

ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *GmCHI* PHÂN LẬP TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG

Trần Thanh Vân^{1,2}, Nguyễn Thị Mai^{2,3},
Trương Đức Thắng², Nguyễn Công Tuấn Linh²,
Nguyễn Vũ Bảo², Hoàng Phú Hiệp², Chu Hoàng Mậu^{2*}

¹ Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang;

² Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên;

³ Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên;

TÓM TẮT

Isoflavone trong cây đậu tương có tác dụng làm giảm sự xuất hiện của một số loại ung thư và có nhiều lợi ích cho sức khỏe. Sự tạo thành isoflavone ở cây đậu tương cần có mặt của enzyme chìa khóa chalcone isomerase (CHI) được mã hóa bởi gen *GmCHI*. Trong nghiên cứu này, gen *GmCHI* đã được phân lập từ mRNA giống đậu tương ĐT51 trồng phổ biến ở Việt Nam. Đoạn mã hóa của gen *GmCHI* có 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. So với trình tự gen *GmCHI* có mã số NM_001248290 trên GenBank, gen *GmCHI* của giống ĐT51 có 7 vị trí sai khác về nucleotide (23, 24, 33, 37, 60, 74 và 115) và 5 vị trí sai khác về amino acid (8, 11, 13, 25, 39). Kết quả so sánh cấu trúc dự đoán từ chuỗi amino acid của cả 2 trình tự protein suy diễn tương ứng đều thuộc phân họ chalcone superfamily (cl03589). Khoảng cách di truyền giữa các giống đậu tương có trình tự gen *GmCHI* đã công bố được xác định dựa trên trình tự nucleotide là 3,8% và dựa trên trình tự amino acid là 4,1%.

Từ khóa: *chalcone isomerase*, gen *GmCHI*, isoflavone, Soybean, tách dòng gen

MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu cho thấy đậu tương tốt cho sức khỏe con người nhờ có chứa thành phần isoflavone. Isoflavone là hoạt chất có nguồn gốc thảo mộc, có thể làm giảm sự xuất hiện của một số loại ung thư, giảm các triệu chứng mãn kinh, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch, béo phì, loãng xương, ngăn chặn sự gia tăng cholesterol trong máu. Isoflavone được tìm thấy chủ yếu ở đậu tương và các loại cây họ đậu khác [2]. Tuy nhiên, hàm lượng isoflavone trong đậu tương thấp, trong khoảng từ 50 - 3000 µg/g và tồn tại ở hai dạng chính là glycoside và aglucone. Dạng glycoside có khối lượng phân tử lớn, chiếm tới trên 90% isoflavone tổng số, được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người, trong khi đó, dạng aglucone được hấp thụ nhanh, nhưng hàm lượng lại rất thấp, chỉ chiếm từ 1% đến 5% isoflavone tổng số.

Do đó, việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen vào việc nâng cao hàm lượng isoflavone trong đậu tương là rất cần thiết. Bằng kỹ thuật biểu hiện gen, các dòng cây chuyển gen được

tạo ra có khả năng tổng hợp isoflavone cao, đáp ứng được nhu cầu của thực tiễn [1], [3], [4]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng và giải trình tự gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Quá trình nghiên cứu được bắt đầu bằng tách chiết RNA tổng số. RNA tổng số được tách chiết từ mầm đậu tương và khử bởi DEPC. Mẫu được nghiền trong nitor lỏng thành bột mịn, thêm 1ml Trizol Regents, đảo nhẹ đều trong 5 phút rồi bổ sung 500 µl C/I ở 25°C (5 phút), sau đó li tâm 10000 vòng trong 15 phút ở 4°C thu 500 µl pha lỏng và bổ sung 500 µl isopropanol 4°C, đảo đều từ 5 - 10 phút ở 25°C, giữ ở -20°C trong 45 - 60 phút. Li tâm 10000 vòng 15 phút 4°C, thu cặn. Bổ sung 700 µl ethanol 70° pha DEPC 0,01%, li tâm 600 vòng, 5 phút, thu tủa và làm khô RNA trong điều kiện vô trùng. Cuối cùng bổ sung 30 - 50 µl H₂O khử ion pha DEPC 0,01% và lưu giữ ở -85°C. Sau đó từ RNA thu được tiến hành tạo cDNA và khuếch đại gen *GmCHI* bằng RT-PCR. Sản phẩm thu được của phản ứng RT-PCR được điện di

* Tel: 0913383289; Email.: chuhoangmau@tnu.edu.vn

kiểm tra trên gel agarose 0,8% cùng với thang DNA chuẩn. Gel điện di chứa DNA được ủ ở nhiệt độ 60°C và thu hồi lại bằng phương pháp thu hồi trên cột GFX.

