

PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH VÀ NHÂN DÒNG DNA TỪ CÁC MẪU MÔ ĐỘNG VẬT CÓ LƯỢNG DNA THẤP PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG SINH HỌC

Lê Đức Minh^{1,2*}, Dương Thúy Hà¹, Nguyễn Văn Thành¹, Nguyễn Mạnh Hà²,
Đình Đoàn Long¹, Đỗ Tước³, Nguyễn Đình Hải⁴

¹Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, *le.duc.minh@hus.edu.vn

²Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường, ĐHQG Hà Nội

³Viện Điều tra và Quy hoạch rừng

⁴Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Liên, Thanh Hóa

TÓM TẮT: Điều tra các loài động vật nguy cấp và khó tiếp cận là một thách thức trong nghiên cứu đa dạng sinh học có sử dụng các phương pháp điều tra truyền thống. Thực tế này đòi hỏi cần có những phương pháp nghiên cứu mới để tăng hiệu quả điều tra. Gần đây, với sự tiến bộ của công nghệ sinh học, phương pháp điều tra sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử đã ngày càng trở nên phổ biến và hứa hẹn có nhiều ứng dụng mới và trong nhiều trường hợp có thể trợ giúp những phương pháp điều tra truyền thống. Tuy nhiên, một trong những khó khăn cơ bản của phương pháp điều tra sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử là những mẫu thu được trên thực địa thường có chất lượng thấp, khó chiết tách và nhân dòng DNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày một phương pháp chiết tách và nhân dòng DNA đơn giản có hiệu quả cao, có thể ứng dụng trong điều kiện ở Việt Nam. Phương pháp này đã được sử dụng thành công trong việc chiết tách và nhân dòng 30 mẫu xương, sụn và da khô của hai nhóm động vật có xương sống là Mang (*Muntiacus* sp.) và giải Thượng Hải (*Rafetus swinhoei*). Trình tự thu được từ phương pháp này đã đóng vai trò quan trọng trong việc xây dựng cây phát sinh loài và đánh giá mức độ đa dạng di truyền trong hai nhóm động vật này. Vì vậy, phương pháp này có khả năng ứng dụng rộng rãi trong việc điều tra và nghiên cứu đa dạng sinh học và đưa ra được các kết quả tin cậy dựa trên các mẫu mô động vật có chất lượng thấp thu được từ thực địa.

Từ khóa: *Muntiacus*, *Rafetus swinhoei*, điều tra đa dạng sinh học, mô chất lượng thấp, sinh học phân tử.

MỞ ĐẦU

Điều tra thực địa đóng một vai trò quan trọng trong nghiên cứu đa dạng sinh học nhằm xác định tình trạng phân bố, quần thể và số lượng cá thể của các loài được quan tâm. Từ trước tới nay, ở Việt Nam cũng như nhiều nơi trên thế giới, điều tra thực địa chủ yếu được tiến hành dựa trên các phương pháp truyền thống như điều tra theo tuyến, quan sát, đánh bắt, đánh dấu và dùng bẫy ảnh. Tuy nhiên, những phương pháp đó chỉ có hiệu quả đối với những loài có mức độ xuất hiện cao tại khu vực điều tra. Đối với những loài có số lượng cá thể ít, việc xác định vùng phân bố và quần thể của chúng thường gặp nhiều khó khăn do tần suất quan sát và ghi nhận được những loài này thường rất thấp.

Vì vậy, thực tế nghiên cứu cho thấy cần có những phương pháp điều tra mới để xác định sự có mặt cũng như vùng phân bố của những loài ít gặp trên. Gần đây các phương pháp sử dụng kỹ

thuật sinh học phân tử đã trở thành công cụ hữu hiệu trong việc điều tra các loài nguy cấp hoặc khó tiếp cận bằng phương pháp thông thường [2, 6, 8, 14]. Đặc biệt, những nghiên cứu này chủ yếu tập trung thu các mẫu có trên hiện trường mà không gây ảnh hưởng đến cá thể cần nghiên cứu, như mẫu lông và mẫu phân. Một phương pháp khác có tính đột phá mới được thử nghiệm là thu thập vạt hút máu để điều tra đa dạng thú tại miền Trung Việt Nam [18]. Bằng cách giải trình tự DNA các mẫu máu thu được từ những mẫu vạt này, các nhà nghiên cứu đã tìm ra sáu loài thú thuộc ba bộ, trong đó có những loài có số lượng ít và khó bắt gặp như mang Trường Sơn (*Muntiacus truongsonensis*) và thỏ vằn (*Nesolagus timminsi*).

