

TÁCH DÒNG GEN CYSTATIN II PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ MẪU NGŨ ĐỊA PHƯƠNG VIỆT NAM

Vì Thị Xuân Thủy¹, Hồ Mạnh Trường², Lê Văn Sơn²,
Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu^{3*}

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

³Đại học Thái Nguyên, *chuhuongmau@tnu.edu.vn

TÓM TẮT: Cystatin là một dạng protein ức chế hoạt động của cysteine proteinase và đóng vai trò như cơ chất để xâm nhập vào trung tâm hoạt động của cysteine proteinase, vì vậy ngăn cản việc đi vào của cơ chất protein khác. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen cystatin II phân lập từ mRNA của bốn mẫu ngô địa phương (SL, LC1, LC2, LC3) và giống ngô lai CP888. Gen cystatin II phân lập được có kích thước 405 bp, mã hoá protein cystatin gồm 134 axit amin. Kết quả so sánh trình tự amino acid của protein suy diễn của năm mẫu ngô và cystatin (mã số D38130) trên Ngân hàng Gen quốc tế cho thấy có 22 axit amin khác nhau, nhưng không có sự khác biệt trong vùng chức năng CY. Gen cystatin II được sử dụng để phát triển vector chuyển gen nhằm mục đích cải thiện khả năng chống mọt ở ngô.

Từ khóa: Cây ngô, gen cystatin II, tách dòng gen, trình tự nucleotide.

MỞ ĐẦU

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong năm loại cây lương thực chính của thế giới. Hạt ngô chứa khá đầy đủ các chất dinh dưỡng cho người và gia súc. Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau lúa gạo. Trong những năm gần đây, sản xuất ngô ở Việt Nam tăng nhanh nhờ sự thúc đẩy của ngành chăn nuôi và công nghiệp chế biến. Đặc biệt từ những năm 1990 trở lại đây, diện tích, năng suất và sản lượng ngô tăng liên tục nhờ đưa ngô lai vào trồng trên diện tích rộng.

Các giống ngô lai cho năng suất cao nhưng giá thành, chất lượng bị giảm nhiều do hạt của các giống ngô này rất dễ bị mọt xâm hại. Một ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch.) là loại đa thực, chúng có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc, trong đó có ngô. Các biện pháp bảo quản hạt giống ngô sau thu hoạch thường tốn thời gian, hiệu quả thấp và tổn thất sau thu hoạch vẫn rất lớn.

Cystatin là protein ức chế hoạt động của cysteine proteinase (cysteine proteinase inhibitor - CPI), tìm thấy ở động vật, thực vật và vi sinh vật. Ở mọt, cysteine proteinase là enzyme tiêu hóa, nếu bị ức chế thì sự tiêu hóa

của mọt sẽ bị cản trở [2, 7]. Chính vì vậy, tiếp cận nghiên cứu nhằm tăng cường khả năng ức chế cysteine proteinase ở một ngô bằng kỹ thuật gen được quan tâm nghiên cứu.

Các giống ngô địa phương miền núi phía Bắc của Việt Nam tuy có năng suất thấp, hạt nhỏ nhưng có khả năng kháng mọt cao, do đó dễ bảo quản hơn so với các giống ngô lai năng suất cao đang được trồng phổ biến. Vì vậy, nghiên cứu tạo giống ngô vừa có năng suất cao vừa có khả năng kháng mọt là chiến lược trong ngành chọn giống ngô bằng công nghệ gen.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen cystatin II (cDNA) nhằm tạo nguyên liệu để thiết kế vector mang gen cystatin II phục vụ tạo dòng ngô chuyển gen có khả năng kháng mọt cao.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng bốn mẫu ngô địa phương thu thập ở tỉnh Sơn La, Lào Cai và giống ngô lai CP888 do Trung tâm giống cây trồng Sơn La cung cấp (bảng 1).

