



GEN MÃ HÓA LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR LIÊN KẾT VỚI MỘT SỐ TÍNH TRẠNG SINH LÝ - HÓA MÁU Ở LỢN ĐỰC THIÊN

Đỗ Võ Anh Khoa¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 18/02/2013

Ngày chấp nhận: 20/08/2013

Title:

Gene encoding Leukemia Inhibitory Factor associated with physiochemical characteristics of the blood of the castrated male pigs

Từ khóa:

Mối liên kết, đa hình di truyền, chỉ tiêu sinh lý-hóa máu, gen LIF, lợn

Keywords:

Association study, genetic polymorphism, blood physiochemical traits, LIF gene, pigs

ABSTRACT

Objectives of this study were to identify possible single-nucleotide-polymorphisms (SNPs) in candidate gene encoding Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and to analyze probable genetic relationship between its SNP based-RFLP-marker with blood physiochemical traits in castrated males of the Yorkshire x Landrace pigs raising at the Experimental Animal Unit of Can Tho University. The results indicated that (i) a polymorphism digested by the restriction enzyme DraIII in exon 3 of the LIF gene was identified with various frequencies ($AA=0.15$, $AB=0.73$, and $BB=0.12$ and (ii) the significant differences between LIF genotypes and physiochemical parameters of blood, such as number of red blood cell (RBC), hematorit HCT, number of platelet (PLT), amount of urea in blood (urea/BUN) were found ($p<0.05$). Expression of these observed traits was changed by aging and LIF genotypes. This study has gained basic knowledge for biological function of the blood stream, one of the main factors for absorption and metabolism in pigs.

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu là để nhận diện đa hình di truyền gen mã hóa Leukemia Inhibitory Factor (LIF) và để phân tích mối quan hệ giữa đa hình di truyền và các tính trạng về sinh lý-hóa ở lợn đực thiên giống Yorkshire x Landrace nuôi tại Trại Chăn nuôi Thực nghiệm Trường Đại học Cần Thơ. Kết quả chỉ ra rằng (i) đa hình di truyền được phân cắt bằng enzyme giới hạn DraIII ở exon 3 của gen LIF đã được nhận diện với tần số khác nhau ($AA=0,15$, $AB=0,73$, and $BB=0,12$) và (ii) sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được tìm thấy giữa các kiểu gen đối với một số tính trạng sinh lý-hóa máu như hồng cầu, tiểu cầu, hematorit và urea trong máu ($p<0,05$). Các tính trạng quan sát này được biến động theo tuổi và kiểu gen LIF. Kết quả nghiên cứu đã làm sáng kiến thức cơ bản về chức năng sinh học của máu, một trong những yếu tố chính của quá trình hấp thu và biến dưỡng ở lợn.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Gen mã hóa Leukemia inhibitory factor gene (LIF) ở lợn có chiều dài DNA khoảng 6,3 kb gồm 5 exon, tọa lạc trên nhiễm sắc thể 14q2.1-q2.2. LIF mã hóa cho các cytokine đa hiệu (pleiotropic cytokine), đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của túi phôi và số con sơ sinh ở chuột (Stewart, 1994; Savatier và *ctv.*, 1998; Hilton,

1992; Spötter *et al.*, 2001). LIF đồng thời cũng được xem như là một gen ứng viên tốt cho một số tính trạng tương đồng ở lợn (Geisert và Yelich, 1997) cũng như đa hình di truyền của nó có ảnh hưởng đến số sơ sinh còn sống/ổ (Spötter và *ctv.*, 2005). Gần đây, Khoa và Thụy (2012) chỉ ra rằng đa hình gen LIF có liên quan đến hàm lượng canxi của thịt thăn, vật chất khô và béo thô của thịt

đùi, giá trị pH và mức độ rỉ dịch của thịt lợn ($p \leq 0,05$). Do vậy, gen LIF được xem như là ứng viên tiềm năng cho những đặc điểm sinh sản và chất lượng thịt ở động vật. Nghiên cứu này sẽ tập trung nhận diện đa hình di truyền trên gen LIF và phân tích mối liên kết đa hình di truyền của nó với một số tính trạng về sinh lý và sinh hóa máu ở nhóm lợn giống lai hai máu Yorkshire x Landrace.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng

Nhóm lợn đực thuần lai hai máu Yorkshire x Landrace (n=33). Tất cả lợn được nuôi trong lồng cá thể, có máng ăn riêng và thực hiện cùng chế độ chăm sóc nuôi dưỡng, sử dụng thức ăn của Công ty Cổ phần GreenFeed Việt Nam.

