

ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN EXPANSIN PHÂN LẬP TỪ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐỊA PHƯƠNG VIỆT NAM

Lò Thanh Sơn¹, Bùi Ngọc Bích², Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu^{3*}

¹Trường đại học Tây Bắc

²Sở Giáo dục - Đào tạo Lạng Sơn

³Đại học Thái Nguyên, *mauchuoang@gmail.com

TÓM TẮT: Expansin là một họ protein có chức năng mở rộng thành tế bào và đã được coi là loại protein chủ yếu có ảnh hưởng đến việc kéo dài tế bào rễ ở thực vật. Hiện nay, vai trò của expansin trong quá trình phát triển rễ của cây đậu tương vẫn chưa được làm sáng tỏ mặc dù đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nhân bản, chọn dòng và xác định trình tự gen *GmEXPI* của giống đậu tương địa phương chịu hạn tốt Xuân Lạng Sơn. Trình tự gen *GmEXPI* phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn có kích thước là 1068 nucleotide, trong đó vùng mã hóa dài 768 nucleotide, với 2 exon và 1 intron. Kích thước exon 1 là 467 bp; exon 2 là 301 bp; intron là 300 bp. Gen *GmEXPI* mã hóa protein gồm 255 amino acid. So với đoạn gen *GmEXPI* mang mã số AF516879 trên GenBank, gen *GmEXPI* của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn sai khác ở 17 vị trí nucleotide và 8 vị trí amino acid; vùng DPBB và Pollen allerg của protein suy diễn đều có 3 vị trí amino acid thay đổi. Những thay đổi này có liên quan gì với sự phát triển bộ rễ cũng như mức độ chịu hạn của cây đậu tương cần phải có những nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Chịu hạn, đậu tương, expansin, *GmEXPI* kéo dài rễ.

MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, đậu tương là loại cây trồng có tầm quan trọng thứ ba trong nhóm cây lấy hạt sau lúa và ngô. Sản lượng đậu tương trên thế giới đạt hàng trăm triệu tấn trong một năm, trong khi đó, ở Việt Nam chỉ đạt vài trăm nghìn tấn trong một năm, điều này cho thấy, tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam so với các nước trong khu vực vẫn còn ở mức thấp. Một trong những nguyên nhân là do biến đổi khí hậu, hạn hán xảy ra liên tục và kéo dài đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương.

Hai cơ chế chính liên quan đến khả năng chịu hạn của cây đậu tương, đó là sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu và sự phát triển bộ rễ. Khả năng thu nhận nước của cây phụ thuộc chủ yếu vào bộ rễ. Để tránh mất nước, những cây chịu hạn thường có bộ rễ khỏe, dài, mập có sức xuyên sâu hoặc rễ lan rộng với số lượng lớn sẽ hút được nhiều nước trong đất. Thực vật nói chung và cây đậu tương nói riêng khi ở giai đoạn cây non thường chịu ảnh hưởng mạnh của hạn hán vì bộ rễ phát triển chưa đầy đủ và còn yếu [11].

Expansin là một họ protein có chức năng mở rộng thành tế bào và đã được coi là loại protein chủ yếu có ảnh hưởng đến việc kéo dài