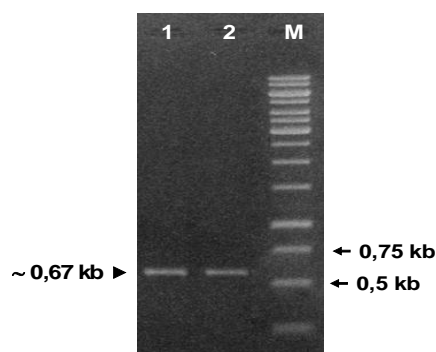
DNA đã được tinh sạch được giải trình tự, sử dụng phương pháp giải trình tự trực tiếp trên thiết bị giải trình tự nucleotide tự động ABI PRISM@3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) tại Viện Công nghệ Sinh học. Kết quả thu được được xử lý bằng phần mềm DNASTar, Bioedit và các công cụ BLAST và CDART trên NCBI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân bản gen *GmCHI* từ mRNA của giống đậu tương ĐT51

Giống đậu tương ĐT51 được sử dụng làm đối tượng phân lập gen *GmCHI*. Hạt được ngâm ủ, nảy mầm, khi được 6 ngày tuổi tiến hành thu miền sinh trưởng của rễ để phục vụ thí nghiệm tách chiết RNA. RNA tổng số được tách chiết và tổng hợp cDNA, gen *GmCHI* được nhân bản bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi CHI-NcoI-F/mCHI-NotI-R và sản phẩm RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1).

Kết quả nhân bản gen *GmCHI* ở hình 1 cho thấy băng DNA được khuếch đại có kích thước khoảng 0,67 kb, đúng như kích thước lý thuyết của gen *GmCHI*. Như vậy bước đầu có thể nhận xét rằng, gen *GmCHI* đã được nhân bản từ mRNA của giống đậu tương ĐT51. Sản phẩm RT-PCR được tinh sạch và nhân dòng để thu lượng sản phẩm đủ lớn phục vụ giải trình tự nucleotide.

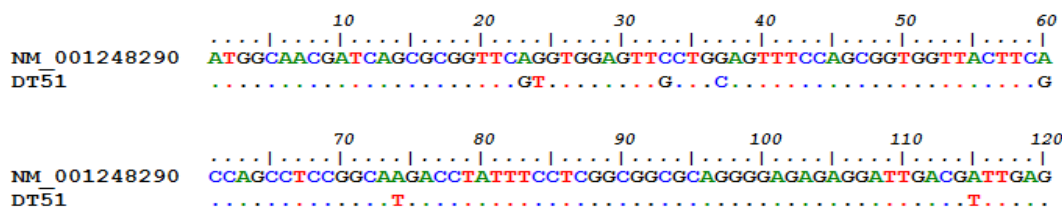


Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cDNA của gen *GmCHI* từ giống đậu tương ĐT51. M: thang DNA 1,0 kb; giếng 1, 2: Hai mẫu sản phẩm RT-PCR nhân bản gen *GmCHI* từ mRNA của giống ĐT51

Đặc điểm của trình tự gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51

Đoạn mã hóa của gen *GmCHI* được xác định trình tự nucleotide trên thiết bị giải trình tự nucleotide tự động, kết quả cho thấy đoạn mã hóa của gen *GmCHI* có 657 nucleotide.

Kết quả phân tích ở hình 2 đã khẳng định đoạn gen phân lập từ mRNA của giống đậu tương ĐT51 là gen *GmCHI*. Gen *GmCHI* có kích thước 657 nucleotide, mã hóa cho 218 amino acid. Tuy nhiên, kết quả so sánh giữa trình tự nucleotide của gen *GmCHI* ở giống đậu tương ĐT51 và trình tự gen *GmCHI* mang mã số NM_001248290 [5] trên GenBank được thể hiện ở hình 2 cho thấy có sự sai khác ở một số vị trí nucleotide. Bảng 1 cho thấy giữa hai trình tự nucleotide có 7 vị trí sai khác, đó là các vị trí 23, 24, 33, 37, 60, 74 và 115.

