

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Hồng Nhung

**PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH CỦA MỘT SỐ GEN THUỘC HỌ CALPAIN
(CAPN) LIÊN QUAN ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CƠ Ở CÁ TRA
(*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Hồng Nhung

**PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH CỦA MỘT SỐ GEN THUỘC HỌ CALPAIN
(CAPN) LIÊN QUAN ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CƠ Ở CÁ TRA
(*Pangasianodon hypophthalmus*)**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Kim Thị Phương Oanh

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Nguyễn Thị Hồng Nhung

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Kim Thị Phương Oanh, Trưởng phòng Hệ gen học môi trường, Viện Nghiên cứu hệ gen đã định hướng ý tưởng nghiên cứu, lên kế hoạch, tận tình hướng dẫn, thường xuyên chỉ dạy kiến thức chuyên môn và tạo điều kiện tốt nhất giúp tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn tại phòng Hệ gen học môi trường – Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các anh chị phòng Hệ gen học môi trường đã luôn tận tình chỉ bảo và cho tôi những lời khuyên bổ ích trong quá trình học tập, nghiên cứu. Tôi cũng xin cảm ơn tất cả các cô chú, anh chị và bạn bè trong Viện Nghiên cứu hệ gen đã luôn giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện khoá luận tại đây.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo và các cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ và khoa Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi muốn cảm ơn bố mẹ, người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn bên cạnh, động viên và tiếp thêm niềm tin, động lực cho tôi trên con đường học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
MỤC LỤC.....	
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Giới thiệu chung về cá tra nuôi	3
1.1.1. Vị trí phân loại và đặc điểm sinh học.....	3
1.1.2. Tình hình nuôi trồng và xuất khẩu cá tra hiện nay.....	4
1.2. Quá trình phát triển cơ ở cá và các gen liên quan	5
1.2.1. Quá trình phát triển cơ ở cá.....	5
1.2.2. Các nghiên cứu về sự tăng trưởng ở cá xương.....	6
1.3. Đặc điểm và chức năng của họ gen calpain.....	8
1.3.1. Giới thiệu về protein calpain	8
1.3.2. Giới thiệu họ gen calpain	10
1.3.3. Tình hình nghiên cứu họ gen calpain ở trong nước và quốc tế.....	11
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	13
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.2.1. Xác định các gen thuộc họ calpain từ dữ liệu genome cá tra nuôi....	15
2.2.2. Phân tích so sánh các gen calpain thu được từ dữ liệu genome của cá tra nuôi	15
2.2.3. Xác định các vùng chức năng và bảo thủ của các gen calpain.....	15
2.2.4. Tách chiết RNA tổng số	15
2.2.5. Tổng hợp cDNA	16
2.2.6. Realtime PCR	16

2.2.7.	Phân tích kết quả realtime PCR.....	18
2.2.8.	Khuếch đại các gen bằng phản ứng PCR	19
2.2.9.	Giải trình tự các gen bằng phương pháp Sanger	20
2.2.10.	Phát hiện và sàng lọc các SNP trên các gen đích.....	21
3.	KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	22
3.1.	Kết quả.....	22
3.1.1.	Các gen thuộc họ gen calpain ở cá tra nuôi.....	22
3.1.2.	Cấu trúc miền chức năng của các gen calpain ở cá tra nuôi	26
3.1.3.	Cấu trúc gen của một số calpain điển hình ở cá tra nuôi.....	27
3.1.4.	Kết quả biểu hiện một số gen thuộc họ calpain ở một số mô khác nhau	29
3.1.5.	Dữ liệu về đa hình nucleotide đơn (SNP) một số gen calpain	31
3.2.	Thảo luận	34
3.2.1.	Thành phần và cấu trúc các gen thuộc họ calpain ở cá tra	34
3.2.2.	Biểu hiện đặc hiệu mô của một số gen calpain ở cá tra	38
3.2.3.	Đa hình trên gen <i>CAPN3b</i> liên quan tới tính trạng tăng trưởng.....	40
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	41
	DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	42

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
PCR	Polymerase Chain Reaction	
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
MAS	Marker Assisted Selection	
GS	Genome Selection	
SR		Mạng lưới cơ tương
EBV	Estimated breeding value	Giá trị chọn giống ước đoán
ID	Identification	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
NCBI	The National Center for Biotechnology Information	
NGS	Next-Generation Sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
RNA	Ribonucleic acid	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
IS	Insert	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2. 1. Bộ mẫu làm realtime PCR	13
Bảng 2. 2. Thông tin bộ mẫu 20 cá thể cá tra nuôi	14
Bảng 2. 3. Các môi sử dụng cho phản ứng realtime PCR.....	17
Bảng 2. 4. Danh sách các môi sử dụng cho phản ứng PCR.....	20
Bảng 3. 1. Các trình tự thuộc họ gen calpain trên genome của cá tra nuôi	22
Bảng 3. 2. Các gen calpain thuộc họ gen calpain của <i>P.hypophthalmus</i>	25
Bảng 3. 3. Kết quả đo nồng độ RNA tổng số của các mô từ các cá thể cá tra.....	29
Bảng 3. 4. Danh sách các SNP được phát hiện trên vùng promoter gen CANP3	33

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1. 1. Cá tra <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	3
Hình 1. 2. Các hướng tăng trưởng cơ ở cá xương.....	6
Hình 1. 3. Cấu trúc các calpain ở người.....	9
Hình 2. 1. Cấu trúc một số gen <i>CAPN</i> và gen <i>EF1α</i> và vị trí các cặp mồi được thiết kế cho phản ứng realtime PCR.....	18
Hình 2. 2. Vị trí các cặp mồi thiết kế cho phản ứng PCR.....	19
Hình 3. 1. Cây chủng loại phát sinh của các trình tự protein calpain.	24
Hình 3. 2. Cấu trúc của các protein calpain của cá tra nuôi.....	26
Hình 3. 3. Cấu trúc một số gen calpain điển hình ở cá tra nuôi.....	28
Hình 3. 4. Ảnh điện di RNA tổng số tách từ mô não, gan, cơ của 5 mẫu cá tra.....	30
Hình 3. 5. So sánh sự biểu hiện của một số gen calpain ở một số mô cá tra.	31
Hình 3. 6. Ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại.....	32
Hình 3. 7. Kết quả phát hiện SNP ở <i>CAPN3</i>	34
Hình 3. 8. So sánh trình tự axit amin <i>CAPN3</i> của cá tra nuôi với các loài khác	37

MỞ ĐẦU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài thủy sản mang lại giá trị kinh tế lớn cho quốc gia, là đối tượng nuôi chủ lực để tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, nghề nuôi cá tra ở Việt Nam đang gặp nhiều thách thức lớn như chất lượng giống bị giảm sút, dịch bệnh xảy ra hàng năm gây thiệt hại lớn. Do vậy, để phát triển bền vững ngành thủy sản nói chung và nuôi trồng cá tra nói riêng, cần thực hiện nâng cao chất lượng chọn giống.

Việc kết hợp giữa di truyền số lượng và di truyền phân tử tạo vật liệu ban đầu cho chọn giống cá tra theo tính trạng tăng trưởng, đặt nền móng cho công tác chọn giống và nghiên cứu đa dạng sinh học của giống thủy sản có giá trị kinh tế cao này. Các nghiên cứu cơ bản như: nghiên cứu chức năng gen, cơ chế điều khiển hoạt động các gen và đa dạng di truyền của các gen nhằm hướng tới xác định chỉ thị phân tử theo các hướng tăng trưởng, khả năng chống chịu bệnh..., góp phần làm tăng hiệu quả của quá trình chọn giống. Hiện nay, hướng nghiên cứu ứng dụng di truyền phân tử trong các chương trình chọn giống có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử MAS (Marker Assisted Selection) đang là một trong những xu thế hiện đại tiếp cận với trình độ của thế giới. Để tìm ra các chỉ thị phân tử này, nghiên cứu sự đa dạng di truyền của các gen liên quan đến tính trạng quan tâm là một trong những phương pháp hữu hiệu.

Họ gen calpain là những ứng cử viên tiềm năng để nghiên cứu đa dạng di truyền liên quan đến các tính trạng tăng trưởng do có vai trò quan trọng đối với sự phát triển cơ nói riêng và sự sinh trưởng nói chung. Các nghiên cứu hiện nay với họ gen calpain hầu hết tập trung ở động vật có vú, còn ở cá xương thì còn hạn chế. Cá tra nuôi thuộc lớp cá xương có chứa nhiều loại calpain điển hình. Tuy nhiên, họ gen này chưa được nghiên cứu về tổng thể cũng như sự liên quan của nó đối với tính trạng sinh trưởng ở cá tra.

Mục tiêu đề tài:

Đề tài “**Phân tích đặc tính của một số gen thuộc họ calpain (capn) liên quan đến sự phát triển cơ ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)**” được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu là bước đầu phân tích đặc tính của một số gen thuộc họ calpain, trên cơ sở đó phục vụ nghiên cứu sâu hơn nhằm

phát triển chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng tăng trưởng ở cá tra nuôi (*P. hypophthalmus*).

Nội dung nghiên cứu cứu chính:

Nội dung 1: Khai thác cơ sở dữ liệu genome cá tra nhằm tìm kiếm các gen thuộc họ calpain. Phân loại và phân tích cấu trúc các gen thuộc họ calpain ở cá tra.

Nội dung 2: Khảo sát, đánh giá sự biểu hiện của một số gen thuộc họ calpain trên một số mô cơ quan của cá tra bằng phương pháp realtime PCR..

Nội dung 3: Phân lập và xác định trình tự một số gen thuộc họ calpain của các cá thể thuộc nhóm cá tra sinh trưởng nhanh và sinh trưởng chậm bằng phương pháp PCR và giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Phát hiện và sàng lọc đa hình nucleotit đơn (SNP) của một số gen thuộc họ calpain ở cá tra liên quan đến tính trạng tăng trưởng.

Những đóng góp của luận văn: Đã xác định được 22 gen thuộc họ calpain trong cơ sở dữ liệu genome cá tra nuôi (*P. hypophthalmus*). Đã phân loại và phân tích được đặc điểm cấu trúc các gen thuộc họ calpain. Đã đánh giá biểu hiện của 5 gen thuộc họ calpain ở các mô não, gan, cơ của cá tra. Đã phát hiện và sàng lọc được một số SNP tiềm năng nằm trên vùng promoter của gen *CAPN3* có liên quan đến tính trạng tăng trưởng của cá tra.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu chung về cá tra nuôi *Pangasianodon hypophthalmus*

1.1.1. Vị trí phân loại và đặc điểm sinh học

Cá tra nuôi (*Pangasianodon hypophthalmus*), thuộc họ cá tra (*Pangasiidae*), bộ cá da trơn hay cá nheo (*Siluriformes*), là loài cá bản địa ở lưu vực sông Mê Kông (Việt Nam, Thái Lan, Lào, Campuchia), được nuôi phổ biến và mang lại giá trị kinh tế lớn cho Việt Nam và một số quốc gia khác thuộc khu vực miền nam châu Á.



Hình 1. 1. Cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*

A. Con non [1]; B. Con trưởng thành [2]

Cá tra nuôi *P. hypophthalmus* là cá da trơn, thân thon dài, phần sau dẹt; đầu cá tương đối nhỏ, mắt lớn, miệng rộng, răng nhỏ và sắc nhọn; vây màu xám đậm hoặc đen, tia vây lưng 6, lưng xám đen, bụng hơi bạc, con non có một sọc đen theo đường bên. Cá tra nuôi sống đáy với phạm vi pH từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ từ 22 đến 26°C [3].

Cá tra có tính ăn tạp, với thức ăn gồm động vật phù du, động vật giáp xác, tảo, thực vật bậc cao và cá nhỏ. Khi trong quá trình ương thành cá giống ở ao, thức ăn công nghiệp và động vật phù du là nguồn thức ăn chính. Khi trưởng thành, cá tra thể hiện tính ăn rộng, ăn tạp thiên về động vật [3].

Về sinh sản, trong điều kiện nuôi nhốt cũng như tự nhiên, cá đực là mất 2 năm còn cá cái khoảng 3 năm để tới tuổi thành thực. Vào khoảng từ tháng 5

đến tháng 6 dương lịch là thời điểm sinh sản của cá tra. Cá tra có tập tính di cư ngược dòng, chúng sẽ di cư để tự nhiên trên những khúc sông có điều kiện sinh thái phù hợp, sau khi đẻ trứng khoảng 24 giờ thì trứng sẽ nở thành cá bột và trôi về hạ nguồn. Một con cái trưởng thành nặng khoảng 10 kg có thể đẻ hơn 1 triệu quả trứng. Ở Việt Nam đã ghi nhận trong điều kiện nuôi lồng cá tra nuôi có lần sinh sản thứ hai cách lần đầu khoảng 6 đến 17 tuần so với cá tra tự nhiên sinh sản 2 lần mỗi năm [3].

1.1.2. Tình hình nuôi trồng và xuất khẩu cá tra hiện nay

Cá tra mang lại giá trị dinh dưỡng cao với nhiều loại vitamin và axit béo mà cơ thể con người không thể tự tổng hợp được. Trong mỡ cá tra các axit béo không no không có cholesterol chiếm phần trăm lớn nên có lợi cho sức khỏe, không gây tăng cân. Nhờ giá trị dinh dưỡng, hương vị ngon sau nấu, giá cả phù hợp nên cá tra được người tiêu dùng ưa chuộng, nhất là ở châu Âu và châu Mỹ.

Diện tích thả nuôi cá tra cả nước ở năm 2022 đạt khoảng 5,500 ha; sản lượng 1,6 triệu tấn. Ngành cá tra đã mang về nguồn ngoại tệ lớn mỗi năm với kim ngạch xuất khẩu từ 1,5 -2,4 tỷ USD/năm, riêng cá tra đã chiếm 16-26% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản của Việt Nam. Theo báo cáo từ Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), năm 2022 cá tra là ngành xuất khẩu khởi sắc nhất trong các ngành hàng thủy sản và đã chinh phục hơn 140 thị trường trên thế giới trong đó có các thị trường truyền thống và khát khe như Mỹ, EU, Nhật Bản. Kim ngạch xuất khẩu đạt 2,4 tỷ USD tăng 70% so với cùng kỳ năm 2021. Hai thị trường Trung Quốc và Mỹ chiếm trên 53% tỷ trọng chi phối đối với sản phẩm cá tra xuất khẩu của Việt Nam [4]. Tuy nhiên đầu năm nay 2023, do lạm phát nên xuất khẩu cá tra giảm sâu 61% so với cùng kỳ năm 2022. Riêng với Đức, tăng trưởng xuất khẩu cá tra tăng mạnh ở thị trường này, tính đến hết tháng 2/2023, xuất khẩu cá tra sang Đức đạt hơn 6,2 triệu USD, tăng 81% so với cùng kỳ năm 2022 và chiếm 2,6% tổng giá trị xuất khẩu cá tra của Việt Nam [4].

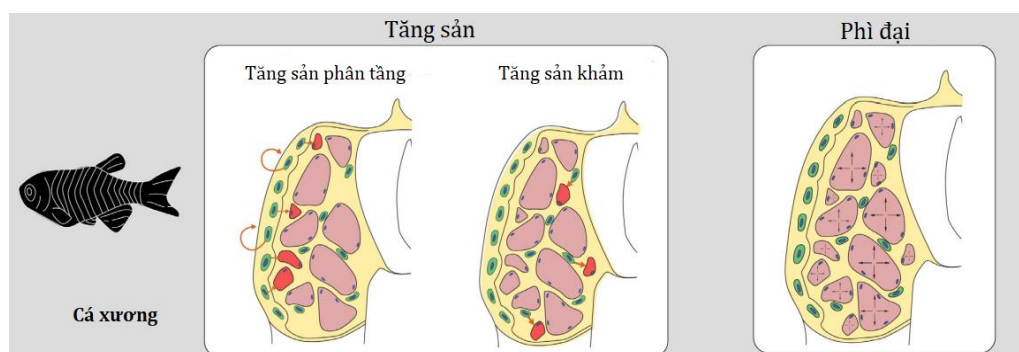
Cá tra (*P. hypophthalmus*) là loài thủy sản mang lại giá trị kinh tế lớn cho quốc gia, là đối tượng nuôi chủ lực để tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, nghề nuôi cá tra ở Việt Nam đang gặp nhiều thách thức lớn như chất lượng giống bị giảm sút, dịch bệnh xảy ra hàng năm gây thiệt hại lớn

như: bệnh gan thận mủ, bệnh xuất huyết, bệnh ký sinh trùng, thối đuôi, bệnh trương bóng hơi,... Do vậy, để phát triển bền vững ngành thủy sản nói chung và nuôi trồng cá tra nói riêng, cần thực hiện nâng cao chất lượng chọn giống. Các nghiên cứu cơ bản như: nghiên cứu chức năng gen, cơ chế điều khiển hoạt động các gen và đa dạng di truyền của các gen nhằm hướng tới xác định chỉ thị phân tử theo các hướng tăng trưởng, khả năng chống chịu bệnh..., góp phần làm tăng hiệu quả của quá trình chọn giống. Hiện nay, hướng nghiên cứu ứng dụng di truyền phân tử trong các chương trình chọn giống MAS (Marker Assisted Selection) và GS (Genome Selection) đang là xu thế hiện đại tiếp cận với trình độ của thế giới. Để tìm ra các chỉ thị phân tử này, nghiên cứu sự đa dạng di truyền của các gen liên quan đến tính trạng quan tâm là một trong những phương pháp hữu hiệu. Đặc biệt, gần đây hệ gen cá tra nuôi (*P. hypophthalmus*) đã được giải mã bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, đây là dữ liệu genome đầu tiên của cá tra có thể dùng làm trình tự tham chiếu cho các nghiên cứu tiếp theo [5].

1.2. Quá trình phát triển cơ ở cá và các gen liên quan

1.2.1. Quá trình phát triển cơ ở cá

Quá trình phát triển cơ xuất hiện ở giai đoạn sớm của phôi thai và sự phát triển này được thúc đẩy bởi các tế bào tiền thân sinh cơ và các yếu tố kích thích từ môi trường bao gồm nhiệt độ và oxi. Trong mọi trường hợp, quá trình sinh cơ đều liên quan đến sự tăng sinh của các nguyên bào cơ, di cư, hợp nhất và biệt hoá tế bào. Cơ trưởng thành không phải một mô đồng nhất mà bao gồm một số loại tế bào tương tác với nhau để tạo mô hình tăng trưởng. Ngoài ra, sự phát triển của tuần hoàn mao mạch, bạch huyết và các cơ quan ngoài cơ (hệ tiêu hoá, nội tiết, thần kinh và miễn dịch) làm tăng cường trao đổi thông tin giữa các mô với môi trường bên ngoài dẫn tới điều hoà quá trình tăng trưởng phức tạp hơn. Ở cá xương, quá trình gia tăng khối lượng cơ và kích thước cơ thể không dừng lại trong suốt vòng đời (mô hình tăng trưởng không xác định). Từ giai đoạn phôi thai tới con trưởng thành, khối lượng sợi cơ gia tăng liên tục cho tới khi đạt tới 40-50% chiều dài tối đa của cơ thể [6].