Bảng 1. Các mẫu/giống ngô sử dụng nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
1	SL	Mai Sơn - Sơn La
2	LC1	Sì Ma Cai - Lào Cai
3	LC2	Sì Ma Cai - Lào Cai
4	LC3	Sì Ma Cai - Lào Cai
5	CP888	Giống ngô lai CP888

RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent KIT; cDNA được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cDNA Synthesis KIT; gen cystatin được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu theo chu kỳ nhiệt: 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ: (94°C/45 giây - 58°C/30 giây-72°C/60 giây); 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%; tinh sạch sản phẩm PCR theo GeneJET PCR Purification KIT và gắn vào vector tách dòng pBT rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30 giây). Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal, IPTG, kháng sinh carbenicilin và bằng colony-PCR với cặp mồi M13. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử [5]. Trình tự gen cystatin được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130 - USA/Japan. Số liệu được xử lý bằng phần mềm BioEdit, DNASTar.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại, tách dòng và xác định trình tự gen cystatin II từ các mẫu ngô nghiên cứu

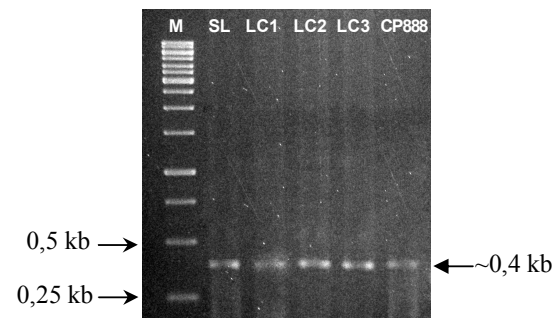
Dựa trên những thông tin của Abe (1991) [1] về trình tự gen cystatin II của ngô đã công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế có mã số D38130, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu ZmCysF/ZmCysR để khuếch đại đoạn mã hoá của gen cystatin II với kích thước khoảng 0,4 kb.

ZmCysF: 5' CACCATGCCCAACAAACA TCGAATCG 3'; ZmCysR: 5' TTAGGCGCTA GCACCCTCTCA 3'.

RNA tổng số được tách chiết từ lá của các cây ngô 5-7 ngày tuổi, RNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã ngược

tao cDNA với mồi ngẫu nhiên (Random Hexamer Primer). Phản ứng PCR nhân bản đoạn mã hóa của gen cystatin II với cặp mồi đã thiết kế ZmCysF/ZmCysR, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose cùng marker 1 kb được thể hiện ở hình 1.

Kết quả thu được ở hình 1 cho thấy, cả 5 mẫu ngô đều cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 0,4 kb, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen cystatin II ở ngô mang mã số D38130 trên Ngân hàng Gen quốc tế. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là gen cystatin II chúng tôi đã tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen cystatin II được công bố trên NCBI.



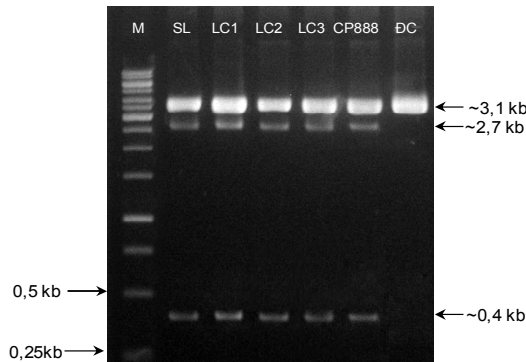
Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen cystatin II của các mẫu ngô nghiên cứu (M: DNA Marker 1 kb; SL, LC1, LC2, LC3: các mẫu ngô địa phương; CP888: giống ngô lai)

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pBT, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α và chọn lọc khuẩn lạc trắng bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi M13. Những khuẩn lạc trắng dương tính với colony-PCR có khả năng mang vector tái tổ hợp pBT_{cystatinII}. Sau khi tách plasmid từ sinh khối vi khuẩn, chúng tôi thực hiện kiểm tra sự có mặt của gen cystatin II bằng cách sử dụng enzyme giới hạn BamHI để cắt plasmid tái tổ hợp (hình 2).

