

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA MỘT SỐ GIỐNG NGŌ VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN CYSTATIN Ở GIỐNG NGŌ LVN885

Nguyễn Vũ Thanh Thanh<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Thảo<sup>1\*</sup>,  
Đặng Thị Hoa<sup>1</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học ĐHQG Huế, <sup>2</sup>Đại học Thủ Đức, <sup>3</sup>Đại học Huế

### TÓM TẮT

Cystatin là protein ức chế cystein protease thuộc họ papain. Ở thực vật, cystatin được khẳng định là gen liên quan đến khả năng chịu hạn. Phyto-cystatin ở thực vật là một nhóm của họ cystatin. Chức năng quan trọng của phyto-cystatin là: điều chỉnh quá trình phân giải protein trong suốt giai đoạn hạt tiềm sinh hoặc giai đoạn hạt nảy mầm; góp phần bảo vệ thực vật bằng cách ngăn ngừa sự phân giải các protease ngoại sinh là các loại côn trùng gây hại, giun tròn, và một số chức năng khác.

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả nhân gen cystatin từ DNA tổng số của giống ngô LVN885 bằng kỹ thuật PCR và đánh giá khả năng chịu hạn của một số giống ngô có khả năng chịu hạn khác nhau. Gen cystatin có kích thước 405 bp. Sản phẩm PCR chứa gen cystatin được tạo đồng trong vector pBT và đã được xác định trình tự gen. So sánh trình tự nucleotide của gen cystatin đã xác định với trình tự gen cystatin có mã số D38130 cho thấy mức độ tương đồng là 99,2%. Mức độ tương đồng amino acid suy diễn của protein cystatin cũng cao (97,7%).

**Từ khóa:** Cystatin, ngô, hạn, phân lập gen, Zea mays L.

### MỞ ĐẦU

Ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau cây lúa và là cây màu quan trọng nhất được trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Cây ngô không chỉ cung cấp lương thực cho người, vật nuôi mà còn là cây trồng xóa đói giảm nghèo tại các tỉnh có điều kiện kinh tế khó khăn [5]. Do diễn biến thời tiết phức tạp và hạn hán thường xuyên xảy ra nên năng suất ngô của nước ta vẫn còn thấp. Chính vì vậy, nhiều nghiên cứu ở mức độ phân tử đã tìm kiếm và phân tích các gen liên quan đến đặc tính chịu hạn của cây ngô. Các nghiên cứu đều thống nhất rằng đặc tính chịu hạn của cây ngô do nhiều gen quy định, trong đó có gen cystatin.

Gen cystatin ở thực vật mã hóa cho protein cystatin ức chế hoạt động của cystein proteaza. Cystatin proteaza là enzym có vai trò thiết yếu trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, sự già và chết theo chương trình của tế bào, trong sự tích lũy protein dự trữ trong hạt, huy động protein dự trữ và khả năng chống chịu với những stress của môi trường. Khi stress hạn xảy ra, một số protein bị biến tính và tồn dư, cystatin

proteaza tham gia loại bỏ các protein biến tính. Quá trình này có thể bị cản trở bởi các chất ức chế cystatin proteaza được gọi là cystatin. Cystatin thuộc họ phyto-cystatin, khi cây trồng gặp hạn cystatin đóng vai trò như cơ chất để xâm nhập vào trung tâm hoạt động của cystein proteaza, ức chế khả năng hoạt động của enzym, làm giảm hoạt động phân giải protein [3], [8], [10].

Đến nay, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về phân lập, biểu hiện gen cystatin từ nhiều loài cây trồng khác nhau, như đậu tương, lạc, lúa, ngô, [1], [3], [7], [9].

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu

- Sử dụng 10 giống ngô lai do Viện nghiên cứu Ngô (Đan Phượng - Hà Nội) cung cấp làm vật liệu nghiên cứu. Tên và đặc điểm của các giống ngô được trình bày ở bảng 1.

- Cấp môi cystatin được chúng tôi thiết kế đưa trên sự phân tích trình tự gen cystatin ở giống ngô được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế với mã số AF454396 và đặt tại hãng Bioneer (bang 2).

- Các loại hóa chất, dụng cụ và thiết bị phục vụ cho thí nghiệm sinh học phân tử.

