

Mối liên kết giữa gen Mx và BF2 đối với khả năng kháng/mẫn cảm bệnh cúm A/H5N1 ở gà Mía Việt Nam

Lưu Quang Minh^{1*}, Nguyễn Hoàng Đăng², Trần Xuân Hoàn¹, Phạm Viết Liên³,
Phạm Thị Phương Mai¹, Nguyễn Thị Nga⁴, Trần Xuân Toàn¹, Nguyễn Hữu Cường⁵

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

²Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương, Cục Thú y, Bộ NN&PTNT

³Trung tâm Khảo nghiệm giống vật nuôi, Cục Chăn nuôi, Bộ NN&PTNT

⁴Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

⁵Vụ KH&CN các ngành kinh tế - kỹ thuật, Bộ KH&CN

Ngày nhận bài 24/8/2015, ngày chuyển phản biện 28/8/2015, ngày nhận phản biện 12/10/2015, ngày chấp nhận đăng 19/10/2015

Trong nghiên cứu này, 196 con gà Mía được công cường độc bằng liều công 10^4 TCID₅₀ chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C và tỷ lệ kiểu hình chết/sống sau 28 ngày công cường độc được quan sát đánh giá. So sánh sự sai khác trình tự gen, các haplotype BF2 đồng hợp của 24 mẫu được phát hiện và được phân thành nhóm haplotype BF2 có khả năng kháng (BF2*M-R) hay mẫn cảm (BF2*M-S) căn cứ vào mức độ tương đồng với một cơ sở dữ liệu bao gồm 26 haplotype được xây dựng dựa trên 51 trình tự haplotype của các giống gà trắng Leghorn và 5 giống gà Trung Quốc (Xiayan, BeijingYou, Zhenzu, Wuji và Sanhuang) công bố trên Ngân hàng GenBank. Bên cạnh đó, đa hình kiểu gen Mx của từng cá thể gà được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP, sử dụng enzyme cắt giới hạn Hpy8I. Kết quả, đã xác định được kiểu gen Mx/AA mã hóa Asn tại vị trí 631 và haplotype BF2*M-R liên kết với kiểu hình kháng bệnh cúm A/H5N1, trong khi đó kiểu gen Mx/GG mã hóa Ser và haplotype BF2*M-S lại thể hiện tính mẫn cảm với bệnh này. Kết quả cũng cho thấy, mối liên kết giữa các alen kháng trong hai gen Mx và BF2 chi phối khả năng kháng bệnh ở gà.

Từ khóa: A/H5N1, gà Mía, gen BF2, gen Mx, haplotype, PCR-RFLP, sequencing.

Chỉ số phân loại 4.3

Đặt vấn đề

Phức hệ phù hợp tổ chức chính (Major Histocompatibility Complex - MHC) bao gồm một nhóm gen mã hoá cho các protein trình diện kháng nguyên trên bề mặt tế bào của đa số động vật có xương sống và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa các đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Do vậy, chúng hứa hẹn trở thành các ứng viên cho việc chọn lọc di truyền nhằm nâng cao khả năng kháng bệnh ở các giống vật nuôi nói chung và gia cầm nói riêng [1-3]. Ở gà (*Gallus gallus*), MHC còn được gọi là phức hệ B và được chia thành 2 phần chủ yếu: nhóm B liên kết (MHC-B) và nhóm Y liên kết (MHC-Y) [4, 5], trong đó vùng MHC-B được cho là có liên kết chặt chẽ với các bệnh truyền nhiễm hơn là vùng MHC-Y [6]. Theo Yan và cs (2005), có 2 locus gen (ký hiệu là BF1 và BF2) mã hóa phân tử MHC lớp I ở gà (BF), trong đó gen BF2 biểu hiện mạnh và được coi như là gen lớp I chính, ngược lại

gen BF1 biểu hiện yếu và có rất ít bản phiên mã mRNA trong phân tử MHC lớp I ở gà [5]. Các gen MHC ở gà có tính đa hình cao [7] và chính tính đa hình cao này cùng với mối liên kết với những tính trạng kháng bệnh đã thúc đẩy các nhà khoa học về giống gia cầm đi sâu nghiên cứu cho dù sự đa hình cao đó ít nhiều gây trở ngại cho việc gắn kết các gen riêng lẻ với các đáp ứng kháng bệnh. Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trên thế giới đã chỉ ra mối liên kết có ý nghĩa của vùng gen BF2 với đặc tính kháng hay mẫn cảm với một số tác nhân gây bệnh bao gồm: virus gây bệnh Marek [8-10], bệnh do khuẩn Salmonella [2, 11], virus gây bệnh Gumboro [12, 13] và bệnh do virus cúm gia cầm [14]. Trong nghiên cứu của mình, các tác giả cũng đã chỉ ra các kiểu alen hay các kiểu gen đơn bội (haplotypes) đặc trưng của gen BF2 liên kết với các tính trạng đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh trên các giống gà khác nhau. Như vậy có thể thấy rằng, các gen MHC có thể sử dụng như chỉ thị phân tử để chọn lọc nâng cao