2.2 Địa điểm

Trại Chăn nuôi Thực nghiệm Trường Đại học Cần Thơ.

2.3 Phương pháp

2.3.1 Đo lường các chỉ tiêu sinh lý hóa máu

Máu được lấy từ tĩnh mạch cổ của lợn tại các thời điểm khi lợn đạt khối lượng khoảng 30, 60 và 100 kg. Sau khi lấy, máu được chứa trong ống nghiệm chứa (i) EDTA để phân tích các chỉ tiêu sinh lý như bạch cầu (WBC), hồng cầu (RBC), tiểu cầu (PLT) và hematocrite (HCT) bằng thiết bị Cell-DYN 1700 Hematology Analyzer (Abbott, USA), hoặc (ii) Heparine để phân tích các chỉ tiêu sinh hóa như hàm lượng glucose và urea bằng thiết bị TC-3300 (Teco Diagnostics, Anaheim, California, USA). Máu được bảo quản ngay trong nước đá và phân tích các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa máu trong vòng 3 giờ sau khi lấy.

2.3.2 Tách chiết DNA

Mẫu tai lợn sau khi lấy được trữ trong ống nghiệm có chứa ethanol 70° và được bảo quản ở -20°C cho đến khi tách chiết DNA, sử dụng proteinase K và ethanol/chloroform theo qui trình được mô tả bởi Đỗ Võ Anh Khoa và ctv. (2011).

2.3.3 Đánh giá kiểu gen

Thí nghiệm sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự như sau:

Mồi xuôi: LIF_fw:

5'-ATGTGGATGTGGCCTACGG-3'

(GenBank AJ296176, nucleotide 6842-6861)

Mồi ngược: LIF_re:

3'-GGGAACAAGGTGGTGATGG-5'

(GenBank AJ296176, nucleotide 7231-7249)

Thành phần của phản ứng PCR, chu trình nhiệt và phương pháp PCR-RFLP dưới sự hỗ trợ của enzyme phân cắt giới hạn *DraIII* được sử dụng như mô tả của Spötter và ctv. (2005) để đánh giá kiểu gen LIF (exon 3, 6988C→T, GenBank acc. no. AJ296176).

2.3.4 Xử lý thống kê

Tần số kiểu gen và alen được tính toán dựa theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg sử dụng phép thử Chi-bình phương.

Số liệu được phân tích bằng phần mềm MS Excel và Minitab v.13.2 (General Linear Model, Tukey) theo mô hình: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$ (μ : trung bình chung, α : ảnh hưởng kiểu gen, ε : sai số).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

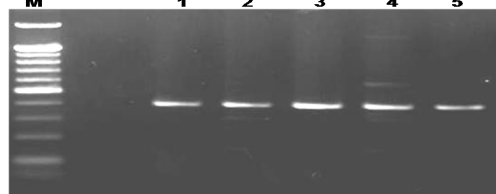
3.1 Đặc điểm kiểu gen

Kết quả khuếch đại đoạn gen LIF có kích thước phân tử 407 bp bằng PCR được thể hiện ở Hình 1. Nhận diện SNP trên exon 3 tại vị trí 6988C→T (GenBank acc. no. AJ296176) gen LIF được thực hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP sử dụng enzyme cắt giới hạn *DraIII*. Theo tính toán lý thuyết, những lợn mang kiểu gen AA sẽ được thể hiện một băng duy nhất với độ lớn 407 bp, trong khi kiểu gen AB có 3 băng tương ứng với độ lớn 407 bp, 266 bp và 144 bp và kiểu gen BB có 2 băng với kích thước phân tử 266 bp và 144 bp (Hình 2).

Bảng 1: Tần số kiểu gen và alen của LIF (n=33)

Kiểu gen	Tần số kiểu gen			Kiểu alen	Tần số alen (%)	Độ dị hợp tử
	n	%	χ^2 -test			
AA	5	15,15	ns	A	52	0,72
AB	24	72,73		B	48	
BB	4	12,12				

Kết quả phân tích ở Bảng 1 cho thấy đoạn gen LIF xuất hiện cả hai dạng alen “A” và “B” với tần số tương đương là 0,52 và 0,48 đồng thời tạo ra 3 kiểu gen là AA, AB, BB với tỷ lệ tương ứng là 15,15%, 72,73% và 12,12%. Khảo sát trên quần thể lợn lai gốc Đức Duroc x Yorkshire, Spötter và