Ngoài ra, vật liệu di truyền từ các mẫu vật được giữ trong bảo tàng cũng là một nguồn cung cấp DNA tốt, có thể giúp giải quyết những vấn đề còn tồn tại trong sinh học quần thể hoặc xây dựng cây phát sinh chủng loại của các nhóm loài đang được quan tâm [4, 5, 12, 21,

22]. Gần đây, nhiều loài động vật hoang dã trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng có các quần thể bị suy giảm và trở nên rất hiếm [15, 19]. Vì vậy, việc thu mẫu sống của những loài này thường đòi hỏi nguồn lực lớn về tài chính và thời gian do chúng đã trở nên quá hiếm hoặc khó có thể tiếp cận được. Hơn nữa, khác với những mẫu thu được từ các hoạt động buôn bán hay bắt giữ, các mẫu của bảo tàng thường có các thông tin chính xác về địa điểm và thời gian thu mẫu. Những thông tin này có khả năng giúp làm sáng tỏ nhiều vấn đề về tình trạng quần thể trong quá khứ của những loài đang nghiên cứu. Chính vì vậy, vai trò của các mẫu vật trong bảo tàng ngày càng quan trọng và có giá trị cho những nghiên cứu về đa dạng sinh học khi áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử.

Một điểm chung cơ bản của các mẫu thu được trên thực địa bằng phương pháp không gây tác động (chỉ thu mẫu DNA) và các mẫu trong có trong bảo tàng là lượng DNA còn lại trong các mẫu thường có chất lượng thấp và cần có những phương pháp đặc biệt để chiết tách và nhân dòng thành công. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng các phương pháp khác nhau để chiết tách DNA từ các mẫu vật có lượng DNA thấp. Tuy nhiên, có nhiều vấn đề gây khó khăn trong việc chiết tách DNA từ những mẫu có chất lượng DNA thấp vì đã để lâu và thường bị nhiễm DNA của các mẫu vật khác [3, 9]. Hơn nữa, các phương pháp sử dụng để tách chiết hiện tại

thường khác nhau và tương đối phức tạp gây khó khăn cho người sử dụng khi mong muốn tìm kiếm một phương pháp tin cậy và dễ sử dụng. Mục đích của nghiên cứu này là xây dựng một phương pháp đơn giản và hiệu quả hơn dùng trong việc chiết tách DNA từ những mẫu vật có chất lượng thấp. Chúng tôi đã sử dụng các bộ Kit có sẵn có thể dễ dàng đặt mua. Phương pháp mà chúng tôi đã áp dụng một phần dựa trên phương pháp của Austin & Arnold (2002) [1] và có sửa đổi để thích hợp với điều kiện của một phòng thí nghiệm sinh học phân tử thông thường không đòi hỏi quá nhiều trang thiết bị hiện đại do đó phù hợp hơn với điều kiện ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu là các mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu tiến hóa và bảo tồn các loài mang (*Muntiacus* sp.) và nghiên cứu đa dạng di truyền và tiến hóa loài giải Thượng Hải (*Rafetus swinhoei*) ở Việt Nam. Các mẫu là các loại mô xương, sụn và da khô được thu trong quá trình điều tra thực địa và trong bảo tàng (bảng 1). Đặc điểm chung của các mẫu mô xương, sụn, da khô là mẫu thu được từ khá lâu, không được lưu trữ, bảo quản trong điều kiện tốt nên hàm lượng DNA thấp và có thể lẫn các thành phần không mong muốn (môi, mọt, vi khuẩn hoặc vật liệu di truyền của các loài khác).

Bảng 1. Các mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Kí hiệu | Loại mẫu | Tên loài | Địa điểm thu mẫu |
|-----|---------|----------|----------------------------------|------------------|
| 1 | Rs1 | xương sọ | <i>Rafetus swinhoei</i> | Ba Vì |
| 2 | Rs2 | mai | <i>Rafetus swinhoei</i> | Yên Bái |
| 3 | Rs3 | sụn hàm | <i>Rafetus swinhoei</i> | Phú Thọ |
| 4 | M2.1 | Da khô | <i>Muntiacus muntjak</i> | Thanh Hóa |
| 5 | M2.2 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Nghệ An |
| 6 | M2.3 | Xương sọ | <i>Muntiacus</i> sp. | Thanh Hóa |
| 7 | M2.4 | Xương sọ | <i>Muntiacus truongsongensis</i> | |
| 8 | M2.5 | Xương sọ | <i>Muntiacus</i> sp. | Điện Biên |
| 9 | M2.6 | Xương | <i>Muntiacus muntjak</i> | |
| 10 | M2.7 | Da khô | <i>Muntiacus truongsongensis</i> | Quảng Nam |
| 11 | M2.8 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Quảng Nam |
| 12 | M2.9 | Xương | <i>Muntiacus muntjak</i> | Nghệ An |
| 13 | M2.10 | Xương sọ | <i>Muntiacus</i> sp. | Kon Tum |
| 14 | M2.11 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Quảng Nam |

