

KHUẾCH ĐẠI GEN SSIV MÃ HOÁ CHO STARCH SYNTHASE (SS) Ở GIỐNG Sắn KM140 BẰNG PHƯƠNG PHÁP RT- PCR

Nguyễn Thị Minh Hồng¹, Phạm Bích Ngọc², Lê Thu Ngọc³

TÓM TẮT

Các starch synthase (SS) của thực vật bậc cao được mã hóa bởi 5 nhóm gen ký hiệu là GBSS (*granule-bound starch synthase*), SSI, SSII, SSIII, và SSIV. GBSS gắn chặt với hạt tinh bột và chịu trách nhiệm tổng hợp amylose. Các biến thể khác nhau của SS (thường gọi là SS hòa tan) tạo ra các chuỗi amylopectin (1 dạng tinh bột đã polyme hóa) có thể tan trong các plastic hoặc một phần hòa tan, một phần gắn với hạt tinh bột. Số liệu di truyền và sinh hóa chỉ ra rằng mỗi biến thể enzyme SS có các cấu thành khác nhau và vai trò nhất định trong tổng hợp amylopectin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập gen SSIV mã hóa cho Starch synthase - enzyme đóng vai trò tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở giống sắn KM140 bằng phương pháp RT - PCR. Kết quả trên cho thấy, đã khuếch đại thành công gen này bằng kỹ thuật RT - PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế theo chu trình nhiệt phù hợp và đã đăng ký trên ngân hàng Genbank có kích thước 3189 bp, mã số KT033500.

Từ khoá: Gen SS (*starch synthase*), sắn KM140, RT - PCR, Genbank.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong 3 cây lương thực quan trọng nhất thế giới sau lúa và ngô (Hoang Kim et al., 2010). Củ sắn có hàm lượng tinh bột cao với khoảng 84-87% trọng lượng khô, là nguồn cung cấp carbohydrate cho hơn 500 triệu người ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới cũng như hơn 1 tỷ người trên thế giới.

Hiện nay, trong bối cảnh biến đổi khí hậu làm trái đất nóng lên, nước biển dâng cao, đe dọa an ninh lương thực thế giới và sự cạn kiệt của nguồn nguyên liệu hóa thạch thì cây sắn được coi là cây trồng đem lại giải pháp kép nhằm đạt cả hai mục tiêu: Góp phần đảm bảo an ninh lương thực và cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp sản xuất nhiều liệu sinh học, từng bước thay thế nhiên liệu hóa thạch.

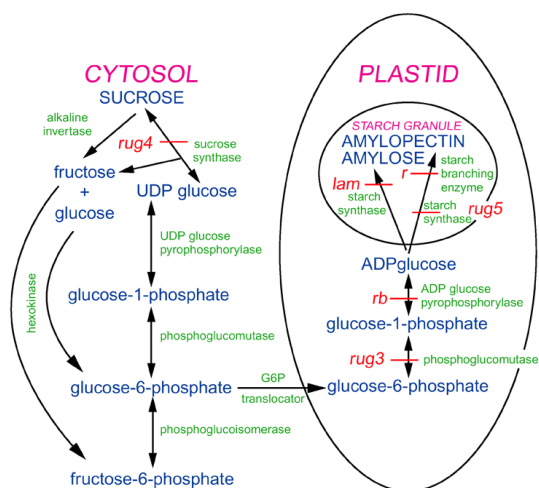
Sắn được trồng khá phổ biến ở Việt Nam và đã từ lâu được xem là cây lương thực và thức ăn gia súc quan trọng sau lúa và ngô. Sắn chủ yếu dùng để bán (48,6%), kể đến dùng làm thức ăn gia súc (22,4%), chế biến thủ công (16,8%), chỉ có 12,2% dùng tiêu thụ tươi. Sắn cũng là cây công nghiệp có giá trị xuất khẩu và tiêu thụ trong nước (Trần Ngọc Ngoạn., 2007). Sắn là nguyên liệu chính để chế biến bột ngọt, bio-ethanol, mì ăn liền, bánh kẹo, siro, nước giải khát, bao bì, ván ép, phụ gia dược phẩm, màng phủ sinh học và chất giữ ẩm cho đất. Mỗi năm Việt Nam xuất khẩu trên 4 triệu tấn sản phẩm từ cây sắn, đứng thứ hai khu vực, sau Thái Lan (Hoàng Kim, Nguyễn Đăng Mãi, 2011).

