

NGHIÊN CỨU CÁC TÍNH CHẤT CỦA ENZYM PDH45 MỞ XOẮN ADN CỦA CÂY ĐẬU HÀ LAN (*PISUM SATIVUM* L.)

PHẠM XUÂN HỘI, TRẦN DUY QUÝ

Viện Di truyền nông nghiệp

PHAN TUẤN NGHĨA

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

NARENDRA TUTEJA

Trung tâm Kỹ thuật gen và Công nghệ sinh học Quốc tế

Tất cả sự sống trên hành tinh sử dụng ADN như là nguyên liệu mang thông tin di truyền. ADN helicaza là nhóm enzym xúc tác việc mở xoắn sợi đôi ADN để tạo ra hai sợi đơn ADN bằng việc bẻ gãy các cầu liên kết hydrogen giữa hai sợi đơn, vì vậy chúng có vai trò thiết yếu trong tất cả các hoạt động trao đổi chất ADN như quá trình sao chép, tái tổ hợp, sửa chữa ADN cũng như quá trình phiên mã và dịch mã. Cho đến nay, đã có khoảng 80 gen mã hóa cho ADN helicaza từ các đối tượng như *E. coli*, thực khuẩn thể, nấm men, một số động vật có vú và con người đã được nhân dòng, tinh sạch và nghiên cứu tính chất, chứng tỏ sự phổ biến của ADN helicaza trong thiên nhiên cũng như vai trò của chúng trong tế bào và cơ thể. *pdh45* là gen mã hóa ADN helicaza đầu tiên ở thực vật được phân lập và nghiên cứu [6]. Trong bài viết này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu chi tiết các đặc tính của enzym PDH45 như ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau lên hoạt tính mở xoắn ADN của enzym PDH45, cấu trúc gen mã hóa của enzym PDH45 và biểu hiện gen *pdh4* ở các điều kiện môi trường, ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển hoa của cây.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Đậu hà lan 7 ngày tuổi ở điều kiện và giai đoạn sinh trưởng, phát triển khác nhau do vườn thí nghiệm của Trung tâm Kỹ thuật gen và Công nghệ sinh học quốc tế (New Delhi) cung

cấp. ADN M₁₃ sợi đơn và oligo để làm cơ chất cho nghiên cứu hoạt động mở xoắn ADN do Trung tâm Kỹ thuật gen và Công nghệ sinh học quốc tế ở Trieste (Italia) cung cấp. Các hóa chất, bộ kit sử dụng trong các thí nghiệm được đặt mua từ các hãng Promega, Clontech, Stratagene. Các hóa chất đánh dấu phóng xạ của hãng Amersham.

2. Phương pháp

a) Nghiên cứu cấu trúc gen bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

ADN hệ gen của đậu hà lan được tinh sạch dựa theo phương pháp của Murray và Thompson (1980) hoặc Dellaaporta và cs. [3]. ADN hệ gen và ADN bổ sung (ADNc) được dùng làm sợi khuôn cho PCR cùng hai môi đặc hiệu được thiết kế ở hai đầu 5' và 3' dựa vào trình tự nucleotit mã hóa của gen *pdh*...

Phản ứng PCR được tiến hành trong 50μl hỗn hợp phản ứng gồm 100 ng (ADN_s) hay 300 ng (ADN hệ gen) làm sợi khuôn, 50 ng mỗi chất môi, 0,15 mM dNTP_s, 5 μl 10 x đệm Taq và 2,5 đơn vị Taq polymeraza. Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: 94°C, 1 phút để tách chuỗi ADN đôi thành chuỗi đơn, 55°C, 1 phút để gắn môi; 72°C, 1 phút 20 giây để sinh tổng hợp chuỗi ADN mới. Phản ứng được tiến hành liên tục 30 chu kỳ lặp lại.

*b) Phân tích sự thể hiện của gen *pdh45* bằng thẩm tách ARN*

ARN tổng số được tinh sạch theo phương pháp của Chomczynski và Sacchi [2]. Quá trình

điện di, xử lý gel và chuyển ARN lên màng như mô tả của Reddy và cs. [7]. Toàn bộ đoạn gen *pdh45* (1,6 kb) được tách ra bằng việc xử lý plasmit mang gen bởi enzym *EcoR1* và *Xho1*. Khoảng 50 - 100 ng của đoạn gen *pdh4* được đánh dấu phóng xạ bởi phương pháp dịch điểm đứt (nick translation). Màng chứa mẫu ARN lúc đầu được lai với ADN đã biến tính của tinh trùng cá hồi, sau đó được rửa và lai với đoạn gen *pdh45* đánh dấu phóng xạ và phân tích bằng phóng xạ tự chụp.

c) *Nghiên cứu hoạt tính bám poly(A) ARN của enzym PDH45 bằng phương pháp dịch chuyển băng (band shift assay)*

Khoảng 4 μ g ADN plasmit chứa đoạn 0,2 kb của clon *pdh45* và clon 1 kb HyPDE chứa poly(T) được xử lý với enzym *XhoI* để tạo dạng mạch thẳng. ADN đã xử lý được tinh sạch bằng cách chiết với hỗn hợp phenol/clorophoc. 20-30 ng ADN từ mỗi clon được sử dụng làm sợi khuôn cho phản ứng phiên mã *in vitro*. Phản ứng phiên mã *in vitro* được tiến hành trong 100 μ l hỗn hợp phản ứng gồm 20-30 ng ADN sợi khuôn, 1 mM ATP, 1mM CTP, 1 mM GTP, 10 mM DTT (dithiothreitol), 20 đơn vị RNasin (chất ức chế ARNaza), 6 μ l α - 32 P UTP và 100 đơn vị T₃ ARN polymeraza. Phản ứng tiến hành ở 37°C trong 1 giờ, sau bổ sung thêm 50 đơn vị T₃ ARN polymeraza cho phản ứng tiếp tục thêm 30 phút.

