

TÁCH DÒNG, GIẢI TRÌNH TỰ VÀ ĐẶC ĐIỂM CỦA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ NAC2 TRÊN CÂY LẠC (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)

Nguyễn Thị Thu Nga^{1*}, Lê Văn Sơn², Lê Trần Bình², Bành Thị Mai Anh¹

¹Đại học Thái Nguyên, *ngasptn@yahoo.com.vn

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Nhân tố phiên mã NAC tồn tại khác nhau trong cây là nhóm nhân tố điều hòa phiên mã mới với nhiều chức năng sinh học. Không chỉ có chức năng quan trọng khác nhau trong quá trình phát triển của thực vật mà còn đáp ứng được trong việc chống chịu với các stress phi sinh học. Trong nghiên cứu này các kết quả về tách dòng và đặc điểm của gen *NAC2* của giống lạc L12 được trình bày. Gen *NAC2* được tách dòng bằng phương pháp RT-PCR, bao gồm một khung đọc mở với 1050 bp mã hóa cho 349 acid amin. Phân tích trình tự gen đã chỉ ra rằng, protein giả định của gen *NAC2* bao gồm vùng bảo thủ NAC (NAC domain-được chia ra làm 5 phân vùng bảo thủ nhỏ hơn từ A đến E) là đặc tính đặc trưng của các nhân tố phiên mã NAC. Khi so sánh trình tự acid amin suy diễn trong vùng bảo thủ NAC của gen *NAC2* và *AhNAC2* chúng tôi nhận thấy có hai acid amin bị thay đổi ở vị trí thứ 78 và 115. Tuy nhiên khi so sánh trình tự acid amin suy diễn trong vùng bảo thủ của gen *NAC2* với các đối tượng thực vật khác như đậu tương, lúa, *Arabidopsis thaliana*, tại vị trí acid amin thứ 115 giống hoàn toàn và không có sự biến đổi ở vị trí này (acid amin K). Có sự tương đồng cao khi so sánh trình tự acid amin suy diễn của gen *NAC2* với các nhân tố phiên mã NAC ở các đối tượng thực vật khác (gần gũi nhất với gen *NAC4* ở đậu tương - *GmNAC4*). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò chìa khóa quan trọng của *NAC2* trong việc đáp ứng với các tín hiệu kích thích từ ABA và khả năng chống chịu hạn của cây lạc. Gen *NAC2* đã được đăng ký trình tự trên ngân hàng gen với mã số HF546358. Kết quả nghiên cứu này sẽ được sử dụng trong thiết kế vector chuyển gen mang nhân tố phiên mã *NAC2* nhằm cải thiện tính chịu hạn của cây lạc.

Từ khóa: Cây lạc, điều hòa và biểu hiện gen, gen *NAC2*, nhân tố phiên mã NAC, tín hiệu phiên mã.

MỞ ĐẦU

Trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển, thực vật thường gặp những nhân tố phi sinh học bất lợi (stress) như hạn hán và nồng độ muối cao. Stress gây ra những phản ứng trên diện rộng của thực vật, từ việc thay đổi biểu hiện gen, trao đổi chất trong tế bào cho đến những thay đổi lớn liên quan đến mức độ sinh trưởng và năng suất cây trồng. Thời gian, mức độ khốc liệt của stress ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của cây trồng. Những biến đổi trong quá trình phát triển và trao đổi chất khi gặp stress được cho là sẽ làm thay đổi sự biểu hiện của gen. Điều đó bắt đầu từ việc nhận biết tín hiệu stress ở mức độ tế bào, lan truyền tín hiệu này trong tế bào và tiếp sau đó là khắp cơ thể sinh vật. Sự biểu hiện gen thể hiện đầu tiên ở mức độ tế bào, sau đó ở mức độ toàn cơ thể và thể hiện ở sự thay đổi mức độ sinh trưởng, phát triển và cuối cùng làm ảnh hưởng đến khả năng tạo năng suất chất lượng cao [3, 6].

