

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

LÊ THỊ HỒNG TRANG

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *GmCHI1A*
LIÊN QUAN ĐẾN TỔNG HỢP ISOFLAVONE PHÂN LẬP
TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG [*Glycine max* (L.) Merrill]

Ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS Chu Hoàng Mậu

THÁI NGUYÊN - 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Các kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án là trung thực và mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc. Một phần kết quả đã được công bố trên các tạp chí và hội nghị khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả, phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các kết quả đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng 6 năm 2020

TÁC GIẢ

Lê Thị Hồng Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu, thầy đã định hướng và trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ, động viên để tôi có được sự tự tin, khắc phục khó khăn và hoàn thành tốt bản luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, nghiên cứu viên Phòng Công nghệ ADN ứng dụng và Phòng Công nghệ tế bào thực vật Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành một số thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Được học tập và sinh hoạt chuyên môn tại Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục Sinh học, Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên tôi đã tích lũy được nhiều kiến thức và phương pháp nghiên cứu về các vấn đề của Sinh học hiện đại và công nghệ sinh học; đồng thời tôi đã nhận được nhiều đóng góp quý báu để tôi hoàn thành kế hoạch học tập và nghiên cứu. Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các thầy cô và cán bộ trong bộ môn.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô giáo, cán bộ Khoa Sinh học và Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Tôi xin bày tỏ lòng tri ân và biết ơn sâu sắc tới thầy cô, gia đình và bạn bè đã động viên, giúp đỡ và chia sẻ khó khăn trong suốt chặng đường học tập, nghiên cứu của tôi thời gian qua.

Thái Nguyên, tháng 6 năm 2020

TÁC GIẢ

Lê Thị Hồng Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÍ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC HÌNH	vi
DANH MỤC PHỤ LỤC	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Nội dung nghiên cứu	3
4. Những đóng góp mới của luận án	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án	5
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ ISOFLAVONE TRONG HẠT ĐẬU TƯƠNG	6
1.1.1. Cây đậu tương	6
1.1.2. Isoflavone	9
1.1.3. Sinh tổng hợp isoflavone và các enzyme tham gia trong con đường phenylpropanoid	16
1.2. ENZYME CHI VÀ GEN MÃ HÓA CHI	18
1.3. CHUYỂN GEN Ở ĐẬU TƯƠNG VÀ PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN <i>CHI</i>	29
1.3.1. Chuyển gen ở đậu tương thông qua <i>Agrobacterium</i>	29
1.3.2. Tiếp cận kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện các thành phần của hạt	34
1.3.3. Nghiên cứu biểu hiện gen <i>CHI</i>	37
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. VẬT LIỆU.....	42
2.1.1. Các giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu	42

2.1.2. Các vector và chủng vi khuẩn	44
2.1.3. Các cặp mồi sử dụng cho PCR.....	44
2.1.4. Hóa chất và thiết bị	45
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	46
2.2.1. Nhóm phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone.....	47
2.2.2. Nhóm phương pháp phân lập gen	47
2.2.3. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen <i>GmCHI1A</i>	50
2.2.4. Nhóm phương pháp phân tích hoạt động của vector chuyển gen trên cây thuốc lá.....	51
2.2.5. Nhóm phương pháp biến nạp và phân tích cây đậu tương chuyển gen	53
2.2.6. Xử lý dữ liệu sinh học	56
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN.....	56
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	57
3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN <i>GmCHI1A</i> PHÂN LẬP TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG.....	57
3.1.1. Hàm lượng daidzein và genistein trong mầm hạt của một số giống đậu tương trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam.....	57
3.1.2. Tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen <i>GmCHI1A</i> từ cây đậu tương	59
3.1.3. Sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen <i>GmCHI1A</i>	66
3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN <i>GmCHI1A</i>	69
3.2.1. Tạo cấu trúc mang gen chuyển <i>GmCHI1A</i>	69
3.2.2. Tạo vector chuyển gen <i>pCB301_GmCHI1A</i>	72
3.2.3. Tạo <i>A. tumefaciens</i> CV58 chứa vector chuyển gen <i>pCB301_GmCHI1A</i>	75
3.2.4. Phân tích hoạt động của vector chuyển gen <i>pCB301_GmCHI1A</i> trên cây thuốc lá.....	76

3.3. PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN <i>GmCHI1A</i> TRÊN CÂY ĐẬU	
TƯƠNG CHUYỂN GEN	81
3.3.1. Biến nạp cấu trúc <i>pCB301_GmCHI1A</i> vào đậu tương thông qua	
<i>A.tumefaciens</i>	81
3.3.2. Phân tích sự có mặt và sự hợp nhất của gen chuyển <i>GmCHI1A</i> trong	
cây đậu tương chuyển gen T0.....	84
3.3.3. Phân tích biểu hiện protein CHI1A tái tổ hợp bằng Western blot và	
ELISA	87
3.3.4. Phân tích hàm lượng daidzein và genistein của các dòng đậu tương	
chuyển gen	90
3.4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	92
3.4.1. Enzyme CHI và hoạt động của gen <i>CHI</i>	92
3.4.2. Cây mô hình trong nghiên cứu chức năng gen	94
3.4.3. Chuyển gen ở đậu tương và phân tích biểu hiện gen <i>GmCHI1A</i>	95
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	100
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	102
TÀI LIỆU THAM KHẢO	104
PHỤ LỤC	

DANH MỤC KÍ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
AS	Acetosyringone	
BAP	Benzylaminopurine	
Bp	base pairs	Cặp bazơ nitơ
CCM	Co-cultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
CHI	Chalcone isomerase	
Cs		cộng sự
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	
DFR	Dihydroxyflavonol 4- reductase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm ELISA
GA ₃	Gibberellic acid	
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm
<i>GmCHI1A</i>	<i>Glycine max</i> chalcone isomerase 1A	Gen <i>GmCHI1A</i> của cây đậu tương
IAA	Indole acetic acid	
IBA	Indolbutylic acid	
IFS	Isoflavone synthase	
Kb	Kilo base	
kD	Kilo Dalton	
L-Tyr	L-tyrosine	

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
mRNA	Messenger ribonucleic acid	RNA thông tin
MS	Murashige and Skoog medium	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
NAA	Naphthaleneacetic acid	
OD	Optical density	Mật độ quang
Ori	Origin	Điểm khởi đầu sao chép
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
RNA	Ribonucleic acid	
Rpm	Revolutions per minute	Số vòng/ phút
scFv	Single-chain fragment variable	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SEM	Shoot elongation medium	Môi trường kéo dài chồi
SIM	Shoot induction medium	Môi trường cảm ứng tạo chồi
<i>taq</i> DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển
Ti-plasmid	Tumor inducing - plasmid	
T0, T1		Các thế hệ cây chuyển gen
T0		Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm
T1		Thế hệ thứ nhất
T2		Thế hệ thứ hai

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
TL-DNA	Transfer left -DNA	Vùng biên trái đoạn DNA được chuyển
TR-DNA	Transfer right -DNA	Vùng biên phải đoạn DNA được chuyển
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
<i>Vir</i>	<i>Virus interferon resistance</i>	Gen vir
WT	Wild type	Cây không chuyển gen
<i>X-gal</i>	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Thống kê các gen <i>GmCHI</i> phân lập từ cây đậu tương đã được công bố trên GenBank.....	26
Bảng 1.2.	Tóm tắt các gen được biến nạp vào đậu tương theo phương pháp gián tiếp thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
Bảng 1.3.	Một số nghiên cứu biểu hiện gen <i>CHI</i> ở thực vật.....	38
Bảng 2.1.	Trình tự nucleotide của các cặp mồi sử dụng trong PCR và kích thước sản phẩm DNA dự kiến.....	45
Bảng 2.2.	Thành phần phản ứng PCR với Master Mix	48
Bảng 2.3.	Thành phần phản ứng gắn gen <i>GmCHI1A</i> vào vector tách dòng ...	49
Bảng 3.1.	Hàm lượng isoflavone trong mầm 3 ngày tuổi của 5 giống đậu tương (mg/100g)	58
Bảng 3.2.	Những vị trí sai khác về trình tự nucleotide của <i>GmCHI1A</i> giữa các giống đậu tương và trình tự gen <i>GmCHI1A</i> mang mã số NM_001248290	63
Bảng 3.3.	Những vị trí sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmCHI1A</i> giữa các giống đậu tương và trình tự gen mang mã số NM_001248290.....	65
Bảng 3.4.	Các trình tự gen <i>GmCHI1A</i> của các giống đậu tương Việt Nam và các trình tự có mã số trên GenBank được sử dụng trong phân tích	66
Bảng 3.5.	Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển <i>GmCHI1A</i> vào thuốc lá.....	77
Bảng 3.6.	Kết quả biến nạp cấu trúc <i>pCB301_GmCHI1A</i> vào giống DT2008 nhờ <i>A. tumefaciens</i> qua nách lá mầm.....	83
Bảng 3.7.	Hiệu suất chuyển gen <i>GmCHI1A</i> vào giống đậu tương DT2008 ở các giai đoạn phân tích	90
Bảng 3.8.	Sự thay đổi hàm lượng daidzein và genistein ở giai đoạn hạt nảy mầm của các dòng đậu tương chuyển gen so với các cây không chuyển gen	91

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	So sánh về cấu trúc của chất chuyển hóa equol của isoflavone với estradiol của estrogen.....	12
Hình 1.2.	Một số dạng khác nhau của isoflavone	13
Hình 1.3.	Con đường phenylpropanoid ở đậu tương	16
Hình 1.4.	Cấu trúc cơ chất và đặc trưng của CHI loại I và CHI loại II tương ứng	19
Hình 1.5.	Cấu trúc CHI với cơ chất (2S)-naringenin.....	20
Hình 1.6.	Cấu trúc CHI và phản ứng với (2S)-naringenin.....	21
Hình 1.7.	Một phần con đường của flavonoid và isoflavonoid.	23
Hình 1.8.	Các gen <i>GmCHI</i> của đậu tương được nhóm thành 4 phân họ dựa trên cơ sở tương đồng và cơ chất đặc hiệu.....	25
Hình 2.1.	Hạt của 5 giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu.....	42
Hình 2.2.	Sơ đồ tổng quát các thí nghiệm thực hiện trong luận án	46
Hình 2.3.	Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen <i>pCB301_GmCHI1A</i>	50
Hình 3.1.	Sắc ký đồ phân tích daidzein và genistein từ mầm hạt đậu tương ở giai đoạn nảy mầm 3 ngày tuổi.	57
Hình 3.2.	Biểu đồ so sánh hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của các giống đậu tương DT51, DT26, DT90, DT2008, DT84.....	58
Hình 3.3.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmCHI1A</i>	59
Hình 3.4.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR với cặp mồi <i>pUC18F/pUC18R</i>	60
Hình 3.5.	Kết quả phân tích bằng BLAST trên NCBI trong nhận diện trình tự gen <i>GmCHI1A</i> phân lập từ giống đậu tương DT26.	60
Hình 3.6.	Trình tự gen <i>GmCHI1A</i> (cDNA) phân lập từ mRNA của bốn giống đậu tương DT26, DT51, DT2008, DT84. NM_00124890: mã số của trình tự gen <i>GmCHI1A</i> trên GenBank.....	62