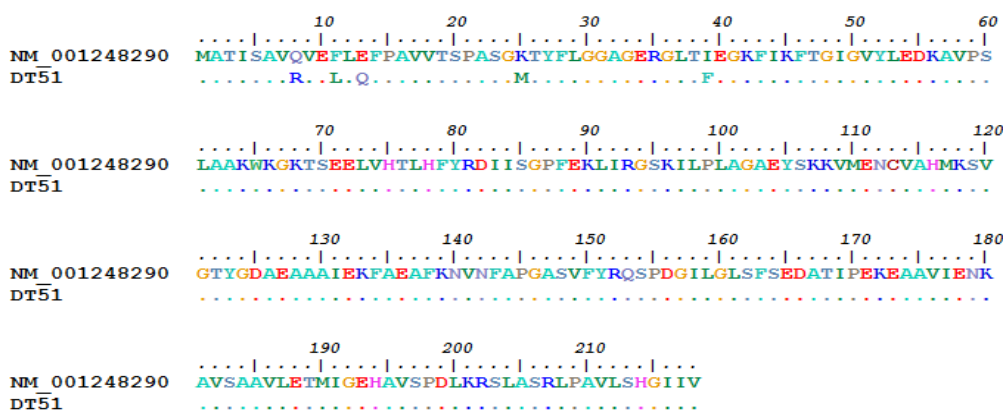


Hình 2. Các vị trí nucleotide sai khác của gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51 so với trình tự gen *GmCHI* mang mã số NM_001248290 trên GenBank

Bảng 1. Các vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51 và trình tự gen mang mã số NM_001248290 trên GenBank

STT	Vị trí	NM_001248290	ĐT51
1	23	A	G
2	24	G	T
3	33	C	G
4	37	G	C
5	60	A	G
6	74	A	T
7	115	A	T

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI* được thể hiện ở hình 3 và bảng 2. Bảng 2 cho thấy giữa hai trình tự amino acid suy diễn có 5 vị trí sai khác, đó là các vị trí 8, 11, 13, 25, 39.

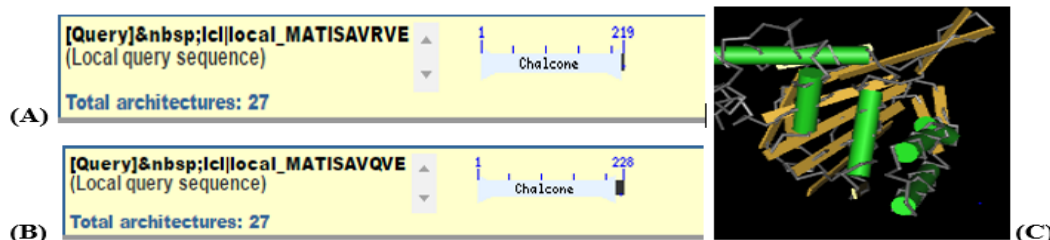


Hình 3. Trình tự amino acid suy diễn từ gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51 và từ gen *GmCHI* mang mã số NM_001248290 trên GenBank

Bảng 2. Các vị trí sai khác trong trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI* phân lập từ giống đậu tương ĐT51 và của trình tự gen mang mã số NM_001248290 trên GenBank

STT	Vị trí	NM_001248290	ĐT51
1	8	Glutamine	Arginine
2	11	Phenylalanine	Leucine
3	13	Glutamic	Glutamine
4	25	Lysine	Methionine
5	39	Izoleucine	Phenylalanine

So sánh dự đoán cấu trúc của hai protein suy diễn từ hai trình tự gen *GmCHI* phân lập từ giống ĐT51 và giống đậu tương có trình tự gen mang mã số NM_001248290 bằng chương trình CDART (Hình 4).



Hình 4. Kết quả so sánh dự đoán cấu trúc của 2 protein suy diễn từ giống ĐT51 (A), trình tự gen mang mã số NM_001248290 (B), cấu trúc mô phỏng trung tâm hoạt động của trình tự protein suy diễn từ gen *GmCHI* của giống đậu tương ĐT51 và giống có trình tự gen NM_001248290 theo liên họ cl03589 (C)

