

## PHÂN LẬP GIEN MÃ HÓA PRÔTÊIN VẬN CHUYỂN LIPÍT Ở CÂY ĐẬU XANH

NGUYỄN VŨ THANH THANH

*Trường đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên*

CHU HOÀNG MẬU

*Đại học Thái Nguyên*

Các protein vận chuyển lipít LTP (Lipid Transfer Proteins - LTP) là protein có liên quan tới đặc tính chịu khô hạn ở thực vật. LTP có khối lượng phân tử khoảng 9,12 kDa và có 8 phân tử xystein làm nhiệm vụ tạo ra 4 cầu nối disulfit [5]. LTP có khả năng xúc tác tới sự vận chuyển phospholipit giữa các lớp màng của tế bào [2, 3] và có thể hỗ trợ việc tạo ra lớp sáp hoặc lớp biểu bì giúp thực vật bảo vệ, phản ứng và đáp ứng lại những thay đổi của môi trường [3, 5].

Trong những năm gần đây, có nhiều công trình nghiên cứu và phân lập gen LTP từ cây *Arabidopsis thaliana* L. [1], *Zea mays* L. [8], *Triticum* L. [7], *Vigna radiata* L. [6] và *Oryza sativa* L. [9].

Dựa vào trình tự của gen mã hoá protein LTP đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AY300807, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại gen mã hoá protein LTP của đậu xanh bằng kỹ thuật PCR, nhằm phục vụ cho việc nghiên cứu các giống đậu xanh có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường. Đoạn gen LTP được nhân lên bằng phương pháp PCR sau đó gắn vào vectơ pBT, dòng hoá và đọc trình tự nuclêôtit của gen. Bài báo này trình bày kết quả phân lập gen LTP ở cây đậu xanh địa phương của tỉnh Cao Bằng.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Giống đậu xanh địa phương của Cao Bằng (kí hiệu CB) có đặc điểm: chống chịu tốt, vỏ hạt màu xanh bóng, khối lượng 1000 hạt khoảng 30,50 g.

Cặp mồi đặc hiệu sử dụng để nhân gen LTP có trình tự nuclêôtit và nhiệt độ gắn mồi được

trình bày ở bảng 1:

*Bảng 1*

**Cặp mồi nhân gen LTP**

Môi	Trình tự mồi (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi
Xuôi	ATGGCTAGCCTGAAGGTTGC	56°C
Ngược	TTACTTGATGTTAGCGCAGTT	56°C

#### 2. Phương pháp

ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp Gawel và Jarnet (1991) có cải tiến [4].

Nhân gen LTP bằng kỹ thuật PCR. PCR được tiến hành với tổng thể tích phản ứng 50 µl gồm: ADN mẫu (50 ng/µl) 4 µl, mồi (10 pM) 4 µl, dNTP (2,5 mM) 4 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 5 µl, *Taq* polymeraza (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 kì; 72°C - 10 phút và lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR của gen LTP được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Gen được làm sạch bằng bộ Kit của hãng Bioneer và gắn trực tiếp vào vectơ pBT, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Tách plasmit mang gen LTP phục vụ cho đọc trình tự gen bằng bộ Kit AccuPrep Plasmid Extraction của hãng Bioneer. Trình tự nuclêôtit của gen LTP được xác định trên máy đọc trình tự nuclêôtit tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystem. Kết quả đọc trình tự gen được xử lý bằng phần mềm DNASTar và BioEdit.

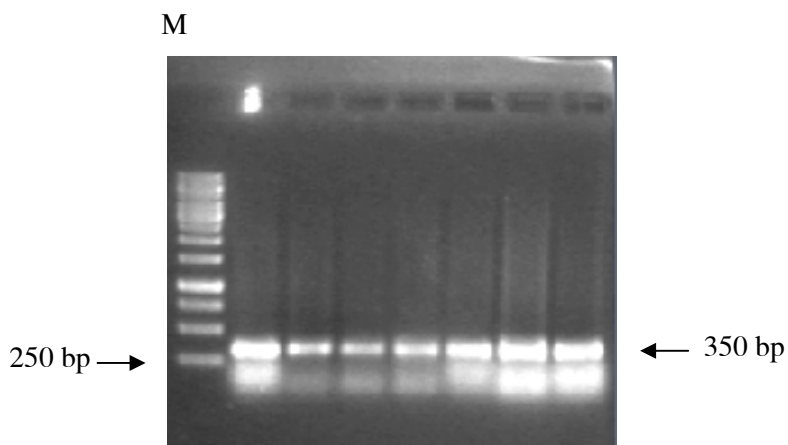
## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả PCR nhân gen LTP