¹ Giảng viên khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

^{2,3} Chuyên viên phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam

Phần lớn các nghiên cứu về sản trong thời gian gần đây chủ yếu sử dụng các phương pháp truyền thống để chọn, lai tạo giống sản mới từ các giống nhập nội và giống địa phương nhằm cải tiến năng suất. Tuy nhiên, việc ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại trong nghiên cứu về sản đang ở giai đoạn khởi đầu và sử dụng các phương pháp đơn giản như nuôi cấy mô để giữ giống, nhân nhanh *in vitro* một số giống mới. Như vậy, ứng dụng công nghệ sinh học nhằm cải tạo cây sản theo hướng các tính trạng có lợi như năng suất cao, chất lượng phù hợp mục đích sử dụng nhằm phục vụ công nghiệp và xuất khẩu là một vấn đề cấp thiết ở nước ta.

Quá trình tổng hợp tinh bột α -1,4 glucan bao gồm ba bước quan trọng xảy ra trong lục lạp và thể vô sắc: i) cung cấp glucose-6-phosphate (Glc-6-P) vào trong các thể lạp, ii) tổng hợp ADP-glucose (ADPG) từ Glc-1-P, và iii) tổng hợp tinh bột từ ADPG (Alisdair, Willmitzer & Trethewey, 2002; Zeeman, 2010). Nói một cách ngắn gọn, bước đầu tiên không thể thiếu là sự tổng hợp ADPG từ Glc-1-P và ATP được xúc tác bởi ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase). Một khi được hoạt hóa, starch synthase (SS) chuyển ADPG tới đầu không khử của α -1,4 glucan để tạo thành các sợi α -1,4 glucan. Tiếp theo, các sợi α -1,4 glucan được dùng như là các cơ chất cho các enzyme phân nhánh của tinh bột (BE hoặc Q-enzyme) tạo ra các liên kết sợi α -1,6 là amylopectin. Cuối cùng amylopectin được tinh thể hóa tạo thành tinh bột dưới tác động của các enzyme phân rã (DPE), phosphorylase (P-enzyme) và glucanotransferase (D-enzyme). Ngoài ra, UDP-glucose: protein glucosyltransferase hoặc amylogenin (38 hoặc 45 kDa) cũng được dự đoán tham gia vào bước đầu tiên trong quá trình tổng hợp tinh bột (Zeeman, 2010) (hình 1).



Hình 1. Quá trình sinh tổng hợp tinh bột và các enzyme liên quan
(<http://www.jic.ac.uk/STAFF/trevor-wang/images/full/starchpath2.jpg>)

Các starch synthase (SS) của thực vật bậc cao mã hóa bởi 5 nhóm gen ký hiệu là GBSS (granule-bound starch synthase), SSI, SSII, SSIII, và SSIV. GBSS gắn chặt với hạt tinh bột và chịu trách nhiệm tổng hợp amylose. Các biến thể khác nhau của SS (thường gọi là SS hòa tan) tạo ra các chuỗi amylopectin (1 dạng tinh bột đã polyme hóa) có thể tan

trong các plastic hoặc một phần hòa tan và một phần gắn với hạt tinh bột. Số liệu di truyền và sinh hóa chỉ ra rằng mỗi biến thể enzyme SS có các cấu thành khác nhau và vai trò nhất định trong tổng hợp amylopectin. Phân tích việc phân phối chiều dài chuỗi amylopectin trong các cây đột biến và cây chuyển gen mất các biến thể enzyme SS đặc trưng đã dẫn tới kết luận rằng nhóm SSI, SSII, SSIII đóng vai trò trong việc kéo dài các chuỗi ngắn, trung bình và dài tương ứng (Zeeman, 2010).