Kết quả xử lý bằng CDART cho thấy cấu trúc dự đoán từ chuỗi amino acid của cả 2 trình tự protein suy diễn từ trình tự gen *GmCHI* của giống đậu tương ĐT51 và giống có trình tự gen mang mã số NM_001248290 đều thuộc phân họ chalcone superfamily (cl03589). Kết quả này chứng minh dự đoán về sự tương đồng về họ enzyme của 2 trình tự protein của giống đậu tương ĐT51 và giống có trình tự gen NM_001248290, từ đó suy đoán cấu hình trung tâm hoạt động của 2 enzyme GmCHI này là giống nhau và không có sự khác biệt về chức năng sinh học (Hình 4). Trên trình tự gen có 7 vị trí sai khác nhưng amino acid chỉ có 5 acid amin bị thay đổi, điều này là do tính thoái hóa của các mã bộ ba, 2 trong số 7 vị trí sai khác không làm thay đổi amino acid mà nó quy định. Nguyên nhân của việc giữ nguyên cấu trúc vùng trung tâm của enzyme GmCHI là do các vị trí sai khác chủ yếu nằm ở phía bên ngoài của chuỗi peptide, ít tham gia vào cấu trúc của trung tâm hoạt động, mặt khác không có sự sai khác dẫn đến mất proline nên không phá vỡ các cầu disulfide, không gây mất cấu trúc không gian của protein.

Sự đa dạng về trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của gen *GmCHI*

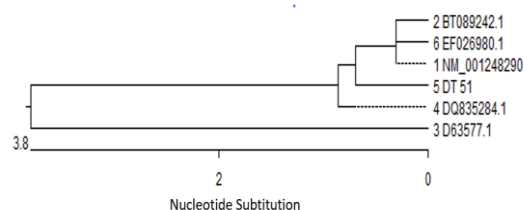
Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự gen *GmCHI* của giống đậu tương ĐT51 với các trình tự gen *GmCHI* trên GenBank bằng BLAST cho thấy 6 trình tự gen có độ tương đồng từ 90% trở lên. Các trình tự này được sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền của các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI*.

Bảng 3 trình bày kết quả phân tích hệ số tương đồng và phân ly dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI* giữa 6 giống đậu tương cho thấy hệ số phân ly trong khoảng khá cao, từ 0,2 đến 7,9%. Trình tự gen *GmCHI* phân lập từ giống ĐT51 có hệ số

phân ly thấp nhất so với trình tự mang mã số NM_001248290 là 1,1% và cao nhất so với trình tự mang mã số D63577.1 là 7,9%. Sơ đồ hình cây (Hình 5) được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI* cho thấy 6 giống đậu tương phân bố trong hai nhánh, với khoảng cách di truyền là 3,8%. Nhánh thứ nhất chỉ có giống mang mã số D63577.1, nhánh thứ hai gồm 5 giống còn lại. Giống ĐT51 nằm trong nhánh thứ hai và có quan hệ gần nhất với giống mang mã số NM_001248290 và DQ835284.1.

Bảng 3. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI*

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	■	99.8	93.3	99.5	98.9	99.5	1	NM_001248290
	2	0.2	■	93.2	99.4	98.8	99.4	2	BT089242.1
	3	6.9	7.0	■	93.3	92.5	92.9	3	D63577.1
	4	0.5	0.6	7.0	■	98.8	99.1	4	DQ835284.1
	5	1.1	1.2	7.9	1.2	■	98.5	5	DT 51
	6	0.5	0.6	7.4	0.9	1.5	■	6	EF026980.1
		1	2	3	4	5	6		

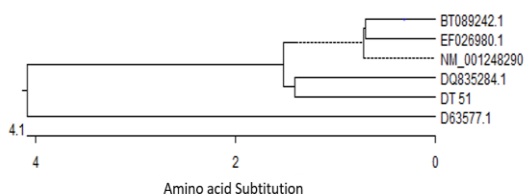


Hình 5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide

Tiếp tục phân tích tính đa dạng của 6 giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid, kết quả được thể hiện ở bảng 4 và hình 6.

Bảng 4. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ gen *GmCHI*

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	■	99.1	90.7	98.6	97.3	98.6	1	NM_001248290
	2	0.5	■	92.7	98.2	96.8	98.2	2	BT089242.1
	3	6.7	7.2	■	92.2	91.3	92.2	3	D63577.1
	4	0.9	1.4	7.7	■	96.8	97.7	4	DQ835284.1
	5	2.3	2.8	8.7	2.8	■	96.3	5	DT 51
	6	0.9	1.4	7.7	1.9	3.3	■	6	EF026980.1
		1	2	3	4	5	6		



