

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

000



LƯƠNG QUÝ PHƯƠNG

**SẢN XUẤT BỘ KIT TÁCH CHIẾT DNA VÀ BỘ KIT PCR
PHÁT HIỆN GEN HALOTHAN TRÊN HEO**

Luận văn kỹ sư

Chuyên ngành: công nghệ sinh học

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 8/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000**

**SẢN XUẤT BỘ KIT TÁCH CHIẾT DNA VÀ BỘ KIT PCR
PHÁT HIỆN GEN HALOTHAN TRÊN HEO**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: công nghệ sinh học**

**Giáo viên hướng dẫn:
PGS.TS. NGUYỄN NGỌC TUÂN
PGS.TS. TRẦN THỊ DÂN**

**Sinh viên thực hiện:
Lương Quý Phương
Khóa: 2002-2006**

**Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006**

**MINISTRY OF TRAINING AND EDUCATION
HCMC NONG LAM UNIVERSITY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

*****000*****

**PRODUCTION DNA EXTRACTION KIT AND PCR KIT TO
DETECT HALOTHAN GENE IN THE PIG**

Engineer essay

Speciality: Biotechnology

Advisor:

Assoc.Prof.Dr NGUYEN NGOC TUAN

Assoc.Prof.Dr TRAN THI DAN

Student:

Luong Quy Phuong

Course: 2002-2006

Ho Chi Minh city

August-2006

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, con xin gửi đến ba má lòng thành kính ghi ơn. Con kính chúc ba má sức khỏe dồi dào, con sẽ luôn phấn đấu để trở thành người có ích cho xã hội để không phụ công dưỡng dục của ba má.

Chân thành gửi lời cảm ơn đến:

- * Ban giám hiệu trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, ban chủ nhiệm Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học cùng tất cả các quý thầy cô đã tận tụy truyền đạt những kiến thức quý báu cho tôi trong suốt quãng thời gian học tập tại trường.
- * Ban giám đốc cùng tập thể cán bộ nhân viên Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực tập tốt nghiệp.
- * Tập thể cán bộ thú y và các cô chú tại lò mổ tập trung huyện Dĩ An, tỉnh Bình Dương đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình lấy mẫu.

Em trân trọng biết ơn thầy Nguyễn Ngọc Tuấn và cô Trần Thị Dân đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong thời gian thực tập tốt nghiệp.

Em gửi lời cảm ơn chân thành đến anh Nguyễn Văn Út và chị Bùi Thị Thu Trang đã giúp đỡ, động viên, chỉ dẫn tận tình trong lúc em tiến hành đề tài tốt nghiệp.

Cảm ơn tất cả bạn bè đã chia sẻ cùng tôi những khó khăn vất vả, vui buồn trong quá trình học tập tại trường và trong thời gian thực tập tốt nghiệp.

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

Lương Quý Phương, Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, tháng 8/2006,
“SẢN XUẤT BỘ KIT TÁCH CHIẾT DNA VÀ BỘ KIT PCR PHÁT HIỆN GEN
HALOTHAN TRÊN HEO”

Hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Nguyễn Ngọc Tuân
2. PGS. TS. Trần Thị Dân

Đề tài được thực hiện từ ngày 28-02-2006 đến ngày 28-07-2006 tại Trung Tâm
Phân Tích Thí Nghiệm Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Gen halothan là gen có những tác động quan trọng đến phẩm chất thịt, sự sinh
trưởng và sinh sản của heo. Do đó, sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR để
phát hiện gen halothan trong đàn heo giống một cách nhanh chóng, tiện lợi, hiệu quả.

Quá trình thực hiện đề tài đạt được những kết quả sau:

1. Rút ngắn thời gian tách chiết DNA: Giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân
giải tế bào từ 1 giờ còn 30 phút, giảm thời gian tủa DNA lần 1 từ 2 giờ còn 1 giờ,
không thực hiện giai đoạn tủa DNA lần 2, thực hiện việc hòa tan DNA trong TE trong
2 giờ thay vì để qua đêm. Độ tinh sạch và hàm lượng DNA ở các thí nghiệm khác biệt
không có ý nghĩa so với độ tinh sạch và hàm lượng DNA tách chiết theo qui trình của
Lê Thị Thu Phương (2004).
2. Thiết lập được bộ kit tách chiết DNA cho 100 mẫu xét nghiệm. Thành phần bộ kit
gồm có 5 dung dịch. Độ tinh sạch, hàm lượng DNA và hiệu quả phản ứng PCR của
DNA tách chiết theo bộ kit khác biệt không có ý nghĩa so với qui trình của Lê Thị Thu
Phương (2004). Nhưng thời gian thực hiện công việc tách chiết DNA theo bộ kit ngắn
hơn (5 giờ so với 24 giờ). Có thể dùng bộ kit để tách chiết DNA từ mô cơ, mô máu,
da. Bộ kit tách chiết DNA có thể bảo quản ở 4°C trong 3 tháng.
3. Thiết lập bộ kit PCR phát hiện gen halothan cho 10 phản ứng. Nồng độ glycerol
20% trong Master Mix 2X sau 1 tháng bảo quản ở 4°C cho hiệu quả PCR cao hơn so
với nồng độ glycerol 10% (100% so với 20%). Bảo quản Master Mix 2X ở hai nhiệt
độ 4°C và 10°C sau 1 tháng đều cho tỷ lệ thành công phản ứng PCR là 100%.
4. Bộ kit PCR halothan phát hiện gen halothan với nồng độ DNA mẫu tối thiểu 1ng.
5. Bộ kit PCR halothan dùng để phát hiện gen halothan trên nhiều nguồn mẫu khác
nhau như cơ vân, máu, da.

MỤC LỤC

NỘI DUNG	TRANG
Bìa.....	i
Trang tựa.....	ii
Lời cảm tạ.....	iii
Tóm tắt khóa luận.....	iv
Mục lục.....	v
Danh sách các chữ viết tắt.....	vii
Danh sách các bảng.....	viii
Danh sách các hình và biểu đồ.....	ix
PHẦN I. MỞ ĐẦU.....	1
1.1 Đặt vấn đề.....	1
1.2 Mục tiêu và yêu cầu.....	2
1.2.1 Mục tiêu.....	2
1.2.2 Yêu cầu.....	2
PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1 Khái quát về gen halothan và cách phát hiện.....	3
2.1.1 Gen halothan.....	3
2.1.2 Ảnh hưởng của gen halothan đến phẩm chất thịt.....	3
2.1.3 Ảnh hưởng của gen halothan đến sức sinh sản.....	5
2.1.4 Những tác động tích cực của gen halothan.....	5
2.1.5 Cách phát hiện gen halothan.....	6
2.2 Phương pháp tách chiết DNA từ tế bào động vật và kỹ thuật PCR.....	7
2.2.1 Phương pháp tách chiết DNA từ tế bào động vật.....	7
2.2.2 Định lượng DNA bằng quang phổ kế.....	8
2.2.3 Phương pháp PCR.....	9
2.2.3.1 Nguyên tắc của phản ứng PCR.....	9
2.3 Enzym cắt giới hạn.....	11
2.4 Nguyên tắc tạo kit tách chiết DNA và kit PCR.....	13
2.4.1 Kit là gì?.....	13
2.4.2 Nguyên tắc tạo kit.....	13
2.4.3 Kit tách chiết DNA.....	13
2.4.4 Kit thực hiện phản ứng PCR.....	14
2.5 Tình hình sản xuất kit trên thế giới và Việt Nam.....	16
PHẦN III. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
3.1 Thời gian và địa điểm tiến hành.....	17
3.2 Nội dung nghiên cứu.....	17
3.2.1 Tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA.....	17
3.2.2 Tạo kit tách chiết DNA.....	17
3.2.3 Tạo kit PCR để phát hiện gen halothan trên heo.....	17
3.3 Vật liệu và hóa chất.....	17
3.3.1 Nguồn mẫu chiết xuất DNA.....	17
3.3.2 Các primer sử dụng.....	18

3.3.2.1	Đối với gen trên nhiễm sắc thể giới tính của bò.....	18
3.3.2.2	Đối với gen thụ thể estrogen trên heo.....	18
3.3.2.3	Đối với gen halothan trên heo	18
3.3.3	Hóa chất	19
3.3.3.1	Hóa chất dùng trong tách chiết DNA	19
3.3.3.2	Hóa chất dùng trong điện di	19
3.3.3.3	Hóa chất dùng trong phản ứng PCR.....	19
3.3.3.4	Hóa chất dùng trong phản ứng cắt enzyme giới hạn <i>HhaI</i>	19
3.3.4	Thiết bị và dụng cụ	19
3.4	Phương pháp tiến hành.....	19
3.4.1	Lấy và bảo quản mẫu	19
3.4.2	Thiết lập bộ kit tách chiết DNA	19
3.4.2.1	Tách chiết DNA từ cơ vân (Lê Thị Thu Phương, 2004) (qui trình I)..	19
3.4.2.2	Phương pháp tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA	21
3.4.2.3	Xây dựng bộ kit tách chiết DNA	23
3.4.2.4	Hiệu quả của bộ kit tách chiết DNA đối với mô máu và da.....	24
3.4.2.5	Thực hiện phản ứng PCR	25
3.4.3	Thiết lập bộ kit PCR phát hiện gen halothan trên heo	27
3.4.3.1	Thiết lập thành phần bộ kit PCR và qui trình dùng bộ kit PCR	27
3.4.3.2	Khảo sát một số đặc tính của bộ kit PCR halothan	29
3.4.4	Cắt enzyme giới hạn	30
3.4.5	Điện di và quan sát kết quả.....	30
3.4.5.1	Chuẩn bị gel agarose 1,5 % và 2 %	30
3.4.5.2	Điện di và đọc kết quả	30
3.5	Xử lý số liệu	30
PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....		31
4.1	Kết quả tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA.....	31
4.1.1	Giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào.....	31
4.1.2	Giảm thời gian rửa DNA lần 1	32
4.1.3	Không thực hiện giai đoạn rửa DNA lần 2	32
4.1.4	Giảm thời gian hòa tan DNA trong TE.....	33
4.2	Kết quả thiết lập bộ kit tách chiết DNA	34
4.2.1	So sánh hiệu quả tách chiết DNA theo qui trình bộ kit và qui trình I	34
4.2.1.2	Kết quả thực hiện phản ứng PCR	35
4.2.2	Thử nghiệm tính ổn định của bộ kit ly trích DNA từ cơ vân.....	38
4.3	Kết quả thiết lập bộ kit PCR phát hiện gen halothan	39
4.3.1	Kết quả khảo sát nồng độ glycerol trong Master Mix 2X	39
4.3.2	Kết quả khảo sát nhiệt độ bảo quản Master Mix 2X	41
4.3.3	Kết quả khảo sát độ nhạy của bộ kit PCR halothan.....	42
4.3.4	Hiệu quả của bộ kit PCR halothan với DNA tách chiết từ máu và da.....	44
4.3.5	Hiệu quả kinh tế của bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan.....	46
PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ		48
5.1	Kết luận.....	48
5.2	Đề nghị	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO		49
PHỤ LỤC		52

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp: base pair
ctv: cộng tác viên
DNA: deoxyribonucleic acid
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylene diamine tetra acetate
NST: nhiễm sắc thể
OD: optical density
PCR: polymerase chain reaction
SDS: sodium dodecyl sulfate
Taq: *Taq* polymerase
TBE: Tris borate EDTA
TE: Tris EDTA
TN: Thí nghiệm
Tỷ số OD: tỷ số $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}}$
UI: unit
USD : United States Dollar
UV: ultra violet
VNĐ : Việt Nam Đồng

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 3.1 Trình tự các đoạn primer cho gen giới tính.....	18
Bảng 3.2 Trình tự cặp primer của gen thụ thể estrogen	18
Bảng 3.3 Trình tự cặp primer của gen halothan	18
Bảng 3.4 Những yếu tố thay đổi để tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA từ cơ	22
Bảng 3.5 Thành phần hóa chất trong bộ kit tách chiết DNA	23
Bảng 3.6 Thành phần hoá chất PCR.....	26
Bảng 3.7 Qui trình phản ứng PCR.....	26
Bảng 3.8 Thành phần hoá chất PCR.....	27
Bảng 3.9 Qui trình phản ứng PCR.....	27
Bảng 3.10 Thành phần hóa chất PCR (Lê Thị Thu Phương, 2004)	28
Bảng 3.11 Thành phần hóa chất PCR Master Mix 2X.....	28
Bảng 3.12 Hỗn hợp thực hiện 1 phản ứng PCR với bộ kit.....	28
Bảng 4.1 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình tách chiết I và II	31
Bảng 4.2 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình tách chiết I và III.....	32
Bảng 4.3 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và IV	33
Bảng 4.4 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và V	33
Bảng 4.5 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và bộ kit.....	35
Bảng 4.6 Tỷ lệ thành công khi PCR với primer của gen giới tính	36
Bảng 4.7 Tỷ lệ thành công khi PCR với primer của gen thụ thể estrogen	36
Bảng 4.8 Kết quả đo OD của DNA tách chiết theo bộ kit ở các thời điểm bảo quản ...	38
Bảng 4.9 Tỷ lệ thành công của phản ứng PCR với Master Mix 2X.....	39
Bảng 4.10 Tỷ lệ thành công của phản ứng PCR ở hai phương pháp	39
Bảng 4.11 Tỷ lệ thành công của bộ kit PCR halothan ở 10°C	41
Bảng 4.12 Kết quả PCR ở các nồng độ DNA mẫu	43
Bảng 4.13 Chi phí hóa chất sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR.....	46

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ

HÌNH	TRANG
Hình 2.1 Heo Pietrain bị stress	4
Hình 2.2 Sự tác động của gen halothan lên phẩm chất thịt	4
Hình 2.3 Nguyên lý của phản ứng PCR	11
Hình 2.4 Cấu tạo của glycerol	15
Hình 2.5 Cấu tạo của DTT	15
Hình 2.6 Cấu tạo của Tween 20	16
Hình 3.1 Bộ kit tách chiết DNA	23
Hình 3.2 Bộ kit PCR halothan	27
Hình 4.1 Sản phẩm PCR gen giới tính từ DNA tách chiết của hai qui trình.....	37
Hình 4.2 Sản phẩm PCR gen thụ thể estrogen từ DNA tách chiết của hai qui trình	37
Hình 4.3 Sản phẩm PCR gen halothan ở hai nồng độ glycerol	41
Hình 4.4 Sản phẩm PCR gen halothan ở hai nhiệt độ bảo quản	42
Hình 4.5 Sản phẩm PCR gen halothan ở các nồng độ DNA mẫu	43
Hình 4.6 Sản phẩm PCR gen halothan từ mẫu máu	44
Hình 4.7 Sản phẩm PCR gen halothan từ mẫu da	44
Hình 4.8 Sản phẩm cắt enzym giới hạn <i>Hha</i> I của gen halothan	45
BIỂU ĐỒ	
Biểu đồ 4.1 DNA tách chiết theo qui trình I và II	31
Biểu đồ 4.2 DNA tách chiết theo qui trình I và III.....	32
Biểu đồ 4.3 DNA tách chiết theo qui trình I và IV	33
Biểu đồ 4.4 DNA tách chiết theo qui trình I và V.....	34
Biểu đồ 4.5 DNA tách chiết theo qui trình I và qui trình bộ kit.....	35
Biểu đồ 4.6 Hiệu quả tách chiết DNA của bộ kit ở các thời điểm bảo quản.....	38

PHẦN I. MỞ ĐẦU

1.1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Thế kỷ 21 được đánh giá là thế kỷ của công nghệ sinh học, không thể phủ nhận những tác động to lớn và đầy tiềm năng của công nghệ này đến nhiều lĩnh vực của đời sống kinh tế xã hội nói chung và trong lĩnh vực chăn nuôi nói riêng. Một trong những kỹ thuật quan trọng của công nghệ sinh học là kỹ thuật PCR (polymerase chain reactions) với ưu điểm phát hiện nhanh, đặc hiệu đã hỗ trợ cho các nhà nghiên cứu có nhiều thuận lợi trong công tác chọn tạo giống vật nuôi, rút ngắn thời gian chọn lọc tính trạng di truyền mong muốn. Bên cạnh đó kết quả của kỹ thuật PCR còn là vật liệu cho nhiều nghiên cứu sâu hơn Ở nước ta hiện nay, phần lớn các kết quả thu được từ việc áp dụng kỹ thuật này chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu trong phòng thí nghiệm, chưa có nhiều ứng dụng rộng rãi trong thực tế sản xuất, thậm chí trong phòng thí nghiệm thì việc áp dụng kỹ thuật này cũng gặp không ít trở ngại. Có nhiều nguyên nhân để lý giải vấn đề này. Một nguyên nhân chính đó là việc áp dụng kỹ thuật PCR khá tốn kém, dễ ngoại nhiễm và mất nhiều thời gian để có thể tối ưu hóa một qui trình PCR phát hiện đoạn gen mục tiêu một cách đặc hiệu và ổn định. Do vậy, nghiên cứu sản xuất bộ kit để tách chiết DNA và bộ kit PCR là một đòi hỏi cấp thiết không chỉ trong nghiên cứu mà còn trong thực tiễn sản xuất. Bộ kit giúp tiết kiệm thời gian trong phát hiện, hạn chế nguy cơ ngoại nhiễm, dễ bảo quản, vận chuyển, hạn chế các lỗi do pipette trong khi pha trộn các thành phần phản ứng, thao tác đơn giản, nhanh, tiện lợi.... Như vậy, bộ kit sẽ giúp cho người sử dụng dễ dàng kiểm soát được các thông số kỹ thuật trong thao tác và rút ngắn thời gian khi thực hiện PCR mà vẫn đạt được hiệu quả mong muốn.

Trong khẩu phần ăn của con người, thịt là một trong những nguồn protein chính, trong đó thịt heo được sản xuất và tiêu thụ lớn nhất trên thế giới (Franco và ctv, 1998). Một trong các mối quan tâm lớn nhất trong quá trình sản xuất thịt heo là phẩm chất thịt. Đây chính là tiêu chí quyết định đến tính cạnh tranh của sản phẩm trên thị trường. Ngoài ra, đối với ngành chăn nuôi heo, việc tạo được các giống heo có năng suất sinh sản cao, tăng trưởng nhanh cũng là nhiệm vụ hàng đầu của các nhà khoa học.

Gen halothan được xem là gen chủ chi phối nhiều tính trạng sản xuất nhưng có những ảnh hưởng bất lợi đáng kể đến phẩm chất thịt, sự sinh trưởng và sinh sản của heo. Do đó, việc dùng bộ kit tách chiết DNA và kit PCR để xác định sớm, chính xác, nhanh chóng kiểu gen của thú trước khi đưa vào đàn heo giống là hết sức cần thiết. Từ yêu cầu đó chúng tôi tiến hành đề tài: **“Sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR phát hiện gen halothan trên heo”**.

