

PHÂN LẬP VÀ ĐỌC TRÌNH TỰ GEN *RPOB* LOÀI MÃ TIỀN (*STRYCHNOS NITIDA*) TẠI THANH HÓA

Lê Đình Chấn¹, Hoàng Thị Hà², Trịnh Thị Hồng³

TÓM TẮT

Thuật ngữ “DNA mã vạch” không chỉ giúp các nhà phân loại học trong công tác phân loại và xác định loài, mà còn nâng cao năng lực kiểm soát, hiểu biết và tận dụng sự đa dạng sinh học. Vì vậy trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến kết quả phân lập và đọc trình tự gen *rpoB* của các mẫu Mã tiền thu tại Thanh Hóa. Chúng tôi đã phân lập gen *rpoB* từ 2 mẫu Mã tiền thu tại Bến En và Xuân Liên Thanh Hóa, kích thước gen *rpoB* mà chúng tôi thu được là 469 nucleotid và có sự tương đồng là 98,5% so với trình tự gen *rpoB* của loài *Strychnos erichsonii* (mã số FJ038322) đã công bố trên ngân hàng gen.

Từ khóa: *rpoB*, DNA barcoding, gen *rpoB*, gen lục lạp, *Strychnos nitida*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mã tiền (*Strychnos nitida*) có nhiều hợp chất quý có tác dụng chữa bệnh cao, đặc biệt là một số hợp chất như: khoảng 2 - 3% là các alkaloid phụ khác như α - colubrin, β - colubrin, vomisin, novacin, pseudostrychin; chất béo (4 - 5%), acid igasuric (= acid chlorogenic), acid loganic, stigmasterin, cycloarterol và một glycosid là loganin; Công trình của Li W. và cs cũng đã phát hiện được 3 hợp chất pyridocarbazole racemic mới, (\pm) -stritidas AC (1 - 3) và 3 monoterpenoid indole alkaloids (4-6) đây là những hợp chất được phát hiện mới trong loài cây này [10]. Nghiên cứu của Wang B. và cs cũng đã phát hiện được 3 glycosides indole mới, đó là 22-deoxystryctosamide (1), 22-deoxystryctosamide N b-oxit (2) và vincosamide 2'-O- β -D-xylopyranoside-11-O- β -D-glucopyranosit (3) [14]. Nghiên cứu của Gu Z. và cs đã cho thấy 6 hợp chất đã được phân lập từ *Strychnos nitida* gồm beta-sitosterol, strychnine, brucine, cantieyine, axit lignoceric và axit palmitic [7]. Tuy nhiên việc nghiên cứu đặc điểm di truyền học của loài cây này còn hạn chế, do đó những dữ liệu khoa học về di truyền học của loài được liệu quý này chưa được công bố nhiều trên thế giới và trong nước, đặc biệt là hệ thống mã vạch DNA (DNA barcode).

Đối với thực vật, trong hệ thống mã vạch DNA thì hệ gen lục lạp mang nhiều đặc điểm thích hợp đối với chỉ thị DNA và hệ gen nhân, vùng DNA nằm giữa các gen hay còn gọi ITS (Internal Transcribed Spacer) thường được sử dụng làm DNA chỉ thị trong một số nghiên cứu [3, 8, 11]. Trong những năm gần đây, nhiều vùng gen đã được nghiên cứu và đề xuất là chỉ thị DNA cho thực vật như Matk, *rpoC1*, *rpoB*... [4, 6, 9].

^{1,3} Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức

² Trường Trung học Phổ thông Thiệu Hóa, huyện Thiệu Hóa, tỉnh Thanh Hóa

Trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến việc phân lập và đọc trình tự gen *ropB* loài Mã tiền (*Strychnos nitida*) tại Thanh Hóa nhằm cung cấp dữ liệu thực vật học về loài được liệu quý này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu Mã tiền (*Strychnos nitida*) được thu thập tại Thanh Hóa. Việc định danh cây Mã tiền được thực hiện tại bộ môn Thực vật học, Trường Đại học Hồng Đức theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [1], Nguyễn Nghĩa Thìn (2007) [2].

