

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG CỦA GIEN CHAPERONIN CCT8 Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, LÊ THỊ THU HIỀN
NGUYỄN ĐĂNG TÔN, CAO XUÂN HIẾU
NÔNG VĂN HẢI, LÊ THỊ MUỘI

Viện Công nghệ sinh học

TRẦN ĐÌNH LONG

Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam

Chaperonin, còn gọi là chất môi giới phân tử (molecular chaperone) là một nhóm protein có phân tử lượng mỗi tiểu đơn vị khoảng 60 kDa và có hoạt tính ATPaza. Chúng tham gia vào quá trình tạo cấu trúc không gian đúng của các protein mới tổng hợp hoặc bị biến tính [1]. Chaperonin có 2 nhóm chính. Nhóm thứ nhất được tìm thấy trong các tế bào vi khuẩn và các bào quan của các sinh vật nhân thực (eukaryote); đại diện của nhóm này là GroEL. Chúng có cấu tạo từ 2 vòng bi bao gồm 7 tiểu đơn vị giống nhau, tạo thành cấu trúc hình trụ. Nhóm thứ hai được tìm thấy trong tế bào chất của các sinh vật nhân thực và vi khuẩn cổ *Archaea*. Đây còn gọi là nhóm CCT/Tric. Cấu trúc của chúng có cấu tạo dạng 2 vòng bi và bao gồm 8 tiểu đơn vị khác nhau: α , β , γ , δ , ϵ , η , θ , ζ . Mỗi tiểu đơn vị đều có vị trí duy nhất trong vòng bi và có những vùng cấu trúc axit amin (aa) khác so với các tiểu đơn vị còn lại. Ngoài ra, trong cấu trúc của mỗi tiểu đơn vị của các loài, từ vi khuẩn cổ đến chuột, đều có những vùng bảo thủ và các vùng mang tính đa dạng khác nhau [2].

Trước đây, chúng tôi đã phân lập gen CCT8 của giống đậu tương đột biến chịu nóng M103. Trong phức CCT, do tiểu đơn vị CCT8 có vị trí gắn với cơ chất nên được đặc biệt quan tâm nghiên cứu. So với tiểu đơn vị này ở giống đậu tương Bominori của Nhật Bản, chúng tôi đã phát hiện thấy một số điểm khác nhau có thể có liên quan đến khả năng chịu nóng của giống M103 [3].

Trong bài này, chúng tôi tiến hành phân lập tiếp CCT8 từ giống đậu tương địa phương chịu

hạn Cúc vàng (CV) và so sánh các trình tự mà chúng tôi đã xác định được với các trình tự CCT8 từ các giống đậu tương trên thế giới và các loài khác nhằm tìm ra quy luật bảo thủ và biến đổi của cấu trúc trong tiểu đơn vị này.

Công trình được tiến hành tại Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Mầm 2 ngày tuổi của giống đậu tương CV được sử dụng để nghiên cứu. Giống đậu tương CV (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, CV rón đen) là giống đậu tương địa phương có nguồn gốc từ huyện Lục Ngạn, tỉnh Bắc Giang. Đặc điểm chính của giống là hạt nhỏ, thời gian sinh trưởng ngắn và có khả năng chịu hạn. Giống do Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ, Viện KHKT nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Các plasmid pUC18, pCR™ 2.1, các chủng *E. coli* INV α 7, DH-5 α do tiến sĩ Fukazawa, trưởng phòng Công nghệ gen, Viện Nghiên cứu Lương thực quốc gia Nhật Bản, hỗ trợ.

Các trình tự CCT8 của các giống đậu tương và các loài nhân thực trên thế giới được truy cập qua Internet trong các Ngân hàng trình tự gen EMBL, GENBANK, DDBJ.

2. Phương pháp phân lập gen *chaperonin* CCT8 từ giống đậu tương CV

ADN tổng số được tách chiết từ mầm đậu tương theo phương pháp sử dụng proteaza K và SDS; PCR để nhân gen *chaperonin* được thực

hiện như đã mô tả trong công bố của Trần Thị Phương Liên và cs. [3].

Tạo dòng phân tử ADN: Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào pCR™ 2.1 (bộ KIT của hãng Invitrogen). Sau đó plasmit tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *E. coli* INVF'α. Tách chiết ADN plasmit và các kỹ thuật ADN tái tổ hợp được tiến hành theo Sambrook và Russell [4].