Hình 1. 2. Các hướng tăng trưởng cơ ở cá xương [7]

Sự phát triển cơ diễn ra theo hai cách (Hình 1.2): tăng sản (là sự gia tăng số lượng cơ) và phì đại (là sự gia tăng kích thước của các cơ hiện có). Cả hai quá trình này diễn ra đồng thời trong suốt vòng đời của cá, nhưng chúng chiếm ưu thế trong các giai đoạn riêng biệt. Ở giai đoạn đầu phát triển, tăng sản chiếm ưu thế với hai giai đoạn xảy ra tuần tự: tăng sản phân tầng và tăng sản khảm. Tăng sản phân tầng là sự bổ sung các sợi mới dọc theo bề mặt bên của bó cơ, còn tăng sản khảm là sự bổ sung rải rác của các sợi cơ trong toàn bộ hệ cơ. Qua giai đoạn này, khi số lượng sợi cơ đạt tối đa, quá trình tăng sản sẽ bị ức chế và quá trình phì đại sẽ chiếm ưu thế ở giai đoạn sau. Tuy nhiên, quá trình này còn dựa trên áp lực chọn lọc của khối lượng cơ thể và hoạt động trao đổi chất cũng như các yếu tố môi trường [7].

1.2.2. Các nghiên cứu về sự tăng trưởng ở cá xương

Sự tăng trưởng của cá chủ yếu phụ thuộc vào sự phát triển của cơ được quy định bởi mạng lưới biểu hiện gen của sự tăng sinh tế bào cơ và chuyển hoá protein. Một số gen/họ gen liên quan tới tăng trưởng đã được nghiên cứu như: Các yếu tố tăng trưởng giống insulin (Insulin Like Growth Factors - *IGFs*), Hormone tăng trưởng (Growth Hormone - *GH*), *Pax-7* (Paired box proteins-7), Các yếu tố điều hòa (Myogenic regulatory factors - *MRFs*), Myostatin (*MSTN*) và họ gen Calpain (*CAPN*),...[8]. Cụ thể, phì đại tế bào cơ trong quá trình tái tạo cơ, tăng sinh và biệt hóa các tế bào tiền thân của cơ cũng như kích thích tăng trưởng được kiểm soát bởi *IGFs* [9]. Hormone tăng trưởng GH là chất điều hòa chính kiểm soát sự phát triển soma và ảnh hưởng đến sự phát triển cơ ở cá thông qua kiểm soát phì đại cơ [10]. Theo Kacperczyk, *Pax-7* là một gen có vai trò thiết yếu trong quá trình tăng sản và phì đại cơ ở cá và sự tăng sinh của tế bào myogen trong quá trình hình thành

cơ thứ cấp được kiểm soát bởi gen này [11]. Các yếu tố điều hòa (*MRFs*) như myogenin, myoblast cũng có liên quan tới tăng trưởng cơ vì đều tham gia vào sự phát triển và biệt hóa của các tế bào cơ [12]. Ngoài ra, theo Mc Pherron và cộng sự, gen *MSTN* đóng vai trò thiết yếu trong tăng trưởng cơ ở cá bằng cách điều hòa chu trình tế bào ở mô [13].

Phát triển cơ ở cá phát triển nhờ cả tăng sản và phì đại. Hơn nữa, ở loài cá lớn tăng trưởng nhanh, cả tăng sản và phì đại đều góp phần vào sự phát triển cơ. Trái ngược với cá lớn, cá nhỏ chậm phát triển, chủ yếu dựa vào phì đại và tỷ lệ tăng sản cơ khá thấp. Do đó, các gen giống nhau có thể có cơ chế biểu hiện và điều hòa khác nhau ở các loài cá khác nhau [14]. Sự đa hình ở gen đã được nghiên cứu để tìm ra sự liên quan giữa đa hình ở các gen này với tính trạng tăng trưởng ở cá, từ đó, sàng lọc các chỉ thị phân tử phục vụ cho chọn giống trong nuôi trồng thủy sản. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện, ví dụ, nghiên cứu gần đây của nhóm chúng tôi về đa hình đơn liên quan tới tính trạng sinh trưởng ở cá tra (*P. hypophthalmus*) đã phát hiện một đa hình đơn nucleotide (SNP) (13,680 A>T trên intron 2) của gen *IGF1*, gen *IGF1R* phát hiện 3 SNP (13,357 T>C; 15,392 T>A trên intron 1 và 83,894 A>G trên intron 15) [3]. Một nghiên cứu khác cho thấy trên gen *GH* ở cá quế (*Siniperca chuatsi*) có các SNP liên quan tới sinh trưởng. SNP tìm thấy trên intron 4 của gen này là g.4940 A>C và g.4948 A>T, 1 SNP trên exon 5 (g.5045 T>C) và 1 SNP trên intron 5 (g.5234 T>G) [15]. Ở cá mè (*Aristichthys nobilis*), trên gen myostatin (*MSTN*) phát hiện hai SNP g.1668T>C trong intron 2 và g.2770 C>A trong vùng 3'UTR đã được xác định có liên quan tới sự tăng trưởng và phát triển ở cơ xương. Đặc biệt SNP g.2770 C>A liên quan đáng kể tới chiều dài và trọng lượng cơ thể [16]. Một nghiên cứu khác ở gen *MSTN*, hai SNP liên quan chặt chẽ tới tính trạng khối lượng cơ thể được phát hiện ở cá chép (*Cyprinus carpio*) là c.42A>G và c.72C>T ở exon 3 [17].

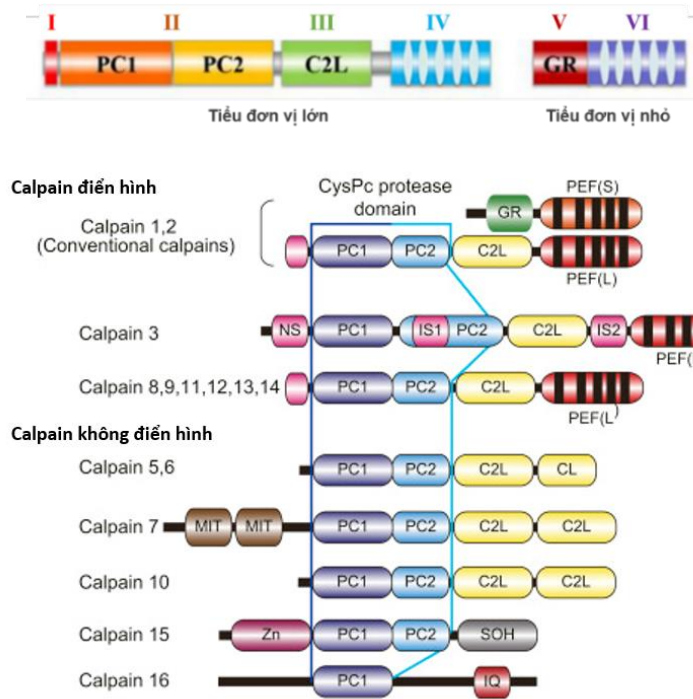
Ngoài các gen liên quan tới sự tăng trưởng đã được đề cập ở trên, một họ gen có liên quan đến sự phát triển của cơ và các phản ứng tổng hợp nguyên bào cơ là họ gen calpain. Họ gen này đóng một vai trò quan trọng đối với các quá trình sinh lý của cơ do khả năng phân giải các protein sợi cơ và cơ chế dung hợp nguyên bào sợi trong quá trình tạo cơ [18]. Có thể thấy, gen

calpains là ứng viên tiềm năng trong nghiên cứu sự đa dạng di truyền nhằm tìm kiếm chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng sinh trưởng.

1.3. Đặc điểm và chức năng của họ gen calpain.

1.3.1. Giới thiệu về protein calpain

Calpain (EC 3.4.22.17; Clan CA, family C02) là một protease nội bào phụ thuộc vào nồng độ Ca^{2+} được khám phá năm 1964. Theo các nghiên cứu trước, họ calpains là siêu họ tồn tại khắp các sinh vật từ vi khuẩn đến con người, ngoại trừ vi khuẩn cổ và vi rút. Cấu trúc calpain đặc biệt với vùng cấu trúc bảo thủ cysteine-proteinase (CysPC) và dựa vào cách sắp xếp của các domain khác, phân loại calpain thành: calpain điển hình (Classical calpains) và calpain không điển hình (Non-classical calpains). Calpain điển hình gồm calpain-1, -2, -3, -8, -9, -11, -12, -13, -14. Calpain không điển hình bao gồm calpain -5, -6, -7, -10 và -15. Các calpain điển hình thường bao gồm vùng CysPC, vùng Calpain III (C2L) và vùng PEF-hand. Ngược lại, calpain không điển hình không có vùng PEF-hand và thêm một số vùng mới. Thành viên đặc trưng nhất của họ calpain là CAPN1 và CAPN2. Cả CAPN1 và CAPN2 bao gồm 2 tiểu đơn vị riêng biệt, một tiểu đơn vị lớn (tiểu đơn vị xúc tác) khối lượng 80 kDa và một tiểu đơn vị nhỏ (tiểu đơn vị điều hoà) khối lượng 30kDa.



Hình 1. 3. Cấu trúc các calpain ở người [19, 20]

Tiểu đơn vị xúc tác chia thành 4 miền (I đến IV) và tiểu đơn vị điều hoà chia thành 2 miền (V đến VI) tương ứng [21] (Xem Hình 1.3). Miền I thực sự không phải một domain, mà là một chuỗi xoắn đơn gồm 10 gốc acid amin. Chuỗi xoắn này rất quan trọng đối với sự ổn định và kích hoạt của một số calpains, nhưng một số thành viên khác lại có cấu trúc độc đáo, thay vào đó, tại đầu N là các trình tự “ngón tay kẽm”- Zn-fingers. Miền II là lõi xúc tác cysteine-protease có bộ ba xúc tác Cys-His-Asn. Miền III (calcium and phospholipid binding C2-like domain) cho thấy trình tự amino acid không có sự tương đồng đáng kể với các trình tự khác trong cơ sở dữ liệu. Cấu trúc 3D của CAPN2 đã tiết lộ miền này giống miền C2 (C2-Like) có khả năng liên kết với canxi và phospholipid được tìm thấy trong một số protein điều hoà bởi Ca^{2+} như kinase C và synaptotag-mins. Miền V của tiểu đơn vị điều hoà chứa glycine tham gia vào tính chất kỵ nước. Miền này có cấu trúc linh hoạt, không neo giữ với các thành phần khác của phân tử calpain. Khác với cấu trúc của calpain điển hình, calpain không điển hình thường không có miền III và IV, một số calpain có thêm một số miền mới không có ở calpain điển hình. Miền IV (penta EF-hand calmodulin-like domain) khá giống với miền VI ở tiểu đơn vị nhỏ, có 5 EF-hand trong 1 domain. EF-hand thứ 5 của miền IV và VI có sự tương tác với nhau hình thành một heterodimer. Mỗi EF-hand đều có một ít sự tương đồng với mô-đun của calmodulin. Thêm vào đó, họ protein penta-

EF-hand được biết có khả năng tạo homo- và/hoặc hetero-dimers, và liên kết với Ca^{2+} [22].

Ngoài ra, calpains cũng được phân loại dựa vào mức độ biểu hiện ở các mô khác nhau, gồm: calpain phổ biến (ubiquitous types) và calpain đặc hiệu mô (tissue-specific types) [23]. Calpain phổ biến đóng một vai trò cơ bản trong tất cả các tế bào, trong khi calpain đặc hiệu mô có liên quan đến các chức năng cụ thể trong tế bào. Ở người, các calpain đặc hiệu mô đã được xác định cho đến nay là: CAPN3 [p94] trong cơ xương, CAPN6 trong nhau thai và cơ vân phôi, CAPN8 [nCL-2] và CAPN9 [nCL-4] trong đường tiêu hóa, CAPN11 trong tinh hoàn, và CAPN12 trong nang lông [23]. Riêng ở cá xương, calpains phân bố rộng rãi trong tất cả các mô, đặc biệt là tim, não và cơ [24]. Mặc dù các thành phần của họ calpain được nghiên cứu khá sâu rộng ở cá xương, nhưng cấu trúc và chức năng các gen thuộc họ calpain vẫn chưa được nghiên cứu nhiều ở đối tượng này.

1.3.2. Giới thiệu họ gen calpain

Calpain có hoạt tính phân giải protein hạn chế, khác với proteasomes và lysosomes ở một hoặc hai đặc điểm. Thứ nhất, calpain biến đổi mục tiêu bằng sự thủy phân hạn chế từ đó thay đổi chức năng của các mục tiêu đó mà không phá hủy chúng. Thứ hai, bản thân calpain có liên quan đến việc nhận dạng mục tiêu cần phân giải, trong khi proteasomes và lysosomes xác định mục tiêu bởi chúng được ‘gắn tín hiệu’ nhờ cơ chế như tự thực bào (autophagy). Bằng cách này, calpains đã tham gia điều khiển rất nhiều chu trình như biểu hiện gen, truyền tín hiệu nội bào, biệt hoá, di cư, tăng sinh tế bào, apoptosis... [25].

Calpains là protease phụ thuộc Ca^{2+} liên quan đến các chức năng tế bào khác nhau, bao gồm tăng sinh và biệt hóa tế bào, tái tạo mô và xơ hóa. Có ba loại calpain chiếm ưu thế trong cơ xương, đó là CAPN1, CAPN2 và CAPN3. Calpain tham gia vào quá trình luân chuyển protein và tái tạo cơ bằng cách phân cắt có chọn lọc các protein đích và tạo các protein phân mảnh có hoạt tính sinh học. Calpain có vai trò trong tái tạo cơ xương gồm: biến đổi sarcomere, sửa chữa màng, hình thành mối nối bộ ba, tín hiệu tế bào, chức năng ti thể và tái tạo protein. Nhờ vào thành phần cấu trúc của calpain mà nó có khả năng phân cắt chọn lọc các vị trí cụ thể trên protein đích, cũng như

phân cắt các protein mà hệ thống phân giải protein khác không tiếp cận được (như proteasome). Calpains đóng vai trò quan trọng đối với quá trình luân chuyển protein của cơ xương và có thể hoạt động độc lập và ngược dòng với các hệ thống phân giải protein khác. Calpain lần đầu được ghi nhận là tác nhân kích hoạt quá trình phân hủy protein trong khi ATP trong cơ xương bị cạn kiệt. Sự phân hủy xảy ra khi hệ thống proteasome autophagy và ubiquitin bị bất hoạt do rò rỉ Ca^{2+} từ mạng lưới cơ tương (SR), do đó kích hoạt calpain. Ngoài ra, chất ức chế cụ thể của calpain là calpastatin cũng được tìm thấy trong cơ xương, nó là chất ức chế nội sinh đặc hiệu với calpain. Hoạt động của calpains được điều hòa bởi chất ức chế nội sinh calpastatin, chất này ngăn chặn cả hoạt hóa enzyme và biểu hiện hoạt tính xúc tác [18].

Trong nuôi trồng thủy sản, tốc độ tăng trưởng của cá và chất lượng phi lê là những đặc điểm quan trọng ảnh hưởng đến lợi nhuận. Tốc độ tăng trưởng của cá phụ thuộc trực tiếp vào khối lượng cơ xương. Cơ xương chiếm hơn một nửa tổng trọng lượng cơ thể và chứa chủ yếu là protein. Ở cá xương, tốc độ tổng hợp và phân hủy protein có vai trò quan trọng đối với sự tăng trưởng không xác định. Hầu hết các nghiên cứu về cơ chế tăng trưởng của cơ cá đều tập trung vào điều hòa tổng hợp protein và điều hòa hoạt động của các enzym phân giải protein. Sự điều hòa tăng hoặc giảm của các enzym phân giải protein làm ảnh hưởng đáng kể đến sự tích lũy protein trong cơ. Có 3 yếu tố chính tham gia vào quá trình quyết định độ mềm của thịt, đó là hàm lượng collagen, độ dai, mức độ rút ngắn của cơ và cuối cùng là độ lão hóa. Những yếu tố này thay đổi theo thời gian, nhiệt độ, kiểu gen, loại cơ và tùy từng loài động vật. Tuy nhiên, điểm chung quyết định độ mềm của thị là sự kích hoạt của các enzyme protein phân giải (calpains, cathepsins và caspase) chịu trách nhiệm cho sự thoái hóa của sợi cơ.

1.3.3. Tình hình nghiên cứu họ gen calpain ở trong nước và quốc tế

Ở cá xương, các thành phần của họ calpain điển hình đã được nghiên cứu ở một số loài, nhưng cấu trúc và chức năng của các gen thuộc họ calpain vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Một số protein chính đã được nghiên cứu ở cá xương gồm : calpain 1 (CAPN1), calpain 2 (CAPN2), calpain 3 (CAPN3), calpain 11 (CAPN11). Ở cá ngựa vằn (*Danio rerio*) cũng phát hiện gen *CAPN1*, *CAPN2* và *CAPN3*, tuy nhiên cấu trúc hay vai trò của gen chưa được

ngiên cứu sâu [26]. Ngoài ra, nghiên cứu ở cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) cho thấy ảnh hưởng của việc hạn chế chất dinh dưỡng đối với các gen *CAPN1*, *CAPN2*, *CAPN3* [27]. Salem và cộng sự đã mô tả gen *CAPN1*, *CAPN2* mã hóa protein calpain ở cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) [28]. McQueen và cộng sự cũng mô tả sự biểu hiện của gen *CAPN1*, *CAPN2-LIKE*, *CAPN3* và *CAPN11* ở cá bơn Đại Tây Dương (*Hippoglossus hippoglossus L.*) [29]. Họ gen calpain cũng được nghiên cứu nhiều ở những loài khác, đặc biệt ở gia súc và gia cầm. Ví dụ: ở gà, đa hình nucleotide đơn (SNP) 3535 trong gen *CAPN1* và SNP trong *CAPN9* có ảnh hưởng đến độ mềm và các đặc điểm chất lượng thịt [30, 31]; SNP 316 trong gen *CAPN1* ở bò Aceh, một loại bò thịt địa phương của Indonesia, có vai trò quan trọng trong hình thành thịt đỏ, là dấu hiệu tiềm năng để xác định di truyền tính trạng thịt đỏ mềm ở bò [32]; SNP g.44C>T được tìm thấy trên gen *CAPN4* được cho là liên quan tới chất lượng thịt cừu Ấn Độ [33]. Ở cá, nhiều nghiên cứu cho thấy một số gen thuộc họ calpain liên quan đến sự phát triển cơ [27, 28], tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về đa hình trên gen calpain và sự liên quan của SNP trên các gen này với tính trạng sinh trưởng. Hiện nay, trong nước cũng đã có một số các nghiên cứu liên quan tới sự tăng trưởng của cá như: nghiên cứu của Trang (2022) đã tìm thấy một số SNP trên gen *IGF1* ở cá tra (*Pangasianodo hypophthalmus*) liên quan tới tính trạng sinh trưởng [34]; nghiên cứu của Anh (2022) về đặc điểm của họ gen calpain ở cá tra (*Pangasianodo hypophthalmus*)[39].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Mẫu cá tra nuôi (*P. hypophthalmus*) được sử dụng cho nghiên cứu này được nuôi tại Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ, thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản và được kế thừa từ đề tài cấp nhà nước “Phân tích hệ gen của cá tra nhằm phát triển chỉ thị phân tử phục vụ chọn giống cá tra theo hướng tăng trưởng”, do TS. Kim Thị Phương Oanh làm chủ nhiệm. Các mẫu cá tra được chia làm 2 bộ như sau:

Bộ mẫu (1): mẫu mô lưu giữ trong dung dịch RNAlater phục vụ cho nghiên cứu đánh giá biểu hiện một số gen thuộc họ calpain ở một số mô cơ quan (não, gan, cơ) của cá tra nuôi bằng phương pháp realtime PCR (Bảng 2.1). Các cá thể cá tra này được chọn từ thế hệ thứ 3 (G3) cộng gộp của quần đàn chọn giống cá tra theo hướng tăng trưởng dựa trên phương pháp di truyền số lượng của Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2.

