

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN PROTEIN CỦA HẠT VÀ NHÂN GIEN
CHAPERONIN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG (*GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL) SƯU TẬP TẠI VÙNG NÚI TÂY BẮC VIỆT NAM**

CHU HOÀNG MẬU, LÊ THỊ THANH HƯƠNG, NGUYỄN PHÚ HÙNG

Đại học Thái Nguyên

TRẦN ĐÌNH LONG

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là một cây công nghiệp ngắn ngày, có giá trị kinh tế và hàm lượng dinh dưỡng cao. Hạt đậu tương chứa từ 38 - 40% protein, 12 - 24% lipit, các loại axit amin cần thiết (lizin, triptophan, metionin, xystin, loxin...) và nhiều loại vitamin (B₁, B₂, C, A, D, E, K, PP₁) [1]. Protein dự trữ trong hạt đậu tương chủ yếu là β -conglyxinin và glyxin [6]. Các tiểu đơn vị protein dự trữ trong hạt có tính bảo thủ cao, liên quan đến đặc tính chống chịu và chất lượng hạt của giống. Ở Việt Nam, nguồn gen của cây đậu tương rất đa dạng và phong phú; ngoài các giống đậu tương nhập nội, giống lai tạo và giống đột biến, còn có tập đoàn các giống địa phương. Những giống đậu tương địa phương thường có chất lượng hạt và khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh như nóng, hạn, mặn, rét, úng vượt trội so với các giống đậu tương khác; trong đó, khả năng chịu nóng, chịu hạn của các giống đậu tương này đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [3, 4, 8, 9]. Tuy nhiên, các tác giả mới chỉ tập trung nghiên cứu các giống đậu tương trồng ở các tỉnh trung du và đồng bằng, trong khi nguồn gen của cây đậu tương ở miền núi nói chung và ở vùng núi Tây Bắc nước ta nói riêng rất đa dạng, có nhiều đặc tính quý, được đồng bào dân tộc thiểu số ưa trồng, lại chưa được quan tâm nghiên cứu.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

10 giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu do Trung tâm nghiên cứu thực nghiệm Đậu

đỗ - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp, được chia làm 2 nhóm: nhóm 1 gồm các giống đậu tương có nguồn gốc ở vùng núi Tây Bắc như: vàng Mường Khương, azuki, Bát-Xát, xanh Bắc Hà, Hà Giang do cán bộ của Viện và chuyên gia Nhật Bản sưu tập tại các bản của đồng bào dân tộc thiểu số thuộc hai tỉnh Lào Cai và Hà Giang; nhóm 2 gồm các giống đậu tương được trồng phổ biến ở miền Bắc nước ta như: AK06, ĐT12, ĐT93, M54, cúc vàng, lơ 75.

2. Phương pháp

- Xác định hàm lượng protein tan theo phương pháp của Lowry dựa trên mô tả của Nguyễn Văn Mùi [7]; xác định hàm lượng lipit theo phương pháp chiết bởi ête dầu hỏa (petroleum ether).

- Phân tích phổ điện di protein dự trữ trong hạt theo phương pháp của Laemmli (1970) trên gel polyacrylamit 12,5% chứa SDS [5].

- Tách chiết ADN tổng số từ mầm đậu tương theo phương pháp miniprep có cải tiến.

- Phát hiện gen chaperonin bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi được sử dụng là MC₁ và MC₂ được tổng hợp từ hãng Invitrogen theo Trần Thị Phương Liên [2, 3].

MC₁: 5' > GCC ATA TGT CGG CAA TCG CGG CCC C

MC₂: 5' > CGG GAT CCC TAC CTC ACA GTT ACA GTT ACA ATA TCA TC

Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR: 94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút 20 giây; lặp lại 32 chu kỳ, 72°C - 10 phút; bảo quản ở 4°C - ∞.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Trọng lượng của 100 hạt, hàm lượng protein và lipid trong hạt của các giống đậu tương

Trọng lượng của hạt đậu tương là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá năng suất của giống. Kết

quả ở bảng 1 cho thấy hạt của ba giống đậu tương Bát Xát, AK06 và ĐT12 đều to và có trọng lượng của 100 hạt cao hơn hẳn so với các giống đậu tương azuki, xanh Bắc Hà và vàng Mường Khương; cao nhất là giống đậu tương Bát Xát (17,90 g), thấp nhất là giống đậu tương azuki (6,78 g).