Tóm lại, tinh bột là thành phần quan trọng đối với thực vật cũng như là nguồn lương thực và nguyên liệu công nghiệp. Cải tiến cây trồng theo hướng tăng năng suất tinh bột là một trong những hướng nghiên cứu quan trọng và luôn được các nhà khoa học quan tâm hàng đầu. Do vậy, các nghiên cứu tìm hiểu về con đường tổng hợp và phân hủy tinh bột ở cây trồng nói chung và đối với sắn nói riêng sẽ góp phần thúc đẩy mục tiêu cải tạo năng suất tinh bột. Và quan trọng hơn, những nghiên cứu chỉ trên cây mô hình hoặc ở các loài cây lương thực khác sẽ không cung cấp đủ thông tin cho mục đích này. Bởi vì các quá trình này là khác nhau giữa các loài, giữa các bộ phận khác nhau của cây, bao gồm các nhân tố điều khiển trao đổi chất tinh bột, cấu trúc tinh bột và các con đường phân hủy tinh bột khác nhau. Xuất phát từ cơ sở trên, những gen liên quan tới quá trình sinh tổng hợp tinh bột sẽ được nghiên cứu ở đối tượng cây sắn ở Việt Nam. Các gen quan trọng sẽ được phân lập để thiết kế các hệ thống vector.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Giống sắn KM140 do Trung tâm nghiên cứu thực nghiệm nông nghiệp Hưng Lộc, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam cung cấp. Củ giống sắn này được thu và làm vật liệu cho tách chiết RNA.

2.1.2. Cặp môi sử dụng

Bảng 1. Các môi được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Gen	Trình tự môi	Mục đích
1	SSIV_F <i>EcoRI</i>	CACCATGGCGTCGAAGCTATCGACGTGGTTTCTG	Môi phân lập gen
2	SSIV_R	TTAGACCTACTTGCTGCCGCTCTTG	
3	MeSSiv_F1i	TTGGCAGAACTGATGCAAGAA	Đọc trình tự
4	MeSSiv_F2i	AACTATTGGAGGAACGTCTTCAAC	
5	MeSSiv_F3i	CGCTTTTCATTTTTTCAGCCGTG	
6	MeSSiv_F4i	AGGCAGCATCTTGGGTTATCAA	
7	MeSSiv_Ri	TCTACATTCCTCTCCACATCATT	

2.1.3. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất: Kit tách chiết RNA tổng số PureLink Plant RNA Reagent (Invitrogen); kit tổng hợp cDNA RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas);

dung dịch TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetic acid và 1mM EDTA); Agarose 0,8%; Ethidium bromide 0,5µg/ml, thang DNA 1kb (Thermo)...

Thiết bị: Pipetman, máy soi gel (Bio-Rad), máy chụp ảnh điện di (Amersham Pharmacia Biotech), máy ly tâm (Eppendorf), bộ điện di (Bio-Rad), máy hút chân không (Savant), máy PCR System 9700 (Applied Biosystem), bể ổn nhiệt, máy voltex v.v cùng các trang thiết bị khác của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết RNA tổng số từ củ sắn

Quy trình tách chiết RNA được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit PureLink Plant RNA Reagent, Invitrogen. Đầu tiên nghiền 0,1 g mẫu trong nitro lỏng. Sau đó bổ sung 0,5ml PureLinkPlant RNA Reagent lạnh, đảo đều. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Rồi ly tâm 12.000 vòng trong 2 phút ở nhiệt độ phòng. Chuyển phần dịch nổi qua ống ly tâm mới. Bổ sung 0,1ml NaCl 5 M, trộn đều. Bổ sung thêm 0,3ml Chloroform, trộn đều. Ly tâm 12.000 vòng trong 10 phút ở 4°C, chuyển pha trên qua ống ly tâm mới. Thêm 1 lần thể tích isopropanol, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 12.000 vòng trong 10 phút ở 4°C, bỏ phần dịch. Tiếp tục bổ sung 1ml cồn 75%, trộn đều. Ly tâm 12.000 vòng trong 1 phút ở nhiệt độ phòng, bỏ dịch, dùng pipet cẩn thận hút hết dịch vẫn còn trong ống ly tâm.