| | | | | |
|----|-------|-------------|------------------------------|-------------|
| 15 | M2.12 | Xương sọ | <i>Muntiacus</i> sp. | Nghệ An |
| 16 | M2.13 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Nghệ An |
| 17 | M2.14 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Quảng Nam |
| 18 | M2.15 | Da, lông | <i>Muntiacus</i> sp. | Kon Tum |
| 19 | M2.16 | Xương, răng | <i>Muntiacus</i> sp. | Nghệ An |
| 20 | M2.17 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Nghệ An |
| 21 | M2.18 | Da | <i>Muntiacus puhoatensis</i> | Nghệ An |
| 22 | M2.19 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | |
| 23 | M2.20 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | |
| 24 | M2.21 | Da khô | <i>Muntiacus</i> sp. | |
| 25 | M3.5 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Son La |
| 26 | M3.6 | Da khô | <i>Muntiacus</i> sp. | Son La |
| 27 | M3.7 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Son La |
| 28 | M3.8 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Son La |
| 29 | M3.9 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Son La |
| 30 | M3.10 | Xương | <i>Muntiacus muntjak</i> | Son La |
| 31 | M3.11 | Da khô | <i>Muntiacus muntjak</i> | Son La |
| 32 | M4.1 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Myanma |
| 33 | M5.7 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Tuyên Quang |
| 34 | M5.11 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Tuyên Quang |
| 35 | M5.14 | Xương | <i>Muntiacus</i> sp. | Tuyên Quang |

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Các mẫu được tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ Kit Dneasy Blood và Tissue (Qiagen, Đức). Để tách chiết, vật liệu di truyền được lấy ở phần sâu bên trong khối mẫu vật (hạn chế lấy vùng bề mặt) nhằm hạn chế nguy cơ nhiễm. Khoảng 0,1-0,2 g với mẫu da khô và 0,3-0,4 g với mẫu xương, sụn được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước như đầu tip giúp tăng hiệu quả chiết tách DNA. Để giảm nguy cơ nhiễm các sản phẩm không mong muốn trên bề mặt, các mẫu xương, sụn, da khô được rửa với Clorox hoặc Zonrox 10%, sau đó, rửa lại bằng nước cất một vài lần để làm sạch chất tẩy rửa và để khô. Quá trình tách chiết được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất có chỉnh lý dựa trên phương pháp của Austin & Arnold (2002) và Le et al. (2007) [1, 13] ở các mẫu xương, sụn và da khô. Cụ thể là, trong bước ủ mẫu ly giải tế bào, nhiệt độ ủ mẫu tăng thành 60°C, mẫu được ủ trong 72 giờ, kiểm tra và bổ sung Proteinase K (mỗi lần khoảng 20 µl) sau 24 h. Bước cuối cùng khi thu DNA tổng số, chỉ bổ sung 60 µl dung dịch đệm hòa tan DNA, thay vì 200 µl như hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối chứng âm được tiến hành song song trong mỗi lần tách chiết. Nồng độ DNA

tổng số thu được được kiểm tra bằng phương pháp đo quang phổ trên máy BioMate 3 Spectrophotometer và điện di trên gel agarose 1%, trong đệm TBE 1X (Tris base, Boric acid, EDTA pH8) ở 70V trong 30 phút.

Phương pháp so sánh hiệu quả sử dụng Taq polymerase trong phản ứng PCR

Để kiểm tra hiệu quả của một số loại Taq polymerase sử dụng trong nghiên cứu với các mẫu đặc thù, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR so sánh hiệu quả sử dụng ba loại Taq (PCR mastermix và HotTaq mastermix của Fermentas, Đức và HotStarTaq của Qiagen, Đức) trên 2 nhóm mẫu: mẫu có nồng độ DNA tổng số cao và mẫu có nồng độ DNA tổng số thấp. Tổng thể tích mỗi phản ứng PCR là 20 µl, bao gồm 10 µl mastermix, 5 µl nước, 2 µl mỗi loại mồi (10 pmol/µl), 1-2 µl khuôn, tùy nồng độ DNA. Điều kiện của phản ứng PCR là: 95°C ở 15' cho Taq của Qiagen và 5' cho Taq của Fermentas; 40 chu kỳ phản ứng ở 95°C trong 30", 45°C trong 45", 72°C trong 1'; bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 6'. Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng nhân dòng gen cytochrome b có kích thước từ 500-800 bp (bảng 2), nhiệt độ gắn mồi nằm trong khoảng 45-50°C.