Bảng 1

Trọng lượng của 100 hạt, hàm lượng protein và lipid trong hạt của các giống đậu tương

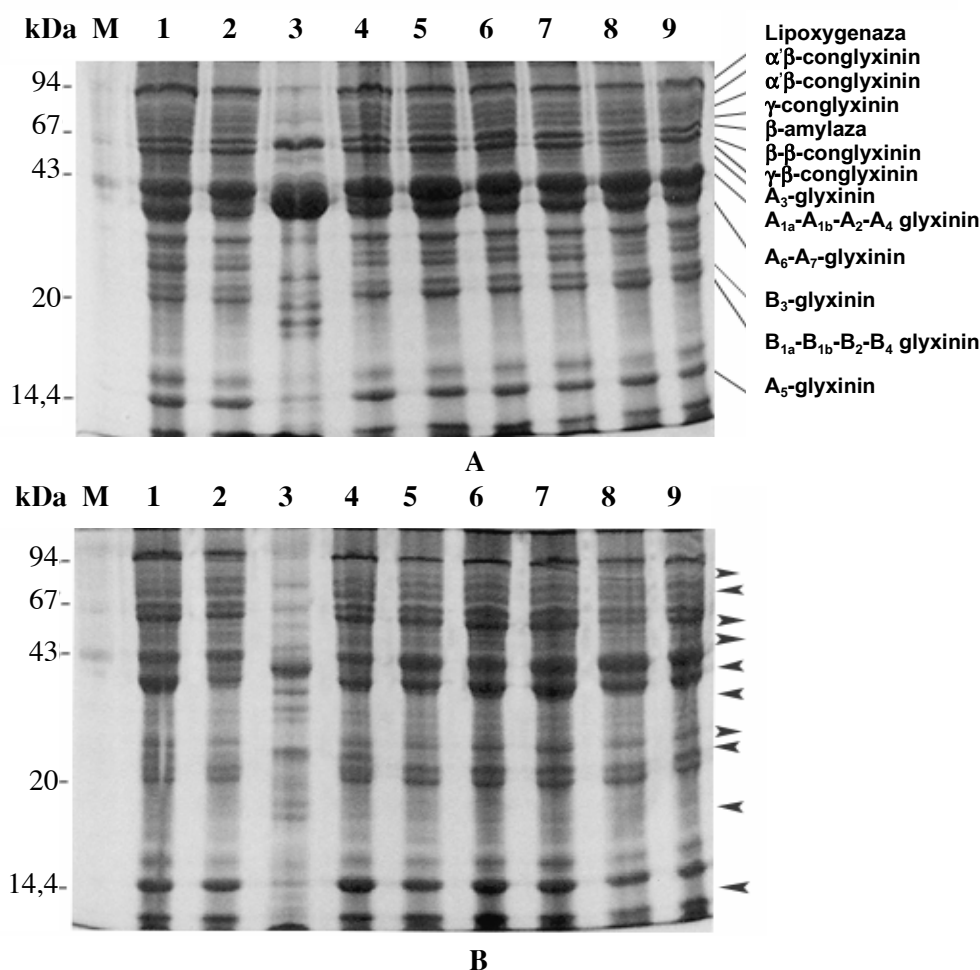
Giống đậu tương	Trọng lượng 100 hạt (g)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng lipid (%)
Vàng Mường Khương	9,92	20,34	21,28
Azuki	6,78	20,90	5,78
Bát Xát	17,90	18,87	24,17
Hà Giang	12,80	21,26	16,85
Xanh Bắc Hà	7,80	22,80	7,74
AK06	15,67	22,59	18,06
Cúc vàng	11,54	19,48	18,80
ĐT12	15,82	22,19	16,18
ĐT93	12,00	19,53	15,69
Lơ 75	8,29	19,58	17,84