ADN sợi khuôn trong hỗn hợp phản ứng được loại bỏ bằng ADNaz, phân phóng xạ tự do được loại bỏ bằng việc chạy hỗn hợp phản ứng qua cột Sephadex G-50. Sản phẩm của phản ứng phiên mã *in vitro* (poly(A) ARNs đánh dấu phóng xạ) được sử dụng làm cơ chất cho phản ứng dịch chuyển băng. Khả năng bám poly(A) ARN của enzym PDH45 được tiến hành trong 10 μ l hỗn hợp phản ứng chứa đệm Tris - HCl 20 mM pH 8.0, MgCl₂ 1 mM, ATP 4 mM, KCl 60 mM, dithiothreitol (DDT) 8 mM, sacarosa 4% , albumin huyết thanh bò (BSA) 80 μ g/ml, 2 μ l poly (A) ARN đã được đánh dấu và 200 ng hoặc 400 ng enzym PDH45 trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ phòng. Phản ứng kết thúc bằng việc bổ sung 2 μ l chất chỉ thị màu và sản phẩm phản ứng được điện di trên gel polyacrylamit không biến tính 6%. Gel được sấy khô và phân tích bằng

phương pháp phóng xạ tự chụp.

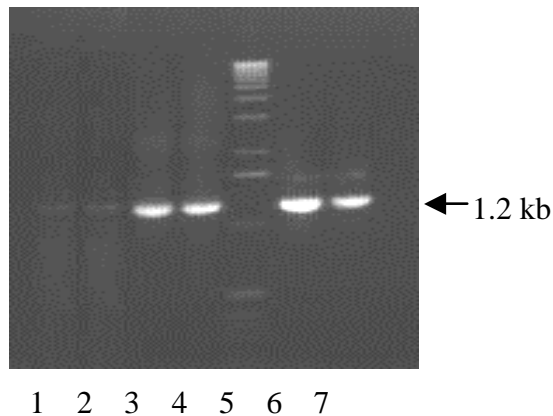
d) *Chuẩn bị cơ chất cho nghiên cứu hoạt tính mở xoắn ADN của enzym PDH45*

Cơ chất để phân tích hoạt động mở xoắn ADN của ADN helicaza là một đoạn oligonucleotit được đánh dấu phóng xạ ở đầu 5' hoặc đầu 3' gắn với ADN sợi đơn mạch vòng (M₁₃ viral ADN) để tạo ra phân xoắn đôi có chiều dài thông thường là 17 nucleotid. Việc đánh dấu oligo đầu 5' được tiến hành như mô tả của Sambrook và cs. [8]. 50-100 ng oligo đánh dấu đầu 5' được gắn vào 2 - 4 μ g ADN M13 sợi đơn mạch vòng trong 50 μ l hỗn hợp phản ứng chứa 40 mM Tris-HCl pH = 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl và 1 mM dithiothreitol. Hỗn hợp phản ứng được làm biến tính ở 95 °C trong 2 phút, sau gắn ở 65°C trong 20 phút và giảm nhiệt độ từ từ tới nhiệt độ phòng. Cơ chất sẽ phản ứng với helicaza trong 30 phút ở 37 °C với sự có mặt của ATP và ion Mg⁺². Sản phẩm của phản ứng mở xoắn ADN sẽ được điện di trên gel polyacrylamit không biến tính 12%. Gel được sấy khô và phân tích bằng phương pháp phóng xạ tự chụp [10].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Gen *pdh45* là một gen không có intron

Cấu trúc gen ở các cơ thể bậc cao thường bao gồm các đoạn mã hóa (exon) và các đoạn không mã hóa (intron). Để tìm hiểu sự có mặt của đoạn không mã hóa trong gen *pdh45* chúng tôi tiến hành phản ứng PCR sử dụng ADN hệ gen và ADNc của đậu hà lan làm sợi khuôn với cùng bộ mồi để tìm kiếm sự khác nhau về kích thước của sản phẩm phản ứng PCR. Kết quả thí nghiệm (hình 1) cho thấy không có sự sai khác về kích thước của sản phẩm phản ứng PCR khi ADN hệ gen và ADNc của đậu hà lan được dùng làm sợi khuôn (hình 1: cột 1-4, 6,7). Sản phẩm phản ứng PCR đầu tiên sử dụng ADN hệ gen làm sợi khuôn xuất hiện ít (hình 1: cột 1, 2) được giải thích bằng sự có mặt ít ADN sợi khuôn, vì vậy nhiều sản phẩm PCR được quan sát với phản ứng PCR thứ hai sử dụng sản phẩm phản ứng PCR đầu tiên làm sợi khuôn (hình 1: cột 3, 4). Kết quả thí nghiệm chứng minh gen *pdh45* là một gen không chứa intron.