Hình 1: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1%

M: Thang chuẩn DNA 100 bp

1-5: sản phẩm PCR

3.2 Ảnh hưởng của gen LIF lên một số tính trạng sinh lý máu

Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về giá trị WBC của các kiểu gen qua các thời điểm phân tích theo thể trọng 30 kg (18,39 - 22,90), 60 kg (15,87 - 19,58) và 100 kg (6,54 - 13,15). Giá trị WBC₃₀ và WBC₁₀₀ tăng dần từ kiểu gen BB>AB>AA và có chiều hướng ngược lại đối với WBC₆₀ AA>AB>BB (Bảng 2). Nhiều nghiên cứu cho rằng, WBC ở lợn dao động trong khoảng 15-20x10⁹/l (Trần Thị Minh Châu, 2000) và lợn trưởng thành có WBC 10-15x10⁹/l (Nguyễn Toàn Thắng, 2006). Những lợn còn nhỏ sẽ có số lượng WBC cao hơn lợn trưởng thành (Trần Thị Minh Châu, 2000; Nguyễn Toàn Thắng, 2006).

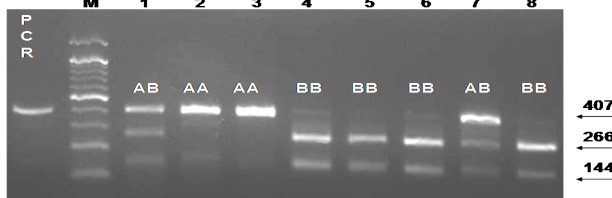
Tại hai thời điểm đánh giá đầu tiên 30 kg

Bảng 2: Ảnh hưởng của kiểu gen LIF lên các chỉ tiêu sinh lý máu (n=33)

Kiểu gen	AA	AB	BB	p
<i>Thời điểm 30 kg</i>				
WBC ₃₀ , 10 ⁹ /l	18,39±3,23	24,20±1,51	22,90±3,61	0,280
RBC ₃₀ , 10 ¹² /l	5,03±0,61	5,60±0,28	6,61±0,68	0,238
PLT ₃₀ , 10 ⁹ /l	245,00±57,18	289,00±26,66	332,80±63,93	0,595
HCT ₃₀	0,37 ^a ±0,02	0,41 ^b ±0,01	0,34 ^{ab} ±0,02	0,036
<i>Thời điểm 60 kg</i>				
WBC ₆₀ , 10 ⁹ /l	19,58±2,09	17,88±0,98	15,87±2,34	0,507
RBC ₆₀ , 10 ¹² /l	4,90±2,01	5,21±0,94	5,91±2,25	0,942
PLT ₆₀ , 10 ⁹ /l	228,20±19,87	186,20 ^b ±9,26	276,50 ^{ab} ±22,21	0,002
HCT ₆₀	0,38±0,02	0,37±0,01	0,36±0,03	0,873
<i>Thời điểm 100 kg</i>				
WBC ₁₀₀ , 10 ⁹ /l	6,54±2,76	12,02±1,28	13,15±3,08	0,179
RBC ₁₀₀ , 10 ¹² /l	4,47 ^a ±0,73	5,52 ^b ±0,34	2,93 ^a ±0,81	0,017
PLT ₁₀₀ , 10 ⁹ /l	151,80 ^a ±31,75	246,90 ^b ±14,80	149,00 ^{ab} ±35,50	0,007
HCT ₁₀₀	0,26 ^a ±0,03	0,41 ^b ±0,01	0,27 ^{ab} ±0,04	0,000

Các số liệu mang chữ số mũ khác nhau ^{a,b,c} trên cùng một hàng khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê (p<0,05)

ctv. (2005) cho thấy tại locus LIF, tần số alen “A” chiếm 27% trong khi tần số alen “B” là 73%. Kết quả này có được dựa trên sự phân bố tần số kiểu gen AA=7%, AB=40% và BB=53% ($\chi^2 = 0,30$; $P = 0,86$) trên locus.