Theo tính toán lý thuyết, vector pBT có kích thước 2,7 kb, sản phẩm PCR của gen đích 0,4 kb thì plasmid tái tổ hợp có kích thước khoảng 3,1 kb. Kết quả điện di kiểm tra (hình 2) cho

thấy, các dòng khuẩn lạc trắng dương tính với colony-PCR đều mang plasmid tái tổ hợp

(*pBT_cystatin II*). Các plasmid tái tổ hợp được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.



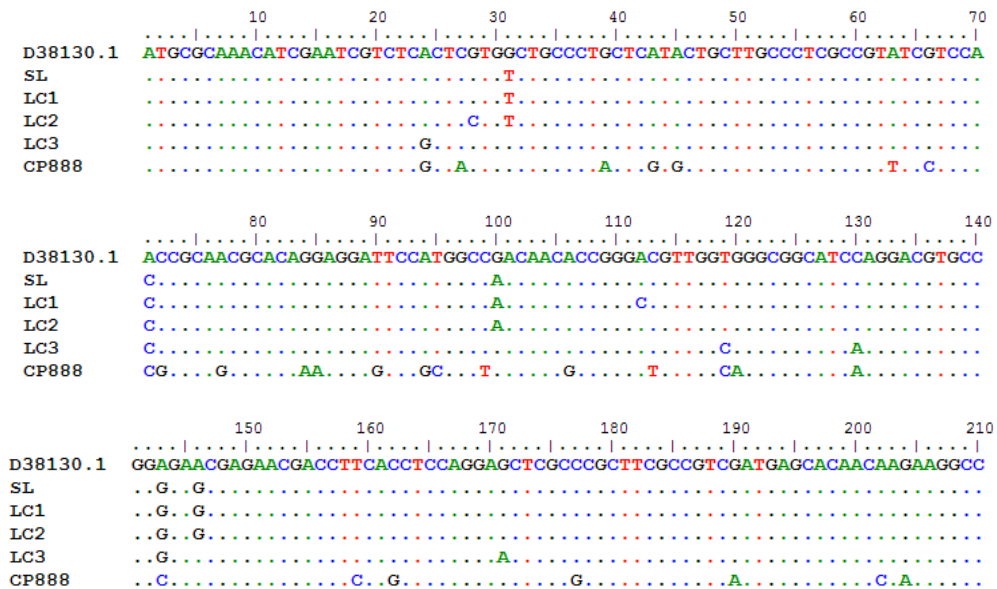
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp cắt bằng *Bam*HI

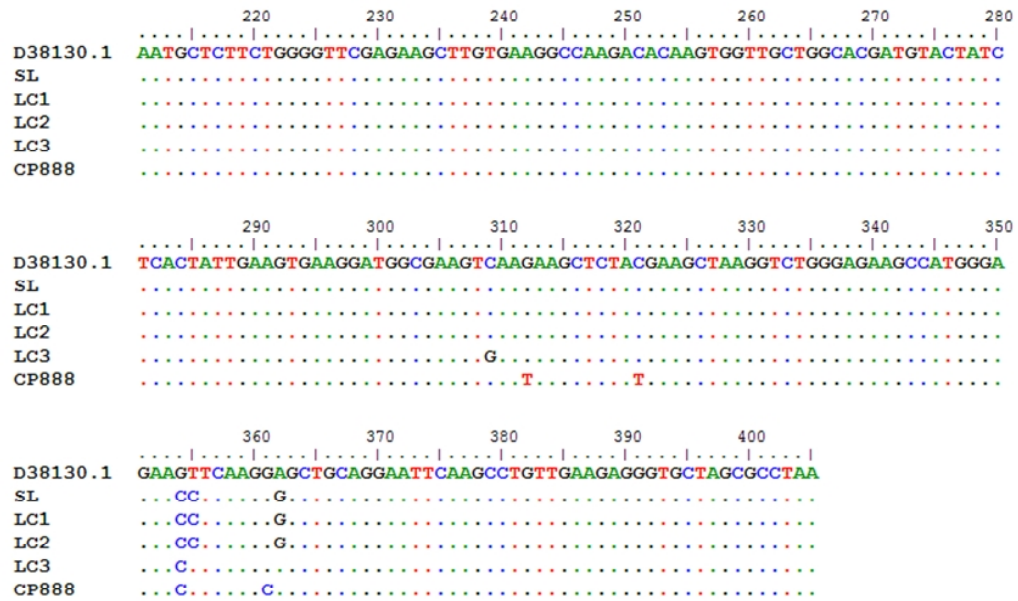
M. DNA marker 1 kb; SL, LC1, LC2, LC3, CP888: plasmid tái tổ hợp *pBT_cystatinII* cắt bởi *Bam*HI; ĐC. plasmid tái tổ hợp *pBT_cystatinII* không cắt bởi *Bam*HI)