1.2 MỤC TIÊU VÀ YÊU CẦU

1.2.1 Mục tiêu

Sản xuất bộ kit phát hiện gen halothan gồm có bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR.

1.2.2 Yêu cầu

- Nắm vững qui trình tách chiết DNA và phản ứng PCR.
- Tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA.
- Tạo được bộ kit tách chiết DNA 100 mẫu, bộ kit PCR halothan cho 10 phản ứng, đáp ứng tiêu chí nhanh, tiện lợi, hiệu quả, và có tính thương mại.
- Kiểm tra độ tinh sạch, độ ổn định, định lượng DNA của bộ kit tách chiết DNA.
- Kiểm tra độ nhạy, độ ổn định, điều kiện bảo quản của bộ kit PCR halothan.
- Kiểm tra hiệu quả của bộ kit PCR halothan trên các nguồn mẫu DNA khác nhau.
- Tính toán hiệu quả kinh tế của bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan.

PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Khái quát về gen halothan và cách phát hiện

2.1.1 Gen halothan

Năm 1991, một nhóm các nhà khoa học đứng đầu là MacLennan đã xác định được trình tự gen halothan (Fujii và ctv, 1991). Ở heo, gen halothan nằm trên nhiễm sắc thể số 6, gồm 2 alen: N và n, tạo nên 3 kiểu gen NN, Nn và nn. Theo MacLennan và cộng sự, gen đột biến lặn n là kết quả của sự đột biến C-cytosin thành T-thymin ở vị trí base 1843 của gen mã hóa thụ thể ryanodin (ryr-1), thụ thể này nằm trong kênh phóng thích canxi của lưới nội bào ở tế bào cơ (Fujii và ctv, 1991). Sở dĩ người ta đặt tên là gen halothan vì trước đây để phát hiện kiểu hình của gen này người ta cho heo ngủi chất gây mê bay hơi halothan. Nếu các chi heo duỗi thẳng và cứng cơ thì xác định phản ứng halothan dương tính và ngược lại phản ứng halothan âm tính khi heo dẫn cơ bình thường sau 3 phút ngủi chất gây mê này.

2.1.2 Ảnh hưởng của gen halothan đến phẩm chất thịt

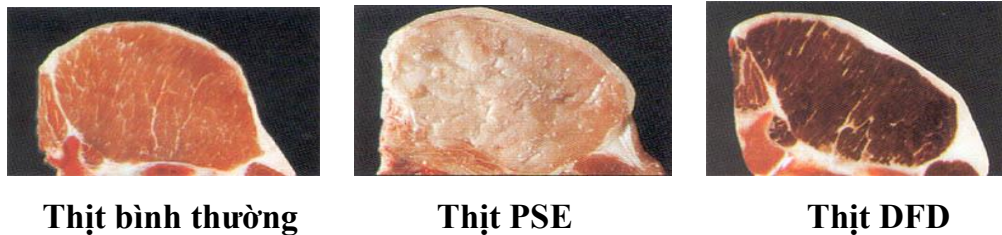
Hội chứng stress trên heo (PSS – porcine stress syndrom) là hội chứng rối loạn thần kinh cơ di truyền ở heo (Franco và ctv, 1998). Hội chứng này được điều khiển bởi gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể số 6 của tế bào bản thể (Houde và ctv, 1993). Heo mắc phải hội chứng này rất nhạy cảm với các tác nhân gây stress. Đây là hội chứng gây thiệt hại rất lớn đối với ngành chăn nuôi heo công nghiệp đặc biệt là những tác động của nó lên phẩm chất thịt. Các nguyên nhân dẫn đến PSS gồm có: thời tiết nóng, đánh nhau, di chuyển xa, ồn ào, đói khát, thiếu, tiêm vaccin. (Du, 2004). Heo mắc phải hội chứng này có các triệu chứng sau đây:

- Sốt kiệt phát: với các biểu hiện khó thở (hơi thở ngắn và dốc), tăng thân nhiệt ($>41^{\circ}\text{C}$), cứng cơ, nổi mẩn xanh trên da.
- Chết đột ngột trong quá trình di chuyển.
- Giảm phẩm chất thịt: mô cơ trở nên nhạt màu, mềm, rỉ dịch (PSE – pale, soft, exudative) hoặc sậm màu, cứng, khô (DFD – dark, firm, dry).



Hình 2.1 Heo Pietrain bị stress
(Nguồn: Chambers và Grandin, 2001)

Hội chứng PSS ảnh hưởng quan trọng đến phẩm chất thịt (Lundstrom và ctv, 1989). Thịt PSE hình thành do sự tương tác của nhiều yếu tố như di truyền, giống heo, sự thay đổi bất thường của thời tiết, vận chuyển đường dài.... Heo mang gen halothan dễ phát triển thịt PSE hơn so với heo không mang gen này (Du, 2004). Theo Barton - Gade (1984), tỷ lệ quày thịt bị PSE ở heo mang kiểu gen nn là 79% - 100%, heo mang kiểu gen Nn là 13% - 33%, heo mang kiểu gen NN là 0% - 33% (Lunsdrom và ctv, 1989).



Thịt bình thường

Thịt PSE

Thịt DFD

Hình 2.2 Sự tác động của gen halothan lên phẩm chất thịt
(Nguồn: Chambers và Grandin, 2001)

Thịt PSE không chỉ không được chấp nhận bởi người tiêu dùng vì thịt có màu sắc nhợt nhạt, không hấp dẫn, bề mặt thịt mềm và rỉ dịch mà còn do thịt PSE không thích hợp trong quá trình chế biến vì khả năng giữ nước thấp. Thịt PSE thường được ghi nhận sau khi giết mổ 45 phút với màu sắc cơ nhợt nhạt; mô cơ mềm, rỉ dịch và mất nước nhiều hơn trong quá trình bảo quản lạnh, chế biến và đun nấu so với thịt bình thường. Thịt nhạt màu là do sự biến tính sắc tố cơ (myoglobin) dưới điều kiện pH thấp và nhiệt độ cao trong cơ. pH trong cơ thấp sau khi giết mổ là kết quả của quá trình đường phân và tăng tích lũy acid lactic trong cơ ngay trước và trong khi giết mổ.

pH thấp còn là nguyên nhân làm giảm khả năng giữ nước của thịt dẫn tới làm giảm sản lượng thịt (Ellis và Bertol, 2001). Như vậy, thịt PSE không chỉ làm giảm chất lượng thịt mà còn làm giảm sản lượng thịt.

2.1.3 Ảnh hưởng của gen halothan đến sức sinh sản

Đối với nọc, gen halothan ảnh hưởng đến khả năng sản xuất tinh của nọc (Schneider và ctv, 1980). Heo nọc mang kiểu gen đồng hợp tử trội NN có thể tích tinh dịch và tổng số tinh trùng tiến thẳng trong một lần xuất tinh cao hơn so với nọc mang kiểu gen dị hợp tử Nn (Đình Văn Chính và ctv, 1999; trích dẫn bởi Lê Thị Thu Phương, 2004). Heo nọc mang kiểu gen đồng hợp tử lặn nn có phẩm chất tinh dịch thấp hơn so với nọc mang kiểu gen NN và Nn (Pfeiffer và ctv, 1986).

Đối với những nái nhạy cảm với stress, chúng thường mệt mỏi, chán ăn gây ảnh hưởng xấu đến quá trình sinh sản như giảm số trứng rụng, tăng tỉ lệ chết phôi, giảm số con đẻ ra trong mỗi lứa.

Theo Wileke (1986), gen halothan giảm số lứa đẻ trong suốt đời nái, nái không nhạy cảm với halothan (HN – Halothan Negative) đẻ nhiều hơn nái nhạy cảm với halothan (HP – Halothan Positive) 1,02 lứa.

2.1.4 Những tác động tích cực của gen halothan

Người ta nhận thấy rằng những heo HP có những ưu điểm nổi bật. Heo mang kiểu gen nn có tăng trọng, hệ số chuyển hóa thức ăn, tỷ lệ nạc trong quây thịt, diện tích thịt thăn, tỷ lệ thịt xẻ cao hơn và trọng lượng xương đùi, dày mỡ lưng thấp hơn heo có kiểu gen NN, Nn (Rundgren, 1990). Trái lại, heo mang kiểu gen nn tăng trưởng chậm 10 – 20%, tỉ lệ chết cao từ giai đoạn sơ sinh đến khi xuất chuồng 20 – 30%, tỉ lệ quây thịt PSE tăng 25%, giảm 0,5 con/ô đẻ và kéo dài khoảng cách giữa hai lứa đẻ ở heo nái, giảm khả năng xuất tinh ở heo nọc (Nguyễn Ngọc Tuấn và Trần Thị Dân, 2001; trích dẫn bởi Lê Thị Thu Phương, 2004).

Heo mang kiểu gen Nn có tỷ lệ nạc quây thịt, diện tích cơ thăn thấp hơn so với heo mang kiểu gen nn nhưng lại cao hơn so với heo mang kiểu gen NN. Ngoài ra heo mang kiểu gen Nn có dày mỡ lưng thấp hơn, hệ số chuyển hóa thức ăn tốt hơn và khả năng hình thành thịt PSE cao hơn so với heo mang kiểu gen NN (Rundgren, 1990).

Theo Mitchell và Heffron (1982), heo mang kiểu gen NN, Nn có tính kháng stress tốt hơn so với heo nn.

Cải thiện hiệu quả chuyển hóa thức ăn, giảm dày mỡ lưng, tăng diện tích thịt thăn và tăng tỉ lệ nạc quày thịt là những cải thiện đáng kể của ngành công nghiệp chăn nuôi heo. Tuy nhiên, những tác động hạn chế của gen halothan lên phẩm chất thịt, sinh sản, sinh trưởng không thể không kể đến. Cách tốt nhất để hạn chế những thiệt hại do gen halothan gây ra đối với ngành chăn nuôi heo là nên loại bỏ gen này ra khỏi đàn heo giống. Bên cạnh đó cũng có ý kiến cho rằng nên giữ lại gen này ở dạng dị hợp tử Nn do những ưu điểm về tỷ lệ nạc quày thịt và tính kháng stress. Tuy nhiên, nên cân nhắc về khả năng hình thành thịt PSE của heo mang kiểu gen Nn nhằm có sự lựa chọn hợp lý để mang lại hiệu quả cao nhất. Trước thực tế đó, việc phát hiện sớm gen này trong đàn heo giống là hết sức cần thiết để ngành chăn nuôi kiểm soát được tác động xấu của gen halothan.

2.1.5 Cách phát hiện gen halothan

Trước đây, để phát hiện gen halothan người ta cho heo ngửi chất gây mê bay hơi halothan với nồng độ 4% trong 3 phút. Phản ứng halothan dương tính khi các chi heo duỗi thẳng và cứng cơ. Ngược lại phản ứng halothan âm tính khi heo vẫn dẫn cơ bình thường. Một số ít heo có phản ứng trung gian vào cuối phút thứ 3 như duỗi thẳng 1 trong 4 chi, hoặc 2 chi sau hoặc hai chi trước thì ghi nhận là nghi ngờ. Các giống heo có tính nhạy cảm khác nhau với halothan, nhìn chung những heo có bắp cơ phát triển như Landrace Bỉ, Pietrain có tần số nhạy cảm với halothan cao hơn so với các giống như Yorkshire, Duroc (Barton–Gade và ctv,1988) .

Phương pháp này có ưu điểm là nhanh, rẻ, dễ thực hiện, cho kết quả ngay, có tính ứng dụng cao tuy nhiên nó cũng bộc lộ nhiều hạn chế như phát hiện trễ (heo từ 8 tuần tuổi trở đi), công kênh, tốn công cố định thú và không thể phát hiện được kiểu gen dị hợp tử (Nn). Bên cạnh đó heo có thể chết đột ngột do sốt kiệt phát lúc xét nghiệm.

Nhằm khắc phục hạn chế của trắc nghiệm halothan, Fujii và ctv (1991) đã đưa ra phương pháp phát hiện gen halothan bằng kỹ thuật PCR và enzym cắt giới hạn để phát hiện đột biến điểm. Sau đó, kỹ thuật này được các nhà khoa học của đại học Iowa cải tiến. Với kỹ thuật PCR và enzym cắt giới hạn, việc phát hiện gen halothan sẽ được thực hiện nhanh chóng, hiệu quả, chính xác và dễ dàng phân biệt các kiểu gen NN, Nn và nn.

Sản phẩm khuếch đại bằng kỹ thuật PCR của gen halothan có chiều dài 586 bp (base pair). Sử dụng enzym cắt giới hạn *HhaI* để phân tích kiểu gen halothan đối với alen N, *HhaI* cắt thành 2 đoạn 127 bp và 459 bp. Với alen n, *HhaI* không cắt. Do đó với kiểu gen nn trên màn hình máy chụp gel ta thấy có 1 băng 586 bp. Kiểu gen Nn trên màn hình máy chụp gel ta thấy có 3 băng: 127 bp, 459 bp và 586 bp (dẫn liệu của Lê Thị Thu Phương (2004)).

2.2 Phương pháp tách chiết DNA từ tế bào động vật và kỹ thuật PCR

2.2.1 Phương pháp tách chiết DNA từ tế bào động vật

Nguyên tắc chung để tách chiết DNA từ tế bào là phân giải tế bào, loại bỏ protein và những tạp chất khác, tủa DNA và tinh sạch DNA.

Đối với việc phân giải tế bào động vật, mục tiêu chính là phá vỡ màng tế bào và màng nhân. Để thực hiện công việc này người ta nghiền mô động vật trong dung dịch phân giải tế bào, dung dịch này có các thành phần chính như: EDTA (ethylene diamine tetra acetate), SDS (sodium dodecyl sulfat), proteinase (proteinase K).

SDS là một chất tẩy, có nhiệm vụ loại bỏ những phân tử lipid của màng, do đó sẽ làm đứt gãy màng tế bào và màng nhân thành từng mảnh nhỏ cho phép DNA phóng thích ra bên ngoài.

Proteinase K là enzym phân giải protein, giúp loại bỏ những protein gắn kết với DNA và phá hủy enzym của tế bào đảm bảo DNA tách ra được nguyên vẹn.

EDTA có nhiệm vụ liên kết với các ion kim loại hóa trị hai đặc biệt là Mg^{++} (một yếu tố cần thiết cho hoạt động của DNase và các enzym khác) để ức chế hoạt động của các enzym tế bào làm hư hỏng DNA.

Để loại bỏ protein, mẫu được lắc mạnh trong hỗn hợp phenol, chloroform và isoamyl alcohol. Phenol và chloroform là những chất hữu cơ có tác dụng biến tính protein và làm protein tan được trong pha hữu cơ nhưng không hòa tan nucleic acid (DNA, RNA) nằm trong pha nước. Ngoài ra chloroform còn có tác dụng loại bỏ các phân tử lipid cho nên cải thiện sự phân tách giữa pha nước và pha hữu cơ. Sau khi ly tâm, pha nước chứa DNA nằm ở phía trên, protein sẽ tủa thành một lớp nằm giữa pha nước và pha hữu cơ. Isoamyl alcohol thêm vào có tác dụng giảm sự tạo bọt.

Sau khi đã loại bỏ protein người ta hút dịch nổi (pha nước chứa DNA) cho vào một ống eppendorf mới, cho muối của cation hóa trị 1 (thường dùng sodium acetate)

và ethanol (hoặc isopropanol) tuyệt đối lạnh để thực hiện việc rửa DNA. Việc thêm muối làm DNA trở nên giảm tính tan. Khi thêm muối vào, những ion mang điện tích dương của muối sẽ tương tác với điện tích âm của DNA dẫn đến trung hòa điện tích của DNA, điều này làm cho các phân tử DNA gắn kết với nhau thay vì đẩy nhau. Ethanol tuyệt đối lạnh sẽ giúp loại bỏ các phân tử nước và trong dung môi ethanol DNA khó tan hơn so với trong nước. Đồng thời nhiệt độ lạnh tạo thuận lợi cho việc rửa DNA. Như vậy, trong môi trường có nồng độ ion cao (nồng độ muối cao) và nồng độ ethanol cao (2,5 thể tích ethanol / 1 thể tích mẫu) sẽ làm rửa DNA (Weaver và ctv, 1997).

Sau khi rửa, DNA được thu nhận bằng cách li tâm.

Để thực hiện việc tinh sạch DNA người ta dùng ethanol 70% để rửa DNA. Công đoạn này nhằm mục đích loại bỏ muối còn liên kết với DNA, lượng ethanol dư trong DNA được loại bỏ bằng cách phơi mẫu ở nhiệt độ phòng (15 - 30') hay để trong tủ ấm 55°C (5 - 10'). Sở dĩ phải loại bỏ ethanol vì nó có thể ức chế phản ứng PCR (Weaver và ctv, 1997). Sau đó, DNA được hòa tan trong nước hoặc TE (đây là dung dịch gồm có Tris HCl và EDTA) để bảo quản.

2.2.2 Định lượng DNA bằng quang phổ kế

Trên nguyên tắc sự hấp thụ ánh sáng khác nhau của các base nitơ trong phân tử DNA mạch kép và mạch đơn, có thể xác định được hàm lượng của DNA trong dung dịch (Weaver và ctv, 1997). Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (OD_{260nm} – optical density) của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung dịch.

Một đơn vị OD ở bước sóng 260 nm ký hiệu là A_{260nm} .

$$A_{260nm} = 1,0 = 50 \mu \text{ g/ml DNA sợi đôi}$$

$$A_{260nm} = 1,0 = 40 \mu \text{ g/ml DNA sợi đơn hay RNA}$$

Tuy nhiên cách tính này chỉ đúng với các dung dịch acid nucleic sạch. Để kiểm tra độ tinh sạch của dung dịch DNA người ta xác định thêm giá trị A_{280nm} . Trong đó A_{280nm} là đơn vị OD ở bước sóng 280 nm. Đây là bước sóng mà ở đó các phân tử protein có mức hấp thụ cao nhất đồng thời các protein cũng hấp thụ ở bước sóng 260 nm gây nên sự sai lệch khi tính nồng độ của acid nucleic. Do đó để đảm bảo chính xác nồng độ DNA người ta sử dụng giá trị A_{260nm}/A_{280nm} . Khi tỷ lệ A_{260nm}/A_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 – 2 dịch chiết DNA được xem là sạch (Weaver và ctv, 1997). Hàm

lượng DNA được ước lượng theo công thức $\text{DNA (ng/}\mu\text{l)} = [62,9 \cdot \text{OD}_{260\text{nm}} - 36 \cdot \text{OD}_{280\text{nm}}] \cdot (\text{độ pha loãng})$.

2.2.3 Phương pháp PCR (polymerase chain reaction)

Phương pháp PCR được mô tả đầu tiên vào năm 1985 bởi Karl Mullis và cộng tác viên.

