

TÁCH DÒNG GIEN MÃ HÓA PHỐTPO-LIPAZA C3 Ở HAI GIỐNG ĐẬU XANH *VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK KP11 VÀ MN93

NGUYỄN VŨ THANH THANH, CHU HOÀNG MẬU

Đại học Thái Nguyên

PHẠM THỊ VÂN, LÊ TRẦN BÌNH

Viện Công nghệ sinh học

Đậu xanh *Vigna radiata* (L.) Wilczek là một trong những mặt hàng nông sản xuất khẩu với nhiều ưu điểm quan trọng trong hệ thống sản xuất cây lương thực và thực phẩm [1]. Cây đậu xanh chịu hạn, chịu úng kém. Việc nghiên cứu mối quan hệ giữa gen với khả năng chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi của cây đậu xanh còn ít được đề cập đến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai giống đậu xanh KP11 và MN93 làm nguyên liệu để tách dòng và so sánh trình tự nucleotit của gen phốtpho-lipaza C3 (PLC3) nhằm đưa phương pháp sinh học phân tử vào nghiên cứu cây đậu xanh, cũng như góp

phần rút ngắn thời gian chọn các giống đậu xanh phục vụ sản xuất.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Hai giống đậu xanh KP11 và MN93 do Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Vectơ tách dòng pTZ57R/T do hãng Fermentas cung cấp. Các loại hóa chất, dụng cụ và thiết bị phục vụ cho thí nghiệm sinh học phân tử.

Ba cặp môi PLC3 ký hiệu F1, F2, F3 có trình tự như sau:

STT	Ký hiệu môi	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn môi
1	F1	5'ATGTCCAAGCAGACTTACAGC3' 5'CTCAGCCACTTTGGCCTGAAG3'	54°C
2	F2	5'GAGGTCTATTAAGCAGTATGC3' 5'AATGCAACCATCTGGGCTCCA3'	54°C
3	F3	5'AGGCACTCGTATTGCCTCAAC3' 5'TCAAATGAATTCAAAGCGCAT3'	54°C

2. Phương pháp

a. ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp Gawel và Jarnet [7] có cải tiến. Chất lượng và nồng độ ADN được xác định bằng máy quang phổ hấp phụ của hãng Shimadzu (model 8452A), Nhật Bản.

b. Dựa trên cơ sở dữ liệu khai thác tại Ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi thiết kế môi để nhân gen phốtpho-lipaza C3. Vì đoạn gen này có kích thước lớn (khoảng hơn 4000 nucleotit) nên rất khó biến nạp và không thể đọc trình tự nucleotit của gen được. Do nhược điểm trên, nên chúng tôi đã thiết kế 3 cặp môi để nhân đoạn gen lớn này. Đặc điểm của 3 cặp môi này là được thiết kế gối lên nhau, để sau khi đọc xong trình tự nucleotit của 3 đoạn gen nhân bằng 3 cặp môi

này, thì có thể ghép lại thành gen hoàn chỉnh. Kích thước dự kiến của 3 cặp môi là: cặp môi thứ nhất (ký hiệu F1) có kích thước 1570 nucleotit, cặp môi thứ hai (ký hiệu F2) có kích thước 1331 nucleotit và cặp môi thứ ba (ký hiệu F3) có kích thước 1482 nucleotit.

c. Nhân gen PLC3 bằng kỹ thuật PCR. PCR được tiến hành với tổng thể tích phản ứng 50 µl gồm: ADN mẫu (50 ng/µl) 4 µl, môi (10 µM) 4 µl, dNTP (2,5 mM) 4 µl, MgCl₂ (25 mM) 5 µl, *Taq* polymeraza (5 U/µl) 0,8 µl, buffer PCR (10X) 5 µl, H₂O khử ion 27,2 µl.

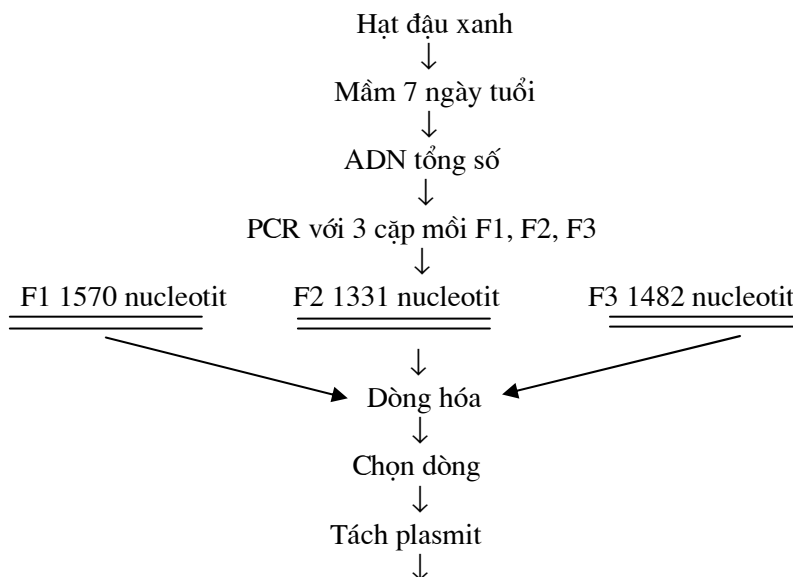
d. Chu trình nhiệt bao gồm các bước sau: 94°C-3 phút; 94°C-50 giây, 54°C-1 phút, 72°C-1 phút 30 giây lặp lại 35 chu kỳ; 72°C - 10 phút và

lưu giữ ở 4°C.