Xác định trình tự cDNA cystatin II

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen cystatin II phân lập từ các mẫu ngô nghiên cứu cho thấy cả 5 trình tự gen thu được đều có kích thước 405 bp và có độ tương đồng cao (hình 3). Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen cystatin II ở 5 mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide của gen cystatin II công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế có mã số D38130 ở bảng 2 cho thấy độ tương đồng của các trình tự gen này là

91,1-99,8%. Giữa các trình tự gen cystatin II có 41 vị trí nucleotide sai khác, trong đó có 13 vị trí nucleotide (24, 28, 31, 100, 112, 119, 130, 143, 146, 171, 354, 355, 362) sai khác giữa các mẫu nghiên cứu và trình tự gen mã D38130, có tới 28 vị trí nucleotide có sự sai khác giữa giống ngô lai CP888 và các trình tự gen khác (khả năng kháng một giống CP888 là kém nhất). Như vậy, rất có thể sự sai khác này có liên quan đến khả năng kháng một của cây ngô.





Hình 3. Trình tự gen cystatin II của các mẫu ngô nghiên cứu và D38130 trên Ngân hàng Gen Quốc tế

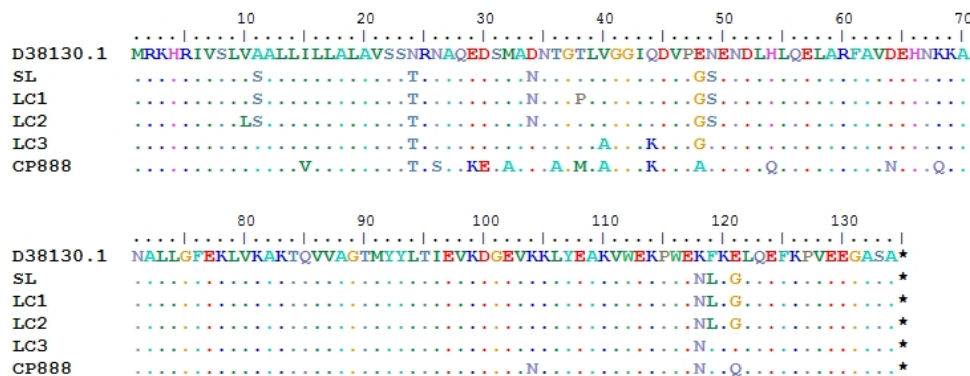
Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự gen cystatin II của các mẫu ngô nghiên cứu và D38130 của Ngân hàng Gen quốc tế

STT	Vị trí	D38130	SL	LC1	LC2	LC3	CP888
1	24	A	A	A	A	G	G
2	27	C	C	C	C	C	A
3	28	G	G	G	C	G	G
4	31	G	T	T	T	G	G
5	39	G	G	G	G	G	A
6	43	A	A	A	A	A	G
7	45	A	A	A	A	A	G
8	63	A	A	A	A	A	T
9	66	G	G	G	G	G	C
10	71	A	A	A	A	A	C
11	72	C	C	C	C	C	G
12	77	A	A	A	A	A	G
13	84	G	G	G	G	G	A
14	85	G	G	G	G	G	A
15	90	T	T	T	T	T	G
16	94	A	A	A	A	A	G
17	95	T	T	T	T	T	C
18	99	C	C	C	C	C	T
19	100	G	A	A	A	G	G
20	106	A	A	A	A	A	G
21	112	A	A	C	A	A	A
22	113	C	C	C	C	C	T
23	119	T	T	T	T	C	C