Để đối phó với những yếu tố bất lợi này, cơ thể thực vật đã được kích thích bằng một loạt

phản ứng sinh lý, sinh hóa phù hợp. Một bước quan trọng trong khả năng đề kháng của thực vật với stress là kích hoạt sự biểu hiện của các gen liên quan, phần lớn được điều hòa bởi các nhân tố phiên mã đặc trưng [5]. Hơn 5% trong trình tự hệ gen của *Arabidopsis* được sử dụng để mã hóa hơn 1500 nhân tố phiên mã, khoảng 45% trong số đó là từ các họ đặc trưng cho thực vật. Một vài họ tương đồng của các yếu tố phiên mã đã được ghi nhận đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng các nhân tố bất lợi từ môi trường [7].

Họ protein NAC [NAM, ATAF và CUC - (No apical meristem (NAM), *Arabidopsis* transcription activation factor (ATAF), Cup-shaped cotyledon (CUC))] là một trong những họ lớn nhất có chứa các nhân tố phiên mã chỉ đặc trưng cho thực vật. Một số lượng lớn các protein NAC đã được xác định trong thực vật (106 thành viên ở *Arabidopsis*, 149 thành viên ở lúa, 101 thành viên trong hệ gen đậu tương). Chúng được mô tả có một vùng bảo thủ cao nằm trong khu vực vùng đầu N (NAC domain - được chia ra thành 5 phân vùng bảo thủ từ A

đến E) và một vùng điều hòa phiên mã hay biến đổi ở đầu C (có thể kích hoạt hay ức chế sự phiên mã của nhiều gen đích) [9]. Căn cứ vào sự tương tự về vùng NAC đã biết ở thực vật, khoảng 180 gen NAC từ *Oryza sativa* và *Arabidopsis* đã được phân loại thành 2 nhóm. Nhóm I được chia thành 14 phân nhóm (TERN, ONAC022, SENU5, NAP, AtNAC3, ATAF, OsNAC3, NAC2, ANAC011, TIP, OsNAC8, OsNAC7, NAC1, và NAM), bốn phân nhóm còn lại (ANAC011, ONAC003, ONAC001, ANAC063) xếp vào nhóm II [4, 7, 8, 9].

Vùng bảo thủ NAC là một vùng nằm ở đầu N chứa khoảng 160 acid amin, được tìm thấy trong họ protein NAC thuộc các nhân tố điều hòa phiên mã đặc biệt ở thực vật. Protein NAC tham gia vào quá trình phát triển, bao gồm cả việc hình thành nên các mô phân sinh đỉnh chồi, các cơ quan hoa và chồi bên cũng như trong việc điều khiển hormone thực vật và bảo vệ [10].

Vùng bảo thủ NAC có thể được chia thành 5 phân vùng bảo thủ (từ A đến E). Mỗi phân vùng bảo thủ nhỏ hơn được phân biệt bởi các acid amin không đồng nhất. Trong khi vùng NAC giàu các acid amin cơ bản (R, K và H) thì sự phân bố của các acid amin ở mỗi phân vùng bảo thủ là không giống nhau. Vùng C và D giàu các acid amin cơ bản nhưng nghèo các acid amin có tính acid, phân vùng bảo thủ B có chứa một tỷ lệ cao các acid amin có tính acid. Vùng gắn DNA (DNA-binding domain) được chứa trong một khu vực gồm 60 acid amin nằm trong phân vùng bảo thủ D và E [1, 2].

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả tách dòng, phân tích trình tự gen và so sánh trình tự acid amin suy diễn của gen *NAC2* từ giống lạc có khả năng chịu hạn tốt L12. Kết quả này được sử dụng phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Hạt lạc giống L12 của Trung tâm Nghiên cứu phát triển cây đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm được sử dụng trong các thí nghiệm.

Vector tách dòng pBT, chủng vi khuẩn *E. coli* (DH5 α) do phòng Công nghệ tế bào thực

vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Các loại hóa chất, dụng cụ và thiết bị phục vụ cho thí nghiệm sinh học phân tử.