tế bào rễ ở thực vật. Nghiên cứu của Cosgrove et al. (1993, 1996, 1998) [1, 2, 3] đã chỉ ra rằng, expansin có vai trò làm tăng kích thước tế bào thực vật, làm nở lỏng thành tế bào. Ngoài ra, enzyme và các tác nhân khác cũng làm tăng cường mở rộng thành tế bào [4, 5]. Sự kéo dài tế bào gây ra bởi môi trường có tính acid và expansin với vai trò mở rộng thành tế bào đã tìm thấy ở nhiều đối tượng thực vật khác nhau, như táo, rêu, dương xỉ, cây hạt trần và cây hạt kín, vì vậy, có thể coi expansin giữ vai trò trong việc làm giãn dài tế bào. Các expansin thực vật trong họ expansin làm biến đổi thành tế bào có nguồn gốc và tiến hóa như thế nào vẫn còn nhiều bí ẩn [10]. Nhiều gen đã được phân lập từ hệ gen của một loạt các loài thực vật và kết quả thu được đã chỉ ra rằng chúng tạo thành một họ gen expansin [3]. Li et al. (2002) [10] đã phân loại expansin thành ba phân họ α -, β - và γ -expansin, dựa trên mối quan hệ phát sinh loài của chúng. Kết quả nghiên cứu của Kam et al. (2005) [9] cũng cho thấy, hai gen EXP1 và EXPB2 liên quan đến sự tăng trưởng và phát triển của rễ cây. Lee et al. (2003) [6] lần đầu tiên xác định được mối liên quan của gen expansin với sự kéo dài rễ ở cây đậu tương và

cho biết mức độ biểu hiện của *GmEXPI* rất cao trong rễ mầm 5 ngày tuổi, mRNA của gen *GmEXPI* được tìm thấy nhiều nhất ở vùng gốc rễ và vùng tế bào kéo dài. Những kết quả này gợi ý rằng gen EXP giữ một vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của rễ, đặc biệt là trong sự kéo dài rễ. *GmEXPI*, *GmEXP2* và expansins khác trong họ expansin có độ tương đồng cao, chỉ khác ở hàm lượng acid amin. Nghiên cứu của Guo et al. (2011) [8] cho rằng, gen β -expansin (*GmEXPB2*) ở đậu tương về bản chất có liên quan đến cấu trúc hệ thống rễ phù hợp phản ứng với stress phi sinh học từ môi trường. EXPB2 là một protein tiết nằm trên thành tế bào, chủ yếu được thể hiện trong rễ và được đánh giá cao gây ra bởi môi trường thiếu phospho, EXPB2 tham gia kéo dài rễ và sau đó ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của thực vật và sự hấp thu phospho, đặc biệt khi phospho ở mức thấp. Ngoài ra, EXPB2 cũng được tổng hợp trong điều kiện thiếu Fe và thiếu nước nhẹ.

Protein EXP1 có hai vùng chức năng là DPBB và Pollen allerg, số lượng và trình tự amino acid của mỗi vùng có tính đặc trưng và quyết định mức độ hoạt động của expansin. Hiện nay, vai trò của expansin trong quá trình phát triển rễ của cây đậu tương vẫn chưa được làm sáng tỏ mặc dù đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu. Tuy nhiên, hướng tiếp cận nghiên cứu chức năng của họ gen expansin trong quá trình phát triển của rễ là sự tham gia của các protein trong quá trình cải thiện thành tế bào trong các lớp tế bào biểu bì rễ, trong việc điều hành các hoạt động kéo dài và trưởng thành của cây cũng sẽ được quan tâm nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng hạt của giống đậu tương địa phương Xuân Lạng Sơn làm vật liệu nghiên cứu. Gieo hạt nảy mầm trên cát sạch đến khi cây có 3 lá chét. Sử dụng lá để tách chiết DNA tổng số. Tách chiết DNA tổng số từ lá đậu tương theo phương pháp của Gawel & Jarret (1991) [7].

Nhân gen *GmEXPI* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi SoyExp-F/SoyExp-R được chúng tôi thiết kế dựa trên trình tự có mã số AF516879 trên Ngân hàng gen quốc tế. Cặp mồi SoyExp-F/SoyExp-R có trình tự là: *SoyExp-F*: 5'

CATGCCATGGATGGGCAAAATCATGCTTGT 3'; *SoyExp-R*: 5' ATTTGCGGCCGCTTAGTGA ACTGGGCTAGA 3'

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: biến tính ở 94°C trong 3 phút, lặp lại 30 chu kỳ với 3 giai đoạn: (1) biến tính ở 94°C (1 phút); (2) tiếp hợp mồi ở 54°C (1 phút); (3) tổng hợp ở 72°C (1 phút 30 giây); hoàn tất phản ứng ở 72°C (10 phút); lưu giữ ở 4°C (∞). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X, với sự có mặt của thang DNA chuẩn và chụp ảnh dưới ánh sáng cực tím.