Hình 2: Cắt đoạn gen LIF bằng enzyme *DraIII*

M: Chi thị DNA 100 bp

PCR: Sản phẩm PCR 407 bp

1-8: Sản phẩm PCR-RFLP/*DraIII*

(5,03 - 6,61) và 60 kg (5,91 - 4,90), RBC cũng tăng dần theo chiều hướng BB>AB>AA. Sự chênh lệch về RBC giữa các kiểu gen tại hai thời điểm này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, đến thời điểm 100 kg, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về RBC được tìm thấy, nơi mà những lợn mang kiểu gen dị hợp AB (5,52 ± 0,34) có hàm lượng RBC₁₀₀ cao hơn hai kiểu đồng hợp AA (4,47 ± 0,73) và BB (2,93 ± 0,81) (p=0,017). Nhìn chung, số lượng RBC của đàn lợn thí nghiệm nằm trong mức RBC bình thường 5,00-5,50x 10⁹/l, ngoại trừ RBC₁₀₀ của những lợn mang kiểu gen LIF BB (2,93x 10⁹/l). Số lượng RBC càng nhiều thì sức sống của con vật càng tốt (Nguyễn Thị Kim Đông và Hứa Văn Chung, 2005; Trần Cừ, 1975). Trong nghiên cứu này, kiểu gen LIF có ảnh hưởng đến chỉ tiêu RBC₁₀₀.

Qua phân tích cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa về hàm lượng PLT₆₀ ($p=0,002$) và PLT₁₀₀ ($p=0,007$) giữa các đa hình gen LIF. Những cá thể mang kiểu gen dị hợp AB có PLT₆₀ (186,20 ± 9,26) thấp nhất nhưng PLT₁₀₀ lại là cao nhất (246,9 ± 14,8), trong khi những lợn mang kiểu gen BB thì ngược lại (PLT₁₀₀ thấp nhất và PLT₆₀ cao nhất). Tại thời điểm 30 kg, sự khác biệt về giá trị PLT₃₀ giữa lợn mang kiểu gen BB (332,80 ± 63,93), AB (289,00 ± 26,66) và AA (245,00 ± 57,18) không có ý nghĩa thống kê. Nhìn chung, giá trị PLT giảm dần theo tuổi đối với lợn mang kiểu gen AA và BB. Giá trị PLT có sự biến động rất lớn giữa các cá thể mang cùng kiểu gen. Tuy nhiên, các giá trị về PLT của các kiểu gen qua các thời điểm đều nằm trong mức bình thường 100-600 x 10⁹/l (Trần Cừ, 1975).

Đa hình gen LIF có ảnh hưởng đến hàm lượng HCT ở mức ý nghĩa thống kê ($p<0,05$), nơi mà

kiểu gen dị hợp tử AB (0,41 ± 0,01 và 0,41 ± 0,01) có giá trị HCT cao hơn kiểu gen đồng hợp tử AA (0,37 ± 0,02 và 0,26 ± 0,03) và AB (0,34 ± 0,02 và 0,27 ± 0,04) tương ứng tại thời điểm đầu (30 kg) và cuối (100 kg) của thí nghiệm. Giá trị HCT ổn định ở giai đoạn 60 kg giữa các kiểu gen. Theo Clarence và ctv. (1986) giá trị HCT bình thường từ 0,32-0,50. Điều này cũng phù hợp với kết quả về HCT ở hầu hết các thời điểm, ngoại trừ kiểu gen AA và BB có giá trị HCT₁₀₀ thấp hơn.

3.3 Ảnh hưởng của gen MyoG đến một số chỉ tiêu sinh hóa máu

Sự ổn định hàm lượng glucose cũng được tìm thấy giữa các kiểu gen LIF, dao động trong khoảng 3,95-4,51 mmol/L ở thời điểm 60 kg và 4,22-4,92 mmol/L ở thời điểm 100 kg. Nhìn chung, ở lợn trưởng thành, hàm lượng glucose không có sự khác biệt giữa các đa hình gen LIF.

Bảng 3: Ảnh hưởng của kiểu gen LIF lên các chỉ tiêu sinh hóa máu (n=33)

Kiểu gen	AA	AB	BB	p
<i>Thời điểm 60 kg</i>				
Glucose, mmol/L	4,12±0,31	4,51±0,14	3,95±0,34	0,227
Urea, mmol/L	5,74 ^a ±0,66	6,19 ^b ±0,31	3,93 ^{ab} ±0,74	0,029
BUN, mmol/L	2,64 ^a ±0,30	2,85 ^b ±0,14	1,81 ^{ab} ±0,34	0,029
<i>Thời điểm 100 kg</i>				
Glucose, mmol/L	4,22±0,27	4,34±0,13	4,92±0,30	0,202
Urea, mmol/L	4,82±1,12	6,41±0,52	4,12±1,25	0,162
BUN, mmol/L	2,22±0,51	2,95±0,24	1,90±0,58	0,162

