

## ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *GmCHI* PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG KHÁC NHAU VỀ HÀM LƯỢNG ISOFLAVONE

Lê Thị Hồng Trang<sup>1,2</sup>, Trần Thị Thanh Vân<sup>3</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>4</sup>,  
Phạm Thanh Tùng<sup>4</sup>, Lê Văn Sơn<sup>4</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Trường Cao đẳng Sư phạm Thái Nguyên

<sup>3</sup>Trường Đại học Tân Trào Tuyên Quang

<sup>4</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*chuhoangmau@tnu.edu.vn

**TÓM TẮT:** Trong nghiên cứu này, năm giống đậu tương trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam được khảo sát hàm lượng isoflavone và phân tích đặc điểm của gen *GmCHI* mã hóa enzyme chalcone isomerase, enzyme chìa khóa trong quá trình chuyển hóa tổng hợp isoflavone ở đậu tương. Hàm lượng isoflavone (daidzein, genistein) trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của giống đậu tương ĐT26 cao nhất (64,27 mg/100 g) và cao gấp 2,18 lần và 2,45 lần so với giống DT84 và DT2008. Gen *GmCHI* phân lập từ mRNA của các giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008 và DT84 có kích thước 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide của gen *GmCHI* ở bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008 và DT84 từ 96,8% đến 98,9% và tương đồng với giống đậu tương mang mã số NM\_001248290 trên GenBank từ 98% đến 99%. Khoảng cách di truyền giữa giống ĐT26 so với các giống ĐT51, DT2008, DT84 và các giống khác dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI* là 19,3%, dựa trên trình tự amino acid suy diễn là 4,4%. Đoạn mã hóa của gen *GmCHI* được sử dụng làm nguyên liệu để thiết kế vector biểu hiện ở thực vật nhằm cải thiện hàm lượng isoflavone trong đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

*Từ khóa:* *Glycine max*, daidzein, genistein, gen chalcone isomerase, isoflavone.

### MỞ ĐẦU

Đậu tương, *Glycine max* (L.) Merrill, có nguồn gốc từ vùng Đông Á, đây là cây trồng trên cạn, ngắn ngày, có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Hàm lượng protein trong hạt đậu tương cao hơn hàm lượng protein có trong cá, thịt và cao gấp hai lần so với các loại đậu đỗ khác. Vì vậy, các sản phẩm từ đậu tương ngày càng được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sản phẩm từ đậu tương rất tốt cho sức khỏe con người nhờ có chứa thành phần isoflavone. Isoflavone là hoạt chất có nguồn gốc thực vật, có thể làm giảm sự phát triển của một số tế bào ung thư, giảm các triệu chứng mãn kinh, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch và có thể tác động tích cực đến quá trình sinh lý khác [9]. Ở thực vật, isoflavone và các dẫn xuất của các hợp chất phytoalexin có tác dụng kháng nấm gây bệnh và các loại vi khuẩn [1]. Isoflavone có trong cây đậu tương còn có tác dụng kích thích vi khuẩn *Rhizobium* trong đất để hình thành các nốt sần cố định đạm [4].

Con đường sinh tổng hợp isoflavone là một nhánh của con đường phenylpropanoid. Quá trình chuyển hóa tổng hợp isoflavone có nhiều enzyme tham gia, bao gồm phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), chalcone reductase (CHR), chalcone isomerase (CHI) và isoflavone synthase (IFS). Trong đó CHI là enzyme nắm giữ vị trí then chốt trong con đường sản sinh flavonoid và xúc tác chuyển đổi chalcone thành flavanone, là nguyên liệu cho quá trình chuyển hóa flavonoid và isoflavonoid [5]. Các nghiên cứu về enzyme CHI đã được thực hiện trên cây *Arabidopsis* đã chỉ ra rằng, chỉ khi có mặt của CHI thì *Arabidopsis* mới hình thành flavonoid; trong vò cà chua không có CHI và naringenin, khi làm tăng CHI dẫn đến sự gia tăng lên 78 lần hàm lượng flavonoid [7, 8]. Đoạn mã hóa chalcone isomerase ở cây đậu tương có kích thước 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid, có mặt ở các bộ phận của cây và biểu hiện mạnh nhất là ở giai đoạn nảy mầm [3].

