

TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GIEN 18S rARN CỦA HAI LOÀI LAN HÀI *PAPHIOPEDILIUM HELENAE* VÀ *PAPHIOPEDILIUM MICRANTHUM*

HUỲNH THỊ THU HUỆ, NGUYỄN HẢI HÀ,
NGUYỄN HUY HOÀNG, ĐẶNG VĂN HẠNH,
NÔNG VĂN HẢI, LÊ TRẦN BÌNH

Viện Công nghệ sinh học

Hiện nay trên thế giới, việc ứng dụng các phương pháp phân loại học hiện đại như phân loại phân tử, được sử dụng khá nhiều trên đối tượng thực vật. Như Hoot và cộng sự đã phân tích trình tự của ba gen 18S rARN, atpB, rbcL để phân tích hệ thống phát sinh của thực vật hai lá mầm, [4, 6, 7], Cameron và cộng sự đã nghiên cứu sự phát sinh chủng loại trên họ Phong lan bằng sự phân tích và so sánh trình tự của gen rbcL [2]. Nguyên tắc của phương pháp này là, từ trình tự của gen đã được giải mã, sẽ biết được sự khác biệt nucleotit trên cùng vị trí của các loài khác nhau, từ đó đánh giá mức độ gần hay xa giữa các loài.

Chi lan hài *Paphiopedilium* nằm trong họ Lan *Orchidaceae* bao gồm các loài lan hài rất được ưa chuộng trong lĩnh vực cây cảnh hiện nay. Theo thống kê của Tanaka (1999), Việt Nam có khoảng 20 loài lan hài [11], trong đó *P. helenae* là một trong số 7 loài mới được phát hiện và *P. micranthum* là một loài trước đây được coi là đặc hữu của Trung Quốc nhưng nay đã phát hiện có ở Việt Nam. Tuy vậy, về hình thái học, người ta thấy có một số điểm khác biệt nhỏ giữa *P. micranthum* của Trung Quốc và loài của Việt Nam do vậy cần được xác định lại chính xác hơn [11]. Cả hai loài lan hài này đều được tìm thấy ở tỉnh Cao Bằng của nước ta [8] *P. helenae* có hoa nhỏ, màu vàng, hình thái lá và hoa hơi giống với loài *P. burbigernum* [11] thường mọc trên vách đá vôi ở đỉnh có độ cao khoảng 500-1000 m. *P. micranthum* có hoa khá to, màu hồng cũng sống bám ở độ cao khoảng 600-1500 m [8].

Tuy nhiên, ở chi lan hài chưa có nhiều nghiên cứu sâu về phân loại ở mức độ phân tử. Hiện mới có hai trình tự của gen 18S rARN của

chi này là đã được đọc hoàn chỉnh. Trình tự thứ nhất được Hahn công bố năm 1999 là trên loài *P. sp.* Hahn 6903 [5] và đến năm 2000 thì Cameron công bố trình tự của gen này ở loài *P. delenatii*. [3]

Từ những kết quả nghiên cứu thăm dò đã có trên các đối tượng thực vật khác, chúng tôi quyết định chọn gen 18S rARN ở thực vật để phân lập và xác định trình tự. Đây là một gen khá bảo thủ nên những khác biệt về một vài nucleotit sẽ cho kết quả đáng tin cậy đối với việc đánh giá vị trí tương quan giữa các loài. Chúng tôi cũng đã thành công trong việc xác định trình tự của gen 18S rARN ở một số loài thuộc chi Bình vôi. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành phân lập và đọc trình tự của gen 18S rARN ở hai loài lan hài của nước ta là *P. helenae* và *P. micranthum* để từ đó so sánh với các loài khác nhằm khẳng định tính chính xác cho những nghiên cứu phân loại trước đó.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Lá non là nguyên liệu ban đầu để tách chiết ADN tổng số theo phương pháp của Becker và cộng sự [1]. Nồng độ và độ sạch của ADN tổng số được xác định bằng điện di và phổ hấp thụ trên máy quang phổ (Hewlett Parkard, Mỹ)