Hình 1. Gen *pdh45* không chứa intron.

Cột 1, 2 là sản phẩm phản ứng PCR thứ nhất sử dụng ADN hệ gen như sợi khuôn.
Cột 3, 4 là sản phẩm phản ứng PCR thứ hai sử dụng sản phẩm phản ứng PCR thứ nhất như sợi khuôn.
Cột 5 là băng chuẩn.
Cột 6 và 7 là sản phẩm phản ứng PCR sử dụng ADNc như sợi khuôn.

2. Gen *pdh45* không có vai trò trong quá trình biệt hóa của hoa

Sự biểu hiện của gen *pdh45* ở các giai đoạn phát triển của hoa là đối tượng cho việc tìm hiểu vai trò của gen *pdh45* trong quá trình biệt hóa của hoa và quả đậu hà lan. Các giai đoạn khác nhau của hoa (F₁, F₂, F₃, F₄, F₅) được mô tả tóm tắt ở bảng 1.

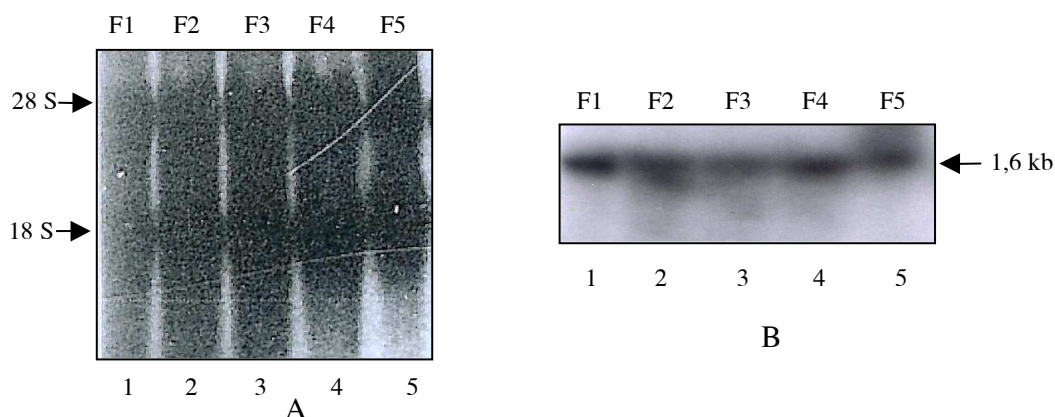
Hoa đậu hà lan ở các giai đoạn phát triển khác nhau được sử dụng cho việc tách ARN tổng số. 30 µg của ARN tổng số từ mỗi giai đoạn phát triển được chạy điện di trên gel phormaldehyt-agarosa 1,2%. Sau khi chạy điện di, ARN được chuyển lên màng. Trước khi lai,

màng được nhuộm với xanh mêtylen để quan sát hàm lượng ARN từ mỗi mẫu đã được chuyển lên màng (hình 2A). Màng được lai với toàn bộ đoạn gen *pdh45* đánh dấu phóng xạ (hình 2B). Kết quả thí nghiệm cho thấy sự biểu hiện của gen *pdh45* không có khác biệt trong các giai đoạn phát triển của hoa từ giai đoạn F₂ đến F₅. Sự biểu hiện của gen *pdh45* được phát hiện ở mức độ cao ở giai đoạn F₁ (hình 2B: cột 1) mặc dù hàm lượng ARN tổng số được đưa lên màng để lai ở cột này ít hơn (hình 2A: cột 1). Kết quả thí nghiệm chứng minh rằng gen *pdh45* có vai trò quan trọng trong giai đoạn sớm của sự hình thành hoa, tuy nhiên nó không có vai trò trong quá trình biệt hóa của hoa và quả.

Bảng 1

Mô tả tóm tắt các giai đoạn phát triển hoa đậu hà lan

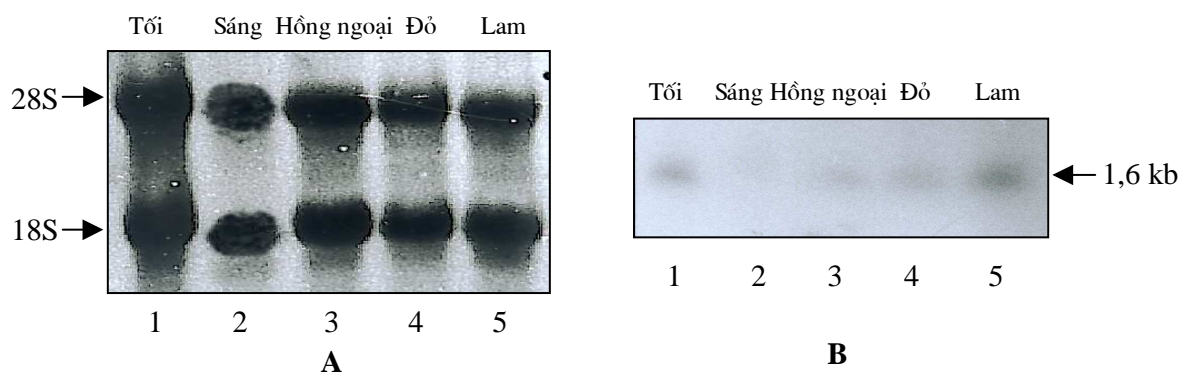
Giai đoạn	Kích thước (mm)	Mô tả	Nét đặc trưng
F1	7-10	Giai đoạn nụ	Hoa chưa nở, cánh hoa có thể quan sát
F2	10-12	Giai đoạn nụ	Hoa chưa nở, cánh hoa lớn hơn
F3	13-15	Hoa vừa nở	Cánh hoa nở nhưng chưa hoàn toàn
F4	≈ 15	Hoa trưởng thành	Cánh hoa nở hoàn toàn, đài hoa còn nguyên
F5	≈ 15	Hoa tàn	Đài hoa rụng