Cặp mồi đặc hiệu *rpoB* (Bảng 1) [5] và các hóa chất cần thiết trong nghiên cứu sinh học phân tử như: Tris HCl, EDTA, phenol, ethanol (100%), agarose... thuộc các hãng: Merck, Sigma, Biolabscasc của các nước Mỹ, Anh, Đức.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi nhân bản *rpoB*

Tên mồi		Trình tự mồi (5'-3')
<i>rpoB</i>	F	AAGTGCATTGTTGGAAGTGG
	R	GATCCCAGCATCACAATTCC

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ lá non theo phương pháp của Shanghai Maroof và cs (1984) [12].

2.2.2. Phương pháp nhân gen *proB* bằng kỹ thuật PCR

Theo phương pháp của Peter và cs (2011) và bảng các cặp mồi DNA Barcoding [15]. Trong đó, đoạn gen *rpoB* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu *rpoB*-1f/*rpoB*-3r với kích thước dự kiến là khoảng 500 nucleotide.

Phản ứng PCR được tiến hành với thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen *rpoB*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	Mồi xuôi	10 pmol/ml	1
3	Mồi ngược	10 pmol/ml	1
4	DNA khuôn	10ng/μl	1
5	Nước khử ion	-	9,5
Tổng thể tích			25

2.2.3. Phương pháp chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sau khi điện di, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, sau đó nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới tia UV.

Sau khi chạy điện di, lấy bản gel ra khỏi máy điện di, nhẹ nhàng lấy riêng phần gel agarose cho vào hộp chứa dung dịch Ethidium bromide. Nhuộm trong 10 phút. Lấy bản gel ra, rửa bằng cách ngâm trong nước 2 - 3 phút. Đem vào máy quan sát dưới đèn tử ngoại (UV) và chụp ảnh.

2.2.4. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Sau khi nhân được gen *rpoB* bước tiếp theo cần thu nhận gen ở dạng tinh sạch và không lẫn gel agarose. Quá trình tinh sạch được thực hiện theo Kit GenJET PCR Purification của hãng Thermo Scientific.

2.2.5. Phương pháp xác định trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB*

Trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự gen đó được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình Bioedit, BLAST, DNASTAR.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích hình thái *Strychnos nitida*

Dây leo gỗ, có móc đôi mang lông thưa. Lá hình trái xoan hẹp, dài 8 - 14 cm, rộng 4 - 5 cm, đỉnh lá có mũi nhọn nhỏ, có 3 gân chính và một đôi gân nhỏ sát mép lá; cuống lá dài khoảng 5 mm (hình 1). Cụm hoa là một chùm xim kép ở đầu cành, dài 4 - 6 cm. Cuống hoa và cuống cụm hoa có lông. Hoa mẫu 5, Tràng hoa hình ống, màu xanh nhạt, dài 14 - 15 mm, ống tràng dài gấp 4 - 5 lần thủy; Thủy dài khoảng 2,5 mm, hơi cong; Nhị đính ở họng tràng, tại đây có một vòng lông dày; Chỉ nhị rất ngắn khoảng 0,5 mm, bao phấn nhẵn; Bầu hình trứng, nhẵn, vòi dài khoảng 12 mm, đỉnh bầu và nửa dưới của vòi có lông; Núm nhụy thò ra ngoài bộ nhị; Quả có đường kính 3 - 5 cm; Vỏ quả nhẵn, rất dày (khoảng 5 mm).



Hình 1. Ảnh chụp cành, lá cây Mã tiền (*Strychnos nitida*)

3.2. Kết quả tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo phương pháp của Shanghai Maroof và cs (1984), sau đó DNA được đo nồng độ và xác định độ sạch bằng máy đo NanoDrop (Thermo Scientific).