Tách dòng và đọc trình tự: sản phẩm PCR của gen PLC3 được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%, sau đó được làm sạch (thời gel) theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction được gắn trực tiếp vào vectơ pTZ57R/T và được biến nạp vào tế bào khả biến của chủng *E. coli*

DH5α. Trình tự nucleotit của gen PLC3 được xác định thành 3 đoạn F1, F2, F3 trên máy đọc trình tự nucleotit tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystem. Kết quả đọc trình tự được xử lý và nối ghép bằng phần mềm DNASTar và BioEdit.

Sơ đồ thí nghiệm tổng quát:

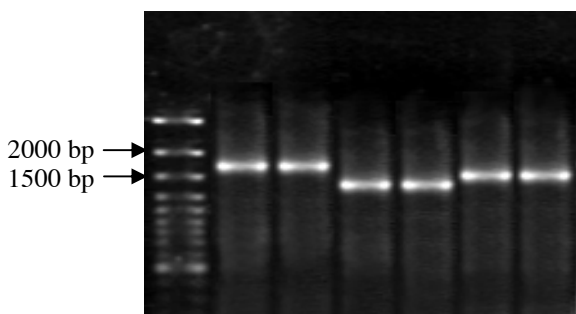


Đọc trình tự nucleotit của 3 đoạn gen. Xử lý và nối 3 đoạn thành gen PLC3 dài 4215 nucleotit

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nhân gen PLC3 của 2 giống đậu xanh KP11 và MN93

M 1F1 2F1 1F2 2F2 1F3 2F3



Hình 1. Kết quả PCR nhân gen PLC3 của 2 giống đậu xanh KP11 và MN93 với 3 cặp mồi F1, F2, F3

Ghi chú: M. chỉ thị phân tử 100 bp; 1F1 v□ 2F1 □ sản phẩm PCR của hai giống KP11 v□ MN93 với cặp mồi F1; 1F2 v□ 2F2 □ sản phẩm PCR của hai giống KP11 v□ MN93 với cặp mồi F2; 1F3 v□ 2F3 □ sản phẩm PCR của hai giống KP11 v□ MN93 với cặp mồi F3.

Với mục đích nhân đoạn gen mã hóa PLC3

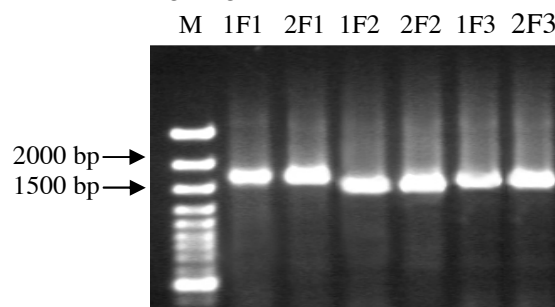
ở đậu xanh, chúng tôi tiến hành tách chiết ADN tổng số với số lượng đủ lớn. Các mẫu ADN được pha loãng ở nồng độ 50 ng và xác định mật độ hấp thụ tia tử ngoại trên máy quang phổ, đảm bảo đủ độ tinh khiết để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

Dựa trên sự phân tích trình tự nucleotit của gen PLC3 ở giống đậu xanh được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế với mã số AY394078, chúng tôi đã thiết kế 3 cặp môi F1, F2, F3 gối lên nhau để nhân và phát hiện sự có mặt của gen PLC3 ở 2 giống đậu xanh KP11 và MN93. Kích thước của đoạn gen được nhân lên bằng cặp môi F1 khoảng 1570 nucleotit, bằng cặp môi F2 khoảng 1330 nucleotit và bằng cặp môi F3 khoảng 1480 nucleotit. Đoạn gen PLC3 của 2 giống đậu xanh được nhân lên bằng phương pháp PCR sử dụng 3 cặp môi F1, F2, F3. Kết quả nhân gen được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarosa 1% và được thể hiện trên hình 1. Hình 1 cho thấy mỗi mẫu nhận được đoạn ADN đặc hiệu có kích thước khoảng 1570 nucleotit với cặp môi F1, 1331 nucleotit với cặp môi F2 và 1482 nucleotit với cặp môi F3 so với thang ADN chuẩn; hàm lượng của sản phẩm đủ lớn để sử dụng cho việc tách dòng.

2. Kết quả tách dòng gen PLC3

Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách gắn sản phẩm PCR đã tinh sạch vào vectơ tách dòng pTZ57R/T, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến của chủng *E. coli* DH5 α và được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung ampicillin 100 mg/ml, X-gal 40 mg/ml và IPTG 100 μ M. Ủ đĩa petri ở 37°C trong 16 giờ. Kết quả thu được cả khuẩn lạc xanh và trắng. Tiến hành chọn dòng thông qua phản ứng colony-PCR. Chọn khuẩn lạc trắng nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin 100 mg/ml qua đêm. Lấy khuẩn của mỗi mẫu chạy phản ứng colony PCR với cặp môi pUC18 để xác định khuẩn lạc có plasmid mang gen mong muốn. Vì cặp môi pUC18 là cặp môi được thiết kế chung cho các vectơ tạo dòng nên khi kiểm tra sản phẩm PCR vừa đồng hóa thì kích thước của các đoạn gen vừa nhân lên sẽ cao hơn khoảng 200 nucleotit so với nhân bằng cặp môi đặc hiệu. Như vậy, kích thước sau khi đồng hóa của đoạn gen đã được nhân bằng cặp môi F1 ở trên sẽ là 1770 nucleotit, đoạn gen đã được nhân bằng cặp môi F2 là 1531 nucleotit và đoạn

gen đã được nhân bằng cặp môi F3 là 1682 nucleotit. Sản phẩm colony PCR được điện di kiểm tra trên gel agarosa 1% (hình 2).