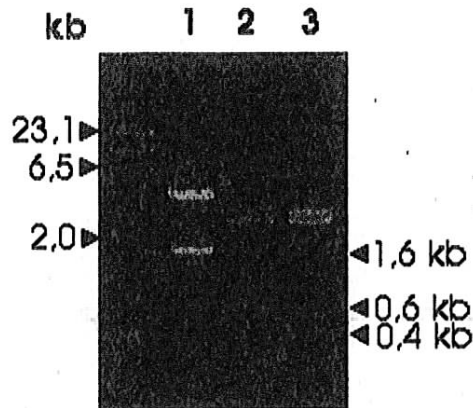
Trình tự ADN được xác định theo phương pháp của Sanger trên máy xác định trình tự ADN tự động (Pharmacia ALF express automated sequencer). Các kết quả đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm P/C GENE. Các trình tự ADN được xử lý và phân tích theo chương trình Clustal

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập gen *chaperonin* từ giống đậu tương địa phương CV

ADN tổng số của giống đậu tương CV được tách chiết, tinh sạch và sử dụng làm khuôn mẫu cho PCR với cặp mồi ChapN và ChapC để phát hiện gen *chaperonin* CCTδ. Sản phẩm PCR của giống đậu tương CV rất đặc hiệu, có kích thước phân tử (KTPT) tương tự như kích thước cDNA của gen này (1,6 kb) cũng như kích thước của các sản phẩm PCR ở các giống đậu tương khác [3]. Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào plasmit pCR™ 2.1 và biến nạp vào *E. coli*. Chúng tôi đã chọn được dòng pCha5 có mang đoạn ADN với KTPT tương ứng với sản phẩm PCR. Để xác định được trình tự của toàn bộ đoạn ADN có KTPT 1,6 kb này, sản phẩm PCR tiếp tục được xử lý bằng enzym hạn chế *SacI*, các đoạn cắt được gắn vào plasmit pUC18 và biến nạp vào *E. coli*. Chúng tôi đã chọn được các dòng pUC1₃, pUC3₁, pUC10₁ có đoạn gắn với KTPT tương ứng khoảng 0,4 kb, 0,6 kb và 0,6 kb (hình 1). Trình tự ADN từ hai đầu của các đoạn gắn trong các dòng pCha5, pUC1₃, pUC3₁, pUC10₁ đã được tiến hành xác định theo sơ đồ trên hình 2. Kết quả đọc trình tự được xử lý qua phần mềm P/C GENE: Trình tự của đoạn gen *chaperonin* CCTδ của giống CV dài 1602 bp, mã hóa cho 533 aa theo lý thuyết. Trình tự protein CCTδ của giống CV được tiến hành phân tích so sánh với trình tự này của giống đậu tương đột biến chịu nóng M103 [3], giống

Bominori-Nhật Bản [5] và các giống đậu tương khác trên thế giới cũng như các loài nhân thực đã công bố trên các Ngân hàng trình tự gen quốc tế.



Hình 1. Điện di các plasmit mang đoạn gen *chaperonin* của giống CV. Plasmit pCha5 có gắn sản phẩm PCR của giống CV 1,6 kb [1], plasmit pUC18 có gắn các đoạn cắt của sản phẩm PCR (2- pUC10₁ với đoạn gắn 0,6 kb; 3- pUC1₃ với đoạn gắn 0,4 kb) được xử lý *EcoRI* và *BamHI*