Phương pháp này cho phép khuếch đại nhanh một gen mong muốn lên nhiều lần. Mức độ khuếch đại, về lý thuyết là hàng triệu lần (tạo ra nhiều μg DNA) từ một phân tử DNA ban đầu. Phương pháp này khác với phương pháp nhân bản DNA bằng cloning (dòng hóa trong điều kiện *in vivo*). Trong phương pháp PCR, sự nhân bản DNA được thực hiện trong điều kiện *in vitro*, không cần sự hiện diện của tế bào.

2.2.3.1 Nguyên tắc của phản ứng PCR

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) là một phương pháp tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzym DNA polymerase và một cặp primer đặc hiệu cho đoạn DNA này. Nhờ enzym DNA polymerase xúc tác trên các mạch khuôn DNA tổng hợp nên các mạch đơn mới. Các mạch đơn mới được tổng hợp lại được sử dụng làm khuôn cho quá trình tổng hợp mạch mới của chu kỳ tiếp theo. Sự tổng hợp mạch đơn DNA mới cần có sự tham gia của các primer tạo các nhóm 3' OH tự do. Các nucleotid được gắn ở vị trí nhóm OH kéo dài tạo thành mạch đơn mới (Khuất Hữu Thanh, 2003).

Tất cả các DNA polymerase đều cần những primer chuyên biệt để tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn. Mạch khuôn thường là một trình tự DNA của gen (gọi là trình tự DNA mục tiêu) đặc trưng cho loài sinh vật mục tiêu hoặc là gen quy định việc tổng hợp một loại độc tố chuyên biệt của vi sinh vật (Hồ Huỳnh Thủy Dương, 2000).

Primer là những đoạn oligonucleotid mạch đơn có kích thước khoảng 6 – 100 bp, có trình tự bắt cặp bổ sung với trình tự hai đầu mạch khuôn. Primer càng dài khả năng tổng hợp mạch DNA mới càng chính xác. Ngược lại khi primer ngắn quá, sự bắt cặp giữa môi và khuôn thuận lợi nhưng kết quả PCR kém độ chính xác. Cặp primer

gồm primer xuôi và primer ngược tham gia phản ứng PCR. Primer xuôi bắt cặp và gắn ở đầu 3' của mạch khuôn 5' → 3', primer ngược bắt cặp bổ sung gắn ở đầu 3' của mạch khuôn 3' → 5' (Khuất Hữu Thanh, 2003).

Như vậy, để khuếch đại một trình tự DNA xác định, cần phải có những thông tin tối thiểu về trình tự của DNA, đặc biệt là trình tự base ở hai đầu đoạn DNA đủ để tạo các primer bổ sung chuyên biệt (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2000).

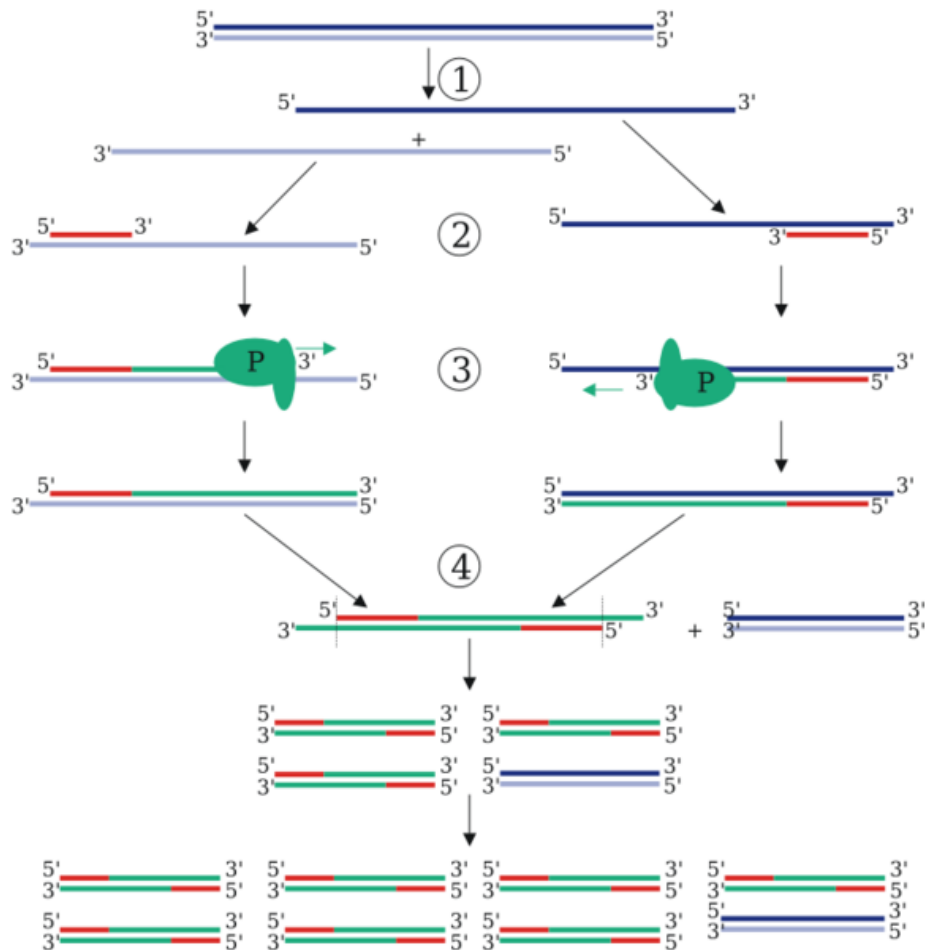
Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn.

Giai đoạn biến tính (denaturation): dung dịch phản ứng phải đầy đủ các thành phần cần thiết cho sự tái bản DNA (dNTP, enzym DNA polymerase, Mg^{++} , ...). Phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của DNA khuôn. Ở điều kiện này, phân tử DNA từ dạng sợi đôi sẽ tách thành sợi đơn, ở nhiệt độ 94 - 95°C trong vòng 30 giây đến 1 phút. Nếu đoạn DNA có tỷ lệ G - C cao, chuỗi G, C liền nhau dài thì cần tính toán để có nhiệt độ thích hợp.

Giai đoạn bắt cặp (annealation): trong giai đoạn này, nhiệt độ hạ thấp dưới nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các primer, các primer bắt cặp với mạch khuôn. Thường ở chế độ nhiệt trong khoảng 40°C - 70°C. Tùy thuộc vào độ lớn và T_m của các primer, thời gian từ 30 giây đến 1 phút.

Giai đoạn kéo dài (extension): dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotid lần lượt gắn vào primer theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Mạch mới được tạo thành từ mạch được kéo dài. Nhiệt độ phản ứng là 72 °C (đây là nhiệt độ mà các enzym DNA polymerase hoạt động tốt nhất), thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.

Trong phản ứng PCR, một chu kỳ gồm 3 bước như trên được lặp đi lặp lại nhiều lần, số lượng DNA được gia tăng theo cấp số nhân. Theo tính toán, sau 30 - 40 chu kỳ, sự khuếch đại sẽ cho ra 10^6 bản sao. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng ethidium bromide sau khi thực hiện điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamide, sau đó tiến hành quan sát dưới tia UV (bước sóng 312 nm) (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2000).



Hình 2.3: Nguyên lý của phản ứng PCR

(1): biến tính – tách rời hai mạch của phân tử DNA

(2): bắt cặp – cặp primer chuyên biệt cho một trình DNA xác định bắt cặp với mạch khuôn

(3): kéo dài – DNA polymerase tổng hợp mạch mới từ vị trí primer đã bắt cặp dưới sự hiện diện của 4 loại dNTP và chất đệm thích hợp

(4) : hoàn thành chu kỳ đầu tiên

(Nguồn: Chambers và Grandin, 2001)

2.3 Enzym cắt giới hạn

Hiện tượng giới hạn và enzym giới hạn do Hamilton phát hiện đầu tiên (1970) ở vi khuẩn *Haemophilus influenzae*, chủng Rd đặt tên là Hind II (Khuất Hữu Thanh, 2003). Enzym giới hạn (Restriction Enzym – RE) thuộc nhóm enzym endonuclease, có khả năng cắt những phân tử DNA sợi kép tại những điểm rất chính xác. Mỗi RE nhận biết và cắt đặc hiệu một đoạn DNA theo trình tự giới hạn (vị trí giới hạn) 4 hoặc

6 cặp base. Đặc trưng quan trọng nhất của các trình tự giới hạn là chúng có cấu trúc polindromic, nghĩa là hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau khi chúng được đọc theo chiều 5' - 3'. Như vậy vị trí cắt giống nhau trên hai mạch.

Dựa vào khả năng nhận biết và cắt trình tự giới hạn, người ta chia enzym giới hạn làm 3 loại:

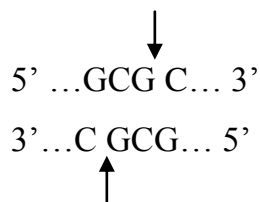
Loại thứ nhất gồm các enzym giới hạn nhận biết trình tự giới hạn di chuyển dọc theo DNA, đến cách vị trí giới hạn khoảng 1000-5000 nucleotid cắt tại đó và giải phóng vài chục nucleotid.

Loại thứ hai gồm các enzym giới hạn nhận biết vị trí giới hạn cắt ngay tại đó. Loại này được sử dụng nhiều trong kỹ thuật gen và công nghệ DNA tái tổ hợp.

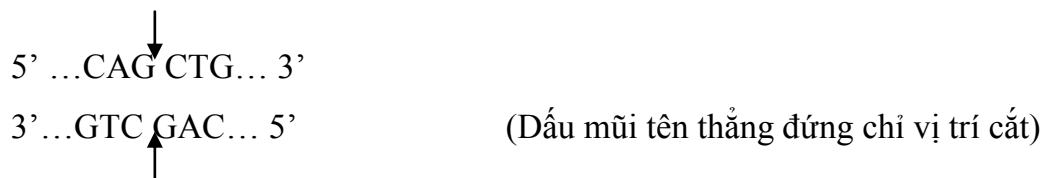
Loại thứ ba gồm các enzym giới hạn nhận biết vị trí giới hạn và cắt ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotid về phía trước.

Enzym giới hạn cắt vị trí giới hạn theo hai kiểu cắt khác nhau là cắt tạo đầu bằng và cắt tạo đầu so le.

Enzym giới hạn *HhaI* có vị trí cắt theo kiểu đầu so le:



Enzym giới hạn *PvuII* có vị trí cắt theo kiểu đầu thẳng:



Enzym giới hạn cắt cả hai mạch DNA cùng một điểm tạo các đầu bằng (blunt ends), các đầu bằng bị cắt của phân tử DNA không có khả năng tự kết hợp lại với nhau. Để nối các đoạn DNA với nhau cần sử dụng enzym nối- DNA ligase hoặc các adaptor chuyên dụng cho mỗi loại enzym. Enzym giới hạn nhận biết và cắt phân tử DNA ở các vị trí lệch nhau giữa hai mạch đơn tạo nên các đầu so le (hay đầu dính – cohesive ends). Các đầu so le tạo ra sau khi cắt có thể tự nối lại với nhau mà không cần sự có mặt của enzym nối DNA ligase.

Mỗi loại enzym giới hạn hoạt động tốt trong những điều kiện nhất định về nhiệt độ, độ pH và dung dịch đệm thích hợp. Tiến hành phản ứng của các enzym giới hạn cần thực hiện trong thể tích càng nhỏ càng tốt để enzym giới hạn tiếp xúc tốt với cơ chất (Khuất Hữu Thanh, 2003).

2.4 Nguyên tắc tạo kit tách chiết DNA và kit PCR

2.4.1 Kit là gì ?

Thuật ngữ kit dùng để chỉ việc cung cấp trọn gói các điều kiện cần thiết để thực hiện một công việc cụ thể, nhằm mang lại cho người sử dụng sự tiện lợi, nhanh chóng, hiệu quả khi tiến hành công việc. Trong sinh học phân tử, thuật ngữ kit dùng để chỉ việc cung cấp các hóa chất (đã tối ưu hóa về nồng độ và thể tích), công cụ thiết yếu để thực hiện một cách nhanh chóng, hiệu quả cho một kỹ thuật sinh học phân tử (kỹ thuật PCR, kỹ thuật tách chiết DNA, kỹ thuật tách chiết plasmid,...) (Gerard và Henegariu, 1997).

2.4.2 Nguyên tắc tạo kit

Nguyên tắc chung của việc tạo kit trong tách chiết DNA và PCR là giúp cho công việc tách chiết DNA và thiết lập phản ứng PCR được tiến hành nhanh chóng, tiện lợi, hiệu quả. Để đáp ứng được các tiêu chí trên nhà sản xuất kit phải tiến hành phối trộn các hóa chất (thể tích và nồng độ mỗi chất đã được tối ưu hóa) vào trong cùng một ống nghiệm (chai, lọ,...) hoặc một vài ống nghiệm. Mỗi ống nghiệm sẽ đóng vai trò cụ thể trong quá trình tiến hành công việc. Trong việc đóng gói bộ kit, số lượng ống nghiệm sẽ được hạn chế ở mức tối thiểu (có thể). Trên cơ sở các hóa chất đã được đóng gói người ta tiến hành thiết lập qui trình thực hiện tách chiết DNA và PCR, qui trình này phải phát huy được hiệu quả các hóa chất đã đóng gói và đáp ứng tiêu chí chung là giúp công việc được tiến hành nhanh chóng, hiệu quả và tiện lợi.

2.4.3 Kit tách chiết DNA

Tách chiết DNA là công việc mất khá nhiều thời gian, và sản phẩm của việc tách chiết DNA sẽ là vật liệu cho nhiều kỹ thuật sinh học phân tử trong đó có kỹ thuật PCR. Do đó, đây là công việc đóng vai trò hết sức quan trọng. Tạo kit trong tách chiết DNA một mặt tạo được DNA có chất lượng cao, mặt khác phải rút ngắn thời gian trong quá trình thực hiện.

Thông thường kit tách chiết DNA dựa trên 4 bước cơ bản trong quá trình tách chiết DNA là phân giải tế bào, loại bỏ protein, tủa DNA và tinh sạch DNA. Các nhà sản xuất kit sẽ phối trộn hóa chất để thực hiện các bước trên, tùy theo mỗi nhà sản xuất mà các hóa chất phối trộn với số lượng các tube khác nhau. DNA tạo ra từ kit phải được kiểm tra chất lượng về hàm lượng DNA, độ tinh sạch của DNA, tính nguyên vẹn của DNA (chiều dài DNA). Bên cạnh đó người ta phải đánh giá tính ổn định của bộ kit sau một thời gian bảo quản (Denhart và Doraiswamy, 2001).

2.4.4 Kit thực hiện phản ứng PCR

Trong việc thực hiện kỹ thuật PCR, các thành phần phản ứng được trộn với nhau (ngoại trừ DNA mẫu) thành dạng dung dịch mẹ (master mix), sau đó được phân chia vào từng eppendorf nhỏ để thực hiện phản ứng PCR sau khi đã thêm DNA mẫu. Mỗi eppendorf sẽ thực hiện một phản ứng PCR. Mục đích của việc pha master mix nhằm hạn chế sai sót trong thao tác dùng pipet, tránh ngoại nhiễm, giảm thất thoát hóa chất và tiết kiệm thời gian. Nhược điểm của phương pháp pha master mix này là sau khi pha xong phải thực hiện phản ứng PCR ngay, không thể bảo quản hay vận chuyển đi xa. Để khắc phục các nhược điểm trên và cải thiện hiệu quả khuếch đại của phản ứng PCR người ta tạo ra những bộ kit PCR.

Bộ kit PCR được thiết kế nhằm khuếch đại các mẫu DNA thông thường một cách nhanh chóng, thuận tiện và hiệu quả. Bộ kit PCR bao gồm hầu hết các thành phần cần thiết cho phản ứng PCR (ngoại trừ DNA mẫu) do đó sẽ giảm thời gian thiết lập phản ứng và các thao tác dùng pipet. Kit PCR có những đặc tính nổi bật là nhanh, nhạy, tiện lợi, ổn định và hiệu quả. Bởi vì một số nguyên nhân sau:

- Khi sử dụng kit người dùng chỉ mất thời gian dưới 1 phút để thiết lập một phản ứng PCR (Denhart và Doraiswamy, 2001).

- Kit PCR có thể khuếch đại với một lượng mẫu rất nhỏ, nhiều sản phẩm kit có thể khuếch đại với 2 bản copy của DNA mẫu (Denhart và Doraiswamy, 2001).

- Việc đóng gói master mix trong một eppendorf với các thành phần phản ứng đã tối ưu hóa về nồng độ nên rất tiện lợi. Người sử dụng chỉ việc thêm DNA mẫu, primer, và nước cất hai lần cho đủ thể tích là đã hoàn thành việc thiết lập phản ứng PCR.

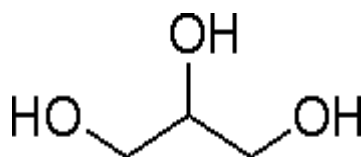
- Kit PCR có thể bảo quản trong thời gian dài (2 - 3 tháng) ở nhiệt độ 4°C mà vẫn ổn định. Chúng ta có thể vận chuyển đi xa và không cần phải rã đông trước khi thiết lập phản ứng PCR (Denhart và Doraiswamy, 2001).

- Trong thành phần của bộ kit, ngoài các hóa chất cơ bản trong phản ứng PCR còn có một số chất phụ gia giúp giảm việc khuếch đại các sản phẩm không chuyên biệt và giảm cấu trúc bậc hai của DNA. Do đó sẽ tăng hiệu quả khuếch đại (Denhart và Doraiswamy, 2001).

Ngoài ra, việc dùng kit PCR giúp giảm nguy cơ ngoại nhiễm và hạn chế các lỗi trong tính toán và trong thao tác dùng pipet.

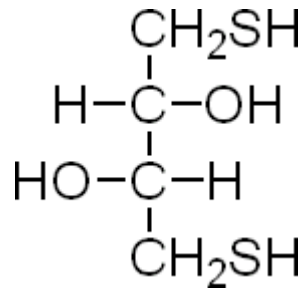
Trong các đặc tính của kit PCR, đặc tính nổi bật nhất là tính ổn định của bộ kit. Để có thể tạo được tính ổn định của bộ kit đặc biệt là sự ổn định của *Taq* polymerase, người ta thêm vào thành phần của kit một số chất ổn định như glycerol, tween-20, dithiothreitol (DTT) (Denhart và Doraiswamy, 2001).

Glycerol có công thức hóa học là $C_3H_8O_3$. Vai trò của glycerol trong kit PCR giúp tăng cường hiệu quả khuếch đại và tính chuyên biệt cho phản ứng PCR. Glycerol giúp giảm cấu trúc bậc hai của DNA và sự bắt cặp không chuyên biệt, mặt khác glycerol là chất ổn định *Taq*, bảo vệ *Taq* dưới tác động của nhiệt (Gerard và Henegariu, 1997).