\* Tel: 0915 874262

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 10 giống ngô nghiên cứu**

| STT | Giống   | Hình thái hạt | Màu vỏ hạt | Khối lượng 100 hạt (g) |
|-----|---------|---------------|------------|------------------------|
| 1   | LVN 9   | Bán răng ngựa | Vàng nhạt  | 30,05 ± 0,02           |
| 2   | LVN 10  | Hạt bán đá    | Vàng cam   | 30,18 ± 0,02           |
| 3   | LVN 45  | Hạt sâu cay   | Vàng cam   | 34,56 ± 0,01           |
| 4   | LVN 61  | Hạt răng ngựa | Vàng       | 29,99 ± 0,02           |
| 5   | LVN 66  | Bán răng ngựa | Vàng cam   | 31,86 ± 0,01           |
| 6   | LVN 092 | Hạt bán đá    | Vàng cam   | 24,72 ± 0,01           |
| 7   | LVN 99  | Hạt bán đá    | Vàng cam   | 24,47 ± 0,02           |
| 8   | LVN 145 | Bán răng ngựa | Vàng cam   | 30,36 ± 0,01           |
| 9   | LVN 885 | Hạt sâu cay   | Vàng       | 26,16 ± 0,01           |
| 10  | C 919   | Bán răng ngựa | Vàng cam   | 29,17 ± 0,03           |

**Bảng 2. Cặp mồi nhân gen *cystatin***

| Mồi | Trình tự mồi                    | Nhiệt độ gắn mồi |
|-----|---------------------------------|------------------|
| CF  | CATGCCATGGATGCGCAAACATCGAATCGTC | 52°C             |
| CR  | ATTTCGGCGCCGCGCTAGCACCCCTCTTCAA | 52°C             |

**Phương pháp nghiên cứu**

- Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của 10 giống ngô lai ở giai đoạn cây non theo phương pháp của Lê Trần Bình và đtg [2].

- Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Gaweł và Jarosz [3].

- Nhân gen *cystatin* bằng kỹ thuật PCR. PCR được tiến hành với tổng thể tích phản ứng 25  $\mu$ l gồm DNA mẫu (50 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, mồi (10 pM) 4  $\mu$ l, dNTP (2,5 mM) 2  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2,5  $\mu$ l, Taq polymerase (5 unit/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, buffer PCR (10X) 2,5  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O khử ion 9  $\mu$ l. Chu trình nhiệt bao gồm các bước sau: 94°C-3 phút; 94°C-30 giây, 52°C-1 phút, 72°C-1 phút lặp lại 30 chu kỳ; 72°C - 10 phút và lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR nhân gen *cystatin* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Gen được làm sạch (thời gel) theo bộ Kit AccuPrep<sup>®</sup> Gel Purification (Bioneer) và gắn vào vector pBT, sau đó được biến nạp vào tế bào kha biến *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ .

- Tách plasmid tái tổ hợp bằng bộ kit của hãng Bioneer.

- Để xác định trình tự nucleotide của gen *cystatin* trên thiết bị giải trình tự tự động ABI

PRISM-a 3100 Advant Genetic Analyzer tại viện Công nghệ Sinh học. Kết quả được phân tích bằng phần mềm BioEdit

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN****Khả năng chịu hạn của các giống ngô nghiên cứu**

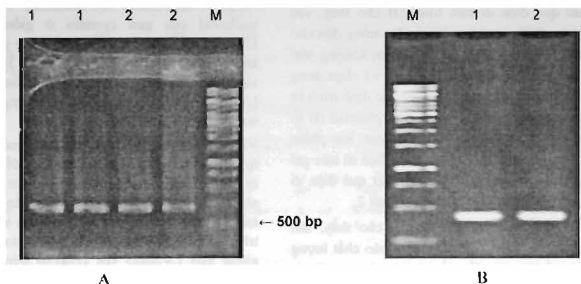
Để đánh giá khả năng chịu hạn của các giống ngô nghiên cứu, tạo cơ sở cho việc chọn giống ngô có khả năng chịu hạn cao, chúng tôi tiến hành đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các giống ngô ở giai đoạn cây non theo tỉ lệ: tỉ lệ cây không héo, tỉ lệ cây phục hồi sau 3, 5, 7, 9 ngày thí nghiệm. Kết quả đánh giá nhanh khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của các giống ngô nghiên cứu được trình bày ở bảng 3

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, giống C919 là giống chịu hạn tốt nhất với chỉ số chịu hạn là 12920, còn giống LVN885 chịu hạn kém nhất với chỉ số chịu hạn là 2300. Chỉ số chịu hạn càng lớn thì khả năng chịu hạn càng cao. Chỉ số chịu hạn giảm dần ở các giống như sau:

C919 > LVN10 > LVN145 > LVN 99 > LVN45 > LVN66 > LVN092 > LVN61 > LVN9 > LVN885.