Bảng 2. Các môi sử dụng trong nghiên cứu

| Tên môi | Trình tự môi | Tài liệu tham khảo |
|-----------------------|--------------------------------------------|--------------------|
| Gludg (f) | 5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG - 3' | [17] |
| CB3 (r) | 5'-GGCAAATAGGAAATATCATTC - 3' | [17] |
| CB534 (f) | 5'-GACAATGCAACCCTAACACG - 3' | [7] |
| Tcytbthr (r) | 5'-TTCTTTGGTTTACAAGACC - 3' | [7] |
| C1 (r) | 5'-GTGAGTAGTGTATAGCTAGGAAT - 3' | Thiết kế mới |
| C2 (f) | 5'-CCATTTGATGAACTTTGGAT - 3' | Thiết kế mới |
| C3 (r) | 5'-CGTAATATAGGCCTCGTCCGAT - 3' | Thiết kế mới |
| C4 (f) | 5'-CCTCACTATTCTTCATATGCA - 3' | Thiết kế mới |
| C5 (r) | 5'-CTAGGATTATGAATGGTAATA - 3' | Thiết kế mới |
| C6 (f) | 5'-CTACTACTATCAATCGCCATA - 3' | Thiết kế mới |
| C7 (r) | 5'-GGTCTCCTAGTAGGTTGGGGTA - 3' | Thiết kế mới |
| M _μ l14724 | 5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG - 3' | [11] |
| MuH15149 | 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 3' | [11] |
| M _μ l15162 | 5'-GCAAGCTTCTACCATGAGGACAAATATC - 3' | [11] |
| MuH15915R | 5'-GGAATTCATCTCTCCGTTTACAAGAC - 3' | [11] |

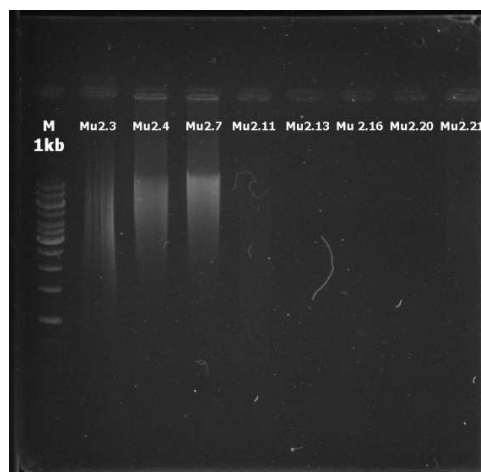
Phương pháp PCR cho các mẫu có nồng độ DNA rất thấp

Phản ứng PCR với các mẫu có nồng độ DNA rất thấp được tiến hành với HotStarTaq (Qiagen, Đức) theo thể tích và điều kiện phản ứng tương tự như đã trình bày ở trên. Đối với các mẫu không thu được sản phẩm PCR do hàm lượng DNA quá thấp, sản phẩm của phản ứng PCR được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR lần hai. Khi cách này cũng không hiệu quả, các cặp môi mới nhận các phân đoạn gen ngắn có kích thước từ 200-400 nucleotide sẽ được thiết kế thêm (bảng 2).

Các sản phẩm PCR thành công sau đó được gửi giải trình tự hai chiều tại MacroGen-Hàn Quốc. Chúng tôi kiểm tra tính xác thực của các trình tự thu được bằng công cụ BLAST trên Ngân hàng gen (GenBank) trước khi tiến hành các phân tích sâu hơn như xây dựng cây phát sinh loài. Chúng tôi sử dụng hai phương pháp xây dựng cây phát sinh loài là phương pháp tiết kiệm tối đa (Maximum parsimony) trong phần mềm PAUP 4.0 [20] và phương pháp Bayesian trong phần mềm MrBayes 3.2 [10].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số



Hình 1. DNA tổng số một số mẫu mang trong nghiên cứu

Maker 1kb. Điện di trên gel agarose 1%, TBE 1X, ở 70V trong 30 phút.