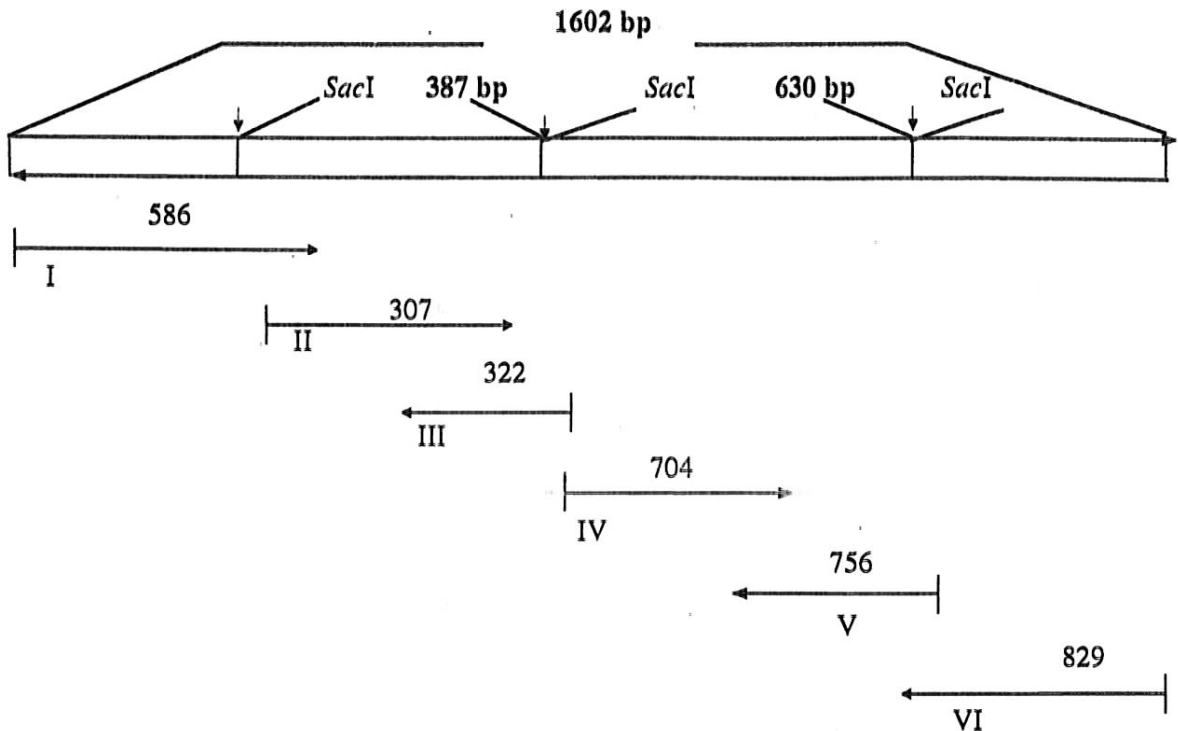
2. So sánh mức độ đồng nhất của gen CCTδ

a) So sánh trình tự của gen CCTδ giữa các giống đậu tương CV, Bominori và M103

Gen CCTδ của giống đậu tương CV dài 1602 bp mã hóa cho 533 aa. So với giống đậu tương Bominori của Nhật Bản, CCTδ của giống CV có tỷ lệ đồng nhất là 97,86% (với 49 vị trí nucleotit khác biệt và 12 vị trí aa thay đổi). Còn so với giống đậu tương chịu nóng M103, CCTδ của giống CV có 38 vị trí nucleotit và 11 vị trí aa thay đổi, với tỷ lệ đồng nhất 98,50%. Vị trí của các aa thay đổi ở 3 giống đậu tương trên được trình bày trong bảng 1.

Nghiên cứu về cấu trúc phân tử protein thích ứng với sự biến đổi nhiệt độ cực đoan, Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử châu Âu đã tìm ra quy luật biến đổi các aa trong các enzym từ "lạnh" sang "nóng": Gly-> Ala; Ser-> Ala; Ser-> Thr; Ser-> Gly Lys-> Arg; và từ "nóng" sang "lạnh":

Gen CCT8 của giống đậu tương địa phương chịu hạn CV



Hình 2. Sơ đồ đọc trình tự của các plasmit mang đoạn gen chaperonin pCha5 (~1,6 kb), pUC1₃ (~0,4 kb), pUC3₁ (~0,6 kb); pUC10₁ (~0,6 kb)

Bảng 1
Các axit amin thay đổi ở các giống đậu tương Bominori, CV và M103

STT	Vị trí	Bominori	CV	M103
1	24	Glu (E)	Asp (D)	Asp (D)
2	54	Ile (I)	Thr (T)	Ile (I)
3	76	Val (V)	Gly (G)	Val (V)
4	99	Ser (S)	Thr (T)	Thr (T)
5	100	Thr (T)	Thr (T)	Ile (I)
6	110	His (H)	Leu (L)	His (H)
7	128	Glu (E)	Asp (D)	Asp (D)
8	129	Pro (P)	Ala (A)	Gly (G)
9	204	Val (V)	Leu (L)	Val (V)
10	220	Leu (L)	Pro (P)	Leu (L)
11	280	Ser (S)	Gly (G)	Gly (G)
12	307	Ser (S)	Ser (S)	Ala (A)
13	360	Phe (F)	Val (V)	Phe (F)
14	506	Leu (L)	Leu (L)	Pro (P)
15	514	Thr (T)	Met (M)	Thr (T)