Phương pháp

Thu mẫu

Hạt lạc giống L12 được trồng ra môi trường (cát:trấu:đất với tỷ lệ 1:1:2) ở điều kiện bình thường. Cây lạc non sau khi có đủ 3 lá thật được tiến hành gây hạn nhân tạo (không tưới nước). Sau một tuần gây hạn, thu mẫu lá lạc đã xử lý hạn để tiến hành làm thí nghiệm.

Thiết kế môi

Dựa trên trình tự gen *AhNAC2* đã công bố trên ngân hàng (No. EU755023) [7], chúng tôi tiến hành thiết kế môi nhân gen *NAC2* ở giống lạc L12.

Trình tự môi như sau: NAC2F: CCCCATGGATGGGAATTCAAGAGAAAGA và NAC2R: TTGCGGCCGCTTGCTGAACC CGAACCCAACC.

Phương pháp tách chiết RNA tổng số

Sử dụng bộ kit Trizol Reagents (của hãng Invitrogen) để tách chiết RNA tổng số từ các mẫu lá lạc theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Phương pháp tổng hợp cDNA

RNA tổng số được sử dụng để nhân gen bằng phương pháp tổng hợp cDNA, cDNA được tổng hợp theo quy trình của nhà sản xuất bộ KIT RevertAidTMH Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas).

Nhân bản gen *NAC2* bằng phản ứng PCR

Gen *NAC2* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp môi đặc hiệu theo chu trình nhiệt như sau: 94°C/3 phút; 94°C/30 giây, 57°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây; 72°C/10 phút, 35 chu kỳ. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Đệm PCR 10X (2,5 μ l), MgCl₂ (25 mM) - 2,5 μ l, dNTPs (10 mM) - 2,5 μ l, *Taq* DNA polymerase (5 đơn vị/ μ l) - 0,5 μ l, DNA khuôn (10-20 ng/ μ l) - 1 μ l, Nước khử ion - 15 μ l, Môi xuôi (10 pmol/ μ l) - 0,5 μ l, Môi ngược (10 pmol/ μ l) - 0,5 μ l. Tổng thể tích - 25 μ l.

Phương pháp tách dòng

Tinh sạch và gắn đoạn gen vào vector tách dòng pBT

Gen được làm sạch (thời gel) bằng bộ KIT QIAquick Gel Extraction (Bioneer) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; gắn đoạn gen vào vector tách dòng pBT; ủ ở 22°C trong 2 giờ, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α .

Tách chiết plasmid tái tổ hợp

Được thực hiện và tinh sạch bằng Plasmid Miniprep Kit (Qiagen).

Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony-PCR)

Đệm PCR 10X (2,5 μ l), MgCl₂ (25 mM) - 2,5 μ l, dNTPs (10 mM) - 2,5 μ l, Taq DNA polymerase (5 đơn vị/ μ l) - 0,5 μ l, DNA khuôn (10 - 20 ng/ μ l) - 1 μ l, Nước khử ion - 15 μ l, Mồi xuôi (10 pmol/ μ l) - 0,5 μ l, Mồi ngược (10 pmol/ μ l) - 0,5 μ l. Tổng thể tích - 25 μ l.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/3 phút; 94°C/30 giây, 57°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây; 72°C/10 phút, 25 chu kỳ.

Phương pháp đọc trình tự và phân tích gen

Plasmid tách từ các dòng khuẩn lạc được giải trình tự theo phương pháp của Sanger.

Trình tự gen nhận được được phân tích bằng phần mềm BioEdit.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

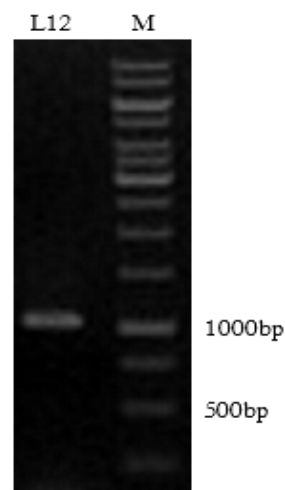
Kết quả nhân bản, tách dòng và xác định trình tự gen NAC2

Dựa trên trình tự gen *AhNAC2* của cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) đã công bố tại Ngân hàng gen quốc tế (EU755023), gen *NAC2* có kích thước khoảng 1050 bp. Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế có kích thước tương ứng như trên.