Hình 2. Biểu hiện của gen *pdh45* ở các giai đoạn phát triển khác nhau của hoa

A: ARN tổng số từ mỗi giai đoạn phát triển khác nhau của hoa được chạy điện di và nhuộm bởi xanh mêtylen. 18S và 28S là ARN ribosom.

B: Blot được lai với đoạn gen *pdh45* đã được đánh dấu phóng xạ. Một ARN 1,6 kb tương ứng với *pdh45* được phát hiện ở tất cả các giai đoạn phát triển hoa. F1, F2, F3, F4, F5 tương ứng với các cột 1, 2, 3, 4, 5 chỉ ra mức độ thể hiện của *pdh45* ở các giai đoạn khác nhau.



Hình 3. Biểu hiện của gen *pdh45* ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau.

A: ARN tổng số từ mỗi điều kiện chiếu sáng khác nhau được chạy điện di và nhuộm bằng xanh mêtylen. 18 S và 28 S là ARN ribosom.

B: Blot được lai với đoạn gen *pdh45* đã được đánh dấu phóng xạ. Một ARN 1.6 kb tương ứng với *pdh45* được phát hiện. Các điều kiện chiếu sáng: tối, sáng, hồng ngoại, đỏ, lam tương ứng với các cột 1, 2, 3, 4, 5 chỉ ra mức độ thể hiện của *pdh45* ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau.

3. Sự thể hiện của gen *pdh45* được kích hoạt bởi ánh sáng lam

Để tìm hiểu sự biểu hiện của gen *pdh45* ở các điều kiện ánh sáng khác nhau, đậu hà lan 7 ngày tuổi được gieo trồng trong các điều kiện không có ánh sáng, ánh sáng trắng, hồng ngoại, đỏ và lam và được sử dụng cho việc tách ARN tổng số. 30mg ARN tổng số từ mỗi điều kiện chiếu sáng được chạy điện di trên gel phormaldehyt-agarosa 1,2%, sau đó chuyển lên màng. Màng được nhuộm methylen xanh để quan sát hàm lượng ARN từ mỗi mẫu đã được

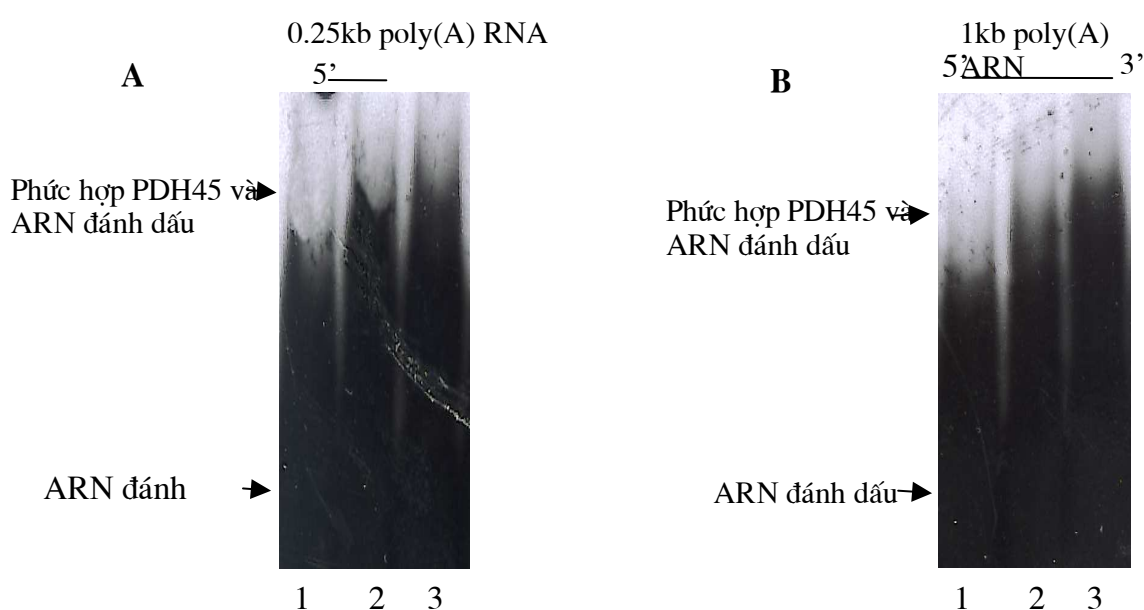
chuyển lên màng (hình 3A). Màng được lai với toàn bộ đoạn gen *pdh45* đánh dấu phóng xạ (hình 3B). Kết quả thí nghiệm chứng tỏ rằng sự biểu hiện của gen *pdh45* ở mức độ cao được quan sát ở mẫu ARN được xử lý bởi ánh sáng lam (hình 3B: cột 5). Sự biểu hiện ở mức độ cao của gen *pdh45* cũng được quan sát ở mẫu ARN được xử lý bởi điều kiện tối (hình 3B: cột 1). Tuy nhiên, điều này được giải thích bằng hàm lượng ARN trên màng của cột mẫu không có ánh sáng là nhiều hơn so với các cột khác (hình 3A: cột 1). Kết quả thí nghiệm khẳng định sự