24	120	G	G	G	G	G	A
25	130	C	C	C	C	A	A
26	143	A	G	G	G	G	C
27	146	A	G	G	G	A	A
28	159	T	T	T	T	T	C
29	162	C	C	C	C	C	G
30	171	G	G	G	G	A	G
31	177	C	C	C	C	C	G
32	190	G	G	G	G	G	A
33	202	A	A	A	A	A	C
34	204	G	G	G	G	G	A
35	309	C	C	C	C	G	A
36	312	G	G	G	G	G	T
37	321	C	C	C	C	C	T
38	354	G	C	C	C	C	C
39	355	T	C	C	C	T	T
40	361	G	G	G	G	G	C
41	362	A	G	G	G	A	A

Kết quả so sánh protein suy diễn của gen cystatin II ở các mẫu nghiên cứu và D38130 của Ngân hàng Gen quốc tế ở hình 4 và bảng 3 cho thấy các trình tự axit amin đều có 134 axit amin

và có độ tương đồng là 85,0% đến 99,2%. Như vậy, có thể kết luận đã nhân bản và tách dòng thành công gen cystatin II (cDNA) từ các mẫu ngô nghiên cứu.



Hình 4. Trình tự axit amin của cystatin ở các mẫu nghiên cứu và D38130 trên Ngân hàng Gen quốc tế

CY là vùng chức năng của cystatin gồm 87 axit amin, từ axit amin thứ 41 đến axit amin thứ 127. Hình 4 cho thấy, trong vùng này có 10 vị trí axit amin khác nhau, trong đó cũng có các vị trí thứ 54, 64, 68, 104 chỉ có sự sai khác của giống CP888 so với các trình tự khác, sự sai khác này có thể liên quan đến khả năng ức chế

hoạt động cysteine proteinase của cystatin. Trong vùng CY của cystatin có 5 điểm gắn kết với enzyme là các axit amin thứ 41 (Glycine), 85 (Glutamine), 86 (Valine), 87 (Valine), 89 (Glycine), kết quả phân tích cho thấy không có sự sai khác giữa các mẫu nghiên cứu và D38130 của Ngân hàng Gen quốc tế.

Bảng 3. Các vị trí sai khác giữa trình tự axit amin suy diễn của cystatin ở các mẫu ngô nghiên cứu và D38130 trên Ngân hàng Gen quốc tế

STT	Vị trí	D38130.1	SL	LC1	LC2	LC3	CP888
1	10	V	V	V	L	V	V
2	11	A	S	S	S	A	A
3	15	I	I	I	I	I	V
4	24	N	T	T	T	T	T
5	26	N	N	N	N	N	S
6	29	E	E	E	E	E	K
7	30	D	D	D	D	D	E
8	32	M	M	M	M	M	A
9	34	D	N	N	N	D	D
10	36	N	N	N	N	N	A
11	38	T	T	P	T	T	M
12	40	V	V	V	V	A	A
13	44	Q	Q	Q	Q	K	K
14	48	E	G	G	G	G	A
15	50	N	S	S	S	N	N
16	54	H	H	H	H	H	Q
17	64	D	D	D	D	D	N
18	68	K	K	K	K	K	Q
19	104	K	K	K	K	K	N
20	118	K	N	N	N	N	N
21	119	F	L	L	L	F	F
22	212	E	G	G	G	E	Q

