



PHÂN TÍCH CẤU TRÚC GEN MÃ HÓA INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 (IGF2) Ở CÁ TRA NUÔI (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*)

Lê Thị Nguyễn Bình, Nguyễn Thị Hoa, Trần Thị Huyền Trang, Nguyễn Thành Phương, Kim Thị Phương Oanh 

Viện nghiên cứu hệ Gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

 Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ktpoanh@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.02.2019

Ngày nhận đăng: 17.9.2019

TÓM TẮT

Gen mã hóa yếu tố tăng trưởng giống insulin 2 (Insulin-like growth factor 2 - IGF2) là một gen quan trọng liên quan đến sự tăng trưởng của nhiều loài cá, trong đó có cá tra. Trong nghiên cứu này, từ cDNA mã hóa protein IGF2 được phân lập từ RNA tổng số tách chiết từ mô gan cá tra nuôi, qua quá trình phiên mã ngược và PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen IGF2, chúng tôi đã thu được sản phẩm có chiều dài 642bp, có trình tự tương đồng 95% với gen IGF-2 của cá nheo thuộc họ *Ictalurus*. Dựa vào trình tự cDNA này, 3 cặp mồi được thiết kế nhằm nhân 3 vùng trình tự thuộc gen IGF2 trên genomic DNA tách chiết từ mô vây cá tra nuôi có kích thước lần lượt là 900, 1500 và 1200bp. Sau khi giải trình tự và ráp nối lại nhờ các vùng trình tự chồng khít lên nhau, 3 đoạn trình tự này tạo nên một đoạn gen IGF2 với tổng chiều dài đạt 3387bp, chứa 4 exon mã hóa cho protein IGF2, tương đồng 96% với mRNA mã hóa cho protein IGF2 của cá nheo Mỹ *Ictalurus punctatus* và cá nheo lục *Ictalurus furcatus*. Việc xác định được cấu trúc của gen IGF2 của cá tra nuôi *Pangasianodon hypophthalmus* là tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn về mặt chức năng hay đa dạng di truyền.

Từ khóa: cá tra, Insulin-like growth factor 2, IGF2, *Pangasianodon hypophthalmus*

MỞ ĐẦU

Sản xuất cá tra là một ngành kinh tế mũi nhọn, đem lại nguồn lợi kinh tế lớn cho Việt Nam và một số nước khác thuộc khu vực miền nam châu Á. Cá tra nuôi (*Pangasianodon hypophthalmus*) thuộc họ cá tra (*Pangasiidae*), bộ cá da trơn hay cá nheo (*Siluriformes*), là một trong những loài cá đặc hữu của vùng lưu vực sông Mê Kông (Việt Nam, Thái Lan, Lào, Campuchia). Với truyền thống nuôi cá tra phổ biến trong ao và bè, năng suất nuôi cá tra tại đồng bằng Nam Bộ ở Việt Nam rất cao, trung bình khoảng 300 tấn/ha, khiến cá tra đã và đang là một đối tượng chăn nuôi có giá trị xuất khẩu lớn.

Để có một ngành sản xuất cá tra bền vững, chất lượng cao, giá cả thị trường ổn định, đảm bảo an toàn sinh học và hạn chế được tối thiểu các tác động tiêu cực đến môi trường sinh thái thì các chương trình chọn giống là vô cùng quan trọng. Một trong số các chương trình chọn giống hiện đang được ưu tiên ứng dụng trên thế giới chính là sử dụng các dấu chuẩn di truyền sinh học phân tử theo các hướng tăng trưởng, khả năng chống chịu bệnh..., góp phần

làm tăng hiệu quả của quá trình chọn giống. Yếu tố tăng trưởng giống insulin (insulin-like growth factor, gọi tắt là IGF) gồm IGF1 và IGF-2 với cấu trúc tương tự nhau là một ví dụ, chúng tham gia vào sự điều hòa các chu trình trao đổi chất và các quá trình biệt hóa trong tế bào (Moriyama *et al.*, 2000). Tại các nội quan, hormone tăng trưởng tuyến yên GH sẽ liên kết với thụ thể của nó, từ đó hoạt hóa quá trình tổng hợp và giải phóng IGF, trong đó IGF2 ít phụ thuộc hormone GH và là yếu tố tăng trưởng quan trọng ở giai đoạn phôi (Moriyama *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2005). Gen mã hóa cho IGF-I và IGF2 có thể được coi là một đại diện cho các dấu chuẩn di truyền phân tử tiềm năng liên quan đến quá trình tăng trưởng ở các loài cá khác nhau như cá vằn (Maures *et al.*, 2002), cá hồi sao (Chauvigne *et al.*, 2003; Gabillard *et al.*, 2003), cá tráp đầu vàng (Radaelli *et al.*, 2003), cá chép (Vong *et al.*, 2003). Đặc biệt các nghiên cứu ở cá da trơn *Ictalurus punctatus* đã chỉ ra rằng mức độ biểu hiện của gen IGF2 ở mô cơ và mô gan của cá thuộc nhóm sinh trưởng nhanh cao hơn hẳn so với cá thuộc nhóm sinh trưởng chậm (Peterson *et al.*, 2005; Peterson,