Arg → Lys; Glu → Ala [6]. Kết quả so sánh 3 trình tự cho thấy sự thay đổi aa ở 3 vị trí phù hợp với quy luật đó: ở giống chịu lạnh Bominori có Ser⁹⁹, cũng ở vị trí này ở giống đột biến chịu nóng M103 và giống chịu hạn CV được thay bằng Thr. Tương tự như vậy, ở vị trí 280, Ser ở giống Bominori được thay bằng Gly 280 ở giống M103 và giống CV. Còn ở vị trí 307, Ser ở giống Bominori và giống CV được thay bằng Ala ở giống M103. Sự trùng hợp với quy luật biến đổi của các enzym chịu nóng-lạnh có thể là một bằng chứng lý giải cho khả năng chịu nóng của giống M103 cũng như giống địa phương CV. Đồng thời, đây cũng là cơ sở dự đoán mức độ chịu nóng giảm dần từ M103 → CV → Bominori.

b) So sánh trình tự gen CCT8 giữa các giống đậu tương

Trong Ngân hàng trình tự gen quốc tế có công bố 8 đoạn trình tự gen CCT8 từ các mô khác nhau của các giống đậu tương ở Mỹ với số đăng ký trình tự là AW755712, AW234445,

BE210522, BI361934, BG 316074, BM 086211, BM086023 và AW185981. Những đoạn này được phân lập từ ngân hàng cDNA của đậu tương. Chúng bao gồm các đoạn đầu, đoạn giữa và phần lớn là các đoạn cuối của gen. So với giống đậu tương Bominori của Nhật Bản (AB 004233, AB 003589), chúng có độ đồng nhất rất cao, từ 92,04% đến 98,50%. Mức độ sai khác lớn nhất ở trình tự BG316074

c) So sánh gen CCTδ giữa các loài khác nhau

So đậu tương với các loài sinh vật nhân thực khác, độ đồng nhất của gen CCTδ cũng có những dao động đáng kể (hình 3). Riêng trình tự aa suy diễn của các gen này đã có độ dài trong khoảng 528 đến 541 aa. Các gen CCTδ ở thực vật như đậu tương, lúa, *Arabidopsis* đều không có intron, trong khi đó, ở động vật như chuột, cá đều có nhiều đoạn intron dài. So với giống Bominori Nhật Bản, CCTδ của các loài có độ tương đồng khác nhau. Trong cùng một loài đậu tương, độ tương đồng gen CCTδ rất cao : trên 92%. Trong các loài thực vật, độ tương đồng vẫn còn đáng kể: *Arabidopsis*: 88,74% (AB02049); lúa: 76,36% (AC068924); cây bông: 93,08% (AI730591); khoai tây: 75,81% (BG098161), xương rồng: 86,26% (BG459105). Nhưng so giữa các loài thực vật và động vật, độ tương đồng chỉ còn khoảng 60%: cá: 64,71% (D49484), chuột: 63,60% (AB022157). Và nếu so với loài sinh vật nhân thực đơn giản nhất là nấm men thì chỉ số này chỉ còn 58,67% (NC001147).

Để nghiên cứu sâu hơn về tính bảo thủ – tính đa dạng của trình tự này ở các loài khác nhau, cũng như các giống khác nhau trong một loài, chúng tôi tiến hành nghiên cứu so sánh các vùng chức năng chính của CCTδ.

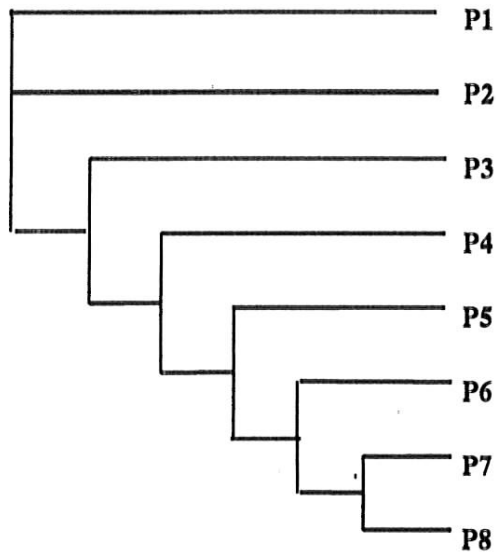
3. So sánh cấu trúc của các vùng chức năng

Trong cấu trúc phân tử của CCTδ có ba vùng chức năng quan trọng nhất [2, 9, 10, 11, 12].