Bộ mẫu (2): mẫu mô lưu trong dung dịch Ethanol 100% - phục vụ cho nghiên cứu phát hiện và sàng lọc SNP trên gen đích liên quan tới sự phát triển cơ. Bộ mẫu sử dụng cho luận án này gồm 20 cá thể, trong đó có 10 cá thể sinh trưởng nhanh và 10 cá thể sinh trưởng chậm (Bộ mẫu kế thừa từ các đề tài trước). Bộ mẫu được lựa chọn dựa trên giá trị chọn giống ước đoán EBV. Đối với bộ mẫu sinh trưởng nhanh, chọn ra 10 cá thể có EBV cao nhất thuộc 9 gia đình có EBV trung bình cao nhất (ký hiệu từ N1 đến N10). Ngược lại, 10 cá thể có EBV thấp nhất thuộc 9 gia đình có EBV trung bình thấp nhất được chọn làm bộ mẫu sinh trưởng chậm (ký hiệu từ C1 đến C10). Mẫu nghiên cứu đã được mô tả trong nghiên cứu trước [34]. Thông tin về khối lượng cơ thể và EBV của các cá thể được trình bày ở Bảng 2.2.

Bảng 2. 1. Bộ mẫu làm realtime PCR

Ký hiệu mẫu	ID	Khối lượng	EBV	Gia đình
1	0418CC0DD2	12516	584	768
2	041518EEBD	1.9518	577.1	54
3	04179E0A62	0.4493	-426.7	233
4	0418C8504D	0.5232	-356.7	225
5	0418F7F4A3	1.912	629.7	180

Bảng 2. 2. Thông tin bộ mẫu 20 cá thể cá tra nuôi

10 cá thể cá tra tăng trưởng nhanh					
Ký hiệu mẫu	ID	Khối lượng	EBV	Gia đình	EBV gia đình
N1	0418CBE232	1969,8	400,9	131	173,1
N2	0418CBCBD7	2160	439,4	113	251,4
N3	0418CC3BB3	1702,6	420,9	38	170,7
N4	0418CBE610	1705,4	313,6	161	179,4
N5	0418CBCB67	1691,4	314,1	161	179,4
N6	0418CBF2A2	2017,8	366,5	175	232,1
N7	0418CBFB40	1439,2	310,7	180	213,1
N8	0418CBBF81	1585	405,4	30	263,6
N9	04179DF375	1269,8	295,8	105	205,7
N10	0418CBEE7B	1882,8	332,1	175	232,1
	Trung bình	1742,4±272.3	359,9±53.1		
10 cá thể cá tra tăng trưởng chậm					
Ký hiệu mẫu	ID	Khối lượng	EBV	Gia đình	EBV gia đình
C1	0418CBDC66	767,2	-170,4	51	-120,9
C2	0418F7E641	606	-124,3	200	-58,1
C3	0418CC464D	230,4	-220,7	249	-68,4
C4	0418CBD251	516,6	-195	51	-120,9
C5	0418CBD623	657,8	-153,3	114	3,3
C6	041799FD22	500,2	-148,5	31	-78,9
C7	0418F7CC7B	394,2	-230,5	255	-171,6
C8	0416D9227A	447	-127,9	174	-39,9
C9	04179E0B12	445,6	-155,3	31	-78,9
C10	0418CBDA71	557,2	-110,4	296	-45,9
	Trung bình	512,2±148.8	-163,6±40.6		

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Xác định các gen thuộc họ calpain từ dữ liệu genome cá tra nuôi

Các gen calpain trong bộ genome của cá tra nuôi được tìm kiếm bằng cách sử dụng các trình tự các gen thuộc họ calpain của các loài cá xương gần với họ với cá tra (được thu thập từ ngân hàng dữ liệu NCBI) làm trình tự truy vấn (query) khi sử dụng công cụ BLAST [35] tìm kiếm trình tự tương đồng trong cơ sở dữ liệu genome của cá tra nuôi *P.hypophthalmus* đã được giải mã bằng NGS [5] (bảng phụ lục 1).

2.2.2. Phân tích so sánh các gen calpain thu được từ dữ liệu genome của cá tra nuôi

Trình tự axit amin của các gen calpain ở cá tra nuôi được suy ra từ các trình tự gen tương ứng. Trình tự protein calpain từ các loài khác nhau (154 protein) có sẵn trong ngân hàng dữ liệu NCBI được sử dụng để phân tích cây phát sinh chủng loại nhằm phân loại các protein trong họ calpain (bảng phụ lục 2). Các trình tự protein suy diễn được đóng chuỗi (alignment) bằng phần mềm ClustalW với các cài đặt mặc định. Phần mềm MEGA 7.0 được sử dụng để dựng cây phát sinh loài bằng phương pháp neighbor-joining [36] với xác suất bootstrap được tính trên 1000 để đánh giá độ tin cậy.

2.2.3. Xác định các vùng chức năng và bảo thủ của các gen calpain

Các trình tự protein suy diễn từ các gen calpain được phân tích chức năng sâu hơn bằng công cụ web InterPro với tham số mặc định [37]. Các vùng chức năng được minh họa trong cấu trúc gồm các miền chức năng với các vị trí hoạt động và đặc trưng của từng protein.

2.2.4. Tách chiết RNA tổng số

Mẫu cá tra sử dụng trong nghiên cứu được thu trực tiếp từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu mô gan, não và cơ được cắt thành các mảnh nhỏ và ngay lập tức được ngâm trong dung dịch RNA sau đó, sau đó được bảo quản ở -80°C cho đến khi chiết xuất RNA.

RNA tổng số được tách từ các mô cơ quan của cá tra được thực hiện như sau: Sử dụng kẹp lấy mẫu, cắt khoảng 1cm^3 mỗi mô và rửa bằng RNase-Free water sau đó đưa mẫu vào ống eppendot 1,5 ml. Thêm 800 μl Trizol Reagent

vào ống ép chứa mẫu và nghiền mẫu bằng chày. Sau khi mẫu đã được nghiền nhỏ, ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút rồi ly tâm ống mẫu với tốc độ 12000rpm ở 4°C trong 10 phút, sau đó thu dịch nổi và giữ lạnh. Thêm một thể tích Chloroform tỉ lệ 1:1 với thể tích dịch nổi thu ở bước trước, vortex và ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm ống với tốc độ 12000rpm ở 4°C trong 10 phút, sau đó thu dịch nổi. Thêm một thể tích Propanol tỉ lệ 1:1 với thể tích dịch nổi thu được, đảo nhẹ bằng tay và ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút. Ly tâm ống mẫu với tốc độ 12000 rpm ở 4°C trong 5 phút và loại dịch để thu tủa. Tủa được rửa với 1ml EtOH 70% và ly tâm 12000 rpm ở 4°C trong 5 phút rồi loại cặn. Tủa được làm khô ở nhiệt độ phòng 10 đến 15 phút, sau đó hòa tủa trong Rna-Free water, bảo quản RNA ở tủ -80°C. RNA tổng số được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1,0% và đo nồng độ bằng máy đo quang phổ kế NanoDrop Lite (Thermo Sisher ScientiSic).

2.2.5. Tổng hợp cDNA

RNA tổng số đã tách được từ mẫu mô cơ, gan, não của cá tra được sử dụng để tổng hợp cDNA (sử dụng kit RevertAid First Strand cDNA synthesis của Thermo Scientific), Enzyme ReverseAid Transcriptase (RT) hoạt động ở 42-50°C, phù hợp để tổng hợp cDNA lên đến 13kb, Chất ức chế RiboLock Rnase trong bộ kit có hiệu quả bảo vệ RNA khỏi bị phân hủy.

2.2.6. Realtime PCR

Realtime PCR là kỹ thuật PCR khuếch đại DNA đích và định lượng trực tiếp sản phẩm PCR sau mỗi chu kỳ phản ứng dựa trên thuốc nhuộm sử dụng huỳnh quang liên kết với sợi DNA kép (dsDNA). Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp SYBR Green sử dụng bộ kit Luna Universal qPCR Master Mix (NewEngland BioLab) trên máy Lightcycle® 96 Instrument.

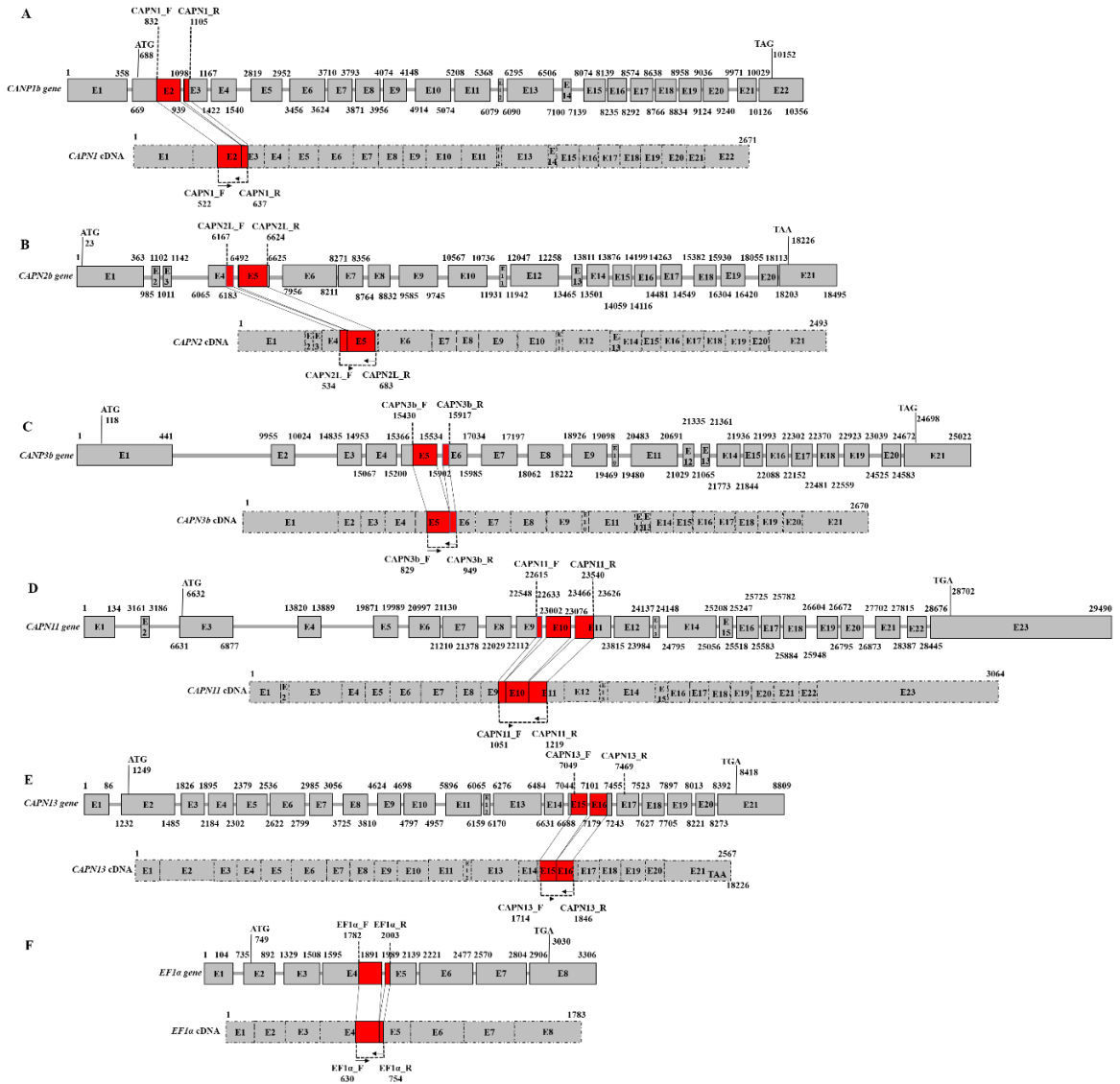
cDNA dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR với các cặp mồi thiết kế nằm trên vùng exon junction. Phản ứng realtime PCR được tiến hành để khuếch đại các đoạn gen với thể tích 20 µl: 1µl cDNA khuôn, 0,5 µl mỗi mồi (10 pmol/µl) và 10 µl Luna Universal qPCR Mix (NewEngland BioLab). Phản ứng được thực hiện trong điều kiện sau: Biến tính chung ở 95°C trong 5 phút, 45 chu kỳ (biến tính 95°C trong 30 giây, gắn mồi 51°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây). Cuối cùng là nhiệt độ chảy (cài đặt mặc định

theo máy) gồm 95°C trong 10 giây, 65°C trong 60 giây, 97°C trong 1 giây và làm mát ở 37°C trong 30 giây.

Các cặp mồi được sử dụng trong realtime PCR (Bảng 2.4) được thiết kế bởi phần mềm Primer 5.0 dựa trên chú thích của từng gen. Cấu trúc của các gen được phân tích và vị trí của các cặp mồi cho mỗi gen được thể hiện trong Hình 2.1.

Bảng 2. 3. Các mồi sử dụng cho phản ứng realtime PCR

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Vị trí trên gen	Kích thước (bp)
CAPN1_F	CGGTTATATGAGGACGAAACATTCC	Exon 2	116
CAPN1_R	CAGAACTCCGTGGGTCTCATCC	Exon 2- Exon 3 junction	
CAPN2_F	GAATCTTCCACTTTCAGTTCTGG	Exon 4– Exon 5 junction	150
CAPN2_R	TAGCGTAGGCCTTTTCCAATAGG	Exon 5	
CAPN3b_F	GGAGGTGTAACAGAATACTATG	Exon 5	121
CAPN3b_R	CAGTCGGTACCAAAGCATCTAT	Exon 5– Exon 6 junction	
CAPN11_F	CAGGGGCGTGGAGTGACAAT	Exon 9 – Exon 10 junction	169
CAPN11_R	TCACTTAGCGCATCCGGTGT	Exon 11	
CAPN13_F	GGAAATCAACGCAGAGCAG	Exon 15	133
CAPN13_R	TCCAGTAACTGAGAGATCCATC	Exon 16– Exon 17 junction	
EF1 α _F	CCAAGGAAGTCAGTGCTTACA	Exon 4	125
EF1 α _R	CTTGAACCATCCCATGTTTGTG	Exon 4– Exon 5 junction	



Hình 2. 1. Cấu trúc một số gen *CAPN* và gen *EF1α* và vị trí các cặp mồi được thiết kế cho phản ứng realtime PCR

A: Gen *CAPN1b*, B: Gen *CAPN2b*, C: Gen *CAPN3b*, D: Gen *CAPN11*, E: Gen *CAPN13*, F: Gen *EF1α*

Gen ID theo chú giải của NCBI lần lượt là 113541709 với *CAPN1b*, 113547602 với *CAPN2b*, 113532394 với *CAPN3b*, 113547580 với *CAPN11*, 113538997 với *CAPN13*, và 113536322 với *EF1α*.

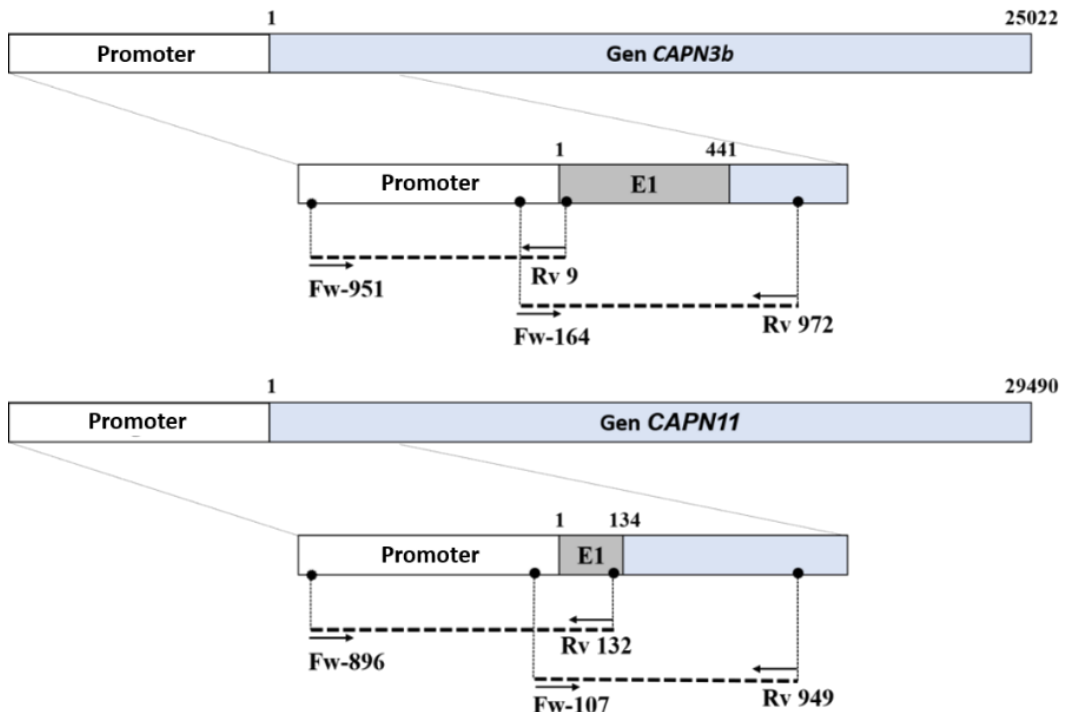
2.2.7. Phân tích kết quả realtime PCR

Kết quả thu được từ thí nghiệm realtime PCR được phân tích bằng phương pháp ΔC_t [38] nghĩa là mức độ biểu hiện của gen được đánh giá dựa trên tỷ lệ biểu hiện của gen calpain so với gen tham chiếu *EF1α* (elongation factor 1 alpha) được tính bằng giá trị $2^{-\Delta C_t}$. Trong đó $\Delta C_t = (C_t \text{ gen quan tâm}$

– $Ct_{EF1\alpha}$). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ biểu hiện giữa các gen calpain khác nhau trong mỗi mô được đánh giá bằng giá trị p-value < 0,05, được tính toán bằng phần mềm Graphpad Prism 9, sử dụng phép kiểm nghiệm t test khi so sánh hai biến hoặc bằng ANOVA khi so sánh 3 biến trở lên.