Đậu tương được xếp vào loại cây trồng cung cấp nhiều protein hơn là lipid. Kết quả ở bảng 1 cho thấy hàm lượng protein tan trong hạt của các giống đậu tương khá cao, dao động trong khoảng 18,87 - 22,80%; hàm lượng lipid trong hạt của các giống khá chênh lệch nhau, dao động từ 5,78 - 24,17%. Các giống đậu tương azuki, xanh Bắc Hà và Hà Giang đều có hàm lượng lipid thấp, thấp nhất là giống azuki (5,78%). Giống cho hàm lượng lipid cao nhất là giống Bát Xát (24,17%). Các giống đậu tương ĐT12, AK06 và xanh Bắc Hà đều có hàm lượng protein cao, cao nhất là giống xanh Bắc Hà (22,80%) nhưng hàm lượng lipid lại chỉ có 7,74%; ngược lại, giống đậu tương Bát Xát có hàm lượng protein thấp nhất (18,87%), nhưng lại có hàm lượng lipid cao nhất (24,17%). Như vậy, hàm lượng protein và lipid trong hạt của các giống đậu tương có mối tương quan nghịch.

2. Phổ điện di protein hạt của các giống đậu tương

Hạt đậu tương được bóc vỏ, nghiền nhỏ tới dạng bột mịn và chiết protein theo hai cách: protein được chiết bởi NaCl 1M và protein được chiết bởi H₂O khử ion. Dịch chiết protein được tiến hành phân tích điện di trên gel polyacrylamit 12,5% có SDS (hình 1).

Kết quả phân tích phổ điện di protein dự trữ chiết bằng NaCl 1M bao gồm hầu hết là albumin và globulin. Hình 1 cho thấy phổ điện di protein của 9 giống đậu tương có số băng điện di dao động từ 16 - 28 băng. Từ kết quả phân tích hình ảnh điện di protein, dựa trên thang protein chuẩn, kích thước của các băng điện di chính đã được xác định, trong đó rõ nhất là các băng tương ứng với các tiểu phân globulin dự trữ trong hạt, bao gồm các tiểu đơn vị: α , α' , β , γ - β -conglyxinin tương ứng với khối lượng phân tử 55-78 kDa; γ -conglyxinin (khoảng 67 kDa); A₃-glyxinin (47 kDa); nhóm các vạch trùng nhau A_{1a}, A_{1b}, A₂, A₄-glyxinin (39 kDa); A₆, A₇-glyxinin (khoảng 36 kDa); nhóm B_{1a}, B_{1b}, B₂, B₄-glyxinin (21 kDa) và tiểu đơn vị có khối lượng phân tử nhỏ nhất là A₅-glyxinin (14,4 kDa). Nhìn chung, các tiểu đơn vị globulin phân bố ở các giống đậu tương là giống nhau. Tuy nhiên, đáng chú ý là sự khác biệt rõ rệt của giống azuki so với các giống còn lại. Ở giống azuki không thấy xuất hiện hai tiểu đơn vị α' , β - β -conglyxinin. Theo Phan Hữu Tôn và cs. thì sự thiếu hụt đồng thời hai tiểu đơn vị α' , β - β -conglyxinin là do một gen lặn (ký hiệu là a, có alen trội là A) quy định, đã phân ly theo tỷ lệ bất thường là: 3AA: 4Aa: 1aa [6].



Hình 1. Phổ điện di protein chiết bằng NaCl 1M (A) và H₂O (B) của 9 giống đậu tương

Ghi chú: M. thang protein chuẩn; 1. Bát Xát - Lào Cai; 2. vàng Mường Khương; 3. azuki; 4. Hà Giang; 5. xanh Bắc Hà; 6. Cúc vàng; 7. ĐT93; 8. ĐT12; 9. AK06; \blacktriangleright . băng điện di xuất hiện; \blacktriangleleft . băng điện di protein không xuất hiện.