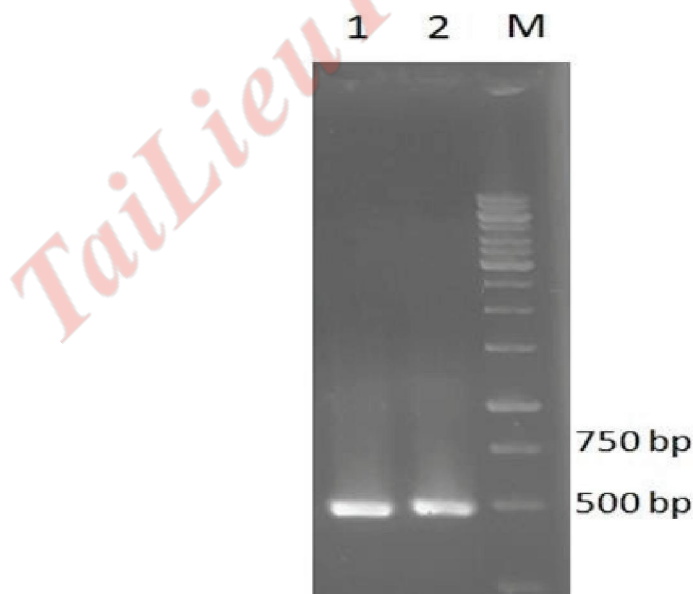
Bảng 3. Nồng độ và độ tinh sạch các mẫu

Tên mẫu	OD260/280	Nồng độ (ng/μl)
MTXL	2,04	103,5
MTPL	1,99	159,0

Qua bảng 3 có thể thấy rằng DNA được tách chiết với độ tinh sạch cao nằm trong khoảng từ 1,99 đến 2,04. Nồng độ DNA được tách chiết đạt từ 159,0 đến 103,5. DNA này sẽ được pha loãng đến nồng độ cuối cùng là 100 ng/μl cho phản ứng PCR tiếp theo.

3.3. Kết quả nhân bản gen *rpoB* các mẫu Mã tiền

Sau khi thực hiện PCR sản phẩm được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả PCR với các cặp mồi đặc hiệu (bảng 1) được thể hiện trên hình 2.

**Hình 2. Kết quả PCR 2 mẫu với cặp mồi *rpoB***

M: Marker (1kb, Thermo);

*1: Sản phẩm nhân bản từ cặp mồi *rpoBF/R* từ mẫu Mã tiền Xuân Liên;*

*2: Sản phẩm nhân bản từ cặp mồi *rpoBF/R* từ mẫu Mã tiền Pù Luông*

Kết quả PCR từ 2 mẫu Mã tiền với cặp mồi *rpoB* F/R thu được một băng duy nhất ở vị trí khoảng 500 bp, kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết và làm cơ sở cho việc đọc trình tự gen *rpoB* phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Kết quả đọc trình tự gen *rpoB* của hai mẫu Mã tiền thu được

Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng phương pháp điện di, cho thấy sản phẩm thu được là đặc hiệu đúng kích thước so với tính toán lý thuyết, là cơ sở để chúng tôi tiến hành đọc trình tự gen *rpoB* trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được như sau:

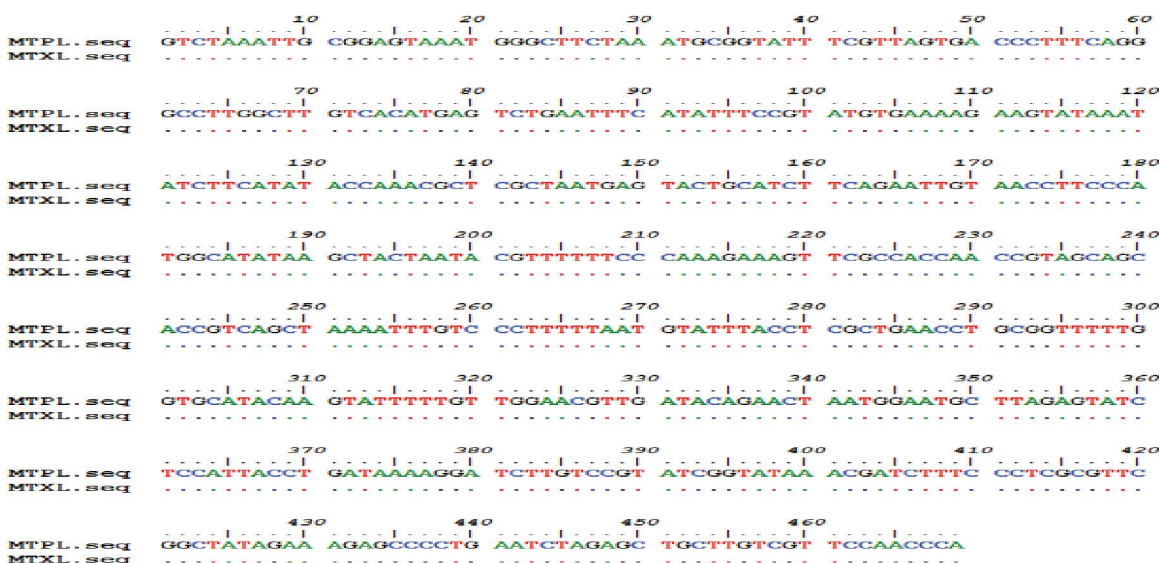
Trình tự gen *rpoB* của mẫu Mã tiền thu tại Pù Luông