Tiến hành thổi gel và tinh sạch sản phẩm PCR theo bộ Kit DNA extraction Kit K05013 của hãng Fermentas để thu nhận đoạn gen *GmEXPI* mong muốn, sau đó sản phẩm PCR tinh sạch được gắn vào vector tách dòng pBT nhờ enzyme nối T4 ligase. Phản ứng ghép nối dựa trên nguyên tắc bổ sung giữa hai đầu nucleotide A thò ra ở sản phẩm PCR với *Taq* polymerase và hai đầu nucleotide T trên vector tách dòng pBT. Hỗn hợp được ủ ở 22°C trong 1 giờ cho phản ứng xảy ra hoàn toàn, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E. coli* DH5 α và được cấy trên môi trường LB đặc (pepton, cao nấm men, NaCl, agarose) có bổ sung kháng sinh ampicillin (100 mg/l), X-gal (40 mg/l) và IPTG (100 μ M). Ủ đĩa ở 37°C trong 16 giờ. Kết quả thu được có cả khuẩn lạc màu xanh và màu trắng.

Kiểm tra sản phẩm tách dòng bằng phản ứng colony-PCR, chúng tôi tiếp tục tiến hành tách plasmid theo bộ Kit AccuPrep Plasmid Extraction của hãng Bioneer. Kết quả thu được plasmid tái tổ hợp mang gen *GmEXPI* của giống đậu tương nghiên cứu, sản phẩm plasmid sạch, đảm bảo chất lượng và số lượng phục vụ cho việc xác định trình tự nucleotide của gen *GmEXPI*.

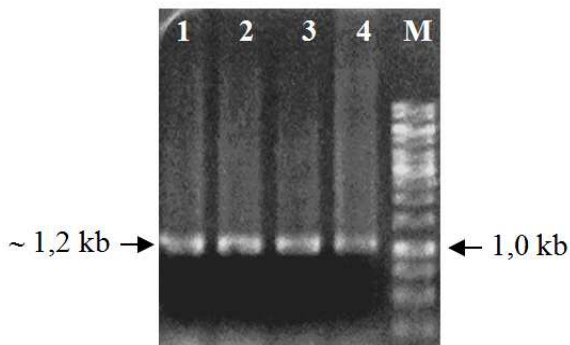
Trình tự nucleotide được xác định trên máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) sử dụng bộ hóa chất sinh chuẩn BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Xử lý dữ liệu bằng phần mềm DNASTAR và BLAST.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân gen *GmEXPI* từ hệ gen cây đậu tương

DNA tổng số của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn được tách chiết từ lá non và được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260/280 nm và điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả cho thấy, DNA tổng số không bị đứt gãy, sạch và ít tạp chất, có hàm lượng và chất lượng đảm bảo cho các thí nghiệm phân tích DNA.

Chúng tôi tiến hành nhân gen *GmEXPI* bằng phương pháp PCR từ DNA hệ gen của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn với cặp mồi SoyExp-F/SoyExp-R. Kết quả nhân gen được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X với sự có mặt của thang DNA chuẩn và chụp ảnh dưới ánh sáng cực tím (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh điện di kết quả nhân gen *GmEXPI* từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn
M. Marker 1 Kb; 1, 2, 3, 4: Đoạn gen *GmEXPI*.

Hình 1 cho thấy, đoạn DNA nhân bản được có kích thước ước tính khoảng 1,1 kb, hàm lượng của sản phẩm đủ lớn để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo. Kích thước của đoạn DNA khuếch đại phù hợp với tính toán lý thuyết khi chúng tôi thiết kế cặp mồi và đúng bằng kích thước của gen *GmEXPI* đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số AF516879. Như vậy, chúng tôi có thể sơ bộ kết luận đã nhân bản được gen *GmEXPI* từ DNA hệ gen của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn.