biểu hiện của gen *pdh45* là được kích hoạt bởi ánh sáng lam.

4. Enzym PDH45 có khả năng bám poly (A) ARN

Kết quả của thí nghiệm nghiên cứu khả năng bám poly (A) ARN của enzym PDH45 được trình bày ở hình 4, trong đó ở hình 4A tương ứng với cơ chất 0,25 kb poly(A) ARN và hình 4B tương ứng với cơ chất 1 Kb poly (A) ARN, cột 1 là phản ứng không có enzym PDH45 còn

cột 2 và 3 là phản ứng trong sự có mặt của 200 và 400 ng enzym PDH45. Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng phức hợp tạo ra bởi enzym PDH45 và poly (A) ARN được quan sát ở tất cả các phản ứng có sự tham gia của enzym PDH45 (hình 4A, B; cột 2,3). Việc tăng hàm lượng enzym PDH45 tới 400ng cho một phản ứng đã dẫn tới sự di chuyển phức hợp enzym PDH45 – poly (A) ARN chậm hơn trong quá trình điện di (hình 4A, B; cột 3). Kết quả này chứng minh enzym PDH45 có khả năng bám poly (A) ARN.



Hình 4. Khả năng bám poly (A) ARN của enzym PDH45.

Hỗn hợp của poly (A) ARN đã được đánh dấu và enzym PDH45 được ủ 30 phút sau điện di trên gel polyacrylamit không biến tính 6%. Sự hình thành của phức hợp poly (A) ARN - enzym PDH45 được quan sát bằng chụp ảnh phóng xạ tự động. Lượng phóng xạ tự do và phức hợp được chỉ ra bằng các mũi tên. Cột 1 là phản ứng không có enzym PDH45, cột 2 và 3 là phản ứng có 200 và 400 ng enzym PDH45.
A: Khả năng bám 0,25 kb poly (A) RNA của enzym PDH45.
B: Khả năng bám 1 kb poly (A) ARN của enzym PDH45

5. Đặc tính hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 và các yêu cầu phản ứng

Các yêu cầu phản ứng cho hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 được trình bày ở bảng 2. Enzym PDH45 bị mất hoạt tính ở 56°C trong 1 phút. Hoạt tính enzym bị phá hủy nếu hỗn hợp phản ứng có chứa trypsin. Hoạt tính mở xoắn của enzym PDH45 hoàn toàn bị ức chế bởi 5 mM EDTA, 45 mM ammonium sulfat, 100

mM phosphat kali (pH8,0), 30 mM M13 ssDNA. Tuy vậy, M13 RFI DNA, *E.coli* tARN, ARN tổng số của đậu hà lan, poly A, poly C, poly G hay poly U ở nồng độ 30mM không có ảnh hưởng đến hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45. Hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 phụ thuộc ATP và Ion Mg^{2+} . Hoạt tính của enzym bị mất nếu thay thế ATP bởi $ATP\gamma S$, ADP, AMP hoặc thay thế Mg^{2+} bởi

các ion khác như Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{2+} và Ca^{2+} . Tuy nhiên, enzym thể hiện khoảng 10% hoạt động mở xoắn ADN ở nồng độ ion Mn^{2+} và Ca^{2+} 0,6 mM. Ở nồng độ KCl hoặc NaCl 200 mM, hoạt động mở xoắn không bị ức chế đáng kể. Thay thế $MgCl_2$ bằng $MgSO_4$ hoặc $Mg(CH_3COO)_2$ không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động mở xoắn ADN của enzym.