Bảng 3. Khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của 10 giống ngô

| Tên giống | 3 ngày |       | 5 ngày |       | 7 ngày |       | 9 ngày |       | Chỉ số chịu hạn |
|-----------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-----------------|
|           | %CKH   | %CPH  | %CKH   | %CPH  | %CKH   | %CPH  | %CKH   | %CPH  |                 |
| LVN10     | 100    | 100   | 86.67  | 73.33 | 56.67  | 50    | 16.67  | 13.33 | 10110           |
| LVN99     | 93.33  | 83.33 | 73.33  | 66.67 | 50     | 46.67 | 13.33  | 10    | 7680            |
| LVN145    | 93.33  | 100   | 66.67  | 80    | 43.33  | 56.67 | 10     | 23.33 | 8890            |
| LVN885    | 73.33  | 63.33 | 36.67  | 16.67 | 10     | 6.67  | 0      | 0     | 2300            |
| LVN45     | 93.33  | 80    | 66.67  | 63.33 | 43.33  | 36.67 | 10     | 6.67  | 6590            |
| LVN61     | 83.33  | 66.67 | 46.67  | 36.67 | 20     | 13.33 | 0      | 0     | 3350            |
| LVN66     | 90     | 73.33 | 63.33  | 56.67 | 33.33  | 23.33 | 6.67   | 6.67  | 5380            |
| LVN092    | 86.67  | 66.67 | 56.67  | 50    | 23.33  | 16.67 | 6.67   | 0     | 4140            |
| C919      | 100    | 100   | 93.33  | 83.33 | 73.33  | 63.33 | 33.33  | 30    | 12920           |
| LVN9      | 76.67  | 63.33 | 43.33  | 23.33 | 16.67  | 6.67  | 0      | 0     | 2680            |



Hình 1. Hình ảnh điện di kết quả PCR nhân gen cystatin từ DNA tổng số (A) và từ khuẩn lạc (B)

Ghi chú: M. Marker 1kb

### Kết quả phân lập và xác định trình tự gen cystatin

Từ kết quả đánh giá chịu hạn ở trên, chúng tôi lựa chọn giống LVN885 để tiếp tục nghiên cứu xác định trình tự gen. Lá non của cây ngô LVN885 được sử dụng để tách chiết DNA tổng số. Sau khi tách chiết DNA, chúng tôi điện di kiểm tra DNA trên gel agarose 1% trong TAE 1X và chụp ảnh trên máy soi gel để đánh giá chất lượng DNA. DNA tổng số thu được không bị đứt gãy vì vậy có thể sử

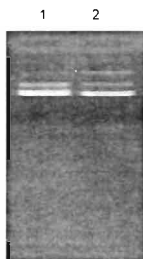
dụng cho nghiên cứu tiếp theo. Sau khi tách chiết DNA tổng số, chúng tôi tiến hành pha loãng DNA về nồng độ 50 ng/ $\mu$ l và nhân gen cystatin với cặp mồi đặc hiệu ở giống ngô LVN885 bằng phương pháp PCR. Kết quả nhân gen được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm nhân gen cystatin được thể hiện ở hình 1

Sản phẩm của phản ứng PCR thu được ở hình 1A cho thấy, đã khuếch đại được một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 400 bp.

kích thước này phù hợp với tính toán khi thiết kế môi của chúng tôi ban đầu. Để khẳng định kết quả nhân gen cystatin chính xác, chúng tôi tiếp tục phân lập gen và chọn dòng.