Hình 2.4: Cấu tạo của glycerol

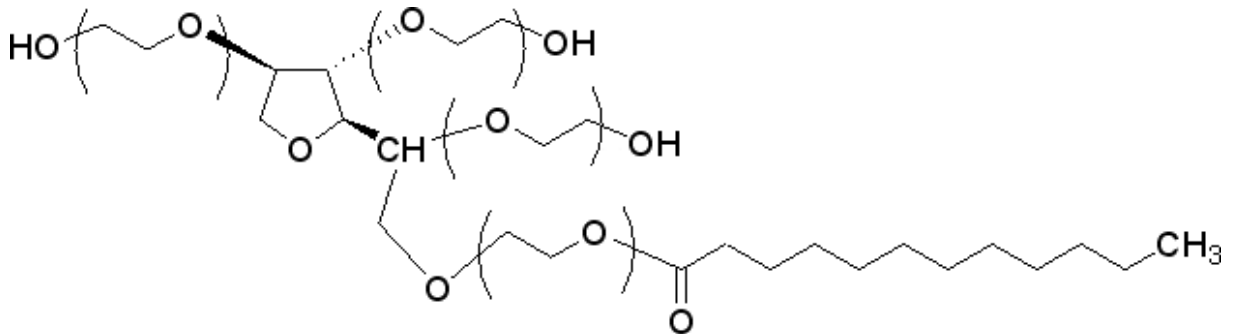
DTT có công thức hóa học là $C_4H_{10}O_2S_2$. DTT là một chất tan trong nước, được dùng như một chất chống oxy hóa, với vai trò giảm số lượng các cầu nối disulfide và duy trì các monothiol ở trạng thái khử. Ở nồng độ thấp DTT dùng để ổn định, chống sự oxy hóa protein có chứa nhóm sulfhydryl tự do, bảo vệ hoạt tính của enzym trong *in vitro* (Cleland, 1964). Trong phản ứng PCR, DTT được dùng như một chất để ổn định *Taq* (Gerard và Henegariu, 1997).



Hình 2.5: Cấu tạo của DTT

Tween-20 [polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate] là chất tẩy nhẹ. Trong sinh học, tween 20 dùng như là một chất làm tan protein màng, chất cản trong kỹ thuật Western blotting, phân giải tế bào ở nồng độ 0,05% - 5%...

Trong kỹ thuật PCR, tween 20 giúp ổn định *Taq* và giảm hình thành cấu trúc bậc hai của DNA (Gerard và Henegariu, 1997).



Hình 2.6: Cấu tạo của Tween 20

2.5 Tình hình sản xuất kit trên thế giới và Việt Nam

Trong những năm cuối thế kỷ 20, di truyền học và kỹ thuật gen phát triển nhanh chóng đạt những thành tựu to lớn về lý thuyết và thực tiễn. Một trong những mốc quan trọng của kỹ thuật sinh học phân tử diễn ra trong thời điểm này là việc đầu tiên tạo ra kit trong kỹ thuật tách chiết các kháng thể vào năm 1981. Sự kiện này đã mang lại triển vọng to lớn trong việc đưa các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm ra ứng dụng rộng rãi ngoài thực tiễn. Hiện nay, việc sản xuất kit sinh học trên thế giới đã và đang phát triển mạnh mẽ trong nhiều lĩnh vực của công nghệ sinh học. Hoạt động hiệu quả và qui mô trong công nghệ sản xuất kit sinh học chủ yếu tập trung vào các công ty tư nhân như Promega, Bio-Rad, Qiagen,... Các công ty này đã cho ra thị trường các sản phẩm kit đa dạng về kỹ thuật và đối tượng nghiên cứu như kit Elisa, kit tách chiết DNA, kit tách chiết plasmid, kit PCR,...

Ở Việt Nam, công nghệ sinh học là một lĩnh vực khá mới và non trẻ. Các hoạt động trong lĩnh vực này chủ yếu tập trung trong nghiên cứu chưa có nhiều ứng dụng trong thực tiễn. Do đó, đẩy mạnh sản xuất kit sinh học để đưa các thành tựu nghiên cứu trong phòng thí nghiệm vào ứng dụng thực tiễn hết sức cần thiết. Tuy vậy, trong việc sản xuất kit sinh học phân tử cũng đã có những thành công nhất định, chủ yếu tập trung trong lĩnh vực phát hiện bệnh trên tôm như các bộ kit phát hiện virus đốm trắng (WSSV), virus gây bệnh còi (MBV), virus gây bệnh viêm gan tụy (HPV) trên tôm do phòng vi sinh học phân tử - Viện Công Nghệ Sinh Học Việt Nam sản xuất. Các dẫn liệu ở Việt Nam cho thấy chưa có nghiên cứu nào về việc sản xuất kit phát hiện gen halothan trên heo.

PHẦN III. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH

Từ ngày 28-02-2006 đến ngày 28-07-2006 tại Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

3.2 NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

3.2.1 Tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA

- Giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào từ 1 giờ còn 30 phút.
- Giảm thời gian tủa DNA lần 1 từ 2 giờ còn 1 giờ.
- Không thực hiện giai đoạn tủa DNA lần 2.
- Thực hiện việc hòa tan DNA trong TE trong 2 giờ thay vì để qua đêm.

3.2.2 Tạo kit tách chiết DNA

- So sánh chất lượng của DNA tách chiết từ kit với DNA tách chiết từ qui trình của Lê Thị Thu Phương (2004) (qui trình I).
- Thử nghiệm tính ổn định của kit sau 2 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng bảo quản ở 4 °C.

3.2.3 Tạo kit PCR để phát hiện gen halothan trên heo

- Thiết lập thành phần bộ kit PCR và qui trình dùng bộ kit PCR để chẩn đoán gen halothan.

- Khảo sát nhiệt độ trữ bộ kit PCR halothan.
- Khảo sát thời gian sử dụng của bộ kit PCR halothan.
- Khảo sát độ nhạy của bộ kit PCR halothan.
- Khảo sát hiệu quả khuếch đại của bộ kit PCR halothan trên các nguồn mẫu DNA khác nhau.

3.3 VẬT LIỆU VÀ HÓA CHẤT

3.3.1 Nguồn mẫu chiết xuất DNA

Mẫu cơ vân, máu, da của heo và cơ vân của các giống bò ta Vàng, lai Sind, sữa Hà Lan được lấy từ lò mổ tập trung tại huyện Dĩ An - Bình Dương.

3.3.2 Các primer sử dụng

3.3.2.1 Đối với gen trên nhiễm sắc thể giới tính của bò

Sử dụng 2 cặp primer là RIV, UIV và BTANRP1 (BTA1), BTANRP2 (BTA2) (Alves và ctv, 2003; trích dẫn bởi Nguyễn Văn Út, 2005). Trong đó cặp primer RIV, UIV dùng khuếch đại đoạn DNA dài 655 bp trên cánh dài của NST Y. Cặp primer BTA1, BTA2 nhằm khuếch đại đoạn DNA dài 375 bp, đoạn DNA này nằm trong trình tự chuyên biệt cho gen thụ thể androgen liên kết NST X.

Bảng 3.1 Trình tự các đoạn primer cho gen giới tính (Alves và ctv, 2003)

Primer	Trình tự	DNA mục tiêu nằm trên
RIV	5' GTT TTA TTA TCC CAG CAA G 3'	NST Y
UIV	5' TAT TCC TTT GGG GAG CA 3'	NST Y
BTA1	5' CCA ACT TTC CCT TCT TTC CC 3'	NST X
BTA2	5' ATG GCC CAA AAG AAC ATT CA 3'	NST X

3.3.2.2 Đối với gen thụ thể estrogen trên heo

Dùng cặp primer để khuếch đại đoạn DNA dài 120 bp chuyên biệt cho gen thụ thể estrogen.

Bảng 3.2 Trình tự cặp primer của gen thụ thể estrogen (Short và ctv, 1997)

Primer	Trình tự
Primer xuôi	5' CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3'
Primer ngược	5' CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3'

3.3.2.3 Đối với gen halothan trên heo

Dùng cặp primer để khuếch đại đoạn DNA dài 586 bp chuyên biệt cho gen halothan.

Bảng 3.3 Trình tự cặp primer của gen halothan (Hughes và ctv, 1992)

Primer	Trình tự
Primer xuôi	5' CTT CCC ACC CTG GGT CTT 3'
Primer ngược	5' AGG CAG AGC CAT GGA GAC 3'

3.3.3 Hóa chất

3.3.3.1 Hóa chất dùng trong tách chiết DNA

Tris-HCl, NaCl, SDS, EDTA, proteinase K, sodium acetate, isoamyl alcohol, phenol, chloroform, ethanol, TE 1 X.

3.3.3.2 Hoá chất dùng trong điện di

Agarose, TBE 0,5 X (Tris borate EDTA, pH = 8,3), loading dye 6 X, ladder (10 bp, 100bp, 200bp), ethidium bromide.

3.3.3.3 Hóa chất dùng trong phản ứng PCR

Taq DNA polymerase: 5UI/μl (ABgene), dung dịch đệm 10X (ABgene), dNTP 25 mM (ABgene), MgCl₂ 25 mM (ABgene), cặp primer gen halothan, cặp primer gen thụ thể estrogen, primer gen trên NST giới tính, nước cất 2 lần (khử ion, hấp vô trùng, chiếu UV, pH 6,8 - 7).

3.3.3.4 Hóa chất dùng trong phản ứng cắt enzym giới hạn *HhaI*

Enzyme cắt giới hạn *HhaI*, BSA (Bovine Serum Albumin), buffer C, nước cất 2 lần (khử ion, vô trùng).

3.3.4 Thiết bị và dụng cụ

Tủ sấy (Jencons - PLS), water bath (Memmert), autoclave (Tommy), máy cất nước (khử ion) (Branstead), máy ly tâm (Mikro Z2K/ Sigma 3K30C), tủ trữ mẫu và

hóa chất (Reetech, Brandt, Sanyo), máy chụp gel (Biorad), máy luân nhiệt (Eppendorf) (version 2.11.32), bộ điện di (Biorad), máy đo OD (Hewlett Packard), micropipet, đầu tip, eppendorf, kéo, chày, kẹp....

3.4 PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.4.1 Lấy và bảo quản mẫu

Mẫu cơ vân, da: lấy khoảng 5g mẫu của thú vừa được giết mổ; chứa mẫu trong túi ni lông 5*10 cm; trữ mẫu trong thùng đá, mang về phòng thí nghiệm; trữ ở -70°C .

Mẫu máu: lấy 4 ml máu lúc giết mổ thú, máu được cho vào ống nghiệm vô trùng chứa sẵn 4 mg Na_2EDTA ; trữ mẫu trong thùng đá, mang về phòng thí nghiệm; trữ ở -70°C .

3.4.2 Thiết lập bộ kit tách chiết DNA

3.4.2.1 Tách chiết DNA từ cơ vân (Lê Thị Thu Phương, 2004) (qui trình I)

– Đồng nhất mẫu

Cho khoảng 0,1 g cơ vân vào eppendorf 1,5 ml. Dùng chày nghiền nhuyễn mẫu.

– Phân giải tế bào

Cho vào 60 μl dung dịch đệm tách chiết (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1mM EDTA và 1% SDS, PH= 8) và 3 μl proteinase K (20 mg/ml). Ủ hỗn hợp ở 55°C trong 1 giờ.

– Tủa protein

Cho vào 375 μl sodium acetate 0,2 M; vortex trong 10 giây. Cho vào 200 μl hỗn hợp phenol / chloroform / isomyl alcohol (25:24:1); vortex nhẹ; ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C .

– Tủa DNA lần 1

Lấy phần nước nổi bên trên chuyển vào tube 1,5 ml mới, sau đó cho thêm 1ml ethanol tuyệt đối lạnh; trộn đều; ủ -20°C trong 2 giờ.

Ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C ; lấy cạn làm ráo.

– Tủa DNA lần 2

Cho vào 180 μl TE 1X, vortex , ủ ở 55°C trong 15 phút.

Cho vào 20 μl sodium acetate 2M, trộn đều; tiếp tục cho vào 500 μl ethanol tuyệt đối lạnh; trộn đều; ủ ở -20°C trong 15 phút. Ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C , bỏ phần nổi lấy cạn.

– Rửa DNA

Rửa cặn bằng 1ml ethanol 70%, ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C, lấy cặn.

Làm khô cặn trong tủ ẩm ở 55°C, quan sát mức độ khô của cặn.

– Hòa tan DNA

Hòa tan cặn bằng 200 µl TE 1X; ủ 55°C qua đêm; vortex nhẹ cho tan cặn .

Sản phẩm DNA sau khi tách chiết được trữ ở -20°C hoặc sử dụng ngay. DNA được kiểm tra độ tinh sạch bằng cách đo mật độ quang (OD: optical density) ở bước sóng 260 nm và 280 nm bằng quang phổ kế (model HP 8453). Hàm lượng DNA được ước lượng theo công thức DNA (ng/µl) = $[62,9 \cdot OD_{260nm} - 36 \cdot OD_{280nm}] \cdot (\text{độ pha loãng})$. Mẫu được pha loãng 10 lần theo tỷ lệ 10 µl DNA gốc với 90 µl H₂O cất khi đo OD.

Ký hiệu qui trình tách chiết DNA trên là qui trình I. Dựa theo qui trình I này chúng tôi tiến hành công đoạn tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA và sản xuất thử bộ kit tách chiết DNA.

3.4.2.2 Phương pháp tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA

Tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Mỗi yếu tố thí nghiệm được tiến hành trên 5 mẫu cơ vân bò. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được. So sánh các chỉ tiêu trong mỗi thí nghiệm với kết quả thu được từ phương pháp tách chiết DNA theo qui trình I (trang 20).

❖ Thí nghiệm 1: Giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào

Thực hiện theo qui trình I nhưng thời gian ủ mẫu giảm từ 1 giờ còn 30 phút và sau 10 phút ủ, vortex mẫu 14000 vòng / phút trong 1 phút (qui trình II).

❖ Thí nghiệm 2: Giảm thời gian rửa DNA lần 1

Tiến hành qui trình tách chiết I nhưng thời gian rửa DNA trong ethanol tuyệt đối ở -20°C giảm từ 2 giờ còn 1 giờ (qui trình III). Do sợi cơ vân có nhiều nhân cho nên lượng DNA tách chiết từ cơ khá nhiều. Vì vậy, chúng tôi thử nghiệm giảm thời gian rửa DNA trong ethanol tuyệt đối.

❖ Thí nghiệm 3: Không thực hiện giai đoạn rửa DNA lần 2

Tiến hành theo qui trình I nhưng không thực hiện giai đoạn rửa DNA lần 2 (qui trình IV).

❖ **Thí nghiệm 4: Giảm thời gian hòa tan DNA trong TE**

Tiến hành như qui trình I nhưng hòa tan DNA trong TE ở 55°C trong 2 giờ (qui trình V) thay vì để qua đêm.

Bảng 3.4 Những yếu tố thay đổi để tối ưu hóa qui trình tách chiết DNA từ cơ

Qui trình Giai đoạn	I	II (TN1)	III (TN2)	IV (TN3)	V (TN4)
Phân giải tế bào và protein	Ủ hỗn hợp ở 55°C trong 1 giờ	Ủ hỗn hợp 55°C trong 30 phút, sau 10 phút ủ, vortex 14000 vòng / phút trong 1 phút	Như qui trình I	Như qui trình I	Như qui trình I

Tủa DNA lần 1	Thu dịch nổi vào tube mới, thêm 1 ml ethanol 100%, ủ - 20°C trong 2 giờ, ly tâm, lấy cặn làm ráo	Như qui trình I	Như qui trình I nhưng giảm thời gian ủ ethanol 100% 1 giờ	Như qui trình I	Như qui trình I
Tủa DNA lần 2	Cho 180 µl TE 1X vortex, ủ 55°C / 15 phút, thêm 20 µl sodium acetate 2M và 500 µl ethanol 100 %, ủ -20°C /15 phút, ly tâm, lấy cặn	Như qui trình I	Như qui trình I	Không thực hiện giai đoạn này	Như qui trình I
Hòa tan DNA	Hòa tan cặn bằng 200 µl TE 1X, ủ 55°C trong tủ ấm, qua đêm	Như qui trình I	Như qui trình I	Như qui trình I	Như qui trình I nhưng thời gian ủ 55°C là 2 giờ

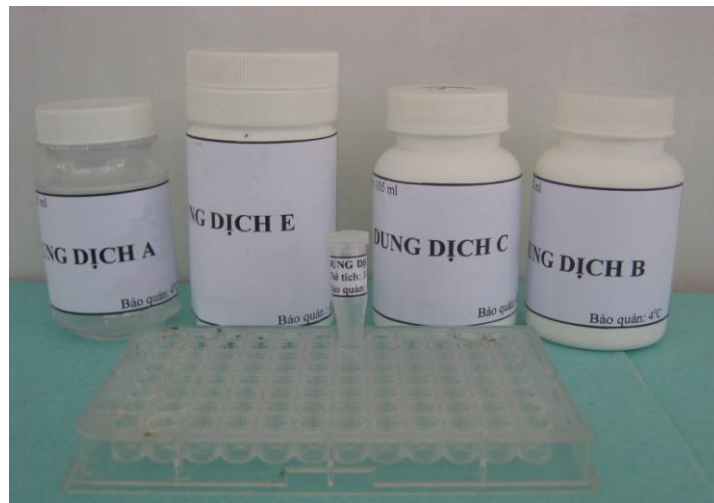
3.4.2.3 Xây dựng bộ kit tách chiết DNA

Thực hiện việc phối trộn hóa chất tách chiết DNA thành 5 dung dịch chính là dung dịch A, dung dịch B, dung dịch C, dung dịch D và dung dịch E. Hóa chất trong bộ kit đủ tách chiết DNA cho 100 mẫu. Thành phần hóa chất trong mỗi dung dịch mô tả như ở bảng 3.5.

Bảng 3.5 Thành phần hóa chất trong bộ kit tách chiết DNA

Dung dịch	Thành phần	Thể tích	Điều kiện bảo quản
-----------	------------	----------	--------------------

A	50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS (pH=8)	6,2 ml	Bảo quản ở 4°C
B	Phenol, chloroform, isoamyl alcohol theo tỷ lệ tương ứng 25:24:1	25 ml	Bảo quản ở 4°C
C	Natri acetate 0,075 M và ethanol 100%	105 ml	Bảo quản ở 4°C
D	Proteinase K	310 µl	Bảo quản ở 4°C
E	10 mM Tris-HCl và 1mM Na ₂ EDTA (pH=8)	200 ml	Bảo quản ở 4°C



Hình 3.1 Bộ kit tách chiết DNA

❖ **Thí nghiệm 5: So sánh hiệu quả tách chiết DNA từ cơ vân theo qui trình của bộ kit và qui trình I**

Dựa trên các qui trình tách chiết DNA đã tối ưu hóa, tiến hành thử nghiệm qui trình tách chiết DNA theo các hóa chất đã phối trộn của bộ kit.