Trong nghiên cứu này, năm giống đậu tương trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam được khảo sát hàm lượng isoflavone và phân tích đặc điểm của gen *GmCHI* mã hóa enzym chìa khóa chalcone isomerase trong quá trình chuyển hóa tổng hợp isoflavone ở đậu tương.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của các giống đậu tương DT51, DT26, DT90, DT2008 và DT84 được sử dụng để phân tích hàm lượng isoflavone và tách chiết RNA tổng số.

#### Phương pháp sắc ký lỏng cao áp

Phân tích định lượng hàm lượng daidzein và genistein được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp theo Chen et al. (2001) [2]. Dịch chiết thu được sau đó được loại tạp, làm sạch mẫu qua hệ thống SPE và định lượng bằng phương pháp HPLC theo Chen et al. (2001) [2].

#### Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử

RNA tổng số được tách từ mầm đậu tương sử dụng kit Trizol® Regents (Invitrogen), cDNA được tổng hợp bằng Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit. Nhân bản gen *GmCHI* được tiến hành bằng PCR với cặp mồi CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R được thiết kế dựa trên trình tự gen *CHI* của đậu tương mang mã số NM\_001248290. Trình tự đoạn mã hóa của gen *GmCHI* được nhân bản dự kiến có kích thước là 657 nucleotide. Nếu khuếch đại gen *GmCHI* từ cDNA bằng cặp mồi trên thì kết quả sẽ cho sản phẩm PCR với kích thước là  $9 + 657 + 11 = 677$  nucleotide. Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR là: CHI-NcoI-F: 5'-ATGCCATGGATGGCAACGATCACCGCGGTT-3'; CHI-NotI-R: 5'-TTGCGGCCGCGACTATAATGCCGTGGCTC-3'.

Phản ứng PCR nhân gen *GmCHI* được thực hiện theo chu trình nhiệt 94°C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; 72°C trong 10 phút và lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1 µg/ml.

Tách dòng phân tử được thực hiện theo Sambrook et al. (2001) [6]. Sản phẩm PCR được tinh sạch theo GeneJET PCR Purification Kit và gắn vào vector tách dòng pBT để tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Chọn dòng khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp dựa trên kiểu hình khuẩn lạc và bằng colony-PCR với cặp mồi pUC18-F/pUC18-R có trình tự nucleotide là: pUC18-F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; pUC18-R: 5'-CAGTATCGACAAAGGAC-3'; đoạn DNA được nhân bản dự kiến là 838 nucleotide.

Tách chiết plasmid được thực hiện theo bộ kit Plasmid Miniprep của hãng Qiagen. Trình tự nucleotide của gen được xác định trên thiết bị tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) và được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTar.