Vì sản phẩm PCR nhân gen cystatin có sản phẩm phụ không mong muốn như các nucleotide dư thừa sau phản ứng, môi, enzym... Vì vậy, để quá trình biến nạp đạt hiệu quả cao nhất, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR. Sau khi thu nhận sản phẩm PCR đã được làm sạch, chúng tôi tiến hành tạo dòng gen. Kết quả tạo dòng được thể hiện trong hình 1B. Hình 1B là hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc trắng (là khuẩn lạc có khả năng mang plasmid tái tổ hợp). Từ kết quả điện di trên hình 1B cho thấy, sản phẩm PCR từ những khuẩn lạc trắng đều cho một băng duy nhất có kích thước khoảng 400 bp, chứng tỏ kết quả biến nạp và chọn dòng thành công. Để phục vụ việc xác định trình tự gen, chúng tôi tiến hành tách plasmid tái tổ hợp theo bộ kit của hãng Bioneer. Sản phẩm DNA plasmid tái tổ hợp được điện di trên gel agarose 1% trong TAE 1X. Kết quả điện di tách plasmid được thể hiện ở hình 2.

Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy, sản phẩm tách plasmid sạch, đảm bảo chất lượng và số lượng để tiến hành đọc trình tự nucleotide của gen cystatin.



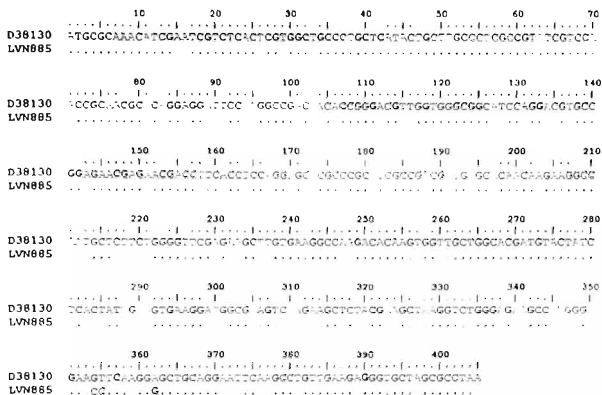
Hình 2. Hình ảnh điện di plasmid tái tổ hợp

Sau khi xác định trình tự gen, chúng tôi thu nhận trình tự và so sánh trình tự gen đã xác định với Ngân hàng gen NCBI, kết quả cho thấy trình tự mà chúng tôi thu được đã chính xác là trình tự gen cystatin của ngò. Đây là trình tự gen cystatin ở ngò lần đầu tiên được phân lập từ DNA tổng số tại Việt Nam. Để kiểm tra sự tương đồng về nucleotid và amino acid với trình tự đã công bố trên NCBI, chúng tôi sử dụng phần mềm BioEdit để so sánh. Kết quả so sánh trình tự nucleotid của gen cystatin của giống ngò 1.VN885 với gen cystatin D38130 trên Ngân hàng gen NCBI được trình bày ở hình 3. Kết quả cho thấy kích thước của gen cystatin ở giống ngò 1.VN885 và D38130 trên Ngân hàng gen NCBI có kích thước 405 nucleotid. Trình tự nucleotid của gen cystatin ở giống ngò 1.VN885 và D38130 trên Ngân hàng gen chỉ khác nhau ở 3 vị trí là 354, 355 và 362. Do vậy trình tự gen cystatin của giống ngò 1.VN885 và D38130 có hệ số tương đồng nucleotid cao là 99,2%.

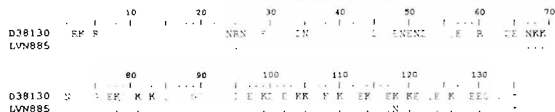
Việc nghiên cứu một gen nào đó, ngoài trình tự nucleotid người ta còn quan tâm đến trình tự amino acid trong phân tử protein là sản phẩm của gen đó. Trên cơ sở này bằng phần mềm BioEdit chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen cystatin của giống ngò 1.VN885 với D38130 trên Ngân hàng gen kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, trình tự amino acid trong protein cystatin ở giống ngò 1.VN885 với D38130 có sự khác nhau ở các vị trí là 118, 119, và 121. Sự tương đồng của giống ngò 1.VN885 so với D38130 về trình tự amino acid là 97,7%.

Như vậy, trình tự gen cystatin của giống ngò 1.VN885 mà chúng tôi phân lập được có sự tương đồng cao so với gen cystatin của giống ngò đã đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số D38130. Để tiếp tục phục vụ cho việc tạo cây chuyển gen và xác định chỉ thị phân tử thông qua gen cystatin, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu xác định trình tự gen của 1 số giống ngò khác có khả năng chịu hạn.



