

## SO SÁNH TRÌNH TỰ GIEN CYSTATIN Ở CÂY ĐẬU XANH (*VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK)

CHU HOÀNG MẬU, NGUYỄN VŨ THANH THANH

*Đại học Thái Nguyên*

NGUYỄN THỊ THU TRANG

*Sở Giáo dục và Đào tạo Thái Nguyên*

Đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) là cây trồng ăn hạt được trồng ở nhiều nước trên thế giới. Đậu xanh là cây chịu hạn kém [6]. Stress môi trường như nóng, lạnh, hạn, sâu bệnh ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất của đậu xanh.

Cystatin là protein ức chế cystein proteaza thuộc họ papain. Cystatin thực vật (phytocystatins) có ở nhiều loài cây một lá mầm và hai lá mầm và có hoạt tính giống như chất ức chế cystein proteaza ở động vật. Các chất ức chế cystein proteaza thực vật thường được mã hoá bởi nhiều gen, nhưng sự hiểu biết về các gen này còn ít. Sự biểu hiện của gen cystatin thường trong điều kiện hạn, lạnh, mặn và ở các pha riêng rẽ của quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật [4, 8, 13]. Pernas M. và cs. (2000) cho rằng khi rễ cây dẻ (*Castanea sativa*) gặp lạnh, sốc muối, stress nóng thì mức độ phiên mã tăng mạnh ở cả tế bào rễ và tế bào lá và cystatin ở cây dẻ không chỉ liên quan đến phản ứng tự vệ với các mầm bệnh và sâu hại mà còn liên quan đến khả năng chống lại tác động bất lợi của các nhân tố vô sinh [10]. Nghiên cứu và phân lập

gen cystatin cũng đã được thực hiện trên các cây trồng khác như: đậu đũa (*Vigna unguiculata* L.), đậu tương (*Glycine max* L.), cà rốt (*Daucus carota* L.), táo (*Malus domestica*) [3, 7, 9], [11]. nhưng đối với cây đậu xanh việc nghiên cứu về cystatin và gen mã hoá protein này vẫn còn là vấn đề mới mẻ.

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả đánh giá khả năng chịu hạn, phân lập gen mã hoá cystatin của 2 giống đậu xanh (trong đó, một giống chịu hạn tốt - DX208 và một giống chịu hạn kém - PaEC3) nhằm đánh giá sự đa dạng của gen mã hoá cystatin của các giống đậu xanh phục vụ cho việc nghiên cứu chọn tạo các giống đậu xanh có khả năng chịu hạn.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

7 giống đậu xanh do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ - Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

*Bảng 1*

**Một số đặc điểm hình thái của 7 giống đậu xanh nghiên cứu**

STT	Tên giống	Màu thân mầm	Màu vỏ hạt	Khối lượng 1000 hạt
1	DX208	Xanh	Xanh bóng	75,30 ± 0,015
2	Đỗ Quế	Xanh	Xanh mốc	44,20 ± 0,025
3	DX14	Xanh	Xanh mốc	65,86 ± 0,040
4	DX04	Xanh	Xanh bóng	66,31 ± 0,015
5	V123	Xanh	Xanh bóng	63,95 ± 0,020
6	T135	Xanh	Xanh mốc	50,54 ± 0,032
7	PAEC3	Tím	Vàng bóng	60,75 ± 0,010

Cặp môi cystatin được chúng tôi thiết kế dựa trên sự phân tích trình tự gen cystatin ở giống đậu xanh được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế với mã số AF454396 và đặt tại hãng Fermentas:

Bảng 2

**Trình tự cặp môi nhân gen cystatin**

Môi	Trình tự môi (5'-3')
Cys1	GTCGCAGGAAGCTAGAAAGCGTTG
Cys2	CTATGCAGGTGCCTCTCCAAC

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

**2. Phương pháp**

Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn theo phương pháp của Lê Trần Bình và cs. (1998) [2].

ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp Gawel và Jarnet (1991) có cải tiến [5].