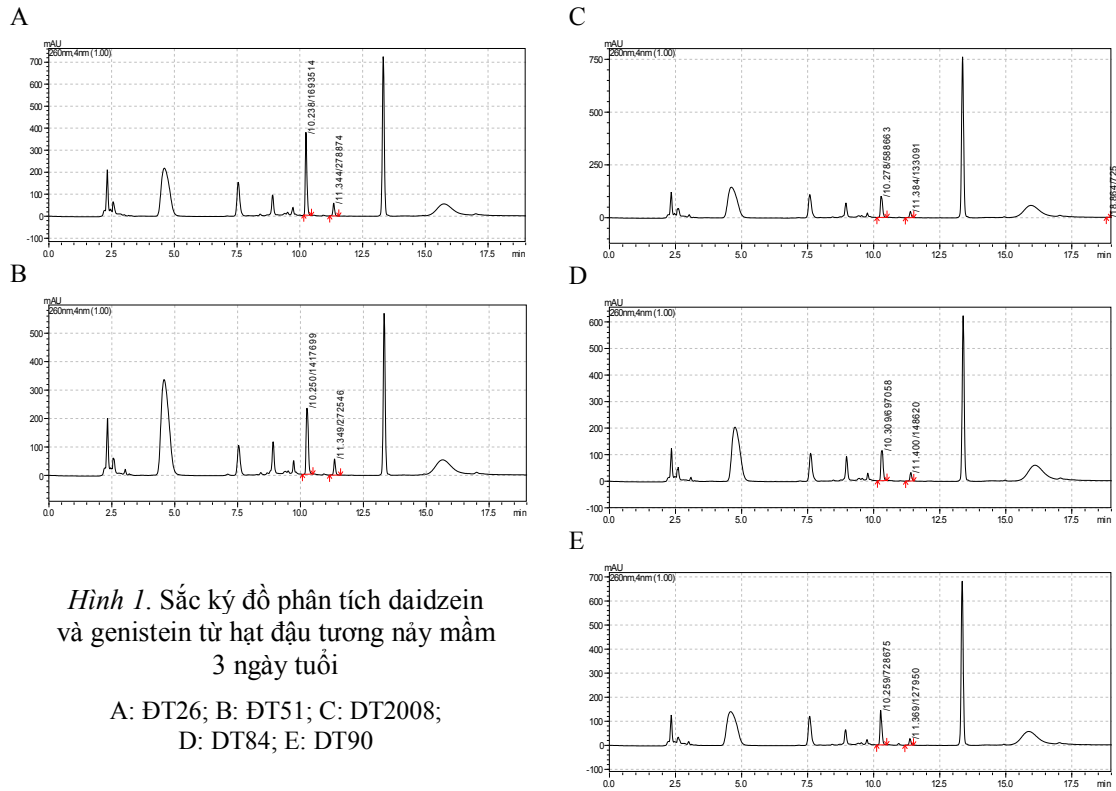
#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm của 5 giống đậu tương

Từ sắc ký đồ (hình 1) và phương trình đường chuẩn kết quả phân tích HPLC định lượng daidzein và genistein chiết từ hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi được thể hiện ở bảng 1 và hình 2.

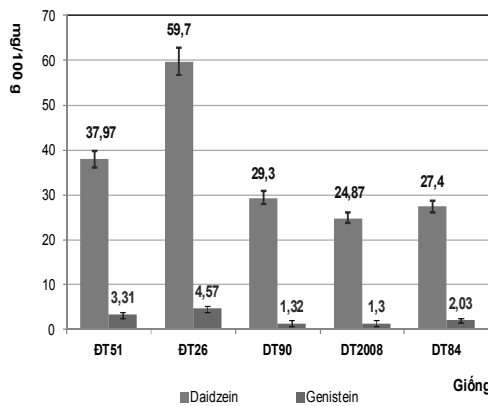
Bảng 1. Hàm lượng isoflavone trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của 5 giống đậu tương [ $\bar{x} \pm S_x$  (mg/100 g)] ( $\alpha = 0,001$ )

Isoflavone	DT51	DT26	DT90	DT2008	DT84
Daidzein	37,97±0,75	59,70±1,30	29,30±1,23	24,87±0,27	27,40±0,49
Genistein	3,31±0,11	4,57±0,10	1,32±0,10	1,30±0,11	2,03±0,11
Isoflavone (daidzein + genistein)	41,28	64,27	30,62	26,17	29,43



Hình 1. Sắc ký đồ phân tích daidzein và genistein từ hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi

A: ĐT26; B: ĐT51; C: DT2008; D: DT84; E: DT90



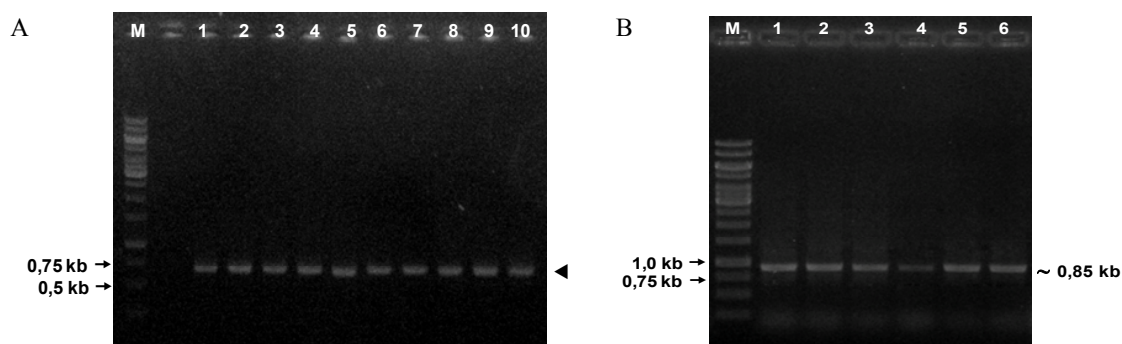
Hình 2. Biểu đồ so sánh hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của các giống đậu tương ĐT51, ĐT26, ĐT90, DT2008, DT84 ( $\bar{x}$ ; thanh đứng trên mỗi biểu đồ là sai số chuẩn ( $S_x$ ); đơn vị: mg/100 g; mức ý nghĩa  $\alpha=0,001$ )

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở giống đậu tương ĐT26, trong hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi có hàm lượng daidzein và genistein cao nhất

(64,27 mg/100 g), giống DT2008 có hàm lượng thấp nhất (26,17 mg/100 g). Hàm lượng daidzein và genistein có sự khác biệt giữa 5 giống đậu tương ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,001$ . Có thể xếp theo thứ tự giảm dần về hàm lượng isoflavone (daidzein+genistein) của 5 giống đậu tương trong nghiên cứu: ĐT26 > ĐT51 > DT90 > DT84 > DT2008 (hình 2).

### Tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *GmCHI* từ cây đậu tương

Kết quả nhân bản đoạn mã hóa gen *GmCHI* từ cDNA có kích thước ước tính gần 0,7 kb (hình 3A). Đoạn DNA nhận bản được tinh sạch và tiến hành tách dòng bằng vector pBT và tế bào khả biến *E.coli* DH5 $\alpha$ . Kết quả chọn dòng tế bào mang vector tái tổ hợp dựa trên kiểu hình khuẩn lạc và kiểm tra bằng colony-PCR với cặp mồi pUC18F/pUC18R thu được đoạn DNA có kích thước khoảng 0,85 kb (hình 3B) đúng như tính toán lý thuyết. Các dòng khuẩn lạc dương tính với colony-PCR được chọn để tách plasmid tái tổ hợp và đem giải trình tự nucleotide đoạn gen *GmCHI*.



Hình 3. A. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI* (M: thang DNA 1kb; 1, 2: ĐT26; 3, 4: ĐT51; 5, 6: ĐT84; 7,8 ĐT90; 9, 10:ĐT2008);  
 B. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR với cặp mồi *pUC18F/pUC18R* (M: thang DNA 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6: các dòng khuẩn lạc có kiểu hình trắng được kiểm tra bằng colony-PCR).