GTCTAAATTGCGGAGTAAATGGGCTTCTAAATGCGGTATTTTCGTTAGTGACCCTTTCAGG
 GCCTTGGCTTGTACATGAGTCTGAATTTTCATATTTCCGTATGTGAAAAGAAGTATAAAT
 ATCTTCATATACCAAACGCTCGCTAATGAGTACTGCATCTTCAGAATTGTAACCTTCCCA
 TGGCATATAAGCTACTAATACGTTTTTTTCCCAAAGAAAGTTCGCCACCAACCGTAGCAGC
 ACCGTCAGCTAAAATTTGTCCCTTTTAAATGTATTTACCTCGCTGAACCTGCGGTTTTTG
 GTGCATACAAGTATTTTTGTGGAACGTTGATACAGAATAATGGAATTCTTAGAGTATC
 TCCATTACCTAATAAAAGGATCGTGTCCGTATCGGTATAAACGACCCTTCCCCCGCGTTC
 GGCTATAGAAAGAGCCCCTGAATCTAGAGCTGCTTGGCGTTCCAACCCA

Trình tự gen *rpoB* của mẫu Mã tiền thu tại Xuân Liên

GTCTAAATTGCGGAGTAAATGGGCTTCTAAATGCGGTATTTTCGTTAGTGACCCTTTCAGG
 GCCTTGGCTTGTACATGAGTCTGAATTTTCATATTTCCGTATGTGAAAAGAAGTATAAAT
 ATCTTCATATACCAAACGCTCGCTAATGAGTACTGCATCTTCAGAATTGTAACCTTCCCA
 TGGCATATAAGCTACTAATACGTTTTTTTCCCAAAGAAAGTTCGCCACCAACCGTAGCAGC
 ACCGTCAGCTAAAATTTGTCCCTTTTAAATGTATTTACCTCGCTGAACCTGCGGTTTTTG
 GTGCATACAAGTATTTTTGTGGAACGTTGATACAGAATAATGGAATTCTTAGAGTATC
 TCCATTACCTAATAAAAGGATCGTGTCCGTATCGGTATAAACGACCCTTCCCCCGCGTTC
 GGCTATAGAAAGAGCCCCTGAATCTAGAGCTGCTTGGCGTTCCAACCCA

Với 2 mẫu thu được từ kết quả phân lập, chúng tôi nhận được trình tự nucleotide của mẫu đều bằng nhau và bằng 469 nucleotit, để khẳng định mối quan hệ di truyền của các trình tự này, chúng tôi tiến hành so sánh bằng phần mềm tin sinh Bioedit, kết quả thu được trên hình 3, sau đó chúng tôi tiến hành so sánh với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mã số FJ038322 để làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