BUN là lượng nitơ của urea trong máu nhân với hệ số 0,46

Các chữ số mũ khác nhau ^{a,b,c} trên cùng một hàng khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$)

Khi quan sát tại hai thời điểm khi lợn đạt khối lượng 60 kg và 100 kg nhận thấy sự đa hình gen LIF có ảnh hưởng đến hàm lượng urea/BUN trong máu. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê giữa các kiểu gen tại thời điểm 60 kg nơi mà những lợn mang kiểu gen dị hợp tử AB luôn có hàm lượng urea/BUN cao hơn các kiểu gen còn lại ($p=0,029$) và lợn mang kiểu gen AA có hàm lượng urea cao hơn lợn mang kiểu gen BB. Thực tế, alen “A” thể hiện khả năng vượt trội về hàm lượng urea trong máu so với alen “B”. Thông thường cơ thể chỉ cần năng lượng cung cấp từ lipid và glucid là đủ, tuy nhiên khi có sự thiếu hụt nguồn cung cấp năng lượng, cơ thể cũng có thể sử dụng năng lượng protein và vì thế nồng độ urea trong máu tăng thêm (Đỗ Đình Hồ, 2003).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu nhận thấy đa hình gen LIF đang hiện hữu trong quần thể nhóm lợn lai hai

máu Yorkshire x Landarace được nuôi tại Trại Chăn nuôi Thực nghiệm Trường Đại học Cần Thơ có ảnh hưởng đến hàm lượng RBC, PLT, HCT và urea đường huyết. Sự biểu hiện của các nhóm tính trạng này thay đổi theo tuổi và kiểu gen LIF. Nghiên cứu này góp phần tăng thêm kiến thức về chức năng sinh học của LIF trong điều hòa các tính trạng sinh lý-hóa máu, một trong những nhân tố chính của quá trình chuyển hóa hấp thu và biến dưỡng ở vật nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu nhận được sự hỗ trợ của Công ty Cổ phần GreenFeed Việt Nam (Nhật Chánh, Bến Lức, Long An).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clarence MF, Mays A, Harold EA, James A, Douglas CB, Paul MN, Glenn HS, Richard AH

- (1986) The Merck Veterinary Manual”, Sixth Edition. Merck and Co. Inc. Rahway. N.J. U.S.A.
2. Đỗ Đình Hồ (2005) Hóa sinh lâm sàng. NXB Y học.
 3. Đỗ Võ Anh Khoa, Nguyễn Huy Trường, Nguyễn Thị Diệu Thúy (2011) Ảnh hưởng của kiểu gen H-FABP lên các tính trạng sinh lý-sinh hóa máu, năng suất và phẩm chất thịt lợn. Tạp chí Nghiên cứu và Phát triển 9(4): 592-601.
 4. Hilton DJ (1992) LIF: Lots of interesting functions”. Trends of Biochem Sci 17: 72–76.
 5. Khoa DVA, Thuy NTD (2012) Leukemia-inhibitory-factor polymorphism associated with pH, driploss and chemical composition of pork. In proceedings: The First International Conference on Animal Production and Environment, 13-14. December, Can Tho University, Vietnam: 276-282.
 6. Nguyễn Thị Kim Đông, Hứa Văn Chung (2005) Bài giảng sinh lý gia súc. Trường Đại học Cần Thơ.
 7. Nguyễn Toàn Thắng (2006) Giáo trình sinh lý học vật nuôi. Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.
 8. Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, Rudkin BB, Samarut J, (1996) Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells”. Oncogenen 12: 309-322.
 9. Spötter A, Drögemüller C, Hamann H, Distl O (2005) Evidence of a new leukemia inhibitory factor-associated genetic marker for litter size in a synthetic pig line. J Anim Sci 83: 2264–2270.
 10. Spötter A, Drögemüller C, Kuiper H, Brenig B, Leeb T, Distl O (2001) Molecular characterization and chromosome assignment of the porcine gene for leukemia inhibitory factor LIF. Cytogenet Cell Genet 93(1-2): 87-90.
 11. Stewart CL (1994) Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. Mol Reprod Dev 39: 233-238.
 12. Trần Cừ (1975) Sinh lý học gia súc. NXB Nông thôn, Hà Nội.
 13. Trần Thị Minh Châu (2000) Bài giảng chẩn đoán xét nghiệm. Trường Đại học Cần Thơ.