Trình tự gen *GmEXPI* phân lập từ hệ gen của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn

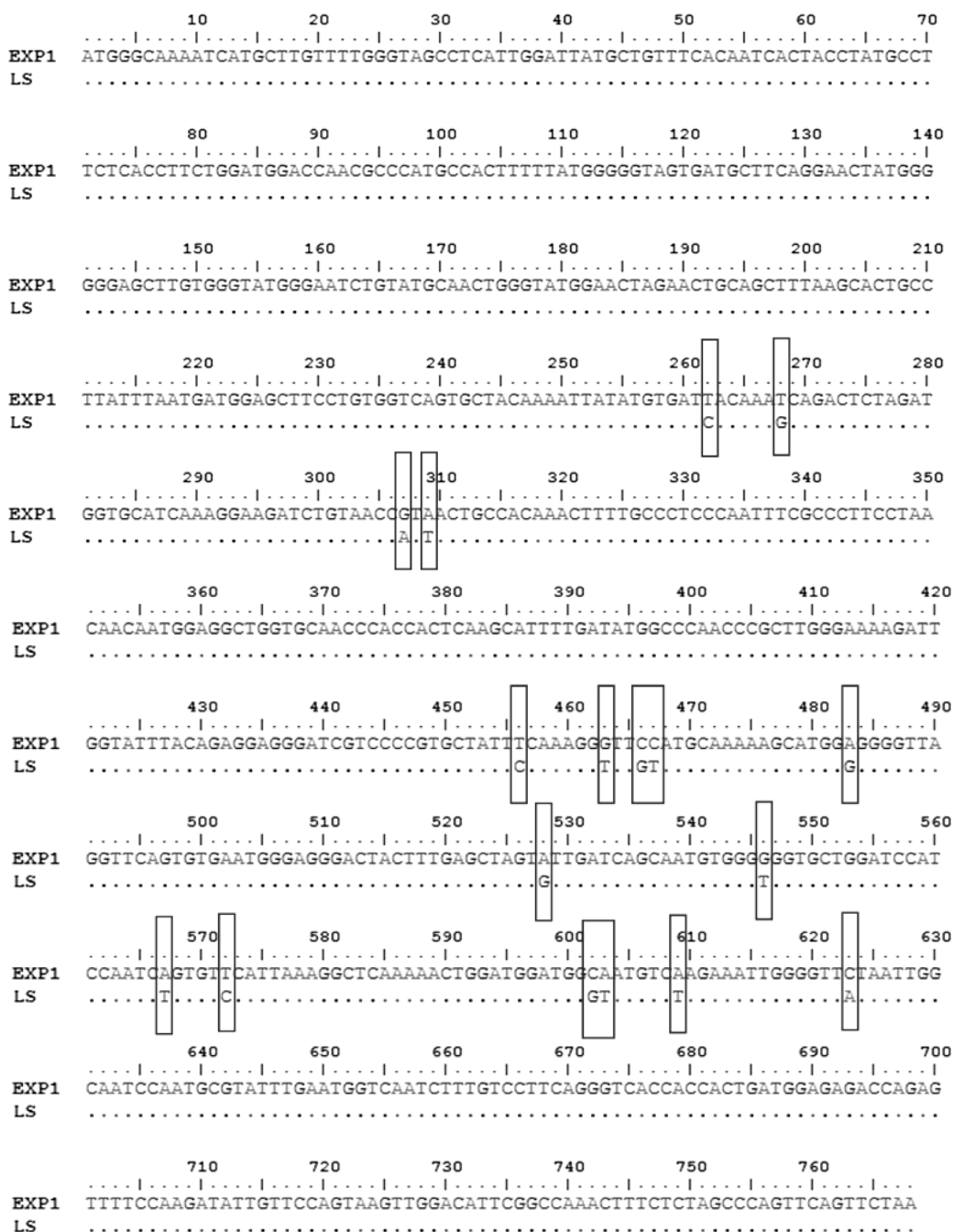
Đoạn gen *GmEXPI* thu được từ kết quả thổi gel và tinh sạch sản phẩm PCR. Đoạn gen