Với phương pháp tách chiết như trên chúng tôi đã tách chiết thành công 23 mẫu xương, 2 mẫu sụn và 5 mẫu da khô, chiếm 30/35 ($\approx 86\%$) các mẫu giải và mang thu nhận được từ hai nghiên cứu. Kết quả đo quang phổ nồng độ

DNA một số mẫu nằm trong khoảng từ 21-300 $\mu\text{g/ml}$ (bảng 3). Tuy nhiên, phần lớn các mẫu có nồng độ DNA thấp nên khi pha loãng mẫu máy Biomate 3 Spectrophotometer không có khả năng đo cho kết quả chính xác, do nồng độ mẫu nằm

ngoài vùng đo tối ưu của máy là 5-4000 $\mu\text{g/ml}$. Bởi vậy, chúng tôi lựa chọn cách thức kiểm tra nồng độ DNA bằng điện di trên gel agarose 1%. Cách này giúp tiết kiệm mẫu và vẫn cho kết quả tổng quan về hàm lượng DNA (hình 1).

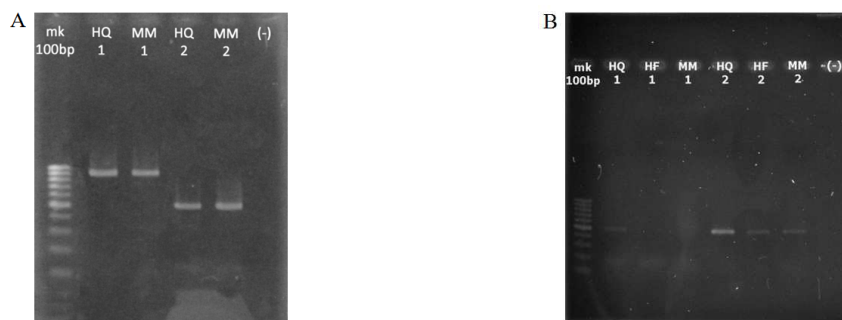
Bảng 3. Nồng độ DNA của một số mẫu mang trong nghiên cứu

| Mẫu | A_{260}/A_{280} | [DNA] ($\mu\text{g/ml}$) | Mẫu | A_{260}/A_{280} | [DNA] ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------|-------------------|----------------------------|--------|-------------------|----------------------------|
| Mu 1.5 | 1,68 | 66,44 | Mu 2.3 | 1,51 | 101,3 |
| Mu 1.10 | 1,50 | 81,53 | Mu 2.4 | 1,85 | 201,8 |
| Mu 1.11 | 1,60 | 105,5 | Mu 2.5 | 2,00 | 81,63 |
| Mu 1.7 | 1,48 | 65,53 | Mu 2.6 | 1,87 | 36,64 |
| Mu 2.1 | 2,00 | 43,1 | Mu 2.7 | 1,86 | 302 |
| Mu 2.2 | 1,97 | 21,02 | Mu 2.8 | 1,89 | 86,74 |

Hiệu quả sử dụng Taq polymerase

Đối với mẫu mô tươi, hình điện di (hình 2A) cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể giữa HotStarTaq mastermix và PCR mastermix trong

phản ứng PCR. Đối với mẫu có hàm lượng DNA thấp, HotStarTaq mastermix của Qiagen cho hiệu quả phản ứng PCR khác biệt rõ rệt so với hai loại taq là HotTaq và Taq polymerase thông thường của Fermentas (hình 2B).



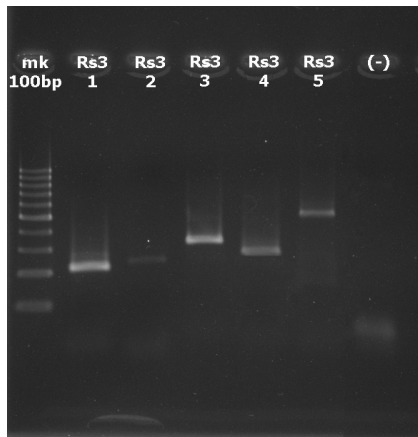
Hình 2. Hiệu quả sử dụng Taq polymerase

A. Mẫu có nồng độ DNA cao; B. Mẫu có nồng độ DNA thấp; HQ: HotStarTaq - Qiagen; HF: HotTaq - Fermentas; MM: Taq Polymerase thông thường - Fermentas. Maker 100bp. Hình điện di trên gel agarose 1% trong đệm TBE 1X ở 80V trong 30 phút.



Hình 3. Phân đoạn một gen cytochrome b của một số mẫu mang

A. Sản phẩm PCR lần thứ nhất; B. Sản phẩm PCR lần thứ hai với khuôn là sản phẩm PCR lần thứ nhất. Phân đoạn gen có kích thước 450 bp. Maker 100 bp. Điện di trên gel agarose 1% trong đệm TBE 1X ở 80V trong 30 phút.