*Tác giả liên hệ: Email: quangminhvcn@yahoo.com

The association between Mx and BF2 genes on the resistant/supceptible ability for A/H5N1 disease in Vietnamese Mia chickens

Summary

In the study, 196 Mia chickens were individually challenged by A/H5N1/NCVD-2693-2.3.2.1C sub-strain with the dose of 10^4 TCID₅₀, and the chicken survival/mortality phenotypes were observed at 28-day post-challenge. The BF2 nucleotide variation in exon 2 was detected by sequencing, and consequently the homologous BF2 haplotypes from 24 individual were identified and grouped into resistant BF2*M-R haplotype and supceptible BF2*M-S haplotype motifs. These motifs were confirmed based on their high nucleotide homology with 26 BF2 haplotypes constructed from 51 haplotypes of White Leghorn and 5 Chinese chicken varieties (Xiayan, BeijingYou, Zhenzu, Wuji, and Sanhuang) published in GenBank. Besides, the Mx genotypes were determined from 196 individuals by PCR-RFLP, using restriction enzyme Hpy8I. The results indicated that the Mx/AA genotype encoding for Asn at pos.631 and BF2*M-R haplotype were identified to be associated with A/H5N1 resistant trait, while the Mx/GG encoding for Ser and BF2*M-S haplotype expressed to be susceptible. The results also demonstrated that the association between resistant alleles of Mx and BF2 enhanced disease resistibility in chicken.

Keywords: A/H5N1, BF2 gene, haplotype, Mia chicken, Mx gene, PCR-RFLP, sequencing.

Classification number 4.3

khả năng kháng bệnh của gà.

Gen Mx, hay còn gọi là gen kháng myxovirus - một nhóm các virus ARN bao gồm virus cúm (influenza), virus gây bệnh khó thở (parainfluenza), virus gây bệnh quai bị (mumps) và virus gây bệnh Newcastle được tìm thấy ở nhiều cơ thể sinh vật, bao gồm nấm men và động vật có xương sống [15]. Các gen này mã hóa cho phân tử protein Mx thuộc họ protein dynamin có bản chất giống như enzyme kháng virus GTPases (guanosine triphosphate) được kích thích bởi interferon (IFN) và khi tương tác với IFN, protein Mx sẽ ức chế sự hình thành các protein và các acid nucleic cần thiết cho sự nhân lên của virus [16-18]. Sự hiện diện các kiểu gen Mx đã giải thích lý do tại sao các cá thể vật nuôi này lại có khả năng kháng lại sự xâm nhiễm virus tốt hơn các cá thể vật nuôi khác. Các nghiên cứu về vai trò của gen Mx đối với khả năng kháng bệnh ở gà đã chỉ ra vị trí sai khác tại acid amin Asn631Ser (Asparagine-631-Serine) quyết định đáp ứng sinh kháng thể cũng như đáp ứng kháng virus cúm gây bệnh ở gà [19-23].

Trước tình hình dịch cúm gia cầm đang là vấn đề toàn cầu, đặc biệt ở Việt Nam khi mà điều kiện cơ sở chăn nuôi, trình độ KH&CN còn hạn chế, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân tích vai trò của kiểu gen Mx và BF2 liên quan đến khả năng kháng hay mẫn cảm với virus cúm gây bệnh trên đàn gà Mía nuôi tại Việt Nam, tạo cơ sở cho việc chọn dòng gà có tính kháng bệnh cao dựa trên các chỉ thị phân tử hỗ trợ.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Đối tượng thí nghiệm là 196 con gà Mía (2 tuần tuổi) có đặc điểm ngoại hình đặc trưng được lựa chọn ngẫu nhiên tại các hộ chăn nuôi ở một số tỉnh lân cận Hà Nội. Gà được đeo số nhẵn, không tiêm chủng và nuôi dưỡng cách ly an toàn sinh học. Chế độ chăm sóc và nuôi dưỡng gà được thực hiện theo quy trình chuẩn của Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, Viện Chăn nuôi.

Phương pháp

Phương pháp xác định hiệu giá kháng thể và công cường độc: sử dụng huyết thanh tách từ mẫu máu gà lúc 5 tuần tuổi để xác định hiệu giá kháng thể đối với vacxin H5N1 bằng phương pháp ức chế ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination inhibition - HI) với kháng nguyên chuẩn H5 mua từ Phòng thí nghiệm tham chiếu quốc tế về virus cúm gia cầm Weibridge

(Vương quốc Anh). Phương pháp công cường độc gà được thực hiện theo đường nhỏ mũi 100 ul/cá thể với liều công 10^4 TCID₅₀ chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C trong phòng an toàn sinh học của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương (Cục Thú y). Đây là chủng virus lưu hành trên diện rộng trong cả nước, đặc biệt là khu vực phía Bắc nước ta và liều công 10^4 TCID₅₀ đã được tối ưu đảm bảo tỷ lệ gà chết và gà sống sau 28 ngày tương ứng chiếm 78,0 và 22,0%, phù hợp với mục đích sàng lọc những cá thể gà mang kiểu gen có khả năng kháng cao hay mẫn cảm với chủng virus xâm nhiễm [24].