Như vậy, rất có thể giống đậu tương azuki có kiểu gen đồng hợp lặn (aa) về tính trạng này. Đặc biệt, chúng tôi nhận thấy giống đậu tương azuki thiếu hụt tiểu đơn vị B₃-glyxinin tương ứng với kích thước khoảng 20 kDa, đây là tiểu đơn vị trong cấu trúc G₄ (A₅A₄B₃) [4, 6]. Điều này cho thấy protein dự trữ trong hạt của giống đậu tương azuki không có loại glyxinin này. Kết quả thu được phù hợp với tác giả Kitamura khi nghiên cứu giống đậu tương của Nhật Bản [4]. Ngược lại, trong khoảng kích thước phân tử từ 14 - 35 kDa, ở giống đậu tương azuki, xuất hiện 3 tiểu đơn vị đặc trưng thuộc nhóm glyxinin, nhưng kích thước của chúng lại có sự chênh lệch so với các tiểu đơn vị tương ứng của các giống khác. Như vậy, rất có thể đây là sản phẩm của

các locut đa alen.

Ngoài ra, chúng tôi còn nhận thấy hai giống đậu tương Bát Xát và vàng Mường Khương có sự thiếu hụt một tiểu đơn vị nằm trong khoảng kích thước phân tử 43 - 67 kDa; ở hai giống ĐT12 và AK06, xuất hiện thêm 2 tiểu đơn vị có kích thước phân tử ước lượng 20 - 30 kDa.

Các protein thuộc nhóm albumin có các băng vạch chính được xác định tương ứng với các tiểu đơn vị lipoxygenaza (khối lượng phân tử 94 kDa) và β-amylaza (58 kDa). Kết quả mà chúng tôi nhận được phù hợp với công bố của Trần Thị Phương Liên và cs. (1999) [4]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy giống đậu tương azuki có tiểu đơn vị

lipoxigenaza nhạt hơn nhiều so với các giống khác. Lipoxigenaza là một loại enzym oxy hóa các axit béo không no, tạo mùi vị đặc biệt làm hạn chế khả năng sử dụng đậu tương trong công nghiệp thực phẩm. Đây là một ưu điểm về mặt chất lượng của giống đậu tương azuki. Mặt khác, lipoxigenaza có vai trò làm tăng hàm lượng jasmonat - chất có liên quan đến khả năng chịu nóng, chịu hạn ở thực vật [8]. Và như vậy, rất có thể giống azuki là giống đậu tương chịu nóng kém. Điều này phù hợp với nguồn gốc sưu tập của giống azuki tại Sa Pa-Lào Cai.

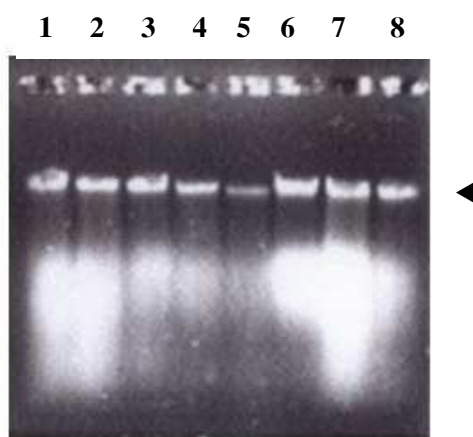
Phổ điện di protein chiết bằng H₂O bao gồm chủ yếu là albumin và một phân globulin. Do trong tế bào có các ion và các hợp chất hữu cơ với khối lượng phân tử thấp dễ tan trong nước, nên khi chiết bằng nước, chúng tạo thành dung dịch muối loãng, đủ để hòa tan một phần globulin. Nhìn chung, phổ điện di protein chiết bằng nước có sự đa hình rõ rệt hơn so với phổ điện di protein chiết bằng muối. Trong khoảng kích thước phân tử từ 67 - 94 kDa, ở hai giống Bắc Xát và vàng Mường Khương xuất hiện 2 tiểu đơn vị protein đặc trưng mà các giống khác không có. Ngược lại, trong khoảng kích thước này, giống azuki lại thiếu 3 tiểu đơn vị protein. Tương tự như vậy, trong khoảng kích thước phân tử từ 43 - 67 kDa, giống azuki cũng thiếu 2 tiểu đơn vị protein, hai giống ĐT12 và AK06 thiếu 1 tiểu đơn vị protein so với các giống còn lại. Ngoài ra, giống azuki còn thể hiện sự khác biệt so với các giống còn lại ở sự xuất hiện 3 tiểu đơn vị protein đặc trưng có kích thước phân tử nhỏ hơn 14,4 kDa và 2 tiểu đơn vị ở khoảng

kích thước phân tử từ 14,4 - 20 kDa. Mặt khác, trong khoảng kích thước phân tử từ 14,4 - 20 kDa ứng với các protein thuộc nhóm glyxinin của các giống đậu tương, xuất hiện nhiều băng điện di phụ hơn so với phổ điện di protein chiết bằng muối; đồng thời các băng điện di chính của nó cũng có độ đậm nét hơn hẳn. Điều này chứng tỏ tính hoà tan trong nước của các tiểu đơn vị protein này đã tăng lên.