Qui trình tách chiết DNA theo bộ kit:

1. Cho khoảng 0,1 g cơ vân vào eppendorf 1,5 ml. Dùng chày nghiền nhuyễn mẫu.

2. Cho vào 60 μ l dung dịch A và 3 μ l dung dịch D. Ủ hỗn hợp ở 55°C trong 30 phút, sau 10 phút ủ đem vortex 14000 vòng / phút trong 1 phút.
3. Cho vào 375 μ l nước cất vô trùng; vortex 14000 vòng / phút trong 30 giây. Cho vào 200 μ l dung dịch B; vortex 14000 vòng / phút trong 1 phút; ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C.
4. Lấy phần nước nổi bên trên chuyển vào tube 1,5 ml mới, sau đó cho thêm 1ml dung dịch C; trộn đều ; ủ -20°C trong 1 giờ.
5. Ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C; lấy cạn làm ráo.
6. Rửa cạn bằng 1ml ethanol 70%, ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C, lấy cạn.
7. Làm khô cạn trong tủ ẩm ở 55°C, quan sát mức độ khô của cạn.
8. Hòa tan cạn bằng 200 μ l dung dịch E; ủ 55°C trong 2 giờ.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Chỉ tiêu theo dõi là trị số OD, hàm lượng DNA (10 mẫu cơ bò) và hiệu quả phản ứng PCR trên gen xác định giới tính ở bò (10 mẫu), gen thụ thể estrogen ở heo (5 mẫu).

❖ **Thí nghiệm 6: Thử nghiệm tính ổn định của bộ kit tách chiết DNA**

Tiến hành thử nghiệm hiệu quả tách chiết DNA của bộ kit sau 2 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng bảo quản ở 4°C. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Số mẫu thí nghiệm cho mỗi thời gian bảo quản là 5 mẫu cơ bò. Chỉ tiêu theo dõi là trị số OD và hàm lượng DNA.

3.4.2.4 Hiệu quả của bộ kit tách chiết DNA đối với mô máu và da

Trong quá trình thiết lập bộ kit tách chiết DNA, chúng tôi sử dụng cơ vân là nguồn mẫu tách chiết DNA. Để nâng cao tính ứng dụng của bộ kit, chúng tôi sử dụng bộ kit tách chiết DNA sau 3 tháng bảo quản ở 4°C để tách chiết DNA từ mô máu và da. Hiệu quả tách chiết DNA được kiểm tra qua phản ứng PCR sử dụng bộ kit PCR halothan.

Đối với mô máu, trong hồng cầu có chứa lượng lớn hemoglobin, nguồn DNA chỉ có ở tế bào bạch cầu. Theo Erlich (1989), nhân hem trong hemoglobin là chất ức chế mạnh đến hoạt động của *Taq* polymerase (trích dẫn bởi Lê Thị Thu Phương, 2004). Do đó, công đoạn đầu tiên trong quá trình tách chiết DNA từ máu là loại bỏ hemoglobin và thu nhận tế bào bạch cầu. Dựa theo qui trình tách chiết DNA từ máu

(theo dẫn liệu của Lê Thị Thu Phương, 2004) và qui trình tách chiết DNA theo bộ kit, chúng tôi xây dựng qui trình tách chiết DNA từ mô máu sử dụng bộ kit.

1. Rã đông hoàn toàn mẫu máu, lấy 500 μ l máu vào eppendorf 1,5 ml sau đó cho thêm 400 μ l dung dịch E; trộn đều; ly tâm 12000 vòng / phút trong 1 phút, ở 10°C; lấy cạn.
2. Cho vào 500 μ l dung dịch E; vortex cho tan cạn; ly tâm 12000 vòng / phút trong 1 phút ở 10°C; lấy cạn.
3. Lặp lại bước 2 đến khi phần cạn trở nên trắng.
4. Cho thêm 60 μ l dung dịch A và 3 μ l dung dịch D. Ủ hỗn hợp ở 55°C trong 30 phút, sau 10 phút ủ đem vortex 14000 vòng / phút trong 1 phút.
5. Cho vào 200 μ l nước cất vô trùng; vortex 14000 vòng / phút trong 30 giây. Thêm 60 μ l dung dịch B; vortex 14000 vòng / phút trong 1 phút; ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C.
6. Lấy phần nước nổi bên trên chuyển vào tube 1,5 ml mới, sau đó thêm 500 μ l dung dịch C; trộn đều ; ủ -20°C trong 1 giờ.
7. Ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C; lấy cạn làm ráo.
8. Rửa cạn bằng 500 μ l ethanol 70%, ly tâm 12000 vòng / phút trong 2 phút ở 10°C, lấy cạn (vừa khô).
9. Làm khô cạn trong tủ ẩm ở 55°C, quan sát mức độ khô của cạn (vừa khô).
10. Hòa tan cạn bằng 100 μ l dung dịch E; ủ 55°C trong 2 giờ.

Đối với mẫu da, tiến hành ly trích DNA theo qui trình của bộ kit tách chiết DNA.

3.4.2.5 Thực hiện phản ứng PCR

Thực hiện kỹ thuật PCR xác định gen giới tính và gen thụ thể estrogen trên mẫu DNA đã tách chiết theo bộ kit nhằm đánh giá chất lượng DNA tách chiết từ bộ kit. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố, tiến hành PCR xác định gen giới tính trên 10 mẫu DNA tách chiết từ cơ bò và kỹ thuật PCR xác định gen thụ thể estrogen trên 5 mẫu DNA tách chiết từ cơ heo.

➤ Kỹ thuật PCR xác định gen giới tính trên bò (Nguyễn Văn Út, 2005)

Áp dụng kỹ thuật multiplex PCR với 2 cặp primer là RIV, UIV và BTANRP1 (BTA1), BTANRP2 (BTA2) (trang 17).

Bảng 3.6 Thành phần hoá chất PCR

Bảng 3.7 Qui trình phản ứng PCR

Tên hoá chất	Nồng độ cuối
PCR buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
RIV / UIV	0,5 µM
BTA1 / BTA2	0,4 µM
dNTP	200 µM / mỗi loại
<i>Taq</i>	1,5 UI
DNA	5 ng/µl
H ₂ O cất	vừa đủ 30 µl

Giai đoạn	Chu trình nhiệt	
Tiền biến tính	94°C	5 phút
Lặp lại 35 chu kỳ		
- Biến tính	94°C	1 phút
- Ủ bắt cặp	55°C	1 phút
- Kéo dài	72°C	1 phút
Kéo dài cuối cùng	72°C	7 phút
Trữ	4°C	

❖ **Kỹ thuật PCR xác định gen thụ thể estrogen trên heo (Lê Thị Thu Phương, 2004)**

Theo Rothschild và ctv (1994), gen thụ thể estrogen ảnh hưởng quan trọng đến sự thụ thai. Gen thụ thể estrogen có 2 alen (A và B) nằm trên nhiễm sắc thể số 1, hình thành 3 kiểu gen AA, AB, BB. Trong đó kiểu gen BB làm tăng số con đẻ ra còn sống trên ổ.

Dùng kỹ thuật PCR để khuếch đại đoạn DNA chuyên biệt dài 120 bp nằm trên gen thụ thể estrogen.

Bảng 3.8 Thành phần hoá chất PCR

Tên hoá chất	Nồng độ cuối
PCR buffer	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
Primer xuôi	0,2 µM

Bảng 3.9 Qui trình phản ứng PCR

Primer ngược	0,2 μ M
dNTP	100 μ M / mỗi loại
<i>Taq</i>	0,5 UI
DNA	< 250 ng
Nước cất	vừa đủ 13,6 μ l

Giai đoạn	Chu trình nhiệt	
Tiền biến tính	94°C	4 phút
Lặp lại 35 chu kỳ		
- Biến tính	94°C	1 phút
- Ủ bắt cặp	55°C	1 phút
- Kéo dài	72°C	1,5 phút
Kéo dài cuối cùng	72°C	8 phút
Trữ	4°C	

3.4.3 Thiết lập bộ kit PCR phát hiện gen halothan trên heo

3.4.3.1 Thiết lập thành phần bộ kit PCR và qui trình dùng bộ kit PCR

Dựa theo thành phần hóa chất thực hiện phản ứng PCR phát hiện gen halothan của Lê Thị Thu Phương (2004), chúng tôi tiến hành thiết lập bộ kit PCR để phát hiện gen halothan cho 10 mẫu. Bộ kit PCR gồm các thành phần: tube Master Mix 2X (150 μ l) cho 10 phản ứng PCR, primer xuôi (15 pmol / μ l), primer ngược (15 pmol / μ l) và DNA chuẩn (kiểu gen Nn).

Master Mix 2X bao gồm tất cả các thành phần cần thiết cho phản ứng PCR phát hiện gen halothan (ngoại trừ primer và DNA mẫu) ở nồng độ 2X. Ngoài ra, trong thành phần master mix còn có các chất để ổn định *Taq* như glycerol, DTT, tween 20.



Hình 3.2 Bộ kit PCR halothan

Bảng 3.10 Thành phần hóa chất PCR
(Lê Thị Thu Phương, 2004)

Bảng 3.11 Thành phần hóa chất PCR
Master Mix 2X

Tên hoá chất	Nồng độ cuối
PCR buffer	1 X
MgCl ₂	2 mM
Primer xuôi	0,5 µM
Primer ngược	0,5 µM
dNTP	200 µM / mỗi loại
<i>Taq</i>	1 UI
DNA	< 250 ng
Nước cất	vừa đủ 30 µl

Tên hoá chất	Nồng độ cuối
PCR buffer	2 X
MgCl ₂	4 mM
dNTP	400 µM / mỗi loại
<i>Taq</i>	1 UI
Tween 20	0,45%
DTT	1 mM
Nước không có nuclease	vừa đủ 150 µl
Glycerol	

Bảng 3.12 Hỗn hợp thực hiện 1 phản ứng PCR với bộ kit

Thành phần	Thể tích	Nồng độ cuối
Master mix 2X	15 µl	1 X
Primer xuôi	1 µl	0,5 µM
Primer ngược	1 µl	0,5 µM
DNA mẫu (<250 ng)	Tùy phản ứng	Tùy phản ứng
Nước cất 2 lần, vô trùng	Vừa đủ 30 µl	Vừa đủ 30 µl

❖ **Thí nghiệm 7: Khảo sát nồng độ glycerol trong 2X PCR Master Mix**

Để duy trì hoạt tính của *Taq* polymerase, một số nhà sản xuất dùng glycerol với nồng độ cao để trữ *Taq* trong buffer trữ. Tương tự, để tăng khả năng bảo quản của bộ kit chúng tôi cũng sử dụng glycerol trong thành phần của Master Mix 2X. Hai nồng độ glycerol 10% và 20% được khảo sát trong thí nghiệm này nhằm tìm ra nồng độ glycerol bảo quản tối ưu cho bộ kit PCR.

Tiến hành pha Master Mix 2X ở hai nồng độ glycerol 10% và 20%, bảo quản ở 4°C. Thực hiện phản ứng PCR với Master Mix 2X sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần bảo quản. Chúng tôi chọn nhiệt độ 4°C để bảo quản vì đa số các master mix trên thị trường đều có thể bảo quản trong khoảng nhiệt độ 2°C – 8°C.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu bình phương Latin (LSD) với hai yếu tố khảo sát là nồng độ glycerol và thời gian bảo quản. Số mẫu thí nghiệm cho mỗi thời gian bảo quản ở mỗi nồng độ glycerol là 5 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu quả của phản ứng PCR với DNA tách chiết từ cơ heo.

3.4.3.2 Khảo sát một số đặc tính của bộ kit PCR halothan

❖ Thí nghiệm 8: Khảo sát nhiệt độ bảo quản bộ kit PCR halothan

Sau khi đã xác định được nồng độ glycerol tối ưu trong Master Mix 2X, chúng tôi tiến hành pha Master Mix 2X với nồng độ glycerol đã xác định và bảo quản ở 10°C (nhiệt độ được xác định bằng nhiệt kế tại nơi bảo quản) trong 1 tháng.

Thực hiện 5 phản ứng PCR với Master Mix 2X sau mỗi tuần bảo quản để đánh giá hiệu quả của bộ kit PCR bảo quản ở 10°C. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu quả của phản ứng PCR với DNA tách chiết từ cơ heo.

❖ Thí nghiệm 9: Khảo sát độ nhạy của bộ kit PCR halothan

Dùng bộ kit PCR (đã tối ưu hóa) để thực hiện phản ứng với các nồng độ DNA mẫu 50 ng, 20 ng, 10 ng, 1 ng cho mỗi phản ứng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Ở mỗi nồng độ DNA mẫu thực hiện 5 phản ứng PCR. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu quả của phản ứng PCR.

❖ Thí nghiệm 10: Khảo sát hiệu quả bộ kit PCR halothan với DNA tách chiết từ mô máu và da

Một trong những mục tiêu hàng đầu của bộ kit PCR halothan là phục vụ cho công tác chọn giống trong ngành chăn nuôi. Do vậy chúng ta không thể giết thú để lấy mẫu cơ trong việc phát hiện gen halothan. Từ yêu cầu thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu quả của bộ kit PCR halothan với DNA tách chiết từ máu và da. Việc tách chiết DNA được thực hiện với bộ kit tách chiết DNA sau 3 tháng bảo quản ở 4°C.

Sử dụng bộ kit PCR halothan bảo quản 1 tuần ở 4°C để thực hiện phản ứng với 10 mẫu DNA tách chiết từ máu và 5 mẫu DNA tách chiết từ da. Kết quả này được so sánh với kết quả dùng bộ kit PCR halothan để khuếch đại DNA từ cơ. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu quả của phản ứng PCR.

3.4.4 Cắt enzym giới hạn

Hỗn hợp cắt sản phẩm PCR đối với gen halothan gồm: 10 µl sản phẩm PCR; 0,3 µl HhaI (10UI / µl); 0,2 µl BSA (10 µg / µl); 2 µl buffer C; 7,5 µl nước cất hai lần vô trùng.

Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 3 giờ.

3.4.5 Điện di và quan sát kết quả

3.4.5.1 Chuẩn bị gel agarose 1,5% và 2%

- Cân 0,225 g agarose (đối với gel agarose 1,5%) hoặc 0,3 g agarose (đối với gel 2%) hoà tan trong 15 ml TBE 0,5 X, lắc nhẹ cho agarose phân tán đều.

- Đun agarose trong lò vi ba ở 650 w, 2 phút (đối với multi agarose) hoặc 350 W, 4 phút (đối với midi agarose).

- Để gel nguội đến khoảng 50°C; đổ vào khuôn có gắn lược.

- Chờ gel đông, rút lược ra.

Nồng độ agarose dùng cho điện di sản phẩm PCR gen giới tính là 1,5%; nồng độ agarose dùng cho điện di gen halothan và gen thụ thể estrogen là 2%.

Loại agarose dùng để điện di sản phẩm PCR của gen giới tính, gen thụ thể estrogen và gen halothan là multi agarose. Loại agarose dùng điện di sản phẩm cắt enzym giới hạn *HhaI* của gen halothan là midi agarose.

3.4.5.2 Điện di và đọc kết quả

- Dùng 7,5 µl sản phẩm PCR trộn với 1,5 µl loading dye 6 X.

- Đối với sản phẩm PCR gen halothan và gen giới tính thì điện di gel 30 phút trong TBE 0,5 X với dòng điện 100 V, 250 mA. Đối với sản phẩm enzym cắt giới hạn *HhaI* thì điện di gel 50 phút trong TBE 0,5 X với dòng điện 50 V, 250 mA.

- Vớt gel ra khỏi buồng điện di; cho vào thùng nhuộm ethidium bromide 0,1% trong 30 phút.

- Đặt gel lên bàn chụp UV, quan sát kết quả.

3.5 XỬ LÝ SỐ LIỆU

Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học với trắc nghiệm chi-square hoặc trắc nghiệm F trên phần mềm Statgraphics 7.0.

PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

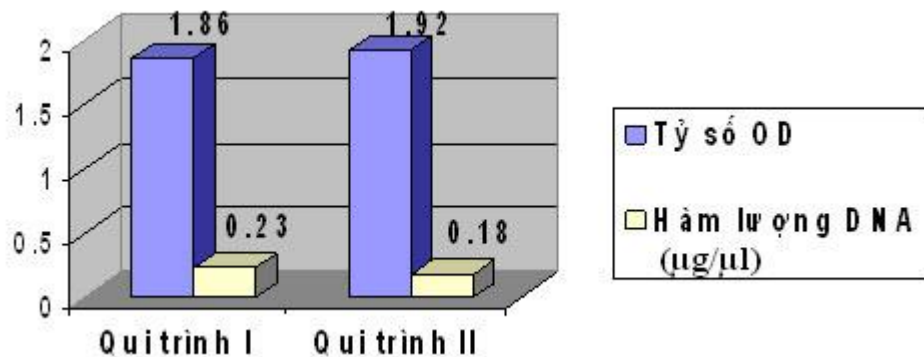
4.1 KẾT QUẢ TỐI ƯU HÓA QUI TRÌNH LY TRÍCH DNA

4.1.1 Giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào

DNA từ cơ bò được tách chiết theo qui trình I và II, kết quả đo OD được trình bày ở bảng 4.1.

Bảng 4.1 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình tách chiết I và II

Chỉ tiêu	Qui trình I ($\bar{X} \pm SD$)	Qui trình II ($\bar{X} \pm SD$)	Sai biệt thống kê
Tỷ số OD	1,86 ± 0,02	1,92 ± 0,03	P = 0,06
Hàm lượng DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,23 ± 0,03	0,18 ± 0,02	P = 0,19
Số mẫu	5	5	



Biểu đồ 4.1 DNA tách chiết theo qui trình I và II

Kết quả ở bảng 4.1 cho thấy độ tinh sạch và hàm lượng của DNA thu được từ hai qui trình ly trích I và II khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Khác nhau giữa hai qui trình là thay đổi thời gian ở giai đoạn ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào. Đối với qui trình II, thời gian thực hiện giai đoạn này ngắn hơn nhưng có kết hợp vortex mẫu trong quá trình ủ cho nên sự tiếp xúc giữa mẫu và dung dịch phân giải tốt hơn so với qui trình I. Chính điều này làm cho yếu tố thời gian không ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả phân giải tế bào của qui trình II.