Bảng 2

Điều kiện phản ứng cho hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45

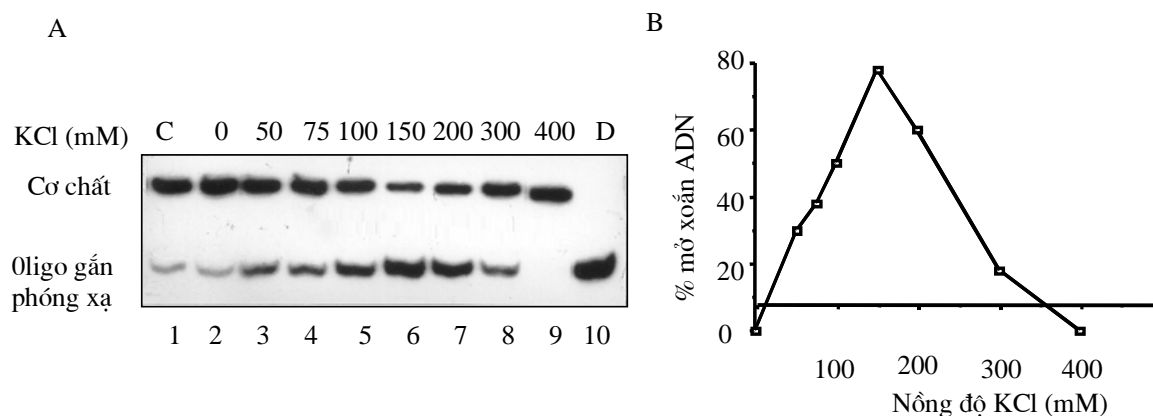
Điều kiện phản ứng	% mở xoắn ADN
Phản ứng đầy đủ	67
Phản ứng không có PDH45	< 2
PDH45 đã được xử lý ở 56°C, 1 phút	< 2
-ATP	< 2
-ATP + ATP γ S (0,6 mM)	< 2
-ATP + ADP (0,6 mM) or AMP (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$	< 2
- $MgCl_2$ + $CaCl_2$ (0,6 mM)	10
- $MgCl_2$ + $ZnSO_4$ (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$ + $MnCl_2$ (0,6 mM)	60
- $MgCl_2$ + $CuCl_2$ (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$ + $NiCl_2$ (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$ + $AgNO_3$ (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$ + $CoCl_2$ (0,6 mM)	< 2
- $MgCl_2$ + $MgSO_4$ (0,6 mM)	67
- $MgCl_2$ + $Mg(CH_3COO)_2$ (0,6 mM)	66
+KCl or NaCl (200 mM)	61
+ $(NH_4)_2SO_4$ (45 mM)	< 2
+ KPO_4 (pH 8,0, 100 mM)	< 2
+EDTA (5 mM)	< 2
+M13ssDNA (30 mM)	< 2
+M13RFI DNA (30 mM)	64
+Pea leaves total RNA (30 mM)	62
+ <i>E. coli</i> t-RNA (30 mM)	61
+Poly[A] or Poly[C] or Poly[G] or Poly[U]	65
+Trypsin (1U)	< 2

Ghi chú: Phản ứng phân tích hoạt động mở xoắn ADN sử dụng 40 ng PDH45 và 1 ng cơ chất như đã mô tả ở phần nguyên liệu và phương pháp.

Hình 5 (A, B) trình bày biểu đồ về ảnh hưởng của nồng độ KCl đối với hoạt tính helicaza của enzym PDH45. Hoạt tính mở xoắn ADN hoàn toàn phụ thuộc nồng độ muối (hình 5A: cột 2); tối thích ở nồng độ KCl 150 mM (hình 5A: cột 6) và bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 400 mM (hình 5A: cột 9). Hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 cũng rất nhạy cảm với ion Mg^{2+} . Khi vắng mặt Mg^{2+} , enzym không thể hiện hoạt tính mở xoắn (hình 6A, cột 2); ở nồng độ $MgCl_2$ 0,6 mM, enzym có hoạt tính cao nhất (hình 6A, cột 5) và ở nồng độ $MgCl_2$ từ 2 mM, trở lên, hoạt tính của enzym hoàn toàn bị ức chế (hình 6A: cột 2, 8, 10).