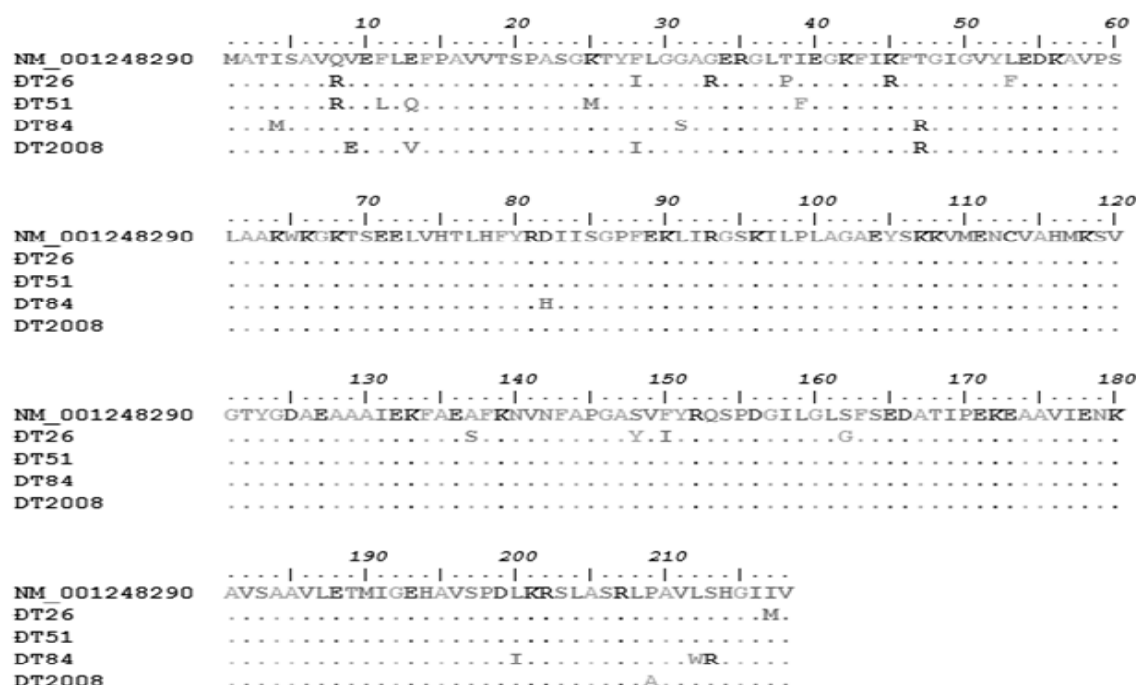
Bảng 2. Những vị trí sai khác về trình tự nucleotide của *GmCHI* giữa các giống đậu tương

Thứ tự	Vị trí nucleotide	NM_001248290	ĐT26	ĐT51	ĐT84	DT2008
1	12	C	C	C	G	C
2	23	A	G	G	A	A
3	24	G	C	T	G	G
4	26	T	T	T	T	A
5	33	C	C	G	C	C
6	37	G	G	C	G	G
7	38	A	A	A	A	T
8	60	A	A	G	A	A
9	74	A	A	T	A	A
10	82	T	A	T	T	A
11	91	G	G	G	A	G
12	97	G	C	G	G	G
13	112	A	C	A	A	A
14	115	A	A	T	A	A
15	134	A	G	A	A	A
16	140	C	C	C	G	G
17	159	G	C	C	C	C
18	177	A	A	A	A	T
19	244	G	G	G	C	G
20	409	G	T	G	G	G
21	443	C	A	C	C	C
22	448	T	A	T	T	T
23	484	A	G	A	A	A
24	598	T	T	T	A	T
25	621	A	C	A	A	A
26	625	C	C	C	C	G
27	633	A	A	A	A	T
28	635	T	T	T	G	T
29	639	C	C	C	G	C
30	651	A	G	A	A	A
31	654	C	T	T	T	G

Chọn 4 dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *GmCHI* của bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008, DT84 tiến hành giải trình tự nucleotide, kết quả thu được đoạn gen có kích thước 657 nucleotide đúng như tính toán. Bằng BLAST trong NCBI đã xác định được trình tự các gen đích có độ tương đồng so với gen *CHI* mang mã số NM\_001248290 (trình tự gen sử dụng thiết kế cặp môi nhân gen) từ 98% đến 99%. Kết quả đã khẳng định 4 trình tự gen phân lập từ bốn giống đậu tương trên là gen *GmCHI*. Như vậy, gen *GmCHI* phân lập từ các giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008 và DT84 có kích thước 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid.

Trình tự nucleotide của gen *GmCHI* của các giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008 và DT84 có độ tương đồng từ 96,8% đến 98,9%; tuy nhiên giữa các trình tự nucleotide xuất hiện 31 vị trí sai khác về nucleotide (bảng 2).