Hình 3.7.	Trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>GmCHI1A</i> của giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT84 và DT2008 so với NM_001248290.....	64
Hình 3.8.	Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>GmCHI1A</i> được thiết lập theo phương pháp UPGMA	67
Hình 3.9.	Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmCHI1A</i> được thiết lập theo phương pháp UPGMA	68
Hình 3.10.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt mở vòng <i>pRTRA7/3</i> và cắt <i>pBT-GmCHI1A</i> bằng cặp enzyme <i>NcoI/NotI</i>	70
Hình 3.11.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>GmCHI1A</i> từ các dòng khuẩn lạc.	71
Hình 3.12.	A: Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid <i>pRTRA7/3_GmCHI1A</i> bằng <i>HindIII</i> . B: Sơ đồ cấu trúc và kích thước của đoạn <i>CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA</i> thu nhận được.....	73
Hình 3.13.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid <i>pCB301</i>	73
Hình 3.14.	Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen <i>pCB301_GmCHI1A</i>	74
Hình 3.15.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>GmCHI1A</i> từ khuẩn lạc <i>E.coli</i> tái tổ hợp.	75
Hình 3.16.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR bằng cặp mồi đặc hiệu <i>CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R</i> từ các dòng khuẩn lạc <i>A.tumefaciens</i> CV58.....	76
Hình 3.17.	Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen <i>GmCHI1A</i>	77
Hình 3.18.	A-Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển <i>GmCHI1A</i> từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.; B- Kết quả Southern blot các mẫu thuốc lá chuyển gen <i>GmCHI1A</i>	79

Hình 3.19.	A- Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR nhân gen <i>GmCHI1A</i> (cDNA) từ mRNA của 5 cây thuốc lá chuyển gen ở thể hệ T0. B- Kết quả phân tích Western blot các cây thuốc lá chuyển gen thể hệ T0.	80
Hình 3.20.	Kết quả tạo cây đậu tương chuyển gen <i>GmCHI1A</i> từ giống DT2008 bằng kỹ thuật lây nhiễm <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp qua nách lá mầm hạt chín.....	82
Hình 3.21.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen chuyển <i>GmCHI1A</i> từ các cây đậu tương chuyển gen T0 và các cây đối chứng không chuyển gen.	84
Hình 3.22.	Sơ đồ cắt vector <i>pCB301_GmCHI1A</i> bởi enzyme <i>SacI</i> để tạo cấu trúc <i>nptII_CaMV35S_GmCHI1A_cmyc</i>	86
Hình 3.23.	Kết quả phân tích Southern blot các cây đậu tương chuyển gen <i>GmCHI1A</i> với đoạn dò <i>nptII</i> được đánh dấu bằng biotin.....	87
Hình 3.24.	Kết quả phân tích Western blot protein từ các cây đậu tương chuyển gen thể hệ T1 và cây không chuyển gen.....	88
Hình 3.25.	Hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A của các dòng đậu tương chuyển gen T1-1, T1-4, T1-21, T1-24 và cây đối chứng không chuyển gen (WT) từ phân tích ELISA.....	89

DANH MỤC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1.	SƠ ĐỒ CẤU TRÚC VECTOR pBT, pRTRA7/3, pCB301	1
Phụ lục 1.1.	Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pBT	1
Phụ lục 1.2.	Sơ đồ cấu trúc vector pRTRA7/3	1
Phụ lục 1.3.	Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301	2
PHỤ LỤC 2.	MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TRONG HỆ THỐNG TÁI SINH IN VITRO PHỤC VỤ CHUYỂN GEN	3
2.1.	Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn	3
2.2.	Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá chuyển gen	3
2.3.	Môi trường tái sinh in vitro ở đậu tương.....	4
PHỤ LỤC 3.	SẮC KÝ ĐỒ PHÂN TÍCH DAIDZEIN VÀ GENISTEIN TỪ MẦM HẠT ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN THỂ HỆ T2 BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC	5

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Flavonoid là sản phẩm tự nhiên quan trọng có vai trò bảo vệ thực vật và mang lại lợi ích về sức khỏe của con người. Isoflavone thuộc nhóm flavonoid chứa nhiều trong hạt đậu tương, biểu hiện ở các đặc tính như chống oxy hóa, chống ung thư, kháng khuẩn và chống viêm. Isoflavone trong hạt đậu tương dễ sử dụng cho người, trong khi đó một số hợp chất có thành phần tương tự như isoflavone ở cỏ ba lá, cỏ linh lăng, cây dong, ... lại rất khó sử dụng.

Isoflavone được tổng hợp từ 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), isoflavone synthase (IFS) và các enzyme khác. CHI là enzyme chìa khóa xúc tác cho phản ứng từ phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin. Naringenin được chuyển hóa thành nhiều loại flavonoid chính như: flavanone, flavonol và anthocyanin. CHI được phân thành hai loại là CHI loại I và CHI loại II. Các CHI loại I được tìm thấy trong hầu hết các loài thực vật, bao gồm cả cây họ Đậu và không phải cây họ Đậu; còn các CHI loại II chỉ có ở cây họ Đậu. CHI xúc tác hai nhánh chuyển hoá các chalcone (naringenin chalcone và isoliquiritigenin) thành các flavanone tương ứng (naringenin và liquiritigenin). Các CHI loại I xúc tác chuyển đổi naringenin-chalcone (2',4',6',4'-tetrahydroxychalcone) thành 4',5,7-trihydroxyflavanone. Các CHI loại II sử dụng cả naringenin-chalcone và isoliquiritigenin (2',4',4'-trihydroxychalcone) để tổng hợp naringenin và liquiritigenin. Naringenin và liquiritigenin là hai tiền chất của phản ứng tạo thành isoflavone (glycitein, daidzein, genistein) với sự tham gia của IFS.

Vai trò của gen *CHI* mã hóa enzyme CHI đã được chứng minh bởi kết quả so sánh dạng hoa cảm chương đột biến do tích lũy naringenin-chalcone-2'-

glucoside và dạng bình thường có màu trắng hoặc màu đỏ. Các kết quả nghiên cứu biểu hiện gen *CHI* cũng được thực hiện ở hành tây, thuốc lá, dạ yến thảo, cà chua, nhót, cây *Chamaemelum nobile*. Những nghiên cứu này đều khẳng định sự biểu hiện mạnh gen *CHI* làm tăng hàm lượng isoflavone tổng số ở cây chuyển gen nhiều lần so với cây không chuyển gen. Như vậy việc tác động đến enzyme *CHI* có thể làm tăng tích lũy isoflavone và các flavonoid khác.

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là loại cây trồng có vị trí quan trọng trong sản xuất nông nghiệp của nhiều quốc gia trên thế giới. Hạt đậu tương có giá trị dinh dưỡng cao, với hàm lượng protein và lipid cao, chứa nhiều amino acid không thay thế (lysine, tryptophan, methionine, leucine...), các muối khoáng Ca, Fe, Mg, P, K, Na, và các vitamin (B1, B2, C, E, K...) cần thiết cho cơ thể người và động vật. Hạt đậu tương là nguồn nguyên liệu cho chế biến thực phẩm vì thế đây được coi là mặt hàng xuất khẩu có giá trị cao trên thế giới. Bộ rễ của đậu tương có nhiều nốt sần, là kết quả cộng sinh của một loại vi sinh vật hình que *Bradyrhizobium japonicum* có khả năng cố định đạm nên đậu tương không những không kén đất mà còn có thể cải tạo đất.

Đáng chú ý là trong hạt đậu tương chứa isoflavone, tuy nhiên hàm lượng isoflavone trong hạt tương đối thấp, khoảng từ 50 - 3000 $\mu\text{g/g}$ và tồn tại ở hai dạng chính là β -glucoside (daidzin, genistin, glycitin) và aglycone (daidzein, genistein, glycitein). Dạng glycoside có khối lượng phân tử lớn được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người, trong khi đó, dạng aglycone được hấp thụ nhanh hơn, nhưng hàm lượng lại rất thấp. Đây là lý do thu hút sự quan tâm nghiên cứu trong việc cải thiện hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương. Trong đó, cách tiếp cận tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa của con đường sinh tổng hợp phenylpropanoid là kỹ thuật được ứng dụng để làm tăng hàm lượng isoflavone ở nhiều loài thực vật khác nhau.

Ở cây đậu tương có 12 gen *GmCHI* được sắp xếp vào 4 phân họ, trong đó phân họ II có ba gen *GmCHI* gồm: *GmCHI1A*, *GmCHI1B1* và *GmCHI1B2*. Gen

GmCHI1A ở đậu tương có bốn exon và ba intron nằm trên nhiễm sắc thể số 20. Đoạn mã hóa của gen *GmCHI1A* có 657 nucleotide, mã hóa cho 218 amino acid. Đến nay mới có nghiên cứu của Lyle và cs (2005) về biểu hiện gen *GmCHI* ở nấm men và của Vu và cs (2018) phân tích biểu hiện gen *GmCHI1A* ở cây *Talinum paniculatum*, mà chưa tìm thấy nghiên cứu nào đề cập đến kết quả phân tích sự biểu hiện quá mức (overexpression) của gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương theo hướng tiếp cận tạo dòng cây chuyển gen có hàm lượng isoflavone cao.

Xuất phát từ những cơ sở trên chúng tôi đã chọn và tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu biểu hiện gen GmCHI1A liên quan đến tổng hợp isoflavone phân lập từ cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)”*** nhằm làm sáng tỏ mối liên hệ giữa việc tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* với sự tăng hàm lượng isoflavone trong mầm hạt đậu tương chuyển gen.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Biểu hiện được gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen và tạo được dòng đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* có hàm lượng isoflavone cao hơn đối chứng không chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu đặc điểm của gen GmCHI1A của cây đậu tương

- i) Khảo sát hàm lượng isoflavone của một số giống đậu tương trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam.
- ii) Nghiên cứu thông tin của gen *GmCHI* của cây đậu tương, thiết kế cặp mồi PCR và nhân bản đoạn mã hóa của gen *GmCHI1A* từ giống đậu tương có hàm lượng isoflavone cao.
- iii) Tách dòng, giải trình tự nucleotide và phân tích đặc điểm của gen *GmCHI1A* phân lập từ cây đậu tương.

3.2. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen *GmCHI1A* và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen đã thiết kế.

- i) Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển *GmCHI1A*
- ii) Tạo vector chuyển gen pCB301
- iii) Tạo dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 mang vector chuyển gen

3.3. Phân tích biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen

- i) Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* vào giống đậu tương DT2008.
- ii) Phân tích sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* vào hệ gen cây đậu tương bằng PCR và Southern blot.
- iii) Phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp *GmCHI1A* ở cây đậu tương chuyển gen bằng Western blot và ELISA.
- iv) Đánh giá sự thay đổi hàm lượng isoflavone ở cây chuyển gen *GmCHI1A* so với đối chứng không chuyển gen.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình nghiên cứu mới ở Việt Nam và trên thế giới đã chứng minh sự biểu hiện mạnh của gen *GmCHI1A* làm tăng hàm lượng isoflavone ở mầm hạt đậu tương chuyển gen. Luận án là công trình có hệ thống với nội dung được trình bày từ phân lập gen đến thiết kế vector chuyển gen thực vật, phân tích biểu hiện gen và tạo dòng cây chuyển gen có hàm lượng isoflavone cao.