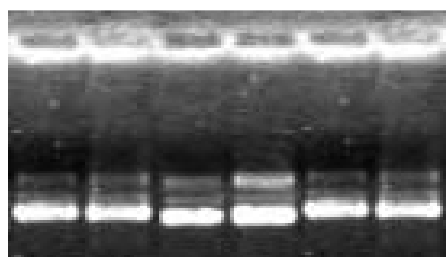
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR trên gel agarosa 1%

Ghi chú: như hình 1.

Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy sản phẩm colony PCR từ những khuẩn lạc trắng đều cho kết quả dương tính. Tất cả các mẫu đều cho một băng duy nhất đúng kích thước, chứng tỏ kết quả biến nạp và chọn dòng thực hiện tốt, phản ứng PCR đã đạt mức tối ưu. Như vậy, có thể khẳng định là việc nối ghép sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng đã đạt kết quả như mong muốn.

Tiến hành chọn khuẩn lạc trắng tương ứng với 2 mẫu nghiên cứu có sản phẩm colony PCR như mong muốn để tách plasmid theo bộ kit QIAprep Spin Miniprep. Sản phẩm ADN plasmid được điện di trên gel agarosa 1%. Kết quả được thể hiện ở hình 3.

1F1 2F1 1F2 2F2 1F3 2F3



Hình 3. Kết quả điện di tách plasmid

Ghi chú: 1F1 v□ 2F1 l□ plasmid của hai giống KP11 v□ MN93 được nhân bằng cặp môi F1; 1F2 v□ 2F2 l□ plasmid của hai giống KP11 v□ MN93 được nhân bằng cặp môi F2; 1F3 v□ 2F3 l□ plasmid của hai giống KP11 v□ MN93 được nhân bằng cặp môi F3.

Kết quả điện di trên hình 3 cho thấy sản phẩm tách plasmid sạch, đảm bảo chất lượng và số lượng để tiến hành đọc trình tự nucleotit.

3. Kết quả xác định trình tự nucleotit

Để xác định chính xác gen PLC3 đã được tách dòng, chúng tôi tiến hành đọc trình tự nucleotit của 3 đoạn gen được nhân lên bằng ba cặp môi F1, F2, F3 trên máy đọc tự động ABI PRIMS® 3100 Avant Genetic Analyzer theo cả chiều xuôi và chiều ngược. Trình tự nucleotit của gen PLC3 của 2 mẫu nghiên cứu thu được, đem phân tích, xử lý bằng phần mềm DNASTar và BioEdit.

Kết quả cho thấy kích thước của gen PLC3 ở 2 mẫu nghiên cứu là 4215 nucleotit, gồm cả

E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6	I6	E7	I7	E8	I8	E9
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

E1 (exon 1) gồm 315 nucleotit: từ vị trí nucleotit 1 đến 314 (1..314)

E2 (exon 2) gồm 197 nucleotit: 889..1085

E3 (exon 3) gồm 136 nucleotit: 1438..1573

E4 (exon 4) gồm 246 nucleotit: 1654..1899

E5 (exon 5) gồm 230 nucleotit: 2004..2233

E6 (exon 6) gồm 118 nucleotit: 2698..2815

E7 (exon 7) gồm 153 nucleotit: 3481..3633

E8 (exon 8) gồm 87 nucleotit: 3739..3825

E9 (exon 9) gồm 294 nucleotit: 3922..4215

I1 (intron 1) gồm 574 nucleotit: 315..888

I2 (intron 2) gồm 352 nucleotit: 1086..1473

I3 (intron 3) gồm 80 nucleotit: 1574..1653

I4 (intron 4) gồm 104 nucleotit: 1900..2003

I5 (intron 5) gồm 464 nucleotit: 2234..2697

I6 (intron 6) gồm 665 nucleotit: 2816..3480

I7 (intron 7) gồm 105 nucleotit: 3634..3738

I8 (intron 8) gồm 96 nucleotit: 3826..3921

4. So sánh trình tự nucleotit của 2 mẫu nghiên cứu KP11 và MN93

Sau khi đọc trình tự, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự nucleotit của 2 mẫu nghiên cứu KP11 và MN93. Kết quả cho thấy trình tự nucleotit của đoạn gen PLC3 (dài 4215 nucleotit) ở 2 mẫu nghiên cứu có độ tương đồng rất cao 99,8% (sai khác 8 nucleotit). Đó là các vị trí: ở vị trí 22 nucleotit T ở KP11 được thay bằng C ở MN93, vị trí 414 A (KP11) thay bằng G (MN93), vị trí 479 T (KP11) thay bằng C (MN93), vị trí 297 C (KP11) thay bằng T (MN93), vị trí 1964 T (KP11) thay bằng G (MN93), vị trí 2979 C (KP11) thay bằng T (MN93), vị trí 3388 T (KP11) thay bằng C (MN93), vị trí 4194 A (KP11) thay bằng G

intron và exon. Vùng coding (vùng mã hóa) gồm 1776 nucleotit mã hóa 591 axit amin (trừ axit amin mở đầu). Khi so sánh 2 trình tự này trong BLAST của NCBI, kết quả cho biết đây là các trình tự nucleotit của gen mã hóa PLC3 của đậu xanh. Chúng tôi kết luận đã tách dòng thành công đoạn gen mã hóa PLC3 của đậu xanh.

Sơ đồ cấu trúc của gen PLC3 của 2 giống đậu xanh KP11 và MN93 dài 4215 nucleotit với 9 exon và 8 intron:

(MN93). Điểm khác biệt về trình tự nucleotit của gen ở 2 mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotit của gen đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế có mã số AY39407 [8] là: kích thước gen của 2 mẫu nghiên cứu (KP11 và MN93) dài 4215 nucleotit còn của mẫu có mã số AY394078 (tại Ngân hàng gen quốc tế) là 5213 nucleotit. Sự khác biệt về chiều dài này không ảnh hưởng đến đoạn mã hóa và trình tự axit amin vì đoạn thiếu hụt đó chỉ nằm ở vùng intron. Vì chiều dài của gen PLC3 quá dài (4215 nucleotit) nên chúng tôi không đưa vào trong bài báo mà chỉ đưa đoạn mã hóa axit amin của gen này ở dưới đây.