Sản phẩm PCR được nhân lên từ ADN tổng số với cặp mồi BVB và BVF (như sau 5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC-3', 5'-CCGGTGAAGTGTTCGGATCGC-3') và đưa vào plasmit pBluescript KS(-) nhờ enzym ligaza, tiếp theo biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α (được mua từ hãng Life technologies-Mỹ). Sau đó, plasmit tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường nuôi cấy có X-gal (5-bromo-4-

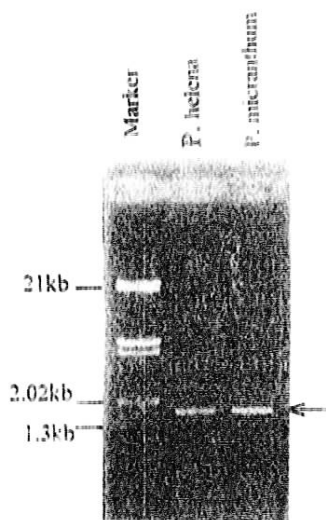
chloro-3-indolyl β -D(-)-galactopyranosit) và IPTG(isopropyl β -D-thiogalactopyranosit). DNA plasmit được tách chiết và kiểm tra sự có mặt của gen 18S rARN theo Sambrook và cộng sự [10].

Những dòng vectơ chứa gen 18S rARN sẽ được tinh sạch để đọc trình tự theo phương pháp của Sanger [9]. Các hóa chất dùng để đọc trình tự ADN là của hãng Amersham Pharmacia Biotech.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nhân đoạn gen 18S rARN từ ADN tổng số của hai loài lan hài *P. helenae* và *P. micranthum*

Với ADN tổng số đã đảm bảo độ tinh sạch qua kiểm tra bằng điện di và đo quang phổ, chúng tôi tiến hành làm PCR sử dụng cặp mồi đã thiết kế cho việc nhân gen 18S rARN của thực vật có tên là BVF và BVB. Theo tính toán với cặp mồi chúng tôi đã thiết kế thì kích thước của gen 18S rARN sẽ vào khoảng 1.7 kb. Chúng tôi sử dụng chương trình chạy PCR với nhiệt độ gắn mồi là 52°C trong 1 phút và nhiệt độ tổng hợp là 72°C trong 1 phút 20 giây để nhân đoạn gen này ở cả hai loài. Kết quả là chúng tôi đã nhận được các băng PCR có kích thước đúng với lý thuyết.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR của hai loài lan hài trên gel agarosa

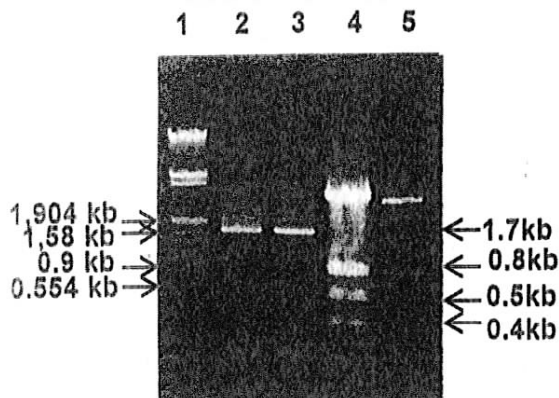
Ghi chú: Marker: ADN λ cắt bằng HindIII và EcoRI

P. helenae: Sản phẩm PCR của loài *P. helenae*

P. micranthum: Sản phẩm PCR của loài *P. micranthum*

2. Tách dòng gen 18S rARN của hai loài lan hài

Sau khi tiến hành gắn đoạn PCR vào vectơ đã mở vòng bằng enzym ligaza để chọn vectơ tái tổ hợp, chúng tôi đã thu được những dòng plasmit có chứa gen 18S rARN của cả hai loài.



Hình 2. Kết quả phân tích bằng enzym giới hạn và PCR trên các dòng được chọn

Ghi chú: 1: Marker ADN λ cắt bằng HindIII và EcoRI; 2,3: Sản phẩm PCR từ ADN plasmit ở hai dòng của loài *P. helenae*, *P. micranthum*; 4: Dòng ADN plasmit của loài *P. helenae* cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III; 5: Dòng ADN plasmit của loài *P. micranthum* cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III.