Waldbieser, 2009). Tuy vậy, vẫn chưa có phân tích nào về cấu trúc gen IGF được thực hiện trên đối tượng cá tra nuôi *P. hypophthalmus*, nên đây có thể được coi là một hướng mới và là nền tảng để phát triển các nghiên cứu sâu hơn liên quan đến sinh trưởng của cá tra.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về công tác chọn giống và nghiên cứu đa dạng sinh học của cá tra mới đang dừng lại ở bước cơ sở, đặt nền móng ban đầu, với các dấu chuẩn phân tử microsatellite tương quan với màu sắc thịt của cá tra (Phạm Anh Tuấn, Nguyễn Hữu Ninh, 2003), dấu chuẩn phân tử RAPD và AFLP liên quan đến đa dạng di truyền trên cá tra (Đào Thị Tuyết *et al.*, 2003), (Nguyễn Văn Cường *et al.*, 2003) và các chương trình chọn giống cá tra được thực hiện nhằm nâng cao khả năng sinh trưởng bằng phương pháp chọn lọc cá thể, cung cấp nguồn giống cá tốt cho nông dân (Nguyễn Văn Sáng *et al.*, 2009). Do vậy, việc phân lập và xác định trình tự cDNA mã hóa insulin-like growth factor (IGF2) ở cá tra nuôi trong hướng nghiên cứu của chúng tôi có thể sẽ góp phần vào việc phân tích ảnh hưởng của gen IGF2 đến quá trình sinh trưởng của loài này, đồng thời mở ra tiềm năng bổ sung thêm được các dấu chuẩn di truyền phân tử liên quan đến tính trạng tăng trưởng cho cá tra nuôi.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu thập mẫu

Mẫu gan và mẫu vây cá tra sử dụng được thu thập trực tiếp từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu sau khi thu được bảo quản ngay trong nitơ lỏng.

Tách chiết RNA tổng số-Tổng hợp cDNA

Các tế bào mô gan của cá tra được phá vỡ bằng biện pháp cơ học (nghiền bằng cối chày sứ) và dung dịch Trizol cho đến khi nhuyễn mịn. Tiếp theo protein được loại bỏ bằng chloroform thông qua quá trình đảo trộn, ly tâm, thu dịch pha trên. RNA sau đó được tủa bằng isopropyl alcohol, thu lại bằng ly tâm, rửa bằng ethanol 70%, làm khô và hòa tan trong nước khử ion vô trùng, không lẫn RNase. RNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel Agarose 1% và đo quang phổ ở bước sóng 260 nm. cDNA được tổng hợp sử dụng RNA đã tách chiết được thông qua bộ kit “SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen) với các thành phần phản ứng và quy trình như bộ kit đã cung cấp.

Tách chiết DNA tổng số

Các tế bào mô vây của cá tra được phá vỡ bằng biện pháp cơ học (nghiền bằng cối chày sứ) và các chất tẩy mạnh trong dung dịch đệm (100mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 8; 25mM EDTA, pH 8; 0.5% SDS). Protein được loại bỏ nhờ proteinase K và hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1). Sau đó, DNA được tủa bằng cồn tuyệt đối và sodium acetate, thu lại bằng ly tâm, làm khô và hoà tan trong H₂O khử ion vô trùng. Cuối cùng, dung dịch chứa DNA được bổ sung RNase để loại bỏ RNA, và được điện di trên gel Agarose 1% và đo quang phổ ở bước sóng 260nm và 280nm để kiểm tra nồng độ và chất lượng DNA tách chiết được.

Phân lập và xác định trình tự cDNA của gen IGF2

Cặp mồi nhằm nhân sản phẩm từ cDNA của gen IGF2 được thiết kế dựa trên các trình tự nucleotide của cá tra đã được chú giải dựa trên dữ liệu đã được phân tích và nghiên cứu, bao gồm: mồi xuôi (IGF2-Fw1): 5'-TAGGATCCAGGCGATGGAGGAGCAGA-3' và mồi ngược (IGF2-Rv667): 5'-TAGGATCCCAAGGTCAAGGCTAATAATCC-3'. Sản phẩm thu được sẽ có kích thước theo tính toán lý thuyết là 667bp, thông qua phản ứng PCR sử dụng enzyme *DreamTaq* DNA Polymerase (Fermentas) với chu trình nhiệt như sau: 94°C- 5 phút; (94°C-30 giây; 56°C- 30 giây; 72°C- 40 giây) x 30 chu kỳ; 72°C- 7 phút; kết thúc và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch và giải trình tự bằng máy 3500 Genetic Analyzer. Dữ liệu từ máy giải trình tự được xử lý và phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Sequencing Analysis v5.2 và BioEdit. Kết quả được so sánh với trình tự trên NCBI để kiểm tra.

Phân lập và xác định trình tự đoạn gen IGF2

Sau khi phân lập và giải mã thành công, trình tự cDNA của gen IGF2 được sử dụng để thiết kế 3 cặp mồi nhằm nhân gen IGF2 từ genomic DNA (Bảng 1).

Các sản phẩm thu được tuy chưa dự tính được chính xác về kích thước, do chưa biết được đoạn gDNA của gen IGF2 sẽ được biến đổi (cắt-nối) như thế nào trong quá trình phiên mã để tạo thành mRNA, nhưng vẫn được nhân lên thông qua phản ứng PCR sử dụng enzyme *DreamTaq* DNA Polymerase (Fermentas) với chu trình nhiệt như sau: 94°C- 5 phút; (94°C-30 giây; 56°C- 30 giây; 72°C- 40 giây) x 30 chu kỳ; 72°C- 7 phút; kết thúc và bảo quản ở 4°C. Các sản phẩm PCR này sẽ

được tinh sạch và giải trình tự bằng máy 3500 Genetic Analyzer. Dữ liệu từ máy giải trình tự được xử lý và phân tích bằng các phần mềm

chuyên dụng như Sequencing Analysis v5.2 và BioEdit. Kết quả được so sánh với trình tự trên NCBI để kiểm tra.