Sơ đồ cấu trúc của gen PLC3 của mẫu đậu xanh có mã số AY394078 tại Ngân hàng gen quốc tế:

I1	E1	I2	E2	I3	E3	I4	E4	I5	E5	I6	E6	I7	E7	I8	E8	I9	E9	I10
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

Sơ đồ trên cho thấy gen PLC3 của mẫu có mã số AY394078 cũng có 9 exon giống 2 mẫu nghiên cứu KP11 và MN93 nhưng có thêm 2 đoạn không mã hóa là I1 gắn vào phía trước đoạn E1 và I10 gắn vào phía sau đoạn E9. I1 thực chất không phải là intron mà là 5'UTR, còn I10 là 3'UTR.

Vùng mã hóa axit amin của gen PLC3 gồm có 9 exon nối lại với nhau theo thứ tự từ exon 1 đến exon 9.

So sánh các vùng exon mã hóa axit amin (có kích thước 1776 nucleotit) của gen PLC3 ở 2 giống đậu xanh KP11 và MN93 với giống đậu xanh tại Ngân hàng gen quốc tế có mã số AY394078, kết quả cho thấy trình tự nucleotit có độ tương đồng cao, chỉ có 9 vị trí sai khác nhau là 22, 34, 142, 235, 297, 489, 627, 1287, 1755 (hình 4). Các vị trí sai khác này tương ứng với các vị trí 22, 34, 142, 235, 297, 1065, 1552, 3525, 4194 ở trong gen khi chưa loại intron.

	10 20 30 40 50
AY394078	ATGTCCAAGC AGACTTACAG CTTTGTGCTTC TGCTTCCGCC GCCGCTTCAG
KP11	ATGTCCAAGC AGACTTACAG CTTTGTGCTTC TGCTTCCGCC GCCGCTTCAG
MN93	ATGTCCAAGC AGACTTACAG CCTTGTGCTTC TGCTTCCGCC GCCGCTTCAG

	60 70 80 90 100
AY394078	TCTCCCCGTG TCGGAGGCC CTCCGGAGAT AAGGACCCTT TTCGACCGTT
KP11	TCTCCCCGTG TCGGAGGCC CTCCGGAGAT AAGGACCCTT TTCGACCGTT
MN93	TCTCCCCGTG TCGGAGGCC CTCCGGAGAT AAGGACCCTT TTCGACCGTT

	110 120 130 140 150
AY394078	ATTCCGATGA GAATGGAATC ATGACAGCCT CTCACGTCCG CAGTTTCCTG
KP11	ATTCCGATGA GAATGGAATC ATGACAGCCT CTCACGTCCG CGGTTTCCTG
MN93	ATTCCGATGA GAATGGAATC ATGACAGCCT CTCACGTCCG CGGTTTCCTG

	160 170 180 190 200
AY394078	GTTGAGGTGC AGAAGGAGGA GAGTGTCACT GAGGAGGAAG CACAGGCCAT
KP11	GTTGAGGTGC AGAAGGAGGA GAGTGTCACT GAGGAGGAAG CACAGGCCAT
MN93	GTTGAGGTGC AGAAGGAGGA GAGTGTCACT GAGGAGGAAG CACAGGCCAT

	210 220 230 240 250
AY394078	CATCGATGGC CACAAGCATC TCAGCATCTT TCACAGGAGG GGTCTCAATC
KP11	CATCGATGGC CACAAGCATC TCAGCATCTT TCACCGGAGG GGTCTCAATC
MN93	CATCGATGGC CACAAGCATC TCAGCATCTT TCACCGGAGG GGTCTCAATC

	260 270 280 290 300
AY394078	TTGAGAGTTT CTTCAACTAC CTCTTCAGTA GCAATAATAA TCCACCTCTC
KP11	TTGAGAGTTT CTTCAACTAC CTCTTCAGTA GCAATAATAA TCCACCCCTC
MN93	TTGAGAGTTT CTTCAACTAC CTCTTCAGTA GCAATAATAA TCCACCTCTC

	310 320 330 340 350
AY394078	TCGCCTTCTC TCGGGGTGCA CCAAGATATG TCTTCACCGT TGTCTCATTA
KP11	TCGCCTTCTC TCGGGGTGCA CCAAGATATG TCTTCACCGT TGTCTCATTA
MN93	TCGCCTTCTC TCGGGGTGCA CCAAGATATG TCTTCACCGT TGTCTCATTA

	360 370 380 390 400
AY394078	CTTCATTTAT ACTGGTCATA ATTCTATCT AACTGGGAAC CAACTAAGCA
KP11	CTTCATTTAT ACTGGTCATA ATTCTATCT AACTGGGAAC CAACTAAGCA
MN93	CTTCATTTAT ACTGGTCATA ATTCTATCT AACTGGGAAC CAACTAAGCA

	410 420 430 440 450
AY394078	GTGACTGCAG TGACGTCCCC ATCATCAAGG CACTGCAGAA GGGTGTAAAG
KP11	GTGACTGCAG TGACGTCCCC ATCATCAAGG CACTGCAGAA GGGTGTAAAG
MN93	GTGACTGCAG TGACGTCCCC ATCATCAAGG CACTGCAGAA GGGTGTAAAG

	460 470 480 490 500
AY394078	GTGATTGAAT TAGATATATG GCCTAATGAA TCAAAGGAGG ATGTGGATGT
KP11	GTGATTGAAT TAGATATATG GCCTAATGAA TCAAAGGATG ATGTGGATGT
MN93	GTGATTGAAT TAGATATATG GCCTAATGAA TCAAAGGATG ATGTGGATGT