Cụ thể là:

- 1) Gen *GmCHI1A* được phân lập từ cây đậu tương Việt Nam có kích thước của vùng mã hóa là 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid, thuộc phân họ II nằm trên nhiễm sắc thể số 20 của đậu tương.
- 2) Lần đầu tiên gen *GmCHI1A* được phân tích biểu hiện và sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmCHI1A* đã làm tăng hàm lượng enzyme CHI ở cây đậu tương.

3) Tạo được 4 dòng đậu tương chuyển gen ở thể hệ T2 có hàm lượng daidzein tăng từ 166,46% đến 187,23% và genistein tăng từ 329,80%-463,93% so với cây không chuyển gen.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Về mặt khoa học, kết quả của luận án đã chứng minh được sự tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp isoflavone của đậu tương đã làm tăng hàm lượng isoflavone trong mầm hạt đậu tương. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để cải thiện hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong cây trồng bằng kỹ thuật biểu hiện gen.

Kết quả đăng tải trên các bài báo khoa học và các trình tự gen đăng ký trên GenBank là tài liệu có giá trị tham khảo trong nghiên cứu và giảng dạy.

Về mặt thực tiễn, các dòng đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* làm vật liệu phục vụ chọn giống đậu tương có hàm lượng isoflavone cao. Kết quả nghiên cứu của luận án có thể áp dụng vào các giống cây họ Đậu và các loài thực vật khác trong định hướng nâng cao hàm lượng isoflavone trong mầm hạt nhằm nghiên cứu các thực phẩm chức năng phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ ISOFLAVONE TRONG HẠT ĐẬU TƯƠNG

1.1.1. Cây đậu tương

1.1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm thực vật học của cây đậu tương

Đậu tương là một trong số những cây trồng có lịch sử lâu đời nhất của loài người. Năm 1993, nhiều nhà khoa học đã dựa vào sự đa dạng về hình thái của hạt, thống nhất cây đậu tương có nguồn gốc từ vùng Mãn Châu (Trung Quốc) xuất phát từ một loại đậu tương dại, thân mảnh, dạng dây leo, có tên khoa học là *Glycine soja* Sieb và Zucc. Từ Trung Quốc đậu tương được lan truyền sang các nước Đông Nam châu Á và dần lan rộng trên khắp thế giới, được nông dân các nước châu Á coi đây là một trong những cây trồng chính [14].

Ở Việt Nam, đậu tương đã được canh tác lâu đời, chủ yếu ở một số tỉnh vùng Đông Bắc, miền Bắc nước ta [3], [6]. Mặc dù, được trồng từ rất sớm nhưng chỉ trong vài chục năm gần đây đậu tương mới được quan tâm, phát triển và ngày nay nó được xem là một giống cây trồng có giá trị dinh dưỡng cao, chiếm một vị trí quan trọng trong nền kinh tế. Tuy nhiên, diện tích trồng và sản lượng chưa cao so với các nước trên thế giới.

Đậu tương có bộ NST $2n=40$, tên khoa học là *Glycine max* (L) Merrill, thuộc chi *Glycine*, họ Đậu Fabaceae, phân họ Faboideae và bộ Phaseoleae. Do xuất phát từ những yêu cầu, căn cứ và tiêu chí phân loại khác nhau nên đậu tương có nhiều cách phân loại khác nhau. Trong số đó, hệ thống phân loại căn cứ vào đặc điểm hình thái, phân bố địa lý và số lượng nhiễm sắc thể do Hymowitz và Newell (1984) xây dựng vẫn được nhiều người sử dụng. Theo hệ thống này ngoài chi *Glycine* còn có thêm chi phụ *Soja*. Chi *Glycine* được chia ra thành 7 loài hoang dại lâu năm, và chi phụ *Soja* được chia ra làm 2 loài: loài

đậu tương trồng *Glycine* (L.) Merr và loài hoang dại hàng năm *Glycine Soja* Sieb và Zucc [6].

Về đặc điểm thực vật học, đậu tương là cây trồng cạn thu hạt bao gồm các bộ phận rễ, thân, lá, hoa, quả và hạt. Rễ cây đậu tương gồm rễ chính và rễ phụ. Rễ chính có thể ăn sâu 30-50 cm và có thể trên 1 m. Trên rễ chính mọc ra nhiều rễ phụ. Bộ rễ của đậu tương có nhiều nốt sần là kết quả cộng sinh của một loại vi sinh vật hình que có tên khoa học là *Bradyrhizobium japonicum* với rễ cây đậu tương. Cây đậu tương thuộc thân thảo, có hình tròn, trên thân có nhiều lông nhỏ. Thân khi còn non có màu xanh hoặc màu tím, khi về già chuyển sang màu nâu nhạt, màu sắc của thân khi còn non có liên quan chặt chẽ với màu sắc của hoa sau này. Sự khác biệt của cây đậu tương với cây trồng khác là khi cây ra hoa rồi lại là lúc thân cành phát triển mạnh nhất. Cây đậu tương có 3 loại lá, đó là lá mầm, lá nguyên và lá kép. Lá mầm (lá tử diệp) khi mới mọc có màu vàng hay xanh lục, khi tiếp xúc với ánh sáng thì chuyển sang màu xanh. Hạt giống to thì lá mầm chứa nhiều dinh dưỡng nuôi cây mầm, cho nên khi trồng đậu tương nên làm đất tơi nhỏ và chọn hạt to cây sẽ mọc khỏe, sinh trưởng tốt. Lá nguyên (lá đơn) xuất hiện sau khi cây mọc từ 2-3 ngày và mọc phía trên lá mầm. Lá đơn mọc đối xứng nhau. Lá đơn to màu xanh bóng là biểu hiện cây sinh trưởng tốt. Lá đơn to xanh đậm biểu hiện của một giống có khả năng chịu rét. Lá đơn nhọn gọn sóng là biểu hiện cây sinh trưởng không bình thường. Mỗi lá kép có 3 lá chét, có khi 4-5 lá chét. Lá kép mọc so le thường có màu xanh tươi khi già biến thành màu vàng nâu. Hoa đậu tương nhỏ, không hương vị, thuộc loại hoa đồng chu lưỡng tính trong hoa có nhị và nhụy, mỗi hoa gồm 5 lá đài, 5 cánh hoa có 10 nhị và 1 nhụy. Màu sắc của hoa thay đổi tùy theo giống và thường có màu tím, tím nhạt hoặc trắng. Đa phần các giống có hoa màu tím và tím nhạt. Hoa phát sinh ở nách lá, đầu cành và đầu thân [3]. Số quả biến động từ 2 đến 20 quả ở mỗi chùm hoa và có thể đạt tới 400 quả trên một cây. Một quả chứa từ 1 tới 5 hạt,

nhưng hầu hết các giống quả thường từ 2 đến 3 hạt. Hạt đậu tương có nhiều hình dạng khác nhau, như hình tròn, hình bầu dục, tròn dẹt,... [6], [129]. Khi hạt đã phát triển đạt đến kích thước tối đa, các khoang hạt đã kín, quả đã đủ mẩy thì cây ngừng sinh trưởng. Khi các hạt đã rắn dần và đạt đến độ chín sinh lý vỏ hạt có màu sắc đặc trưng của giống, còn vỏ quả thì chuyển dần sang màu vàng, vàng tro, xám, lá của cây cũng chuyển dần sang úa vàng và rụng dần [6].

Một số nhân tố sinh thái cũng ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương như đất, nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng. Đất trồng đậu tương thích hợp nhất là đất thịt nhẹ, tơi xốp, thoáng, thoát nước, pH từ 6,5-7,2. Tùy từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển mà cây đậu tương có yêu cầu nhiệt độ khác nhau. Nhu cầu nước của cây đậu tương thay đổi tùy theo điều kiện khí hậu, kỹ thuật trồng trọt và thời gian sinh trưởng. Đậu tương có phản ứng với độ dài ngày, các giống khác nhau phản ứng với độ dài ngày khác nhau [130].

1.1.1.2. Thành phần hóa học của hạt đậu tương

Trong hạt đậu tương, phôi thường chiếm 2%, hai lá mầm chiếm 90% và vỏ hạt chiếm 8% khối lượng hạt. Trong thành phần hóa học của hạt đậu tương, protein chiếm một tỷ lệ khối lượng rất lớn, khoảng 32% - 52%, trong khi đó hàm lượng protein trong gạo chỉ 6,2-12%; ngô 9,8-13,2%; thịt bò 21%; thịt gà 20%; cá 17-20% và trứng 13-14,8% [6]. Hàm lượng protein trong hạt đậu tương cao hơn cả hàm lượng protein có trong cá thịt và cao gấp 2 lần so với các loại đậu đỗ khác [6]. Thành phần amino acid trong protein của đậu tương ngoài methyonine và tryptophan còn có các amino acid khác với số lượng khá cao tương đương lượng amino acid có trong thịt. Protein của đậu tương chứa đủ 8 amino acid thiết yếu mà cơ thể người không thể tự tổng hợp được. Đặc biệt, hạt đậu tương chứa isoflavone có cấu trúc tương tự như hoocmon nữ (estrogen), có lợi cho sức khỏe con người, chống lại các tác nhân ung thư, giảm cholesterol máu, ngăn ngừa loãng xương và triệu chứng tiền mãn kinh ở phụ nữ [2], [20], [60], [77].

Lipid trong hạt đậu tương có từ 18-24%. Lipid của đậu tương chứa một tỉ lệ cao các acid béo chưa no (khoảng 60-70%) có hệ số đồng hóa cao, mùi vị thơm như acid linoleic chiếm 52-65%, oleic từ 25-36%, linolenic khoảng 2-3%. Dùng dầu đậu tương thay mỡ động vật có thể tránh được xơ vữa động mạch [6]. Carbohydrate trong đậu tương khoảng 22-35,5%, trong đó 1-3% tinh bột. Chất tro trong đậu tương chiếm từ 4,5-6,8%. Ngoài ra, trong hạt đậu tương có khá nhiều loại vitamin như B1 và B2 và các loại vitamin PP, A, E, K, C, ... Đặc biệt trong hạt đậu tương nảy mầm, hàm lượng isoflavone, vitamin tăng lên nhiều so với hạt tiềm sinh [6].

1.1.2. Isoflavone

1.1.2.1. Lợi ích của isoflavone đối với sức khỏe con người

Người ta đã xác định được năm hợp chất có trong hạt đậu tương có khả năng chống lại tế bào ung thư, đó là, chất ức chế protease, phytate, phytosterol, saponin và isoflavone [2]. Vì vậy, isoflavone đậu tương là một trong những hợp chất đem lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Isoflavone có hoạt tính giống estrogen và có tác dụng tốt cho phụ nữ ở thời kỳ mãn kinh [60]. Ngoài ra chất này còn có tác dụng giảm nguy cơ bệnh tim mạch mãn tính bằng cách giảm mức độ oxy hóa các cholesterol và giảm sự tích lũy LDL-cholesterol trên thành mạch máu, qua đó làm tăng cường quá trình phục hồi của thành mạch [71]. Đồng thời, isoflavone cũng có tác dụng kìm hãm ung thư ở giai đoạn tiềm ẩn trước khi phát triển thành các khối u lớn hơn, nhờ vậy ngăn ngừa một số bệnh ung thư như ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú. Genistein là loại isoflavone quý hiếm có khả năng chống oxy hóa, kích thích sản sinh ra lượng collagen đáng kể và kìm hãm sự phát triển của các tế bào ung thư [83]. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra các isoflavone ngăn ngừa sự loãng xương, đồng thời tăng mật độ chất trong xương [20].