2.2.8. Khuếch đại các gen bằng phản ứng PCR (Polymerase chain reaction)

DNA tổng số tách từ mẫu mô vây cá tra được làm khuôn cho chuỗi phản ứng polymerase (PCR) để khuếch đại các vùng gen quan tâm, Các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự genome tham chiếu của các gen trên ngân hàng dữ liệu GenBank. Phản ứng PCR được tiến hành để khuếch đại các đoạn gen có tổng thể tích là 25 μ l, bao gồm: 12,5 μ l Taq 2X Master Mix (NEB), 1 μ l mồi xuôi và 1 μ l mồi ngược (10 pmol/ μ l), 1 μ l DNA khuôn (20 ng/ μ l) và 9,5 μ l nước cất tinh. Quá trình phản ứng khuếch đại PCR được thực hiện trong điều kiện sau: Biến tính chung ở 95°C trong 5 phút; tiếp đến là 40 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi với nhiệt độ đặc hiệu tương ứng với mỗi mồi trong 30 giây, kéo dài mồi ở 68°C trong 1 phút; cuối cùng là giai đoạn kéo dài hoàn thiện chuỗi phản ứng ở 68°C trong 8 phút.



Hình 2. 2. Vị trí các cặp mồi thiết kế cho phản ứng PCR

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% , nhuộm với ethidium bromide để quan sát dưới tia UV, Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Sisher ScientiSic) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2. 4. Danh sách các môi sử dụng cho phản ứng PCR

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Vị trí đoạn khuếch đại trên gen	Kích thước (bp)
Fw-896	CCACTCCGTAAAGTCTTCTCC	Promoter gen <i>CAPN11</i>	1027
Rv132	CTATTTCTCTCTCCGATTTGCC		
Fw-107	CCCTTCCCTACCCTTAGTCC	Exon 1 trên gen <i>CAPN11</i>	1056
Rv949	GTCACGATGCTGAGAAACCG		
Fw-950	GCAGCATTTTAAGCCAAAGCCTATG	Promoter gen <i>CAPN3</i>	959
Rv9	GTGCCTTGATATTCCTGGAGTC		
Fw-164	CCAAAAGAGGGAGAGAATGAG	Exon 1 trên gen <i>CAPN3</i>	1135
Rv972	ATGGCTGTAATTCCTAAATGG		

2.2.9. Giải trình tự các gen bằng phương pháp Sanger

Sản phẩm tinh sạch của phản ứng PCR được dùng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự bằng phương pháp Sanger sử dụng bộ kit BigDye Terminator v3,1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Sisher ScientiSic) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng được tiến hành trên đĩa PCR 96 giếng với chu trình nhiệt như sau: giai đoạn biến tính chung với điều kiện 96°C trong vòng 45 giây; 28 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: biến tính 96°C trong 10 giây, giai đoạn gắn môi ở 50°C trong 5 giây và kéo dài ở 60°C trong 2 phút; cuối cùng giữ lạnh ở 4°C.

Sản phẩm PCR Sequencing sau phản ứng được tiến hành tinh sạch theo quy trình như sau: Các mẫu trong đĩa tinh sạch được trộn đều bằng voltex và sau đó spin lắng mẫu. Thêm 2 µl EDTA 125 µM và 60 µl EtOH 100% vào mỗi mẫu và dán kín mặt đĩa. Đĩa mẫu được ly tâm với tốc độ 4000 rpm trong 30 phút ở 4°C, lúc này DNA kết tủa bám vào đáy giếng. Bỏ băng dính trên

mặt đĩa và đổ bỏ dung dịch trong đĩa lên giấy thấm bằng cách úp ngược đĩa. Bổ sung 60 μ l ethanol 80% vào mỗi giếng và dán đĩa lại, không trộn cùn trong giếng ở bước này. Ly tâm đĩa đựng mẫu với tốc độ 4000rpm ở 4°C trong 30 phút. Tiếp tục đổ bỏ dung dịch trong đĩa bằng cách úp ngược, sau đó ly tâm nhanh đĩa mẫu để loại bỏ hoàn toàn cùn trong các giếng mẫu. Làm khô đĩa mẫu bằng máy cô quay chân không trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Lúc này sản phẩm tinh sạch có thể được giữ lạnh ở 4°C và tránh ánh sáng cho tới khi biến tính và giải trình tự.

Sản phẩm PCR giải trình tự đã tinh sạch được đem biến tính thành sợi đơn trước khi cho lên máy đọc trình tự theo quy trình sau: Bổ sung 6 μ l HiDi vào mỗi giếng mẫu và ly tâm nhanh cho dung dịch lắng xuống đáy tiếp xúc với phần tua DNA. Đĩa mẫu được biến tính ở 98°C trong 2 phút trên máy PCR. Sau khi kết thúc chu trình nhiệt, lấy đĩa ra khỏi máy PCR và làm lạnh trên đá trong 5 phút. Lúc này sản phẩm tinh sạch đã sẵn sàng đưa vào máy giải trình tự. Trình tự các đoạn DNA điện di mao quản và đọc tín hiệu huỳnh quang trên máy giải trình tự ABI 3500 Genetic Analyzer. Tín hiệu được ghi tự động, phân tích và lưu trữ trên máy tính.

2.2.10. Phát hiện và sàng lọc các SNP trên các gen đích trên bộ mẫu khởi tạo gồm 20 cá thể cá tra.

Sau khi có được bộ dữ liệu trình tự nucleotide của các đoạn gen đích của 20 cá thể cá tra, bộ dữ liệu này được so sánh (alignment) với trình tự tham chiếu tương ứng bằng phần mềm MUSCLE để phát hiện các SNP (cá thể không đọc được trình tự ở vị trí SNP là Non-identify, ký hiệu NN). SNP tiềm năng liên quan đến tính trạng tăng trưởng được sàng lọc ở bộ mẫu khởi tạo gồm 2 nhóm (10 cá thể STN và 10 cá thể STC) với tiêu chí sau: (1) tần số xuất hiện SNP đạt ít nhất 0,3 ở một nhóm trở lên; (2) thành phần kiểu gen hoặc thành phần alen thực sự khác biệt giữa hai nhóm ($p < 0,05$ theo kiểm định Fisher Exact Test) hoặc/và (3) gây nên sự thay đổi axit amin trên protein tương ứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Các gen thuộc họ gen calpain ở cá tra nuôi

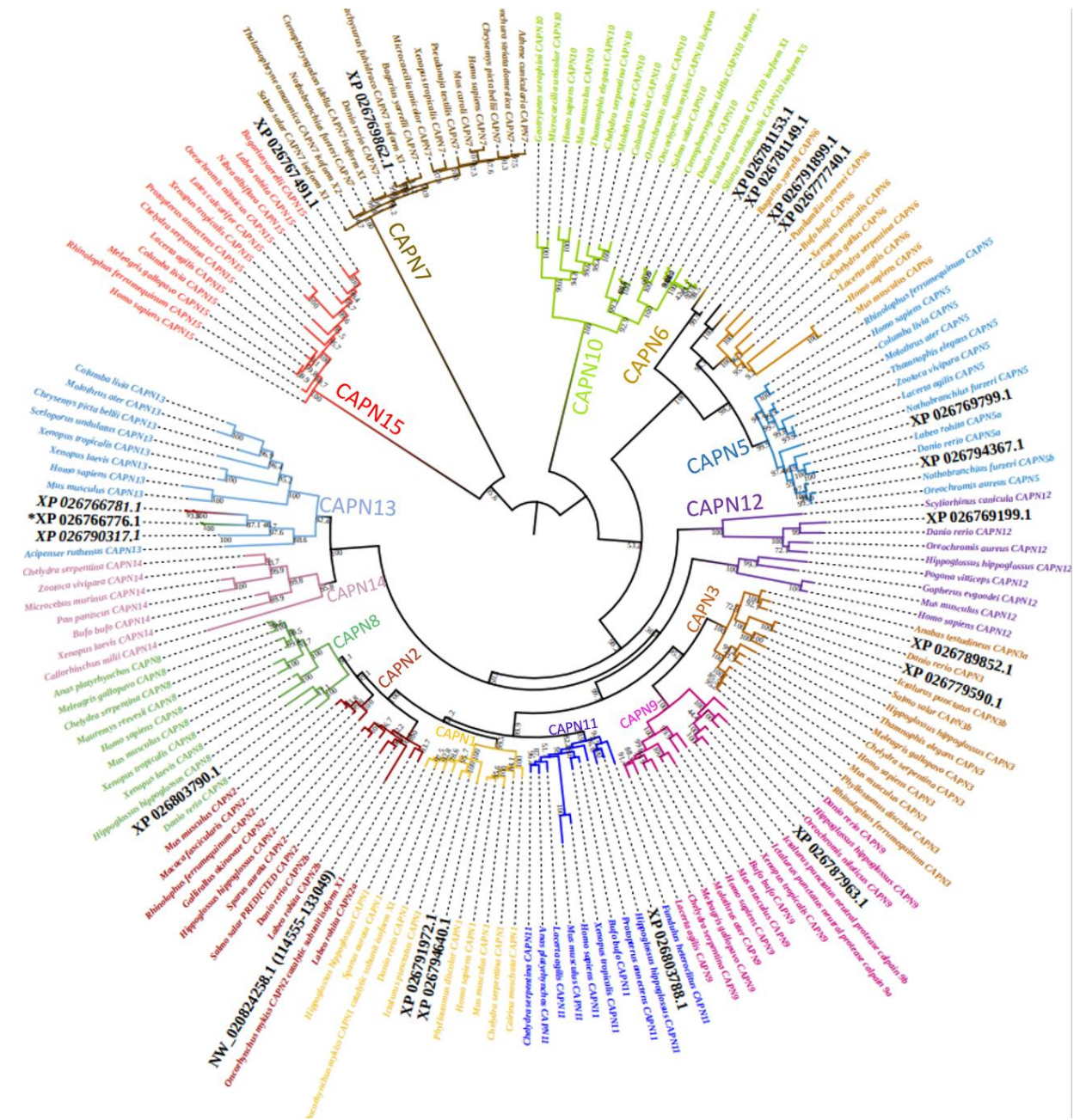
Để tìm gen calpain trên cơ sở dữ liệu genome của cá tra nuôi được giải mã bằng NGS [5], một tập hợp các trình tự nucleotide của gen calpain từ các loài cá xương đã được sử dụng làm gen truy vấn để tìm kiếm trình tự các gen thuộc họ calpain trên bộ gen của cá tra nuôi. Tổng cộng có 22 trình tự liên quan đến gen calpain đã được xác định trong bộ gen của cá tra nuôi và được liệt kê trong Bảng 3.1. Phân khai thác cơ sở dữ liệu đã được nghiên cứu bởi Vũ Hải Anh [39]. Tuy nhiên ở nghiên cứu trước, chỉ có 8 trình tự gen trong họ calpain được phát hiện và phân loại. Trong nghiên cứu này, tôi đã cập nhật mới các gen truy vấn và tìm được nhiều trình tự hơn nghiên cứu trước. Từ bảng 3.1 có thể thấy các trình tự gen calpain nằm trên các scaffold khác nhau với chiều dài khác nhau từ khoảng 6789 nucleotide tới 50718 nucleotide.

Các trình tự axit amin suy diễn từ các trình tự gen calpain của cá tra nuôi (Bảng 3.1) và các trình tự axit amin calpain của các loài khác nhau được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Dựa trên sự tương đồng về trình tự protein của chúng với các loài khác, cây phát sinh chủng loại (Hình 3.1) cho thấy các gen này được chú giải là *CAPN1*, *CAPN2*, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15. Tuy nhiên *CANP14* không được tìm thấy trong bộ gen của cá tra nuôi. Một số gen calpain có các isoform như *CAPN1*, *CAPN3*, *CAPN5*, *CAPN6*, *CAPN10*, *CAPN13* với hai hoặc ba bản sao của trình tự gen. Cụ thể, mỗi *CAPN1*, 3, 5, 6, 10, và *CAPNS1* đều có 2 trình tự; *CAPN13* có 3 trình tự. Ngoài ra, theo một số nghiên cứu trước đây, như ở cá ngựa vằn xác định được 2 gen của protein CANP1 là *CANP1a* và *CANP1b* [26], mà trong kết quả xác định gen calpain cũng thu được 2 trình tự gen *CANP1*.

Bảng 3. 1. Các trình tự thuộc họ gen calpain trên genome của cá tra nuôi

STT	Vị trí trên genome của <i>P. hypenthalmus</i>	Nucleotide (bp)	NCBI- Nucleotide ID	NCBI- Protein ID
1	NW_020824222.1 (347074..372010, complement)	24936	XM_026936171.1	XP_026791972.1
2	NW_020824225.1 (5450499..5460854, complement)	10356	XM_026938839.1	XP_026794640.1
3	NW_020824258.1 (114555..133049)	18495	N/A	N/A
4	NW_020824219.1 (5049412..5059086)	9675	XM_026934051.1	XP_026789852.1
5	NW_020824206.1 (746955..771976)	25022	XM_026923789.1	XP_026779590.1
6	NW_020824199.1 (16015395..16037702, complement)	22308	XM_026913998.1	XP_026769799.1
7	NW_020824225.1 (9574079..9624256, complement)	50178	XM_026938566.1	XP_026794367.1
8	NW_020824222.1 (6885241..6896936, complement)	11696	XM_026936098.1	XP_026791899.1
9	NW_020824205.1 (253922..269445)	15524	XM_026921939.1	XP_026777740.1
10	NW_020824199.1 (6544878..6571009)	26132	XM_026914061.1	XP_026769862.1
11	NW_020824258.1 (89487..104101, complement)	14615	XM_026947989.1	XP_026803790.1

12	NW_020824216.1 (2495985..2512654, complement)	16661	XM_026932162.1	XP_026787963.1
13	NW_020824208.1 (9816834..9842692)	25796	XM_026925348.1	XP_026781149.1
14			XM_026925352.1	XP_026781153.1
15	NW_020824258.1 (137069..166558)	29490	XM_026947987.1	XP_026803788.1
16	NW_020824199.1 (17194370..17217517, complement)	23148	XM_026913398.1	XP_026769199.1
17	NW_020824219.1 (5151558..5160366)	8809	XM_026934516.1	XP_026790317.1
18	NW_020824283 (386496..400727, complement)	14232	XM_026910980.1	XP_026766781.1
19	NW_020824283 (402813..420093, complement)	17281	XM_026910975.1	XP_026766776.1
20	NW_020824315.1 (216829..226448, complement)	9620	XM_026911690.1	XP_026767491.1
21	NW_020824205.1 (16559493..16568417, complement)	8925	XM_026922453.1	XP_026778254.1
22	NW_020824207.1 (536009..542797)	6789	XM_026924902.1	XP_026780703.1



Hình 3. 1. Cây chủng loại phát sinh của các trình tự protein calpain.

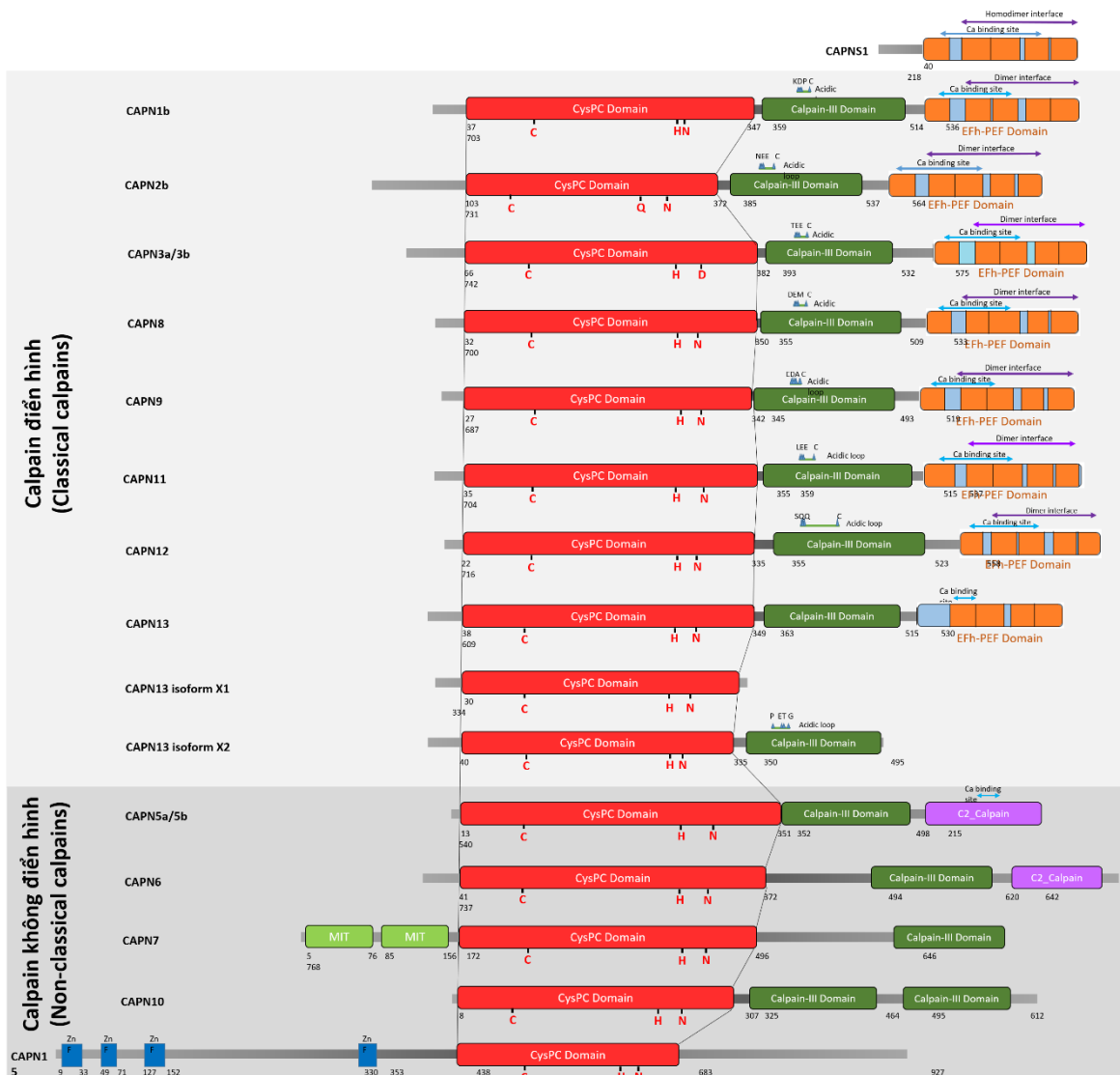
Từ cây chủng loại phát sinh (xem Hình 3.1), các trình tự gen calpain của cá tra nuôi được xác định tên (Bảng 3.2) và từ protein suy diễn xác định được chiều dài acid amin. Chiều dài các axit amin trung bình từ 600 đến hơn 700 aa, ngoại trừ CAPN15 dài hơn 900 aa và hai tiểu đơn vị CAPNS1a và CAPNS1b khoảng hơn 200 aa.