III. THẢO LUẬN

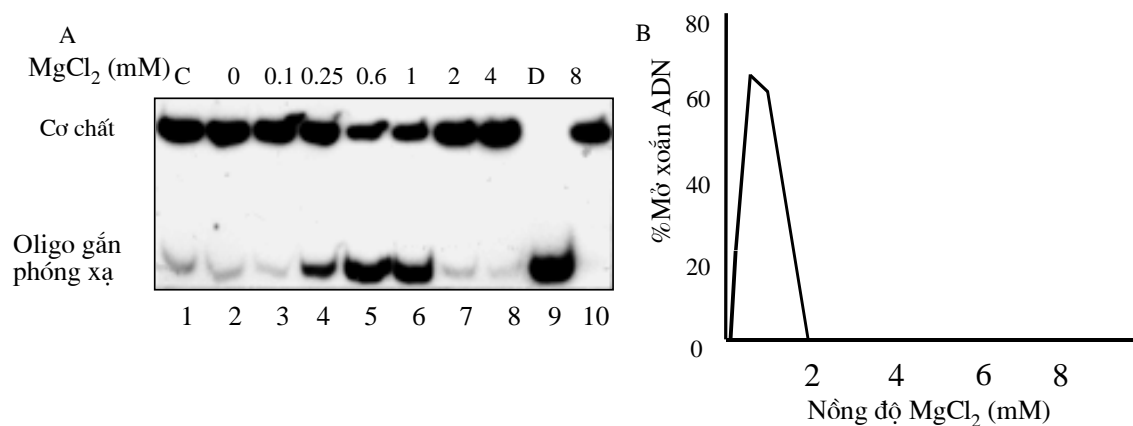
Sự sinh trưởng và phát triển của thực vật là kết quả của quá trình điều khiển tăng sinh của các tế bào. Không giống như các đối tượng khác, tế bào của thực vật bậc cao có thể nhân lên, sau đó các tế bào này có khả năng biệt hóa hình thành các cơ quan để tạo thành một cơ thể hoàn chỉnh. Thực vật làm được điều này có thể bằng việc điều hòa bộ máy phân chia tế bào của chúng theo một cơ chế riêng, không giống như ở vi khuẩn, nấm hay động vật. Vì vậy, thực vật cũng là một mô hình lý thú để nghiên cứu cơ chế trao đổi chất ADN hiện vẫn còn rất ít được biết đến. ADN helicaza đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong tăng sinh của tế bào, vì vậy một nghiên cứu phân tử chi tiết của ADN helicaza sẽ rất có giá trị trong các hiểu biết của con người về vai trò của ADN trong chu kỳ sống của tế bào ở thực vật. Gen *pdh45* là một gen hoàn chỉnh mã hóa cho một ADN helicaza ở thực vật lần đầu tiên được phát hiện và nhân dòng. Các phân tích hóa sinh của enzym tinh sạch khẳng định rằng enzym PDH45 chứa hoạt tính mở xoắn ADN, ARN và cả hoạt tính ATPaz. Enzym PDH45 cũng là một thành viên của nhân tố khởi đầu của quá trình dịch mã và có khả năng hoạt hóa hoạt tính của topoisomeraza I [6]. Sự xuất hiện của đoạn không mã hóa trong gen ở các cơ thể bậc cao đã làm cho các nghiên cứu về phiên mã và dịch mã trở nên hết sức phức tạp. Chưa có các kết luận hoàn toàn chính xác về vai trò của các đoạn không mã hóa trong quá trình sinh trưởng, phát triển và tiến hóa ở cơ thể bậc cao. Tuy nhiên, ở thực vật gần đây có một vài quan điểm cho rằng tính chống chịu ở thực vật có liên quan đến các



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ muối KCl tới hoạt tính mở xoắn ADN của enzym PDH45.

A: Mỗi phản ứng phân tích hoạt tính mở xoắn ADN sử dụng 40 ng enzym PDH45 và 1 mg cơ chất helicaza. Nồng độ muối KCl sử dụng trong các phản ứng được đề cập trên đầu của hình. C và D tương ứng với cột 1 và 9 là phản ứng không có enzym PDH45 và phản ứng cơ chất đã làm biến tính.

B: Hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 ở các nồng độ muối khác nhau được định lượng và biểu diễn bằng đồ thị.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ MgCl tới hoạt tính mở xoắn ADN của enzym PDH45.

A: Mỗi phản ứng phân tích hoạt tính mở xoắn ADN sử dụng 40 ng enzym PDH45 và 1 ng cơ chất helicaza. Nồng độ MgCl sử dụng trong các phản ứng được đề cập trên đầu của hình. C và D tương ứng với cột 1 và 9 là phản ứng không có enzym PDH45 và phản ứng cơ chất đã làm biến tính.

B: Hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45 ở các nồng độ MgCl khác nhau được định lượng và biểu diễn bằng đồ thị.

vùng không mã hóa trong gen. Trong trường hợp của gen *pdh45*, kết quả phân tích lai ARN ở các điều kiện nghiêm ngặt (high stringency) và không nghiêm ngặt (low stringency) cho kết quả các băng tương tự. Điều thú vị là các băng được quan sát ở mỗi mẫu phân tích phản ánh chính xác số các vị trí enzym giới hạn ở ADNc, chứng tỏ *pdh45* là gen với một bản sao duy nhất (single copy gene) và là gen không chứa

intron (intronless gene) trong hệ gen của cây đậu hà lan [6]. Trong công trình nghiên cứu này, khi sử dụng cùng bộ môi với các sợi khuôn là ADN hệ gen và ADNc trong phản ứng PCR, chúng tôi đã thu được các sản phẩm của phản ứng PCR có cùng kích thước càng chứng minh *pdh45* là gen không chứa intron.

Phân tích lai ARN ở các bộ phận khác nhau của cây đã chứng tỏ sự biểu hiện của gen *pdh45*

ở tất cả các cơ quan như lá, thân, hoa, đầu rễ đã chứng tỏ vai trò thiết yếu của nó trong việc duy trì các hoạt động trao đổi chất ADN của tế bào [6]. Khi sử dụng ARN tổng số từ các hoa đậu Hà lan ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau và từ cây 7 ngày tuổi được sinh trưởng trong các điều kiện chiếu sáng khác nhau cho các phân tích lai ARN để tìm hiểu các vai trò cụ thể của gen *pdh45* trong sinh trưởng và phát triển của cây đã cho thấy sự biểu hiện của gen *pdh45* không có sự sai khác nhiều trong các giai đoạn phát triển của hoa. Điều này chứng tỏ sự biểu hiện của gen *pdh45* là thiết yếu cho sự hình thành hoa nhưng không có vai trò rõ rệt trong các giai đoạn phát triển của hoa. Các mẫu phân tích với ARN tổng số của đậu Hà lan sinh trưởng ở các điều kiện ánh sáng khác nhau cũng cho thấy gen *pdh45* biểu hiện nhiều hơn trong điều kiện ánh sáng lam, chứng tỏ rằng gen *pdh45* có thể có vai trò trong việc điều khiển tính chống chịu của thực vật.