Hình 3. So sánh trình tự nucleotide của gen cystatin ở LVN885 với D38130



Hình 4. So sánh trình tự amino acid của giống ngô LVN885 với D38130

**KẾT LUẬN**

1. Khả năng chịu hạn của 10 giống ngô nghiên cứu có sự khác biệt. Giống C919 là giống chịu hạn tốt nhất, giống LVN885 là giống chịu hạn kém nhất.

2. Đã tạo dòng và xác định trình tự gen cystatin ở giống ngô LVN885 với chiều dài 405 bp.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[1]. Abe K., Emori Y., Kondo H., Susuki K., Aria S., "Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (*Oryza cystatin*) - Homology with animal cystatin and transient expression in the ripening process of rice seeds", *J Biol Chem*, 262(35), 1987.

[2] Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*, Nhà Đại học Quốc Gia Hà Nội, 1998  
 [3] Gawel N J., Jarret R L., "A modified CTAB DNA extraction procedure of Musa and Ipomoea", *Plant Mol Biol Rep*, 9(262 - 266), 1991.  
 [4] Grudkowska M., Zagdanska B, Multifunctional role of plant cysteine proteinases, *Acta Biochim Pol*, 51, 2004.  
 [5] Nguyễn Đức Trọng, Dương Văn Sơn, Lương Văn Hinh, *Giáo trình cây ngô*, Nhà Nông nghiệp, 2000.  
 [6] Massonneau A., Condamine P., Wisniewski J P., Zivy M., Rogowsky P. M., "Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought", *Biochim Biophys Acta*, 1729(3), 2005.

[7]. Misaka T., Kuroda M., Iwabuchi K., Abe K., Arai S. (1996), Soyacystatin, a Novel Cysteine Proteinase Inhibitor in Soybean, is Distinct in Protein Structure and Gene Organization from Other Cystatins of Animal and Plant Origin, *European Journal of Biochemistry*, 240 (3): 609.

[8]. Oliveira A.S., Filho J.X., Sales M.P., "Cysteine proteinases and cystatins", *Braz Arch Biol Techn*, 46(1), 2003.

[9]. Vũ Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, 2011, "Nghiên cứu đặc điểm trình tự gen cystatin của một số dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu chiếu xạ và xử lý mất nước", *Tạp chí Sinh học*, 33 (3): 86-95.

[10]. Turk V., Bode W. (1991). The cystatins protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, 285 (2): 213-219.

## SUMMARY

### ASSESSMENT OF DROUGHT RESISTANT ABILITY OF SOME CORN CULTIVARS (*Zea mays* L.) AND SEQUENCED GENE ENCODING CYSTATIN FROM LVN885 CULTIVAR

Nguyen Vu Thanh Thanh<sup>1</sup>, Nguyen Phuong Thao<sup>1</sup>,  
Dang Thi Hoa<sup>1</sup>, Chu Hoang Mau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Sciences - TNU, <sup>2</sup>Thai Nguyen University

Cystatins are protein inhibitors of cystein proteases belonging to papain family. In plants, cystatins are found to be involved in drought stress. The phytocystatins of plants are members of the cystatin superfamily of proteins. Various biological functions have been attributed for phytocystatins: Physiological functions of regulation of the endogenous proteinases activities in seeds during seeds maturation, Participation of the inhibitors as important element in defence against attack by insects and nematodes that generally contain cysteine proteinases in their guts; and others functions not defined.

In this study, we present some results on amplification of cystatin gene from DNA isolated from corn cultivar Vietnam (LVN885) via PCR reaction and assessment of drought tolerant ability from some corn cultivars (*Zea mays* L.) with different level of drought tolerance. This gene is 405 bp in length. The PCR products containing the cystatin fragments were cloned into pBT and sequenced. Comparison of nucleotide sequence of the cystatin gene published on NCBI with the code number D38130 and LVN885 showed a similar degree 99,2%. Similar levels of amino acid sequences in proteins cystatin also high (97,7%).

**Key words:** corn, cystatin, drought, PCR, *Zea mays* L.

Ngày nhận bài: 25/9/2012, ngày phản biện: 6/10/2012, ngày duyệt đăng: 10/10/2012

\* Tel: 0915 874267