Phương pháp thu thập mẫu và tách chiết ADN từ máu gà: gà 4 tuần tuổi được lấy mẫu máu bằng cách dùng kim và xylanh chọc hút máu tĩnh mạch ở cánh gà. Máu gà được cho vào dung dịch chống đông natri citrate 0,5% và bảo quản ở 4°C trước khi sử dụng để tách chiết ADN. Phương pháp tách chiết ADN từ mẫu máu gà được thực hiện theo quy trình bộ kit GeneJET Genomic ADN Purification (Fermentas). Mẫu ADN được bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp PCR nhân các đoạn gen Mx và BF2 ở gà: sử dụng cặp mồi (F: 5'- GCA CTG TCA CCT CTT AAT AGA - 3'; R: 5'- GTA TTG GTA GGC TTT GTT GA - 3') để nhân đoạn gen Mx có kích thước 301 bp thuộc nhiễm sắc thể số 1 ở gà (GenBank: DQ788615.1) và cặp mồi (F: 5'- GCA GAG CTC CAT ACC CTG CGG TA - 3'; R: 5'- GCC GGT CTG GTT GTA GCG CCG - 3') để nhân đoạn gen BF2 có kích thước 267 bp thuộc nhiễm sắc thể số 16 ở gà (GenBank: AB426152). Phản ứng PCR được tối ưu hóa và thực hiện trong tổng thể tích 25 ul bao gồm 2 x Go-taq green master mix (Promega), 200 uM dNTPs và 0,5 ul dung dịch ADN. Chu trình nhiệt được tiến hành trên máy Thermal cycle (Eppendorf): biến tính 95°C trong 10 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (95°C trong 30 giây; 58°C trong 30 giây; 72°C trong 30 giây) và cuối cùng 1 chu kỳ ở 72°C trong 5 phút.

Phương pháp xác định đa hình đoạn gen Mx: sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen Mx ở gà được tiến hành ủ cắt bằng enzyme giới hạn Hpy8I trong tổng thể tích 20 ul bao gồm: 12 ul sản phẩm PCR, 10 Unit Hpy8I, 1x buffer và được ủ qua đêm ở 37°C. Kết quả được điện di trên gel agarose 1,5% trong thời gian 35 phút ở hiệu điện thế 90 V.

Phương pháp giải trình tự xác định đa hình haplotype trong đoạn gen BF2: trình tự đoạn gen BF2

được xác định trên máy giải trình tự tự động AB3130 (module BigDye® XTerminator™ - website: www.appliedbiosystems.com/support). Sản phẩm PCR được làm sạch theo quy trình bộ kit QIAquick PCR Purification (Quiagen) và được bảo quản ở -20°C. Phản ứng sequencing được thực hiện theo quy trình bộ kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem), sau đó được làm sạch bằng kit BigDye® XTerminator™ - Purification (Applied Biosystem).

Phương pháp xử lý số liệu: kiểm tra cân bằng Hardy Weinberg (HW) và sự sai khác giữa tỷ lệ gà sống và chết sau công cường độc ở các kiểu gen Mx và BF2 nghiên cứu trong quần thể gà Mía phân tích bằng kiểm định Chi-square, sử dụng phần mềm Microsolf excel.

Phân tích trình tự gen được thực hiện sử dụng các phần mềm chuyên dụng LaserGene v7.0, Bioedit v7.2.5 và so sánh với kết quả đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế (EMBL/Genbank/DDBJ).

Kết quả và thảo luận

Đa hình gen Mx và mối liên kết với khả năng kháng/mẫn cảm với chủng virus cúm A/H5N1 xâm nhiễm

Nhằm khẳng định khả năng kháng bệnh gà không bị ảnh hưởng do dư lượng kháng thể tồn tại từ đời cha mẹ, hiệu giá kháng thể trên gà thí nghiệm lúc 4 tuần tuổi đã được xác định. Kết quả cho thấy, cả 196 con gà thí nghiệm đều không có kháng thể cúm (âm tính). Như vậy, gà đạt yêu cầu dùng trong thí nghiệm công cường độc với liều công 10^4 TCID₅₀ chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C.