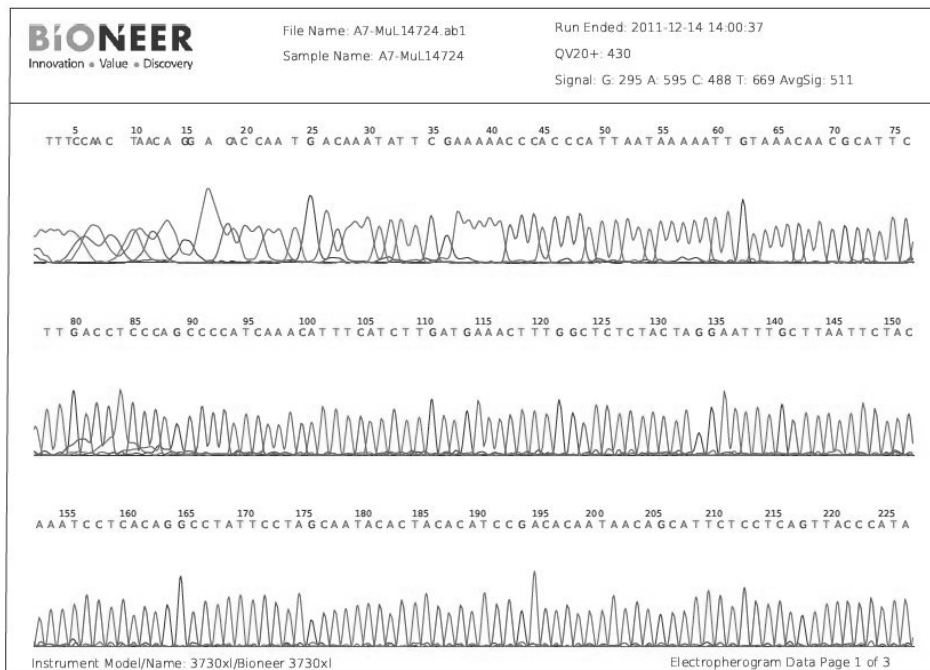
Hình 4. Điện di cytochrome b của mẫu Rs3
Rs3.1:200 bp; Rs3.2:210 bp; Rs3.3:290 bp; Rs3:230 bp; Rs3:450 bp. Maker 100 bp. Điện di trên gel agarose 1%, trong đệm TBE ở 80V trong 30 phút.

Phản ứng PCR và giải trình tự

Kết quả giải trình tự cho thấy, chúng tôi đã nhân thành công phân đoạn 1140 bp gen cytochrome b ở 27 mẫu mang và 3 mẫu rùa. Trong đó, 11 mẫu đã được tiến hành phản ứng PCR lần hai và 2 mẫu được nhân bằng các phân đoạn gen có kích thước nhỏ (hình 3 và 4). Sản phẩm PCR thành công cho kết quả giải trình tự rõ nét, ít bị nhiễu (hình 5).

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

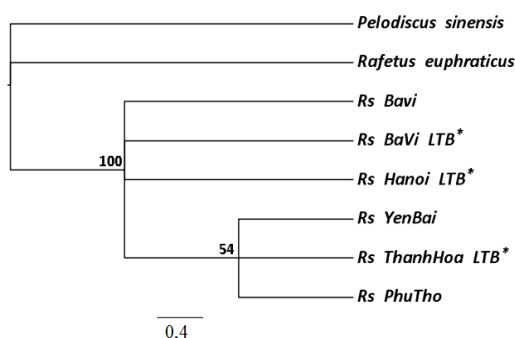
Từ kết quả PCR và giải trình tự thành công, chúng tôi đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại gen cytochrome b cho loài giải Thượng Hải (*Rafetus swinhoei*) sử dụng 3 mẫu thu được trong nghiên cứu này và cây phát sinh chủng loại gen cytochrome b cho 27 mẫu thuộc giống mang (*Muntiacus*) ở Việt Nam (hình 6 và 7).



Hình 5. Kết quả giải trình tự phân đoạn một gen cytochrome b (450bp) của mẫu Mu 2.8.