Từ lá của giống lạc L12 đã qua xử lý hạn, RNA tổng số được tách chiết và tổng hợp cDNA. Gen *NAC2* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả hình 1 cho thấy, đoạn gen thu được có kích thước tương ứng với kích thước tính toán theo lý thuyết khoảng 1050 bp.

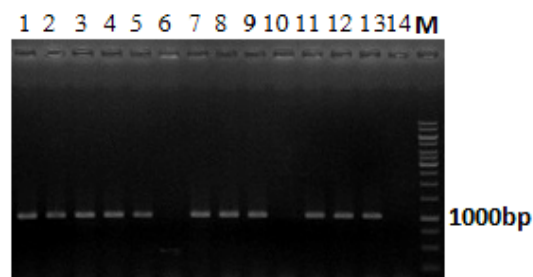
Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách gắn sản phẩm PCR đã tinh sạch vào vector

tách dòng pBT. Sau đó vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Sản phẩm biến nạp cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh chọn lọc carbenicillin, X-gal và IPTG. Cơ chất X-gal giúp cho việc chọn lọc các dòng tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp dễ dàng. Trên môi trường có chứa kháng sinh carbenicillin, X-gal và IPTG, phát triển hai loại khuẩn lạc: khuẩn lạc màu xanh và khuẩn lạc màu trắng.



Hình 1. Kết quả nhân gen *NAC2* từ giống lạc L12 (M. Thang DNA chuẩn 1 kb).

Tất cả các khuẩn lạc này là những khuẩn lạc đã được biến nạp plasmid chứa gen kháng kháng sinh carbenicillin, nhưng chỉ có khuẩn lạc màu trắng mới mang plasmid tái tổ hợp. Vì vậy, các khuẩn lạc màu trắng được lựa chọn để thực hiện các bước tiếp theo của quá trình tách dòng.



Hình 2. Điện di sản phẩm clony-PCR
M: Thang DNA chuẩn 1 kb. 1-14: các dòng khuẩn lạc nghiên cứu.

AhNAC2	703		GTGCTCGAGTCCCTGCCGGAGATCGACGACCGTTGCTTCGCCTTGCCACGTGTCAACTCC	762
NAC2	661		TTAAGAGCGCTGCAGCAGCAGCGCCATCACCAAGAAGACACCAAGGTCGGCCTACTCCAA	720
AhNAC2	763		TTAAGAGCGCTGCAGCAGCAGCGCCATCACCAAGAAGACACCAAGGTCGGCCTACTCCAA	822
NAC2	721		CAGCAACAGCAACAGGGTCTCGTAGCCGGCACCGGTAGTTTCTTGGACTGGGCTTCGGGG	780
AhNAC2	823		CAGCAACAGCAACAGGGTCTCGTAGCCGGCACCGGTAGTTTCTTGGACTGGGCTTCGGGG	882
NAC2	781		CCGGGGATTCTGAACGATTGGGGCCAGGCCAGCAGGGGATTGTTAACTACGGAAATGAC	840
AhNAC2	883		CCGGGGATTCTGAACGATTGGGGCCAGGCCAGCAGGGGATTGTTAACTACGGAAATGAC	942
NAC2	841		CTCTTTGTCCCTTCAGTGTGCCACGTGGATTCCAATTTGGTGCCAGCAAAGATAGAAGAG	900
AhNAC2	943		CTCTTTGTCCCTTCAGTGTGCCACGTGGATTCCAATTTGGTGCCAGCAAAGATAGAAGAG	1002
NAC2	901		GAGGTTTCAGAGCGGTGTGAAGACTCAATCCGCATTCTTTTCAGCAGGGACCGAACCCGAAT	960
AhNAC2	1003		GAGGTTTCAGAGCGGTGTGAAGACTCAATCCGCATTCTTTTCAGCAGGGACCGAACCCGAAT	1062
NAC2	961		GACTTCACACAAGCATTCTCAAACCAATTAGATCCTTACGGGTTTAGTAGGTACTCGGTT	1020
AhNAC2	1063		GACTTCACACAAGCATTCTCAAACCAATTAGATCCTTACGGGTTTAGTAGGTACTCGGTT	1122
NAC2	1021		CAACCGGTTGGGTTTCGGGTTCAAGCAATGA 1050	
AhNAC2	1123		CAACCGGTTGGGTTTCGGGTTCAAGCAATGA 1152	