GmEXPI tinh sạch được gắn vào vector tách dòng pBT nhờ enzyme nối T4 ligase tạo vector tái tổ hợp, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E. coli* DH5 α . Tách chiết plasmid, kiểm tra và thu được plasmid tái tổ hợp mang gen *GmEXPI*, sau đó đem xác định trình tự nucleotide gen *GmEXPI*. Khi so sánh với trình tự nucleotide của gen *GmEXPI* (cDNA) của giống đậu tương đã công bố trên ngân hàng gen NCBI với mã số là AF516879 khẳng định đoạn DNA phân lập được chính là trình tự gen *GmEXPI* của đậu tương. Gen *GmEXPI* có exon 1 từ vị trí nucleotide 11 đến 477; intron từ vị trí nucleotide 478 đến 777; exon 2 từ vị trí nucleotide 778 đến 1078. Từ 1 đến 10 là điểm vùng chứa điểm cắt của enzyme giới hạn NcoI ở mỗi xuôi; từ 1079 đến 1090 là vùng chứa điểm cắt của enzyme giới hạn NotI ở mỗi ngược. Kích thước exon 1 là 467 bp; exon 2 là 301 bp; intron là 300 bp và kích thước của gen *GmEXPI* dài 1068 nucleotide, trong đó, vùng mã hóa có 768 nucleotide.

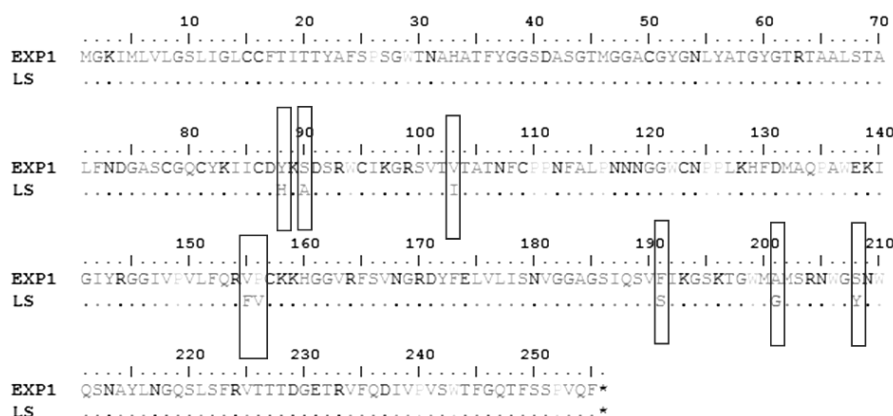
Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen *GmEXPI* phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn với trình tự nucleotide của gen *GmEXPI* (cDNA) mã số AF516879 (hình 2) đã xác định được 17 vị trí nucleotide sai khác kể từ bộ ba mở đầu ở các vị trí 262 (Gen *GmEXPI* ở Xuân Lạng Sơn là C còn gen *GmEXPI* mã số AF516879 là T). Ở vị trí 268 (XLS: G; AF516879: T), ở vị trí 307 (XL: A, AF516879: G), ở vị trí 309 (XLS: T; AF516879: A), ở vị trí 456 (XLS: C; AF516879: T), ở vị trí 463 (XLS: T; AF516879: G), ở vị trí 466 (XLS: G; AF516879: C), ở vị trí 467 (XLS: T; AF516879: C), ở vị trí 483 (XLS: G; AF516879: A), ở vị trí 528 (XLS: G; AF516879: A), ở vị trí 546 (XLS: T; AF516879: G), ở vị trí 567 (XLS: T; AF516879: A), ở vị trí 572 (XLS: C; AF516879: T), ở vị trí 602 (XLS: G; AF516879: C), ở vị trí 603 (XLS: T; AF516879: A), ở vị trí 609 (XLS: T; AF516879: A), ở vị trí 623 (XLS: A; AF516879: C).