	510 520 530 540 550
AY394078	TCTTCATGGA AGGACATTGA CATCTCCTGT GGCCTCATC AAATGTTTGA
KP11	TCTTCATGGA AGGACATTGA CATCTCCTGT GGCCTCATC AAATGTTTGA
MN93	TCTTCATGGA AGGACATTGA CATCTCCTGT GGCCTCATC AAATGTTTGA

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      560      570      580      590      600
AY394078 GGTCTATTAA GCAGTATGCT TTTGTTGCCT CAGAATATCC AGTTGTAATA
KP11       GGTCTATTAA GCAGTATGCT TTTGTTGCCT CAGAATATCC AGTTGTAATA
MN93       GGTCTATTAA GCAGTATGCT TTTGTTGCCT CAGAATATCC AGTTGTAATA
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      610      620      630      640      650
AY394078 ACCTTAGAAG ACCACCTTAC TCCCGATCCT CAGGCCAAAG TGGCTGAGAT
KP11       ACCTTAGAAG ACCACCTTAC TCCCGACCTT CAGGCCAAAG TGGCTGAGAT
MN93       ACCTTAGAAG ACCACCTTAC TCCCGACCTT CAGGCCAAAG TGGCTGAGAT
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      660      670      680      690      700
AY394078 GATTACTCAA ACATTTGGAG ACATACTATT TTCTCCTGGC TCTGAAAGCT
KP11       GATTACTCAA ACATTTGGAG ACATACTATT TTCTCCTGGC TCTGAAAGCT
MN93       GATTACTCAA ACATTTGGAG ACATACTATT TTCTCCTGGC TCTGAAAGCT
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      710      720      730      740      750
AY394078 TGAAGGAATT TCCTTCTCCT AAATCGCTTA AAAGGAGGAT TATCATATCA
KP11       TGAAGGAATT TCCTTCTCCT AAATCGCTTA AAAGGAGGAT TATCATATCA
MN93       TGAAGGAATT TCCTTCTCCT AAATCGCTTA AAAGGAGGAT TATCATATCA
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      760      770      780      790      800
AY394078 ACCAAACCAC CTAAGGAGTA CATTGAGGCA AAAGAAGTTC AGGAAAAGGG
KP11       ACCAAACCAC CTAAGGAGTA CATTGAGGCA AAAGAAGTTC AGGAAAAGGG
MN93       ACCAAACCAC CTAAGGAGTA CATTGAGGCA AAAGAAGTTC AGGAAAAGGG
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      810      820      830      840      850
AY394078 GGAGGGATCA CAAAAGGAAA AGCCTGTAGA TGATGAAGAA GCATGGGGGA
KP11       GGAGGGATCA CAAAAGGAAA AGCCTGTAGA TGATGAAGAA GCATGGGGGA
MN93       GGAGGGATCA CAAAAGGAAA AGCCTGTAGA TGATGAAGAA GCATGGGGGA
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      860      870      880      890      900
AY394078 AAGAAGTTCC TAGTTTGAGA GGTGGCACTA TTTCTGATCA CAAGAACATC
KP11       AAGAAGTTCC TAGTTTGAGA GGTGGCACTA TTTCTGATCA CAAGAACATC
MN93       AAGAAGTTCC TAGTTTGAGA GGTGGCACTA TTTCTGATCA CAAGAACATC
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      910      920      930      940      950
AY394078 GAGGATGAGG ATGATCTTGA CAATGAAGAT GATACTGATG AAGCAGAATA
KP11       GAGGATGAGG ATGATCTTGA CAATGAAGAT GATACTGATG AAGCAGAATA
MN93       GAGGATGAGG ATGATCTTGA CAATGAAGAT GATACTGATG AAGCAGAATA
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      960      970      980      990      1000
AY394078 TTCACGTCAA AATGCATCAG ACGAATACAG ACGTTTAATT GCCATTTCATG
KP11       TTCACGTCAA AATGCATCAG ACGAATACAG ACGTTTAATT GCCATTTCATG
MN93       TTCACGTCAA AATGCATCAG ACGAATACAG ACGTTTAATT GCCATTTCATG
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1010     1020     1030     1040     1050
AY394078 CTGGGAAGCC TAAAGGTGGA TTAACAGAAT GCCTCAAAGT GGATCCCGAT
KP11       CTGGGAAGCC TAAAGGTGGA TTAACAGAAT GCCTCAAAGT GGATCCCGAT
MN93       CTGGGAAGCC TAAAGGTGGA TTAACAGAAT GCCTCAAAGT GGATCCCGAT
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1060     1070     1080     1090     1100
AY394078 ACAGTGAAAC GTCTAAGTTT AAGTGAGCTA CAACTTGAAA AGGCTGCTGA
KP11       ACAGTGAAAC GTCTAAGTTT AAGTGAGCTA CAACTTGAAA AGGCTGCTGA
MN93       ACAGTGAAAC GTCTAAGTTT AAGTGAGCTA CAACTTGAAA AGGCTGCTGA
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1110     1120     1130     1140     1150
AY394078 AACTCATGGC AAAGAAATCA TAAGGTTTAC TCAGCGGAAT ATRACTGAGAG
KP11       AACTCATGGC AAAGAAATCA TAAGGTTTAC TCAGCGGAAT ATRACTGAGAG
MN93       AACTCATGGC AAAGAAATCA TAAGGTTTAC TCAGCGGAAT ATRACTGAGAG
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1160     1170     1180     1190     1200
AY394078 TGTATCCAAA AGGCACTCGT ATTGCCTCAA CAAATTATAA TCCATTGATC
KP11       TGTATCCAAA AGGCACTCGT ATTGCCTCAA CAAATTATAA TCCATTGATC
MN93       TGTATCCAAA AGGCACTCGT ATTGCCTCAA CAAATTATAA TCCATTGATC
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1210     1220     1230     1240     1250
AY394078 GGGTGGATGC ATGGAGCCCA GATGGTTGCA TTCAACATGC AGGGATACGG
KP11       GGGTGGATGC ATGGAGCCCA GATGGTTGCA TTCAACATGC AGGGATACGG

```

