

USING DNA BARCODES TO IDENTIFY THAI NGUYEN CATFISH

Hoang Thi Thu Yen*, Nguyen Thi Yen

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 23/02/2021	The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene has been used extensively to study molecular taxonomy in animals. In this study, we study the sequencing analysis of <i>COI</i> gene segments isolated from Thai Nguyen catfish sample. <i>COI</i> gene fragment was isolated from catfish genome DNA by PCR technique. Then, the PCR product was purified and sequenced, the <i>COI</i> gene segment obtained was 616 bp in length. Nucleotide sequences of <i>COI</i> gene were compared with those published on Genbank using Blast software. The comparison results showed that the studied <i>COI</i> gene segment did not have scientific basis to identify species in the genus <i>Silurus</i> . Using Bioedit software to compare the nucleotide sequence of the <i>COI</i> gene fragment showed that the studied catfish sample could be a different species compared with the submitted species belonging genus <i>Silurus</i> .
Revised: 24/3/2021	
Published: 28/5/2021	
KEYWORDS	
Catfish	
Catfish genus <i>Silurus</i>	
Mitochondrial DNA	
Gene coding cytochrome c oxidase subunit I (COI)	
Molecular taxonomy	

SỬ DỤNG MÃ VẠCH DNA TRONG VIỆC ĐỊNH LOẠI CÁ NHEO TẠI THÁI NGUYÊN

Hoàng Thị Thu Yên*, Nguyễn Thị Yên

Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 23/02/2021	Gen mã hóa cytochrome c oxidase subunit I (COI) ở ty thể được sử dụng nhiều để nghiên cứu phân loại phân tử ở động vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích trình tự đoạn gen <i>COI</i> phân lập từ mẫu cá nheo Thái Nguyên. Đoạn gen <i>COI</i> được phân lập từ DNA genome mẫu cá nheo bằng kỹ thuật PCR. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự, đoạn gen <i>COI</i> thu được có chiều dài 616 bp. Trình tự nucleotide đoạn gen <i>COI</i> được so sánh với các trình tự đã công bố trên Genbank bằng cách sử dụng phần mềm Blast. Kết quả so sánh chỉ ra, đoạn gen <i>COI</i> nghiên cứu không có cơ sở khoa học để định danh đến loài trong chi cá nheo <i>Silurus</i> . Sử dụng phần mềm Bioedit so sánh trình tự nucleotide đoạn gen <i>COI</i> cho thấy, mẫu cá nheo nghiên cứu có thể là 1 loài khác so với các loài đã công bố thuộc chi cá nheo <i>Silurus</i> .
Ngày hoàn thiện: 24/3/2021	
Ngày đăng: 28/5/2021	
TỪ KHÓA	
Cá nheo	
Chi cá nheo <i>Silurus</i>	
DNA ty thể	
Gen mã hóa cytochrome c oxidase subunit I (COI)	
Phân loại phân tử	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4030>

*Corresponding author. Email: yenhtt@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Hiện nay, ngoài các nghiên cứu phân tích về đặc điểm hình thái, các phương pháp nghiên cứu di truyền phân loại phân tử cũng được sử dụng nhằm hỗ trợ nhận dạng và định danh loài. Tất cả các tế bào sinh vật nhân chuẩn đều có chứa ty thể, DNA ty thể có tốc độ thay đổi nhanh, chúng cung cấp những sai khác quan trọng trong trình tự giữa các loài [1]. Một số gen ty thể được sử dụng nhiều để nghiên cứu và ứng dụng trong phân loại phân tử có thể kể đến như cytochrome c oxidase subunit I (COI) và 16S rRNA [2]-[4].