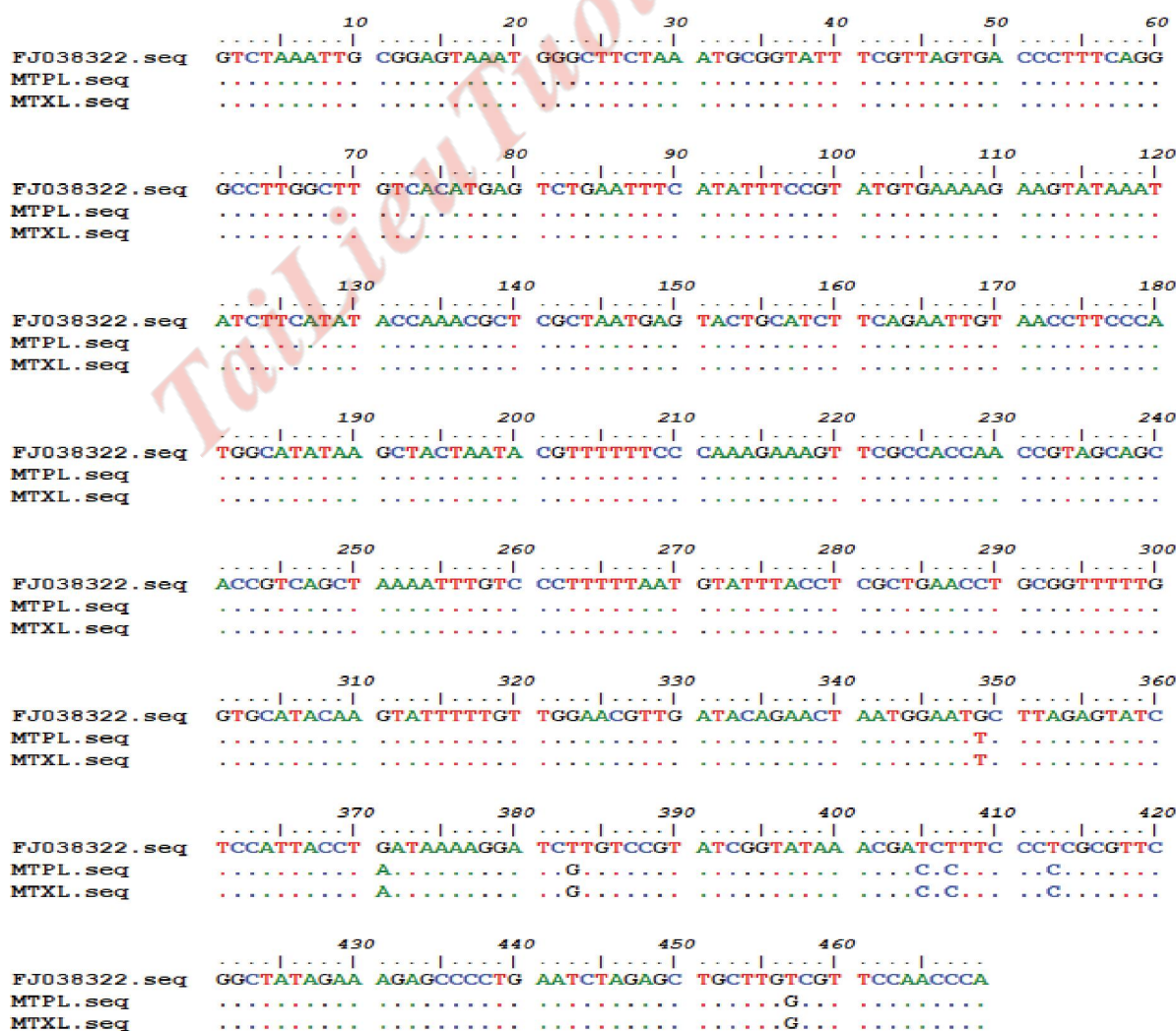


Hình 3. Kết quả so sánh hai trình tự gen *rpoB* của hai mẫu Mã tiền thu được tại Xuân Liên và Pù Luông

Kết quả phân tích trên hình 3 cho thấy, độ tương đồng của hai trình tự gen *rpoB* chúng tôi thu được là 100%. Như vậy, các trình tự gen *rpoB* thu được là cùng loài, từ đó có thể khẳng định các cá thể cùng loài trong cùng điều kiện địa lý sẽ có trình tự gen phân loại là hoàn toàn giống nhau.