Bảng 3. 2. Các gen calpain thuộc họ gen calpain của *P.hypophthalmus*

STT	ID*	Tên gen	Chiều dài acid amin
1	XP_026791972.1	<i>CAPN1b isoform X1</i>	704
2	XP_026794640.1	<i>CAPN1b isoform X2</i>	703
3	NW_020824258.1	<i>CANP2b</i>	731
4	XP_026789852.1	<i>CAPN3a</i>	742
5	XP_026779590.1	<i>CAPN3b</i>	742
6	XP_026769799.1	<i>CAPN5a</i>	640
7	XP_026794367.1	<i>CAPN5b</i>	640
8	XP_026791899.1	<i>CAPN6 isoform X1</i>	737
9	XP_026777740.1	<i>CAPN6 isoform X2</i>	737
10	XP_026769862.1	<i>CAPN7</i>	768
11	XP_026803790.1	<i>CAPN8</i>	700
12	XP_026787963.1	<i>CAPN9</i>	687
13	XP_026781149.1	<i>CAPN10 isoform X1</i>	612
14	XP_026781153.1	<i>CAPN10 isoform X2</i>	612
15	XP_026803788.1	<i>CAPN11</i>	704
16	XP_026769199.1	<i>CAPN12</i>	716
17	XP_026790317.1	<i>CAPN13</i>	609
18	XP_026766781.1	<i>CAPN13 isoform X1</i>	334
19	XP_026766776.1	<i>CAPN13 isoform X2</i>	495
20	XP_026767491.1	<i>CAPN15</i>	927
21	XP_026778254.1	<i>CAPNS1a</i>	216
22	XP_026780703.1	<i>CAPNS1b</i>	218

*ID sử dụng trên hình 3.1

3.1.2. Cấu trúc miền chức năng của các gen calpain ở cá tra nuôi



Hình 3. 2. Cấu trúc của các protein calpain của cá tra nuôi

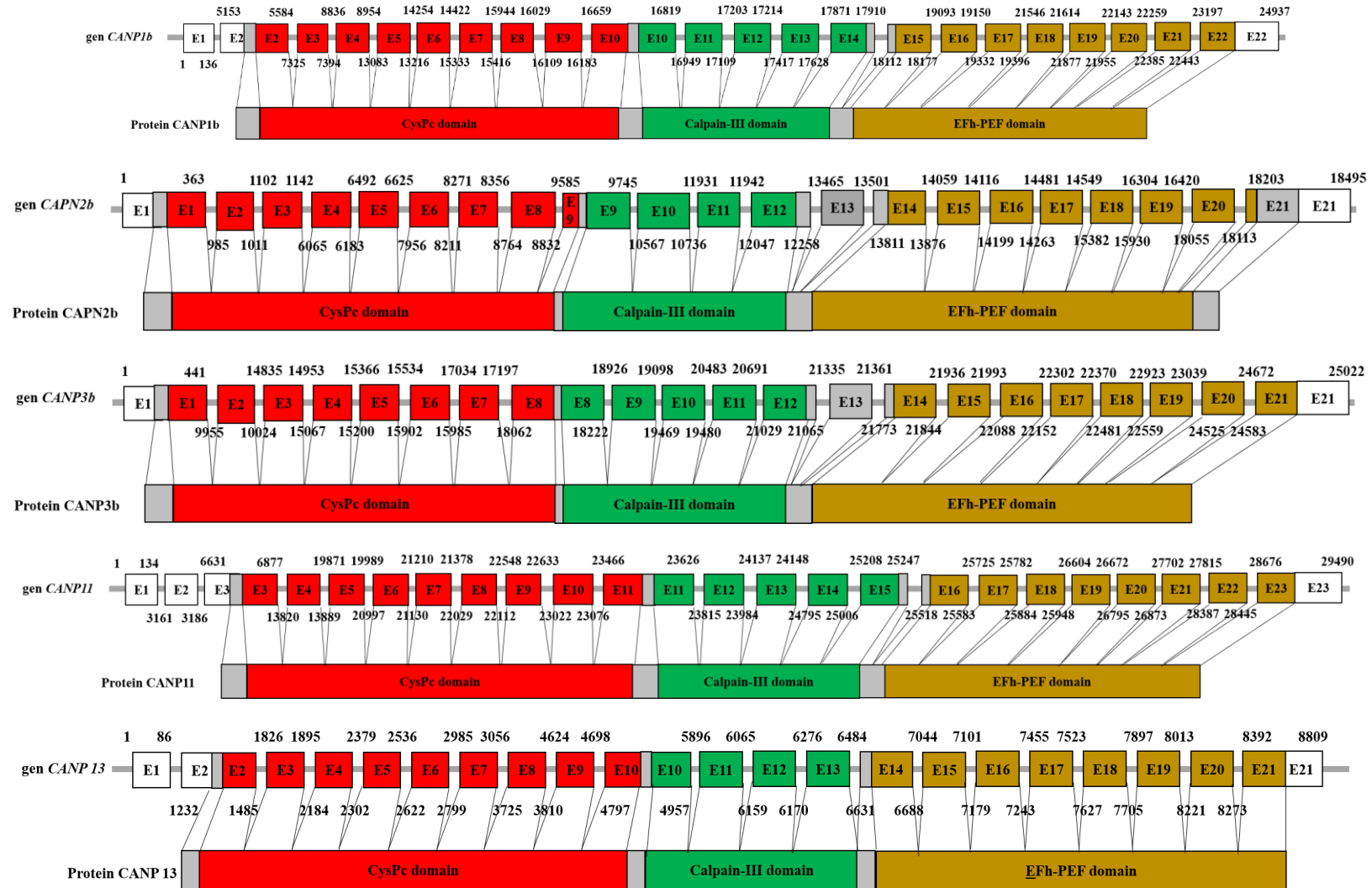
Các trình tự protein suy diễn từ các gen trên sẽ được phân tích bằng phần mềm tin sinh để xác định các domain chức năng và vùng bảo thủ của các gen calpain (xem Hình 3.2). Dựa vào cây chủng loại phát sinh (Hình 3.1), chia calpains ở cá tra nuôi thành hai nhóm là calpain điển hình (classical calpain) và không điển hình (non-classical calpain) (Xem hình 3.2). Miền CysPC – vùng cấu trúc bảo thủ cysteine-proteinase của calpain được biểu thị bằng các hộp màu đỏ với 3 vị trí hoạt động được đánh dấu bằng các chữ cái màu đỏ. Miền Calpain III được biểu thị bằng hộp màu xanh đậm, đây là miền đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt calpain bởi canxi liên quan tới quá trình gây ra tương tác với miền CysPC. Miền PEF có chứa 4 hoặc 5 motif

EF hand được biểu thị bằng hộp màu cam cùng với điểm gắn Canxi và vùng tương tác hình thành dimer hoặc homodimer. Miền C2_Calpain (C2) biểu thị bằng hộp màu tím, là vùng phụ thuộc Ca^{2+} . Miền MIT được biểu thị bằng hộp xanh lá nhạt, là các motif tương tác và vận chuyển vi ống. Motif ZnF được biểu thị bằng hộp màu xanh biển, là các ‘ngón tay kẽm’ Zn-fingers.

Về cấu trúc miền chức năng của các calpain, nhận thấy domain chức năng CysPC là vùng cấu trúc bảo thủ, có ở tất cả các calpain, với 3 vị trí hoạt động là C, H/Q, N/D. Đối với các calpain điển hình, luôn có miền III và IV (PEF-hand), trong đó miền III có vùng acidic loop và miền IV có 5 EF hand. Riêng CAPN13 có sự khác biệt trong cấu trúc với miền IV chỉ có 4 EF hand và có isoform không có acidic loop trong miền III. Bên cạnh đó, 2 isoform của CAPN13 có cấu trúc mất miền IV hoặc mất cả miền III và IV. Riêng CAPNS1 chỉ có domain PEF có thể tạo homodimer với tiểu đơn vị nhỏ của CAPN1. Các calpain không điển hình có cấu trúc domain ở đầu C khác với calpain điển hình ở điểm không có miền IV (PEF). Cụ thể, CAPN5 và 6 có miền C2, CAPN10 có thêm 1 miền III, CAPN7 không có miền thay thế tại vị trí tương ứng, ngoài ra có thêm 2 vùng MIT ở đầu N. Riêng CAPN15 mất vùng III, và có thêm 4 motif “ngón tay kẽm” (Zn-fingers) ở đầu N. Tất cả các calpain không điển hình đều không có acidic loop ở miền III.

3.1.3. Cấu trúc gen của một số calpain điển hình ở cá tra nuôi

Để làm rõ về cấu trúc của một số gen calpain điển hình ở cá tra nuôi, tôi tiến hành phân tích cấu trúc gen để xác định các vùng exon quy định vùng domain chức năng nào, từ đó làm cơ sở cho việc thiết kế mồi để phân tích biểu hiện và tìm kiếm SNP. Cấu trúc gen của 5 calpain điển hình gồm *CAPN1b*, *CAPN2b*, *CAPN11*, *CAPN3b*, *CAPN13* được thể hiện trong Hình 3.3. Trong đó, vùng CysPC thường khoảng 9 đến 10 exon quy định, 4 đến 5 exon quy định vùng calpain-III, và 7 đến 8 exon quy định vùng PEF-hand.



Hình 3. 3. Cấu trúc một số gen calpain điển hình ở cá tra nuôi

3.1.4. Kết quả biểu hiện một số gen thuộc họ calpain ở một số mô khác nhau

3.1.4.1. Tách RNA tổng số từ các mô não, cơ, gan

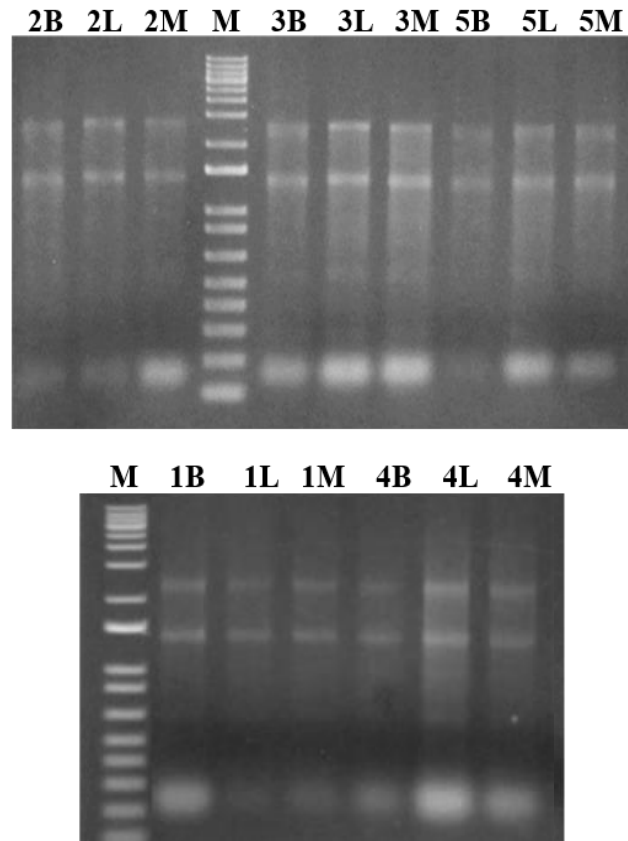
Các mẫu mô não, cơ, gan từ 5 cá thể cá tra được tiến hành tách chiết RNA tổng số. Sau đó được xác định nồng độ bằng cách đo quang phổ (Bảng 3.3).

Sau khi xác định nồng độ, RNA tổng số sẽ được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% với thể tích 3 μ l mỗi mẫu. Kết quả điện được thể hiện ở Hình 3.4.

Kết quả điện di cho thấy RNA tổng số tách được đều có băng 18S và 28S. Một số mẫu cơ nồng độ thấp do quá trình nghiền mẫu không tốt vì mô cơ cứng và dai. Mẫu mô gan chứa nhiều enzyme nên RNA tổng số thu được bị nhiễu. Do đó, khi tiến hành đo nồng độ các mẫu DNA thì giữa các mẫu không có sự đồng đều về nồng độ. Tuy vậy, RNA tổng số thu được từ các mẫu trên vẫn đủ điều kiện để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. 3. Kết quả đo nồng độ RNA tổng số của các mô từ các cá thể cá tra

Số thứ tự mẫu	Mô cơ quan	Ký hiệu	Nồng độ	OD _(260/280)
1	Não	1B	412.7	1.98
	Gan	1L	285.1	2.07
	Cơ	1M	152.8	2.19
2	Não	2B	348.8	1.96
	Gan	2L	1123.0	2.0
	Cơ	2M	112.0	1.97
3	Não	3B	586.0	1.91
	Gan	3L	1704.7	2.01
	Cơ	3M	109.9	1.93
4	Não	4B	379.2	1.91
	Gan	4L	1550	2.05
	Cơ	4M	153.2	2.06
5	Não	5B	732.8	1.96
	Gan	5L	714.5	1.95
	Cơ	5M	186.9	1.98



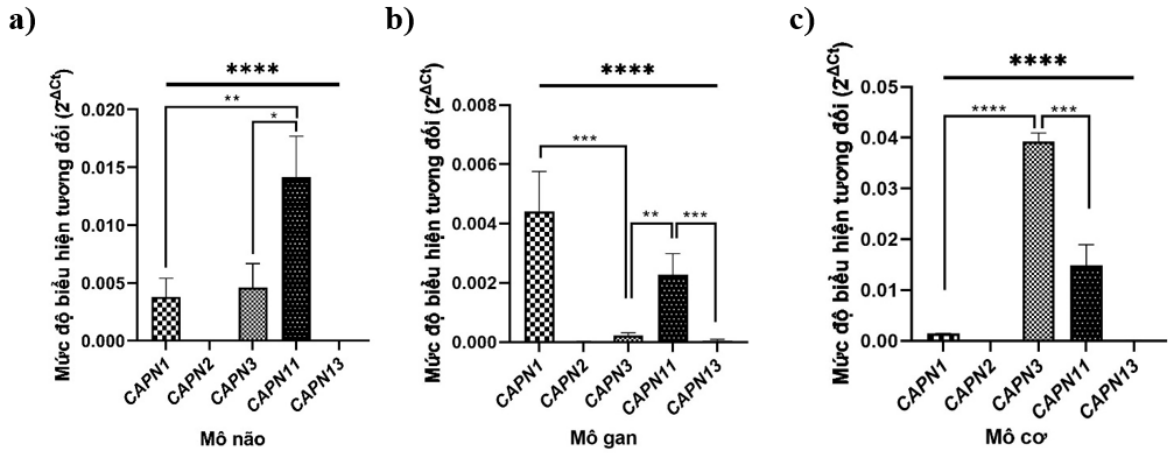
Hình 3. 4. Ảnh điện di RNA tổng số tách từ mô não, gan, cơ của 5 mẫu cá tra

M: Marker 1kb plus

3.1.4.2. Kết quả realtime PCR

Trong số các gen calpain được xác định trong bộ gen của cá tra nuôi, năm gen *CAPN1b*, *2b*, *3b*, *11* và *13* đã được chọn để khảo sát mức độ biểu hiện trong các mô não, cơ và gan cá tra bằng phương pháp realtime PCR.

RNA tổng số từ các mô não, cơ, gan của các cá thể cá tra được tổng hợp cDNA để làm khuôn cho quá trình realtime PCR với các cặp mồi thiết kế nằm trên vùng exon junction. Mức độ biểu hiện tương đối của các gen calpain so với gen tham chiếu *EF1 α* được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp so sánh $2^{-\Delta C_t}$. Kết quả so sánh sự biểu hiện của một số gen calpain ở các mô cơ quan được biểu diễn dưới dạng biểu đồ cột.



Hình 3. 5. So sánh sự biểu hiện của một số gen calpain ở các mô não (a), gan (b), cơ (c) cá tra.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.001$

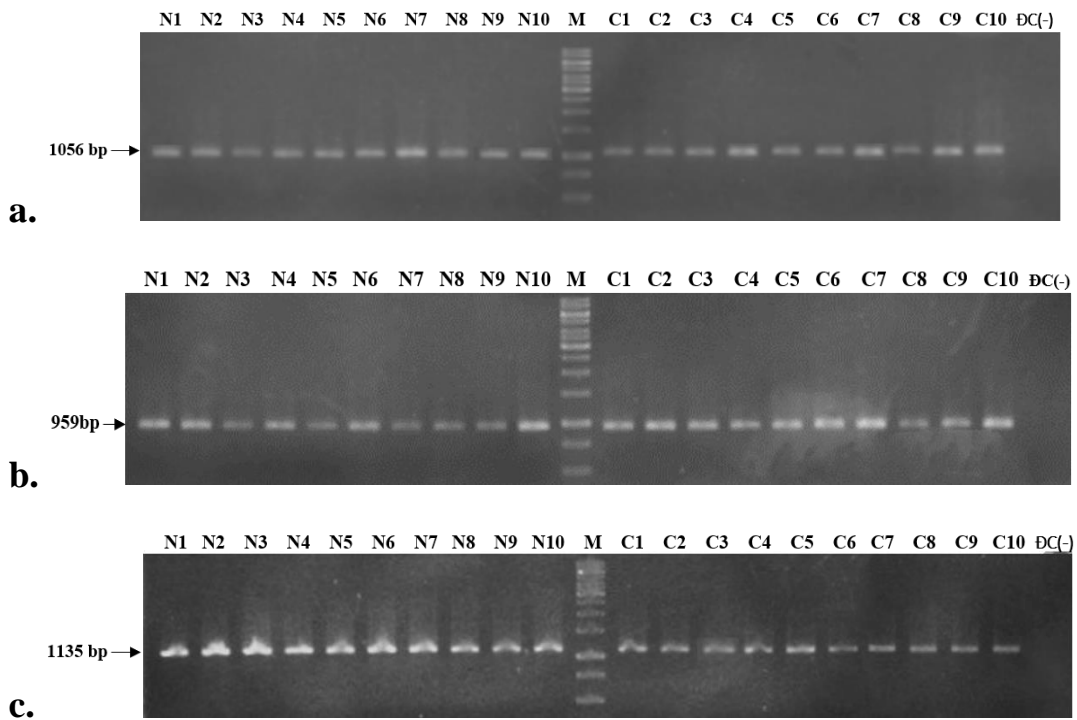
Mức độ biểu hiện tương đối của các gen calpain điển hình *CAPN1,2,3,11* và *13* trong mô não, gan, cơ của cá tra nuôi được thể hiện trong Hình 3.5. Ở cả ba mô, mức độ biểu hiện phiên mã của các gen có sự khác biệt đáng kể với giá trị $p < 0,0001$, với sự biểu hiện nhiều ở các gen *CAPN1*, *CAPN3* và *CAPN11* và ngược lại, hầu như không có sự biểu hiện ở *CAPN2* và *CAPN13*. Mô não, *CAPN11* có biểu hiện cao nhất, gấp hơn 3 lần so với *CAPN1* và *CAPN3* (tương ứng $p < 0,01$ và $p < 0,05$) (Hình 3.5a). Mức độ phiên mã cao nhất ở gan là *CAPN1*, được biểu thị ở biểu đồ cao gấp đôi so với *CAPN11* ($p < 0,05$) và gấp khoảng 20 lần so với *CAPN3* ($p < 0,001$) (Hình 3.5b). Đối với mô cơ, *CAPN3* có mức độ biểu hiện cao nhất, gần gấp 3 lần so với *CAPN11* ($p < 0,001$) và khoảng 27 lần so với *CAPN1* ($p < 0,0001$) (Hình 3.5c).