Như vậy, từ kết quả phân tích phổ điện di protein ở trên cho thấy protein dự trữ trong hạt của các giống đậu tương nghiên cứu đã biểu hiện sự đa hình. Đặc biệt, chúng tôi còn nhận thấy thành phần protein dự trữ của giống azuki có sự khác biệt lớn so với các giống khác. Đây có thể xem như một đối tượng mới cần được quan tâm nghiên cứu sâu hơn ở mức độ phân tử.

3. Tách chiết ADN tổng số và nhân gen chaperonin bằng phản ứng PCR

ADN tổng số được tách chiết từ mầm đậu tương 3 ngày tuổi theo phương pháp miniprep có cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm; sản phẩm được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarosa 0,8% (hình 2) và xác định hàm lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ. Kết quả cho thấy hàm lượng ADN thu được dao động trong khoảng từ 120,09 - 179,63 ng/μl và có một băng điện di duy nhất, không đứt gãy. Từ nồng độ ADN gốc, chúng tôi đã tiến hành pha loãng với các hệ số khác nhau để thực hiện phản ứng PCR. Kết quả cho thấy, nồng độ ADN khuôn tối ưu được sử dụng cho một phản ứng PCR của đậu tương khoảng 5-15 ng.

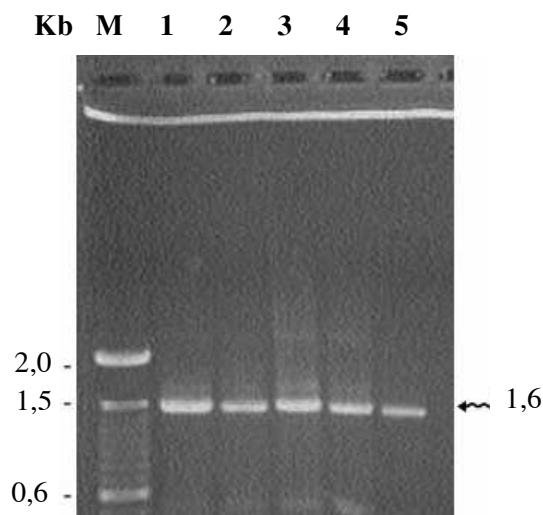


Hình 2. Hình ảnh điện di ADN tổng số

1. AK06; 2. vàng Mường Khương; 3. ĐT12; 4. xanh Bắc Hà; 5. azuki; 6. ĐT93; 7. M54; 8. cúc vàng

Trên cơ sở xác định được nồng độ ADN khuôn tối ưu cho phản ứng PCR, chúng tôi đã tiến hành nhân gen chaperonin của 5 giống đậu tương, trong đó có 3 giống thuộc vùng núi Tây

Bắc (azuki, vàng Mường Khương, xanh Bắc Hà) và hai giống ĐT93, M54. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0,8% (hình 3).



Hình 3. Hình ảnh điện di gen chaperonin của 5 giống đậu tương
M. thang ADN chuẩn; 1. ĐT 93; 2. vàng Mường Khương; 3. azuki; 4. M54; 5. xanh Bắc Hà

Kết quả ở hình 3 cho thấy cả 5 giống đậu tương đều thu được sản phẩm PCR đặc hiệu, với kích thước phân tử khoảng ~ 1,6 kb. Kích thước phân tử của sản phẩm PCR nhận được chính bằng kích thước phân tử của cDNA của gen chaperonin của giống đậu tương Nhật Bản [2]. Điều này chứng tỏ cả 5 giống đậu tương nghiên cứu đều có mặt gen chaperonin và không có intron trong cấu trúc của gen. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết luận của Trần Thị Phương Liên và cs. (1999) [4]. Sản phẩm PCR thu được có thể đáp ứng cho các nghiên cứu tiếp theo.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã xác định được hàm lượng protein, hàm lượng lipid của 10 giống đậu tương. Hàm lượng protein và hàm lượng lipid có mối tương quan nghịch. Giống đậu tương xanh Bắc Hà có hàm lượng protein tan cao nhất (22,80%).