Trên hình 2 là kết quả kiểm tra sự có mặt của gen 18S rARN trong vectơ: giếng 2,3 là sản phẩm PCR từ hai dòng thu được của hai loài khi sử dụng chính cặp mồi BVF và BVB, giống như kết quả khi chạy mẫu ADN tổng số với hai mồi này cũng có kích thước khoảng 1,7 kb. Hai giếng tiếp theo là kết quả chúng tôi cắt vectơ thu được bằng hai enzym giới hạn *Bam*HI và

HindIII, vì trên sản phẩm nhân gen 18S rARN từ ADN tổng số của hai loài nghiên cứu chúng tôi tìm thấy điểm cắt của hai enzym này. Nếu trên đoạn ADN gắn vào vectơ cũng có điểm cắt như vậy thì khả năng đồng cắt thu được là chính xác hơn. Vì thế, với mỗi dòng thu được, chúng tôi đã cắt đồng thời bằng hai enzym *BamHI* và *HindIII*. Kết quả là trên cả hai dòng đều có điểm cắt của cả hai enzym. Trên hình 2, giếng 4 và 5 chúng ta thấy khi cắt plasmid bằng cả hai enzym trên cùng lúc đã tạo ra 4 băng: băng cao nhất có kích thước khoảng 2,9 kb tương ứng với kích thước vectơ khi mở vòng và không mang gen ngoại lai, ba băng còn lại là do gen bị cắt văng ra bởi hai enzym khi cho cắt đồng thời. Điều này chứng tỏ trên vectơ được chọn đã chứa gen 18S rARN của hai loài lan hài trên. Ngoài ra chúng tôi nhận thấy gen 18S rARN của hai loài lan hài này không chỉ giống nhau về kích thước mà cùng có vị trí nhận biết cho hai enzym *BamHI* và *HindIII*.

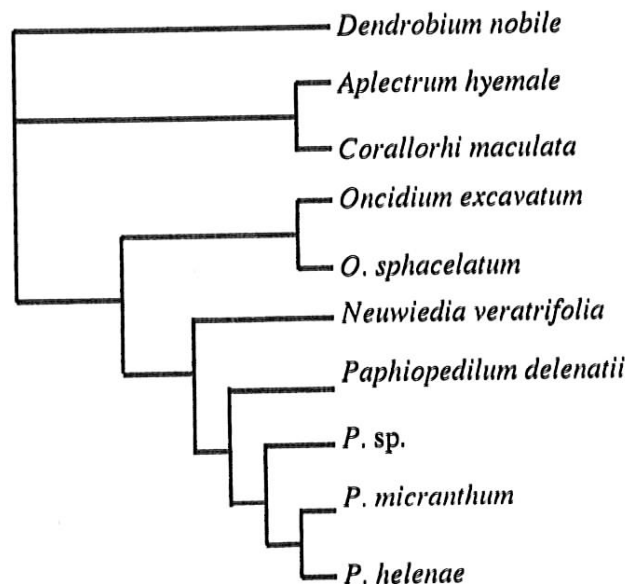
Tuy nhiên, để đánh giá về độ sai khác của gen 18S rARN của hai loài thì chúng tôi phải tiến hành đọc trình tự nucleotit của gen 18S rARN từ hai dòng plasmid này.

3. Kết quả đọc trình tự của gen 18S rARN của hai loài *P. helenae* và *P. micranthum*

Trình tự của gen 18S rARN của cả hai loài đã được giải mã, chúng tôi đã công bố trên ngân hàng gen EMBL với mã số: AJ293100 là của *P. helenae* với chiều dài toàn bộ là 1667 bp và AJ303203 là của *P. micranthum* với chiều dài là 1666 bp. Đây là công bố đầu tiên về trình tự của gen 18S rARN của hai loài *P. helenae* và *P. micranthum* trên ngân hàng EMBL.

Chúng tôi đã sử dụng phần mềm Clustal để so sánh hai trình tự của gen này và tìm thấy 18 điểm khác nhau về nucleotit giữa chúng, đồng thời cũng so sánh hai trình tự này với hai trình tự đã được Hahn và Cameron công bố trong ngân hàng gen và thấy 39 điểm khác nhau giữa bốn trình tự gen đã có của lan hài.