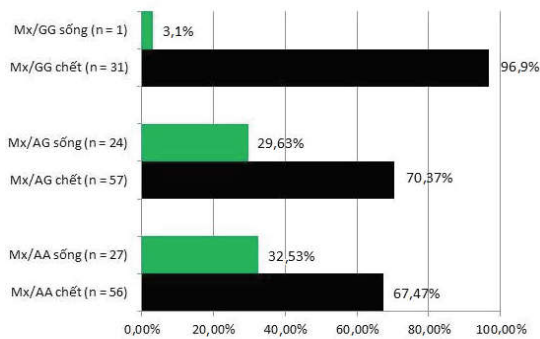
Sử dụng cặp mồi nghiên cứu, đoạn gen Mx có kích thước 301 bp, từ vị trí 20670 đến 20968 bao gồm một phần vùng intron 12 và exon 13 trên trình tự gen Mx thuộc nhiễm sắc thể số 1 ở gà (GenBank: DQ788615.1) đã được khuếch đại thành công. Đa hình gen Mx chứa vị trí đột biến A20766G trong vùng exon 13 dẫn đến thay đổi axit amin Asn631Ser và làm thay đổi chức năng kháng/mẫn cảm với virus cúm A/H5N1 xâm nhiễm trên gà được xác định bằng enzyme cắt giới hạn Hpy8I. Kết quả, đã phát hiện được 3 kiểu gen Mx/AA, AG và GG trong quần thể gà Mía nghiên cứu, với tần số tương ứng là 0,424; 0,413; 0,163 và 2 alen Mx/A, Mx/G với tần số tương ứng là 0,63 và 0,37 (bảng 1). Kết quả này khá phù hợp với kết quả phân tích tần số alen của gen Mx có khả năng kháng virus cúm A/H5N1 trên 15 giống gia cầm bản địa và 4 giống gà ngoại của Li

và cs (2006) [25], khi tác giả đã phát hiện tần số alen A (có khả năng kháng virus cúm) ở các giống gà nội cao, dao động từ 0,7241 đến 0,9554, trong khi đó tần số alen A ở quần thể gà ngoại thấp hơn nhiều, dao động từ 0,0565 đến 0,2742. Bằng kiểm nghiệm Chi-square với $p = 0,28$, chúng tôi xác định tần số các kiểu gen tương ứng trong quần thể gà Mía nghiên cứu này tuân theo định luật cân bằng Hardy Weinberg.

Bảng 1: tần số kiểu gen và alen của gen Mx ở gà Mía

	Kiểu gen			Alen	
	AA	AG	GG	A	G
Gà Mía (n=196)	0,424	0,413	0,163	0,63	0,37

Phân tích mối tương quan giữa các kiểu gen Mx phát hiện được trên số gà sống và chết sau công cường độc bằng chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C với liều công 10^4TCID_{50} cho thấy, vai trò kháng bệnh rõ rệt của kiểu gen Mx/AA và Mx/AG với tỷ lệ gà sống sau công ở 28 ngày lần lượt chiếm 32,53 và 29,63%. Trong khi đó, ở gà mang kiểu gen Mx/GG, sau 28 ngày công cường độc số gà chết chiếm tỷ lệ 96,9% (biểu đồ 1). Bằng kiểm nghiệm Chi-square, chúng tôi nhận thấy sự khác biệt về tỷ lệ gà sống và gà chết ở 3 kiểu gen nghiên cứu là có ý nghĩa thống kê với $p = 0,004$.



Biểu đồ 1: sự liên kết giữa đa hình kiểu gen Mx với khả năng kháng bệnh gây ra bởi chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1 C (liều công 10^4TCID_{50})

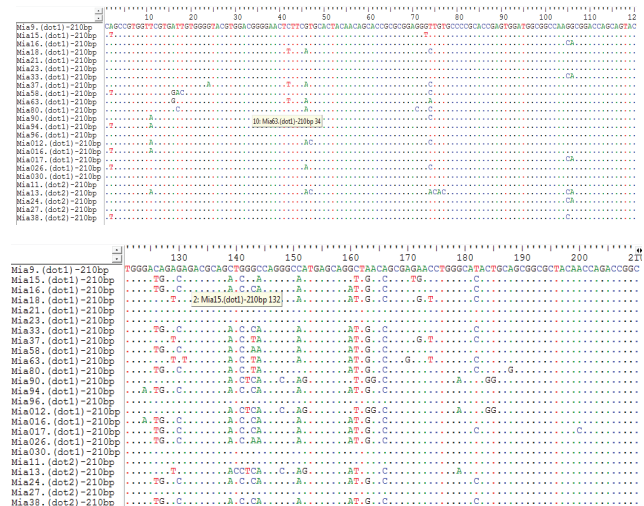
Từ các kết quả trên, chúng tôi nhận thấy alen Mx/A liên kết với khả năng kháng bệnh cao, ngược lại alen Mx/G thì thể hiện tính mẫn cảm với bệnh gây ra bởi chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C xâm nhiễm với liều công 10^4TCID_{50} . Kết luận này đã góp phần vào nhận định của nhiều tác giả khi công bố trong các nghiên cứu của mình rằng vị trí đột biến A20766G trong gen Mx dẫn đến thay đổi axit amin Asn631Ser và làm thay đổi chức năng kháng hay mẫn cảm với virus cúm A/H5N1 xâm nhiễm trên gà [19, 20,

22]. Kết quả cũng góp phần giải thích vì sao tần số alen Mx/A trong quần thể gà Mía lại cao hơn alen Mx/G (0,63 so với 0,37 - xem bảng 1). Có thể trong quá trình chọn lọc tự nhiên, những cá thể gà mang alen G có tính mẫn cảm với các bệnh do virus ARN xâm nhiễm, do vậy số lượng dần dần bị hạn chế, ngược lại những cá thể gà mang alen A có khả năng kháng cao với các bệnh này nên số lượng vẫn được duy trì.