Nhân gen cystatin 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 pM) 4 µl, dNTP (2,5 mM) 4 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 5 µl, Taq polymerase (5 unit/µl) 0,8 µl, buffer PCR (10X) 5 µl, H<sub>2</sub>O khử ion 27,2 µl. Chu trình nhiệt bao gồm các bước sau: 94°C-3 phút; 94°C-50 giây, 56°C-1 phút, 72°C-1 phút 30 giây lặp lại 30 chu kỳ; 72°C - 10 phút và lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR nhân gen cystatin được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Gen được làm sạch (thời gel) theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction và gắn vào vectơ pTZ57R/T, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Trình tự nucleotit của gen cystatin được xác định trên máy đọc trình tự nucleotit tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystem. Kết quả xác định trình tự

gen được xử lý bằng phần mềm DNASTAR và BioEdit.

**3. Địa điểm thí nghiệm**

Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Di truyền học - Đại học Sư phạm - ĐHTN và Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học. Xác định trình tự gen tại Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**1. Khả năng chịu hạn của các giống đậu xanh nghiên cứu**

Để đánh giá khả năng chịu hạn của các giống đậu xanh khác nhau góp phần định hướng cho việc chọn các giống đậu xanh chịu hạn có hiệu quả, chúng tôi tiến hành nghiên cứu, đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các giống đậu xanh ở giai đoạn cây non (xuất hiện 3 lá thật) theo các chỉ tiêu: tỉ lệ cây không héo, tỉ lệ cây phục hồi sau 3, 5, 7, 9, 11 ngày thí nghiệm, từ đó xác định chỉ số chịu hạn tương đối của các giống đậu xanh, kết quả nhận được ở bảng 3.

Chỉ số chịu hạn tương đối được tính theo công thức:

$$S_n = 1/2 \sin\alpha (a_n b_n + b_n c_n + c_n d_n + d_n e_n + e_n g_n + g_n h_n + h_n i_n + i_n k_n + k_n l_n + l_n m_n)$$

Trong đó: S<sub>n</sub>: chỉ số chịu hạn tương đối; n: ký hiệu các giống nghiên cứu. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: a. % cây không héo sau 3 ngày hạn; b. % cây phục hồi sau 3 ngày hạn; c. % cây không héo sau 5 ngày hạn; d. % cây phục hồi sau 5 ngày hạn; g. % cây không héo sau 7 ngày hạn; h. % cây phục hồi sau 7 ngày hạn; i. % cây không héo sau 9 ngày hạn; k. % cây phục hồi sau 9 ngày hạn; l. % cây không héo sau 11 ngày hạn; m. % cây phục hồi sau 11 ngày hạn.

Bảng 3

**Đánh giá khả năng chịu hạn của 7 giống đậu xanh nghiên cứu**

Giống	DX208	Đỗ Quế	DX14	DX04	V123	T135	PaEC3
Chỉ số chịu hạn tương đối	11640	4740	5750	11220	6340	8810	4610

Bảng 3 cho thấy, giống DX208 là giống chịu hạn tốt nhất có chỉ số chịu hạn là 11640, còn giống PaEC3 chịu hạn kém nhất với chỉ số chịu hạn là 4610. Chỉ số chịu hạn giảm dần ở các

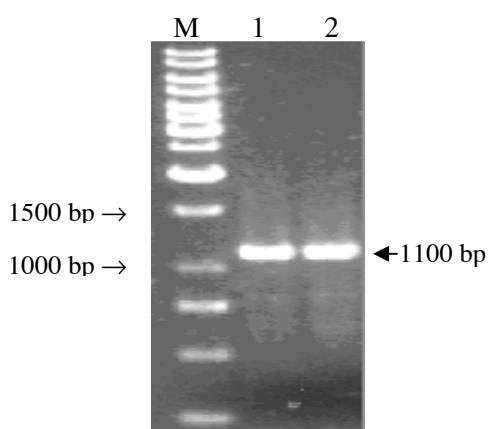
giống như sau: DX208 > DX04 > T135 > V123 > DX14 > Đỗ Quế > PaEC3.

Từ kết quả đánh giá khả năng chịu hạn ở trên, chúng tôi lựa chọn giống DX208 (có chỉ số

chịu hạn lớn nhất) và PaEC3 (có chỉ số chịu hạn nhỏ nhất) để tiếp tục nghiên cứu phân lập gen cystatin.