2. Phổ điện di protein dự trữ trong hạt trên gel polyacrylamit 12,5% chứa SDS có biểu hiện sai khác về một số tiểu đơn vị protein giữa các giống đậu tương. Trong đó, sự sai khác thể hiện rõ nhất ở các giống đậu tương của vùng núi Tây Bắc. Đặc biệt, giống azuki có số lượng băng

điện di thấp nhất (18 băng) và phổ điện di protein dự trữ trong hạt của giống azuki có sự sai khác về các tiểu đơn vị β -conglyxinin và glyxinin so với các giống khác.

3. ADN tổng số được tách chiết từ mầm đậu tương có khả năng hoạt động tốt trong các phản ứng PCR. Bằng kỹ thuật PCR, đã nhân bản thành công gen chaperonin tế bào chất có kích thước phân tử 1,6 kb của 5 giống đậu tương: azuki, vàng Mường Khương, xanh Bắc Hà, ĐT93 và M54.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Văn Bình** và cs., 1996: Giáo trình Cây công nghiệp: 5-36. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
2. **Nong V. H. et al.**, 2000: Japanese journal of Biochemistry: 201-300.
3. **Trần Thị Phương Liên** và cs., 1998: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 36(5): 8 - 14.
4. **Trần Thị Phương Liên**, 1999: Nghiên cứu đặc tính hóa sinh và sinh học phân tử của một số giống đậu tương có khả năng chịu nóng, chịu hạn ở Việt Nam. Luận án tiến sỹ

- sinh học, Hà Nội.
5. **Laemmler U. K.**, 1970: *Natural*, 227: 680-688.
 6. **Phan Hữu Tôn**, 1997: *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 3: 34-38. Hà Nội.
 7. **Nguyễn Văn Mùi**, 2001: *Thực hành hóa sinh học*, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
 8. **Hoàng Thị Thu Yến và cs.**, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 1073-1076, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
 9. **Hoàng Thị Thu Yến và cs.**, 2004: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 723-727. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

STUDY OF THE SEED PROTEIN COMPOSITION AND THE AMPLIFICATION OF THE CYTOSOLIC CHAPERONIN GENE FROM SOME SOYBEAN CULTIVARS OF THE NORTH-WEST MOUNTAINOUS REGION, VIETNAM

**CHU HOANG MAU, LE THI THANH HUONG,
NGUYEN PHU HUNG, TRAN DINH LONG**

SUMMARY

The seeds of some soybean cultivars of the North-West mountainous region, Vietnam (vang Muong Khuong, azuki, Bat Xat, Ha Giang, xanh Bac Ha, AK06, Cuc vang, DT12, DT93, Lo 75 and M54) were used to study of the seed protein composition and the amplification of the cytosolic chaperonin gene; among them, the vang Muong Khuong, azuki, Bat Xat-Lao Cai, Ha Giang and xanh Bac Ha cultivars were local ones.

These seeds were used to extract lipid and storage proteins. The total protein content in the seeds of these soybean cultivar was from 18.87 - 22.80% of dry weight and this value was highest in the xanh Bac Ha cultivar (22.80%). The total lipid content was from 5.78 - 24.17% of dry weight and especially the azuki cultivar had the lowest lipid percentage (5.78%).

The seed protein fractions of some soybean cultivars were analyzed by 12.5% - SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The analytic result showed that the storage proteins of some local soybean cultivars had the polymorphism. Especially, the result showed the difference in β -conglycinin and glycinin subunits distribution of the azuki cultivar in comparison with other cultivars.

The total genomic DNAs from the soybean seedlings have been isolated. The cytosolic chaperonin gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the molecular weight about 1.6 kb from five soybean cultivars.

Ngày nhận bài: 15-5-2005