Cơ sở dữ liệu Fishbase cho thấy, cá nheo chi *Silurus* có 14 loài thuộc họ *Siluridae*, bộ *Siluriformes*, lớp *Actinopterygii*, ngành *Chordata* và giới *Animalia* [5]. DNA ty thể của một số loài cá nheo đã được công bố trên Genbank (*Silurus soldatovi* - MN171302; *Silurus asotus* - MK895951; *Silurus grahami*- MW217571...). Năm 2012, Wang và cs đã nghiên cứu đa dạng di truyền rRNA 16S từ 18 mẫu cá nheo được thu thập từ các con sông ở Trung Quốc và chỉ ra chúng có mức tương đồng di truyền cao, dao động 99,8-100% [6]. Năm 2015, dựa trên các quan sát về hình thái, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Văn Hào cho rằng Việt Nam có 3 loài cá nheo mới, nâng tổng số loài cá nheo lên 5. Đó là, *S. caobangensis* sp.n. thu ở sông Bằng (Cao Bằng), *S. langsonensis* sp. n. thu ở sông Kỳ Cùng (Lạng Sơn) và *S. dakrongensis* sp. n thu ở sông Đakrông (Quảng Trị). Hai loài được công bố trước đó là cá nheo *S. asotus* Linnaeus, 1758 phân bố rộng ở các tỉnh phía Bắc, *S. meridionalis* Chen, 1977 phân bố ở sông Kỳ Cùng (Lạng Sơn) [7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đặc điểm trình tự đoạn gen *COI* phân lập từ mẫu cá nheo Thái Nguyên làm cơ sở khoa học để định danh loài cá nheo.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Sử dụng mẫu vây cá nheo được thu thập tại sông Công, TP. Sông Công, Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Thượng Hải, Trung Quốc). Mẫu vây cá nheo được cắt nhỏ, cho vào ống eppendorf 1,5ml; nghiền trong ni tơ lỏng. Tiếp theo, bổ sung 20µl proteinase K, đảo đều và ủ mẫu ở 56°C trong 3h; thêm 4µl RNase, trộn đều, giữ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Trộn đều hỗn hợp trong 15 giây, bổ sung 200µl dung dịch AL, đảo đều; bổ sung 200µl ethanol tuyệt đối, đảo đều. Chuyển dung dịch sang cột, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch. Chuyển cột sang ống mới, bổ sung 500 µl dung dịch AW1, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Chuyển cột sang ống mới, bổ sung 500 µl dung dịch AW2, ly tâm 14000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ dịch và ly tâm thêm 14000 vòng/phút trong 1 phút để làm khô mẫu. Đặt cột sang ống eppendorf mới, bổ sung 50µl nước khử ion, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Bước này lặp lại hai lần. Mẫu DNA tổng số sau đó được kiểm tra bằng điện di gel 0,8%.

2.2.2. Phân lập đoạn gen *COI* bằng kỹ thuật PCR

Cặp mồi sử dụng trong kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen *COI* dựa trên cơ sở dữ liệu trình tự đã công bố của loài *Silurus soldatovi* - MN171302; *Silurus asotus* - MK895951 và *Silurus grahami*- MW217571 (F: 5'-CACGCGCTGATTCTTCTCAACTAAC-3' và R: 5'-CCGGGTAGAATCAGAATGTAGACTTC-3'). Kỹ thuật PCR được thực hiện trong 50 µl thể tích với các thành phần: 25µl master mix (Qiagen), 2,0 µl mỗi F (10mM), 2,0 µl mỗi R (10mM), 4 µl DNA(40 ng/µl); 17 µl H₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng là: 94°C trong 3 phút, (94°C trong 30 giây, 58°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây) lặp lại 32 chu kỳ, 72°C trong 10 phút và lưu giữ

ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit JETTM PCR purification của Thermo Scientific (Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

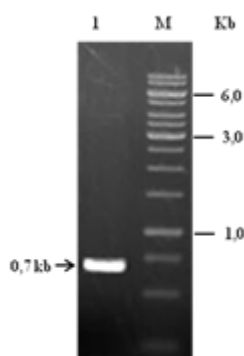
2.2.3. Xác định và phân tích trình tự đoạn gen *COI*

Sản phẩm PCR đoạn gen *COI* tinh sạch được xác định trình tự trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kết quả trình tự gen được phân tích, so sánh bằng phần mềm sinh học chuyên dụng (BLAST, Bioedit).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khuếch đại và xác định trình tự đoạn gen *COI* từ mẫu cá nheo nghiên cứu

Từ DNA tổng số thu được, chúng tôi tiến hành khuếch đại đoạn gen *COI* với cặp mồi dựa trên trình tự gen đã công bố trên Genbank. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả thu được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại đoạn gen *COI* từ mẫu cá nheo nghiên cứu (M: Ladder GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific); 1: sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *COI* từ mẫu cá nheo nghiên cứu)

Kết quả ở hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR đoạn gen *COI* thu được có kích thước khoảng 0,7 kb, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết. Tiếp theo, sản phẩm PCR được tinh sạch phục vụ mục đích xác định trình tự, kết quả thu được đoạn trình tự nucleotide sản phẩm PCR có kích thước 616 bp và so sánh với các trình tự đã công bố trên Genbank bằng cách sử dụng phần mềm Blast. Kết quả so sánh cho thấy, sản phẩm PCR được khuếch đại chính là đoạn gen *COI*, phân tích bằng phần mềm Bioedit cho thấy đoạn gen *COI* có khung đọc từ nucleotide thứ 3, mã hóa 204 amino acid (hình 2).