## 2. Kết quả nhân bản gen cystatin của hai giống đậu xanh DX208 và PaEC3 bằng kỹ thuật PCR

Đoạn gen cystatin của 2 giống đậu xanh (DX208 và PaEC3) được nhân lên bằng phương pháp PCR, kết quả nhân gen được kiểm tra bằng phương pháp 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 1100 bp.



**Hình 1.** Kết quả PCR nhân gen cystatin của 2 giống đậu xanh

Ghi chú: M. Chỉ thị phân tử 1kb;  
1. DX208; 2. PaEC3.

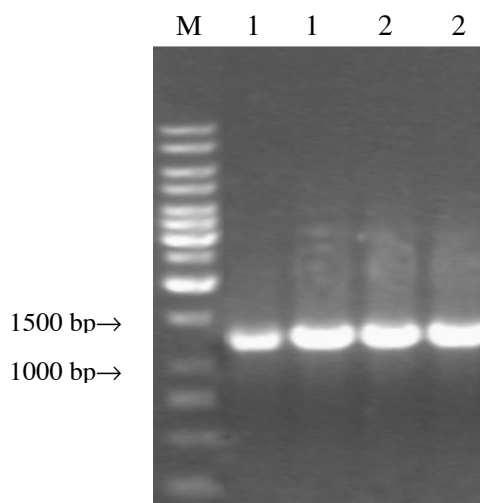
## 3. Kết quả tách dòng gen cystatin

Để xác định được trình tự gen cystatin, chúng tôi tiến hành tách dòng gen cystatin. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách gắn sản phẩm PCR đã tinh sạch vào vectơ tách dòng pTZ57R/T, biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và cấy trên đĩa Petri có môi trường LB đặc bổ sung ampicillin 100 mg/ml, X-gal 40 mg/ml và IPTG 100  $\mu$ M. Ở các đĩa petri đã cấy trải ở 37°C trong 16 giờ, kết quả thu được cả khuẩn lạc xanh và trắng (hình 2). 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 clony 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 dòng hoá thì kích thước của các đoạn gen vừa nhân lên sẽ cao hơn khoảng 200 nucleotit so với nhân bằng cặp môi đặc hiệu. Sản phẩm colony PCR được điện di kiểm tra trên gel agarosa 1% (hình 3).



**Hình 2.** Hình ảnh khuẩn lạc

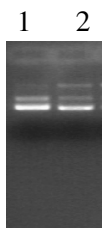


**Hình 3.** Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR trên gel agarosa

Ghi chú: M. Chỉ thị phân tử 1kb;  
1. DX208; 2. PaEC3.

Từ 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. Tiến hành chọn khuẩn lạc trắng tương ứng với 2 mẫu nghiên cứu có sản phẩm colony PCR ở trên 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 4.



**Hình 4.** Kết quả điện di tách plasmid  
*Ghi chú:* 1. Plasmid mang gen cystatin của giống DX208; 2. Plasmid mang gen cystatin của giống PaEC3.

Kết quả điện di trên hình 4 cho thấy, sản phẩm tách plasmid sạch, đảm bảo chất lượng và số lượng để tiến hành xác trình tự nucleotit của gen cystatin.

#### 4. Kết quả xác định trình tự nucleotit

Để xác định trình tự nucleotit của gen cystatin đã tách dòng, chúng tôi tiến hành xác định trình tự nucleotit của gen cystatin trên máy đọc tự động ABI PRISM@ 3100 Avant Genetic Analyzer. Kết quả đọc trình tự được đem phân tích, xử lý bằng phần mềm BioEdit. Kết quả thu được thể hiện ở hình 5.