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự cDNA-IGF2 nhằm nhân 3 đoạn gen IGF2 từ genomic DNA.

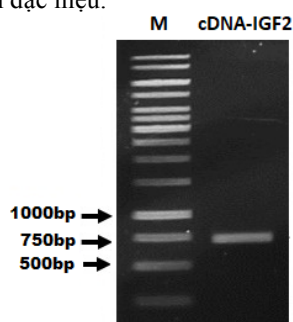
STT cặp mồi	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Khoảng cách giữa 2 mồi trên trình tự cDNA (bp)
1	IGF2-Fw1	5'-TAGGATCCAGCGCATGGAGGAGCAGA-3'	215
	IGF2-Rv202	5'-CTCTGTCTCCACACACGAAGTGCAGAG-3'	
2	IGF2-Fw99	5'-GCTTTTCACGGTGGCATTGTCACTG-3'	262
	IGF2-Rv339	5'-GACGACCTGCAGCGTAGTGGTG-3'	
3	IGF2-Fw244	5'-CCTCACCGAGGAATAGTGGAGGAATGCTG-3'	411
	IGF2-Rv667	5'-TAGGATCCCAAGGTCAAGGCTAATAATCC-3'	

*: Chú thích: Số xuất hiện ở tên mồi là vị trí nucleotide dựa trên trình tự cDNA của gen IGF-II

KẾT QUẢ

Phân lập và xác định trình tự cDNA của gen IGF2

Mẫu RNA tổng số được tách chiết từ mô gan của cá tra được dùng làm khuôn để thực hiện phản ứng tổng hợp cDNA. Sau đó, cDNA vừa được tổng hợp này lại tiếp tục được dùng làm khuôn để khuếch đại cDNA của gen IGF2 thông qua phản ứng PCR với cặp mồi IGF2-Fw1 và IGF2-Rv667. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0.8%. Kết quả ở Hình 1 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước nhỏ hơn 750bp phù hợp với tính toán lý thuyết, được nhân lên đặc hiệu.



Hình 1. Đoạn cDNA của gen IGF2 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. M: Marker 1 kb (Fermentas)

Đoạn cDNA-IGF2 sau đó được tinh sạch và làm khuôn cho chuỗi phản ứng xác định trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự cDNA thu được sau khi phân tích bằng phần mềm Bioedit có chiều dài đạt 642bp cùng trình tự protein suy diễn được thể hiện ở hình 2.

Phân lập và xác định trình tự đoạn gen IGF2

Sau khi giải mã trình tự cDNA của gen IGF2, dựa vào đó, các cặp mồi được thiết kế nhằm nhân

gen IGF2 từ genomic DNA. Các sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0.8% (Hình 3A) cho thấy các đoạn trình tự gen IGF2 từ genomic DNA đã được nhân lên đặc hiệu, bằng rõ ràng với kích thước lần lượt 900bp, 1200bp và 1500bp. Như vậy, chúng tôi có thể thiết lập được sơ đồ khuếch đại các đoạn gen IGF2 từ genomic DNA ở hình 3B.

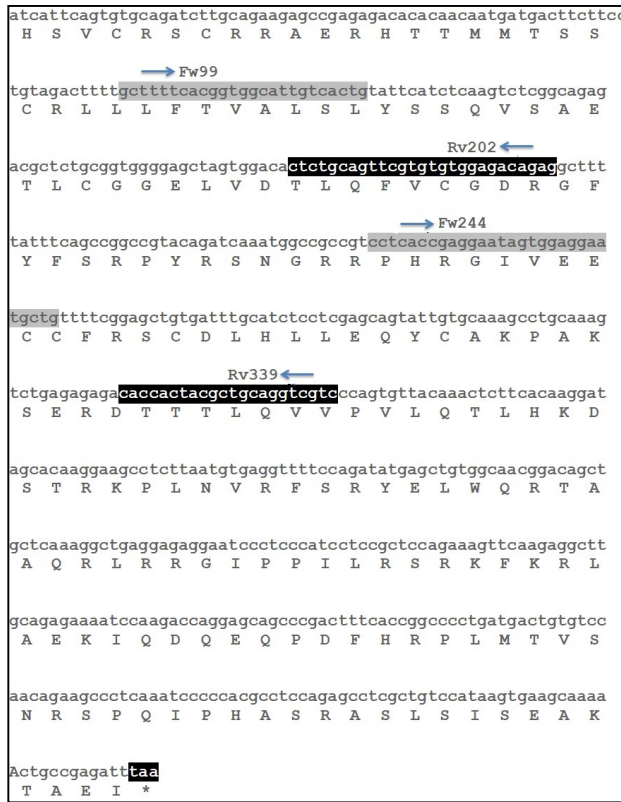
Các đoạn sản phẩm PCR thu được từ các bước trên được tinh sạch và làm khuôn cho chuỗi phản ứng nhằm xác định trình tự bằng phương pháp Sanger. Do các cặp mồi được thiết kế để nhân các đoạn trình tự có một phần trùng nhau, làm cơ sở cho việc ghép nối trình tự, nên từ trình tự của ba đoạn sản phẩm trên, chúng tôi đã thu được một đoạn trình tự có tổng độ dài đạt 3387bp với mã số trên ngân hàng dữ liệu là MH374076. Đoạn trình tự này được đối chiếu với trình tự cDNA để xác định các vùng Intron và Exon của gen IGF2 (Hình 4A), kết quả cho thấy tương ứng với chiều dài từ vị trí khoảng 0 đến 630 trên cDNA thì bao gồm 4 exon và 3 intron trên gDNA, qua đó, cấu trúc đầy đủ của gen IGF2 được phác thảo ở hình 4B.