RNA tổng số sau khi tách chiết từ củ và lá sắn tiếp tục được loại bỏ DNA tạp nhiễm bằng cách xử lý DNase theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific), sau đó được tinh sạch bằng phương pháp rửa sử dụng dung dịch LiCl 7,5M (Ambion). Thêm tác nhân rửa này vào dung dịch RNA tổng số sao cho nồng độ cuối cùng của LiCl trong dung dịch RNA đạt 2,5M, ủ mẫu ở -20°C trong 30 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút. Loại bỏ dịch nổi và rửa rửa RNA với cồn 70% lạnh để loại bỏ lượng muối còn sót lại. Hòa rửa RNA trong nước khử ion đã được xử lý DEPC.

2.2.2. Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp theo kit “RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas). Phản ứng cDNA được thực hiện trong thể tích 20µl gồm có các thành phần sau: 500 ng RNA tổng số; 1µl môi ngẫu nhiên (Hexamer). Bổ sung nước khử ion có xử lý DEPC tới thể tích 12µl. Trộn nhẹ, ủ 65°C/5phút, sau đó đặt vào đá. Tiếp tục bổ sung các thành phần vào ống phản ứng trên: 4µl đệm Reaction buffer 5X tổng hợp cDNA; 1µl riboLock Ribonuclease inhibitor (20u/l); 2µl dNTP (10 mM); 1µl enzyme M-MuLV Reverse Transcriptase (20u/µl). Trộn nhẹ và cho vào máy spin sau đó chạy chương trình tổng hợp cDNA 25°C/5 phút; 42°C/ 60 phút. Kết thúc phản ứng ở 70°C/5 phút. Bảo quản cDNA ở -20°C hoặc -70°C. Mẫu cDNA sau khi tổng hợp được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

2.2.3. Phương pháp PCR

Các đoạn gen quan tâm được nhân lên bằng các cặp môi đặc hiệu. Sợi cDNA được dùng làm khuôn. PCR dựa trên cơ sở phản ứng mở rộng primer nhờ enzyme bền nhiệt có

hoạt tính 5'-3' DNA polymerase tạo ra sản phẩm PCR có hai đầu bằng để khuếch đại theo hàm mũ lên đến hàng triệu lần các đoạn DNA. Tuy nhiên, Taq DNA polymerase có nhược điểm là khả năng xuất hiện đột biến trong quá trình tổng hợp sợi mới cao (1 đột biến trên 3700 nucleotide). Như vậy, Taq DNA polymerase không thích hợp cho nhân bản vùng CDS của gen. Pfu DNA polymerase được sử dụng như giải pháp thay thế với tỉ lệ sai sót thấp 7.7×10^5 tới 1×10^6 (Cline *et al.*, 1996; Slater *et al.*, 1998).

Phản ứng được thực hiện với enzyme Pfu DNA polymerase và chu trình nhiệt như sau: 95°C/3 phút, 32 chu kỳ (95°C/40 giây, 55°C/30 giây, 72°C/4 phút và 72°C/10 phút). Sản phẩm PCR được tinh sạch, tách dòng trong vector pBT và giải trình tự sử dụng cặp môi Frag_F/R.

Sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose 0,8 %.