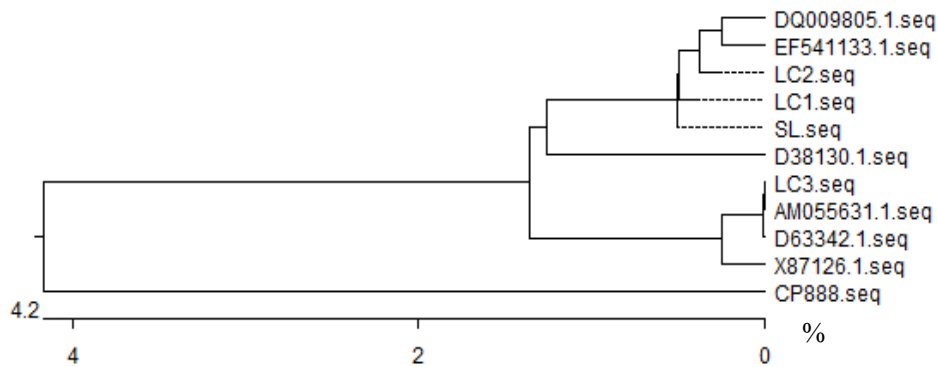
Sự đa dạng về trình tự gen cystatin II ở ngô

Chúng tôi đã tiến hành so sánh vùng mã hóa của trình tự gen cystatin II của 5 mẫu ngô nghiên cứu với 5 trình tự gen cystatin II của ngô được phân lập ở các quốc gia khác nhau, mẫu

nghiên cứu, mã số gen trên Ngân hàng Gen quốc tế, vùng phân lập được trình bày ở bảng 5. Kết quả đánh giá sự đa dạng của trình tự gen cystatin II của 10 giống ngô nghiên cứu được thể hiện trên sơ đồ hình cây ở hình 5.

Bảng 5. Mẫu ngô nghiên cứu/mã số, vùng phân lập sử dụng trong phân tích so sánh trình tự vùng mã hóa gen cystatin II

STT	Mẫu/Mã số NCBI	Năm công bố	Vùng phân lập
1	SL	2014	Việt Nam
2	LC1	2014	Việt Nam
3	LC2	2014	Việt Nam
4	LC3	2014	Việt Nam
5	CP888	2014	Việt Nam
6	AM055631.1	2005	Pháp
7	D63342.1	2000	Nhật Bản
8	DQ009805.1	2005	Hoa Kỳ
9	EF541133.1	2007	Ấn Độ
10	X87126.1	2006	Anh



Hình 5. Mối quan hệ di truyền của một số trình tự gen cystatin II ở ngô

Sơ đồ hình cây ở hình 5 cho thấy 10 trình tự vùng mã hóa của gen cystatin II ở ngô chia thành hai nhóm lớn, với khoảng cách di truyền là 4,3%. Nhóm lớn thứ nhất, gồm 9 trình tự gen và chia thành hai nhóm nhỏ. Nhóm nhỏ thứ nhất, gồm các trình tự gen có quan hệ gần gũi với nhau, bao gồm mẫu LC3 và các trình tự mang mã AM055631 (Pháp), D63342 (Nhật Bản) và X87126 (Anh). Nhóm nhỏ thứ hai gồm các mẫu SL, LC1, LC2 và các gen mang mã DQ009805 (Hoa Kỳ), EF541133 (Ấn Độ). Nhóm lớn thứ hai, chỉ duy nhất một trình tự gen của mẫu CP888.

Chúng tôi tiếp tục phân tích, so sánh 5 axit amin có chức năng gắn kết với cysteine proteinase trong vùng chức năng CY, là vị trí axit amin thứ 41 (Glycine), 85 (Glutamine), 86 (Valine), 87 (Valine), 89 (Glycine), kết quả cho thấy cả 5 axit amin của các protein ở các trình tự so sánh không có sự sai khác. Như vậy, điểm gắn kết của cystatin với cysteine proteinase có tính bảo thủ cao.