3.1.5. Dữ liệu về đa hình nucleotide đơn (SNP) một số gen calpain

3.1.5.1. Kết quả PCR

Bộ mẫu DNA tổng số của 20 cá thể cá thể (gồm 10 cá thể tăng trưởng nhanh và 10 cá thể tăng trưởng chậm) được sử dụng để cho giai đoạn phát hiện và sàng lọc SNP trên gen đích liên quan tới sự phát triển cơ. Vùng promoter của gen *CAPN3* và vùng exon 1 của gen *CAPN11* và *CAPN3* được khuếch đại bởi các cặp mồi ở bảng 2.5 bằng phản ứng PCR. Kết quả điện di

sản phẩm PCR khuếch đại cho thấy các băng thu được đặc hiệu và đúng kích thước dự kiến (Hình 3.6).



Hình 3. 6. Ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại
 a.Vùng exon 1 trên gen *CAPN11*; b. vùng promoter gen *CAPN3*;
 c. exon 1 trên gen *CAPN3* ; M: marker

Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng phương pháp qua cột và sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Sản phẩm tinh sạch đủ điều kiện để làm khuôn cho phản ứng giải trình tự Sanger.

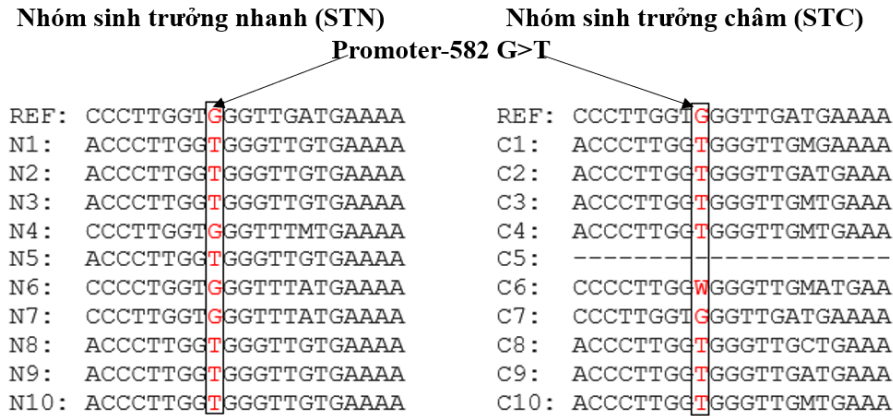
3.1.5.2. Phát hiện và sàng lọc SNP trên vùng promoter của *CAPN3*

Trình tự các đoạn gen vùng promoter của gen *CAPN3* của 20 cá thể cá tra được so sánh với trình tự tham chiếu để xác định SNP. Từng vị trí SNP được kiểm tra định tính hiệu quả giải mã. Ví dụ về một vị trí SNP được minh họa ở Hình 3. Tất cả 36 SNP được phát hiện ở vùng promoter của gen *CAPN3* (xem phụ lục), trong đó có 10 SNP đều có tần số xuất hiện đạt ít nhất 0,3 ở một nhóm sinh trưởng nhanh (STN)/chậm (STC) trở lên (Xem Bảng 3.4). Các SNP này tiếp tục được đánh giá sự khác biệt về thành phần kiểu gen/ thành phần alen giữa hai nhóm sinh trưởng nhanh/chậm thông qua giá trị $p < 0,05$. Theo đó, có 1 SNP thể hiện được sự khác biệt về thành phần kiểu gen giữa hai nhóm là ở vị trí -582 G>T với giá trị $p=0,0014$.

Bảng 3. 4. Danh sách các SNP được phát hiện trên vùng promoter gen *CANP3*

STT	Vị trí SNP trên gen	Tham chiếu (Ref)	Thay đổi (Alt)	Thành phần kiểu gen		Thành phần alen	
				STN (a)	STC (a)	STN	STC
1	Promoter-833	A*	T	2AA:4AT:4TT (0,66)	2AA:3AT:5TT (0,54)	8A:12T	7A:13T
2	Promoter-672	A*	C	1AA:2AC:7CC (0,3)	0AA:1AC:8CC:1NN (0,11)	4A:16C	1A:17C
3	Promoter-646	T	G	7TT:2TG:1GG (0,33)	7TT:2TG:1NN (0,22)	16T:4G	16T:2G
4	Promoter-594	G	C	7GG:3CC (0,43)	6GG:3CC:1NN (0,5)	14G:6C	12G:6C
5	Promoter-593	C	A	7CC:3AA (0,43)	6CC:3AA:1NN (0,5)	14C:6A	12C:6A
6	Promoter-592	A	C	7AA:3CC (0,43)	6AA:3CC:1NN (0,5)	14A:6C	12A:6C
7	Promoter-576	G*	T	3GG:7TT (0,43)	1GG:8TT:1NN (0,13)	6G:14T	2G:16T
8	Promoter-584	T*	G	3TT:7GG (0,43)	1TT:8GG:1NN (0,13)	6T:14G	2T:16G
9	Promoter-568	G	T	7GG:3TT (0,43)	8GG:1TT:1NN (0,13)	14G:6T	16G:2T
10	Promoter-582	G*	T	3GG:7TT (0,43)	1GG:1GT:7TT:1NN (0,25)	6G:14T	3G:15T

*: alen thiểu số; (a): Tần số xuất hiện SNP của mỗi nhóm (a) = (Alt/Ref) ; với trường hợp Ref là alen thiểu số, (a) = (Ref/Alt)



Hình 3. 7. Kết quả phát hiện SNP ở CAPN3 Promoter-582 G>T

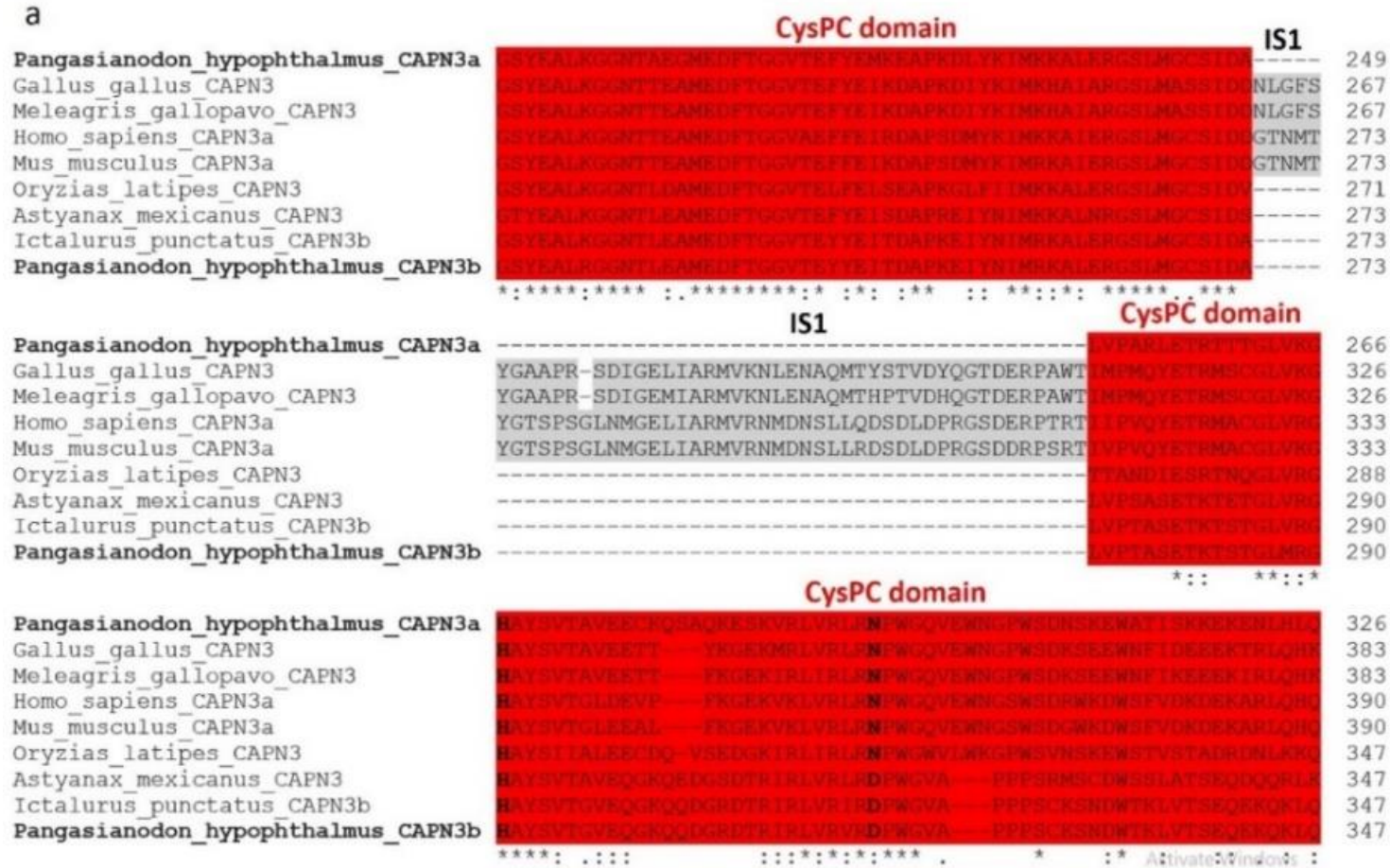
3.2. Thảo luận

3.2.1. Thành phần và cấu trúc các gen thuộc họ calpain ở cá tra

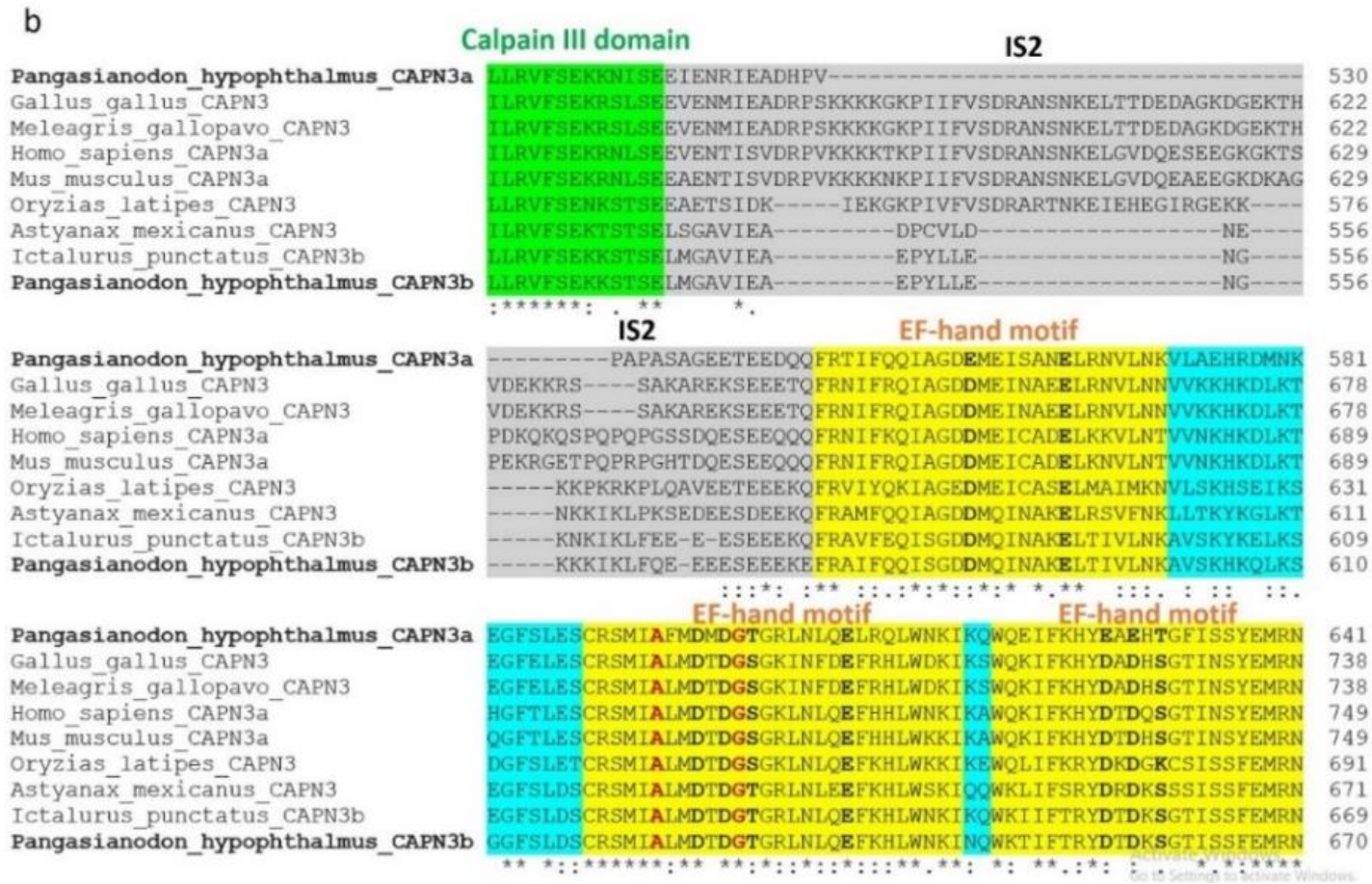
Kết quả nghiên cứu họ gen calpain trên cá tra nuôi cho thấy họ gen calpain gồm 22 trình tự gen và được phân thành 14 loại khác nhau, bao gồm: *CAPN1*, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 và *CAPNS1*. Gen *CAPN14* không được tìm thấy trong hệ gen của cá tra. Kết quả này tương đồng với một số kết quả nghiên cứu trước đó đã cho thấy: mRNA của *CAPN14* không được phát hiện trong 76 mô ở người và chưa có tài liệu nghiên cứu nào về *CAPN14* ở cá xương [40]. Một vài gen calpain có isoform như là *CAPN1*, *CAPN3*, *CANP5*, *CANP6*, *CAPN10*, *CAPN13* và *CAPNS1* với 2 hoặc 3 bản sao của trình tự nucleotide. Cụ thể, *CAPN1* có 2 isoform nằm trên scaffold khác nhau, kết quả này giống với cá ngựa vằn: *CANP1a* trên LG13 và *CAPN1b* trên LG22 [26]. Cá ngựa vằn có 2 isoform: *CAPN2a* ở LG13 và *CAPN2b* ở LG22 trong khi cá tra nuôi chỉ có *CAPN2b* [26]. Cả *CAPN3* và *CAPN5* ở cá tra nuôi đều có hai isoform lần lượt là *CAPN3a/3b* và *CAPN5a/5b*, kết quả này giống với nghiên cứu ở cá ngựa vằn [41, 42]. *CAPN10* ở cá tra nuôi có hai isoform là *CAPN10 isoform X1*, *CAPN10 isoform X2*, trong khi ở người có 8 isoform và chưa có nghiên cứu ở cá liên quan tới cấu trúc của *CAPN10* [43]. *Calpain small subunit (CAPNS)* ở cá tra nuôi giống với cá ngựa vằn, đều có hai isoform là *CAPNS1a* và *CAPNS1b* [26]. *CAPN6* ở cá tra nuôi có 2 isoform, tuy nhiên chưa tìm thấy các nghiên cứu trên loài cá xương về isoform của *CAPN6*.

Dựa vào cây phát sinh, các gen thuộc họ calpain của cá tra có thể chia thành calpain điển hình và không điển hình (Hình 3.2). Cây phát sinh chủng loại cho thấy các calpain điển hình cùng thuộc một nhánh lớn, do có sự tương đồng về cấu trúc domain chức năng. Trong mỗi cụm, trình tự calpain của cá tra nuôi có mức độ tương đồng cao nhất với các trình tự calpain tương ứng của các loài cá da trơn khác, chẳng hạn cá chình *Bagarius yarrelli*, cá bò *Tachysurus fulvidraco*, cá nheo miệng lớn *Silurus meridionalis*, cá nheo Mỹ *Ictalurus punctatus*, và một số cá xương khác như cá ngựa vằn *Danio rerio*, cá trôi Ấn Độ *Labeo rohita*, cá bơn *Hippoglossus hippoglossus*, cá tầm *Acipenser ruthenus* (Xem Hình 3.1)

Nhánh CAPN13 và 14 gần nhau và thuộc một nhánh nhỏ riêng và kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước [24]. Cây phát sinh cho thấy bốn calpain gồm CAPN8, 2, 1 và 11 phân nhánh từ cùng một gốc, điều này tương đồng với nghiên cứu trước của Macqueen và cộng sự [24]. Theo nghiên cứu của Ookura, CAPN3 và CAPN9 cùng phân nhánh từ cùng một gốc và giống với nghiên cứu của tôi về hai calpain này ở cây phát sinh [44]. CAPN12 gần với CAPN3 nhưng phân nhánh độc lập và giống với nghiên cứu của Macqueen [24]. Các calpain không điển hình chia làm 3 nhánh: i) CAPN5 và CAPN6; ii) CAPN10 và iii) CAPN7 và CAPN15. CAPN5 và CAPN6 phân nhánh từ cùng một gốc, hai gen này đều có điểm chung là có thêm miền C2. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu đã có về nguồn gốc phát sinh của 2 gen calpain này [45]. CAPN10 gần với CAPN 5 và 6 nhưng phân nhánh độc lập, do cấu trúc của gen *CAPN10* không có miền C2 mà thay vào đó là thêm một miền calpain_III. Nhánh CAPN15 và CAPN7 khác biệt rõ ràng so với những nhánh khác bởi cấu trúc protein khác biệt của chúng. Tuy nhiên, cây phát sinh thể hiện hai gen này phân nhánh từ cùng một gốc, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Rawlings và cộng sự là CAPN7 và CAPN15 xảy ra sự sao chép đồng thời trong quá trình tiến hoá [45].



Hình 3. 8 (a). So sánh trình tự axit amin CAPN3 của cá tra nuôi với các loài khác



Hình 3. 9 (b). So sánh trình tự axit amin CAPN3 của cá tra nuôi với các loài khác

Theo một nghiên cứu của Stephanie và cộng sự về hệ thống gen calpain ở cá ngựa vằn, đã xác định được 2 gen quy định tiểu đơn vị xúc tác của calpain-1 (*CAPN1a* và *CAPN1b*) và 2 gen quy định tiểu đơn vị điều hòa (*CAPNS1a* và *CAPNS1b*) [26]. Kết quả nghiên cứu của tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Stephanie. Tuy nhiên gen *CAPN1a* không có ở hệ gen cá tra nuôi mà 2 trình tự gen *CAPN1* tìm thấy được xác định là gen *CAPN1b*, còn 2 tiểu đơn vị điều hòa được xác định là *CAPNS1a* và *CAPNS1b*.