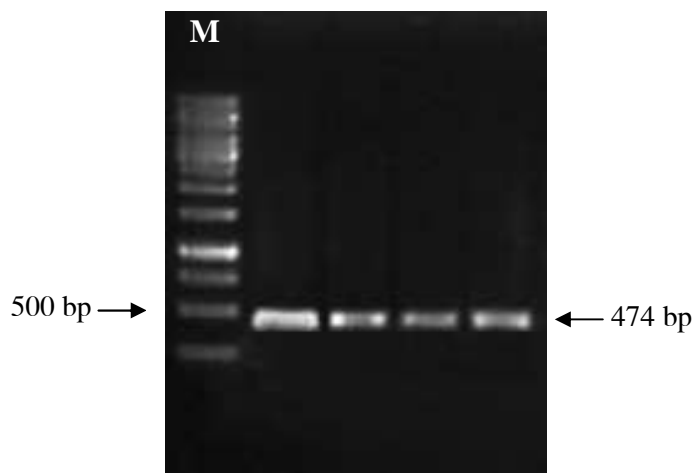
Dựa trên cơ sở dữ liệu khai thác từ Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AY300807, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân và phát hiện sự có mặt của gen LTP ở giống đậu xanh địa phương CB.

Đoạn gen LTP được nhân từ ADN tổng số

bằng phương pháp PCR. Kết quả điện di được thể hiện ở hình 1. Hình 1 cho thấy, đã nhân được một đoạn ADN đặc hiệu có kích thước khoảng 350 bp, hàm lượng của sản phẩm đủ lớn để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo. Độ dài của đoạn ADN vừa nhân được cũng phù hợp với lý thuyết khi chúng tôi thiết kế mồi và chiều dài cũng tương tự như với gen LTP đã đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số AY300807.



Hình 1. Hình ảnh điện di kết quả nhân gen LTP. M. Marker 1kb



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR M. Marker 1 Kb

### 2. Tách dòng gen LTP

Vì sản phẩm PCR có sản phẩm phụ nên chúng tôi đã tiến hành thoi gel để thu nhận đoạn gen mong muốn trước khi biến nạp. Quá trình tách dòng được thực hiện như sau: gắn sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch vào vectơ tách dòng pBT, rồi được biến nạp vào tế bào khả biến

chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Sau đó cấy trải trên môi trường LB đặc (pepton, cao nấm men, NaCl và agar) có kháng sinh ampicilin (100 mg/ml), IPTG (0,1 mM) và X - gal (40 mg/ml), ủ hộp lồng petri ở 37°C trong 16 giờ. Kết quả thu được có cả khuẩn lạc màu xanh và màu trắng (hình 2). Chọn 4 khuẩn

lạc có màu trắng chuyển sang nuôi ở môi trường có LB lỏng (có bổ sung ampicilin 100mg/ml) qua đêm. Lấy dịch nuôi chứa vi khuẩn kiểm tra sản phẩm chọn dòng bằng PCR với cặp môi pUC18 để xác định khuẩn lạc có mang gen mong muốn.

Sản phẩm colony - PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0,8% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromit 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím (hình 2).



**Hình 3.** Kết quả điện di tách plasmit mang gen LTP của giống đậu xanh CB

pUC là môi thiết kế chung cho các vectơ tách dòng nên khi kiểm tra sản phẩm PCR vừa dòng hóa thì kích thước của đoạn gen sẽ cao hơn 124 bp. Điều này có nghĩa là kích thước của đoạn gen vừa nhân khoảng 474 bp. Kết quả điện di ở hình 2 cho thấy, sản phẩm colony - PCR

những khuẩn lạc màu trắng đều cho kết quả dương tính với cả 4 băng. Các băng đều đúng kích thước dự đoán. Sau khi kiểm tra sản phẩm chọn dòng, chúng tôi tiếp tục tiến hành tách plasmit. Sản phẩm tách plasmit được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0,8% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromit 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím (hình 3).