THẢO LUẬN

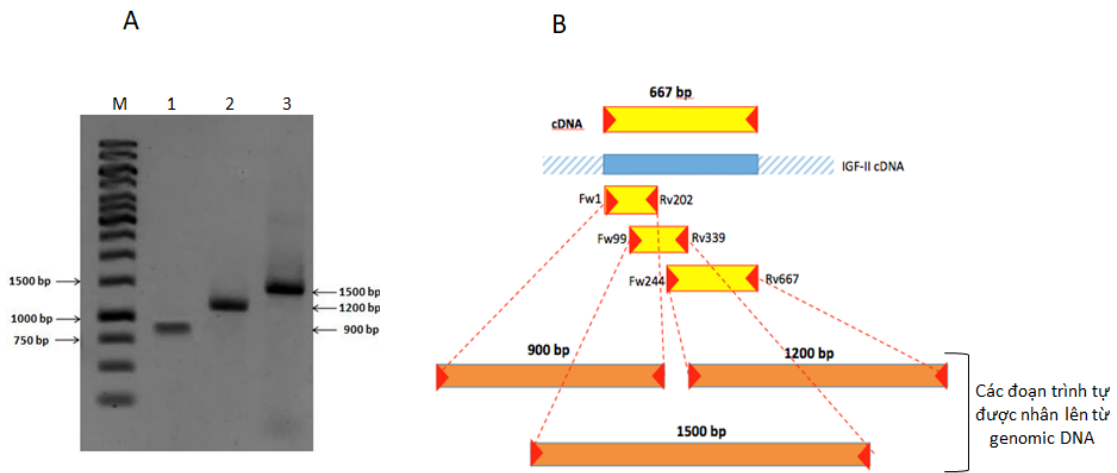
Khi kiểm tra mức độ tương đồng giữa trình tự cDNA của IGF2 trong nghiên cứu của chúng tôi với ngân hàng dữ liệu của NCBI, kết quả BLAST cho thấy trình tự cDNA có độ tương đồng cao nhất là 95% với gen IGF2 của cá nheo thuộc họ *Ictalurus* (GU587840.1 và NM_001200946.1), trình tự protein suy diễn (Hình 1B) có độ tương đồng cao nhất đạt 90% với IGF2 cũng của cá nheo thuộc họ *Ictalurus*. Đối với trình tự gen IGF2 của cá tra nuôi được giải trình tự và ráp nối thông qua ba đoạn trình tự được khuếch đại từ genomic DNA, chúng tôi cũng tiến

hành kiểm tra mức độ tương đồng với ngân hàng dữ liệu của NCBI, kết quả BLAST cho thấy trình tự gen IGF2 này có độ tương đồng cao nhất 96% với

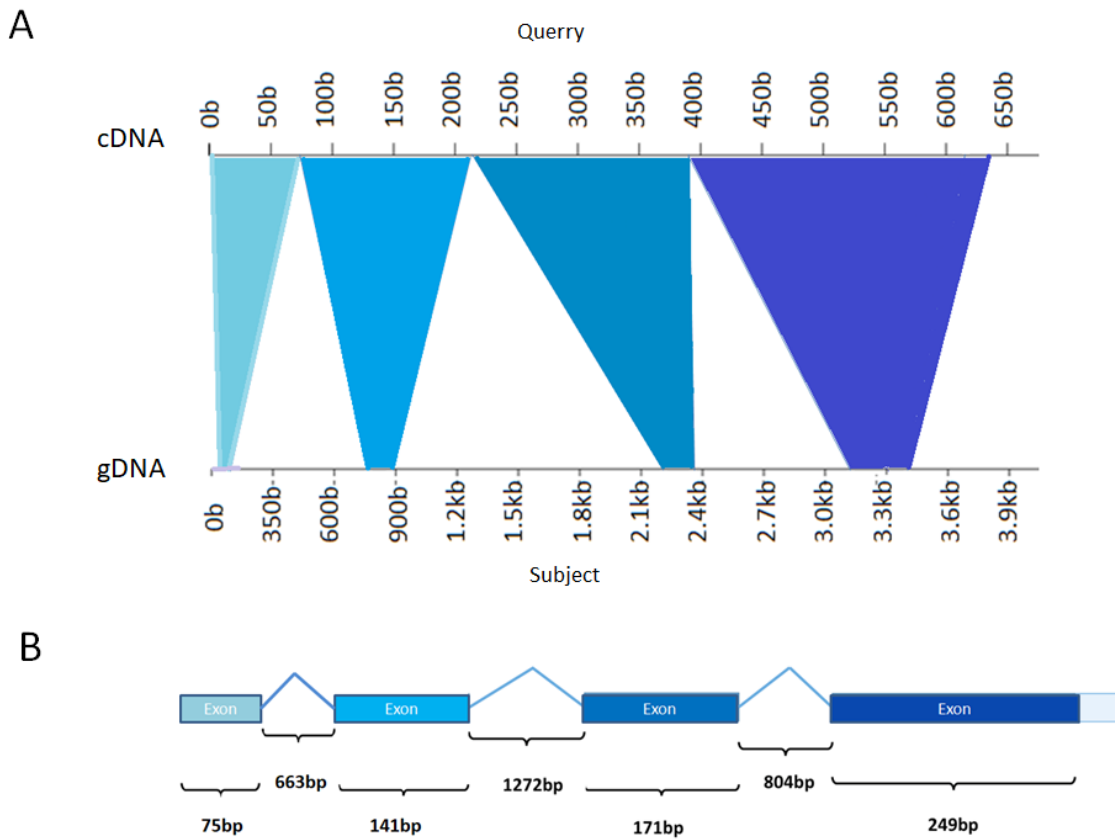
mRNA mã hóa cho protein IGF2 của cá nheo Mỹ *Ictalurus punctatus* (GU589289.1) và cá nheo lục *Ictalurus furcatus* (GU587840.1).