Trong nghiên cứu này, 5 thành viên của hệ thống calpain đã được xác định cấu trúc, trong đó các miền đều có vùng xúc tác chính CysPC và đều có khoảng từ 21 tới 23 exon. Trong đó, CAPN3 là calpain đặc hiệu mô cơ có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy giải phóng canxi từ các sợi cơ xương, hấp thu canxi của mạng lưới cơ tương, hình thành và tái tạo cơ. Ngoài ra, CAPN3 ở người là một calpain điển hình với hai trình tự chèn là IS1 và IS2 mang lại đặc tính như phân giải nhanh, kích hoạt Ca^{2+} và kích hoạt Na^{+} của protease [46]. Ở một số loài cá xương như họ cá gai (stickleback), cá hồi Đại Tây Dương *Salmo salar*, cá cơm Nhật *Oryzias Latipes*, CAPN3 không có đoạn IS1 mà chỉ giữ lại một IS2, không có cả hai trình tự IS ở cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [29]. So sánh trình tự protein của CAPN3a và CAPN3b ở cá tra nuôi với các loài khác, nhận thấy calpain 3 ở cá tra nuôi thiếu 2 vùng IS1 và IS2 (Xem Hình 3.8).

3.2.2. Biểu hiện đặc hiệu mô của một số gen calpain ở cá tra

Theo các nghiên cứu trước biểu hiện của calpain điển hình ở các mô đã được đánh giá trên đại diện cá xương, động vật lưỡng cư, bò sát và động vật có vú, kết quả cho thấy các gen trong họ calpain còn được chia thành hai loại dựa trên mức độ biểu hiện của chúng là: calpain phổ biến (ubiquitous) và calpain đặc hiệu mô (tissue-specific). Nhằm phân tích đặc điểm này ở họ gen calpain của cá tra, tôi đã chọn khảo sát một số gen, gồm: *CAPN1b*, *CAPN2b*, *CAPN3b*, *CAPN11*, *CAPN13* để phân tích biểu hiện gen ở các mô não, gan, cơ ở cá tra.

Phân tích biểu hiện gen cho thấy *CAPN1b* ở cá tra nuôi đều có biểu hiện ở cả 3 mô: não, gan và cơ. Cụ thể, biểu hiện nhiều ở mô gan và não và ít nhất ở mô cơ, kết quả này tương thích với nghiên cứu trước đây về cá bon

Hippoglossus hippoglossus L. [29]. Ngoài ra, các mô khác ở cá bơn và cá ngựa vằn đều có biểu hiện của *CAPN1*, mặc dù biểu hiện không nhiều [24]. Do vậy, có thể kết luận *CAPN1b* là phổ biến, có thể biểu hiện rộng rãi ở các mô khác của cá tra nuôi.

Kết quả biểu hiện của *CAPN2b* ở nghiên cứu của tôi cho thấy gen này hầu như biểu hiện kém ở các mô nghiên cứu của cá tra. Theo nghiên cứu của Macqueen và cộng sự, *CANP2* ở cá ngựa vằn cũng biểu hiện kém ở ba mô này, và cả những mô khác cũng thấy sự biểu hiện không đáng kể [24]. *CAPN2* biểu hiện ở các mô ở loài lưỡng cư, bò sát cũng khá giống ở cá, tuy nhiên ở thú, sự biểu hiện của *CAPN2* lại rõ rệt so với những calpain khác [24].

CAPN11 biểu hiện cả ở não, gan và cơ của cá tra, đặc biệt biểu hiện nhiều ở mô cơ và mô não. Thí nghiệm của Macqueen ở cá ngựa vằn cũng cho kết quả tương tự đối với biểu hiện của *CAPN11* và gen này biểu hiện rộng rãi ở các mô [24]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu ở cá bơn lại khác so với cá tra và ngựa vằn, *CAPN11* biểu hiện ở gan và cơ nhưng không có biểu hiện ở não [29].

Đối với sự biểu hiện của gen *CAPN13* ở cá tra, sự biểu hiện ở các mô thấp hơn so với các gen khác, nhưng vẫn lớn hơn so với gen *CAPN2*. So với nghiên cứu ở cá ngựa vằn của Macqueen thì khá tương đồng [24]. So sánh biểu hiện của *CAPN13* ở các loài nhận thấy *CAPN13* biểu hiện kém dần từ cá đến lưỡng cư và cuối cùng là không thấy sự biểu hiện ở thú [24]. Điều này có thể lý giải do sự biểu hiện *CAPN13* kém dần trong quá trình tiến hoá.

Kết quả nghiên cứu cho thấy *CAPN3b* biểu hiện mạnh nhất ở mô cơ so với não và gan. Kết quả này giống với các nghiên cứu ở cá tráp đầu vàng (*Sparus aurata*), cá bơn (*Hippoglossus hippoglossus* L.) và cá ngựa vằn (*Danio rerio*) là biểu hiện *CAPN3* là mạnh nhất mô cơ còn biểu hiện kém và hầu như không biểu hiện ở các mô khác [29]. So với các loài khác ngoài cá như lưỡng cư, bò sát, hay thú thì kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng về biểu hiện *CAPN3* ở mô cơ so với các mô khác [24]. Tuy nhiên, *CAPN3b* ở cá tra nuôi có biểu hiện ở não nhưng ở cá tráp đầu vàng, cá bơn và cá ngựa vằn thì không có sự biểu hiện [29].

Chính vì sự biểu hiện đặc hiệu ở mô cơ của gen *CAPN3*, cùng với các nghiên cứu đã có trước đó về vai trò của *CAPN3* liên quan đến sự phát triển cơ và quan trọng trong việc thúc đẩy giải phóng canxi từ các sợi cơ xương, hấp thu canxi của mạng lưới cơ tương, hình thành cơ và tái tạo cơ [29, 47, 48]. Nghiên cứu đã tiếp tục thực hiện nội dung đánh giá sự đa dạng di truyền, tìm kiếm đa hình trên gen *CAPN3b* có thể liên quan đến tính trạng tăng trưởng.

3.2.3. Đa hình trên gen *CAPN3b* liên quan tới tính trạng tăng trưởng

Nghiên cứu của tôi đã phát hiện một số SNP nằm trong vùng promoter, có tần số xuất hiện có một chút khác biệt giữa hai nhóm cá tra nuôi có tốc độ tăng trưởng khác nhau. SNP nằm trên vùng không mã hóa trình tự axit amin, nhưng nó có thể liên quan tới sự điều khiển hoạt động của gen. Cho đến nay, đã có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng: SNP xuất hiện trên những gen có liên quan tới tính trạng sinh trưởng có thể dẫn đến sự thay đổi kiểu hình và có thể sử dụng làm chỉ thị phân tử ứng dụng trong chọn giống. Cụ thể, nghiên cứu của Cuevas năm 2016 đã phát hiện gen *GH* ở cá rô phi vằn *Oreochromis niloticus* có 2 SNP (-284 A>G và -271 C>T) liên quan tới tính trạng sinh trưởng nằm trên vùng promoter và 4 SNP (G/C, T/A, C/G và C/T) trên promoter của gen *IGF-1* [49]. Năm 2014, Tsai và cộng sự nghiên cứu các đa hình đơn trên gen *IGF-1* ở cá hồi Đại Tây Dương đã phát hiện các SNP trong đó có 1 SNP (g.5763G>T) thuộc vùng promoter liên quan tới tăng trưởng [50]. Ngoài các loài cá, các nghiên cứu trên người, bò, gà cũng xác định các SNP thuộc vùng promoter là có liên quan tới tăng trưởng: Martin và cộng sự đưa ra hai vị trí SNP (-575G>A và -202A>C) ở vùng promoter trên gen *GHI* của con người có liên quan tới mức độ tăng trưởng [51]; Năm 2003, Ge và cộng sự đã sử dụng phương pháp giải trình tự trên bò Angus và tìm thấy 3 SNP (-396C>T, -346 C>T và -336C>T) trên vùng promoter của gen *GH* [52]; Nghiên cứu của Liu và cộng sự với mục tiêu tìm kiếm các SNP trên gen *GHRHR* liên quan tới tính trạng sinh trưởng ở gà, đã cho kết quả 3 SNP được tìm thấy trên vùng promoter (g.-1654 A>G, g.-1411A>G và g.-142T>C) [53]. Từ các nghiên cứu đã có về SNP liên quan tới tính trạng tăng trưởng, có thể thấy được phần lớn các SNP chủ yếu nằm ở vùng promoter. Bên cạnh đó, đa hình đơn nucleotide (SNP) trên gen *CAPN3* liên quan tới sự tính trạng ở cơ

mặc dù chưa được nghiên cứu ở cá xương, nhưng ở các loài khác cũng đã được nghiên cứu. Ví dụ như: nghiên cứu của Barendse và cộng sự đã xác định được đa hình nucleotide (c.1538 + 225G >T) trong trình tự gen *CAPN3* ở loài ngựa vẫn có liên quan tới độ mềm của thịt [54]. Năm 2009, một nghiên cứu xác định các SNP trong gen *CAPN3* ở quần thể gà Trung Quốc, cho thấy có 2 SNP trong intron 8 và exon 10 ở gen *CAPN3* là có khả năng liên quan tới sự phát triển cơ ở gà [55]. Nghiên cứu đánh giá mối liên quan của SNP tiềm năng trên gen *CANP3* với chất lượng thịt bò Brahman ở Brahman của Royer đã xác định được SNP rs109050259 G>A [56]. Tổng hợp các nghiên cứu đã có và so sánh với kết quả nghiên cứu của luận văn, một số SNP trên vùng promoter của gen *CAPN3* có thể có liên quan tới sự phát triển cơ ở cá tra nuôi và sẽ là chỉ thị phân tử tiềm năng trong chọn giống cá tra theo hướng tăng trưởng.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

- Đã khai thác cơ sở dữ liệu genome cá tra nuôi *P.hypophthalmus* và xác định được 22 gen thuộc họ gen calpain.
- Đã phân loại các gen thuộc họ calpain của cá tra và phân tích được cấu trúc, các vùng chức năng của các gen đó.
- Đã khảo sát sự biểu hiện của 5 gen *CAPN1,2,3,11* và *13* ở ba loại mô: não, gan và cơ của cá tra.
- Đã phát hiện được một số SNP trên vùng promoter của gen *CAPN3* ở bộ mẫu khởi tạo. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa hai nhóm sinh trưởng nhanh và chậm chưa có ý nghĩa thống kê..

Kiến nghị

Từ những kết quả đạt được, đưa ra những kiến nghị sau:

- Kiểm nghiệm lại một số SNP trên bộ mẫu lớn hơn
- Tiếp tục sàng lọc và tìm kiếm SNP trên những vùng khác của gen *CAPN3*.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tan H., Lim K., Liew J.H., et al., 2020, The non-native freshwater fishes of Singapore: an annotated compilation, *The Raffles Bulletin of Zoology*, 68150-195.
2. Bosma R.H., Hanh C.T.T., Potting J., et al., 2009, *Environmental impact assessment of the pangasius sector in the Mekong Delta*.
3. Tran T.T.H., Nguyen H.T., Le B.T.N., et al., 2021, Characterization of single nucleotide polymorphism in IGF1 and IGF1R genes associated with growth traits in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878), *Aquaculture*, 538736542.
4. VASEP. "Xuất khẩu cá tra tăng chậm lại nhưng sẽ về đích 2,4 tỷ USD". Nguồn: <https://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra>
5. Kim O.T.P., Nguyen P.T., Shoguchi E., et al., 2018, A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement, *BMC Genomics*, 19(1), pp. 733.
6. Johnston I., Bower N., Macqueen D., 2011, Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish, *The Journal of experimental biology*, 2141617-28.
7. Ruparelia A.A., Ratnayake D., Currie P.D., 2020, Stem cells in skeletal muscle growth and regeneration in amniotes and teleosts: Emerging themes, *WIREs Developmental Biology*, 9(2), pp. e365.
8. Johnston I.A., MacQueen D.J., Watabe S., 2008, *Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle*, in *Fisheries for Global Welfare and Environment*, Terrapub. pp 241-262.
9. Florini J.R., Ewton D.Z., Coolican S.A., 1996, Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis, *Endocr Rev*, 17(5), pp. 481-517.
10. Fuentes E.N., Valdés J.A., Molina A., Björnsson B.T., 2013, Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system, *Gen Comp Endocrinol*, 192136-48.

11. Kacperczyk A., Jagla T., Daczewska M., 2009, Pax-3 and Pax-7 label muscle progenitor cells during myotomal myogenesis in *Coregonus lavaretus* (Teleostei: Coregonidae), *Anat Histol Embryol*, 38(6), pp. 411-8.
12. Larbi Ayisi C., Gyamfua A., Owusu-Afriyie G., 2021, Modulation of Muscle Growth Related Genes in Fish in Response to Plant Based Ingredients, *Genetics of Aquatic Organisms*, 6413.
13. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J., 1997, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member, *Nature*, 387(6628), pp. 83-90.
14. Liu X., Zeng S., Liu S., et al., 2020, Identifying the Related Genes of Muscle Growth and Exploring the Functions by Compensatory Growth in Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*), *Frontiers in Physiology*, 11.
15. Tian C., Yang M., Lv L., et al., 2014, Single nucleotide polymorphisms in growth hormone gene and their association with growth traits in *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), *Int J Mol Sci*, 15(4), pp. 7029-36.
16. Liu L., Yu X., Tong J., 2012, Molecular characterization of myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the bighead carp (*Aristichthys nobilis*), *Molecular biology reports*, 399211-21.
17. Sun Y., Yu X., Tong J., 2012, Polymorphisms in Myostatin Gene and associations with growth traits in the common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Int J Mol Sci*, 13(11), pp. 14956-61.
18. Hyatt H.W., Powers S.K., 2020, The Role of Calpains in Skeletal Muscle Remodeling with Exercise and Inactivity-induced Atrophy, *Int J Sports Med*, 41(14), pp. 994-1008.
19. Coria M.S., Carranza P.G., Palma G.A., 2018, Calpain System in meat tenderization: A molecular approach, *Revista MVZ Córdoba*, 236523-6536.
20. Luo Y., Sellitti D.F., Suzuki K., 2016, *The Calpain Proteolytic System*, in *Encyclopedia of Cell Biology*, Academic Press, Waltham. pp 670-680.
21. Campbell R.L., Davies P.L., 2012, Structure-function relationships in calpains, *The Biochemical journal*, 447 3335-51.
22. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., et al., 2003, The calpain system, *Physiol Rev*, 83(3), pp. 731-801.

23. Ono Y., Sorimachi H., 2012, Calpains — An elaborate proteolytic system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), pp. 224-236.
24. Macqueen D.J., Wilcox A.H., 2014, Characterization of the definitive classical calpain family of vertebrates using phylogenetic, evolutionary and expression analyses, *Open Biology*, 4(4), pp. 130219.
25. Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K., 1997, Structure and physiological function of calpains, *Biochem J*, 328 (Pt 3)(Pt 3), pp. 721-32.
26. Lepage S.E., Bruce A.E.E., 2008, Characterization and comparative expression of zebrafish calpain system genes during early development, *Developmental Dynamics*, 237(3), pp. 819-829.
27. Preziosa E., Liu S., Terova G., et al., 2013, Effect of nutrient restriction and re-feeding on calpain family genes in skeletal muscle of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *PLoS One*, 8(3), pp. e59404.
28. Salem M., Yao J., Rexroad C.E., et al., 2005, Characterization of calpastatin gene in fish: its potential role in muscle growth and fillet quality, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 141(4), pp. 488-97.
29. Macqueen D.J., Meischke L., Manthri S., et al., 2010, Characterisation of capn1, capn2-like, capn3 and capn11 genes in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Transcriptional regulation across tissues and in skeletal muscle at distinct nutritional states, *Gene*, 453(1-2), pp. 45-58.
30. Shu J.T., Zhang M., Shan Y.J., et al., 2015, Analysis of the genetic effects of CAPN1 gene polymorphisms on chicken meat tenderness, *Genet Mol Res*, 14(1), pp. 1393-403.
31. Cui H.X., Wang S.L., Guo L.P., et al., 2018, Expression and effect of Calpain9 gene genetic polymorphism on slaughter indicators and intramuscular fat content in chickens, *Poult Sci*, 97(10), pp. 3414-3420.
32. Rosa T., Azhar A., Akmal M., et al., 2020, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 316 on Calpain Gene in Aceh Cattle, *E3S Web of Conferences*, 15101027.
33. Mahrous K.F., Hassanane M.S., Shafey H.I., et al., 2016, Association between single nucleotide polymorphism in ovine Calpain gene and growth

- performance in three Egyptian sheep breeds, *J Genet Eng Biotechnol*, 14(2), pp. 233-240.
34. Trang T.T.H., 2022, *Nghiên cứu đa hình một số gen liên quan đến tính trạng tăng trưởng ở cá tra nuôi (Pangasianodon hypophthalmus)*, Luận văn Tiến sĩ, Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Hà Nội.
 35. Menlove K., Crandall K., 2009, Similarity searching using BLAST, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 5371-22.
 36. Saitou N., Nei M., 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406-425.
 37. Paysan-Lafosse T., Blum M., Chuguransky S., et al., 2023, InterPro in 2022, *Nucleic Acids Res*, 51(D1), pp. D418-d427.
 38. Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
 39. Anh V.H., 2022, *Characterization of calpain family genes in striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*, Bachelor Thesis - University of Science and Technology of Hanoi.
 40. Dear T.N., Boehm T., 2001, Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes, *Gene*, 274(1-2), pp. 245-52.
 41. Prykhozhiy S.V., Caceres L., Ban K., et al., 2023, Loss of calpain3b in Zebrafish, a Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy, Increases Susceptibility to Muscle Defects Due to Elevated Muscle Activity, *Genes*, 14(2), pp. 492.
 42. Coomer C.E., Morris A.C., 2018, Capn5 Expression in the Healthy and Regenerating Zebrafish Retina, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(8), pp. 3643-3654.
 43. Dong B., Liu R., 2008, Characterization of endogenous and recombinant human calpain-10, *Biochimie*, 90(9), pp. 1362-71.
 44. Gaprindashvili G., 2015, Phylogenetic Analysis and Taste Cell Expression of Calpain 9 in Catfish (*Ictalurus punctatus*), *Natural Science*, 7143-150.

45. Rawlings N.D., 2015, Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases, *Biology Direct*, 10(1), pp. 66.
46. Liu S.Y., Jiang H., Yuan B., et al., 2015, Characterization of a novel CAPN3 transcript generated by alternative splicing in cattle, *Genet Mol Res*, 14(1), pp. 457-63.
47. Hauerslev S., Sveen M.-L., Duno M., et al., 2012, Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 13(1), pp. 43.
48. Chen L., Tang F., Gao H., et al., 2021, CAPN3: A muscle-specific calpain with an important role in the pathogenesis of diseases (Review), *Int J Mol Med*, 48(5), pp. 203.
49. Cuevas-Rodríguez B.L., Sifuentes-Rincón A.M., Ambriz-Morales P., et al., 2016, Novel single nucleotide polymorphisms in candidate genes for growth in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45.
50. Tsai H.Y., Hamilton A., Guy D.R., Houston R.D., 2014, Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene are associated with growth-related traits in farmed Atlantic salmon, *Anim Genet*, 45(5), pp. 709-15.
51. Horan M., Millar D.S., Hedderich J., et al., 2003, Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region, *Hum Mutat*, 21(4), pp. 408-23.
52. Ge W., Davis M.E., Hines H.C., et al., 2003, Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle, *J Anim Sci*, 81(3), pp. 641-8.
53. Liu W., Yu Y., Li G., et al., 2012, Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the growth hormone-releasing hormone receptor gene are associated with growth and reproduction traits in chickens, *Anim Genet*, 43(5), pp. 564-9.
54. Barendse W., Harrison B.E., Bunch R.J., Thomas M.B., 2008, Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle, *BMC Genetics*, 9(1), pp. 41.