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI* phân lập từ các giống đậu tương ở hình 4 cho thấy, các trình amino acid suy diễn từ trình tự gen *GmCHI* có độ tương đồng từ 91,8% đến 97,7%, tuy nhiên, giữa các trình tự amino acid suy diễn xuất hiện 24 điểm sai khác, đó là các vị trí 4, 8, 9, 11, 13, 25, 28, 31, 33, 38, 39, 45, 47, 53, 82, 137, 148, 150, 162, 200, 209, 212, 213 và 217.



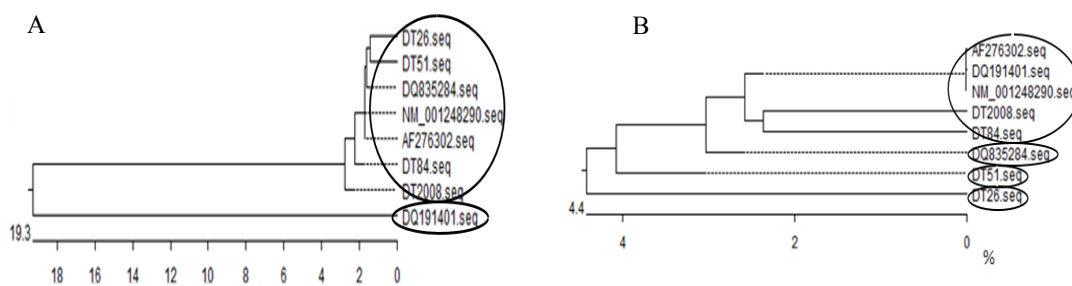
Hình 4. Trình tự amino acid suy diễn từ gen *GmCHI* của giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008 và DT84 so với NM\_001248290

#### Sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI*

Khi so sánh bằng BLAST trong NCBI, bốn trình tự gen *CHI* trên GenBank mang mã số AF276302, DQ191401, DQ835284 và NM\_001248290 cùng với 4 trình tự phân lập từ các giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT84 và

DT2008 được lựa chọn để phân tích sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI* phân lập từ cây đậu tương.

Sơ đồ hình cây dựa trên trình tự nucleotide (hình 5A) và trình tự amino acid (hình 5B) của gen *CHI* được thiết lập.



Hình 5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide (A) và trình tự amino acid (B)

Hình 5A cho thấy, dựa trên trình tự nucleotide các giống đậu tương phân bố trong hai nhánh, giống có trình tự gen *CHI* mang mã số DQ191401 phân bố ở một nhánh và 7 giống còn lại phân bố ở nhánh thứ hai, với khoảng cách di truyền là 19,3%. Giống DT26, DT51, DT2008 và DT84 được xếp trong cùng nhóm. Tuy nhiên, ở sơ đồ hình 5B dựa trên trình tự amino acid, các giống đậu tương phân bố trong hai nhánh chính, nhánh chính thứ nhất chỉ có giống DT26 và nhánh chính thứ hai gồm 7 giống còn lại, với khoảng cách di truyền là 4,4%. Nhánh chính thứ hai lại chia làm hai nhánh phụ và nhánh phụ thứ nhất chỉ có giống DT51. Giống DT2008 và DT84 phân bố trong một nhóm thuộc nhánh phụ thứ hai. Trong hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi của giống đậu tương DT26, hàm lượng daidzein và genistein cao nhất (64,27 mg/100 g) phân bố riêng ở một nhánh chính; giống DT51 có hàm lượng daidzein và genistein cao thứ hai (41,28 mg/100 g), phân bố ở một nhánh phụ thuộc nhánh chính thứ hai; giống DT2008 và DT84 có hàm lượng daidzein và genistein thấp nhất, phân bố trong một nhóm. Như vậy sự khác nhau về trình tự amino acid giữa giống DT26, DT51 và DT2008, DT84 liên quan đến sự chuyển hóa tổng hợp daidzein và genistein trong hạt đậu tương nảy mầm. Trình tự gen *GmCHI* phân lập từ giống có hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm cao nhất được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen nhằm nâng cao hàm lượng isoflavone ở đậu tương.