Hình 2. Trình tự nucleotide của đoạn cDNA của gen IGF2 và trình tự protein suy diễn. Mũi tên đánh dấu vị trí các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự này.



Hình 3. Các đoạn sản phẩm của gen IGF2 được nhận lên từ genomic DNA. A: Kết quả điện di sản phẩm PCR nhận các đoạn gen IGF2 từ genomic DNA. M; Marker 1 kb; 1: sản phẩm PCR được nhận lên từ cặp mồi IGF2-Fw1 và IGF2-Rv202; 2: sản phẩm PCR được nhận lên từ cặp mồi IGF2-Fw244 và IGF2-Rv667; 3: sản phẩm PCR được nhận lên từ cặp mồi IGF2-Fw99 và IGF2-Rv339. B: Sơ đồ khuếch đại các đoạn gen IGF2 từ genomic DNA.

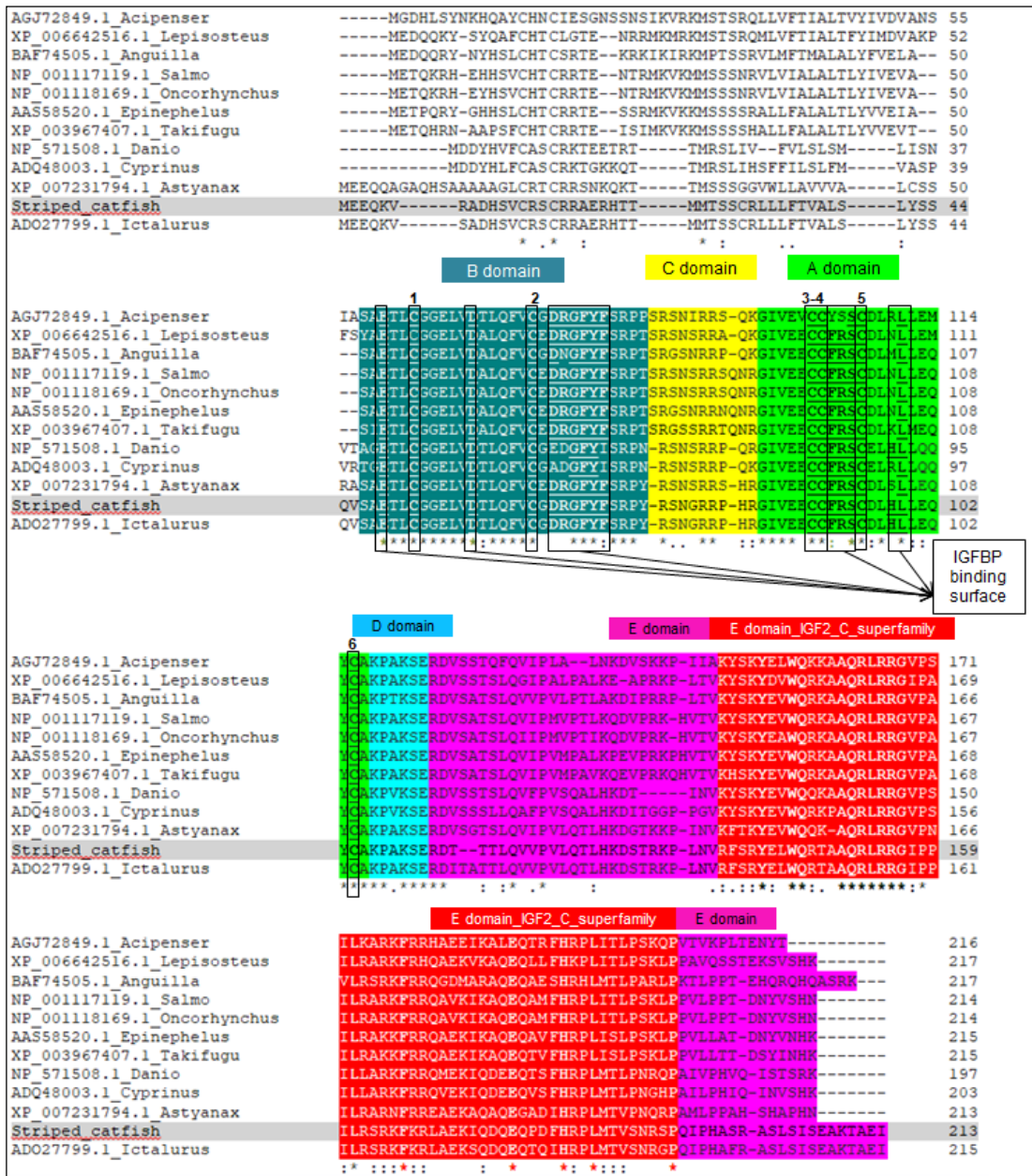


Hình 4. Gen IGF2. A: Sơ đồ so sánh trình tự cDNA và gDNA của gen IGF2. B: Sơ đồ cấu trúc gen IGF2.

Ngoài ra, khi phân tích gen IGF2, De Pagter và đồng tác giả (1988) đã xác định được gen IGF2 có chiều dài khoảng 30kb, bao gồm 8 exon, trong đó có 5 vùng exon không mã hóa protein (exon 1 đến 4 và 4B), và tiếp theo đó là 3 vùng exon mã hóa protein (exon 5, 6 và 7). Exon 4 và 4B có chứa các rất nhiều trình tự điều hòa promoter như hộp TATA, hộp CCAAT, và vị trí nhận biết SP1, còn exon 7 bao gồm cả vùng 3' không dịch mã (de Pagter-Holthuisen *et al.*, 1988). Ở những nghiên cứu gần đây hơn, gen IGF2 ở người được xác định bao gồm 9 exon, và chỉ có từ exon 7 đến exon 9 có chứa vùng mã hóa protein, còn lại các exon 1,2,4,5 và 6 quy định 5 vùng promoter tương ứng là gồm P1, P0, P2, P3 và P4. Gen IGF2 còn chứa 2 trình tự lặp Alu và 4 đảo CpG, với đảo CpG cuối cùng bao phủ lên vùng mã hóa protein ở exon 9 (Monk *et al.*, 2006). Như vậy, đối chiếu với kết quả thu được ở nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy phạm vi trình tự gen IGF2 phân tích được ở cá tra nuôi *Pangasianodon hypophthalmus* lại chứa 4 vùng trình tự exon mã hóa cho protein IGF2 với chiều dài 75bp, 141bp, 171 bp