2.2.4. Phương pháp xác định trình tự nucleotide

Đoạn gen quan tâm gắn trên vector tách dòng pBTsau khi tách từ khuẩn lạc, được xác định trình tự trên máy đọc tự động ABI PRIM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer bằng cách sử dụng bộ hoá chất sinh chuẩn bigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Do kích thước gen SSIV là rất lớn (~3,5kb) nên các cặp môi (bảng 1) được dùng để nhân các đoạn chồng gối nhau, sau đó gắn ghép lại với nhau để thu được kích thước SSIV hoàn chỉnh. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR đọc trình tự trên máy luân nhiệt GeneAmp[®] PCR System 9700.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cách bổ sung 5µl EDTA 125mM, 60µl cồn 100% và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Tiếp đó ly tâm 12.000 v/p, trong 15 phút để kết tủa các đoạn DNA, sau đó loại bỏ cồn. Bổ sung 60µl ethanol 70% và ly tâm 10.000 v/p trong 10 phút. Làm khô kết tủa DNA, bổ sung 10µl Hi-DiTM Formamide và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Các mẫu được tra vào các giếng của khay đựng mẫu, sau đó điện di trong ống mao quản 80cm x 50µl với polymer POP-4TM của hãng ABI, Mỹ. Kết quả được xử lý bằng phần mềm DNASTar.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh bột là nguồn carbohydrate chủ yếu cho con người và đồng thời cung cấp nguyên liệu quan trọng cho công nghiệp. Hiện nay nguồn nguyên liệu tinh bột cho công nghiệp chủ yếu tách chiết từ ngô, tuy nhiên một lượng đáng kể khác từ lúa, lúa mì, sắn, khoai tây, arrowroot (*Maranta arundinacea*) và sago palm (*Metroxylon sagu*). Tinh bột từ các nguồn khác nhau có thành phần polymer, cấu trúc và thành phần hóa lý khác nhau. Thành phần hóa lý chính là chức năng của tinh bột quyết định khả năng ứng dụng của tinh bột. Việc biến đổi quá trình trao đổi tinh bột trong cây trồng có thể góp phần tăng khả năng tích tụ tinh bột trong các cơ quan dự trữ, ngăn chặn hoặc tăng việc phân hủy tinh bột (tùy thuộc vào loại cây trồng hay nhu cầu sử dụng) hoặc biến đổi cấu trúc tinh bột để tăng hoặc đa dạng chức năng của tinh bột trong thực phẩm và nguyên liệu của công nghiệp.

Nhìn vào số lượng lớn các enzyme tham gia vào việc xác định cấu trúc của tinh bột trong một bộ phận nhất định của cây, có thể thấy rằng số tinh bột khác nhau có thể được biến đổi qua việc điều khiển của các gen liên quan là rất lớn. Trong các loài lưỡng bội mà sinh sản hữu tính thì phương pháp tốt nhất là kết hợp các đột biến ảnh hưởng đến các gen mã hóa cho các enzyme trao đổi tinh bột. Các phương pháp công nghệ sinh học có thể có nhiều ưu thế và cần thiết nếu cây trồng quan tâm là đa bội và sinh sản vô tính, các gen quan tâm cần biểu hiện mạnh hơn hoặc giảm một phần hoạt tính, tính trạng mong muốn là kết quả của việc biểu hiện gen từ loài khác.

Sinh tổng hợp tinh bột là một quá trình phức tạp, có sự tham gia biểu hiện của nhiều gen và có sự khác biệt giữa các loài khác nhau và các bộ phận khác nhau của cây về các yếu tố quy định quá trình chuyển hóa tinh bột, cấu trúc của tinh bột và sự phân hủy tinh bột.

Nhiều gen liên quan tới sinh tổng hợp tinh bột ở sắn đã được phân lập (Munywka *et al.*, 1997). Có thể kể đến là gen mã hóa enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase, làm nhiệm vụ xúc tác quá trình tổng hợp ADP - glucose và các starch synthase (SS) của thực vật bậc cao mã hóa bởi 5 nhóm gen ký hiệu là GBSS (granule-bound starch synthase), SSI, SSII, SSIII, và SSIV (Zeeman, 2010). Ngoài ra, các gen khác liên quan tới sinh tổng hợp tinh bột như BE với vai trò tổng hợp amylopectin và DBE tham gia vào quá trình phân rã tinh bột.