#### KẾT LUẬN

Hàm lượng daidzein, genistein trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của giống đậu tương DT26 cao nhất (64,27 mg/100 g) so với 5 giống đậu

tương được khảo sát và hàm lượng daidzein, genistein được xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp là DT26, DT51, DT90, DT84 và DT2008. Gen *GmCHI* phân lập từ mARN của các giống đậu tương DT26, DT51, DT2008 và DT84 có kích thước 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide của gen *GmCHI* ở bốn giống đậu tương DT26, DT51, DT2008 và DT84 từ 96,8% đến 98,9% và tương đồng với giống đậu tương mang mã số NM\_001248290 trên GenBank từ 98% đến 99%. Khoảng cách di truyền của giống DT26 so với các giống DT51, DT2008, DT84 và các giống khác dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI* là 19,3%, dựa trên trình tự amino acid suy diễn là 4,4%. Đoạn mã hóa của gen *GmCHI* được sử dụng làm nguyên liệu để thiết kế vector biểu hiện ở thực vật nhằm cải thiện hàm lượng isoflavone trong đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2016-TNA-18 và sự giúp đỡ của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Phòng Thí nghiệm Công nghệ gen, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alka P. M., Vivek V., Avinash G. P., 2011. Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacogn Rev.*, 5(9): 13-18.
2. Chen H., Zuo Y., Deng Y., 2001. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by

- high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2): 387-395.
- Jin A. K., Seung B. H., Woo S. J., Chang Y. Y., Kyung H. M., Jae G. G., Ill M. C., 2007. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. *Food Chemistry*, 102(3): 738-744.
  - Khalid A. L., Didier B., Valérie H., 2012. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signal Behav.*, 7(6): 636-641.
  - Kimura Y., Aoki T., Ayabe S., 2001. Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. *Plant Cell Physiol.*, 42(10): 1169-1173.
  - Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - Shirley B. W., Kubasek W. L., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel F. M., Goodman H. M., 1995. Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant*, 8(5): 659-671.
  - Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., deVos C. H. R., Colliver S., 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.*, 53(377): 2099-2106.
  - <http://www.isoflavones.info/>.

## THE CHARACTERISTICS OF *GmCHI* GENE ISOLATED FROM SOYBEAN CULTIVARS WITH DIFFERENT ISOFLAVONE CONTENT

Le Thi Hong Trang<sup>1,2</sup>, Tran Thị Thanh Van<sup>3</sup>, Ho Manh Tuong<sup>4</sup>,  
Pham Thanh Tung<sup>4</sup>, Le Van Son<sup>3</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Thai Nguyen University of Education, Thai Nguyen University

<sup>2</sup> Thai Nguyen College of Education

<sup>3</sup> Tan Trao University, Tuyen Quang

<sup>4</sup> Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

In this study, isoflavone content of five soybean varieties disseminated grown in North Vietnam have been surveyed, and the *GmCHI* gene encoding chalcone isomerase, a key enzyme in metabolizing synthetic isoflavone in soybeans, was analyzed. Content of isoflavone (daidzein, genistein) in 3-day-old germinated seeds of soybean cultivar DT26 was the highest (64.27 mg/100g) and higher 2.18 times and 2.45 times compared with DT84 and DT2008 respectively. *GmCHI* gene isolated from mRNA of the soybean cultivars DT26, DT51, DT2008, DT84 is 657 nucleotides in length, encoding 218 amino acids. Similarity coefficient of nucleotide sequence of *GmCHI* gene of four soybean DT26, DT51, DT2008, DT84 ranged from 96.8% to 98.9% and similar to those of NM\_001248290 on GenBank from 98% to 99%. Genetic distances of DT26 compared with DT51 DT26, DT2008, DT84 and other varieties based on nucleotide sequences of *GmCHI* gene was 19.3% and based on the amino acid sequence deduced was 4.4%. Coding region of *GmCHI* gene has been used as a material for design transformation vector for the improvement of isoflavone content in soybean by gene transfer technique.

*Keywords:* *Glycine max*, daidzein, genistein, chalcone isomerase gene, isoflavones.

Ngày nhận bài: 28-3-2016