```

MN93      GGGTGGATGC ATGGAGCCCA GATGGTTGCA TTCAACATGC AGGGATACGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1260      1270      1280      1290      1300
AY394078 TAGGTCTCTC TGGTGTGATC AGGGAATGTT CAAAGCGAAT GGGGGATGTG
KP11      TAGGTCTCTC TGGTGTGATC AGGGAATGTT CAAAGCCAAT GGGGGATGTG
MN93      TAGGTCTCTC TGGTGTGATC AGGGAATGTT CAAAGCCAAT GGGGGATGTG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1310      1320      1330      1340      1350
AY394078 GTTATGTTAA GAAACCAGAT TTTCTGTTAA AGACTGGTCT TAATAATGAG
KP11      GTTATGTTAA GAAACCAGAT TTTCTGTTAA AGACTGGTCT TAATAATGAG
MN93      GTTATGTTAA GAAACCAGAT TTTCTGTTAA AGACTGGTCT TAATAATGAG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1360      1370      1380      1390      1400
AY394078 GTCTTTGATC CTAAGCTCG TTTGCCGGTG AAGAAAACCT TGAAAGTGAC
KP11      GTCTTTGATC CTAAGCTCG TTTGCCGGTG AAGAAAACCT TGAAAGTGAC
MN93      GTCTTTGATC CTAAGCTCG TTTGCCGGTG AAGAAAACCT TGAAAGTGAC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1410      1420      1430      1440      1450
AY394078 TATATATATG GGGGAAGGAT GGTTCATGA TTTCAAGCAC ACGCACTTTG
KP11      TATATATATG GGGGAAGGAT GGTTCATGA TTTCAAGCAC ACGCACTTTG
MN93      TATATATATG GGGGAAGGAT GGTTCATGA TTTCAAGCAC ACGCACTTTG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1460      1470      1480      1490      1500
AY394078 ATCAATACTC ACCCCCTGAC TTCTATGCAA GAGTGGGGAT TGCTGGAGTC
KP11      ATCAATACTC ACCCCCTGAC TTCTATGCAA GAGTGGGGAT TGCTGGAGTC
MN93      ATCAATACTC ACCCCCTGAC TTCTATGCAA GAGTGGGGAT TGCTGGAGTC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1510      1520      1530      1540      1550
AY394078 CCTTATGATA CTGTTATGAA AAAAACAAG AGCGTGGAGG ATAATTGGTC
KP11      CCTTATGATA CTGTTATGAA AAAAACAAG AGCGTGGAGG ATAATTGGTC
MN93      CCTTATGATA CTGTTATGAA AAAAACAAG AGCGTGGAGG ATAATTGGTC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1560      1570      1580      1590      1600
AY394078 TCCATCATGG AATGAGGAAT TTAAGTTTCC ACTTCTGTG CCAGAACTGG
KP11      TCCATCATGG AATGAGGAAT TTAAGTTTCC ACTTCTGTG CCAGAACTGG
MN93      TCCATCATGG AATGAGGAAT TTAAGTTTCC ACTTCTGTG CCAGAACTGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1610      1620      1630      1640      1650
AY394078 CTCTGCTTCG TGTAGAAGTT CATGAATATG ACATGTCTGA GAAAGATGAC
KP11      CTCTGCTTCG TGTAGAAGTT CATGAATATG ACATGTCTGA GAAAGATGAC
MN93      CTCTGCTTCG TGTAGAAGTT CATGAATATG ACATGTCTGA GAAAGATGAC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1660      1670      1680      1690      1700
AY394078 TTTGGTGGCC AAACCTTGCTT ACCTGTGTGG GAACTGAGAA GTGGAATTTCG
KP11      TTTGGTGGCC AAACCTTGCTT ACCTGTGTGG GAACTGAGAA GTGGAATTTCG
MN93      TTTGGTGGCC AAACCTTGCTT ACCTGTGTGG GAACTGAGAA GTGGAATTTCG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1710      1720      1730      1740      1750
AY394078 TGCAGTTCCA TTATATTCCC GCAAAGGAGA AAAGTACCAC AATGTGAAGC
KP11      TGCAGTTCCA TTATATTCCC GCAAAGGAGA AAAGTACCAC AATGTGAAGC
MN93      TGCAGTTCCA TTATATTCCC GCAAAGGAGA AAAGTACCAC AATGTGAAGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1760      1770
AY394078 TTCTAATGCG CTTTGAATTC ATTTGA
KP11      TTCTAATGCG CTTTGAATTC ATTTGA
MN93      TTCTGATGCG CTTTGAATTC ATTTGA

```

Hình 4. So sánh trình tự của các vùng exon của các giống đậu xanh KP11, MN93 và AY394078

5. So sánh trình tự nucleotit của 2 gen PLC3 nghiên cứu (vùng mã hóa axit amin) với trình tự của các gen PLC3 của một số cây trồng khác

Chúng tôi tiến hành so sánh trình tự nucleotit của 2 gen PLC3 nghiên cứu với các trình tự nucleotit của gen PLC3 ở một số cây trồng khác