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
<b>PaEC3</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAA CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>DX208</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAA CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
<b>PaEC3</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGGTTT TCTTTTCCT TTCACACACC
<b>DX208</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGGTTT TCTTTTCCT TTCACACACC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
<b>PaEC3</b>	CTTTATTTT TTTCCCTC AAAAAGATTA AAGAAATTG TACCACTCAT
<b>DX208</b>	CTTTATTTT TTTCCCTC AAAAAGATTA AAGAAATTG TACCACTCAT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	160                  170                  180                  190                  200
<b>PaEC3</b>	TATGTTTTC TCTGTATCT ATGCTTCTC AGAAATCCC AAGCTTCTG
<b>DX208</b>	TATGTTTTC TCTGTATCT ATGCTTCTC AGAAATCCC AAGCTTCTG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	210                  220                  230                  240                  250
<b>PaEC3</b>	TTGGTTTCCT ATTGGGCTG ATCGTTGATC GGTTCGGCC ACGCCAAGAT
<b>DX208</b>	TTGGTTTCCT ATTGGGCTG ATCGTTGATC GGTTCGGCC ACGCCAAGAT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	260                  270                  280                  290                  300
<b>PaEC3</b>	TTCTTCAGAG ATTCACATG TTGATTATAT TATCTCTTT GTTTGATTAA
<b>DX208</b>	TTCTTCAGAG ATTCACATG TTGATTATAT TATCTCTTT GTTTGATTAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	310                  320                  330                  340                  350
<b>PaEC3</b>	CAATAATTGT TAACTTTTAG ATTTTCTTC TGGGGATAAT GGGGTCTTC
<b>DX208</b>	CAATAATTGT TAACTTTTAG ATTTTCTTC TGGGGATAAT GGGGTCTTC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	360                  370                  380                  390                  400
<b>PaEC3</b>	TGTTGTTGGA TTGATTTTGT TCTGAGGTAG AGTTTCTAA GAAGAGAATG
<b>DX208</b>	TGTTGTTGGA TTGATTTTGT TCTGAGGTAG AGTTTCTAA GAAGAGAATG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	410                  420                  430                  440                  450
<b>PaEC3</b>	TTAAAGATAA TTTTGTGAAT ATACTGTGTT ATTAGCTTAA ATTTATTGTA
<b>DX208</b>	TTAAAGATAA TTTTGTGAAT ATACTGTGTT ATTAGCTTAA ATTTATTGTA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	460                  470                  480                  490                  500
<b>PaEC3</b>	AATTGCTAAA TTTTCTAAGT TTTGTTTCTT ATATATAGTA TCAGACATGA
<b>DX208</b>	AATTGCTAAA TTTTCTAAGT TTTGTTTCTT ATATATAGTA TCAGACATGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	510                  520                  530                  540                  550
<b>PaEC3</b>	TTTTAATAAC TTCCAAAATA GTTCAATCAT TAATGGAGAG TAACCTAGAA
<b>DX208</b>	TTTTAATAAC TTCCAAAATA GTTCAATCAT TAATGGAGAG TAACCTAGAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	560                  570                  580                  590                  600
<b>PaEC3</b>	GGAAAATATT TCAGAGTGTG TAGGCAGATC TATTTGGAAA AATAAGCCAA
<b>DX208</b>	GGAAAATATT TCAGAGTGTG TAGGCAGATC TATTTGGAAA AATAAGCCAA