và 249bp (Hình 4B), xen giữa là 3 intron, vẫn còn các vùng trình tự exon mã hóa cho vùng 3' không dịch mã và vùng promoter chưa được giải mã đầy đủ, cần được xác định thêm, nhằm làm rõ cơ chế điều hòa biểu hiện gen IGF2 ở loài cá này.

Trình tự protein suy diễn từ trình tự cDNA-IGF2 đã phân lập và giải trình tự được chúng tôi sử dụng để đồng hàng cùng các trình tự protein IGF2 của các loài cá đã được công bố: cá hoàng *Acipenser schrenckii* (ID: AGJ72849.1), cá láng đốm *Lepisosteus oculatus* (ID:XP_006642516), cá chình Nhật Bản *Anguilla japonica* (ID: BAF74505.1), cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* (ID: NP_001118169.1), cá hồi Đại Tây Dương *Salmo salar* (ID: NP_001117119.1), cá mú *Epinephelus coioides* (ID: AAS58520.1), cá nóc hồ *Takifugu rubripes* (ID:XP_003967407.1), cá ngựa vằn *Danio rerio* (ID: NP_571508.1), cá chép *Cyprinus carpio* (ID: ADQ48003.1), cá hang mù Mexico *Astyanax mexicanus* (ID: XP_007231794.1). Từ đó khảo sát độ bảo tồn các vùng cấu trúc và chức năng của IGF2 ở cá tra nuôi trong nghiên cứu này.



Hình 5. Kết quả đồng hàng trình tự IGF2 của cá tra nuôi và các loài cá khác. Tên của các trình tự IGF2 của các loài khác được đóng hàng gồm: mã số định danh và một phần tên Latin của loài (được chú thích theo thứ tự từ trên xuống dưới theo Bảng 2; Tên của trình tự IGF2 của cá tra nuôi được ký hiệu là *Striped_catfish*, và được bôi màu xám; Các domain B, C, A, D, E trong protein IGF2 được bôi màu xanh da trời đậm, vàng, xanh lá cây, xanh lơ, hồng-đỏ-hồng, tương ứng, trong đó phần IGF2-C-super family thuộc domain E được bôi màu đỏ, chữ trắng. Các khung viền đen có đánh số 1,2,3,4,5,6 chỉ ra 6 vị trí Cystein (C) luôn được bảo tồn trong các trình tự IGF2. Các khung viền đen còn lại chỉ ra các trình tự amino acid bảo thủ ở vùng liên kết với IGF binding protein (IGF binding protein binding surface- IGFBP binding surface).