Đa hình haplotype gen BF2 và mối liên kết với khả năng kháng/mẫn cảm với chủng virus cúm A/H5N1 xâm nhiễm

Sử dụng cặp mồi nghiên cứu, đoạn gen BF2 có kích thước 267 bp, bao gồm toàn bộ vùng exon2 trên trình tự gen BF2 thuộc nhiễm sắc thể số 16 ở gà đã được khuếch đại thành công. Đa hình nucleotide trong đoạn gen BF2 dẫn đến khả năng thay đổi chức năng kháng hay mẫn cảm với virus cúm A/H5N1 xâm nhiễm trên gà được xác định bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả cho thấy, trong tổng số 196 gà Mía nghiên cứu, 24 mẫu mang kiểu gen BF2 đồng hợp (chiếm tỷ lệ 12,2%) đã được phát hiện. Tỷ lệ xuất hiện kiểu gen BF2 đồng hợp ở các giống gà Việt Nam rất khác nhau khi so sánh với kết quả đã công bố của tác giả [26] về tỷ lệ cá thể gà Tè, Tre và H' mông mang kiểu gen BF2 đồng hợp (lần lượt là 16,7; 3,3 và 8,3%).

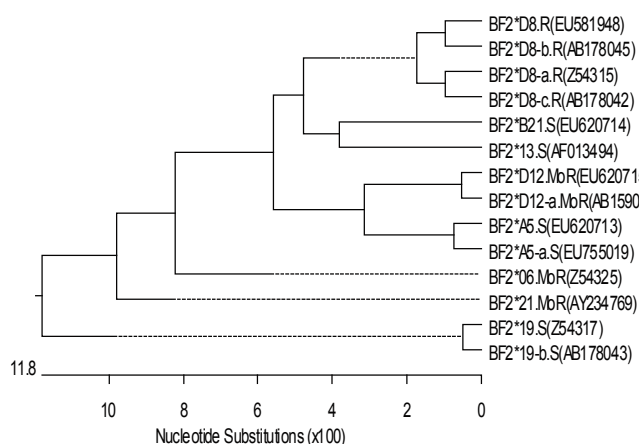
Phân tích sự sai khác của 210 nucleotide trong trình tự gen BF2 (pos.+53..+263) thu được từ các mẫu này, 10 haplotype đồng hợp và các haplotype dị hợp của chúng đã được phát hiện. Đây là vùng tập trung nhiều vị trí SNPs dẫn đến thay đổi chức năng của đoạn gen BF2 liên kết đến các tính trạng đáp ứng miễn dịch ở gà [11, 27].



Hình 1: trình tự nucleotide haplotype đồng hợp gen BF2 (exon2) ở gà Mía

Cho đến nay, nhiều nhà khoa học trên thế giới cho rằng trình tự nucleotide trong gen BF2 trên các giống gà sẽ khác nhau do đặc điểm của từng giống [11], vì vậy để so sánh mức độ tương đồng, một cơ sở dữ liệu bao gồm 26 haplotype với mức độ tương đồng giữa các nhóm dao động 92,9-100% được xây dựng dựa trên 51 trình tự haplotype của các giống gà trắng Leghorn và 5 giống gà Trung Quốc (Xiayan, BeijingYou, Zhenzu, Wuji và Sanhuang) [5, 9, 25].

Với mục tiêu xác định được các kiểu haplotype liên kết với khả năng kháng hay mẫn cảm với bệnh, từ 26 haplotype trên, chúng tôi đã xác định được 8 haplotypes chia vào 3 nhóm, gồm: (1) Nhóm haplotype kháng bệnh cao BF2*D8 (EU581948, Z54315, AB178042, AB178045); (2) Nhóm haplotype kháng bệnh trung bình BF2*21 (AY234769), BF2*D12 (EU620715, AB159071) và BF2*06 (Z54325); (3) Nhóm haplotype mẫn cảm BF2*A5 (EU620713, EU755019), BF2*19 (Z54317, AB178043), BF2*B21 (EU620714) và BF2*13 (AF013494) (hình 2).

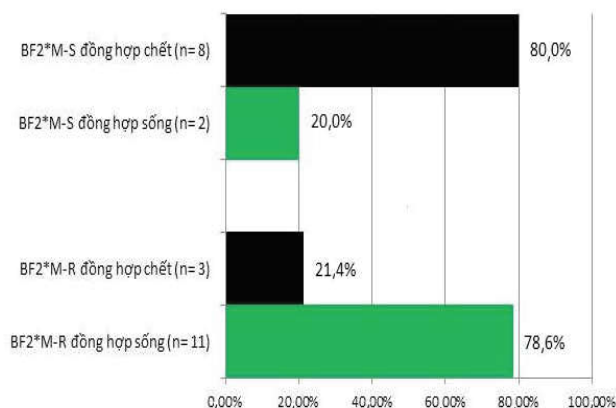


Hình 2: kết quả phân nhóm các haplotype liên kết với khả năng kháng hay mẫn cảm với bệnh