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650
PaEC3  TATTTGCCTA ACAAAGTATC TTCTACCGAA CATGCACTTT GCCTCAGTGT
DX208  TATTTGCCTA ACAAAGTATC TTCTACCGAA CATGCACTTT GCCTCAGTGT
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      660      670      680      690      700
PaEC3  GGTATGGTGC AAAGCGGGTG AGAGAGAGCA AAAAGTTATG ATGCAAATAT
DX208  GGTATGGTGC AAAGCGGGTG AGAGAGAGCA AAAAGTTATG ATGCAAATAT
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      710      720      730      740      750
PaEC3  TTGTCGTTTG AAGCTTGTGG AAGCCCATAA TCCATTATCA GAAGCCAGAA
DX208  TTGTCATTG AAGCTTGTGG AAGCCCATAA TCCATTATCA GAAGCCAGAA
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      760      770      780      790      800
PaEC3  TTGATTATTG ATTGTTAGGA TAAATCTGTC ATTTATCGTA TGTCAAATGAA
DX208  TTGATTATTG ATTGTTAGGA TAAATCTGTC ATTTATCGTA TGTCAAATGAA
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810      820      830      840      850
PaEC3  TAAATGGTTT TGTGGCGTGA ATTTTAACAA CAAAGTTTGT CGTTTTTTTTC
DX208  TAAATGGTTT TGTGGCGTGA ATTTTAACAA CAAAGTTTGT CGTTTTTTTTC
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      860      870      880      890      900
PaEC3  TTTGTAGTAA TAGAAATGCA AACTGGTGTC TATTTTTATT TTGTTTTTAT
DX208  TTTGTAGTAA TAGAAATGCA AACTGGTGTC TATTTTTATT TTGTTTTTAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950
PaEC3  TGATTGGTGA TGGCTATATA CAGAACGCC TTCTGGAGTT TGGAAGGGTG
DX208  TGATTGGTGA TGGCTATATA CAGAACGCC TTCTGGAGTT TGGAAGGGTG
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      960      970      980      990      1000
PaEC3  GTAAGTGCAC AACAGCAAGT GGTTCCTGGT ACCTTGATCA CCATCACTTT
DX208  GTAAGTGCAC AACAGCAAGT GGTTCCTGGT ACCTTGATCA CCATCACTTT
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1010     1020     1030     1040     1050
PaEC3  GGAGGCAAAA GATGGTGGG AAAAGAAGGT TTATGAAGCC AAAGTCTGGG
DX208  GGAGGCAAAA GATGGTGGG AAAAGAAGGT TTATGAAGCC AAAGTCTGGG
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1060     1070     1080     1090     1100
PaEC3  AGAAGCCATG GTTGAACTTC AAGGAGCTGC AAGAGTTCAA ACTTGTGGGA
DX208  AGAAGCCATG GTTGAACTTC AAGGAGCTGC AAGAGTTCAA ACTTGTGGGA
      .....|.....|.....|
      1110
PaEC3  GAGGCACCTG CATAG
DX208  GAGGCACCTG CATAG