Theo tổng hợp của Yongming Yuan và Yunhan Hong (2017), IGF2 là một đoạn peptit ngắn gồm 67 đến 70 amino acid, thuộc 4 domain lần lượt là B, C,

A và D. Domain E ở đầu C và chuỗi peptide tín hiệu ở đầu N chỉ tồn tại ở tiền hormone (preprohormone), sau đó chúng sẽ bị cắt bỏ trong quá trình hậu dịch

mã để tạo thành đoạn peptide IGF2 hoàn chỉnh với hoạt tính sinh học (Yongming, Yunhan, 2017). Như vậy, kết quả đóng hàng trình tự IGF2 của cá tra nuôi và trình tự IGF2 của các loài cá khác cho thấy có đầy đủ các domain B, C, A, D và E ở IGF2 của cá tra nuôi (Hình 5). Trong đó, domain A và B có trình tự bảo thủ cao giữa các loài cá: 23/29 amino acid tương đồng chức năng giữa các loài ở domain B, đạt 79.3%; 17/21 amino acid tương đồng chức năng giữa các loài ở domain A, đạt 80.9% (Hình 5), phù hợp với kết quả nghiên cứu của Antony và đồng tác giả (2005) khi khẳng định 2 domain này ở IGF2 rất bảo thủ ở các loài động vật có xương sống, với tỉ lệ trình tự tương đồng đạt từ 70 đến 90% (Antony *et al.*, 2005). Domain C của IGF2 ở động vật có vú thường có 8 amino acid, trong khi ở các loài cá có xương lại thường có 11 amino acid, trừ cá ngựa vằn *Danio rerio* có 9 amino acid trong vùng này (Wood, Duan, 2004). Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, domain C của IGF2 cá tra nuôi lại có 9 amino acid, với trình tự khá giống domain C của IGF2 ở cá ngựa vằn *Danio rerio*, cá nheo lục *Ictalurus furcatus*, cá hang mù Mexico *Astyanax mexicanus*, cá chép *Cyprinus carpio*, trong khi các loài cá còn lại có 11 amino acid ở domain này (Hình 5). Khác với IGF1 có vùng domain D với trình tự nhiều biến dị, vùng D ở IGF2 lại rất bảo thủ, với 5 trên 6 amino acid tương đồng khi đóng hàng trình tự của người và các loài cá xương (Löffing-Cueni *et al.*, 1999). Điều này cũng được thấy trong nghiên cứu của chúng tôi, khi domain D gen IGF2 của cá tra nuôi cũng có đến 5 trên 6 amino acid tương đồng (K-P-A/T/V-K-S-E: Lys-Pro-Ala/Thr/Val-Lys-Ser-Glu) với trình tự domain D của các loài cá được kiểm tra (Hình 5). Cuối cùng là domain E-phần sẽ bị loại bỏ khỏi IGF2 để khiến protein này được hoàn thiện, có hoạt tính sinh học, thường có độ dài lớn hơn 98 amino acid (Ayson *et al.*, 2002). Trong nghiên cứu này, domain E của IGF2 cá tra nuôi có độ dài là 101 amino acid (Hình 5), được xác định có chứa IGF2_C_super family (phần trình tự được bôi màu đỏ, chữ trắng) tương đồng với trình tự của các loài cá khác được đóng hàng (Hình 5), và với các trình tự khác của IGF2 trên ngân hàng NCBI.

Cấu trúc bậc 4 của protein IGF2 được tạo thành nhờ liên kết bisulfite giữa 6 cystein được bảo tồn ở tất cả các trình tự IGF2 (Yongming, Yunhan, 2017). Nghiên cứu của chúng tôi cũng tìm ra được kết quả tương tự, với 6 vị trí Cystein được đánh dấu bằng khung viền đen và ký hiệu số từ 1 đến 6 (Hình 5) rất bảo thủ ở trình tự IGF2 của cá tra nuôi, cũng như các trình tự khác được khảo sát cùng. Bên cạnh đó, các

trình tự thuộc vùng liên kết với các IGF binding protein (Yongming, Yunhan, 2017) (được đánh dấu bằng khung viền đen thuộc vùng IGFBP binding surface) cũng được bảo tồn, và rất tương đồng giữa trình tự IGF2 của cá tra nuôi và các loài cá khác (Hình 5). Trong đó, theo nghiên cứu của Yongming và Yuhan (2017) và kết quả BLAST, các trình tự thuộc domain B là vùng gắn với các IGF binding protein nói chung, còn các trình tự thuộc domain A là vùng gắn với các IGF2 binding protein (Yongming, Yunhan, 2017).

KẾT LUẬN

Các gen IGF đã được nhiều nghiên cứu chứng minh là gen quan trọng đối với quá trình sinh trưởng ở các loài cá. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và xác định thành công trình tự cDNA mã hóa cho protein IGF2 của cá tra nuôi *Pangasianodon hypophthalmus*, đồng thời giải mã được vùng trình tự gen IGF2 có chứa các exon mã hóa cho protein IGF2 của loài cá này. Các kết quả nêu trên sẽ tạo tiền đề để phát triển những nghiên cứu sâu hơn về vùng điều hòa 3' và 5' không dịch mã của gen IGF2 của cá tra nuôi, liên quan đến chức năng gen này trong tương lai.

Lời cảm ơn: Công trình này bao gồm kết quả của đề tài cấp cơ sở “Phân lập và xác định trình tự cDNA mã hóa insulin-like growth factor (IGF –I) hoặc/và IGF-II ở cá tra nuôi” do Viện Nghiên cứu hệ gen cấp kinh phí thực hiện và một phần kết quả của đề tài cấp nhà nước “Phân tích hệ gen biểu hiện (exome + transcriptome) của cá tra nhằm phát triển chỉ thị phân tử phục vụ chọn giống cá tra theo hướng tăng trưởng” do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cấp kinh phí thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Antony WW, Cunming D, Howard AB (2005) Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. *Int Rev Cyto* 243: 215-282.
- Ayson FG, de Jesus EG, Moriyama S, Hyodo S, Funkenstein B, Gertler A, Kawauchi H (2002) Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen Comp Endocrinol* 126: 165–174.
- Chauvigne F, Gabillard JC, Weil C, Rescan PY (2003) Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *Gen Comp Endocrinol* 133: 233 – 242.