Tiến hành phân tích so sánh sự tương đồng giữa 10 trình tự haplotype đồng hợp gen BF2 ở gà Mía với 3 nhóm haplotype trên, chúng tôi đã xác định được 5 haplotype liên kết với chức năng. Cụ thể, trong 24 mẫu đồng hợp được phát hiện có 10 mẫu mang haplotype có mức độ tương đồng 96,2-97,6% với các haplotype kháng bệnh cao BF2*D8; 4 mẫu có mức độ tương đồng 92,9-94,8% với các haplotype kháng bệnh trung bình BF2*D12 và BF2*06; 3 mẫu tương đồng với haplotype mẫn cảm BF2*19 ở mức 91,9-93,3%, và đặc biệt có 7 mẫu mang haplotype đồng hợp có mức độ tương đồng 100% với haplotype mẫn cảm BF2*A5. Từ kết quả này, chúng tôi tạm ký hiệu nhóm gà Mía mang

haplotype BF2 có khả năng kháng chủng virus H5N1 xâm nhiễm là BF2*M-R và nhóm gà mang haplotype BF2 mẫn cảm là BF2*M-S.

Áp dụng vào kết quả thí nghiệm thực tế, chúng tôi nhận thấy trong nhóm gà Mía mang kiểu gen đồng hợp kháng bệnh BF2*M-R, tỷ lệ gà sống và chết sau 28 ngày công cường độc tương ứng chiếm 78,6 và 21,4%, ngược lại trong nhóm gà Mía mang kiểu gen đồng hợp mẫn cảm BF2*M-S, tỷ lệ gà sống và chết sau công cường độc tương ứng chiếm 20 và 80% (biểu đồ 2).



Biểu đồ 2: sự liên kết giữa đa hình kiểu gen BF2 đồng hợp với khả năng kháng bệnh gây ra bởi chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1 C (liều công 10^4 TCID₅₀)

Tiến hành phân tích trên số gà Mía mang kiểu gen BF2 dị hợp tử sống sót sau công cường độc, tỷ lệ gà có khả năng mang haplotype kháng BF2*M-R và gà có khả năng mang haplotype mẫn cảm BF2*M-S lần lượt là 76,9 và 23,1%. Theo công bố của Boonyanuwat và cs (2006) [14], những cá thể gà mang haplotype BF2 kháng hay mẫn cảm đều cho tỷ lệ sống hoặc chết tương ứng là 100%, vì vậy kết quả trên đã đưa ra giả thiết có sự liên kết gen ảnh hưởng đến khả năng kháng bệnh ở gà Mía cho dù sự sai khác về tỷ lệ gà sống/chết ở hai nhóm mang kiểu gen đồng hợp BF2*M-R và BF2*M-S trên là có ý nghĩa thống kê với $p = 0,004$ (kiểm định Chi-square).

Tương tác giữa các gen Mx và BF2 liên kết với khả năng kháng bệnh trên gà Mía

Để đánh giá khả năng liên kết giữa hai gen Mx và BF2 chi phối tính kháng hay mẫn cảm với bệnh, chúng tôi tiến hành xác định số lượng gà mang các alen Mx/A và Mx/G trên 24 mẫu gà Mía mang kiểu gen BF2 đồng hợp. Kết quả về số lượng gà sống và chết sau công cường độc đối với từng nhóm alen được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: tỷ lệ gà mang đồng thời các kiểu alen gen Mx và BF2 sống và chết sau công cường độc

Nhóm các alen gen Mx và BF2	Số lượng/Tỷ lệ				Tổng (n)	%
	Sống (n)	%	Chết (n)	%		
Mx/A-BF2*M-R	10	83,3	2	16,7	12	100
Mx/A-BF2*M-S	2	28,6	5	71,4	7	100
Mx/G-BF2*M-R	1	50,0	1	50,0	2	100
Mx/G-BF2*M-S	0	0	3	100	3	100

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, nhóm gà mang đồng thời các alen có khả năng kháng bệnh trong gen Mx và BF2 có tỷ lệ gà sống và chết tương ứng cao nhất và thấp nhất so với ba nhóm gà còn lại ($p = 0,02$; Chi-square). Mặc dù tỷ lệ chết ở nhóm gà này chiếm 16,7%, nhưng một điều thú vị là toàn bộ cá thể gà chết này đều mang kiểu alen BF2*06 thuộc nhóm kháng trung bình (hình 2). Ở nhóm gà mang đồng thời các alen miễn cảm (Mx/G-BF2*M-S), tỷ lệ gà chết là 100%, cao hơn nhiều so với tỷ lệ gà chết mang từng alen kháng riêng biệt (biểu đồ 1 và 2). Điều này cho thấy, khả năng 2 alen miễn cảm trong gen Mx và BF2 đã chi phối làm giảm sức đề kháng của gà. So sánh tỷ lệ gà sống và chết ở hai nhóm Mx/A-BF2*M-S và Mx/G-BF2*M-R, chúng tôi thấy không có sự khác biệt đáng kể nào giữa các tỷ lệ này và cho dù số lượng mẫu không đủ lớn, nhưng có thể thấy rằng có mối liên kết giữa alen miễn cảm BF2*M-S với alen kháng Mx/A dẫn đến sự chết của gà (71,4%) và ngược lại, mối liên kết giữa alen kháng BF2*M-R với alen miễn cảm Mx/G đã nâng cao khả năng sống sót của gà (50,0%) khi mà theo kết quả ở trên, tỷ lệ gà mang kiểu gen miễn cảm Mx/GG sống sót chỉ chiếm 3,1% (biểu đồ 1).