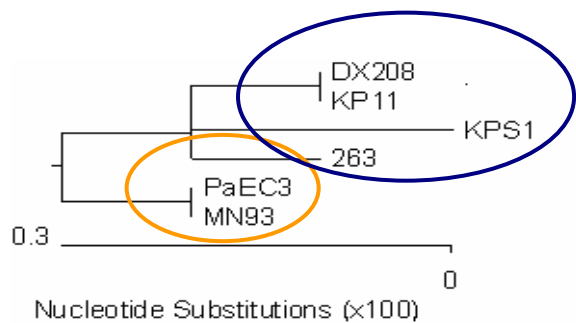
```

**Hình 5.** Trình tự nucleotit của gen cystatin ở 2 giống đậu xanh nghiên cứu

Kết quả cho thấy, chiều dài gen cystatin ở 2 mẫu nghiên cứu đều có kích thước 1115 nucleotit. Khi so sánh 2 trình tự này trong BLAST của NCBI, kết quả cho biết đây là các trình tự gen mã hoá cystatin của đậu xanh. Chúng tôi kết luận đã nhân, tách dòng và đọc trình tự thành công đoạn gen mã hoá cystatin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu.

Hai giống nghiên cứu chỉ khác nhau về trình tự nucleotit ở 3 vị trí là: 287; 561; 706. Do vậy, trình tự gen cystatin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu có độ tương đồng cao (99,7%).

Dựa trên số liệu về trình tự nucleotit của gen cystatin ở 2 giống đậu xanh nghiên cứu,



**Hình 6.** Biểu đồ hình cây so sánh mức tương đồng gen cystatin của 6 giống đậu xanh chúng tôi tiến hành so sánh trình tự nucleotit của 2 giống đậu xanh này với 4 giống đậu xanh

KP11, KPS1, 263, MN93 [12]. Sau đó, lập biểu đồ hình cây để tìm hiểu mối quan hệ về gen cystatin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu với các giống đậu xanh đã phân lập trước đó. Kết quả trên hình 6 cho thấy, sáu giống đậu xanh được chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm bốn giống DX08, KP11, KPS1 và 263; nhóm 2 gồm hai giống MN93 và PaEC3.

Giống DX208 ở nhóm 1 chịu hạn tốt, giống PaEC3 ở nhóm 2 chịu hạn kém. So sánh trình tự nucleotit của 6 giống đậu xanh cho thấy, tỷ lệ % tương đồng về trình tự nucleotit rất cao (dao động từ 99,6% đến 100%), trong đó có hai giống DX208 và KP11 tương đồng 100%, giống PaEC3 cũng tương đồng 100% với MN93 (bảng 4).

Bảng 4

So sánh trình tự nucleotit của gen cystatin ở 6 giống đậu xanh

Hệ số khác nhau	Hệ số giống nhau								
		1	2	3	4	5	6		
1			99,7	99,7	99,7	99,6	100,0	1	PaEC3.seq
2	0,3			99,8	99,8	99,7	99,7	2	263.seq
3	0,3	0,2			100,0	99,7	99,7	3	DX208.seq
4	0,3	0,2	0,0			99,7	99,7	4	KP11.seq
5	0,4	0,3	0,3	0,3			99,6	5	KPS1.seq
6	0,0	0,3	0,3	0,3	0,4			6	MN93.seq
		1	2	3	4	5	6		

### 5. So sánh trình tự nucleotit đoạn mã hoá

Đoạn mã hóa của gen cystatin ở 2 giống đậu xanh nghiên cứu gồm 2 exon: exon 1 từ vị trí số 1 đến vị trí 74 của gen, exon 2 từ vị trí 923 đến 1115. Phân tích trình tự nucleotit của đoạn mã hoá axit amin của 2 mẫu nghiên cứu

với mẫu trên Ngân hàng gen có mã số AF454396 và 4 mẫu đậu xanh KP11, KPS1, 263, MN93 cho thấy đoạn mã hoá đều dài 267 nucleotit. Trình tự nucleotit của đoạn mã hoá axit amin của gen cystatin ở 7 mẫu ở trên có độ tương đồng rất cao (100%).

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
<b>DX208</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>PaEC3</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>AF454396</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>KP11</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>MN93</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>263</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
<b>KPS1</b>	ATGTCGCAGG AACTAGAAAAG CGTTGAGATC GATAGTTTAG CTCGATTTGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
<b>DX208</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>PaEC3</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>AF454396</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>KP11</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>MN93</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>263</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
<b>KPS1</b>	TGTTGAAGAA CACAACAAA AACAGAACGC CCTTCTGGAG TTTGGAAGGG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
<b>DX208</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>PaEC3</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>AF454396</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>KP11</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>MN93</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>263</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT
<b>KPS1</b>	TGGTAAGTGC ACAACAGCAA GTGGTTTCTG GTACCTTGTA CACCATCACT

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160      170      180      190      200
DX208   TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
PaEC3   TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
AF454396 TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
KP11    TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
MN93    TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
263     TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
KPS1    TTGGAGGCAA AAGATGGTGG GCAAAAAGAAG GTTTATGAAG CCAAAGTCTG
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210      220      230      240      250
DX208   GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
PaEC3   GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
AF454396 GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
KP11    GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
MN93    GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
263     GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
KPS1    GGAGAAGCCA TGGTTGAACT TCAAGGAGCT GCAAGAGTTC AAACCTGTTG
      ....|....| ....|...
      260
DX208   GAGAGGCACC TGCATAG
PaEC3   GAGAGGCACC TGCATAG
AF454396 GAGAGGCACC TGCATAG
KP11    GAGAGGCACC TGCATAG
MN93    GAGAGGCACC TGCATAG
263     GAGAGGCACC TGCATAG
KPS1    GAGAGGCACC TGCATAG

```

**Hình 7.** So sánh trình tự vùng mã hóa của gen cystatin ở 7 giống đậu xanh

Do trình tự nucleotit ở vùng mã hóa giống nhau 100% nên trình tự axit amin của 7 giống đậu xanh so sánh ở trên cũng giống nhau 100%. Chiều dài protein cystatin của các giống đậu