Kết quả so sánh trình tự amino acid của protein suy diễn EXP1 được mã hóa bởi gen *GmEXPI* phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn với trình tự amino acid của protein EXP1 do gen *GmEXPI* mã hoá có mã số AF516879 trên ngân hàng NCBI cho thấy có sự

sai khác ở 8 vị trí amino acid trong chuỗi polypeptide lần lượt ở các vị trí 88 (XLS: H, AF516879: Y), Vị trí 90 (XLS: A, AF516879: S), ở vị trí 103 (XLS: I, AF516879: V), ở vị trí 155 (XLS: F, AF516879: V), ở vị trí 156 (XLS: V, AF516879: P), ở vị trí 191 (XLS: S, AF516879: F), ở vị trí 201 (XLS: G, AF516879: A), ở vị trí 208 (XLS: Y, AF516879: S).



Hình 2. Trình tự nucleotide vùng mã hóa của gen *GmEXP1* phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn và trình tự nucleotide mã số AF516879 công bố trên NCBI có 16 điểm sai khác đã đánh dấu € trên trình tự so sánh



Hình 3. Trình tự amino acid của protein EXP1 do gen *GmEXPI* mã hoá phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn và trình tự amino acid của protein EXP1 của gen có mã số AF516879 với 8 vị trí amino acid sai khác

Trình tự chuỗi protein EXP1 ở cây đậu tương chứa một vùng bảo thủ DPBB và vùng Pollen allerg. Vùng DPBB có 91 amino acid, từ vị trí amino acid 64 đến 152. DPBB là một vùng bảo thủ của Rare Lipoprotein A (RlpA) có cấu trúc bởi hai chuỗi dạng cuộn gấp kiểu beta (DPBB). Chức năng của RlpA đến nay vẫn chưa được làm rõ, nhưng hoạt động của nó đã được chứng minh như một chất kìm hãm sự phát sinh đột biến ở *E. coli*. Khúc cuộn DPBB thường là một miền enzyme và các thành viên của họ DPBB là khá đa dạng và mỗi dạng DPBB có thể có một số chức năng khác nhau. So sánh vùng DPBB của trình tự amino acid của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn với trình tự amino acid của protein EXP1 được mã hóa bởi gen *GmEXPI* có mã số AF516879 thấy có 3 vị trí amino acid thay đổi: ở vị trí 88, tyrosine (AF516879) → histidine (Xuân Lạng Sơn), ở vị trí 90, serine (AF516879) → alanine (Xuân Lạng Sơn), ở vị trí 103 valine (AF516879) → isoleucine (Xuân Lạng Sơn).

Vùng Pollen allerg có 77 amino acid từ vị trí amino acid số 163 đến vị trí amino acid 240. Vùng Pollen allerg của trình tự amino acid của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn so với trình tự amino acid của protein EXP1 được mã hóa bởi gen *GmEXPI* (mã số AF516879) có 3 vị trí thay đổi, đó là ở vị trí 191, phenylalanine (AF516879) → serine (Xuân Lạng Sơn), ở vị trí 201, alanine (AF516879) → glycine (Xuân Lạng Sơn), ở vị trí 208, serine (AF516879) →

tyrosine (Xuân Lạng Sơn). Giống đậu tương Xuân Lạng Sơn là giống chịu hạn tốt, có bộ rễ phát triển, vì vậy, những sự thay đổi ở vùng DPBB và vùng Pollen allerg ở giống đậu tương Xuân Lạng Sơn so với giống đậu tương có trình tự gen với mã số AF516879 liên quan đến sự phát triển bộ rễ cũng như mức độ chịu hạn thế nào và mang ý nghĩa sinh học gì cần phải có những nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Đã nhân bản, chọn dòng thành công gen *GmEXPI* của giống đậu tương địa phương chịu hạn tốt Xuân Lạng Sơn. Trình tự đoạn gen *GmEXPI* phân lập từ giống đậu tương Xuân Lạng Sơn có kích thước là 1068 nucleotide, trong đó vùng mã hóa dài 768 nucleotide, với 2 exon và 1 intron. Kích thước exon 1 là 467 bp; exon 2 là 301 bp; intron là 300 bp. Gen *GmEXPI* mã hóa protein gồm 255 amino acid.