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự nucleotide NAC2: trình tự gen thu được từ giống lạc L12; AhNAC2: trình tự gen trên Genbank.

Bảng 3. Vị trí sai khác trong trình tự nucleotit của gen NAC2 so với gen AhNAC2

STT	Vị trí	AhNAC2	NAC2
1	195	T	C
2	232	A	G
3	249	A	T
4	264	A	G
5	288	A	G
6	291	T	C
7	297	A	G
8	343	G	A
9	1044	G	A

NAC2	MGIQEKDPLSQLSLPPGFRFYPTDEELLVQYLCKRVAGHHFSLEIIGEIDLYKFDPWVLP
AhNAC2	MGIQEKDPLSQLSLPPGFRFYPTDEELLVQYLCKRVAGHHFSLEIIGEIDLYKFDPWVLP
NAC2	SKAIFGEKEWYFFSPRDRGKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKITTEGRKVGIKKALVIFY
AhNAC2	SKAIFGEKEWYFFSPRDRGKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKITTEGRKVGIKKALVIFY
NAC2	IGKAPKGTKTNWIMHEYRLLDSTRKNGSTKLDDWVLCRIYKKNSSAQQKVPNGVVSSEQ
AhNAC2	IGKAPKGTKTNWIMHEYRLLDSTRKNGSTKLDDWVLCRIYKKNSSAQQKVPNGVVSSEQ
NAC2	YATQYNSGSSSNSSSSHLDEVLESLEIDRRCFALPRVNSLRALQQQRHHQEDTKVGLLQ
AhNAC2	YATQYNSGSSSNSSSSHLDEVLESLEIDRRCFALPRVNSLRALQQQRHHQEDTKVGLLQ
NAC2	QQQQQGLVAGTGSFLDWASGPGILNDLGQAQQGIVNYGNDLFVPSVCHVDSNLVPAKIEE
AhNAC2	QQQQQGLVAGTGSFLDWASGPGILNDLGQAQQGIVNYGNDLFVPSVCHVDSNLVPAKIEE
NAC2	EVQSGVKTQSAFFQQGPNPNDFQTQAFSNQLDPYGFSSRYSVQPVGFGRQ
AhNAC2	EVQSGVKTQSAFFQQGPNPNDFQTQAFSNQLDPYGFSSRYSVQPVGFGRQ

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự acid amin suy diễn NAC2: trình tự acid amin thu được từ giống lạc L12; AhNAC: trình tự acid amin trên Genbank.