3.2. Phân tích trình tự nucleotide sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *COI*

Để xác định đoạn trình tự sản phẩm PCR thu được có phải đoạn gen *COI* hay không, chúng tôi sử dụng phần mềm Blast để so sánh đoạn trình tự thu được với các trình tự đã được công bố trên Genbank. Kết quả phân tích blast cho thấy, trình tự nucleotide thu được chính là trình tự một phần của gen *COI*. Mặt khác, để tìm hiểu trình tự đoạn gen *COI* từ mẫu nghiên cứu có thể đóng vai trò là DNA barcoding trong định danh loài cá nheo dựa trên phần mềm blast, các nucleotide tương đồng được xác định cùng với các thông số: Coverage (độ bao phủ theo chiều dài của trình tự so sánh); E- value (giá trị này càng nhỏ thì độ tin cậy càng cao) và Identity (độ tương đồng so với trình tự so sánh). Một phần dữ liệu tương đồng nhất của một số loài thuộc chi cá nheo *Silurus* với trình tự mẫu nghiên cứu được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1. Bảng thống kê một phần kết quả Blast đối với đoạn gen COI của mẫu nghiên cứu

Bảng 1 cho thấy, trình tự đoạn gen *COI* có sự tương đồng với đoạn gen *COI* của các loài thuộc chi cá nheo *Silurus*, dao động từ 90,58% - 97,73%; mẫu nghiên cứu có trình tự nucleotide đoạn gen *COI* tương đồng cao với *COI* ở loài *Silurus asotus* (97,73%) và *Silurus soldatovi* (97,56%). Kết quả này cho phép đưa ra kết luận ban đầu là mẫu cá nheo Thái Nguyên thu được thuộc chi *Silurus*. Tuy nhiên, dựa trên trình tự đoạn gen *COI* chưa thể kết luận được mẫu cá nheo Thái Nguyên thuộc loài nào trong chi cá nheo đã được công bố và đoạn gen *COI* nghiên cứu không có cơ sở khoa học để định danh đến loài trong chi cá nheo *Silurus*.

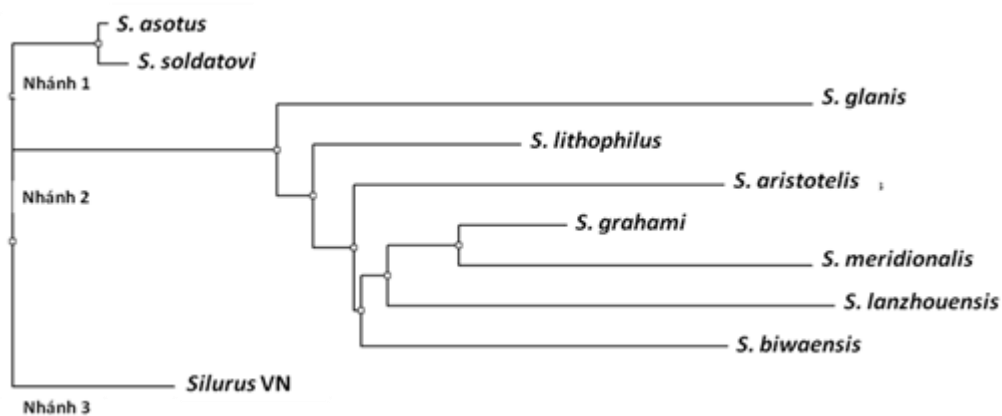
Hệ số sai khác di truyền phản ánh quan hệ di truyền của các mẫu so sánh với nhau. Hai mẫu phân tích càng gần nhau về mặt di truyền thì hệ số sai khác di truyền của chúng càng thấp và

ngược lại. Dựa trên phân tích, so sánh đoạn trình tự gen *COI* của mẫu cá nheo nghiên cứu với đoạn gen *COI* ở các loài cá nheo đã công bố trên Genbank bằng cách sử dụng phần mềm Bioedit, kết quả nhận được hệ số sai khác di truyền giữa các mẫu phân tích thể hiện ở bảng 2. Các mẫu phân tích trong chi *Silurus* có hệ số di truyền từng cặp nằm trong khoảng từ 0,023 đến 0,117, trong đó hệ số sai khác di truyền thấp nhất là 0,023 khi so sánh giữa mẫu cá nheo Việt Nam trong nghiên cứu này với loài *S. asotus*, hệ số sai khác cao nhất khi so sánh giữa 2 loài *S. lanzhouensis* và *S. glanis*.