có tên và mã số đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế: đậu xanh *Vigna radiata* (L) Wilczek (AY394078) [7], khoai tây *Solanum tuberosum* L. (X94289) [8], đậu tương *Glycine max* (L.) Merr (U25027) [13], ngô *Zea mays* L. (AY536525) [9], đậu hà lan *Pisum sativum* L. (Y15253) [10], thuốc

lá *Nicotiana tabacum* L. (X95877) [11], đậu dãi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (U85250) [12].

Kết quả cho thấy 2 mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao nhất so với mẫu AY394078 (đậu xanh); giống KP11 có độ tương đồng là 99,6% và giống MN93 có độ tương đồng là 99,5%. Tiếp đến là *Pisum sativum* L. (80,6%) và thấp nhất là *Zea mays* L. (54,7%). Kết quả so sánh thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1

So sánh trình tự nucleotit của gen PLC3 của 9 loại cây trồng khác nhau

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	99,8	99,6	65,7	76,4	54,8	80,6	58,2	55,5
2		100	99,5	65,8	76,4	54,7	80,6	57,4	55,3
3			100	65,7	76,5	57,4	80,5	57,6	55,5
4				100	64,2	52,9	64,1	58,4	53,0
5					100	52,8	76,0	59,7	58,1
6						100	52,9	54,1	53,5
7							100	58,9	57,5
8								100	58,9

9									100
---	--	--	--	--	--	--	--	--	-----

Ghi chú: 1. KP11; 2. MN93; 3. *Vigna radiata* (L.) Wilczek (AY394078); 4. *Solanum tuberosum* L. (X94289); 5. *Glycine max* (L.) Merr. (U25027); 6. *Zea mays* L. (AY536525); 7. *Pisum sativum* L. (Y15253); 8. *Nicotiana tabacum* L. (X95877); 9. *Vigna unguiculata* (L.) Walp (U85250).

6. So sánh trình tự axit amin của hai giống đậu xanh KP11 và MN93 với giống đậu xanh tại Ngân hàng gen quốc tế có mã số AY394078

Kết quả so sánh trình tự axit amin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu cũng có độ tương đồng rất cao 99,8%, chỉ sai khác 1 axit amin ở vị trí số 8. Ở vị trí số 8, axit amin L của KP11 được thay bằng axit amin F của MN93. So sánh trình tự axit amin của giống đậu xanh có mã số AY394078 tại Ngân hàng gen quốc tế với 2 giống đậu xanh nghiên cứu cho thấy 3 giống này có độ tương đồng cao, chỉ sai khác về trình tự axit amin ở 4 vị trí 8, 12, 48 và 163. Kết quả thể hiện ở hình 5.

	10 20 30 40 50
AY394078	MSKQTYSF C F C FR R RFSLPV SEAPPEIRTL FDRYSDENGI MTASHVRSFL
KP11	MSKQTYSL C F C LR R RFSLPV SEAPPEIRTL FDRYSDENGI MTASHVRGFL
MN93	MSKQTYSF C F C LR R RFSLPV SEAPPEIRTL FDRYSDENGI MTASHVRGFL

	60 70 80 90 100
AY394078	VEVQKEESVT EEEAQAIIDG HKHLSIFHRR GLNLESFFNY LFSSNNNPPL
KP11	VEVQKEESVT EEEAQAIIDG HKHLSIFHRR GLNLESFFNY LFSSNNNPPL
MN93	VEVQKEESVT EEEAQAIIDG HKHLSIFHRR GLNLESFFNY LFSSNNNPPL

	110 120 130 140 150
AY394078	SPSLGVHQDM SSPLSHYFIY TGHNSYLTGN QLSSDCSDVP IIKALQKQVR
KP11	SPSLGVHQDM SSPLSHYFIY TGHNSYLTGN QLSSDCSDVP IIKALQKQVR
MN93	SPSLGVHQDM SSPLSHYFIY TGHNSYLTGN QLSSDCSDVP IIKALQKQVR

	160 170 180 190 200
AY394078	VIELDIWPNE SKEDVDVLHG RTLTSPVALI KCLRSIKQYA FVASEYPVVI
KP11	VIELDIWPNE SKDDVDVLHG RTLTSPVALI KCLRSIKQYA FVASEYPVVI
MN93	VIELDIWPNE SKDDVDVLHG RTLTSPVALI KCLRSIKQYA FVASEYPVVI

	210 220 230 240 250
AY394078	TLEDHLTPDL QAKVAEMITQ TFGDILFSPG SESLKEFPSP KSLKRRIIIS
KP11	TLEDHLTPDL QAKVAEMITQ TFGDILFSPG SESLKEFPSP KSLKRRIIIS
MN93	TLEDHLTPDL QAKVAEMITQ TFGDILFSPG SESLKEFPSP KSLKRRIIIS

	260 270 280 290 300
AY394078	TKPPKEYIEA KEVQEKGEKS QKEKPVDDEE AWGKEVPSLR GGTISDHKNI
KP11	TKPPKEYIEA KEVQEKGEKS QKEKPVDDEE AWGKEVPSLR GGTISDHKNI
MN93	TKPPKEYIEA KEVQEKGEKS QKEKPVDDEE AWGKEVPSLR GGTISDHKNI

	310 320 330 340 350
AY394078	EDEDDLNDNED DTDEAEYSRQ NASDEYRRLI AIHAGKPKGG LTECLKVDPD
KP11	EDEDDLNDNED DTDEAEYSRQ NASDEYRRLI AIHAGKPKGG LTECLKVDPD
MN93	EDEDDLNDNED DTDEAEYSRQ NASDEYRRLI AIHAGKPKGG LTECLKVDPD

	360 370 380 390 400
AY394078	TVKRLSLSSEL QLEKAAETHG KEIIRFTQRN ILRVYPKGTR IASTNYNPLI