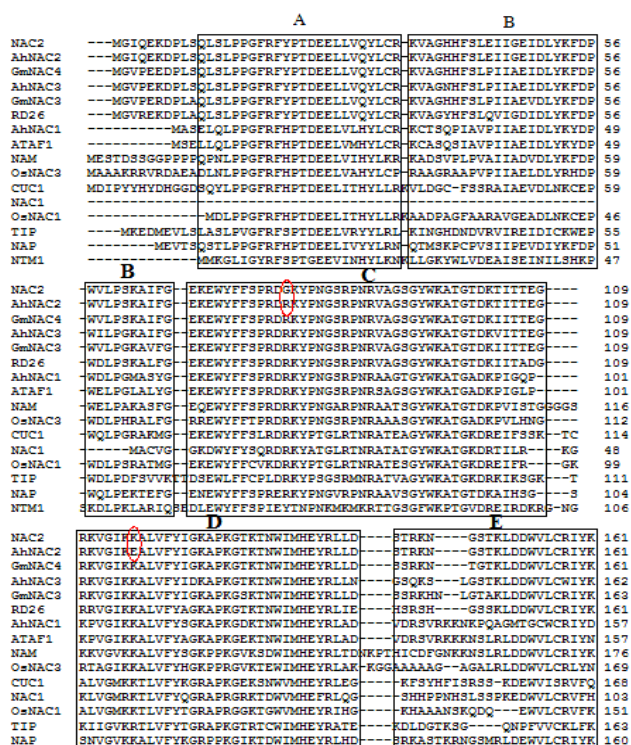
Kết quả đọc trình tự cho thấy gen *NAC2* thu được có kích thước 1050 bp, mã hóa 350 acid amin. Khi so sánh trình tự gen *NAC2* và trình tự gen đã được công bố trên Ngân hàng gen, chúng tôi thu được kết quả như trong bảng 3. Kết quả so sánh trình tự acid amin suy diễn thể hiện trong hình 5.

Dựa vào kết quả đọc trình tự nucleotide có thể thấy sự sai khác với gen *AhNAC2* ở 9 vị trí (195, 232, 249, 264, 288, 291, 297, 343, 1044). Sự sai khác của gen *NAC2* với gen *AhNAC2* có thể là do sai sót trong sự bắt cặp của quá trình PCR hay là do đột biến điểm xuất hiện ở giống

lạc L12 (trong quá trình thực hiện các thao tác phân lập tách dòng-thao tác tách dòng không tạo đột biến). Từ sự sai khác trong trình tự nucleotide, khi tiến hành dịch mã chuyển sang trình tự chuỗi polypeptide nhận thấy một số sự thay đổi 1 nucleotide trong bộ ba làm thay đổi acid amin, một số thay đổi 1 nucleotide trong bộ ba lại không làm thay đổi acid amin do tính thoái hóa của mã di truyền. Cụ thể, chỉ có 2 vị trí thay đổi nucleotide dẫn đến thay đổi acid amin (232, 343). Các vị trí sai khác còn lại đều không làm biến đổi acid amin. Sự sai khác về trình tự acid amin của gen *NAC2* được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Sự sai khác về trình tự acid amin của gen *NAC2* thu được với gen *AhNAC2*

Vị trí thay đổi	Nucleotide trên trình tự <i>AhNAC2</i>	Nucleotide trên trình tự <i>NAC2</i> của giống lạc L12	Acid amin bị thay đổi	Acid amin tạo thành
Vị trí 232 (a.a 78)	A	G	Arginine (R)	Glycine (G)
Vị trí 343 (a.a 115)	G	A	Glutamic acid (E)	Lysine (K)



Hình 6. Kết quả phân tích trình tự acid amin suy diễn các gen trong họ NAC bằng phần mềm Clustal W.

Các protein trên bao gồm: *OsNAC1* (AB028180) và *OsNAC3* (AB028182) ở lúa; *ANAC072/RD26* (AT4G27410), *ANAC002/ATAF1* (AT1G01720), *ANAC018/NAM* (AT1G52880), *ANAC091/TIP* (AT5G24590), *ANAC022/NAC1* (AT1G56010), *ANAC098/CUC2* (AT5G53950), *ANAC068/NTM1* (AT4G01540) và *ANAC029/NAP* (AT1G69490) ở *Arabidopsis thaliana*; *GmNAC3* (DQ028771) và *GmNAC4* (DQ028772) ở đậu tương; *AhNAC1* (EU669863), *AhNAC2* (EU755023) và *AhNAC3* (EU755022) ở lạc.