55. Zhang Z.R., Liu Y.P., Yao Y.G., et al., 2009, Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens, *BMC Genet*, 1010.
56. Royer A.M., Shivers C., Riley D.G., et al., 2016, Single nucleotide polymorphisms associated with carcass traits in a population of Brahman and Brahman-influenced steers, *Genet Mol Res*, 15(2), pp.

Phụ lục 1. Danh sách các gen capn ở các loài cá khác sử dụng làm gen truy vấn

STT	GENE	Tên loài	NCBI_Mã số genome	NCBI_Nucleotide_ID	NCBI_Protein_ID
1	<i>CAPN1</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	NM_001329270.1	NP_001316199.1
2	<i>CAPN2</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>GCF_000002035.6</i>	NM_001013501.2	NP_001013519.1
3	<i>CAPN3</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_017475763.2	XP_017331252.1
4	<i>CAPN5</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_017466373.2	XP_017321862.1
5	<i>CAPN6</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	<i>GCF_022655615.1</i>	XM_027134444.2	XP_026990245.2
6	<i>CAPN7</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_017477965.1	XP_017333454.1
7	<i>CAPN8</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>GCF_000002035.6</i>	NM_001244080.1	NP_001231009.1
8	<i>CAPN9</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_017457232.2	XP_017312721.1
9	<i>CAPN10</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_047153646.1	XP_047009602.1
10	<i>CAPN11</i>	<i>Protopterus annectens</i>	<i>GCF_019279795.1</i>	XM_044060753.1	XP_043916688.1
11	<i>CAPN12</i>	<i>Indo striped catfish</i>	<i>GCF_009078355.1</i>	XM_026913398.2	XP_026769199.2
12	<i>CAPN13</i>	<i>Protopterus annectens</i>	<i>GCF_019279795.1</i>	XM_044058898.1	XP_043914833.1
13	<i>CAPN15</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCA_004006655.3</i>	XM_017480899.2	XP_017336388.1

14	<i>CAPN1</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>GCF_001660625.3</i>	XM_017459909.1	XP_017315398.1
----	--------------	----------------------------	------------------------	----------------	----------------

Phụ lục 2. Danh sách các protein họ calpain ở các loài khác nhau sử dụng cho cây phát sinh

STT	Species	Protein name	Accession number
1	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN1	ACY78224.1
2	<i>Ictalurus punctatus</i>	CAPN1	NP_001316199.1
3	<i>Danio rerio</i>	CAPN1	AAF82808.1
4	<i>Sparus aurata</i>	CAPN1	AGZ95052.1
5	<i>Phyllostomus discolor</i>	CAPN1	KAF6102475.1
6	<i>Homo sapiens</i>	CAPN1	AAH75862.1
7	<i>Mus musculus</i>	CAPN1	NP_001103974.1
8	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN1	KAG6927617.1
9	<i>Cairina moschata</i>	CAPN1	QJI54812.1
10	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAPN1 large subunit isoform X1	XP_021432414.2
11	<i>Salmo salar PREDICTED</i>	CAPN2	XP_013987040.1
12	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN2	ACY78225.1
13	<i>Mus musculus</i>	CAPN2	EDL13105.1
14	<i>Sparus aurata</i>	CAPN2	AGZ95053.1
15	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	CAPN2	XP_032955584.1
16	<i>Macaca fascicularis</i>	CAPN2	NP_001247596.1
17	<i>Gallirallus okinawae</i>	CAPN2	XP_009272128.1
18	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAPN2 large subunit isoform X1	XP_036811423.1
19	<i>Danio rerio</i>	CAPN2b	AAI65647.1
20	<i>Labeo rohita</i>	CAPN2b	XP_050950350.1
21	<i>Labeo rohita</i>	CAPN2a	XP_050982288.1
22	<i>Homo sapiens</i>	CAPN3	NP_775110.1
23	<i>Mus musculus</i>	CAPN3	AAD28255.2

STT	Species	Protein name	Accession number
24	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN3	XP_034435144.1
25	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN3	KAG6935611.1
26	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	CAPN3	XP_032965598.1
27	<i>Phyllostomus discolor</i>	CAPN3	KAF6129124.1
28	<i>Danio rerio</i>	CAPN3	NP_001004571.1
29	<i>Thamnophis elegans</i>	CAPN3	XP_032076184.1
30	<i>Ictalurus punctatus</i>	CAPN3b	NP_001316177.1
31	<i>Salmo salar</i>	CAPN3b	NP_001158880.1
32	<i>Anabas testudineus</i>	CAPN3a	XP_026195942.1
33	<i>Meleagris gallopavo</i>	CAPN3	ALJ53307.1
34	<i>Nothobranchius furzeri</i>	CAPN5	XP_015806162.1
35	<i>Oreochromis aureus</i>	CAPN5	XP_039474529.1
36	<i>Lacerta agilis</i>	CAPN5	XP_033001891.1
37	<i>Homo sapiens</i>	CAPN5	XP_011543527.1
38	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	CAPN5	XP_032976748.1
39	<i>Molothrus ater</i>	CAPN5	XP_036247875.1
40	<i>Columba livia</i>	CAPN5	XP_005500648.1
41	<i>Zootoca vivipara</i>	CAPN5	XP_034971390.1
42	<i>Thamnophis elegans</i>	CAPN5	XP_032094473.1
43	<i>Danio rerio</i>	CAPN5a	NP_001073476.1
44	<i>Labeo rohita</i>	CAPN5a	XP_050991494.1
45	<i>Nothobranchius furzeri</i>	CAPN5b	SBP58125.1
46	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN6	XP_031747775.1
47	<i>Bufo bufo</i>	CAPN6	XP_040260997.1
48	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN6	KAG6933472.1
49	<i>Lacerta agilis</i>	CAPN6	XP_032993695.1
50	<i>Mus musculus</i>	CAPN6	AAH52167.1
51	<i>Homo sapiens</i>	CAPN6	NP_055104.2
52	<i>Gallus gallus</i>	CAPN6	XP_040526511.1

STT	Species	Protein name	Accession number
53	<i>Bagarius yarrelli</i>	CAPN6	TSL34648.1
54	<i>Pundamilia nyererei</i>	CAPN6	XP_005735520.1
55	<i>Pseudonaja textilis</i>	CAPN7	XP_026580318.1
56	<i>Chrysemys picta bellii</i>	CAPN7	XP_005278720.2
57	<i>Nothobranchius furzeri</i>	CAPN7	XP_015805418.1
58	<i>Bagarius yarrelli</i>	CAPN7	TSK16117.1
59	<i>Danio rerio</i>	CAPN7	NP_001128580.1
60	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN7	XP_012819957.2
61	<i>Microcaecilia unicolor</i>	CAPN7	XP_030062172.1
62	<i>Homo sapiens</i>	CAPN7	AAH56202.1
63	<i>Mus caroli</i>	CAPN7	XP_021037662.1
64	<i>Athene cunicularia</i>	CAPN7	XP_026697342.1
65	<i>Lonchura striata domestica</i>	CAPN7	XP_021399034.1
66	<i>Salmo salar</i>	CAPN7 isoform X1	NP_001167074.1
67	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	CAPN7 isoform X1	XP_027004955.1
68	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	CAPN7 isoform X2	XP_051721813.1
69	<i>Thalassophryne amazonica</i>	CAPN7 isoform X2	XP_034030285.1
70	<i>Homo sapiens</i>	CAPN8	AAI57894.1
71	<i>Mus musculus</i>	CAPN8	NP_570960.2
72	<i>Anas platyrhynchos</i>	CAPN8	XP_005015545.1
73	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN8	KAG6926165.1
74	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN8	NP_001039108.1
75	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN8	XP_034445247.1
76	<i>Danio rerio</i>	CAPN8	NP_001231009.1
77	<i>Mauremys reevesii</i>	CAPN8	XP_039388237.1
78	<i>Xenopus laevis</i>	CAPN8	XP_018118132.1
79	<i>Meleagris gallopavo</i>	CAPN8	XP_003203881.2
80	<i>Homo sapiens</i>	CAPN9	NP_006606.1
81	<i>Mus musculus</i>	CAPN9	AAH58748.1

STT	Species	Protein name	Accession number
82	<i>Oreochromis niloticus</i>	CAPN9	XP_003454134.1
83	<i>Danio rerio</i>	CAPN9	NP_001003501.1
84	<i>Lacerta agilis</i>	CAPN9	XP_033000139.1
85	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN9	KAG6932829.1
86	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN9	XP_034445250.1
87	<i>Bufo bufo</i>	CAPN9	XP_040286035.1
88	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN9	NP_001121483.1
89	<i>Meleagris gallopavo</i>	CAPN9	XP_003204086.1
90	<i>Molothrus ater</i>	CAPN9	XP_036236223.1
91	<i>Ictalurus punctatus</i>	CAPN9a	BAR42584.1
92	<i>Ictalurus punctatus</i>	CAPN9b	BAR42585.1
93	<i>Mus musculus</i>	CAPN10	NP_035926.2
94	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN10	KAG6923859.1
95	<i>Microcaecilia unicolor</i>	CAPN10	XP_030071996.1
96	<i>Homo sapiens</i>	CAPN10	AAG17966.1
97	<i>Geotrypetes seraphini</i>	CAPN10	XP_033815207.1
98	<i>Danio rerio</i>	CAPN10	XP_009297070.1
99	<i>Salmo salar</i>	CAPN10	XP_014047518.1
100	<i>Columba livia</i>	CAPN10	XP_005506671.1
101	<i>Molothrus ater</i>	CAPN10	XP_036244445.1
102	<i>Thamnophis elegans</i>	CAPN10	XP_032081274.1
103	<i>Oreochromis niloticus</i>	CAPN10	XP_003437996.1
104	<i>Ictalurus punctatus</i>	CAPN10 isoform X1	XP_047009602.1
105	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	CAPN10 isoform X1	XP_051723392.1
106	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAPN10 isoform X1	XP_021444495.2
107	<i>Silurus meridionalis</i>	CAPN10 isoform X5	XP_046731860.1
108	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN11	ACY78223.1
109	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN11	NP_001013631.1
110	<i>Bufo bufo</i>	CAPN11	XP_040286765.1
111	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN11	KAG6934062.1

STT	Species	Protein name	Accession number
112	<i>Lacerta agilis</i>	CAPN11	XP_033000436.1
113	<i>Anas platyrhynchos</i>	CAPN11	XP_038032609.1
114	<i>Mus musculus</i>	CAPN11	NP_001013789.1
115	<i>Homo sapiens</i>	CAPN11	AAH33733.1
116	<i>Protopterus annectens</i>	CAPN11	XP_043916697.1
117	<i>Fundulus heteroclitus</i>	CAPN11	JAR80631.1
118	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAPN12	XP_034459207.1
119	<i>Homo sapiens</i>	CAPN12	NP_653292.2
120	<i>Mus musculus</i>	CAPN12	Q9ER56.1
121	<i>Danio rerio</i>	CAPN12	NP_001076532.2
122	<i>Oreochromis aureus</i>	CAPN12	XP_031599782.1
123	<i>Scyliorhinus canicula</i>	CAPN12	XP_038642041.1
124	<i>Gopherus evgoodei</i>	CAPN12	XP_030400194.1
125	<i>Pogona vitticeps</i>	CAPN12	XP_020642859.1
126	<i>Acipenser ruthenus</i>	CAPN13	RXM93703.1
127	<i>Homo sapiens</i>	CAPN13	AAI17346.1
128	<i>Mus musculus</i>	CAPN13	NP_001028616.1
129	<i>Chrysemys picta bellii</i>	CAPN13	XP_023967308.1
130	<i>Sceloporus undulatus</i>	CAPN13	XP_042301967.1
131	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN13	NP_001008025.1
132	<i>Xenopus laevis</i>	CAPN13	XP_018120408.1
133	<i>Columba livia</i>	CAPN13	PKK24731.1
134	<i>Molothrus ater</i>	CAPN13	XP_036236382.1
135	<i>Callorhinchus milii</i>	CAPN14	XP_007896560.1
136	<i>Bufo bufo</i>	CAPN14	XP_040286539.1
137	<i>Xenopus laevis</i>	CAPN14	XP_041420159.1
138	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN14	KAG6929443.1
139	<i>Zootoca vivipara</i>	CAPN14	XP_034966394.1
140	<i>Microcebus murinus</i>	CAPN14	XP_012643822.1
141	<i>Pan paniscus</i>	CAPN14	XP_034808770.1

STT	Species	Protein name	Accession number
142	<i>Chelydra serpentina</i>	CAPN15	KAG6926354.1
143	<i>Columba livia</i>	CAPN15	XP_005505707.1
144	<i>Bagarius yarrelli</i>	CAPN15	TSO57262.1
145	<i>Oreochromis niloticus</i>	CAPN15	XP_025762265.1
146	<i>Xenopus tropicalis</i>	CAPN15	NP_001106511.1
147	<i>Lacerta agilis</i>	CAPN15	XP_033023921.1
148	<i>Meleagris gallopavo</i>	CAPN15	XP_010717607.2
149	<i>Homo sapiens</i>	CAPN15	XP_047290490.1
150	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	CAPN15	KAF6271313.1
151	<i>Protopterus annectens</i>	CAPN15	XP_043944893.1
152	<i>Nibea albiflora</i>	CAPN15	KAG8009137.1
153	<i>Lates calcarifer</i>	CAPN15	XP_018544085.2
154	<i>Labeo rohita</i>	CAPN15	KAI2648752.1

Phụ lục 3. Dữ liệu $2^{-\Delta Ct}$ ở các mô

Dữ liệu $2^{-\Delta Ct}$ ở các mô não của 5 gen

<i>CAPN1</i>	<i>CAPN2</i>	<i>CAPN3</i>	<i>CAPN11</i>	<i>CAPN13</i>
0.00304	1.84E-05	0.00652	0.015303	6.32E-05
0.00273	6.15E-05	0.00488	0.010167	1.76E-05
0.00565	1.14E-05	0.00244	0.016958	1.74E-05

Dữ liệu $2^{-\Delta Ct}$ ở các mô gan của 5 gen

<i>CAPN1</i>	<i>CAPN2</i>	<i>CAPN3</i>	<i>CAPN11</i>	<i>CAPN13</i>
0.00631	8.70E-06	0.00032	0.003108	9.71E-05
0.0034	1.72E-05	0.00011	0.002259	8.41E-06
0.00351	2.53E-05	0.00019	0.001391	7.78E-05
0.0044	3.09E-05	0.00028	0.002371	4.86E-05

Dữ liệu $2^{-\Delta Ct}$ ở các mô cơ của 5 gen

<i>CAPN1</i>	<i>CANP2</i>	<i>CANP3</i>	<i>CAPN11</i>	<i>CAPN13</i>
0.00145	7.79E-06	0.040386	0.017579	9.12384E-05
0.001439	1.62E-05	0.037163	0.016863	0.000167913
0.001503	5.46E-05	0.039958	0.010167	9.38034E-05

Phụ lục 4. Các SNP được phát hiện trên vùng promoter của gen *CAPN3*

STT	Vị trí SNP trên gen Promoter	REF	ALT	Thành phần kiểu gen		Thành phần alen	
				STN a	STC a	STN	STC
1	Promoter-845	T	C	10TT 0	9TT:1TC 0.1	20T	19T:1C
2	Promoter-833	A	T	2AA:4AT:4TT 0.66	2AA:3AT:5TT 0.54	8A:12T	7A:13T
3	Promoter-824	T	G	9TT:1TG 0.1	10TT 0	19T:1G	20T
4	Promoter-816	A	G	9AA:1AG 0.1	10AA 0	19A:1G	20A
5	Promoter-814	T	G	9TT:1TG 0.1	10TT 0	19T:1G	20T
6	Promoter-802	T	C	10TT 0	9TT:1TC 0.1	20T	19T:1C
7	Promoter-800	G	T	10GG 0	9GG:1GT 0.1	20G	19G:1T
8	Promoter-783	C	G	10CC 0	9CC:1CG 0.1	20C	19C:1G
9	Promoter-781	C	G	9CC:1CG 0.1	10CC 0	19C:1G	20C
10	Promoter-768	T	G	9TT:1TG 0.1	10TT 0	19T:1G	20T
11	Promoter-745	G	T	10GG 0	9GG:1GT 0.1	20G	19G:1T
12	Promoter-725	C	G	9CC:1CG 0.1	10CC 0	19C:1G	20C

13	Promoter-724	A	C	10AA 0	9AA:1CC 0.1	20A	18A:2C
14	Promoter-719	A	G	9AA:1AG 0.1	10AA 0	19A:1G	20A
15	Promoter-698	T	C	9TT:1TC 0.1	10TT 0	19T:1C	20T
16	Promoter-689	T	C	10TT 0	9TT:1TC 0.1	20T	19T:1C
17	Promoter-688	T	A	9TT:1TA 0.1	10TT 0	19T:1A	20T
18	Promoter-684	T	A	10TT 0	8TT:2TA 0.2	20T	18T:2A
19	Promoter-683	T	G	9TT:1TG 0.1	10TT 0	19T:1G	20T
20	Promoter-681	G	A	9GG:1GA 0.1	10GG 0	19G:1A	20G
21	Promoter-679	T	A	9TT:1TA 0.1	9TT:1AA 0.1	19T:1A	18T:2A
22	Promoter-678	A	C	10AA 0	9AA:1AC 0.1	20A	19A:1C
23	Promoter-672	A	C	1AA:2AC:7CC 0.3	0AA:1AC:8CC:1NN 0.11	4A:16C	1A:17C
24	Promoter-665	T	G	10TT 0	8TT:1TG:1NN 0.11	20T	17T:1G
25	Promoter-663	A	T	10AA 0	8AA:1AT:1NN 0.11	20A	17A:1T
26	Promoter-650	T	A	10TT 0	8TT:1TA:1NN 0.11	20T	17T:1A
27	Promoter-646	T	G	7TT:2TG:1GG	7TT:2TG:1NN	16T:4G	16T:2G

				0.33	0.22		
28	Promoter-612	G	T	10GG 0	7GG:2GT:1NN 0.22	20G	16G:2T
29	Promoter-594	G	C	7GG:3CC 0.43	6GG:3CC:1NN 0.5	14G:6C	12G:6C
30	Promoter-593	C	A	7CC:3AA 0.43	6CC:3AA:1NN 0.5	14C:6A	12C:6A
31	Promoter-592	A	C	7AA:3CC 0.43	6AA:3CC:1NN 0.5	14A:6C	12A:6C
32	Promoter-588	T	C	2TT:8CC 0.25	1TT:8CC:1NN 0.13	4T:16C	2T:16C
33	Promoter-576	G	T	3GG:7TT 0.43	1GG:8TT:1NN 0.13	6G:14T	2G:16T
34	Promoter-584	T	G	3TT:7GG 0.43	1TT:8GG:1NN 0.13	6T:14G	2T:16G
35	Promoter-568	G	T	7GG:3TT 0.43	8GG:1TT:1NN 0.13	14G:6T	16G:2T
36	Promoter-582	G	T	3GG:7TT 0.43	1GG:1GT:7TT:1NN 0.25	6G:14T	3G:15T