1.1.2.2. Hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương

Đậu tương là một trong số rất ít thực vật chứa hàm lượng cao các isoflavone. Hàm lượng isoflavone trong đậu tương nằm trong khoảng từ 0,05-3 mg/g và hàm lượng isoflavone thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố giống, các điều kiện sinh trưởng và thu hoạch. Theo báo cáo của Hammond và cs (2005), hàm lượng isoflavone của đậu tương Mỹ có 1,2-2,5mg/g, đậu tương Hàn Quốc có 0,5-2,3mg/g và đậu tương Nhật Bản có 0,2-3,5mg/g [43]. Theo Jin AK và cs (2007), phôi, lá mầm, vỏ hạt đậu tương có nồng độ isoflavone khác nhau. Trong đó, isoflavone có nồng độ 2,887 mg/g ở phôi, 0,325 mg/g trong lá mầm và 0.033 mg/g trong vỏ hạt. Mười hai đồng phân isoflavone đã được tách bằng phương pháp HPLC-PDA [54]. Báo cáo của Grażyna Szymczak và cs (2017) cho thấy daidzin (daidzein 7- O -glucoside), malonyldaidzin, genistin (genistein 7- O-glucoside) và malonylgenistin là các isoflavone chiếm ưu thế có trong hạt đậu tương và hàm lượng isoflavone từ 3,198 - 4,030 mg/g [38]. Báo cáo năm 2018 của các nhà khoa học Ấn Độ cho thấy hàm lượng isoflavone trong hạt của 21 giống đậu tương dao động trong khoảng 0,1409 -1,0486 mg/g [18]. So sánh hàm lượng isoflavone giữa rễ với lá đậu tương bằng phân tích HPLC và Real-time PCR cho thấy hàm lượng isoflavone trong rễ cao hơn đáng kể so với trong lá, trong khi biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp isoflavone trong lá cao hơn nhiều so với rễ [86]. Năm 2017, các nhà khoa học Indonesia phân tích isoflavone của 34 giống đậu tương đen cho thấy hàm lượng daidzein chênh lệch nhau, giao động từ 0,01 - 0,21 mg/g và genistein từ 0,02 - 0,03 mg/g. Hàm lượng daidzein cao hơn genistein ở 31 giống (0,03 - 0,21 mg/g) và thấp hơn genistein ở 3 giống còn lại (0,01 - 0,02 mg/g), bên cạnh đó cũng xác định được giống tiềm năng cho hàm lượng isoflavone cao [97]. Khi phân tích hàm lượng và thành phần isoflavone trong mầm đậu tương (daidzin, glycitin, genistin, malonyl-daidzin (m-daidzin), malonyl-glycitin (m-glycitin) và malonyl-genistin (m-genistin)) có nguồn gốc từ tất cả các vị trí địa lý trên lãnh thổ Hàn Quốc cho thấy, hàm lượng

isoflavone trong đậu tương dao động từ 0,5 đến 5,51 mg/g với trung bình 2,78 mg/g. Trong đó, genistin cao nhất 1,393 mg/g, tiếp theo là daidzin 0,939 mg/g và glycitin 0,25 mg/g. Tổng hàm lượng isoflavone ngày càng tăng từ phía Bắc đến phía Đông Nam theo vị trí phân phối địa lý, điều này thể hiện những tác động không nhỏ của kiểu gen và vị trí thu thập [27]. Ở Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế và Viện Dinh dưỡng thì thành phần isoflavone tổng số có trong đậu tương là 1,5117 mg/g (phần ăn được), trong đó có 0,6779 mg/g daidzein, 0,7251 mg/g genistein và 0,1088 mg/g glycitein [1].

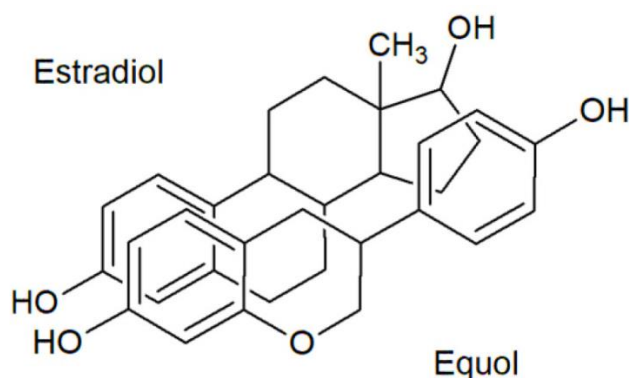
Thành phần và hàm lượng của các đồng phân với isoflavone cũng thay đổi trong các thực phẩm từ đậu tương và phụ thuộc vào phương pháp chế biến. Isoflavone tìm thấy trong đậu tương và các sản phẩm đậu tương không lên men chủ yếu là các glycoside - dạng hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người do có tính phân cực và trọng lượng phân tử cao, chúng chiếm đến 90% hàm lượng isoflavone tổng số [57]. Các aglycone (daidzein, genistein và glycitein) không có nhiều trong đậu tương và các thực phẩm từ đậu tương không lên men có hoạt tính sinh học mạnh [113]. Các isoflavone dạng aglycone được hấp thụ nhanh hơn với hàm lượng cao hơn so với các glycoside tương ứng [49], [92]. Trong số ba loại isoflavone aglycone thì tỷ lệ giữa daidzein:genistein:glycitein thường là 4:5:1 và glycitein có hàm lượng nhỏ nhất, chỉ chiếm 5-10% isoflavone tổng số trong các sản phẩm đậu tương [60], [77]. Ngoài ra, trong một số thử nghiệm lâm sàng trên đối tượng phụ nữ trưởng thành, daidzein được báo cáo là có hoạt tính sinh học cao hơn genistein [127].

1.1.2.3. Đặc điểm cấu trúc và động học của isoflavone

Isoflavone là các hợp chất polyphenol thuộc nhóm flavonoid có cấu trúc giống estrogen của người (Hình 1.1). Isoflavone có cấu trúc cơ bản gồm 2 vòng benzen: A nối với B bởi cầu ba carbon tạo thành một dị vòng pyran (vòng trung gian chứa nguyên tử oxy). Trong cấu trúc của isoflavone, vòng benzene B được nối ở vị trí thứ 3 thay vì vị trí số 2 hay số 4 của dị vòng C như các flavonoid

khác. Do tương đồng với cấu trúc hóa học estrogen của người nên các nhà khoa học gọi nó là estrogen thảo mộc hay phytoestrogen, nhưng có hoạt lực yếu hơn estrogen tự nhiên trong cơ thể người [107].

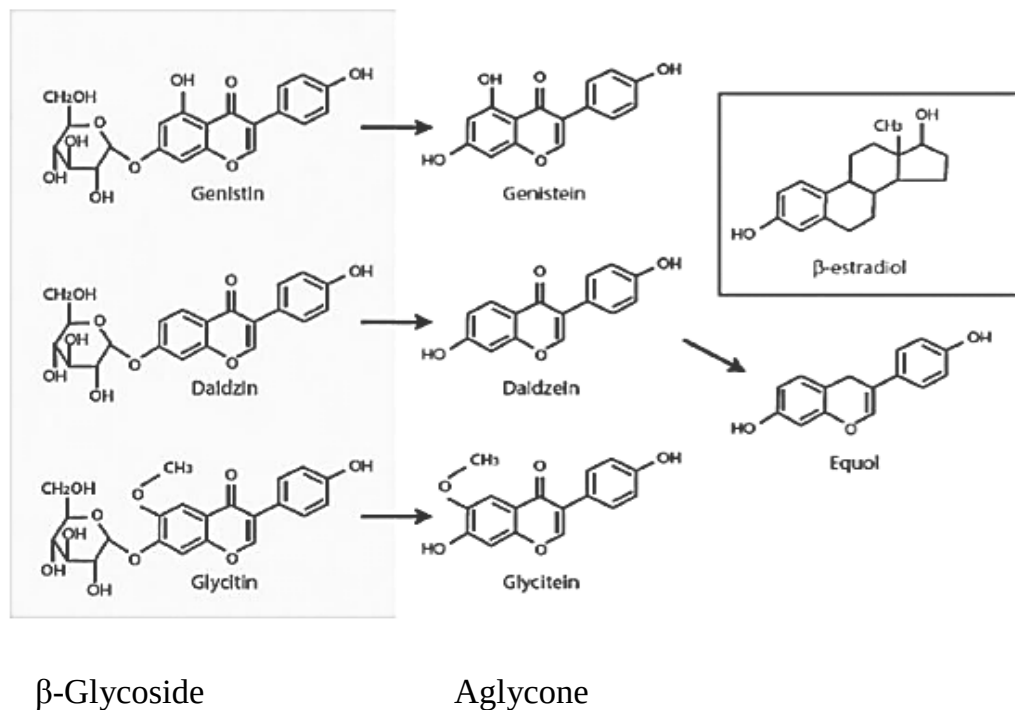
Trong tự nhiên, isoflavone có hai dạng chính, đó là glycoside và aglycone. Glycoside là dạng liên kết với glucose bằng các liên kết β -1,4-glycoside và aglycone là dạng không liên kết với phân tử đường glucose. Dạng glycoside (chưa có hoạt tính) được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người do có trọng lượng phân tử lớn và chiếm tới trên 90% isoflavone tổng số. Trong khi đó, dạng aglycone (có hoạt tính) được hấp thụ nhanh hơn so với dạng glycoside, nhưng chỉ chiếm tỷ lệ rất thấp (từ 1-5% isoflavone tổng số). Mặc dù vậy, các isoflavone dạng glycoside cũng được thủy phân một phần thành aglycone bởi nước bọt và sau đó bởi vi sinh vật đường ruột nhưng hiệu suất chuyển hóa rất thấp [44].



Hình 1.1. So sánh về cấu trúc của chất chuyển hóa equol của isoflavone với estradiol của estrogen [59].

Isoflavone trong đậu tương là một hợp chất phenolic gồm có: aglycone (daidzein, genistein và glyxitein), β -glucoside (daidzin, genistin, glycitin) (Hình 1.2) và các dẫn xuất malony và acetyl của chúng. Có nghĩa là isoflavone trong đậu tương tồn tại ở 4 dạng cấu trúc hóa học, trong đó mỗi dạng lại có 3 đồng phân nên tổng số là 12 loại bao gồm daidzein, genistein, glycitein (aglycone),

daidzin, genistin, glycitin (glycoside), 6''-O-acetyldaidzin, 6''-O-acetylgenistin, 6''-O-acetylglycitin (acetylglycoside), 6''-O-manonyldaidzin, 6''-O-manonylgenistin, 6''-O-manonylglycitin (manonylglycoside). Các dạng isoflavone chiếm ưu thế là manolydaidzin và manolygenistin chiếm 67%, các dạng glucoside là 31% và aglycone là 2% và dạng acetylated ít thấy không phát hiện được [89]. Một nghiên cứu khác cho thấy hạt đậu tương còn chứa các aglycone, như sissotrin, ononin; các dẫn xuất axetyl của β -glucozit: 6''-axetylsissotrin, 6''-axetylononin; các dẫn xuất malonyl của β -glucozit: 6''-manonylsissotrin, 6''-manonylsissotrin [66].