Kết quả phân tích trình tự gen *rpoB* thu được với trình tự gen *rpoB* mang mã số FJ038322 đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế.

Sau khi thu được các trình tự gen *rpoB*, chúng tôi tiến hành so sánh với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mang mã số FJ038322 bằng phần mềm Blast. Kết quả được thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Kết quả so sánh trình tự gen *rpoB* thu được với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mã số FJ038322

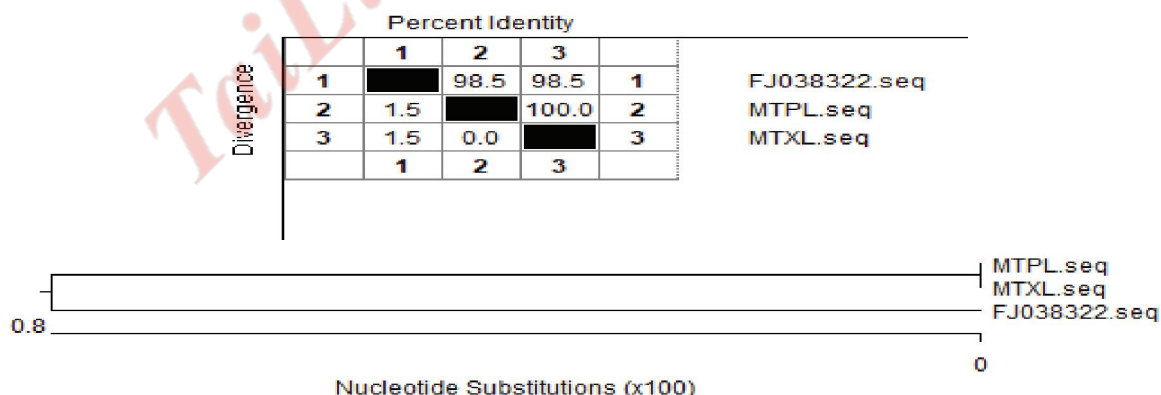
Kết quả trên hình 4, cho thấy: Các mẫu Mã tiền thu được tại Pù Luông và Xuân Liên có trình tự nucleotide của gen *rpoB* sai khác một số vị trí so với trình tự gen *rpoB* mang mã số FJ038322 đã được công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế. Sự sai khác này được cụ thể hóa bởi bảng 3.

Bảng 3. Sự sai khác của các trình tự gen *rpoB* thu được và trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mang mã số FJ038322

TT	Vị trí	FJ038322	Xuân Liên	Pù Luông
1	349	G	T	T
2	371	G	A	A
3	383	T	G	G
4	405	T	C	C
5	407	T	C	C
6	413	T	C	C
7	457	T	G	G

Sự tương đồng của các trình tự gen *rpoB* chúng tôi thu được so với trình tự gen *ropB* của loài *Strychnos erichsonii* đã công bố trên Ngân hàng gen banks mã số FJ038322 là khá cao (98,5%). Nhận xét này cũng được thể hiện trên bảng 4 và hình 5.

Bảng 4. So sánh trình tự *rpoB* thu được với trình tự *rpoB* công bố trên Ngân hàng gen banks mã số FJ038322



Hình 5. Sơ đồ cây dựa trên trình tự nucleotide của gen *rpoB* của các mẫu thu được với trình tự gen *rpoB* đã công bố trên Ngân hàng gen banks FJ038322

Với kết quả trên hình 3, hình 4, bảng 3 và bảng 4, hình 5 cho thấy, các mẫu Mã tiền thu được tại Pù Luông và Xuân Liên là cùng loài và có quan hệ di truyền gần với loài *Strychnos erichsonii* được Gonzalez, M.A. và cs mô tả năm 2016 tại Pháp, điều này được thể hiện ở kết quả phân tích Blast trong NCBI.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc phân lập và đọc trình tự gen *rpoB* của loài Mã tiền tại Thanh Hóa, kích thước gen *rpoB* thu được là 469 nucleotide và có sự tương đồng 98,5% so với trình tự gen *rpoB* loài *Strychnos erichsonii* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế mã số FJ038322;