Tỷ số OD qui trình I và II khoảng 1,8 – 2. Như vậy, DNA ly trích theo qui trình I và II có độ tinh sạch đạt yêu cầu. Tuy nhiên, so với qui trình I, thời gian thực hiện

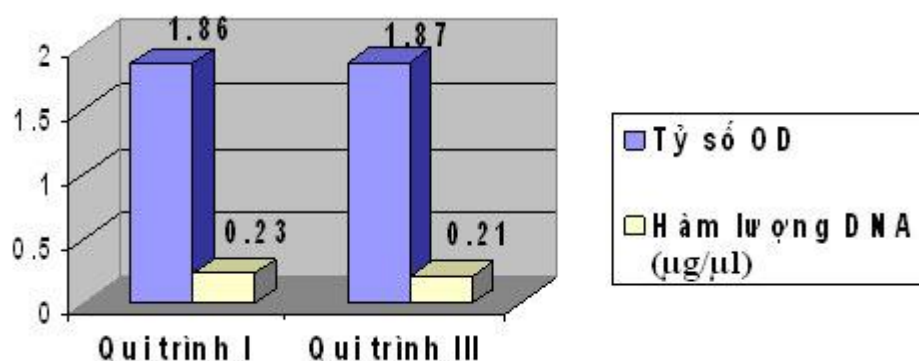
của qui trình II ngắn hơn nên chúng tôi quyết định giảm thời gian ủ mẫu trong dung dịch phân giải tế bào.

4.1.2 Giảm thời gian ủ DNA lần I

DNA từ cơ bò được tách chiết theo qui trình I và III, kết quả đo OD được trình bày ở bảng 4.2.

Bảng 4.2 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình tách chiết I và III

Chỉ tiêu	Qui trình I ($\bar{X} \pm SD$)	Qui trình III ($\bar{X} \pm SD$)	Sai biệt thống kê
Tỷ số OD	1,86 \pm 0,02	1,87 \pm 0,03	P = 0,79
Hàm lượng DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,23 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	P = 0,54
Số mẫu	5	5	



Biểu đồ 4.2 DNA tách chiết theo qui trình I và III

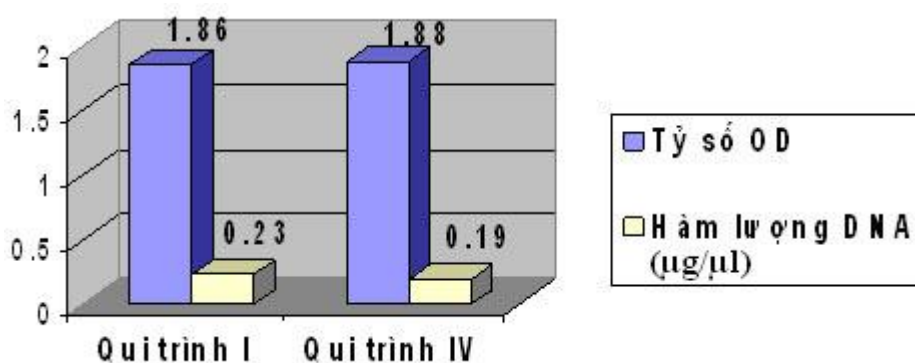
Theo kết quả ở bảng 4.2, độ tinh sạch và hàm lượng DNA thu được từ hai qui trình tách chiết I và III khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Điểm khác biệt giữa qui trình I và qui trình III là thời gian ủ DNA lần 1 trong 1 giờ thay vì 2 giờ. Độ tinh sạch DNA trong hai qui trình ly trích đều nằm trong khoảng 1,8 – 2. Từ kết quả trên chúng tôi quyết định giảm thời gian ủ DNA lần 1.

4.1.3 Không thực hiện giai đoạn ủ DNA lần 2

DNA từ cơ bò được tách chiết theo qui trình I và IV, kết quả đo OD được trình bày ở bảng 4.3.

Bảng 4.3 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và IV

Chỉ tiêu	Qui trình I ($\bar{X} \pm SD$)	Qui trình IV ($\bar{X} \pm SD$)	Sai biệt thống kê
Tỷ số OD	1,86 ± 0,02	1,88 ± 0,04	P = 0,65
Hàm lượng DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,04	P = 0,42
Số mẫu	5	5	

**Biểu đồ 4.3 DNA tách chiết theo qui trình I và IV**

Qua kết quả ở bảng 4.3, DNA ly trích từ cơ theo hai qui trình I và IV có độ tinh sạch và hàm lượng DNA khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Tỷ số OD của DNA tách chiết từ hai qui trình khoảng 1,8 – 2. Như vậy, độ tinh sạch của DNA thu được từ hai qui trình đạt yêu cầu. Chúng tôi thực hiện qui trình IV như qui trình I nhưng không có giai đoạn tủa DNA lần 2. Mục đích của giai đoạn này là làm tinh sạch DNA. Do đây là phương pháp tách chiết DNA có sử dụng phenol, proteinase K nên rất hiệu quả trong việc loại bỏ protein trong DNA tách chiết. Vì thế, việc thực hiện giai đoạn này là không cần thiết.

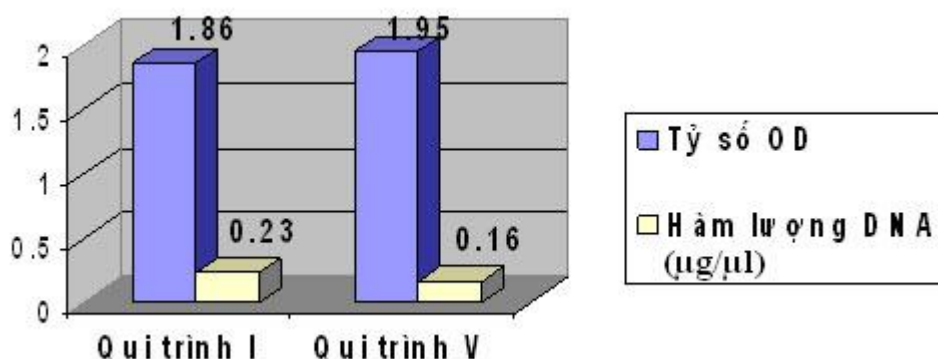
4.1.4 Giảm thời gian hòa tan DNA trong TE

DNA từ cơ bò được tách chiết theo qui trình I và V, kết quả đo OD được trình bày ở bảng 4.4.

Bảng 4.4 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và V

Chỉ tiêu	Qui trình I ($\bar{X} \pm SD$)	Qui trình V ($\bar{X} \pm SD$)	Sai biệt thống kê
----------	----------------------------------	----------------------------------	-------------------

Tỷ số OD	$1,86 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,01$	$P = 0,006$
Hàm lượng DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$0,23 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,03$	$P = 0,1$
Số mẫu	5	5	



Biểu đồ 4.4 DNA tách chiết theo quy trình I và V

Kết quả ở bảng 4.4 cho thấy độ tinh sạch của DNA thu được từ hai quy trình ly trích I và V khác nhau một cách rất có ý nghĩa ($p < 0,01$). Hàm lượng DNA thu được từ hai quy trình ly trích khác nhau không ý nghĩa ($p > 0,05$). Độ tinh sạch của DNA ly trích theo hai quy trình đều đạt yêu cầu. Hai quy trình này chỉ khác nhau về thời gian hòa tan DNA trong TE. Đối với quy trình V, thời gian thực hiện giai đoạn này là 2 giờ còn ở quy trình I giai đoạn này thực hiện qua đêm.

Như vậy, quá trình tách chiết DNA theo quy trình V có tỷ số OD trung bình 1,95 sạch hơn so với DNA tách chiết theo quy trình I một cách có ý nghĩa. Ở quy trình I, giai đoạn hòa tan DNA được thực hiện qua đêm cho nên lượng DNA tan hoàn toàn nhưng cũng kéo theo sự hòa tan một số tạp chất có trong cặn DNA cho nên làm giảm độ tinh sạch của DNA. Ngược lại, giai đoạn hòa tan DNA ở quy trình V được thực hiện trong thời gian ngắn nên hạn chế sự hòa tan tạp chất nhưng lại làm giảm hàm lượng DNA hòa tan. Do đó, hàm lượng DNA tách chiết theo quy trình V thấp hơn so với hàm lượng DNA tách chiết theo quy trình I. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Qua kết quả thu được ở bảng 4.4, chúng tôi quyết định giảm thời gian hòa tan DNA trong TE.

4.2 KẾT QUẢ THIẾT LẬP BỘ KIT TÁCH CHIẾT DNA

4.2.1 So sánh hiệu quả tách chiết DNA theo quy trình của bộ kit và quy trình I

DNA được tách chiết theo qui trình của bộ kit và qui trình I, kết quả đo OD được trình bày ở bảng 4.5.

Bảng 4.5 Tỷ số OD và hàm lượng DNA thu được theo qui trình I và bộ kit

Chỉ tiêu	Qui trình I ($\bar{X} \pm SD$)	Qui trình theo bộ kit ($\bar{X} \pm SD$)	Sai biệt thống kê
Tỷ số OD	$1,86 \pm 0,02$	$1,85 \pm 0,01$	$P = 0,51$
Hàm lượng DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$0,23 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$	$P = 0,56$
Số mẫu	5	10	



Biểu đồ 4.5 DNA tách chiết theo qui trình I và qui trình bộ kit

Kết quả bảng 4.5 cho thấy độ tinh sạch và hàm lượng DNA tách chiết theo qui trình I và qui trình của bộ kit khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Bộ kit tách chiết DNA từ cơ được thiết lập từ các qui trình II, III, IV, V. Các qui trình này khác nhau về độ tinh sạch và hàm lượng DNA so với qui trình I một cách không có ý nghĩa, thậm chí độ tinh sạch cao hơn qui trình I. Cho nên khi thiết kế bộ kit tách chiết DNA từ các qui trình này đã mang lại hiệu quả tách chiết không kém với qui trình I.

Chất lượng DNA tách chiết từ bộ kit chỉ được đánh giá bằng tỷ số OD thì chưa đủ cơ sở để kết luận mẫu DNA đảm bảo yêu cầu cho các ứng dụng của kỹ thuật sinh học phân tử. Do vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu quả phản ứng PCR với nguồn DNA tách chiết từ bộ kit.

4.2.1.1 Kết quả thực hiện phản ứng PCR

Thực hiện phản ứng PCR với primer của gen giới tính và gen thụ thể estrogen với nguồn DNA mẫu từ hai qui trình tách chiết DNA, kết quả được trình bày ở bảng 4.6 và 4.7.

Bảng 4.6 Tỷ lệ thành công khi PCR với primer của gen giới tính

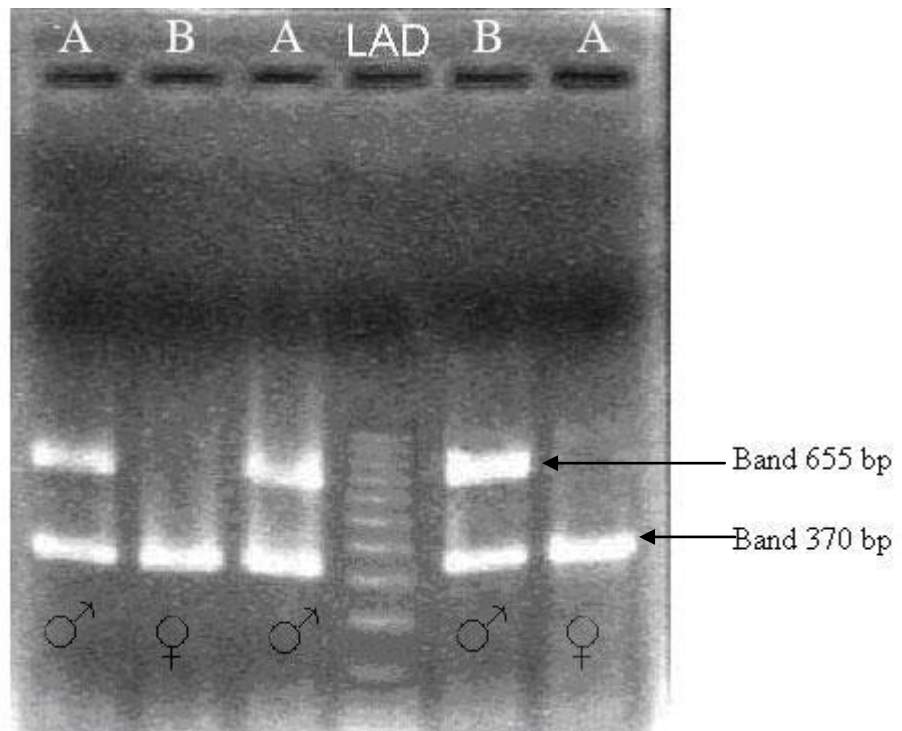
Qui trình tách chiết DNA	Số mẫu thực hiện	Số mẫu thành công	Tỷ lệ thành công (%)
I	10	10	100
Bộ kit	10	10	100

Bảng 4.7 Tỷ lệ thành công khi PCR với primer của gen thụ thể estrogen

Qui trình tách chiết DNA	Số mẫu thực hiện	Số mẫu thành công	Tỷ lệ thành công (%)
I	5	5	100
Bộ kit	5	5	100

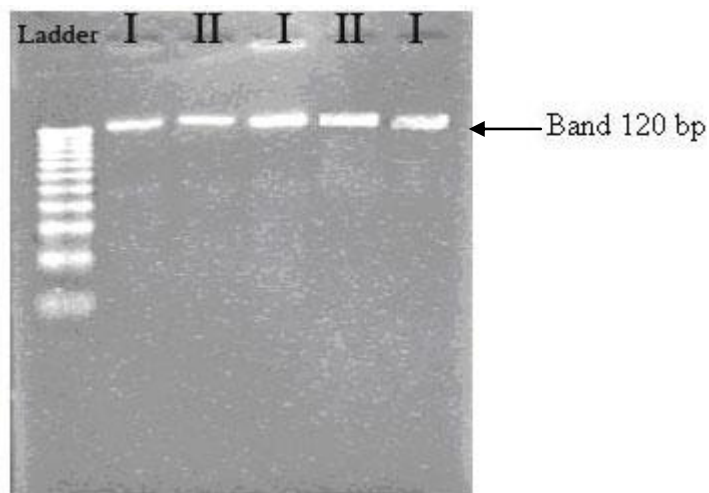
Kết quả từ bảng 4.6 và 4.7 cho thấy tỷ lệ thành công khi thực hiện phản PCR với DNA tách chiết theo qui trình I và qui trình của bộ đều cho tỷ lệ thành công 100%.

Kết quả so sánh hiệu quả tách chiết DNA theo hai qui trình bằng phương pháp đo OD và phương pháp PCR, chúng ta khẳng định chất lượng DNA tách chiết theo qui trình của bộ kit đảm bảo yêu cầu cho việc thực hiện phản ứng PCR. Trong kỹ thuật PCR xác định gen giới tính, trên con đực sản phẩm PCR có band với kích thước 655 bp và trong kỹ thuật PCR xác định gen thụ thể estrogen sản phẩm PCR có kích thước 120 bp. Như vậy, tính nguyên vẹn của DNA tách chiết từ bộ kit có thể đáp ứng yêu cầu khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu có kích thước lớn lẫn kích thước nhỏ.



A: qui trình I; B: qui trình bộ kit; LAD: ladder

Hình 4.1 Sản phẩm PCR gen giới tính từ DNA tách chiết của hai qui trình



I: qui trình I; II: qui trình bộ kit

Hình 4.2 Sản phẩm PCR gen thụ thể estrogen từ DNA tách chiết của hai qui trình

Tiện lợi, nhanh chóng là các điểm vượt trội của qui trình tách chiết DNA theo bộ kit khi so sánh với qui trình I. Với bộ kit tách chiết DNA, các hóa chất được phối trộn sẵn với nồng độ hợp lý và số thao tác trong quá trình thực hiện giảm đáng kể khi so sánh với qui trình I cho nên tạo sự tiện lợi cho người sử dụng. Nếu sử dụng qui trình

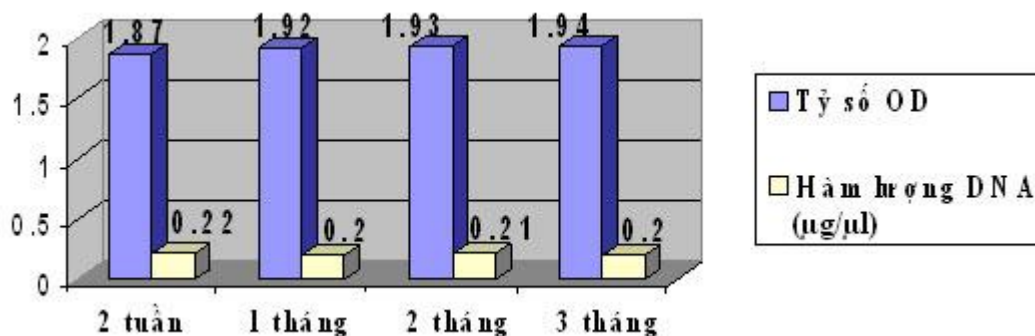
I để tách chiết DNA, chúng ta cần 24 giờ để hoàn thành công việc, trong khi đó nếu dùng bộ kit người sử dụng chỉ mất 5 giờ là có được mẫu DNA sẵn sàng cho phản ứng PCR.

Với sản phẩm Wizard Genomic DNA Purification Kit của công ty Promega, người sử dụng mất 5 – 6 giờ để hoàn thành việc tách chiết DNA từ cơ vân. Như vậy, về mặt thời gian để thực hiện công đoạn tách chiết, sản phẩm của chúng tôi không thua kém so với sản phẩm của công ty Promega.

4.2.2 Thử nghiệm tính ổn định của bộ kit ly trích DNA từ cơ vân

Bảng 4.8 Kết quả đo OD của DNA tách chiết theo bộ kit ở các thời điểm bảo quản

Thời gian Bảo quản	Tham số Thống kê	Tỷ số OD	Nồng độ DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2 tuần	n	5	5
	\bar{X}	1,87	0,22
	SD	0,03	0,03
1 tháng	n	5	5
	\bar{X}	1,92	0,2
	SD	0,03	0,02
2 tháng	n	5	5
	\bar{X}	1,93	0,21
	SD	0,03	0,02
3 tháng	n	5	5
	\bar{X}	1,94	0,2
	SD	0,03	0,01
Sai biệt thống kê		P = 0,48	P = 0,83



Biểu đồ 4.6 Hiệu quả tách chiết DNA của bộ kit ở các thời điểm bảo quản

Từ kết quả ở bảng 4.8 chúng ta có thể kết luận độ tinh sạch và hàm lượng DNA tách chiết từ bộ kit ở các thời điểm bảo quản khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Như vậy, sau 3 tháng bảo quản bộ kit tách chiết DNA vẫn cho hiệu quả tách chiết đạt yêu cầu.

4.3 KẾT QUẢ THIẾT LẬP BỘ KIT PCR PHÁT HIỆN GEN HALOTHAN

4.3.1 Kết quả khảo sát nồng độ glycerol trong Master Mix 2X

Thực hiện phản ứng PCR với Master Mix 2X ở 2 nồng độ glycerol 10% và 20% sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần bảo quản. Tiến hành 5 phản ứng PCR cho mỗi thời gian bảo quản ở mỗi nồng độ, kết quả được trình bày ở bảng 4.9.