So với trình tự gen *GmEXPI* mang mã số AF516879 trên Ngân hàng gen Quốc tế, thì trình tự gen *GmEXPI* của giống đậu tương Xuân Lạng Sơn có 17 vị trí nucleotide sai khác, protein suy diễn có 8 vị trí amino acid sai khác, vùng DPBB và Pollen allerg đều có 3 vị trí amino acid thay đổi.

Lời cảm ơn: Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp cơ sở Đại học Thái Nguyên, mã số ĐH2012-TN01-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cosgrove D. J., Li Z. C., 1993. Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles. *Plant Physiol.*, 103: 1321-1328.
2. Cosgrove D. J., 1996. Plant cell enlargement and the action of expansins. *BioEssays.*, 18: 533-540.
3. Cosgrove D. J., 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.*, 118: 333-339.
4. Cosgrove D. J., 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 391-417.
5. Cosgrove D. J., 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 109-124.
6. Lee D. K., Ahn J. H., Song S. K., Choi D. Y., Lee J. S., 2003. Expression of an Expansin Gene Is Correlated with Root Elongation in Soybean. *Plant Physiol.*, 131(3): 985-997.
7. Gawel, Jarret, 1991. Genomic DNA isolation. www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/htm/dna.htm
8. Guo W., Zhao J., Li X., Qin L., Yan X., Liao H., 2011. A soybean β -expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *Plant J.*, 66(3): 541-52.
9. Kam M. J., Yun H. S., Kaufman P. B., Chang S. C., Kim S. C., 2005. Two expansins, *EXP1* and *EXPB2*, are correlated with the growth and development of maize roots. *J. Plant Physiol.*, 48(3): 304-310.
10. Li Y., Darley C. P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S. L., McQueen-Mason S. J., 2002. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *J. Plant Physiol.*, 128(3): 854-864.
11. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thúy Hương, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, 2011. Gen và đặc tính chịu hạn của cây đậu tương. Nxb. Đại học Quốc gia, Hà Nội.

CHARACTERISTICS OF EXPANSIN GENE ISOLATED FROM LOCAL SOYBEAN CULTIVAR IN VIETNAM

Lo Thanh Son¹, Bui Ngoc Bich², Nguyen Vu Thanh Thanh³, Chu Hoang Mau^{3*}

¹Tay Bac University

²Lang Son Department of Education and Training

³Thai Nguyen University

SUMMARY

Expansin is a protein family, having the function in expanded cell wall, that has been regarded as a major protein affecting the prolongation of root cells in plants. Currently, the role of expansion in the process of development of soybean roots has not been clarified although there have been many research efforts. In this study we present the results of amplification, cloning and determination of the *GmEXP1* gene sequence of local soybean Xuan Lang Son cultivar with good drought tolerance. *GmEXP1* gene isolated from genome of Xuan Lang Son soybean cultivar had the size of 1068 nucleotides, in which the coding region had 768 nucleotides, with two exons and one intron. Size of exon 1 was 467 bp; exon 2 was 301 bp; intron of 300 bp. *GmEXP1* gene encoding 255 amino acids. The comparison with *GmEXP* gene (Accession AF516879 on GenBank), showed that *GmEXP1* gene of Xuan Lang Son soybean cultivar had 17 different nucleotide positions and 8 amino acid positions; DPBB region and Pollen allerg of deduced protein had three changed amino acid positions. The role of these changes in development of the roots as well as the level of drought tolerance of soybean need to be further studied.

Keywords: Drought tolerant, expansin, *GmEXP1*, prolongation of root, soybean.

Ngày nhận bài: 13-7-2012