Trình tự gen *rpoB* của các mẫu Mã tiền thu được tại Xuân Liên và Pù Luông Thanh Hóa có độ tương đồng là 100%, điều này cho thấy các mẫu Mã tiền chúng tôi thu được là cùng loài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam*. Nxb. Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.
- [2] Nguyễn Nghĩa Thìn (2007), *Các phương pháp nghiên cứu thực vật (Methods of plant research)*, Nxb. Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
- [3] Borsch T., Hilu K.W., Quandt D., Wilde V., Neinhuis C., Barthlott W. (2003), *Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms*, J. Evol. Biol, (6), 558-576.
- [4] Chase M. W., Nicolas S., Mike W., James M. D., Rao P. K., Nadia H., and Vincent S. (2005), *Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 360 (1462), 1889-1895.
- [5] Chiou SJ, Yen JH, Fang CL, Chen HL, Lin TY (2007), *Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers*, Planta Med.73(13),1421-6..
- [6] German Serino and Pal Maliga (1998), *RNA Polymerase Subunits Encoded by the Plastid rpo Genes Are Not Shared with the Nucleus-Encoded Plastid Enzyme*, PlantPhysiol. Aug, 117(4), 1165-1170.
- [7] Gu Z, Li T, Xiao P, Chen J, Lian W. (1997), *Chemical constituents of Strychnos nitida G. Don*, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 22(1), 40-1, 62.
- [8] Kim S, Kim J, Liu J (2009), *Genetic discrimination of Catharanthus roseus cultivars by pyrolysis mass spectrometry*, J Plant Biol 52: 462465. doi:10.1007/s12374-009-9059-1.
- [9] Kress W. J., Erickson D. L. (2008), *DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics*, Proc Natl Acad Sci USA, 105(8), 2761-2762.
- [10] Li W, Tang GH, Chen L, Tang YQ, Xu YK, Liu B, Yin S. (2017), *New pyridocarbazole alkaloids from Strychnos nitida*, Nat Prod Res. 12, 1-5. doi: 10.1080/14786419.2017.1385016.
- [11] Ole S. and Gitte P. (2009), *How many loci does it take to DNA barcode a crocus?*, PLoS one, 4(2), 4598.
- [12] Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984), *Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics*, Proc Natl Acad Sci, 81, 8014-8019.
- [13] Taberlet P., Eric C., François P., Ludovic G., Christian M., Alice V., Thierry V., Gérard C., Christian B., and Eske W. (2007), *Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding*, Nucleic Acids Res, 35(3), 14.
- [14] Wang B, Dai Z, Liu L, Wei X, Zhu PF, Yu HF, Liu YP, Luo XD (2016), *Indole Glycosides from Aqueous Fraction of Strychnos nitida*, Nat Prod Bioprospect. 6(6): 285-290.
- [15] <http://europepmc.org/articles/pmc2063462>

ISOLATING AND SEQUENCING OF RPOB GENE FROM STRYCHNOS NITIDA IN THANH HOA

Le Dinh Chac, Hoang Thi Ha, Trinh Thi Hong

ABSTRACT

The term, “DNA barcoding” techniques not only help taxonomists in classifying and identifying species, but also improve their capacity to control, understand and utilize biodiversity. Therefore in this article, we present the results of isolation and sequencing of rpoB genes of the Strychnos nitida collected in Thanh Hoa province. We isolated two rpoB genes from two Strychnos nitida samples collected in Pu Luong and Xuan Lien, Thanh Hoa. The rpoB gene size we obtained was 469 nucleotides and 98.5% of it was similar to the published rpoB gene sequence with accession number FJ038322.

Keywords: *rpoB, DNA barcoding, gen rpoB, chloroplast gene, Strychnos nitida.*

Ngày nộp bài: 16/7/2018; Ngày gửi phản biện: 24/7/2018; Ngày duyệt đăng: 6/8/2019