Hình 6. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid

Dựa trên trình tự amino acid, bảng 5 cho thấy giống đậu tương ĐT51 có hệ số phân ly dao động trong khoảng từ 2,3 đến 8,7%. Trên sơ đồ hình cây (Hình 6) được chia thành 2 nhánh, trình tự amino acid suy diễn của ĐT51 thuộc nhánh thứ 2, có quan hệ gần nhất với giống mang mã số DQ835284.1 và thuộc cùng một nhóm. Thông qua bảng 4, sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid, có thể nhận thấy giữa các giống lân cận có sự tương đồng cao hơn và có xu hướng phân nhóm di truyền hơn về gen *GmCHI* cũng như enzyme CHI. Điều này là phù hợp với các lí thuyết chung của sinh học phân tử và tiến hóa.

KẾT LUẬN

Gen *GmCHI* đã được phân lập từ mRNA giống đậu tương ĐT51 trồng phổ biến ở Việt Nam. Đoạn mã hóa của gen *GmCHI* có 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. So với trình tự gen *GmCHI* mang mã số NM_001248290 trên NCBI, gen *GmCHI* của giống ĐT51 có 7 vị trí sai khác về nucleotide (23, 24, 33, 37, 60, 74 và 115) và 5 vị trí sai khác về amino acid (8, 11, 13, 25, 39). Kết quả so sánh cấu trúc từ chuỗi amino acid của

cả 2 trình tự protein *GmCHI* suy diễn tương ứng cho thấy chúng đều thuộc phân họ chalcone superfamily (cl03589). Khoảng cách di truyền giữa các giống đậu tương có trình tự gen *GmCHI* đã công bố được xác định dựa trên trình tự nucleotide là 3,8% và dựa trên trình tự amino acid là 4,1%.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cấp Bộ Giáo dục & Đào tạo (B2016-TNA-18) và sự giúp đỡ của Phòng Thí nghiệm Công nghệ gen, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dong X., Braun E. L., Grotewold E. (2001), "Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes", *Plant Physiol* 127, pp. 46-57.
- Kimura Y., Aoki T., Ayabe S. (2001), "Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids", *Plant Physiol*, 42(10): pp. 1169-1173.
- Shirley B. W., Kubasek W. L., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel F. M., Goodman H. M. (1995), "Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis", *Plant J.* 8, pp. 659-671.
- Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., deVos C. H. R., Colliver S. (2002), "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway", *J. Exp. Bot.*, Vol.53, pp. 2099-2106.
- Ralston L. (2015), *Glycine max chalcone isomerase (CHI), mRNA*, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001248290.1, trích dẫn 21-01-2015.

SUMMARY

THE CHARACTERISTICS OF *GmCHI* GENE ISOLATED FROM SOYBEAN

**Tran Thanh Van^{1,2}, Nguyen Thi Mai^{2,3},
Truong Duc Thang², Nguyen Cong Tuan Linh²,
Nguyen Vu Bao², Hoang Phu Hiep², Chu Hoang Mau^{2*}**

¹Tan Trao University, Tuyen Quang

²College of Education - TNU

³College of Agriculture and Forestry - TNU

Soybean plant contains isoflavone, which has the effect of reducing the appearance of some types of cancer and has many benefits for health. Isoflavone metabolizing in soybean needs the presence of chalcone isomerase (CHI)- key enzyme. CHI in soybeans is encoded by *GmCHI* gene. In this study, *GmCHI* gene isolated from mRNA of the soybean cultivar DT51 which has 657 nucleotides in length, encodes 218 amino acids. By comparison with the *GmCHI* gene sequence carrying code NM_001248290 on Genbank, *GmCHI* gene of DT51 cultivar has 7 differences in nucleotide position (23, 24, 33, 37, 60, 74 and 115) and 5 differences in amino acid position (8, 11, 13, 25 and 39). The result of comparison structure predicted by CDART program shows the predicting structure from acid amino sequence of both proteins belong to the chalcone superfamily (cl03589) subfamily. Genetic distance between soybean cultivars based on nucleotide sequences of *GmCHI* gene is 3.8% and based on the amino acid sequence deduced is 4.1%.

Keywords: *chalcone isomerase, gene cloning, GmCHI gene, isoflavones, Soybean.*

Ngày nhận bài: 25/11/2016; Ngày phản biện: 15/12/2016; Ngày duyệt đăng: 24/01/2017

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan - Trường ĐH Sư phạm - ĐHTN

* Tel: 0913383289; Email.: chuhoangmau@tnu.edu.vn