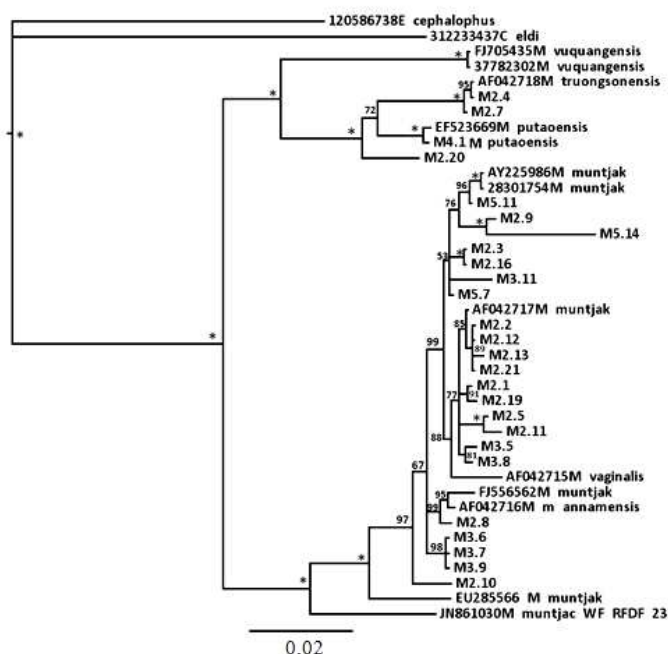
Kết quả thu được đã giúp làm sáng tỏ các vấn đề còn tồn tại trong nghiên cứu về đa dạng di truyền của các quần thể của giải Thượng Hải và mang. Các bằng chứng về di truyền cho thấy, đối với loài giải Thượng Hải, các quần thể phân bố ở các vùng khác nhau ở miền Bắc Việt Nam không thể hiện sự sai

khác lớn về đa dạng gen (hình 6). Tuy nhiên, giống mang lại có sự khác biệt khá lớn về di truyền giữa các quần thể phân bố ở các vùng địa lý khác nhau trên cả nước (hình 7). Những kết quả này sẽ được phân tích và thảo luận kỹ hơn trong những nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại giống *Rafetus* bằng phương pháp hợp tiết kiệm tối đa

Cây phát sinh chủng loại xây dựng từ gen cytochrome b với bootstrap 1000 vòng lặp. Tổng số 1140 nucleotide trong đó 950 vị trí không thay đổi, 161 vị trí thay đổi không ý nghĩa, 29 vị trí thay đổi có ý nghĩa. Chiều dài cây 200. Chỉ số chắc chắn 1,00. Chỉ số duy trì 1,00. Dấu * chỉ các mẫu từ Ngân hàng Gen có mã số AJ607407.1, AJ607408.1 và AJ608763.1.



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại giống Mang từ phương pháp Bayesian

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên mô hình tiến hóa GTR (General Time Reversible). Chọn mẫu cách 1000 thế hệ. Chạy trong 5×10^6 thế hệ. Dấu * thể hiện các nhánh có xác suất hậu nghiệm đạt 100%. Các mẫu từ Ngân hàng gen được thể hiện bằng mã số đi kèm với tên loài.

KẾT LUẬN

Phương pháp tách chiết và nhân dòng DNA được sử dụng trong việc điều tra các loài động vật quý hiếm trong thiên nhiên và còn có thể sử dụng để kiểm soát tình trạng buôn bán động vật

hoang dã và nâng cao hiệu quả thực thi pháp luật. Hiện nay, nhiều loài động vật quý hiếm được pháp luật bảo vệ và sản phẩm của chúng vẫn được vận chuyển trái phép với số lượng lớn trên phạm vi cả nước [16, 19]. Tuy nhiên, việc xác định tên loài của các sản phẩm này gặp