Bảng 2. Hệ số sai khác di truyền giữa mẫu cá nheo nghiên cứu và các loài trong chi cá nheo đã công bố

Mẫu	<i>Silurus</i> VN	<i>S.asotus</i>	<i>S.soldatovi</i>	<i>S.grahami</i>	<i>S.lithophilus</i>	<i>S.biwaensis</i>	<i>S.glanis</i>	<i>S.aristotelis</i>	<i>S.meridiolans</i>	<i>S.lanzhouensis</i>
<i>Silurus</i> VN	0,000									
<i>S.asotus</i>	0,023	0,000								
<i>S.soldatovi</i>	0,025	0,005	0,000							
<i>S.grahami</i>	0,056	0,057	0,059	0,000						
<i>S.lithophilus</i>	0,061	0,055	0,057	0,047	0,000					
<i>S.biwaensis</i>	0,080	0,064	0,070	0,054	0,061	0,000				
<i>S.glanis</i>	0,086	0,088	0,093	0,084	0,082	0,093	0,000			
<i>S.aristotelis</i>	0,086	0,080	0,082	0,068	0,068	0,071	0,091	0,000		
<i>S.meridiolans</i>	0,084	0,082	0,084	0,045	0,068	0,069	0,097	0,080	0,000	
<i>S.lanzhouensis</i>	0,100	0,089	0,088	0,071	0,075	0,084	0,117	0,088	0,082	0,0000

Hệ số sai khác về di truyền còn được thể hiện ở biểu đồ quan hệ di truyền (hình 3). Hình 3 cho thấy 9 loài cá nheo và mẫu cá nheo trong nghiên cứu này được chia thành 3 nhánh. Trong đó, nhánh thứ nhất có hai loài, đó là *S. asotus* và *S. soldatovi*. Nhánh thứ 2 bao gồm 7 loài chia thành 2 nhánh phụ: Nhánh phụ 1 chỉ có 1 loài là *S. glanis*, nhánh phụ 2 bao gồm 6 loài: *S. grahami*, *S. lithophilus*, *S. biwaensis*, *S. glanis*, *S. aristotelis*, *S. meridiolans* và *S. lanzhouensis*. Nhánh 3 chỉ có 1 loài duy nhất là mẫu cá nheo Việt Nam. Do đó, có thể thấy mẫu cá nheo nghiên cứu được thu thập từ Thái Nguyên – Việt Nam có thể là 1 loài khác so với các loài đã công bố thuộc chi *Silurus*.



Hình 3. Biểu đồ quan hệ di truyền giữa các loài cá nheo phân tích

4. Kết luận

Đoạn gen *COI* phân lập từ mẫu cá nheo Thái Nguyên – Việt Nam có chiều dài 616bp. Mẫu cá nheo nghiên cứu được định danh thuộc chi cá nheo *Silurus* bằng cách sử dụng phần mềm Blast và đoạn gen *COI* nghiên cứu không có cơ sở khoa học để định danh đến loài. Sử dụng phần mềm Bioedit so sánh trình tự nucleotide đoạn gen *COI* của mẫu nghiên cứu với các loài trong chi

Silurus đã công bố trên Genbank cho thấy mẫu cá nheo nghiên cứu có thể là 1 loài khác so với các loài đã công bố trong chi cá nheo *Silurus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. A. Castro, A. Picornell, and M. Ramon, "Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies," *Int Microbiol*, vol. 1, no. 4, pp. 327-332, 1998.
- [2] A. K. Singh, R. Kumar, M. Singh, A. K. Mishra, U. K. Chauhan, V. S. Baisvar, R. Verma, N. S. Nagpure, and B. Kushwaha, "Mitochondrial 16S rRNA gene-based evolutionary divergence and molecular phylogeny of *Barilius* spp," *Mitochondrial DNA*, vol. 26, no. 1, pp. 41-47, 2015.
- [3] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0," *Mol Biol Evol*, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729, 2013.
- [4] S. R. Zhu, J. J. Fu, Q. Wang, and J. L. Li, "Identification of *Channa* species using the partial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene as a DNA barcoding marker," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 51, pp. 117-122, 2013.
- [5] Fishbase, "Silurus", 2020. [Online]. Available: <https://www.fishbase.org/Nomenclature/ScientificNameSearchList.php>. [Accessed Feb. 22, 2021].
- [6] Q. R. Wang, Z. Q. Wei, and P. Y. Song, "Genetic Diversity of *Silurus asotus* on Mitochondrial DNA 16S rRNA gene partical sequence," *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 11, no. 11, pp. 1843-1846, 2012.
- [7] V. H. Nguyen, T. H. N. Vu, and T. D. P. Nguyen, "Three Fish Species of The Genus *Silurus* Linnaeus, 1758, (Siluridae, Siluriformes) Newly Discovered in Northern Vietnam," *J. Sci. &Devel.*, vol. 13, no. 1, pp. 65-74, 2015.