Hình 1.2. Một số dạng khác nhau của isoflavone [82]

Trong số các dạng khác nhau của isoflavone, genistein có hoạt tính sinh học mạnh nhất, kế đến là daidzein và glycitein có hoạt tính yếu nhất. Cấu tạo phân tử của genistein là $C_{15}H_{10}O_5$, có trọng lượng phân tử 270 Da. Genistein dạng tinh thể không màu, có hình kim dài với điểm nóng chảy ở 296 - 298 $^{\circ}$ C, khó hòa tan trong acid acetic băng (acid acetic không pha loãng) hay ethanol lạnh, hòa tan

mạnh trong ether và ethanol nóng, chuyển màu sang vàng sau khi hòa tan trong kiềm, và màu đỏ sẫm trong dung dịch sắt (III) clorua. Daidzein có công thức phân tử là $C_{15}H_{10}O_4$, trọng lượng phân tử 254 Da. Daidzein dạng tinh thể không màu, hình trụ với điểm nóng chảy ở 315 - 320⁰C, không tan trong nước, và hòa tan trong methanol, ethanol và acetone, chuyển màu sang màu vàng sau khi hòa tan trong kiềm và phát huỳnh quang bởi tia UV, phân hủy để tạo thành acid formic, resorcin và p-hydroxybenzoate với kiềm [37].

Glycoside isoflavone (genistin và daidzin) là những phân tử tương đối lớn, tan tốt trong nước, tính phân cực cao, khó hấp thu qua ống tiêu hóa. Để có tác dụng sinh học đầu tiên sẽ đòi hỏi sự thủy phân bởi β -glucosidase trong ruột non làm cho genistin và daidzin thủy phân thành các aglycon. *Lactobacillus sporogenes* là vi khuẩn chính sản xuất glycosidase giúp cân bằng tập khuẩn ruột, xúc tác cho thủy phân daidzin và genistin sang daidzein và genistein có hoạt tính “phytoestrogen” [37].

Các aglycon sẽ hấp thụ ở ruột non và sau đó vận chuyển đến gan qua tĩnh mạch chủ. Nồng độ đỉnh của aglycon trong máu chỉ đạt được 4-6 giờ sau khi uống chất chiết xuất từ hạt đậu tương. Sau khi hấp thu, genistein và daidzein sẽ trải qua các quá trình chuyển hóa khác nhau, chủ yếu xảy ra tại gan, ưa nước hơn, dễ đào thải qua pha giải độc (pha II) qua thận và mật (có chu kì ruột-gan) và qua cả sữa mẹ [34].

Các chất chuyển hóa thứ cấp isoflavone đậu tương bao gồm hydroxyl-O-demethylangolensin (genistein), o-demethylangolensin (daidzein), glycitein và equol. Trong đó equol có nguồn gốc từ chuyển hóa của daidzein trong quá trình trao đổi chất với vi khuẩn đường ruột. Equol là thành phần rất quan trọng cho hoạt tính của isoflavone đậu tương trong điều trị các triệu chứng mãn kinh, hoạt tính estrogen của equol mạnh hơn chất mẹ daidzein [59]. Sau đó equol,

genistein, daidzein sẽ liên kết với thụ thể estrogen đặc hiệu và kích thích thụ thể tạo nên “tác dụng estrogen”. Cùng lúc đó, glucuronic acid và các hợp chất sulfate được bài tiết vào mật để giúp cho quá trình lưu thông ruột, thực hiện chức năng phân tách daidzein và genistein. Và một lượng nhỏ flavonoid không được hấp thụ sẽ được bài tiết thông qua nước tiểu [37].

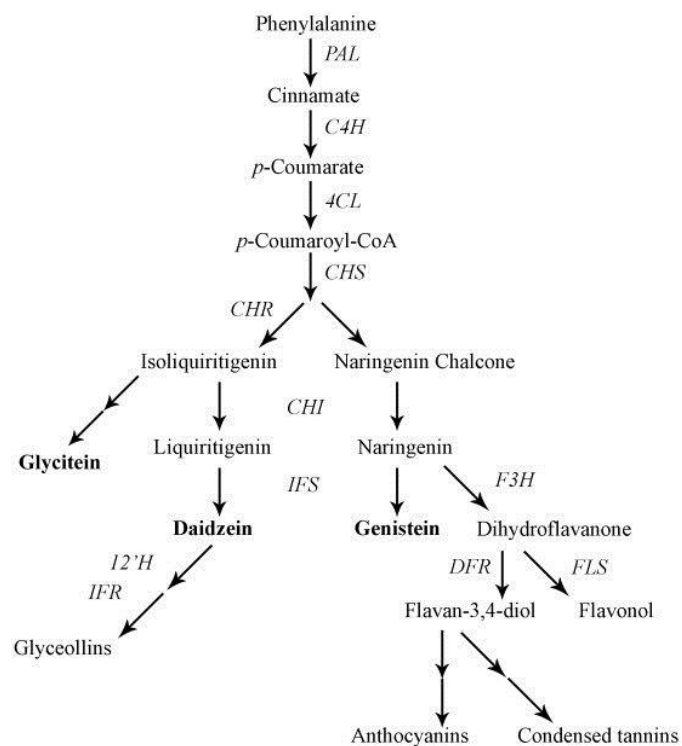
Isoflavone hoạt động trong cơ thể người bằng cách tác động vào estrogen, đó là liên kết với cả thụ thể α -estrogen (α -ER) và β -estrogen (β -ER), tác động lên các cơ quan đích, từ đó tạo ra nhiều lợi ích sức khỏe đối với một số bệnh phụ thuộc hormone [111]. Thụ thể α -ER có mặt tại màng trong tử cung, trong chất đệm của buồng trứng và ở tuyến vú. Thụ thể β -ER tồn tại trong các tế bào nội mô của thành mạch máu, ở não, thận và trong các tế bào của bàng quang và niệu đạo, trong tế bào của niêm mạc ruột và phổi, tế bào xương. Tùy thuộc vào loại thụ thể estrogen trên tế bào, isoflavone có thể làm giảm hoặc kích hoạt hoạt động của estrogen. Isoflavone có thể cạnh tranh với estrogen cho cùng các vị trí thụ thể do đó làm giảm nguy cơ khi estrogen dư thừa gây hại sức khỏe. Chúng cũng có thể làm tăng hoạt động của estrogen. Nếu trong thời kỳ mãn kinh, nồng độ estrogen tự nhiên của cơ thể giảm, isoflavone có thể bù đắp bằng cách liên kết với cùng một thụ thể, do đó làm giảm các triệu chứng mãn kinh [112].

Đáng chú ý là estradiol - một loại hormon estrogen sinh lý chủ yếu, kích thích α -ER và có tác dụng nội tiết trên màng trong tử cung và vú. Trong khi đó, isoflavone (genistein, daidzein và các chất chuyển hóa của chúng) lại kích thích chủ yếu vào β -ER, vì vậy rất khó có tác dụng trên màng trong tử cung và vú nhưng lại có nhiều tác dụng tốt với các triệu chứng của mãn kinh. Mặt khác, ái lực của isoflavone với ER thấp hơn ái lực của hormon estrogen do đó những tác dụng của isoflavone trong đậu tương luôn luôn yếu hơn rất nhiều so với tác dụng của hormon estrogen thực thụ, điều này tạo nên được sự cân bằng về hormon khi bổ sung isoflavone cho cơ thể [81].

1.1.3. Sinh tổng hợp isoflavone và các enzyme tham gia trong con đường phenylpropanoid

1.1.3.1. Con đường phenylpropanoid

Isoflavone được tổng hợp từ một nhánh của con đường phenylpropanoid ở các loài thực vật (Hình 1.3)



Hình 1.3. Con đường phenylpropanoid ở đậu tương [42].

Ngoài isoflavone, con đường phenylpropanoid còn sản sinh ra một loạt các hợp chất phenol như lignan, linhin, flavon, flavonol, tannin đặc (còn được gọi là proanthocyanidin) và anthocyanin. Trong đó, anthocyanin có vai trò tạo sắc tố, các flavonoid như flavon có tác dụng bảo vệ cây không bị tổn hại do tiếp xúc với bức xạ UV, isoflavone kích thích vi khuẩn *Rhizobium* đất hình thành các

nốt sản cố định đậm, ... Sự tổng hợp sinh học của các hoạt chất trong chuyển hóa phenylpropanoid này được gắn liền với sự phát triển của cây và được điều chỉnh bởi các tác động môi trường khác nhau [36].

Trong nhiều năm qua, các nghiên cứu về di truyền, sinh hóa đã tiết lộ rất nhiều công đoạn và các enzyme tham gia vào con đường dẫn đến tổng hợp isoflavone. Bắt đầu từ L-phenylalanine loại bỏ đi nhóm amin để tạo ra cinnamic acid qua PAL. Trong phản ứng thứ hai và thứ ba, cinnamate 4-hydroxylase (C4H) và 4 coumarate CoA ligase (4CL) chuyển đổi thành cinnamic acid *p*-coumaryl CoA. Các enzyme quan trọng đầu tiên để tổng hợp flavonoid là CHS và CHI, trong đó chuyển đổi chalcone thành flavone và CHR là cần thiết cho sự hình thành daidzein và glyceollins. Sau đó, IFS tham gia xúc tác để tổng hợp isoflavone [29], [42], [119].

Trong con đường phenylpropanoid, CHI và IFS là hai enzyme quan trọng tham gia vào quá trình tổng hợp isoflavone. CHI xúc tác cho phản ứng từ phân tử naringenin chalcone mạch hở và isoliquiritigenin mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin và liquiritigenin. Naringenin và liquiritigenin là hai tiền chất của nhiều hợp chất flavonoid và isoflavonoid [65]. IFS là một enzyme đặc biệt, xúc tác cho hai phản ứng của cùng một cơ chất, đó là phản ứng thủy phân và phản ứng dịch chuyển aryl nội phân tử. Trong con đường chuyển hóa phenylpropanoid, flavanone được chuyển đổi thành 2-hydroxyisoflavavone, sau đó tạo thành isoflavone qua 3 bước. Đầu tiên, một gốc tại C3 được tạo ra và sau đó sắp xếp lại dịch chuyển nhóm aryl nội phân tử từ C2 đến C3 và để lại một nhóm hydroxyl vẫn gắn liền với C2. Cuối cùng, isoflavavone dehydratase chuyển đổi 2-hydroxyisoflavanone thành isoflavone [77].