```

KP11          TVKRLSLSSEL QLEKAAETHG KEIIRFTQRN ILRVYPKGTR IASTNYNPLI
MN93          TVKRLSLSSEL QLEKAAETHG KEIIRFTQRN ILRVYPKGTR IASTNYNPLI
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                410          420          430          440          450
AY394078     GWMHGAQMVA FNMQGYGRSL WLMQGMFKAN GCGYVKKPD FLLKTGLNNE
KP11          GWMHGAQMVA FNMQGYGRSL WLMQGMFKAN GCGYVKKPD FLLKTGLNNE
MN93          GWMHGAQMVA FNMQGYGRSL WLMQGMFKAN GCGYVKKPD FLLKTGLNNE
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                460          470          480          490          500
AY394078     VFDPKARLPV KKTTLKVTIYM GEGWFHDFKH THFDQYSPPD FYARVGIAGV
KP11          VFDPKARLPV KKTTLKVTIYM GEGWFHDFKH THFDQYSPPD FYARVGIAGV
MN93          VFDPKARLPV KKTTLKVTIYM GEGWFHDFKH THFDQYSPPD FYARVGIAGV
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                510          520          530          540          550
AY394078     PYDTVMKKTG SVEDNWSPSW NEEFKFPLSV PELALLRVEV HEYDMSEKDD
KP11          PYDTVMKKTG SVEDNWSPSW NEEFKFPLSV PELALLRVEV HEYDMSEKDD
MN93          PYDTVMKKTG SVEDNWSPSW NEEFKFPLSV PELALLRVEV HEYDMSEKDD
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                560          570          580          590
AY294078     FGGQTCLPVW ELRSGIRAVP LYSRKGEKYH NVKLLMRFEF I
KP11          FGGQTCLPVW ELRSGIRAVP LYSRKGEKYH NVKLLMRFEF I
MN93          FGGQTCLPVW ELRSGIRAVP LYSRKGEKYH NVKLLMRFEF I

```

Hình 5. So sánh trình tự axit amin của hai giống đậu xanh KP11 và MN93 với giống đậu xanh có mã số AY394078

Chúng tôi tiến hành so sánh trình tự axit amin của gen PLC3 ở 2 giống đậu xanh KP11 và MN93 với các trình tự axit amin của gen PLC3 ở một số cây trồng khác. Kết quả cho thấy, 2 mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao nhất với AY394078 (99,5%), tiếp đến là *Pisum sativum* L. (81,4%) và thấp nhất là *Zea mays* L. (57,2%). Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

So sánh trình tự axit amin của 9 loại cây trồng khác nhau

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	99,8	99,5	68,4	74,3	57,2	81,4	61,7	57,6
2		100	99,3	68,4	74,3	57,2	81,4	61,7	57,6
3			100	68,4	74,1	57,2	81,2	61,7	57,6
4				100	64,4	56,6	68,2	62,4	55,4
5					100	55,6	75,1	63,4	58,5
6						100	56,3	59,4	57,5
7							100	62,6	57,7
8								100	62,8
9									100

Ghi chú: như bảng 1.

III. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của 2 giống đậu xanh *Vigna radiata* (L.) Wilczek KP11 và MN93. Gen photpho-lipaza C3 được nhân lên bằng phản ứng PCR với 3 cặp môi F1, F2, F3 được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu khai thác tại Ngân hàng gen quốc tế. Sản phẩm PCR được dòng hóa nhờ vectơ pTZ57R/T.

Toàn bộ trình tự nucleotit của các dòng sản phẩm PCR được xác định và xử lý cho kết quả gen PLC3 của 2 giống đậu xanh nghiên cứu dài 4215 nucleotit, trong đó có 9 exon và 8 intron. Đoạn gen mã hóa dài 1776 nucleotit và mã hóa sản phẩm protein dài 591 axit amin (trừ axit amin mở đầu). So sánh trình tự nucleotit và trình tự axit amin của gen PLC3 của 2 giống đậu xanh nghiên cứu với các trình tự tương tự của gen PLC3 của giống đậu xanh có mã số AY394078 tại Ngân hàng gen quốc tế cho thấy các gen PLC3 thu được có độ tương đồng cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Đình Long, Lê Khả Tường**, 1998: Cây đậu xanh. Nxb. Nông nghiệp.
2. **Knight H.**, 2000: Int. Rev. Cyto., 195: 269-325.
3. **Sanders D., Brownlee C. and Harper J. F.**, 1999: Plant cell, 11: 691-706.
4. **Trewavas A. J. and Gilroy S.**, 1991: Trends Gene, 7: 356-361.
5. **Yun Ju Kim et al.**, 2003: FEBS Letters (2004), 556: 127-136.
6. **Zhu J. K.**, 2002: Ann. Rev. Plant Biol., 53: 247-273.
7. **Gawel N. J., Jarret R. H.**, 1991: Genomic DNA isolation. <http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambra/html/dna.html>.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

CLONING OF THE ENCODING PHOSPHOLIPASE C3 GENE FROM TWO MUNGBEAN (*VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK) CULTIVARS KP11 AND MN93

**NGUYEN VU THANH THANH, CHU HOANG MAU,
PHAM THI VAN, LE TRAN BINH**

SUMMARY

Mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek is a grain legume widely grown in the tropics and subtropics and is an excellent source of dietary protein. Many biotic and abiotic stresses such as disease and drought limit the mungbean yield. In this study, 2 mungbean cultivars KP11 and MN93 were subjected to PCR analysis using 3 primer pairs (F1, F2, F3). A 4.2 k b phospholipase C3 (PLC3) gene fragment from the mungbean genome was successfully amplified by PCR. The PCR products containing the PLC3 fragments were cloned in pTZ57R/T and sequenced with three primer pairs (3 forward and 3 reverse primer). The cloned PLC3 gene had 4215 nucleotides in length, including start codon and stop codons, intron and exon. The coding region of PLC3 comprised 1776 nucleotides, encoding a polypeptide of 591 amino acids.

Ngày nhận bài: 20-3-2006