Bảng 4.9 Tỷ lệ thành công của phản ứng PCR với Master Mix 2X

Thời gian bảo quản	Nồng độ glycerol	
	10%	20%
1 tuần	100%	100%
2 tuần	100%	100%
3 tuần	100%	100%
4 tuần	20%	100%

Theo kết quả ở bảng 4.9, tỷ lệ thành công của phản ứng PCR với Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 10% và 20% sau 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần bảo quản ở 4°C đều đạt 100%. Tỷ lệ thành công của phản ứng PCR chỉ có sự khác biệt sau 4 tuần bảo quản Master Mix 2X ở các nồng độ glycerol. Do đó, chúng tôi dùng trắc nghiệm chi – square để so sánh giữa hai phương pháp: Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 10% sau 4 tuần bảo quản (phương pháp A) và Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 20% sau 4 tuần bảo quản (phương pháp B). Kết quả trình bày ở bảng 4.10.

Bảng 4.10 Tỷ lệ thành công của phản ứng PCR ở hai phương pháp

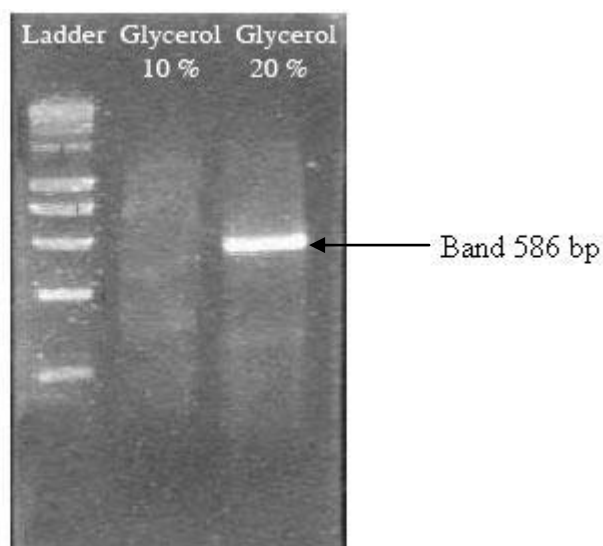
Phương pháp	Số mẫu thực hiện	Số mẫu thành công	Tỷ lệ thành công (%)
A	5	1	20%
B	5	5	100%
Sai biệt thống kê	P < 0,01		

Kết quả ở bảng 4.10 cho thấy sử dụng Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 20% sau 4 tuần bảo quản ở 4°C cho hiệu quả phản ứng PCR cao hơn rõ rệt so với Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 10% bảo quản cùng điều kiện (100% so với 20%). Như vậy, yếu tố nồng độ glycerol gây ra sự khác biệt về tỷ lệ thành công phản ứng PCR giữa hai phương pháp A và B.

Ở tuần thứ 3, với nồng độ glycerol 10% trong Master Mix 2X tuy cho tỷ lệ thành công của phản ứng PCR là 100% nhưng band điện di sản phẩm PCR trên gel mờ hơn so với band điện di của phản ứng PCR với nồng độ 20 % trong Master Mix 2X. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể là do sự giảm hoạt tính của *Taq* trong Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 10%.

Trong các buffer trữ *Taq* của đa số các công ty sinh học hiện nay đều chứa 50% glycerol (v/v). Theo Gerard và Henegariu (1997), glycerol ở nồng độ cao có khả năng giúp ổn định *Taq*. Do đó, kết quả thu được ở trên là phù hợp với những dẫn liệu đã đề cập. Với nồng độ glycerol 20% trong Master Mix 2X chúng ta có thể bảo quản sau 4 tuần ở 4°C mà vẫn cho hiệu quả phản ứng PCR tối ưu.

Một vấn đề cần đặt ra là chúng ta có thể tăng thêm nồng độ glycerol để tăng thời gian bảo quản. Theo Henegariu (1997), nồng độ glycerol thêm vào mỗi phản ứng PCR từ 5% - 10% để tăng cường hiệu quả phản ứng, nếu nồng độ glycerol cao hơn mức cho phép sẽ gây ức chế phản ứng PCR và phản ứng cắt bởi enzym giới hạn. Master Mix 2X chứa 20% glycerol thì trong hỗn hợp PCR (thể tích phản ứng 30 μ l) nồng độ glycerol là 10% phù hợp với nồng độ glycerol khuyến cáo trong phản ứng PCR. Cho nên chúng tôi quyết định chọn nồng độ glycerol 20 % để pha Master Mix 2X cho bộ kit PCR halothan.



Hình 4.3 Sản phẩm PCR gen halothan ở hai nồng độ glycerol

4.3.2 Kết quả khảo sát nhiệt độ bảo quản Master Mix 2X

Kết quả ở mục 4.3.1 cho thấy ở điều kiện bảo quản 4°C sau 4 tuần, Master Mix 2X chứa 20% glycerol cho tỷ lệ thành công của phản ứng PCR là 100%, cho nên chúng tôi chỉ tiến hành thực hiện 5 phản ứng PCR với Master Mix 2X sau mỗi tuần bảo quản ở nhiệt độ bảo quản 10°C để xác định khoảng nhiệt độ tối ưu trong việc bảo quản bộ kit, kết quả được trình bày ở bảng 4.11.

Bảng 4.11 Tỷ lệ thành công của bộ kit PCR halothan ở 10°C

Thời gian bảo quản	Số mẫu thực hiện	Số mẫu thành công	Tỷ lệ thành công (%)
1 tuần	5	5	100
2 tuần	5	5	100
3 tuần	5	5	100
4 tuần	5	5	100

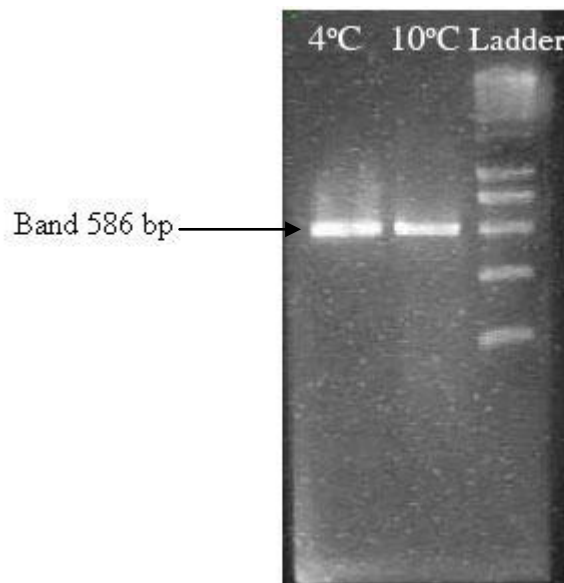
Kết quả từ bảng 4.11 cho thấy tỷ lệ thành công của phản ứng PCR với Master Mix 2X bảo quản ở 10°C qua các thời gian (1 tuần đến 4 tuần) đều cho tỷ lệ thành công của phản ứng PCR là 100%.

Như vậy, khoảng nhiệt độ từ 4°C → 10°C là khoảng nhiệt độ có thể dùng để bảo quản bộ kit PCR halothan trong quá trình sử dụng. Theo Gerard và Henegariu (1999), glycerol có khả năng giúp bảo vệ *Taq* dưới những tác động của nhiệt. Chính vì

vậy, kết quả thu được thí nghiệm này có thể lý giải do những tác động của glycerol trong thành phần bộ kit PCR.

Theo Denhart và Doratswamy (2002), sản phẩm PCR Master Mix của công ty Promega có thể bảo quản ở khoảng nhiệt độ $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. Qua kết quả khảo sát bảo quản 2X PCR Master Mix ở $4^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C}$ không có khác biệt lớn khi so sánh với điều kiện bảo quản của công ty Promega. Với nhiệt độ bảo quản $4^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$, 2X PCR Master Mix có thể dễ vận chuyển đi xa, tránh rã đông sản phẩm và tạo thuận lợi trong việc bảo quản sản phẩm ở những nơi có cơ sở vật chất thiếu thốn. Do đó, sản phẩm tạo ra sẽ có tính thương mại. Người sử dụng có thể dùng bộ kit PCR halothan sau khi đã bảo quản 1 tháng ở $4^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C}$ để thực hiện phản ứng.

Cũng theo Denhart và Doratswamy (2002), sản phẩm PCR Master Mix của công ty Promega có thể bảo quản ở khoảng nhiệt độ $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 3 tháng. Xét về thời gian bảo quản, sản phẩm của chúng tôi thấp hơn so với sản phẩm của công ty Promega. Đây là hạn chế của đề tài do không có đủ thời gian để khảo sát các thời gian bảo quản lâu hơn. Tuy nhiên, bộ kit PCR của chúng tôi chỉ dùng cho 10 phản ứng PCR cho nên thời gian bảo quản 1 tháng là có thể chấp nhận được.



Hình 4.4 Sản phẩm PCR gen halothan ở hai nhiệt độ bảo quản

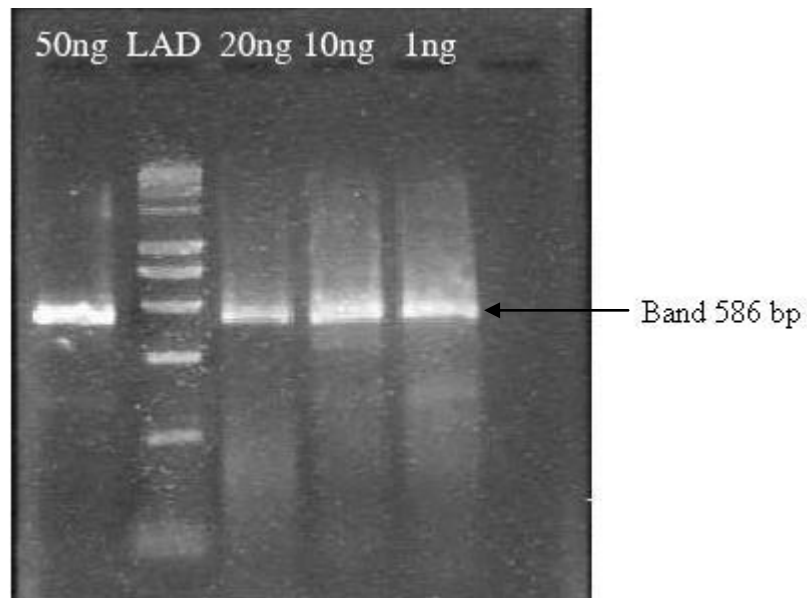
4.3.3 Kết quả khảo sát độ nhạy của bộ kit PCR halothan

Sử dụng bộ kit PCR halothan sau 2 tuần để thực hiện phản ứng PCR với DNA tách chiết từ cơ ở các nồng độ khác nhau đã cho kết quả ở bảng 4.12.

Bảng 4.12 Kết quả PCR ở các nồng độ DNA mẫu

Nồng độ DNA	Số mẫu thực hiện	Số mẫu thành công	Tỷ lệ thành công (%)
50 ng	5	5	100
20 ng	5	5	100
10 ng	5	5	100
1ng	5	5	100

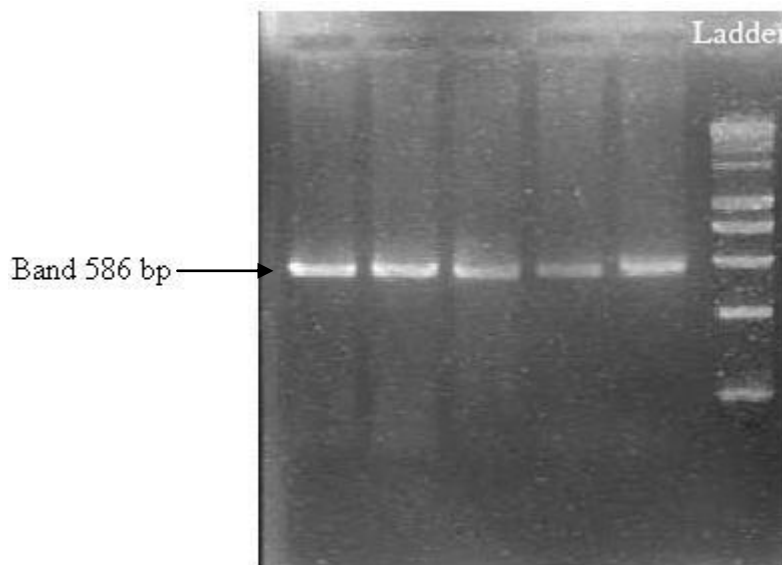
Kết quả bảng 4.12 cho thấy hiệu quả bộ kit PCR halothan ở các nồng độ DNA mẫu khác nhau, tỷ lệ thành công của phản ứng PCR vẫn đạt 100%. Tuy nhiên, độ sáng band điện di trên gel khác nhau ở các nồng độ. Độ sáng của band tỷ lệ thuận với nồng độ DNA mẫu.

**Hình 4.5 Sản phẩm PCR gen halothan ở các nồng độ DNA mẫu**

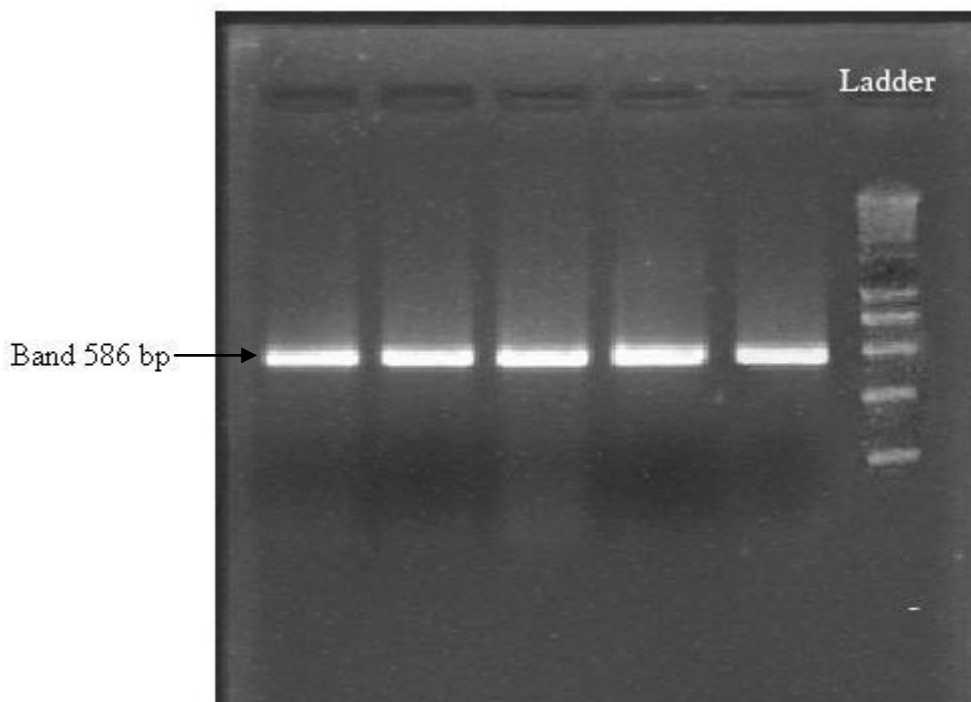
Bộ kit PCR halothan vẫn cho kết quả khuếch đại với nồng độ DNA mẫu 1 ng. Như vậy bộ kit PCR halothan có thể dùng để xác định gen halothan ở các mẫu có lượng DNA thấp như DNA tách chiết từ mô máu, lông,...

4.3.4 Hiệu quả của bộ kit PCR halothan với DNA tách chiết từ máu và da

Thực hiện phản ứng PCR trên 10 mẫu DNA chiết tách từ máu và 5 mẫu DNA tách chiết từ da, kết quả tỷ lệ thành công của phản ứng PCR là 100% trên mẫu máu và da.



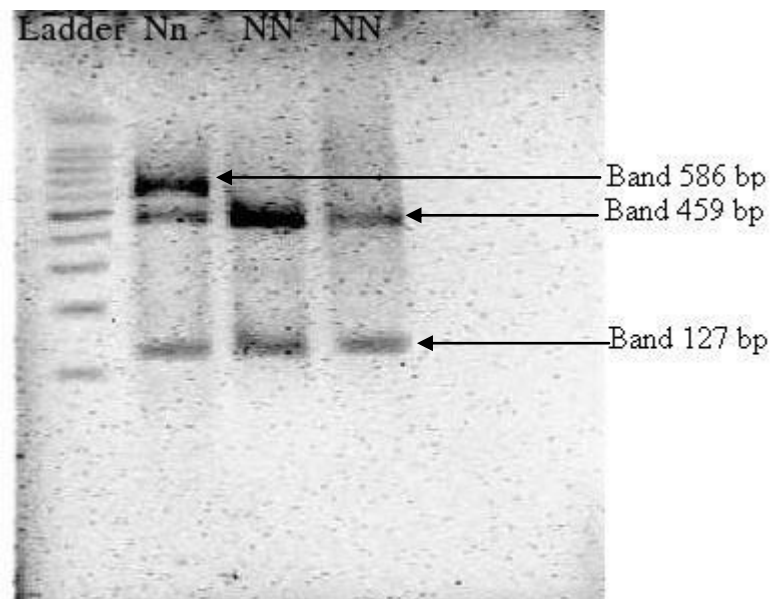
Hình 4.6 Sản phẩm PCR gen halothan từ mẫu máu



Hình 4.7 Sản phẩm PCR gen halothan từ mẫu da

Như vậy, bộ kit tách chiết DNA sau 3 tháng bảo quản ở 4°C vẫn đảm bảo hiệu quả tách chiết DNA đạt yêu cầu cho phản ứng PCR. Với bộ kit tách chiết DNA, người sử dụng có thể dùng để tách chiết DNA từ mô cơ, mô máu và da.

Kết quả trên cho thấy bộ kit PCR halothan có thể dùng để khuếch đại DNA tách chiết từ mô cơ, máu và da. Bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan đã đáp ứng được tiêu chí nhanh, tiện lợi, hiệu quả trong việc phát hiện gen halothan trên heo. Tuy nhiên, do nhu cầu đa dạng trong thực tiễn ngành chăn nuôi, đôi khi phải phát hiện gen halothan từ mẫu lông thú. Do vậy, bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan cần được nghiên cứu thêm để đáp ứng yêu cầu này.