Tóm lại, isoflavone là chất chuyển hóa thứ cấp, có các chức năng sinh học đa dạng. Isoflavone và các hợp chất tương tự như isoflavone tìm thấy ở đậu

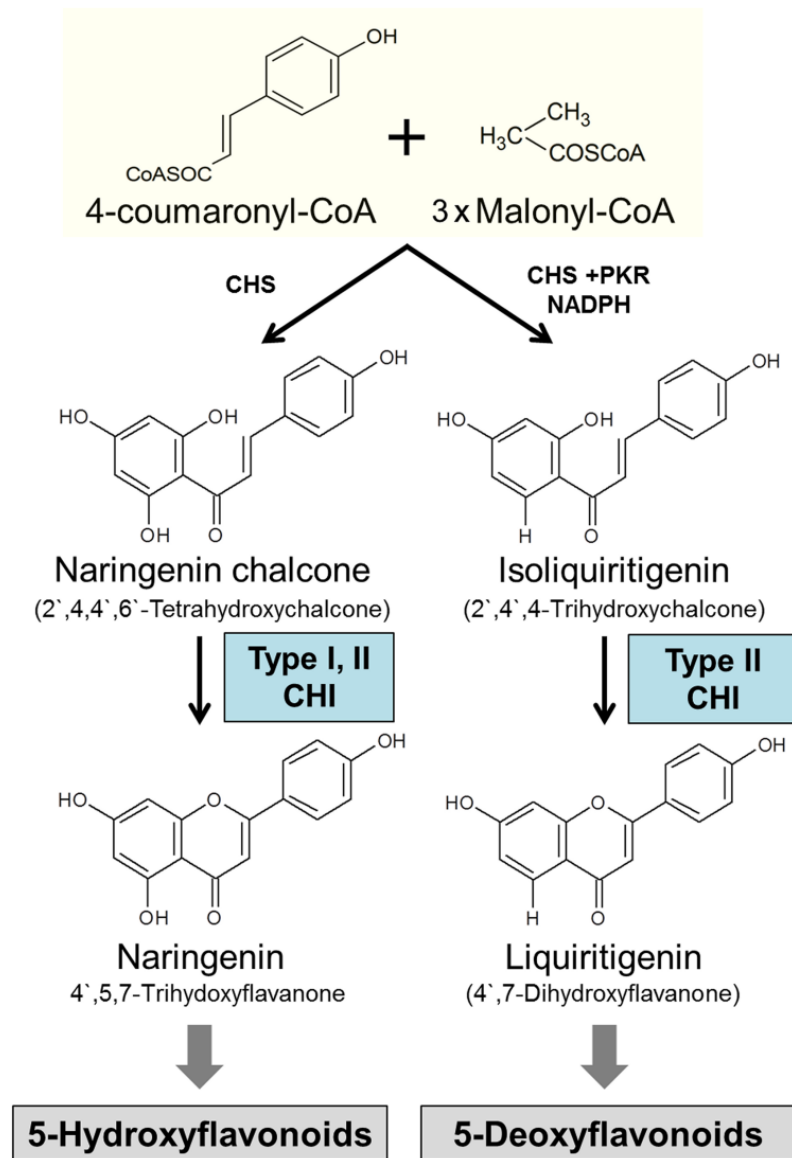
tương và một số loại thực vật khác như cỏ ba lá, cỏ linh lăng, cây dong, ...Isoflavone trong hạt đậu tương dễ sử dụng cho người, trong khi isoflavone có nguồn gốc từ các loài thực vật khác rất khó sử dụng. Isoflavone trong đậu tương có tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch, cải thiện sức khỏe của phụ nữ và có thể tác động tích cực đến quá trình sinh lý khác. Hàm lượng isoflavone trong đậu tương vẫn còn chưa cao, vì thế hướng nghiên cứu nâng cao hàm lượng isoflavone trong đậu tương, đặc biệt là mầm hạt là vấn đề được quan tâm nghiên cứu.

1.2. ENZYME CHI VÀ GEN MÃ HÓA CHI

1.2.1. Cấu trúc và cơ chế hoạt động của enzyme CHI

CHI là một enzyme xúc tác quan trọng giúp chuyển đổi naringenin (chalcone) thành (2S) naringenin theo con đường phenylpropanoid [73]. Enzyme CHI được phân thành hai loại chính là CHI loại I và CHI loại II do độ đặc hiệu bề mặt và sự khác biệt của enzyme CHI phân lập từ những thực vật không phải cây họ Đậu không thể sử dụng isoliquiritigenin như một cơ chất [77] (Hình 1.4).

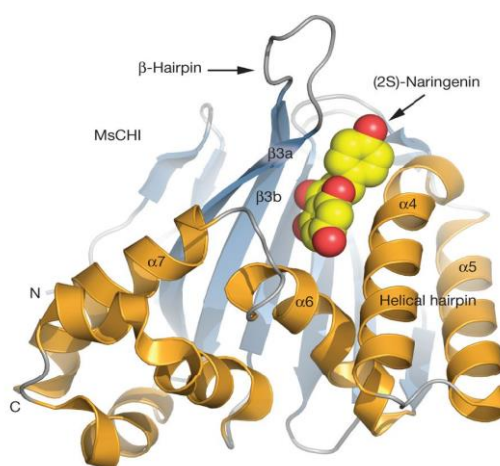
Độ đặc hiệu bề mặt của CHI được cho là do sự khác biệt về trình tự amino acid. Ser190 và Ile191 trong vùng $\alpha 6$ của CHI I được thay thế bởi Thr và Met tương ứng. Các CHI loại I được tìm thấy trong hầu hết các loại thực vật, bao gồm cả cây họ Đậu và không phải cây họ Đậu, có thể kể đến như lúa mạch, arabidopsis, dạ yến thảo và lúa, xúc tác chuyển đổi naringenin-chalcone (2',4',6',4-tetrahydroxychalcone) thành 5-hydroxy-flavonoid. Các CHI loại II chỉ có ở cây họ Đậu và sử dụng cả naringenin-chalcone và isoliquiritigenin (2',4',4-trihydroxychalcone) để tổng hợp 5-deoxy-flavonoid [77].



Hình 1.4. Cấu trúc cơ chất và đặc trưng của CHI loại I và CHI loại II tương ứng [80]

Cấu trúc không gian ba chiều của CHI với hình thức không chứa cơ chất và flavanone đã được báo cáo từ các cấu trúc ở các cây *Medicago sativa* và *Arabidopsis thaliana* [51], [72]. CHI tồn tại như một monome và cấu trúc enzyme lõi được đặc trưng bởi một tấm gồm các sợi xếp song song liên kết với nhau bằng liên kết hydro dọc theo bộ khung của chúng và nằm ở trung tâm (chứa 6-7 sợi). Trong đó, các sợi tạo thành một chuỗi các polypeptide có một

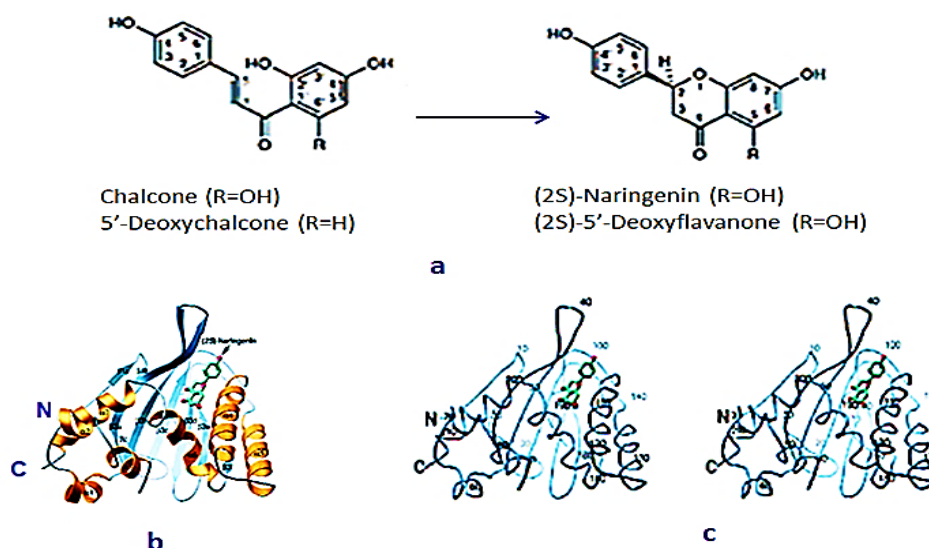
hướng được quy định bởi N-terminus và C-ending được gọi là “phiến gấp nếp β ”. Phiến gấp nếp β lớn này được tạo nên bởi 5 phiến gấp β nhỏ màu xám là $\beta 3a$, $\beta 3b$, $\beta 3c$, $\beta 3d$ và $\beta 3e$. Bao quanh phiến gấp nếp β ở trung tâm là 7-9 sợi xoắn α màu vàng ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ và $\alpha 7$). Mô hình cấu trúc của CHI chứa 218 amino acid gồm phiến gấp β lớn với 7 sợi xoắn α và hai phiến gấp β nhỏ ($\beta 1$, $\beta 2$) tạo thành một cấu trúc kẹp tóc ngắn nằm đối diện với phiến gấp β lớn (Hình 1.5) [72].



Hình 1.5. Cấu trúc CHI với cơ chất (2S)-naringenin [72].

Bảy sợi xoắn α được đặt ở bề mặt lõm của phiến gấp nếp β và vị trí hoạt động được hình thành giữa phiến gấp nếp β và sợi xoắn α - nơi phản ứng với cơ chất (2S)-naringenin hay isoliquiritigenin. Điều đặc biệt là khi so sánh trình tự amino acid của nhiều loài thực vật thì thấy rằng chúng có tính tương đồng cao ở vùng bảo thủ. Đó chính là phiến gấp β 3a, β 3b và chuỗi xoắn α 4, α 6 được bảo toàn ở các loài khác nhau và tạo thành một vị trí hoạt động trên bề mặt protein [80]. Dựa trên các phân tích về cấu trúc, cơ chế xúc tác, CHI ở thực vật được cho là liên quan đến quá trình ion hóa nhóm 2'-hydroxyl của cơ chất và sự tấn công tiếp theo là phản ứng 2'-oxyanion trong quá trình đóng vòng nội phân tử [52].

Các CHI loại I có mặt ở nhiều loài thực vật và chuyển đổi naringenin chalcone thành naringenin. Ngược lại, CHI loại II chỉ có trong cây họ Đậu, có hoạt tính xúc tác bổ sung, cho phép chúng chuyển đổi 4, 2', 4'-trihydroxychalcone (isoliquiritigenin) thành (2S)-7, 4'-dihydroxyflavanone (liquiritigenin). Những phân tích chức năng cấu trúc này cho thấy sự hình thành mạng lưới liên kết hydro giữa vị trí hoạt động của CHI và cơ chất của nó là rất quan trọng cho hoạt động xúc tác của enzyme.