Một ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch.) là loại đa thực, chúng có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc. Một trường thành dùng vòi khoét một lỗ sâu vào hạt, rồi để trứng và sâu non nở ra, ăn phôi và nội nhũ [3, 6]. Enzyme tiêu hóa cysteine proteinase ở sâu non hoạt động phân cắt peptide từ thức ăn. Tuy nhiên, khi cystatin xâm nhập vào trung tâm hoạt động của cysteine proteinase thì cystatin sẽ ngăn cản sự liên kết của cysteine proteinase với cơ chất protein khác, dẫn đến ức chế hoạt động của cysteine proteinase [4] và làm một không tiêu hóa được protein từ thức ăn [2, 7]. Chính vai trò ức chế

của cystatin đối với sự tiêu hóa protein của sâu non một ngô đã gợi ý chúng tôi nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen trong việc nâng cao hàm lượng cystatin trong hạt nhằm cải thiện khả năng kháng một ở cây ngô.

KẾT LUẬN

Gen cystatin II phân lập từ mRNA của các mẫu ngô địa phương SL, LC1, LC2, LC3 và giống ngô lai CP888 có kích thước là 405 bp mã hóa chuỗi polypeptide dài 134 axit amin. Trình tự nucleotide của gen cystatin II các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 41 vị trí nucleotide và 22 vị trí axit amin trong protein cystatin. Trong đó mẫu CP888 có sự sai khác lớn nhất so với các mẫu nghiên cứu và trình tự mang mã số D38130 trên Ngân hàng Gen quốc tế. Các axit amin có chức năng gắn kết với cysteine proteinase của vùng CY có tính bảo thủ cao và không có sự sai khác nào giữa các protein. Trình tự gen cystatin II thu nhận được từ các mẫu ngô nghiên cứu là cơ sở để tiếp tục thiết kế vector phục vụ chuyển gen ở cây ngô.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành có sự dụng thiết bị Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học và thuộc nội dung của đề tài Khoa học - Công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số: B2014-TN06-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe M., Arai S., 1991. Some properties of a cysteine proteinase inhibitor from corn endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, 55(9): 2417-2418.

2. Grudkowska M., Zagdanska B., 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinase. *Acta Biochimica Polonica*, 51: 609-624.
3. Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J., Gomez-Lim M. A., 1999. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat. Biotechnol.*, 17: 1223-1226.
4. Meriem B., Urte S., Juan V., Marie-Claire G., Dominique M., 2010. Plant cystatins, *Biochimie*, 92: 1657-1666.
5. Sambrook J., Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
6. Throne J. E., 1994. Life History of Immature Maize Weevils (Coleoptera: Curculionidae) on Corn Stored at Constant Temperatures and Relative Humidities in the Laboratory. *Environ. Entomol.*, 23(6): 1459-1471.
7. Turk B., Turk V., Turk D., 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem. Hopp seyler*, 378(3-4): 141-150.

CLONING OF CYSTATIN II GENE ISOLATED FROM SOME MAIZE SAMPLES IN VIETNAM

**Vi Thi Xuan Thuy¹, Ho Manh Tuong², Le Van Son²,
Nguyen Vu Thanh Thanh³, Chu Hoang Mau³**

¹Tay Bac University

²Institute of Biotechnology, VAST

³Thai Nguyen University

SUMMARY

Cystatin is the protein inhibitor of cysteine proteinase activity, it roles as a substrate into the active center of cysteine proteinase, that prevents the other substrate proteins go into. In this report, we present the results of isolated, cloning and determine the cystatin II gene sequence of four local maize samples (SL, LC1, LC2, LC3) and CP888 maize cultivar. The coding region of cystatin II gene isolated from some maize samples had the size of 405 nucleotides, coding 134 amino acids. The comparative results of amino acid sequence of deductive protein of five maize samples and cystatin (code number D38130) in GenBank showed has 22 different amino acids, but found no difference in the CY region. The cystatin II gene be used to development of transgenic vector aims at improve resistance to maize weevil.

Keyword: Zea mays, cystatin, cysteine proteinase, cystatin II gene, maize weevil.

Ngày nhận bài: 23-1-2014