- Đào Thị Tuyết, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bảy, Phạm Anh Tuấn (2003) Đánh giá tính đa hình các quần đàn cá tra nuôi (*Pangasius hypophthalmus*) ở Việt nam bằng phương pháp RAPD. *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc* Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 616-620.
- de Pagter-Holthuizen P, Jansen M, van der Kammen RA, van Schaik FMA, Sussenbach JS (1988) Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene: characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. *Biochim Biophys Acta* 950: 282-295.
- Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, Navarro I, Gutierrez J, Le Bail PY (2003) Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 133: 233 – 242.
- Löffing-Cueni D, Schmid AC, Reinecke M (1999) Molecular cloning and tissue expression of the insulin-like growth factor II prohormone in the bony fish *Cottus scorpius*. *Gen Comp Endocrinol* 113: 32–37.
- Maures T, Chan SJ, Xu B, Sun H, Ding J, Duan C (2002) Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish. *Endocrinology* 143: 1858 – 1871.
- Monk D, Sanches R, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Abu-Amero S, Murrell A, Friess H, Reik W, Stanier P, Constancia M, Moore GE (2006) Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet* 15: 1259-1269.
- Moriyama S, Ayson FG, Kawachi H (2000) Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1553-1562.
- Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Kim Đệ, Phạm Anh Tuấn (2003) Phân tích di truyền AFLP cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tuyển tập báo cáo khoa học về nuôi trồng thủy sản. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 2 (24-25/11/2003)*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội: 85-88.
- Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, Trần Đình Trọng, Nguyễn Công Dân, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Đinh Hùng, Phạm Đình Khôi, Bùi Thị Liên Hà, Nguyễn Điền, Nguyễn Quyết Tâm, Ngô Hồng Ngân, Trịnh Quang Sơn (2009) Chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhằm tăng tỷ lệ phi lê bằng chọn lọc gia đình. *Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II*: 1-84.
- Peterson BC, Bosworth BG, Bilodeau AL (2005) Differential gene expression of IGF-I, IGF-II, and toll-like receptors 3 and 5 during embryogenesis in hybrid (channel x blue) and channel catfish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 141: 42-47.
- Peterson BC, Waldbieser GC (2009) Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest Anim Endocrinol* 37: 74-83.
- Phạm Anh Tuấn, Nguyễn Hữu Ninh (2003) Microsatellite nghiên cứu biến dị về màu sắc thịt trắng và thịt vàng của cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 2 (24-25/11/2003)*. *Tuyển tập báo cáo khoa học về nuôi trồng thủy sản* Nxb Nông nghiệp, Hà Nội: 59-62.
- Radaelli G, Patruno M, Maccatrozzo L, Funkenstein B (2003) Expression and cellular localization of insulin-like growth factor-II protein and mRNA in *Sparus aurata* during development. *J Endocrinol* 178: 285 – 299.
- Vong QP, Chan KM, Cheng CHK (2003) Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by realtime PCR: differential regulation of expression by GH. *J Endocrinol* 178: 513 – 521.
- Wood AW, Duan C (2004) Targeted gene knockdown reveals an important role for insulin-like growth factor binding protein-2 in zebrafish embryonic development. *Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting, New Orleans, LA, OR55-3 (Abstract)*.
- Yongming Y, Yunhan H (2017) Medaka insulin-like growth factor-2 supports self-renewal of the embryonic stem cell line and blastomeres in vitro. *Sci Rep* 7: 78.

STRUCTURE OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 (IGF2) GENE FROM STRIPED CATFISH (*PANGASIANODON HYPOPTHALMUS*)

Le Thi Nguyen Binh, Nguyen Thi Hoa, Tran Thi Huyen Trang, Nguyen Thanh Phuong, Kim Thi Phuong Oanh

Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Gene coding Insulin-like growth factor 2 (IGF2) is one of genes relating the growth of many fish species, including striped catfish. In this study, cDNA coding to protein IGF2 was isolated from total RNA extracted from liver tissue of catfish, then was amplified through reverse transcription PCR and standard PCR with IGF2

specific primer pair to generate the 642bp-in-size PCR product. The sequence of this cDNA-IGF2 is similar up to 95% to the cDNA-IGF2 gene sequence of catfish included in family *Ictalurus*. Based on that sequence, 3 primer pairs were designed to amplify 3 regions of IGF2 gene from genomic DNA extracted from fins of catfish, which have 900bp, 1500bp and 1200bp in length. That 3 regions were sequenced and assembled to give the final sequence with 3387bp in length of IGF2 gene, which includes 4 exons coding to IGF2 protein, and is similar up to 96% to sequence of mRNA coding to IGF2 protein of channel catfish *Ictalurus punctatus* and that of blue catfish *Ictalurus furcatus*. Determining the structure of IGF2 gene of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* enable us to further examine its function and genetic variation.

Keywords: *Insulin-like growth factor 2, IGF2, Pangasianodon hypophthalmus, striped catfish*