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm tách plasmit sạch, đảm bảo chất lượng và số lượng phục vụ cho việc xác định trình tự nucleotit.

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

Để xác định chính xác trình tự nucleotit của gen LTP, chúng tôi tiến hành đọc trình tự nucleotit của gen LTP 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. Sau khi xử lý kết quả đọc trình tự nucleotit cho thấy, chiều dài gen LTP ở giống đậu xanh CB có kích thước 351 nucleotit. Khi so sánh trình tự này trong BLAST của NCBI, kết quả cho biết đây là các trình tự gen mã hoá LTP của đậu xanh.

Từ kết quả xác định trình tự ở trên, chúng tôi so sánh trình tự gen LTP của giống CB với trình tự của giống đậu xanh trên Ngân hàng gen Quốc tế có mã số AY300807. Kết quả hình 4 cho thấy, gen LTP của hai giống đậu xanh này có độ tương đồng cao (chỉ sai khác 4 nucleotit ở vị trí 276, 302, 313, 314).

	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	
		10	20	30	40	50
<b>AY300807</b>	ATGGCTAGCC	TGAAGGTTGC	ATGCATGGTT	GCGGTGGTGT	TCATGGTCGT	
<b>CB</b>	ATGGCTAGCC	TGAAGGTTGC	ATGCATGGTT	GCGGTGGTGT	TCATGGTCGT	
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	
		60	70	80	90	100
<b>AY300807</b>	GGTGAGTGCA	CATATGGCAC	ATGCGATCAC	GTGCGGGCAA	GTGGCCTCTT	
<b>CB</b>	GGTGAGTGCA	CATATGGCAC	ATGCGATCAC	GTGCGGGCAA	GTGGCCTCTT	
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	
		110	120	130	140	150
<b>AY300807</b>	CTTTGGCTCC	ATGCATCTCC	TACCTCCAAA	AGGGCGGAGT	TCCGTCCGGC	
<b>CB</b>	CTTTGGCTCC	ATGCATCTCC	TACCTCCAAA	AGGGCGGAGT	TCCGTCCGGC	
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	
		160	170	180	190	200
<b>AY300807</b>	TCGTGTTGCA	GCGGAGTGAA	GGCCCTGAAC	AGCGCCGCAA	GTACCACCGC	
<b>CB</b>	TCGTGTTGCA	GCGGAGTGAA	GGCCCTGAAC	AGCGCCGCAA	GTACCACCGC	
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	
		210	220	230	240	250
<b>AY300807</b>	TGACCGCAA	ACCGCGTGCA	ACTGTCTGAA	AAACCTTGCC	GGTCCAAAGT	
<b>CB</b>	TGACCGCAA	ACCGCGTGCA	ACTGTCTGAA	AAACCTTGCC	GGTCCAAAGT	
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	

	260	270	280	290	300
<b>AY300807</b>	CGGGTATCAA	CGAGGGCAAC	GCCGCTTCAC	TCCCAGGCAA	ATGTAAAGTC
<b>CB</b>	CGGGTATCAA	CGAGGGCAAC	GCCGCATCAC	TCCCAGGCAA	ATGTAAAGTC
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	310	320	330	340	350
<b>AY300807</b>	AACGTGCCCT	ACAAGATCAG	CACCTTCACC	AACTGCGCTA	ACATCAAGTA
<b>CB</b>	ATCGTGCCCT	ACTGGATCAG	CACCTTCACC	AACTGCGCTA	ACATCAAGTA
	351				
<b>AY300807</b>	A				
<b>CB</b>	A				

**Hình 4.** So sánh trình tự nuclêôtit của gen LTP ở giống đậu xanh CB và trình tự đã công bố AY300807

So sánh trình tự axit amin trong protein của gen LTP được phân lập chúng tôi nhận thấy, có hai vị trí sai khác là vị trí 101 (N thay bằng I) và vị trí 105 (K thay bằng G). Kết quả được thể hiện ở hình 5.

Sự sai khác về trình tự nuclêôtit và trình tự axit amin ở trên là cơ sở để chúng tôi có những nghiên cứu tiếp theo trên nhiều giống đậu xanh

hơn nữa và so sánh giữa hai nhóm chịu hạn tốt và kém nhằm tìm kiếm sự thay đổi vị trí các nuclêôtit và axit amin liên quan đến tính trạng chịu hạn của các giống đậu xanh địa phương. Đây là tiền đề tạo cơ sở cho việc nghiên cứu chọn tạo các giống đậu xanh có khả năng chịu hạn tốt phục vụ cho phát triển cây đậu xanh ở vùng Trung du và miền núi phía Bắc.