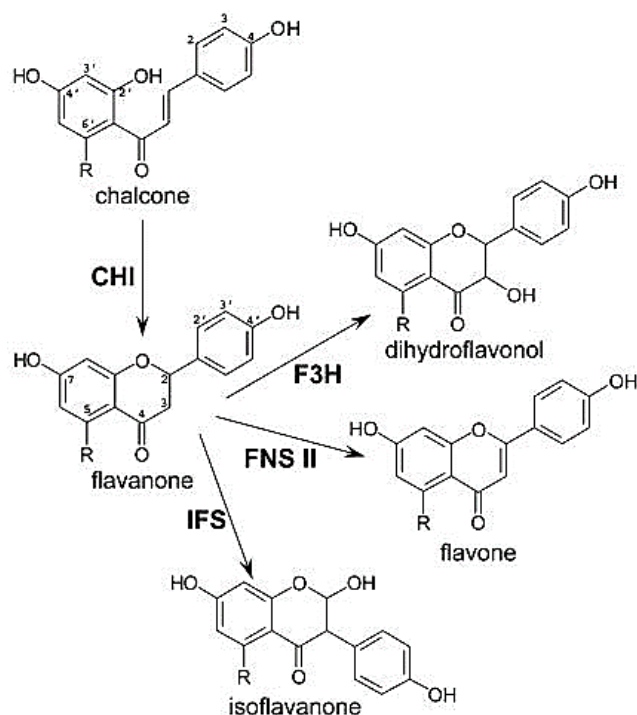
Hình 1.6. Cấu trúc CHI và phản ứng với (2S)-naringenin.

(2S)-naringenin (màu xanh lá cây), liên kết hidro (màu hồng) [51]. a: Phản ứng được xúc tác bởi CHI, bổ sung 2'-hydroxyl vào liên kết đôi không bão hòa, chalcone (bên trái) và flavanone (bên phải); b: Sơ đồ cấu trúc tổng thể của CHI, đầu N và đầu C được đánh dấu cùng cấu trúc các sợi (màu xanh dương) và xoắn α (màu vàng), vị trí liên kết của (2S) naringenin với CHI được chỉ định; c: Hình ảnh không gian ba chiều bộ khung $C\alpha$ của CHI, định hướng giống như hình (a) và vị trí (2S) naringenin cũng được hiển thị [51].

Naringenin và liquiritigenin là tiền chất của nhiều hợp chất flavonoid và isoflavonoid. Naringenin có vai trò quan trọng trong chuỗi chuyển hóa và là cơ

chất cho một số enzyme, xúc tác bởi 3 β -hydroxylase (F3H) tạo dihydroflavonol cần thiết cho việc sản xuất anthocyanin và tannin đặc. Để sinh tổng hợp flavone, flavone synthase (FNS) chuyển naringenin thành apigenin flavone. Có hai loại FNS, tuy nhiên FNSII phổ biến và tồn tại phần lớn trong các loài thực vật. Naringenin còn là cơ chất cho một số enzyme khác. Ở ngô, ngoài F3H và FNSII, flavonoid 3'-hydroxylase và flavonoid 3', 5'-hydroxylase đều thay đổi naringenin bằng cách bổ sung - hydroxyl hóa, tạo ra tiền chất của maysin. Dihydroflavonol 4-reductase cũng có thể sử dụng naringenin để bắt đầu tạo các mô cụ thể của phlobaphenes. Trong các loài thực vật tổng hợp isoflavone, isoflavone synthase (IFS) - một Cyt P450 monooxygenase đóng vai trò là điểm chuyển hóa chính cho sự hình thành của tất cả các hợp chất isoflavonoid. IFS di chuyển aryl nội phân tử của cả hai liquiritigenin và naringenin để tạo thành 2-hydroxyisoflavanones. Các isoflavanone không ổn định trong điều kiện môi trường xung quanh và có thể chuyển thành isoflavone một cách tự phát hoặc với sự hỗ trợ của một isoflavanone dehydratase giả định (Hình 1.7) [65].

Hiểu biết về các chất chuyển hóa giữa con đường flavonoid và isoflavonoid là cần thiết để phát hiện và sử dụng các cơ chế điều chỉnh đường dẫn. Ở cây *Arabidopsis thaliana*, CHS, CHI và dihydroflavonol 4-reductase có thể tương tác trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid; Để sản xuất tăng isoflavone trong các cây không phải họ Đậu, tích lũy naringenin là rất quan trọng, bởi vì IFS sẽ phải cạnh tranh với các enzyme nội sinh khác cho cơ chất này.



Hình 1.7. Một phần con đường của flavonoid và isoflavonoid.

Các phương án đánh số các nguyên tử cacbon cho chalcone và flavanone được đánh dấu. Nhóm -R là H hoặc O H. Khi R = H (OH), các tên thông thường là isoliquiritigenin (naringenin-chalcone), liquiritigenin (naringenin), daidzein (genistein), dihydroxyflavone (apigenin) và kaempferol (quercetin) cho sản phẩm tương ứng là chalcone, flavanone, isoflavone, flavone và dihydroflavonol [65].

1.2.2. Gen mã hoá CHI

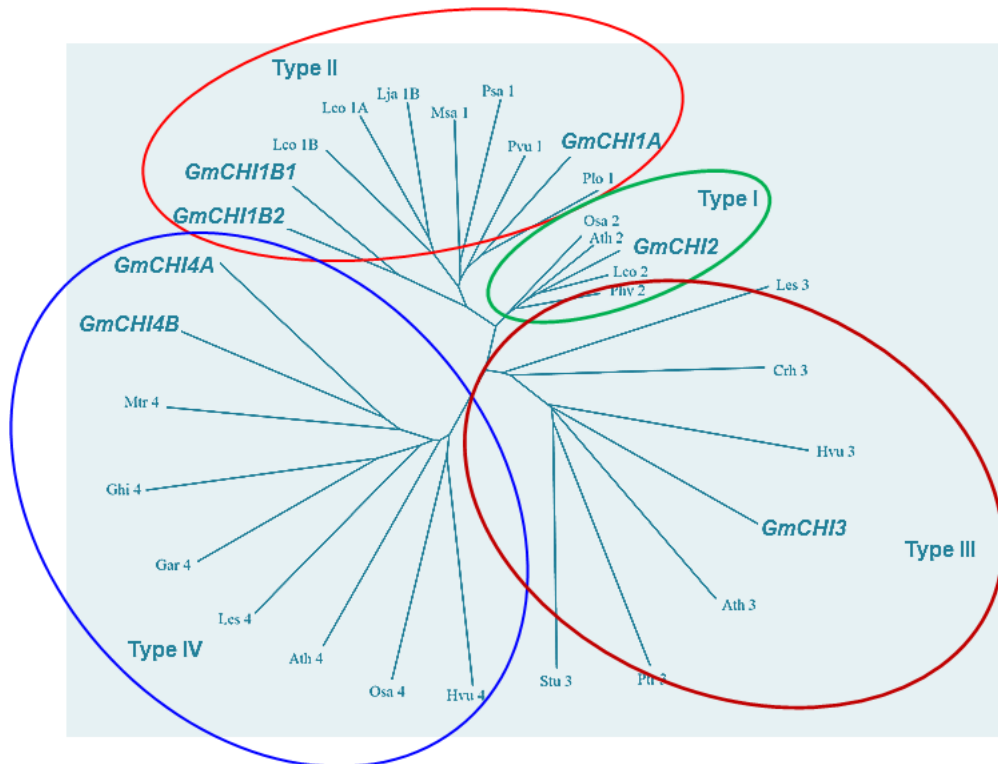
Cho đến nay, gen CHI đã được phân lập từ nhiều loại thực vật khác nhau bao gồm đậu tương, ngô, lúa mì, cỏ linh lăng, lạc, cỏ ca ri, cẩm chương và bạch quả *Ginkgo biloba*. CHI trong phân họ đầu tiên (CHI1) chỉ được tìm thấy trong cây họ Đậu và có 70% giống với *MsaCHI1*. Một số thành viên của phân họ này trước đây được chứng minh là có thể chuyển hóa được naringenin chalcone, được tìm thấy chủ yếu trong các cây họ Đậu. Các thành viên của phân họ thứ hai (CHI2) giống nhau ít nhất 60% và xuất hiện ở nhiều loài thực vật có liên quan xa. Tất cả các thành viên của phân họ này đã được thử nghiệm là chỉ chuyển hóa naringenin chalcone. Dựa trên sự tương đồng về trình tự, phân họ CHI1 thuộc

CHI loại II và phân họ CHI2 thuộc CHI loại I. Các thành viên của phân họ CHI3 và CHI4 cũng chứa nhiều loài thực vật có liên quan xa nhau được tập hợp từ cơ sở dữ liệu bộ gen thực vật tương đồng với *MsaCHI1* [30].

Năm 1994, Heather. Mckhann và Ann Hirsch đã phân lập được 2 gen CHI ký hiệu là CHI1, CHI2 với kích thước lần lượt là 666 bp và 845 bp từ cDNA của cỏ linh lăng (*Medicago sativa* L.) [69]. Grotewold và Peterson đã phân lập được một gen CHI từ cây ngô và thấy rằng các gen mã hóa một sản phẩm *ZmCHI1* có trọng lượng phân tử 24,3 kD [53]. Soderlund (2010) cũng đã phân lập được gen CHI1 từ mRNA của cây ngô với kích thước 1080 bp [95]. Terao và cs đã nghiên cứu phân lập được gen CHI từ cDNA của cây sắn dây *Pueraria lobata* với kích thước gen là 675 bp mã hóa một polypeptide 225 amino acid với trọng lượng phân tử 23,8kD và cDNA mã hóa đã được nhân bản gắn vào vector biểu hiện pET-3d và biểu hiện thành công trong *Escherichia coli* [103]. Năm 2003, Norimoto Shimada và cs đã phân lập được 3 gen: CHI1, CHI2 và CHI3 từ cDNA của cây *Lotusjaponicus* và công bố trên ngân hàng GenBank; CHI1 với mã số AB054801, chiều dài 681 bp, mã hóa cho chuỗi polypeptide 226 amino acid (24,4 kD); CHI2 mã số AB054802, chiều dài 666 bp, mã hóa cho chuỗi polypeptide 221 amino acid (23,9 kD) và CHI3 với mã số AB073787, chiều dài 678 bp, mã hóa cho 225 amino acid (24,2 kD) [74]. Gen *CHI* cũng được phân lập từ mRNA lá cây nho (*Vitis vinifera* L.) bởi Gutha và cs. Kết quả nghiên cứu phân lập được gen CHI có chiều dài 979 bp, mã hóa cho 234 amino acid [41].

Sau khi đã thu thập và phân tích 916 trình tự DNA, 1310 trình tự mRNA và 2403 trình tự amino acid của CHI đã đăng ký tại NCBI, Yin YC và cs (2018) đã xác định được độ dài đầy đủ của trình tự DNA CHI dao động từ 218 đến 3758 bp. Trình tự mRNA CHI dao động từ 265 đến 1436 bp và trình tự amino acid khoảng từ 35 đến 465 amino acid, khối lượng phân tử của protein CHI khoảng từ 23 đến 26 kD và điểm đẳng điện của CHI dao động từ 4,93-5,85 [126].

