65.
4. Dumont N. A., Bentzinger C. F., Sincennes M-C., Rudnicki M. A. (2015). Satellite cells and skeletal muscle regeneration," *Comparative Physiology*, 5: 1027 - 1059.
5. Mohammadinejad F., Mohammadabadi M., Roudbari Z., Sadkowski T. (2022). Identification of key genes and biological pathways associated with skeletal muscle maturation and hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries* and *Sus scrofa*. *Animals (Basel)*, 12: 3471.
6. Kook S. H., Choi K. C., Son Y. O., Lee K. Y., Hwang I. H., Lee H. J., Chang J. S., Choi I. H., Lee J. C (2006). Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. *Molecules and cells*: 22: 239 - 245.
7. Lim D., Chai H. H., Lee S. H., Cho Y. M., Choi J. W., Kim N. (2015). Gene expression patterns associated with peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling in the longissimus dorsi of Hanwoo (Korean Cattle). *Asian Australian journal of Animal Science*, 28: 1075 - 1083.
8. Zhu R., Feng Y., Yang X., Li R., Song Z., Liu Q., Shi D., Huang J. (2024) Functionally conserved PPARG exonic circRNAs enhance intramuscular fat deposition by regulating PPARG and HSL. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257: 128613.
9. Mwangi F. W., Charmley E., Gardiner C. P., Malau-Aduli B. S., Kinobe R. T., Malau-Aduli A.E.O. (2019) Diet and genetics influence beef cattle performance and meat quality characteristics. *Foods*, 8: 648.
10. Goszczynski D. E., Mazzucco J. P., Ripoli M. V., Villarreal E. L., Rogberg-Muñoz A., Mezzadra C. A., Melucci L. M., Giovambattista G. (2016). Genetic characterization of PPARG, CEBPA and RXRA, and their influence on meat quality traits in cattle. *Journal of Animal Science and Technology*, 58: 14.
11. Xu Y., Shi T., Zhou Y., Liu M., Klaus S., Lan X., Lei C., Chen (2018). A novel PAX7 10-bp indel variant modulates promoter activity, gene expression and contributes to different phenotypes of Chinese cattle. *Scientific Reports*, 8: 1724.
12. Weber T. M., Buseman B. J., Nasados J. A., Lancaster J. M., Van Buren J. B., Smart J. H., Bass P. D., Murdoch G. K., Insausti K., Colle M. J. (2020). Assessing outcomes of genetic selection panels to predict marbling in crossbred beef cattle. *Translational Animal Science*, 4: 1238 - 1246.
13. Le T. N. A., Vu H.V, Okuda Y., Duong H. T., Nguyen T. B., Nguyen V. H., Le P. D, Kunieda T. (2018). Genetic characterization of Vietnamese Yellow cattle using mitochondrial DNA and Y-chromosomal haplotypes and genes associated with economic traits. *Animal Science Journal*, 89: 1641 - 1647.
14. Kubo Y., Nishio H., Saito K. (2015) . A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *Journal of Human Genetics*, 60: 233 - 239.
15. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.
16. Clarke A. C., Prost S., Stanton J. A., White W. T., Kaplan M. E., Matisoo-Smith E. A (2014) . Genographic consortium. From cheek swabs to consensus sequences: an A-to-Z protocol for high-throughput DNA sequencing of complete human mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, 15: 68.
17. Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021). Molecular evolutionary genetics analysis version

11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022 - 3027.
18. Ujan J. A., Zan L. S., Ujan S. A., Adoligbe C., Wang H. B (2011). Back fat thickness and meat tenderness are associated with a 526 T→ A mutation in the exon 1 promoter region of the Myf - 5 gene in Chinese *Bos taurus*. *Genetics and Molecular Research*, 10: 3070 - 3079.
19. Li C., Basarab J., Snelling W. M., Benkel B., Murdoch B., Hansen C., Moore S. S. (2004). Assessment of positional candidate genes myf5 and igf1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science*, 1: 1 - 7.
20. Wang S., Cai X., Xue K., Chen H. (2010). Polymorphism of MRF4 and H - FABP genes association with growth traits in Qinchuan cattle and related hybrids. *Molecular Biology Reports*, 38: 1013 - 1020.
21. Du X. H., Gan Q. F., Yuan Z. R., Gao X., Zhang L. P., Gao H. J., Li J. Y., Xu S. Z. (2013). Polymorphism of MyoD1 and Myf6 genes and associations with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Research*, 12: 6708 - 6717.
22. Nguyen T. U., Dao V. C., Pham D. T., Luu H. S., Nguyen T. N., Nguyen H. Q., Nguyen D. T., Hwang I. (2023). A comparative study on the adipogenic and myogenic capacity of muscle satellite cells, and meat quality characteristics between Hanwoo and Vietnamese yellow steers. *Food Science and Animal Resources*, 43: 563 - 579.

CLONING AND SEQUENCING OF GENES INVOLVED IN MUSCLE AND FAT FORMATION IN VIETNAM YELLOW CATTLE

Dao Van Cuong^{1,2}, Pham Dieu Thuy¹, Duong Thi Hong Duyen¹, Nguyen Quang Tinh¹, Tu Trung Kien¹,
Luu Hong Son³, Nguyen Thi Thanh Ha⁴, Nguyen Thanh Hai⁵, Nguyen Ngoc Luong⁶

¹ Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine,
Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

² Vietnam SPS Office, Ministry of Agriculture and Rural Development, Vietnam

³ Institute of Biotechnology and Food technology, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

⁴ Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture

⁵ Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

⁶ University of Sciences, Hue University

Summary

Muscle-derived satellite cells play a crucial role in muscle maintenance and regeneration. As a type of mesenchymal stem cell, they can differentiate into myogenic, fibrogenic, and adipogenic cells. Today, with Wagyu beef gaining popularity worldwide as well as in Vietnam, high-marbled beef is increasingly sought after. While Vietnam yellow cattle is raised for meat production, its carcass performance and marbling quality remain suboptimal for the increasingly demanding customers. To lay the foundation for in-depth research on the mechanisms of meat production and intramuscular fat formation in Vietnam yellow cattle, we employ Long-range PCR to clone and sequence genes involved in muscle development and intramuscular fat formation, namely, Pax3, Pax7, Mrf4, Myf5, Myod1, Myog and PPARy. This report presents the results of PCR cloning, Sanger sequencing and polymorphism detection of seven genes encoding for proteins involved in muscle development and intramuscular fat formation in the satellite cells derived from Vietnam yellow cattle.

Keywords: Vietnam yellow cow, muscle satellite stem cells, Long-range PCR, genes involved in muscle and fat formation.

Ngày nhận bài: 10/7/2024

Ngày gửi phản biện: 01/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 12/8/2024

Ngày duyệt đăng: 23/9/2024