nhieu khó khăn vì những sản phẩm này thường đã bị chế biến hoặc không còn giữ nguyên dạng ban đầu. Để tăng cường hiệu quả của việc thực thi pháp luật và làm cơ sở truy tố những hành vi vi phạm pháp luật, cần có những phương pháp nhận dạng có hiệu quả. Phương pháp chiết tách và nhân dòng DNA chất lượng thấp được trình bày trong nghiên cứu này có thể giúp nhận dạng những sản phẩm được buôn bán trái phép trên thị trường bằng phương pháp sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong một tương lai gần.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Quỹ NAGAO (the NAGAO Natural Environment Foundation) và Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED - đề tài mã số 106.15-2010.30) đã tài trợ cho nghiên cứu này. Chương trình Bảo tồn rùa châu Á, ông Tim McCormack, tiến sỹ Peter Pritchard, tiến sỹ Nguyễn Quảng Trường, thạc sỹ Thạch Mai Hoàng, các cán bộ và người dân địa phương tại nhiều vùng nghiên cứu thực địa đã tận tình giúp đỡ chúng tôi trong việc thu mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Austin J. J., Arnold E. N., Bour R., 2002. The provenance of type specimens of extinct Mascarene Island Giant Tortoises (*Cylindraspis*) revealed by ancient mitochondrial DNA sequences. *Journal of Herpetology*, 36: 280-285.
2. Bellemain E., Swenson J. E., Tallmon D., Brunberg S., Taberlet P., 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: Four methods for brown bear. *Conservation Biology*, 19: 150-161.
3. Cimino G. D., Metchette M., Isaacs S. T., Zhu Y. S., 1990. More false-positive problems. *Nature*, 345: 773-774.
4. Cooper A., 1992. DNA from museum specimens. In B. Herrmann and S. Hummel Ancient DNA, Springer-Verlag Publisher, New York Inc., p.149-165.
5. DeSalle R., Gatesy J., Wheeler W., Grimaldi D., 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science*, 257: 1933-1936.
6. Eggert L. S., Eggert J. A., Woodruff D. S., 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum national park, Ghana. *Molecular Ecology*, 12: 1389-1402.
7. Engstrom T. N., Shaffer H. B., McCord W. P., 2004. Multiple data sets, high homoplasy and the phylogeny of softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Systematic Biology*, 53: 693-710.
8. Fernandez N., Delibes M., Palomares F., 2006. Landscape evaluation in conservation: Molecular sampling and habitat modeling for the Iberian lynx. *Ecological Applications*, 16: 1037-1049.
9. Hoss M., Paabo S., 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by silica-based purification method. *Nucleotide Acids Research*, 21: 3913-3914.
10. Huelsenbeck J. P., Ronquist F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
11. Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
12. Janczewski D. N., Yuhki N., Gilbert D. A., Jefferson G. T., O'Brien S. J., 1992. Molecular phylogenetic inference from saber-toothed cat fossils of Rancho La Brea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 9769-9773.
13. Le M., McCord W. P., Iverson J. B., 2007. On the paraphyly of the genus *Kachuga*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 398-404.
14. Miller C. R., Joyce P., Waits L. P., 2005. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology*, 14: 1991-2005.
15. Myers N., 1997. Global Biodiversity II: Losses and Threats. In G.K. Meffe and C.R. Carroll Principles of Conservation Biology Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
16. Nguyen Van Song, 2003. Wildlife trade in

- Vietnam: Why it flourishes. Research report. Economy and Environment Program for Southeast Asia. Singapore and International Development Research Centre, Canada.
17. Palumbi S., Martin A., Romano S., Mcmillan W. O., Stice L., Grabowski G., 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Honolulu, University of Hawaii.
 18. Schnell I. B., Thomsen P. F., Wilkinson N., Rasmussen M., Jensen L. R. D., Willersley E., Bertelsen M. F., Gilbert M. T. P., 2012. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology*, 22: R262-R263.
 19. Sterling E. J., Hurly M. M., Le M. D., 2006. Vietnam: A Natural History. Yale University Press.
 20. Swofford D. L., 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.
 21. Thomas W. K., Paabo S., Villablanca F., Wilson A. C., 1990. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 101-112.
 22. Wandeler P., Hoeck P. E. A., Keller L. F., 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 634-642.

METHODS FOR EXTRACTING AND SEQUENCING DNA FROM LOW-QUALITY SAMPLES TO AID BIODIVERSITY RESEARCH

Le Duc Minh^{1,2}, Duong Thuy Ha¹, Nguyen Van Thanh¹,
Nguyen Manh Ha², Dinh Doan Long¹, Do Tuoc³, Nguyen Dinh Hai⁴

¹Hanoi University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Centre for Natural Resources and Environmental Studies, Vietnam National University, Hanoi

³Forest Inventory and Planning Institute, Vietnam Administration of Forestry, Hanoi

⁴Xuan Lien Natural Reserve, Thanh Hoa province

SUMMARY

Surveying endangered and elusive species in their natural habitat poses an immense challenge to studies using conventional methods. This reality requires new survey techniques with higher efficiency to support fieldwork. Recently, along with progresses in biotechnology, survey techniques using molecular approaches have become more accessible, promising new applications, and in many cases assisting traditional survey methods in biodiversity research. However, a major difficulty of these techniques is recovering DNA from low-quality samples collected in survey areas. To help overcome this problem, in this study, we present a simple and highly efficient method for extracting and amplifying DNA from low-quality samples applicable in Vietnam's context. Using this method, we successfully sequenced 30 bone, cartilage, and dry skin samples from two different vertebrate animals, muntjacs *Muntiacus* sp., and Shanghai softshell turtle, *Rafetus swinhoii*. Sequences, obtained in this study, play an important role in developing phylogenetic hypotheses and assessing genetic diversity of the two groups. This method can be applied in a variety of studies in future biotic survey and biodiversity research that would be benefited from obtaining DNA sequences of low-quality samples collected in the field in Vietnam.

Keywords: *Muntiacus*, *Rafetus swinhoii*, biotic survey, low-quality DNA, molecular techniques.

Ngày nhận bài: 3-9-2012