Hình 4.8 Sản phẩm cắt enzym giới hạn *HhaI* của gen halothan

4.3.5 Hiệu quả kinh tế của bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan

Bảng 4.13 Chi phí hóa chất sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR

Bộ kit	Hóa chất	Lượng dùng	Thành tiền (VNĐ)
Tách chiết DNA	Tris-HCl	0,36 g	640,8
	EDTA	0,002 g	3,5
	Na ₂ EDTA	0,08 g	240
	NaCl	0,007 g	3,98
	SDS	0,06 g	67,2
	Sodium acetate	0,646 g	350
	Ethanol 100 %	105 ml	64.000
	Phenol	12,5 ml	16.250
	Chloroform	12 ml	1200
	Isoamyl alcohol	0,5 ml	72,5
	Proteinase K	6,2 mg	148.800
	Tổng chi phí		
PCR halothan	<i>Taq</i> ABgene	10 UI	96.000
	dNTP (25mM)	2,4 µl	4.800
	Primer ngược (15 pmol/ µl)	10 µl	900
	Primer xuôi (15 pmol/ µl)	10 µl	900
	DTT (25mM)	6 µl	580
	Tween 20	0,6 µl	370
	Glycerol	30 µl	450
	DNA chuẩn	1 mẫu	4.600

	Tổng chi phí	108.600
--	---------------------	----------------

Theo bảng 4.13, chi phí để sản xuất bộ kit tách chiết DNA cho 100 mẫu là 231.743 VNĐ và chi phí để sản xuất bộ kit PCR halothan cho 10 phản ứng là 108.600 VNĐ. Nếu tính hao hụt hóa chất trong sản xuất là 10%, chi phí để sản xuất bộ kit tách chiết DNA cho 100 mẫu là 260.000 VNĐ và chi phí để sản xuất bộ kit PCR halothan cho 10 phản ứng là 120.000 VNĐ.

Sản phẩm Wizard Genomic DNA Purification Kit sử dụng cho 100 lần tách chiết của công ty Promega có giá bán trên thị trường là 124 USD (khoảng 1.981.000 VNĐ). Như vậy khi so sánh với chi phí sản xuất bộ kit tách chiết DNA, sản phẩm của công ty Promega có giá đắt hơn gấp hơn 7 lần trong khi sản phẩm Wizard Genomic DNA Purification Kit không có cung cấp proteinase K.

Hiện nay trên thị trường Việt Nam chưa có bộ kit PCR halothan, các bộ kit PCR để phát hiện virus gây bệnh trên tôm của phòng sinh học phân tử - Viện Công Nghệ Sinh Học có giá bán 2.500.000 VNĐ / bộ cho 100 phản ứng. Như vậy, với chi phí sản xuất bộ kit PCR halothan, sản phẩm tạo ra hoàn toàn có thể cạnh tranh trên thị trường.

PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 KẾT LUẬN

- 1) Thiết lập được bộ kit tách chiết DNA cho 100 mẫu và bộ kit PCR halothan cho 10 phản ứng, đáp ứng tiêu chí: nhanh, tiện lợi, hiệu quả.
- 2) Bộ kit tách chiết DNA có thể dùng để tách chiết DNA từ mô cơ, máu, da. Bộ kit tách chiết DNA có thể bảo quản ở 4°C trong 3 tháng.
- 3) Master Mix 2X chứa glycerol nồng độ 20% cho tỷ lệ PCR thành công cao hơn Master Mix 2X chứa glycerol 10% sau 1 tháng bảo quản ở 4°C.
- 4) Khoảng nhiệt độ 4°C → 10°C có thể dùng để bảo quản Master Mix 2X trong 1 tháng.
- 5) Bộ kit PCR halothan có thể phát hiện gen halothan với nồng độ DNA mẫu tối thiểu 1ng.
- 6) Bộ kit PCR halothan có thể sử dụng hiệu quả với DNA tách chiết từ mô cơ, mô máu và da.

5.2 ĐỀ NGHỊ

- 1) Khảo sát hiệu quả của bộ kit PCR halothan với DNA tách chiết từ lông.
- 2) Theo dõi tính ổn định của bộ kit PCR halothan sau 2 tháng, 3 tháng bảo quản.
- 3) Khảo sát nồng độ glycerol lớn hơn 20% trong Master Mix 2X để xác định nồng độ glycerol mang lại hiệu quả tốt nhất cho bộ kit PCR halothan.
- 4) Ứng dụng bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR halothan vào thực tế sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

➤ Tài liệu tiếng Việt

1. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002. *Sinh Học Phân Tử (Khái Niệm - Phương Pháp - ứng Dụng)*. Tái bản lần 2, NXB Giáo Dục, Thành Phố Hồ Chí Minh.
2. Lê Thị Thu Phương, 2004. *Phát hiện gen halothan, gen thụ thể estrogen và mối liên quan giữa hai gen này đến năng suất sinh sản của heo nái*. Luận văn thạc sỹ khoa học nông nghiệp, Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
3. Khuất Hữu Thanh, 2003. *Cơ Sở Di Truyền Phân Tử Và Kỹ Thuật Gen*. NXB Khoa Học Kỹ Thuật, Hà Nội. Tr. 121-125 và tr. 137-140.
4. Nguyễn Văn Út, 2005. *Xác định giới tính bằng kỹ thuật Multiplex PCR trên ba giống bò*. Khóa luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

➤ Tài liệu tiếng nước ngoài

5. Alves A. C. B., Hossepian de Lima M. F. V., Teixeira M. C., Moreira-Filho A. C., 2003. Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. *Theriogenology* 59: 1415-1419.
6. Barton-Gade P. A., Chrystall B. B., Kirton A. H., Longdill G. R., Cross H. R., and Jenspersen M., 1988. Slaughter procedures for pigs, sheep, cattle and poultry. In *World animal science* (Cross H. R. and Overby A. J.). Elsevier science publishers, pp 33-36.
7. Chambers P. G., and Grandin T., 2001. *Guidelines for human handling, transport and slaughter of livestock*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, July 2006. <URL: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6909E/x6909e04.htm>>

8. Denhart M., and Doraiswamy V., 2001. *Advantages of PCR Master Mix*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, March 2006.
<URL: http://www.promega.com/pnotes/78/9186_09/9186_09.pdf>
9. Du W., 2004. *Porcine Stress Syndrome gene and pork production*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, May 2006.
<URL: <http://www.omfra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/04-053.htm>>
10. Ellis M., and Bertol T. M., 2001. *Halothane genotype and pork quality*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, March 2006.
<URL: <http://www.conferencia.uncnet.br/pork.htm>>
11. Franco M. M., Conatser A. L., Carneiro A. L., Rodrigues M. C., 1998. *Relationship between the Porcine Stress Syndrome gene and pork quality*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, May 2006.
<URL: http://www.scielo.br/scielo.php?scrip=sci_arttext.htm>
12. Fujii J., Otsu K., Zorzato F., Deleon S., Khanna V. K., Weiler J. E. and MacLennan D.H., 1991. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor associated malignant hyperthermia. *Science*, 253: 448-451.
13. Gerard D. R, and Henegariu L. M., 1997. Adjuvants in PCR reactions. *Biotechniques* 23: 504-511.
14. Houde A., Pommier S. A. and Roy R., 1993. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-452.
15. Hughes I. P., Moran C., and Nicholas F. W., 1992. PCR genotype of the ryanodine receptor gene for a putative causal mutation for malignant hyperthermia in Australian pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 109: 465-476.
16. Lundstrom K., Essen-Gustavson B., Rundgren M., Edfors-Lilja I., and Malmfors G., 1989. Effect of halothane genotype on muscle metabolism at slaughter and its relationships with meat quality: A within – litter comparison. *Meat Science*, 0309 - 1740: 251-261.
17. Pfeiffer H., Lengerken G. V., Schwalbe M., Horn P. and Kovac G., 1986. *Relationships between the stress susceptibility and the fertility of pig*. 37th Animal meeting of the European associated for animal production, Budapest, Hungary.
18. Rundgren M., Lundstrom K., and Edfors-Lilja I., 1990. A within – litter comparison of the three halothane genotype. 2. Performance, carcass quality,

organ development and long – term effects of transportation and amperozide. *Livestock Production Science* 26: 231-243.

19. Schneider A., Schworer D. and Blum J., 1980. Effects of halothane genotype on production and reproduction traits in Swiss Landrace. *Anim. Prod.*, Munich, Germany.

20. Short T. H., Rothschild M. F., Southwood O. I., McLaren D. G., de Vries A., van der Steen H., Eckardt G. R., Tuggle C. K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A. J., and Plastow G. S., 1997. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.* 75:3188-3142.

21. Simpson S. P., and Webb A. J., 1989. *Growth and carcass performance or British Landrace pigs heterozygous at the halothane locus*.p. 503 – p. 509.

22. Weaver K. P., Wilfinger M. C., and Loffert A. J., 1997. *DNA extraction and purification*. Ho Chi Minh city, Viet Nam, May 2006.
<URL: [http://www.protocolonline.net/molecular biology/dna/dna extraction.htm](http://www.protocolonline.net/molecular%20biology/dna/dna%20extraction.htm)>

23. Willeke H., Amler K., and Fisher K., 1984. The influence of the halothane genotype of the sow on her litter size. *Zuechtungskunde* 56:20-25.

PHỤ LỤC

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 1

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn1.OD

Level codes: tn1.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0106602	1	.0106602	4.737	.0612
Within groups	.0180027	8	.0022503		
Total (corrected)	.0286629	9			

Table of means for tn1.OD by tn1.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	5	1.8590400	.0150994	.0212148	1.8244376 1.8936424
2	5	1.9243400	.0259258	.0212148	1.8897376 1.9589424
Total	10	1.8916900	.0150011	.0150011	1.8672224 1.9161576

Multiple range analysis for tn1.OD by tn1.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	5	1.8590400	X
2	5	1.9243400	X

1	5	1.8590400	X
2	5	1.9243400	X

contrast	difference	limits
1 - 2	-0.06530	0.06920

❖ **CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA**

One-Way Analysis of Variance

Data: tn12.nongdoDNA

Level codes: tn12.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0072900	1	.0072900	2.089	.1864
Within groups	.0279200	8	.0034900		
Total (corrected)	.0352100	9			

Table of means for tn12.nongdoDNA by tn12.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	.2340000	.0326497	.0264197	.1909082	.2770918
2	5	.1800000	.0181659	.0264197	.1369082	.2230918
Total	10	.2070000	.0186815	.0186815	.1765295	.2374705

Multiple range analysis for tn12.nongdoDNA by tn12.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	5	.1800000	X

2	5	.1800000	X
---	---	----------	---

1	5	.2340000	X

contrast		difference	limits
1 - 2		0.05400	0.08618

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 2

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn21.OD

Level codes: tn21.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0002611	1	.0002611	.075	.7934
Within groups	.0277058	8	.0034632		
Total (corrected)	.0279670	9			

Table of means for tn21.OD by tn21.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	1.8590400	.0150994	.0263182	1.8161138	1.9019662
2	5	1.8692600	.0340191	.0263182	1.8263338	1.9121862
Total	10	1.8641500	.0186098	.0186098	1.8337966	1.8945034

Multiple range analysis for tn21.OD by tn21.nt

 Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	5	1.8590400	X
2	5	1.8692600	X

 contrast
 1 - 2

difference	limits
-0.01022	0.08585

❖ CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA

One-Way Analysis of Variance

 Data: tn22.nongdoDNA

Level codes: tn22.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0016900	1	.0016900	.415	.5443
Within groups	.0326000	8	.0040750		
Total (corrected)	.0342900	9			

Table of means for tn22.nongdoDNA by tn22.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	.2340000	.0326497	.0285482	.1874365	.2805635
2	5	.2080000	.0237487	.0285482	.1614365	.2545635
Total	10	.2210000	.0201866	.0201866	.1880746	.2539254

Multiple range analysis for tn22.nongdoDNA by tn22.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	5	.2080000	X
1	5	.2340000	X

2	5	.2080000	X
1	5	.2340000	X

contrast	difference	limits
1 - 2	0.02600	0.09313

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 3

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn31.OD

Level codes: tn31.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0011903	1	.0011903	.232	.6480
Within groups	.0410589	8	.0051324		
Total (corrected)	.0422491	9			

Table of means for tn31.OD by tn31.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	1.8590400	.0150994	.0320386	1.8067835	1.9112965
2	5	1.8808600	.0427195	.0320386	1.8286035	1.9331165

```
-----
Total      10  1.8699500  .0226547  .0226547  1.8329991  1.9069009
```

Multiple range analysis for tn31.OD by tn31.nt

Method: 95 Percent LSD

```
-----
Level      Count      Average  Homogeneous Groups
```

```
-----
1          5      1.8590400  X
2          5      1.8808600  X
-----
```

```
-----
contrast          difference      limits
1 - 2              -0.02182      0.10451
-----
```

❖ CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA

One-Way Analysis of Variance

Data: tn32.nongdoDNA

Level codes: tn32.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

```
-----
Source of variation  Sum of Squares  d.f.  Mean square  F-ratio  Sig.level
-----
Between groups      .0044100        1      .0044100    .754     .4195
Within groups       .0468000        8      .0058500
-----
Total (corrected)   .0512100        9
```

Table of means for tn32.nongdoDNA by tn32.nt

```
-----
Level  Count  Average  Std. Error  Std. Error  95 % LSD
        (internal)  (pooled s)  intervals for mean
-----
1      5     .2340000  .0326497    .0342053    .1782096    .2897904
2      5     .1920000  .0356931    .0342053    .1362096    .2477904
-----
```

Total 10 .2130000 .0241868 .0241868 .1735502 .2524498

Multiple range analysis for tn32.nongdoDNA by tn32.nt

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

2	5	.1920000	X
1	5	.2340000	X

contrast	difference	limits
1 - 2	0.04200	0.11158

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 4

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn41.OD

Level codes: tn41.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0210497	1	.0210497	29.533	.0006
Within groups	.0057020	8	.0007127		
Total (corrected)	.0267517	9			

Table of means for tn41.OD by tn41.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
-------	-------	---------	--------------------------	--------------------------	--------------------------------

1	5	1.8590400	.0150994	.0119394	1.8395662	1.8785138
2	5	1.9508000	.0075570	.0119394	1.9313262	1.9702738
Total	10	1.9049200	.0084424	.0084424	1.8911500	1.9186900

Multiple range analysis for tn41.OD by tn41.nt

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

1	5	1.8590400	X
2	5	1.9508000	X

contrast	difference	limits
1 - 2	-0.09176	0.03895 *

* denotes a statistically significant difference.

❖ CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA

One-Way Analysis of Variance

Data: tn42.nongdoDNA

Level codes: tn42.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0136900	1	.0136900	2.935	.1251
Within groups	.0373200	8	.0046650		
Total (corrected)	.0510100	9			

Table of means for tn42.nongdoDNA by tn42.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	.2340000	.0326497	.0305450	.1841796	.2838204

2	5	.1600000	.0282843	.0305450	.1101796	.2098204
Total	10	.1970000	.0215986	.0215986	.1617716	.2322284

Multiple range analysis for tn42.nongdoDNA by tn42.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

2	5	.1600000	X
1	5	.2340000	X

contrast	difference	limits
1 - 2	0.07400	0.09964

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 5

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn51.OD

Level codes: tn51.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0005027	1	.0005027	.486	.5054
Within groups	.0134546	13	.0010350		
Total (corrected)	.0139573	14			

Table of means for tn51.OD by tn51.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	1.8590400	.0150994	.0143873	1.8370562	1.8810238
2	10	1.8467600	.0099414	.0101733	1.8312151	1.8623049
Total	15	1.8508533	.0083065	.0083065	1.8381610	1.8635457

Multiple range analysis for tn51.OD by tn51.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	10	1.8467600	X
1	5	1.8590400	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	0.01228		0.03808

❖ CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA

One-Way Analysis of Variance

Data: tn52.nongdoDNA

Level codes: tn52.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0017633	1	.0017633	.376	.5569
Within groups	.0610100	13	.0046931		
Total (corrected)	.0627733	14			

Table of means for tn52.nongdoDNA by tn52.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	.2340000	.0326497	.0306368	.1871869	.2808131
2	10	.2110000	.0210000	.0216635	.1778981	.2441019
Total	15	.2186667	.0176882	.0176882	.1916391	.2456942

Multiple range analysis for tn52.nongdoDNA by tn52.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	10	.2110000	X
1	5	.2340000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	0.02300		0.08108

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 6

❖ CHỈ TIÊU TỶ SỐ OD

One-Way Analysis of Variance

Data: tn61.od

Level codes: tn61.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0114458	3	.0038153	.870	.4770

Within groups	.0701639	16	.0043852

Total (corrected)	.0816097	19	

Table of means for tn61.od by tn61.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	1.8736200	.0312292	.0296150	1.8292161	1.9180239
2	5	1.9209400	.0271251	.0296150	1.8765361	1.9653439
3	5	1.9257400	.0309095	.0296150	1.8813361	1.9701439
4	5	1.9357400	.0290132	.0296150	1.8913361	1.9801439

Total	20	1.9140100	.0148075	.0148075	1.8918080	1.9362120

Multiple range analysis for tn61.od by tn61.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	5	1.8736200	X
2	5	1.9209400	X
3	5	1.9257400	X
4	5	1.9357400	X

contrast	difference	limits
1 - 2	-0.04732	0.08881
1 - 3	-0.05212	0.08881
1 - 4	-0.06212	0.08881
2 - 3	-0.00480	0.08881
2 - 4	-0.01480	0.08881
3 - 4	-0.01000	0.08881

❖ **CHỈ TIÊU HÀM LƯỢNG DNA**

One-Way Analysis of Variance

Data: tn62.nongdoDNA

Level codes: tn62.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig.level
Between groups	.0017800	3	.0005933	.296	.8280
Within groups	.0321200	16	.0020075		

Total (corrected) .0339000 19

Table of means for tn62.nongdoDNA by tn62.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	5	.2200000	.0282843	.0200375	.1899564	.2500436
2	5	.1980000	.0198494	.0200375	.1679564	.2280436
3	5	.2060000	.0163095	.0200375	.1759564	.2360436
4	5	.1960000	.0120830	.0200375	.1659564	.2260436
Total	20	.2050000	.0100187	.0100187	.1899782	.2200218

Multiple range analysis for tn62.nongdoDNA by tn62.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

4	5	.1960000	X
2	5	.1980000	X
3	5	.2060000	X
1	5	.2200000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	0.02200		0.06009
1 - 3	0.01400		0.06009
1 - 4	0.02400		0.06009
2 - 3	-0.00800		0.06009
2 - 4	0.00200		0.06009
3 - 4	0.01000		0.06009

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THÍ NGHIỆM 7

Summary Statistics for Contingency Tables (Page 1)

Chi-square	D.F.	Significance		
6.66667	1	9.82327E-3		
3.75000	1	0.0528075	with Yates correction	
Statistic	Symmetric	With rows dependent	With columns dependent	
Lambda	0.77778	0.75000	0.80000	
Uncertainty Coeff.	0.61898	0.62824	0.60999	
Somer's D	-0.81633	-0.80000	-0.83333	

Summary Statistics for Contingency Tables (Page 2)

Statistic	Value	Significance
Contingency Coeff.	0.63246	
Cramer's V	0.81650	
Conditional Gamma	-1.00000	
Kendall's Tau B	-0.81650	
Kendall's Tau C	-0.80000	
Fisher's Exact Test		0.02381 (one-tail)
		0.04762 (two-tail)