Tuy nhiên, khi tiến hành so sánh trình tự acid amin của gen *NAC2* với các nhân tố phiên mã NAC trên một số đối tượng thực vật khác nhau (hình 6) chúng tôi nhận thấy vị trí acid amin thay đổi 115 của gen *NAC2* so với gen *AhNAC2* lại tương đồng hoàn toàn với các trình tự acid amin còn lại trong họ gen NAC ở các đối tượng thực vật này. Do đó chúng tôi kết luận trình tự gen *NAC2* thu được từ giống lạc L12 chỉ có một vị trí acid amin thứ 78 thay đổi sau khi so sánh vùng bảo thủ này với các trình tự acid amin trong họ trên ngân hàng gen quốc tế.

Phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào vùng bảo thủ NAC

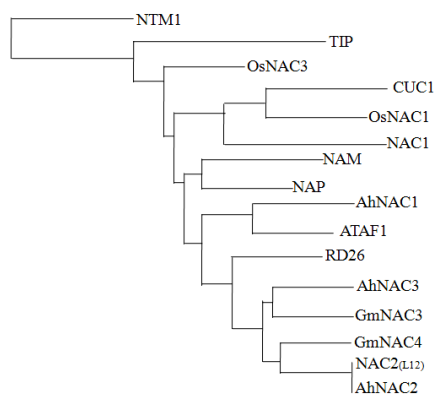
Dựa vào sự phân nhóm các protein thuộc họ NAC được đề cập trong các tài liệu [2, 7, 8, 10]. Chúng tôi tiến hành phân tích và so sánh vùng NAC của gen *NAC2* thu được với các vùng NAC của các gen thuộc họ NAC, kết quả được

trình bày cụ thể trong hình 6 và hình 7.

Khi nghiên cứu về trình tự acid amin của gen *NAC2* thu được, chúng tôi nhận thấy vùng bảo thủ NAC, có khoảng 160 acid amin từ đầu N tương tự như các gen trong họ. So sánh vùng bảo thủ NAC giữa gen *NAC2* và một vài gen trong họ NAC thu được các phân vùng bảo thủ từ A đến E được chỉ ra trong các khung đen của vùng NAC (hình 6). Kết quả phân tích của chúng tôi hoàn toàn tương tự như một số nghiên cứu trước trên cây lạc và một số đối tượng thực vật khác [7, 8, 10].

Vùng NAC của gen *NAC2* thu được hoàn toàn trùng khớp với vùng NAC của gen *AhNAC2* trên Ngân hàng Gen quốc tế. Như vậy, dựa vào các nghiên cứu trước có thể khẳng định gen *NAC2* thu được là yếu tố phiên mã có thể có chức năng điều khiển hoạt động của các gen liên quan đến phản ứng với stress hạn [1, 4, 7, 8, 9].

Họ NAC (NAM, ATAF và CUC) là một họ protein lớn. Kết quả phân tích trình tự tương đồng trong vùng bảo thủ NAC trên một số loài thực vật cho thấy, trình tự acid amin suy diễn của các gen thuộc họ này có mức độ tương đồng cao về các acid amin. Khi so sánh với gen *AhNAC2* mã số EU755023, nhận thấy gen *NAC2* có trình tự tương đồng cao với *AhNAC2* và gần gũi nhất với *GmNAC4* ở đậu tương. Gen *NAC2* có đầy đủ các vị trí acid amin bảo thủ giống các gen trong họ NAC và chỉ có một vùng NAC duy nhất nên có thể kết luận rằng gen *NAC2* thu được thuộc họ gen NAC.



Hình 7. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại so sánh mức độ tương đồng các acid amin của protein do gen *NAC2* mã hóa ở giống lạc L12 và một số NAC protein ở các loài khác (chú thích tên viết tắt các gen xem hình 6)

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng thành công gen *NAC2* từ giống lạc chịu hạn tốt L12. Gen thu được có chiều dài là 1050 bp. Gen *NAC2* đã được đăng ký trình tự trên ngân hàng gen với mã số HF546358.