Từ đó, chúng tôi tính toán % sai khác trên chiều dài toàn bộ của gen đối với từng cặp loài (xem bảng). Như vậy, sự khác biệt giữa các loài này là không nhiều. Từ đó, cũng bằng phần mềm clustal, chúng tôi tìm ra sơ đồ phát sinh giữa bốn loài thuộc chi lan hài với một số loài thuộc họ Phong lan ở chi khác, để thấy rõ hơn vị trí phát sinh của hai loài *P. helenae* và *P. micranthum* (hình 3). Theo đó, vị trí của hai loài này đều thuộc vào chi *Paphiopedilum* và độ tương đồng của chúng lớn hơn so với các loài khác trong chi.



Hình 3. Sơ đồ cây phân loại của một số loài lan (Orchidaceae) dựa trên sự so sánh gen 18S rARN

Bảng

Độ tương đồng về gen 18S rRNA của bốn loài lan hài

Cặp loài	Độ tương đồng (%)
<i>P. micranthum</i> và <i>P. helenae</i>	99,500
<i>P. sp.</i> Hahn 6903 và <i>P. delenatii</i>	98,623
<i>P. sp.</i> Hahn 6903 và <i>P. helenae</i>	98,922
<i>P. micranthum</i> và <i>P. delenatii</i>	98,200

III. KẾT LUẬN

Đã thành công trong việc tách dòng gen 18S rARN và xác định xong trình tự của gen của hai loài lan hài Việt Nam là *Paphiopedilum micranthum* và *P. helenae*.

Gen 18S rARN của hai loài *P. helenae* và *P. micranthum* có sự tương đồng cao hơn so với hai loài lan hài khác là *P. delenatii* và *P. sp.* Hahn 6903.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Becker C. et al., 1995: Eur. J. Biochem. 228: 456-462.
2. Cameron K. M. et al., 1999: Amer. J. Bot., 86 (2): 208-224.
3. Cameron K. M., Chase M. W., 2000: "Nuclear 18S rDNA sequences of Orchida-
4. Chaw S. M. et al., 1997: Mol. Biol. Evol., 14 (1): 56-68.
5. Hahn W. J., 1999: Molecular sequence phylogenetic of the Monocots EMBL/GenBank/DDBJ Database AC number: AF 168868. 1.
6. Hoot S. B., Crane P. R., 1999: Ann. Missouri Bot. Gard., 86: 1-32.
7. Nông Văn Hải và cs., 1999: Ứng dụng công nghệ ADN trong nghiên cứu tài nguyên động vật và thực vật Việt Nam. Báo cáo khoa học tại hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội.
8. L. V. Avérlanóp và cs., 2000: Trích yếu các loài lan thu được ở tỉnh Cao Bằng. Báo cáo khoa học tại hội nghị sinh học quốc gia: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977): Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5463-5467.
10. Sambrook J., Russell D. W., 2001: Molecular cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Tanaka, 1999: Paphiopedilum in Viet Nam. <http://www.orchid.or.jp/orchid/people/tanaka/envietnum.html>

CLONING AND SEQUENCING OF THE 18S-rRNA GENE FROM *PAPHIOPEDILIUM HELENAE* AND *PAPHIOPEDILIUM MICRANTHUM*

HUYNH THI THU HUE, NGUYEN HAI HA, NGUYEN HUY HOANG,
DANG VAN HANH, NONG VAN HAI, LE TRAN BINH

SUMMARY

Paphiopedilum orchids in Vietnam are of great interest, because some new species have been discovered. However, the taxonomy and phylogeny of these species have not been studied. By using DNA technology, we succeeded in cloning of the 18S-rRNA gene from two species, *P. helenae* and *P. micranthum*. These sequences were analyzed completely and compared with others. There was very high level of similarity in nucleotid sequence between *P. helenae* and *P. micranthum* than other species. These analysis have revealed that *P. helenae* is closer to *P. micranthum* than the others. These are newly reported about 18S-rRNA sequences of the *Paphiopedilum* orchids.

Ngày nhận bài: 6-2-2002