Trình tự poly(A) ARN ở cuối mỗi ARN thông tin có vai trò làm ổn định sợi ARN trong quá trình sinh tổng hợp protein. Việc thay đổi chiều dài của đoạn poly(A) ARN có liên quan tới việc điều hòa sự biểu hiện của mỗi một gen. Kháng thể PDH45 đã ức chế quá trình sinh tổng hợp protein *in vitro*, chứng tỏ vai trò của enzym PDH45 trong quá trình dịch mã [6]. Công trình nghiên cứu của chúng tôi đã xác định enzym PDH45 có khả năng bám poly(A) ARN, gợi ý về vai trò của enzym này trong việc điều khiển sự biểu hiện của gen. Kết quả này là bằng chứng thứ hai về vai trò của enzym PDH45 trong quá trình sinh tổng hợp protein.

Các ion kim loại tỏ ra là yếu tố cần thiết cho hoạt tính mở xoắn ADN của enzym PDH45. Ion Mn^{2+} có thể thay thế ion Mg^{2+} mà không có sự thay đổi lớn hoạt tính mở xoắn ADN. Điều này

đã được công bố trong các công trình nghiên cứu trước đây [4, 9, 10]. Tuy nhiên, trong các công trình nghiên cứu của Cannon và Heinhorst [1] hay của Tuteja và Phan [12], khi thay thế ion Mg^{2+} bởi ion Mn^{2+} trong phản ứng phân tích, đã dẫn tới việc ức chế hoạt động mở xoắn ADN của enzym PDH45.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cannon G. C., Heinhorst S., 1990: Plant Mol. Biol., 15: 457-464.
2. Chomeczynski P., Sacchi N., 1987: Annal. Biochem., 162: 156-159.
3. Dellaporta S. L., Wood J., and Hicks J. B., 1983: Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.
4. Goetz G. S. et al., 1988: J. Biol. Chem., 263: 383-392.
5. Murray M. G., Thompson W. F., 1980: Nucl. Acids Res., 8: 4321-4325.
6. Pham X. H. et al., 2000: Plant J., 24: 119-129.
7. Reddy M. K., Nair S. and Tewari K. K., 1998: Plant Mol. Biol., 37: 773-784.
8. Sambrook J. F., Fritsch E. F. and Maniatis T., 1989: In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory, NY.
9. Seiki M. et al., 1987: Biochemistry, 26: 2924-2928.
10. Tuteja N., Phan T. N. and Tewari K. K., 1996: Eur. J. Biochem., 238: 54-63.
11. Tuteja N. et al., 1990: Gene, 88: 227-232.
12. Tuteja N., Phan T. N., 1998: Plant Physiol., 118: 1029-1039.

CHARACTERIZATION OF THE DNA HELICASE PDH45 FROM *PISUM SATIVUM* L.

PHAM XUAN HOI, TRAN DUY QUY, PHAN TUAN NGHIA
NARENDRA TUTEJA

SUMMARY

The transient opening of the duplex DNA is a prerequisite step in many processes of the DNA metabolism. DNA helicases catalyze the unwinding of the double stranded DNA and in some cases, the

double stranded RNA and DNA-RNA hybrids to create single stranded templates by disrupting the hydrogen bonds between two strands and thus play an important role in DNA replication, repair, recombination, transcription and translation. The *pdh45*, the first plant DNA helicase gene which has been cloned, is over-expressed and partially characterized (Pham et al., 2000). Here, the gene *pdh45* is found to be an intronless and single copy gene. The gene is expressed almost at the same level at different stages of flower development, except for the F1 stage and its expression is stimulated by the blue light. Enzyme PDH45 can bind to poly(A)RNA. The unwinding activity of the enzyme PDH45 is salt- and Mg^{2+} -dependent. The enzyme PDH45 is heat labile and its activity is destroyed by the incubation with the trypsin. The helicase activity of the enzyme PDH45 is totally inhibited by 5 mM EDTA, 45 mM ammonium sulfate, 100 mM potassium phosphate (pH 8,0) or M13 ssDNA (30 mM). However, M13RFI DNA, *E. coli* t-RNA, pea total RNA and Poly[A], Poly[C], Poly[G] and Poly[U] at 30 mM have no effect on the DNA unwinding activity of the enzyme PDH45. The enzyme shows no activity when ATP in the reaction mixture is replaced by ATP γ S or ADP or AMP and when Mg^{2+} is replaced by other divalent cations such as Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{2+} and Co^{2+} . However, Mn^{2+} and Ca^{2+} (at 0,6 mM concentration) support 89% and 14% of the activity, respectively. The overall divalent cation requirement is $Mg^{2+} > Mn^{2+} \gg Ca^{2+}$. At a concentration of 200 mM KCl or NaCl, the unwinding activity is not significantly inhibited. The $MgCl_2$ can be replaced by $MgSO_4$ or $Mg(CH_3COO)_2$ without any effect on its activity. These results suggest that the enzyme PDH45 could be an important multifunctional protein involved in the protein synthesis and maintaining the basic activities of the cell.

Ngày nhận bài: 4-3-2002