3.1. Tách chiết RNA tổng số từ củ sắn giống KM140

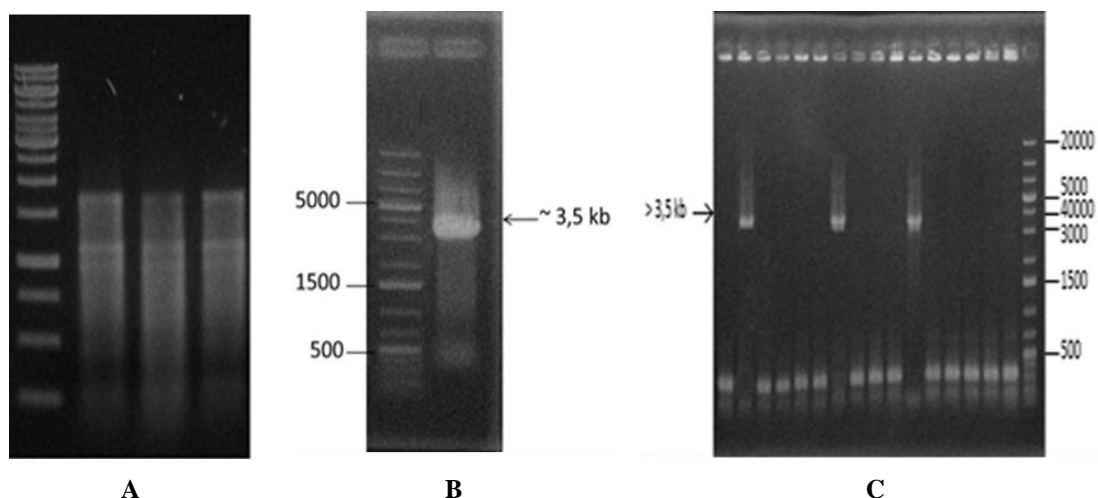
RNA tổng số được tách chiết từ củ của giống sắn KM140 bằng hóa chất chuyên dụng cho việc tách chiết RNA thực vật (PureLink Plant RNA Reagent) của Invitrogen. Các bước thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA genome tạp nhiễm sau đó được loại bỏ bằng cách xử lý mẫu với DNase I và RNA tổng số được tinh sạch bằng phương pháp tủa sử dụng *Lithium chloride* (LiCl). Kết quả điện di kiểm tra RNA tổng số trên gel agarose cho thấy RNA tổng số thu được có tính toàn vẹn, không bị đứt gãy, đảm bảo hàm lượng và độ tinh sạch cho các thí nghiệm tiếp theo (hình 2A).

3.2. Tổng hợp cDNA và khuếch đại gen SSIV bằng phản ứng PCR

Do kích thước DNA của gen SSIV rất lớn (hơn 8 kb) nên chúng tôi sử dụng trình tự CDS của gen SSIV sẵn trên phytozome với mã cassava4.1_000719m để thiết kế cặp môi đặc hiệu khuếch đại gen SSIV từ cDNA củ sắn là SSIV_F *EcoRI*/ SSIV_R (bảng 1). Trên môi xuôi có chứa trình tự CACC ở đầu 5' giúp quá trình nối ghép gen đích vào vector pENTR được đơn giản hóa nhờ phản ứng TOPO cloning - một phương pháp tạo dòng của Invitrogen.

Để tăng hiệu suất cũng như độ đặc hiệu của phản ứng PCR khuếch đại gen SSIV từ cDNA sắn, chúng tôi tiến hành tổng hợp cDNA từ RNA tổng số tách chiết từ củ sắn sử dụng môi đặc hiệu. Theo đó, cDNA được tổng hợp theo kit “RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific).

Sau khi thiết kế được cặp môi đặc hiệu để khuếch đại gen SSIV, căn cứ vào nhiệt độ nóng chảy của môi chúng tôi đã dự tính nhiệt độ gắn môi là ở nhiệt độ 56°C. cDNA được tách chiết từ củ sắn được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR.



Hình 2. Kết quả tách dòng đoạn gen SSIV từ củ sắn KM140

- A. RNA tổng số tách chiết từ củ sắn KM140;
 B. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen SSIV từ cDNA sắn. M: marker DNA 1 kb, 2: Sản phẩm PCR gen SSIV;
 C. PCR chọn lọc các dòng khuẩn mang vector pENTR/ SSIV.

Ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cùng các thành phần như đã trình bày ở phần phương pháp. Theo tính toán lý thuyết, gen SSIV sau khi được tổng hợp bằng phản ứng PCR sẽ có chiều dài ~3,5 kb. Do kích thước của gen đích khá lớn nên trong trường hợp này, để đảm bảo độ chính xác cao trong quá trình sao chép chúng tôi sử dụng *Pfu* DNA polymerase khi thực hiện phản ứng PCR. Ngoài hoạt tính 5'-3' polymerase xúc tác cho quá trình polymer hóa các deoxiribonucleotide, enzyme này còn có khả năng đọc sửa (proofreading) nhờ hoạt tính 3'-5' exonuclease, giúp sửa chữa những sai hỏng trên sợi DNA mới tổng hợp. Sản phẩm thu được của phản ứng PCR khuếch đại gen SSIV được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% (hình 2B).

Hình ảnh 2B trên điện di đồ cho thấy, ở đường chạy số 2 xuất hiện một băng DNA đặc hiệu và sắc nét, có kích thước ~ 3,5 kb, tương đương với kích thước đoạn CDS của gen SSIV theo lý thuyết. Kết quả trên cho thấy, chúng tôi đã phân lập thành công gen này bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế và chu trình nhiệt phù hợp. Đoạn DNA này sau đó được tinh sạch và gắn vào vector pENTRTM/D-TOPO trong dung dịch muối đệm tạo thành vector pENTR/SSIV. Sản phẩm của phản ứng TOPO cloning được sử dụng để biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* One Shot TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Sàng lọc các dòng khuẩn lạc trên đĩa biến nạp bằng phương pháp colony-PCR sử dụng cặp mồi M13F/R và đã chọn được 3 dòng khuẩn lạc cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA đúng như tính toán là > 3,5 kb (hình 2C). Sau đó các dòng khuẩn lạc được nuôi lượng lớn để tách chiết plasmid phục vụ cho giải trình tự gen.


```

                2650      2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGACATGCAATATACCGTACCTGGAGTTGGGAGGACAATTTCTACTTCTTGGCTCAAGCCAGTTGCACATATACAGAG
R H A I Y R T L E L G G Q F L L L G S S P V A H I Q R
                2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGAATTTGAGGGTATTGCAAATCACTTTCAGAATCATGAGCACATTCGGCTGGTATTGAAGTATGATGAATCTCTCGCTC
E F E G I A N H F Q N H E H I R L V L K Y D E S L A
                2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTCCATTTTGCAGCATCTGACATTTTCATCATCCATCTATCTTTGAGCCTTGTGGCCTTACACAGATGATAGCAATG
H S I Y A A S D M F I I P S I F E P C G L T Q M I A M
                2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGATATGGTTCCATACCCATGCAAGAAAAACCGGTGGTCTAAATGATAGTGTTTTGGATGTGATGATGACACAATTC
R Y G S I P I A R K T G G L N D S V L D V D D D T I P
                2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTCAGTTTCGAAATGGATATACATTTCTTGAATCCTGATGAGCAGGGAGTGAATAGTGCCTTAGAACGTCATTTAACC
L Q F R N G Y T F L N P D E Q G V N S A L E R A F N
                3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTATAGGAACGATCCTGAGAGCTGGCAGCAGCTTGTCAAAGGACATGAACATAGATTTTAGTTGGGAATCTTCAGCA
H Y R N D P E S W Q Q L V Q K D M N I D F S W E S S A
                3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190
SSiv  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCACAGTATGAGGAGCTCTACTCAAATCAGTGGCCAGAGCAAGAGCGGCAGCAAGTAGGTCTTAA
S Q Y E E L Y S K S V A R A R A A A S R S *
    
```

Hình 3. Trình tự nucleotide và axit amin suy diễn của gen SSIV đã phân lập

Bảng 2. Vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen SSIV ở giống KM140 so với gen tham chiếu trên phytozome với mã Manes.15G118600

STT	Thay đổi nucleotide			Thay đổi axit amin
	Vị trí	SSIV	Gen tham chiếu	
1	150	Mất AGT		Mất S
2	229	C	A	R-S
3	244	Chèn TGA		Thêm D
4	285	G	T	-
5	731	G	A	E-G
6	1264	G	A	-
7	1349	A	G	-
8	1619	A	G	-
9	1758	T	C	-
10	2937	T	G	F-L
11	3048	A	G	-
12	3083	G	A	-

(Ghi chú: (-) Không thay đổi)