Tiến hành phân tích trên 52 cá thể gà sống sót sau công cường độc mang các alen trong gen Mx và BF2. Kết quả được tổng hợp trong bảng 3.

Bảng 3: số lượng gà mang đồng thời các kiểu alen gen Mx và BF2 sống sót sau công cường độc

Alen gen Mx	Alen gen BF2		Tổng (n)
	BF2*M-R	BF2*M-S	
Mx/A	40	11	51
Mx/G	1	0	1

Bằng kiểm nghiệm Chi-square, chúng tôi đã xác định sự khác biệt về tỷ lệ gà sống giữa hai nhóm alen BF2*M-R, BF2*M-S và Mx/A, Mx/G là không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,6$, có nghĩa là các alen này không độc lập với nhau. Điều này một lần nữa chứng

minh mối liên kết giữa các alen trong gen Mx và gen BF2 chi phối khả năng kháng bệnh ở gà.

Kết luận

Đa hình kiểu gen Mx và sự đa dạng di truyền các haplotype trong gen BF2 đã được phát hiện trên đàn gà Mía, trong đó alen Mx/A do điểm đột biến G20766A dẫn đến thay đổi acid amin Ser631Asn trong vùng exon 13 và haplotype BF2*M-R được xác định liên kết có ý nghĩa với khả năng kháng cao đối với chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 - nhánh 2.3.2.1C xâm nhiễm, với liều công cường độc là $10^{4.5}$ TCID₅₀. Ngược lại, các alen Mx/G và BF2*M-S thể hiện tính miễn cảm với chủng virus cúm này. Kết quả cũng cho thấy vai trò đồng thời của 2 gen Mx và BF2 ảnh hưởng có ý nghĩa đến khả năng kháng bệnh ở gà.

Tài liệu tham khảo

- [1] M.J. Stear, A. Belch, K. Donskow-Schmelter, L.A. Fitton, G.T. Innocent, C. Ishikane, A. Mateus, L. Murphy, K. Rennie, A. Smith, G. Sayers (2007), "Detection of genes with moderate effects on disease resistance using ovine mhc and resistance to nematodes as an example", *Vet Immunol Immunopathol*, **120**(1), pp.3-9.
- [2] H. Zhou, S.J. Lamont (2003), "Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens", *Immunogenetics*, **55**, pp.133-140.
- [3] S.J. Lamont (1998), "The chicken major histocompatibility complex and disease", *Rev Sci Tech*, **17**, pp.128-142.
- [4] M.M. Miller, L.D. Bacon, K. Hala, H.D. Hunt, S.J. Ewald, J. Kaufman, R. Zoorob, W.E. Briles (2004), "Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex", *Immunogenetics*, **56**, pp.261-279.
- [5] R.Q. Yan, Li Xin Sheng, Tian Yao Yang, Chun Xia (2005), "Characterization of BF2 and b2m in three Chinese chicken lines", *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**, pp.417-425.
- [6] K. Hosomichi, M.M. Miller, R.M. Goto, Y. Wang, S. Suzuki, J.K. Kulski, M. Nishibori, H. Inoko, K. Hanzawa, T. Shiina (2008), "Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken Mhc-B haplotype diversity", *J. Immunol*, **181**, pp.3393-3399.
- [7] T. Shiina, K. Hosomichi, K. Hanzawa (2006), "Comparative genomics of the poultry major histocompatibility complex", *Animal Science Journal*, **77**, pp.151-162.
- [8] K.S. Macklin, S.J. Ewald, R.A. Norton (2002), "Major histocompatibility complex effect on cellulitis among different chicken lines", *Avian pathology*, **31**, pp.371-376.
- [9] Y.C. Jin, P. Wei, X.X. Wei, X.Y. Zhao, Y. Li (2010), "Marek's disease resistant/susceptible MHC haplotypes in Xiayan chickens identified on the basis of BLB2 PCR-RFLP and BLB2/BF2 sequence analyses", *British Poultry Science*, **51**(4), pp.530-539.
- [10] L.D. Bacon, H.D. Hunt, H.H. Cheng (2001), "Genetic resistance to Marek's disease", *Current topics in microbiology and immunology*.