xanh so sánh ở trên là 88 axit amin. Vì vậy, chúng tôi chưa tìm thấy có sự khác biệt về trình tự axit amin của hai giống DX208 (chịu hạn tốt) và PaEC3 (chịu hạn kém).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
DX208   MSQELESVEI DSLARFAVEE HNKKQNALLE FGRVVSAAQQQ VVSGTLYTIT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80
DX208   LEAKDGGQKK VYEAKVWEKP WLNFKELQEF KLVGEAPA

```

**Hình 8.** Trình tự axit amin của giống đậu xanh DX208

Các kết quả thu được ở trên cho thấy, chưa thấy có mối liên quan giữa tính trạng chịu hạn với trình tự nucleotit của gen cystatin. Tuy nhiên, cần mở rộng nghiên cứu trên nhiều giống đậu xanh khác để khẳng định kết quả này. Vì vậy, cần nghiên cứu promotor và trình tự nucleotit của gen này trong điều kiện hạn để có thể xác định được chỉ thị phân tử liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu xanh.

### III. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhân được gen cystatin bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu khai thác tại Ngân hàng gen quốc tế. Sản phẩm PCR được dòng

hoá nhờ vectơ pTZ57R/T. Kết quả gen cystatin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu dài 1115 nucleotit, gồm 2 exon và 1 intron. Đoạn mã hóa dài 267 nucleotit và mã hóa sản phẩm protein dài 88 axit amin. So sánh trình tự đoạn mã hoá và axit amin của 2 giống đậu xanh nghiên cứu với giống đậu xanh có mã số AF454396 trên Ngân hàng gen quốc tế và 4 giống đậu xanh KP11, KPS1, 263, MN93, kết quả cho thấy trình tự gen cystatin thu được có độ tương đồng rất cao (giống nhau 100%).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **AF454396:** [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
2. **Lê Trần Bình, Lê Thị Muội,** 1998: Phân

- lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa, Nxb. Đại học quốc gia Hà Nội.
3. **Diop N. N. et al.**, 2004: FEBS Lett., 577(3): 545-50.
  4. **Filho J. X.**, 1992: R. Bras. Fisiol. Veg., 4(1): 1-6.
  5. **Gawel N. J., Jarret R. L.**, 1991: Genomic DNA isolation. Http: //www.igd.cornell.edu/pretoria lab manual.doc.
  6. **Trần Đình Long, Lê Khả Tường**, 1998: Cây đậu xanh, Nxb. Nông Nghiệp, Hà Nội.
  7. **Misaka T. et al.**, 1996: European Journal of Biochemistry, 240(3): 609.
  8. **Oliveira A. S. et al.**, 2003: Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(1): 91-104.
  9. **Ojima A. et al.**, 1997: Plant Molecular Biology, 34(1): 99-109.
  10. **Pernas M. et al.**, 2000: FEBS Lett., 467(2-3): 206-210.
  11. **Ryan S. N. et al.**, 2003: Biochem., 134(1): 31-42.
  12. **Nguyễn Vũ Thanh Thanh**, 2008: Nghiên cứu tính đa dạng di truyền và phân lập một số gen liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), Luận án tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Hà Nội.
  13. **Turk V., Bode W.**, 1991: FEBS Lett., 285(2): 213-219.

## COMPARISON OF GENE ENCODING CYSTATIN OF MUNGBEAN CULTIVARS (*VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK)

CHU HOANG MAU, NGUYEN VU THANH THANH,  
NGUYEN THI THU TRANG

### SUMMARY

Mungbean *Vigna radiata* (L) Wilczek is a grain legume widely grown in the world. Stresses such as hot, cold, drought and disease limit the mungbean yield. In addition, mungbean is low drought tolerance.

Cystatins are protein inhibitors of cystein proteases belonging to papain family. In plants, cystatins are found to be involved in drought stress. These were isolated from *Vigna unguiculata* L., *Glycine max* L., *Daucus carota* L., *Malus domestica*. This paper reports our finding about the genes encoding cystatins isolated and assessment of drought tolerant ability from mungbean cultivars (*Vigna radiata* L. Wilczek) with different level of drought tolerance. Genomic DNA from two mungbean cultivars, including one with high drought tolerance (Dx208) and one with drought sensitiveness (PaEC3) are subjected for gene cloning using cystatin specific primers. Sequencing data of the two cloned cystatin gene fragments proved to be that of cystatin gene with a length of 1115 nucleotides, deviding into 2 exons and 1 intron. The PRF of coding regions of cystatin gene comprises of 267 nucleotides with encoding a polypeptide of 88 amino acids. The nucleotide sequences of the two cultivars show variations in different sites although the amino acid sequences do not differ each to other and even to that announced under the code AF454396.

**Keywords:** cystatin gene, drought stress, mungbean, *Vigna radiata*.

Ngày nhận bài: 2-7-2008