- Vùng hoạt tính ATPaza (ATPase- activity). Đây là vùng bảo thủ nhất. Trình tự IAGGGAPE (Ile416 đến Glu423 ở đậu tương) không thay đổi từ nấm men cho đến các loài thực vật, động vật khác nhau.

- Vùng gắn với ATP (ATP -binding): Đây là vùng tương đối bảo thủ. Ở nấm men và động vật

(chuột, cá), trình tự này bao gồm 7 aa: GDGTTSV (Gly96 đến Val102 ở đậu tương); còn ở các loài thực vật (*Arabidopsis*, giống đậu tương CV, lúa, khoai tây) có trình tự GDGTTTV. Chúng khác nhau bởi aa thứ 6: ở thực vật - Thr, còn ở động vật, nấm men: - Ser. Trong các giống đậu tương, đoạn trình tự này cũng có những sự thay đổi: ở giống đậu tương chịu nóng M103, vị trí Thr100 thay bằng Ile100 (aa thứ 5); còn ở giống Bominori (Nhật Bản), vị trí Thr 99 được thay bằng Ser (aa thứ 4).



Hình 3. Sự đa dạng của trình tự gen chaperonin tế bào chất CCTδ

P1: giống đậu tương M103; P2: giống đậu tương Bominori; P3: giống đậu tương CV; P4: *Arabidopsis*; P5: lúa; P6: nấm men; P7: chuột; P8: cá

Nghiên cứu về cấu trúc phân tử protein thích ứng với sự biến đổi nhiệt độ cực đoạn, gen CCTδ ở giống chịu lạnh Bominori có aa số 99 là Ser, cũng ở vị trí này giống đột biến chịu nóng M103 và giống chịu hạn CV được thay bằng Thr. So với sự biến đổi ở các vị trí khác, điều trùng hợp với quy luật biến đổi của các enzym chịu nóng-lạnh tại chính vị trí gắn với ATP này chắc chắn có ý nghĩa quan trọng đặc biệt.

- Vùng gắn cơ chất với phức CCT tại vị trí đỉnh của CCTδ. Vùng này bao gồm khoảng 50-55 aa (trong vùng Glu209 đến Leu306 ở đậu

tương). Đây là vùng đa dạng nhất so với các vùng chức năng khác của CCTĐ giữa các loài khác nhau, không những chỉ ở các sinh vật nhân thực, mà còn ở các loài vi khuẩn cổ không có ty thể [2].

Cơ chất chủ yếu của chaperonin tế bào chất là các protein tạo khung tế bào: tubulin và actin [7, 8, 9, 10]. Chúng rất đa dạng và đều được mã hóa bằng các họ gen trong các sinh vật nhân thực. Chúng thường có độ đa dạng cao ở vùng aa gần hai đầu cuối N, C. Sự đa dạng này là kết quả của quá trình tiến hóa: sự phân hóa thành nhiều loại mô cơ thể, sự điều khiển linh hoạt trong tế bào và không loại trừ các sự cố sao chép nhân đôi sai lệch trong cơ thể. Sự cùng tiến hóa enzym và cơ chất cũng đã được nhiều tác giả quan tâm đến (2). Đây là một giả thiết giải thích cho sự đa dạng của vùng gần cơ chất của CCTĐ đảm bảo cho sự gắn kết tương ứng giữa enzym và cơ chất trong sự tiến hóa chung.