So sánh trình tự nucleotide giữa gen *NAC2* và *AhNAC2* nhận thấy có sự sai khác ở 9 vị trí (195, 232, 249, 264, 288, 291, 297, 343, 1044). Tuy nhiên chỉ có 2 vị trí thay đổi nucleotide dẫn đến thay đổi acid amin (232, 242)

Khi so sánh trình tự acid amin suy diễn trong vùng bảo thủ *NAC* thì tại vị trí acid amin 115 sai khác với *AhNAC2* nhưng lại tương đồng hoàn toàn với các trình tự khác. Vì vậy trình tự gen chúng tôi thu được chỉ còn một vị trí acid amin thay đổi (78). Phân tích cây phả hệ nhận thấy trình tự gen thu được gần gũi nhất với *AhNAC2* ở lạc và *GmNAC4* ở đậu tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Addie N. O., Heidi A. E., Leila L. L., Karen S., 2005. DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Sci.*, 4: 785-797.
2. Ernst H. A., Nina O. A., Skriver K., Larsen S., Lo L. L., 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep*, 2: 297-303.
3. Jaleel C. A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Somasundaram R., Panneerselvam R., 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11: 100-105.
4. Kazuo N., Hironori T., Junya M., Kazuo S., Kazuko Y. S., 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2): 97-103.
5. Kazuo S., Kazuko Y.S., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Exp. Bot.*, 58(2): 221-227.
6. Trần Thị Phương Liên, 2010. Protein và tính chống chịu của thực vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
7. Liu X., Li L., 2009. Cloning and Characterization of the NAC-Like Gene *AhNAC2* and *AhNAC3* in Peanut. *Acta Agronomica Sinica*, 35(3): 541-545.
8. Olsen A. N., Ernst H. A., Leggio L. L., Skriver K., 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.*, 10(2): 79-87.
9. Swati P., Pranav P. S., Prem S. S., Manoj P., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7(6): 369-381.
10. Wang L. F., Zhang W. C., Wang L., Zhang X. C., Li X. M., Rao Z., 2010. Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its alphaNAC subunit. *Protein Cell*, 1: 406-416.

CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE NAC-Like GENE *NAC2* IN *ARACHIS HYPOGAEA* L.

Nguyen Thi Thu Nga¹, Le Van Son², Le Tran Binh², Banh Thi Mai Anh¹

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

NAC proteins are plant-specific transcription factors and more than 100 NAC genes have been identified in *Arabidopsis* and rice to date. NAC transcription factors exist differentially in plant and are the new

transcription regulatory factors with multiple biological functions. NAC transcription factors have a variety of important functions not only in plant development but also in abiotic stress responses. Stress-inducible NAC genes have been shown to be involved in abiotic stress tolerance. In this paper, the results on cloning and characterization of *NAC2* gene from L12 peanut cultivar are presented. *NAC2* gene cloning by RT-PCR, including an open reading frame with 1050 bp encoding 349 amino acids. Sequencing analysis showed that the deduced protein of *NAC2* including the conservative NAC domains (The NAC domain can be subdivided into five subdomains (A to E)) have characteristic features of the NAC transcription factors. When comparing the amino acid sequence in NAC domain of *NAC2* and *AhNAC2* genes two amino acid changes were found at position 78 and 115. However, when comparing the amino acid sequence in the conservative region of the *NAC2* gene with that of other plants such as soybean, rice, and *Arabidopsis thaliana*, no change was found at position 115 (amino acid K); there was only one change in position 78. A high of similarity when comparing the deduced amino acid sequence of the *NAC2* gene with those of NAC transcription factors in other plant species (closest gene *NAC4* in soybean - *GmNAC4*). Many studies have shown the key role of *NAC2* in response to the stimulus signal from the ABA and drought resistance of peanut. *NAC2* gene sequence has been registered on the Genbank with the accession number HF546358. The results of this study will be used in construction transformation vector carrying *NAC2* transcription factor to improve the drought tolerance of peanut.

Keywords: *Arachis hypogaea*, gene expression and regulation, NAC transcription factors, signal transduction.

Ngày nhận bài: 8-1-2013