Kết quả đọc trình tự gen cho thấy, sản phẩm gen tách dòng từ mẫu nghiên cứu có kích thước 3189 bp (hình 3). Trong đó gen phân lập có độ tương đồng với gen tham chiếu với mã Chromosome15: 8973978...8983153 trên phytozome là 99%, khác nhau ở 12 vị trí và trình tự gen phân lập mã hoá cho 1.063 axit amin suy diễn, so sánh với trình tự axit amin của gen tham chiếu với mã cassava4.1_000719m khác nhau ở 5 vị trí trong đó có vị trí 50 mất axit amin S, vị trí 82 thêm axit amin D và 3 vị trí thay đổi 77R - S; 244E - G; 979F - L (bảng 2). Từ các kết quả phân tích trên chúng tôi đã phân lập thành công gen SSIV từ giống sắn KM140 và đã được đăng kí trình tự trên ngân hàng Genbank với mã số KT033500.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công gen SSIV mã hóa cho enzyme starch synthase, đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở sắn bằng phương pháp RT - PCR và đăng ký trên ngân hàng Genbank với mã số là KT033500 có kích thước 3189 bp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hoàng Kim, Nguyễn Đăng Mãi (Biên tập) (2011), *Sắn Việt Nam: Hiện trạng, định hướng và giải pháp phát triển những năm đầu thế kỷ 21*, Thông tin về Hội thảo sắn Việt Nam lần thứ 10 tại thành phố Hồ Chí Minh ngày 13 - 14/3/2011, Nxb. Nông nghiệp (chi nhánh phía Nam) (sách chuyên khảo), Thành phố Hồ Chí Minh.
- [2] Trần Ngọc Ngoạn (2007), *Giáo trình cây sắn*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
- [3] Alisdair, R.F., Willmitzer, L. & Trethewey, R.N. (2002), *Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology*, Trends in Plant Science 7, 35-41.
- [4] Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H. (1996), *PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases*, Nucl. Acid Res. 24, 3546-51.
- [5] Hoang Kim, Nguyen Van Bo, Hoang Long, Nguyen Trong Hien, Hernan Ceballos and Reinhardt Howeler (2010), *Current situation of cassava in Vietnam. In CIAT (R.H Howeler editor) A New Future for Cassava in Asia: Its Use as Food, Feed and Fuel to Benefit the Poor*, 8th Asian Cassava Research Workshop October 20-24, 2008 in Vientiane, Lao PDR. p. 100-112.
- [6] Munyikwa TRI, Langeveld S, Jacobsen E, Visser RGF (1997), *Cassava starch Biosynthesis: New avenues formodifying starch quantity and quality*, Euphytica 96:65-75.
- [7] Slater, M. et al. (1998), *Pfu DNA Polymerase: A high fidelity enzyme for nucleic acid amplification*, Promega Notes 68, 7-10.
- [8] Zeeman, Samuel C. (2010), *Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants*, Annual Review of Plant Biology 61(1).

AMPLIFICATION OF SSIV GENE CODING FOR STARCH SYNTHASE (SS) IN CASSAVA CULTIVAR KM140 BY RT – PCR METHOD

Nguyen Thi Minh Hong, Pham Bich Ngoc, Le Thu Ngoc

ABSTRACT

Starch synthase (SS) was coded by 5 gene groups coded GBSS (granule-bound starch synthase), SSI, SSII, SSIII, and SSIV. GBSS attaches tightly to starch granule and responds for amylose synthesis. The different variants of the SS (known as the dissolved SS) produce amylopectin chains (a type of polymerized starch) could be dissolved in plastic or partly dissolved, partly attached with starch granules. Genetic and biochemical data indicated that each SS variant was formed by different compositions and each played a certain role in the synthesis of amylopectin. In this study, SSIV gene coded for starch synthase which enhances the starch synthesis of cassava cultivar KM140 was amplified by RT - PCR. The results and BLAST analysis showed that this gene was SSIV with a size of 3189 bp and registered on Genbank with accession number KT033500.

Keywords: *SS gene (starch synthase), KM140 cassava, RT - PCR, Genbank.*