Những phát minh mới nhất trong nghiên cứu cấu trúc không gian ba chiều của protein [9, 10, 12] cho thấy tầm quan trọng đặc biệt của việc tạo cấu trúc không gian đúng cho các protein mới được tổng hợp cũng như tái tạo lại cấu trúc của các protein bị biến tính, đảm bảo cho protein thực hiện hoàn hảo chức năng sinh học của mình. Vai trò trung tâm của quá trình này chính là các chất môi giới phân tử - chaperonin. Trong các giống nhiệt đới chịu nóng hạn, việc phát hiện ra các vị trí aa thay đổi theo quy luật biến đổi của các enzym chịu nhiệt (nhất là biến đổi ở vùng gần ATP) có thể giả thiết cho sự tiến hóa phù hợp với vùng địa hình khí hậu này. Tuy vậy, để khẳng định điều này, cần nghiên cứu sâu hơn về sự biểu hiện của những protein kể trên, cấu trúc không gian của chúng và sự tương tác của chúng với cơ chất.

III. KẾT LUẬN

Trên cơ sở nghiên cứu phân lập và so sánh gen CCTĐ ở đậu tương nói riêng và các loài khác nói chung, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

1. Đã phân lập được gen *chaperonin* tế bào chất CCTĐ từ giống đậu tương địa phương chịu hạn CV. Gen này bao gồm 1602 nucleotit, mã

hóa cho 533 aa. So với gen này ở giống đậu tương chịu lạnh Bominori và giống đậu tương đột biến chịu nóng M103, chúng có độ đồng nhất trên 97%. Đã phát hiện thấy 15 vị trí aa thay đổi, trong đó có 3 vị trí Ser99 → Thr, Ser280 → Gly, Ser307 → Ala theo quy luật biến đổi của các enzym chịu nhiệt.

2. So sánh 13 trình tự CCTĐ ở các mô tế bào và các giống đậu tương khác nhau cho thấy độ đồng nhất rất lớn - trên 92%. Độ đồng nhất của gen này ở các loài khác nhau, từ nấm men đến thực vật, trong khoảng từ 58,67% đến 98,50%.

3. Nghiên cứu so sánh các vùng chức năng của gen CCTĐ cho thấy vùng có hoạt tính ATPaza là bảo thủ nhất. Vùng gần với ATP có độ đồng nhất ít bảo thủ hơn. Còn vùng gần với cơ chất ở vị trí từ 50 đến 55 aa ở phần đỉnh của phức CCT là ở vị trí đa dạng nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boston R. S. et al., 1996: Plant Mol. Biol., 32: 191-222.
2. Archibald J. M. et al., 2000: Mol. Biol. Evol., 17(10): 1456-1466.
3. Trần Thị Phương Liên và cs., 1998: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 36(5): 8-14.
4. Sambrook J. and Russell D. W., 2000: Molecular cloning, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Van Hai Nong et al., 2002: J. Biochem, 132: 291-300.
6. Argos P. et al., 1979: Biochemistry, 18: 5698-5703.
7. De Castro R. D. et al., 1998: Phytochemistry, 47(5): 689-694.
8. In-Seob Han et al., 1991: Plant Mol. Biol., 16: 225-234.
9. Llorca O. et al., 2001: EMBO J., 20(15): 4065-4075.
10. McCormack E. A. et al., 2001: J. Struct. Biol, 135(2): 198-204.
11. Yoda T. et al., 1995: Gene., 166: 249-253.
12. Yokota S. et al., 2001: Eur. J. Biochem., 268(17): 4664-4673.

STUDY ON DIVERSITY OF THE CCT δ GENE FROM SOYBEAN CULTIVARS

TRAN THI PHUONG LIEN, LE THI THU HIEN, NGUYEN ĐANG TON,
CAO XUAN HIEU, NONG VAN HAI, LE THI MUOI, TRAN ĐINH LONG

SUMMARY

CCT, a chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1), is a cytosolic molecular chaperone, involved in folding of proteins. CCT has a double ring structure with eight distinct subunits per ring (α , β , γ , δ , ϵ , η , θ , ζ). We have cloned the CCT δ gene from the local drought resistant soybean cultivar Cuc Vang. A total of 49 nucleotide positions resulting in 15 amino acid (aa) substitutions were observed as compared to those of the known cDNA and the CCT δ gene of the mutant hot resistant cultivar M103.

The aa sequences of the CCT δ from dozens of soybean cultivars and of eucaryotes (from yeast to mouse) were compared. The homology showed at interval from 58.67% to 100%. The ATPase activity motifs are strongly conserved; the ATP binding motifs are less conserved, but the apical domains, where substrate interacts with chaperonin CCT δ , are diversified in CCT δ among these species.

Ngày nhận bài: 25-6-2002