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	10	20	30	40	50
<b>AY300807</b>	MASLKVACMV	AVVFMVVSA	HMAHAITCGQ	VASSLAPCIS	YLQKGGVPSA
<b>CB</b>	MASLKVACMV	AVVFMVVSA	HMAHAITCGQ	VASSLAPCIS	YLQKGGVPSA
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	60	70	80	90	100
<b>AY300807</b>	SCCSGVKALN	SAASTTADRK	TACNCLKNLA	GPKSGINEGN	AASLPGKCKV
<b>CB</b>	SCCSGVKALN	SAASTTADRK	TACNCLKNLA	GPKSGINEGN	AASLPGKCKV
	.... ....	.... ..			
	110				
<b>AY300807</b>	NVPYKISTFT	NCANIK*			
<b>CB</b>	IVPYWISTFT	NCANIK*			

**Hình 5.** So sánh trình tự axit amin trong protein LTP của giống đậu xanh CB và AY300807

### III. KẾT LUẬN

Đã nhân được gen LTP bằng phản ứng PCR với cặp môi 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 pBT. Trình tự nuclêôtit được xác định và xử lý cho kết quả gen LTP của giống đậu xanh CB nghiên cứu dài 351 nuclêôtit. Sản phẩm protein dài 116 axit amin. So sánh trình tự nuclêôtit của giống đậu xanh CB với giống đậu xanh có mã số AY300807 trên Ngân hàng gen Quốc tế cho thấy gen LTP thu được có độ tương đồng rất cao (98,8%), còn trình tự axit amin tương đồng 98,2%.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aronde V. et al.**, 2000: Plant Science, 157: 1-12.
2. **Blein J. P. et al.**, 2002: Trends in Plant Science, 7: 293-296.
3. **Bourgis F., Kader J. P.**, 1997: Physiol Plant, 100: 78-84.
4. **Gawel N. J., Jarret R. L.**, 1991: Genomic DNA isolation. [Http://www.igd.cornell.edu/pretoria%20lab%20manual.doc](http://www.igd.cornell.edu/pretoria%20lab%20manual.doc).
5. **Kader J. C.**, 1996: Annual Review of Plant Molecular Biology, 47: 627-654.

6. Liu K. H., Lin T. Y., 2003: DNA Sequence-The Journal of sequencing and mapping, 14(6): 420-426.
7. Monia A., Garcia O. F., 1993: The Plant Journal, 4: 983-991.
8. Sossountzov L. et al., 1991: The Plant Cell, 3: 923-933.
9. Vignols F. et al., 1994: Gene, 142: 420-426.

## ISOLATION OF GENE ENCODING LTP (LIPID TRANSFER PROTEINS) FROM VIETNAMESE MUNGBEAN

NGUYEN VU THANH THANH, CHU HOANG MAU

### SUMMARY

LTP (Lipid transfer proteins) protein is associated with tolerance to drought in plant. LTP have the ability to transfer phospholipids between membrane vesicles. LTP is implicated in cuticle biosynthesis and thought to play a role in the protection of plant. LTP are 9.12 kDa cysteine-rich cationic peptides and contain 8 cysteine residues formed 4 disulfide bridges [2, 3, 5]. LTP have been isolated from *Arabidopsis thaliana* L. [1], *Zea mays* L. [8], *Triticum* L. [7], *Vigna radiata* L. [6] and *Oryza sativa* L. [9].

Based on the sequence of LTP gene of a mungbean cultivar in NCBI sequence database with the accession number AY300807, specific primer pair was designed to amplify the gene in a Vietnamese mungbean cultivar using polymerase chain reaction (PCR). The PCR product containing the LTP fragment was cloned in pBT vector and the sequencing of the fragment was carried out using ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystem). 351 nucleotides in length of LTP gene fragment was successfully amplified from Vietnamese mungbean cultivar. The correspond a polypeptide sequence of obtained LTP gene was 116 amino acids residues.

*Ngày nhận bài: 20-5-2008*