- [11] L.B. Liu, C.M. Wu, J. Wen, J.L. Chen, M.Q. Zheng, G.P. Zhao (2009), "Association of SNPs in exon 2 of the MHC B-F gene with immune traits in two distinct chicken populations: Chinese Beijing-You and White Leghorn", *Acta Agriculturae Scand Section A*, **59**, pp.4-11.
- [12] H.R. Juul-Madsen, T.S. Dalgaard, C.M. Røntved, K.H. Jensen and Bumstead N (2006), "Immune Response to a Killed Infectious Bursal Disease Virus Vaccine in Inbred Chicken Lines with Different Major Histocompatibility Complex Haplotypes", *Poultry Science*, **85**, pp.986-998.
- [13] S.J. Ewald, X. Ye, S. Avendano, S. McLeod, S.L. Lamont, C.M. Dekkers (2007), "Association of BF2 alleles with antibody titre and production traits in commercial pure line broiler chickens", *Animal Genetics*, **38**, pp.174-176.
- [14] K. Boonyanuwat, Sawat Thummabutra, Neramit Sookanee, Voravit Vatchavalkhu, Voravit Siripholvat (2006), "Influences of major histocompatibility complex class I haplotypes on avian influenza virus disease traits in Thai indigenous chickens", *Animal Science Journal*, **77**, pp.285-289.
- [15] J.H. Ko, H.K. Jin, A. Asano, A. Takada, A.H. Ninomiya, Kida, H. Hokiyama, M. Ohara, M. Tsuzuki, M. Nishibori, M. Mizutani, T. Watanabe (2002), "Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene", *Genome Res*, **12**, pp.595-601.
- [16] C.T.O. Benfield, Jon W. Lyal, Georg Kochs, Laurence S. Tiley (2008), "Asparagine 631 Variants of the Chicken Mx Protein Do Not Inhibit Influenza Virus Replication in Primary Chicken Embryo Fibroblasts or In Vitro Surrogate Assays", *Journal of Virology*, **82(15)**, pp.7533-7539.
- [17] S.H. Lee, S.M. Vidal (2002), "Functional Diversity of Mx Proteins: Variations on a Theme of Host Resistance to Infection", *Genome Res*, **12**, pp.527-530.
- [18] O. Haller, S. Stertz, G. Kochs (2007), "The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins", *Microbes Infect*, **9**, pp.1636-1643.
- [19] J.H. Ko, A. Takada, T. Mitsuhashi, T. Agui, T. Watanabe (2004), "Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631. Anim", *Genet*, **35**, pp.119-122.
- [20] E.J. Livant, S. Avendano, S. McLeod, X. Ye, S.J. Lamont, J.C.M. Dekkers, S.J. Ewald (2007), "MX1 exon 13 polymorphisms in broiler breeder chickens and associations with commercial traits", *Animal Genetics*, **38(2)**, pp.177-179.
- [21] L.J. Qu, X.Y. Li, G.Y. Xu, Z.H. Ning, N. Yang (2009), "Lower antibody response in chickens homozygous for the Mx resistant allele to avian influenza", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **22(4)**, pp.465-470.
- [22] T. Sartika, Sri Sulandari, Moch Syamsul, Arifin Zein (2011), "Selection of Mx gene genotype as genetic marker for Avian Influenza resistance in Indonesian native chicken", *BMC Proceedings*, **5(4)**, p.37.
- [23] J. Seyama, H. Ko, M. Ohe, N. Sasaoka, A. Okada, H. Gomi, A. Yoneda, J. Ueda, M. Nishibori, S. Okamoto, Y. Maeda, T. Watanabe (2006), "Population Research of Genetic Polymorphism at Amino Acid Position 631 in Chicken Mx Protein with Differential Antiviral Activity", *Biochemical Genetics*, **44(9-10)**, pp.432-443.
- [24] Lưu Quang Minh, Vũ Chí Cường, Phạm Viết Liên, Phạm Thị Phương Mai, Nguyễn Thị Nga, Tô Long Thành, Trần Xuân Toàn, Lương Nhân Tuấn, Trần Xuân Hoàn (2015), "Đa hình gen Mx liên quan đến khả năng kháng hay mẫn cảm với chủng virus A/H5N1/NCVD-2693 gây bệnh ở gà Mía, Việt Nam", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học chăn nuôi - thú y toàn quốc*, tr.182-187.
- [25] X.Y. Li, L.J. Qu, J.F. Yao, N. Yang (2006), "Skewed Allele Frequencies of an Mx Gene Mutation with Potential Resistance to Avian Influenza Virus in Different Chicken Populations", *Poultry Science*, **85**, pp.1327-1329.
- [26] Trần Xuân Hoàn, Phạm Thị Phương Mai, Nguyễn Thị Quỳnh Châu, Trần Xuân Toàn (2008), "Đa hình gen BF2 và gen Mx ở một số giống gà nội", *Tạp chí KH&CN Chăn nuôi*, **số 20**, tr.71-78.
- [27] F.W. Li, S.B. Wang, D.G. Cao, B. Wu, G.M. Li, H.X. Han, Y. Zhou, Q.X. Lei, Y. Lu (2012), "Associations between Immune Traits and MHC B-F Gene in Shandong Indigenous Chickens", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **11(19)**, pp.3481-3485.