Gen *CHI* ở cây đậu tương đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và đến nay đã có một số gen *CHI* phân lập từ cây đậu tương được công bố trên GenBank. Theo Dastmalchi và cs (2015), các gen *GmCHI* của đậu tương được xếp vào 4 phân họ dựa trên các trình tự tương đồng và các cơ chất đặc hiệu của protein mà họ gen *CHI* mã hóa (Hình 1.8). Trong đó, phân họ II có ba gen *GmCHI* được xếp là *CHI* loại II gồm có *GmCHI1A*, *GmCHI1B1*, *GmCHI1B2*. Đặc biệt Dastmalchi và cs (2015) cũng đã khẳng định rằng gen *GmCHI1A* có chức năng tham gia vào chuỗi phản ứng tổng hợp isoflavone ở hạt đậu tương [30].



Hình 1.8. Các gen *GmCHI* của đậu tương được nhóm thành 4 phân họ dựa trên cơ sở tương đồng và cơ chất đặc hiệu.

GmCHI1A (AY595413), *GmCHI1B1* (AY595414), *GmCHI1B2* (AY595419) thuộc *CHI* phân họ 2; *GmCHI2* (AY595415) thuộc *CHI* phân họ 1; *GmCHI3* (AY595416) thuộc *CHI* phân họ 3; *GmCHI4A* (AY595417), *GmCHI4B* (NM_001255112) thuộc *CHI* phân họ 4

Bảng 1.1. Thống kê các gen *GmCHI* phân lập từ cây đậu tương đã được công bố trên GenBank

STT	Gen <i>CHI</i>	Type	Mã số trên GenBank	Năm phân lập	Tác giả
1	<i>GmCHI2</i>	I	AY595415	2005	Ralson và cs [131]
2	<i>GmCHI2</i>		DQ191402	2007	Liao và cs [132]
3	<i>GmCHI2A</i>		NM_001249839	2019	Dastmalchi và Dhaubhadel [133]
4	<i>GmCHI</i>	II	AF276302	2001	Chiu và cs [134]
5	<i>GmCHI1A</i>		AY595413	2005	Ralston và cs [135]
6	<i>GmCHI1B1</i>		AY595414	2005	Ralson và cs [136]
7	<i>GmCHI1B2</i>		AY595419	2005	Ralson và cs [137]
8	<i>GmCHI1A</i>		DQ835284	2007	Chung và cs [138]
9	<i>GmCHI</i>		FJ770472	2009	Trantas và cs [139]
10	<i>GmCHI1A</i>		LT594993	2016	Le và cs [140]
11	<i>GmCHI1A</i>		LT594994	2016	Le và cs [141]
12	<i>GmCHI1A</i>		LT594995	2016	Le và cs [142]
13	<i>GmCHI1A</i>		LT594996	2016	Le và cs [143]
14	<i>GmCHI2</i>		AY595415	2005	Ralson và cs [144]
15	<i>GmCHI1A</i>		NM_001248290	2019	Dastmalchi và Dhaubhadel [145]

STT	Gen <i>CHI</i>	Type	Mã số trên GenBank	Năm phân lập	Tác giả
16	<i>GmCHI1B1</i>		NM_001249826	2019	Dastmalchi và Dhaubhadel [146]
17	<i>GmCHI1B2</i>		NM_001249168	2019	Dastmalchi và Dhaubhadel [147]
18	<i>GmCHI3</i>	III	AY595416	2005	Ralson và cs [148]
19	<i>GmCHI3</i>		DQ191403	2007	Liao và cs [149]
20	<i>GmCHI3</i>		DQ191405	2007	Liao và cs [150]
21	<i>GmCHI3B1</i>		NM_001364454	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [151]
22	<i>GmCHI3B2</i>		NM_001364455	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [152]
23	<i>GmCHI3A1</i>		NM_001251461	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [153]
24	<i>GmCHI3A2</i>		NM_001364453	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [154]
25	<i>GmCHI4A</i>	IV	AY595417	2005	Ralson và cs [155]
26	<i>GmCHI4A</i>		NM_001249853	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [156]
27	<i>GmCHI4B</i>		NM_001255112	2018	Dastmalchi và Dhaubhadel [157]

Trong công bố của Lyle và cs (2005), gen *GmaCHI1A* (AY595413) có kích thước 1157 bp, đoạn mã hóa dài 657 bp mã hóa phân tử protein gồm 218 amino acid. Gen *GmCHI1B1* (AY595414) có chiều dài 809 bp, đoạn mã hóa dài 681 bp mã hóa cho phân tử protein dài 226 amino acid. Gen *GmCHI1B2* (AY595419) có chiều dài 786 bp, đoạn mã hóa dài 681 bp, mã hóa phân tử protein dài 226 amino acid. Gen *GmCHI2* (AY595415) có chiều dài 902 bp, đoạn mã hóa dài 681 bp, mã hóa phân tử protein dài 226 amino acid. *GmCHI3* (AY595416) có chiều dài 1037 bp, đoạn mã hóa dài 846 bp, mã hóa cho phân tử protein dài 281 amino acid. Gen *GmCHI4* (AY595417) có chiều dài 952 bp, đoạn mã hóa dài 630 bp mã hóa cho phân tử protein dài 209 amino acid [65].

Như vậy, isoflavone được tổng hợp từ con đường phenylpropanoid có trong tất cả các loài thực vật và chalcone isomerase (CHI) là enzyme rất quan trọng vì nó xúc tác cho phản ứng từ phân tử naringenin chalcone và isoliquiritigenin mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin và liquiritigenin, đây là hai tiền chất của nhiều hợp chất flavonoid và isoflavonoid. Enzyme CHI ở đậu tương được phân thành 4 loại dựa trên cơ sở tương đồng và cơ chất đặc hiệu, đó là CHI1, CHI2, CHI3, CHI4. Các CHI loại I được tìm thấy trong hầu hết các loại thực vật, còn các CHI loại II chỉ có ở cây họ Đậu. CHI gồm khoảng 220 amino acid, gồm 7 chuỗi xoắn α và 7 phiến gấp β . Vị trí hoạt động của enzyme CHI phần lớn là amino acid không phân cực từ phiến gấp β 3a, phiến gấp β 3b, chuỗi xoắn α 4 và chuỗi xoắn α 6. Làm rõ vị trí then chốt enzyme chalcone isomerase trong con đường phenylpropanoid cũng như cấu trúc và vị trí hoạt động của nó có vai trò quan trọng trong việc cải thiện hàm lượng flavonoid và isoflavonoid trong thực vật. Bước đầu xác định được 12 gen CHI trong hệ gen cây đậu tương và được xếp trong 4 phân họ gen. Gen *CHI1A* ở đậu tương được xếp vào CHI loại II. Gen *CHI1A* ở đậu tương có bốn exon và ba intron, đoạn mã hóa có kích thước 657 bp mã hóa cho 218 amino acid.

Gen *CHI* mã hóa chalcone isomerase là enzyme chìa khóa cho sinh tổng hợp flavonoid bằng việc xúc tác cho phân tử naringenin chalcone mạch hở và isoliquiritigenin mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin và liquiritigenin - hai tiền chất của nhiều hợp chất flavonoid và isoflavonoid

1.3. CHUYỂN GEN Ở ĐẬU TƯƠNG VÀ PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN *CHI*

1.3.1. Chuyển gen ở đậu tương thông qua *Agrobacterium*

Ngày nay, khoa học đã có nhiều thành tựu trong nghiên cứu biểu hiện gen ở thực vật nói chung và cây đậu tương nói riêng. Sự tiến bộ kỹ thuật thể hiện ở nhiều khâu như phát triển vector phù hợp với hệ thống tái sinh mới, tiện lợi cho việc sàng lọc, đánh giá; hoàn thiện các phương pháp chuyển gen trực tiếp và gián tiếp; hoàn thiện hệ thống tái sinh phục vụ chuyển gen cho từng đối tượng; ứng dụng nhiều phương pháp phân tích gen ngoại lai ở thể tái tổ hợp qua nhiều thế hệ.... Nhờ những tiến bộ kỹ thuật ngày càng hoàn thiện trong chuyển gen đã nâng cao hiệu suất và rút ngắn thời gian chọn tạo cây trồng biến đổi gen đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của sản xuất nông nghiệp.

Các kết quả nghiên cứu hệ gen của thực vật đã tạo lập được bộ dữ liệu lớn về trình tự các gen trong hệ gen của cây trồng và một lượng lớn thông tin về giải mã hệ gen cây đậu tương. Ngoài ra, nguồn thông tin khác cũng được phát triển, như dữ liệu EST (expressed sequence tag), thư viện cDNA, ... Những nguồn thông tin này là cơ sở cho việc nghiên cứu chức năng các gen ở cây trồng, trong đó có đậu tương.

Cho đến nay, phương pháp chuyển gen trực tiếp và gián tiếp được sử dụng đối với cây đậu tương và đã ghi nhận nhiều thành tựu trong nghiên cứu chức năng gen và tạo dòng chuyển gen ở cây đậu tương (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Tóm tắt các gen được biến nạp vào đậu tương theo phương pháp gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

TT	Gen chuyển	Nguồn gốc của gen chuyển	Năm	Tác giả
1	<i>GmEPSPS</i>	Đậu tương	1995	Padgett và cs [104]
2	<i>FAD2-1</i>	Đậu tương	2002	Buhr và cs [104]
3	<i>Delta-6-desaturase</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2004	Sato và cs [104]
4	Gen kích thích tăng trưởng nguyên bào sợi (<i>bFGF</i>)	Người	2006	Ding và cs [104]
5	gen <i>bar</i> và gen <i>gusA</i>	Vector <i>pZY 102/pTF 102</i>	2008	Trần TCH và cs [106]
6	<i>ω-3 fatty acid desaturase (GmFAD3)</i>	Đậu tương	2008	Flores và cs [104]
7	<i>P5CSm</i>	Đậu tương	2009	Nguyễn Thị Thúy Hường [10]
8	Mutated aspartate kinase (<i>XbAK_E257K</i> and <i>XbAK_T359I</i>)	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	2011	Qi và cs [104]
9	<i>P5CS</i>	Đậu tương	2011	Nguyễn Thị Thúy Hường [11]
10	<i>HA1</i>	Virus H5N1	2012	Nguyễn Thị Thu Hiền và cs [8]
11	<i>CPi (SMV-BYMV)</i>	Soybean mosaic virus và Bean yellow mosaic virus	2014	Lò Thị Mai Thu và cs [15]
12	<i>GmEXP1</i>	Đậu tương	2015	Lò Thanh Sơn và cs [12]
13	<i>GmDREB2</i>	Đậu tương	2017	Đào Xuân Tân [13]
14	<i>hptII</i>	<i>E. coli</i>	2018	Phan Lê Tư và cs [17]

Trong chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* ở đậu tương, mảnh lá mầm thường được chọn làm vật liệu nhận gen [67]. Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của đậu tương bằng cách gây tổn thương ở vị trí nách lá mầm được Hinchey và cs nghiên cứu lần đầu tiên năm 1998. Sau đó nhiều nhóm tác giả ở các phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới tiến hành ứng dụng, nghiên cứu cải tiến phương pháp này nhằm nâng cao hiệu quả biến nạp gen bằng cách sử dụng các mô mục tiêu khác nhau. Homrich MS và cs (2012) đã thống kê các công bố xác định vật liệu nhận gen của đậu tương như nách lá mầm (Paz và cs, 2004; Liu và cs, 2008), trụ dưới lá mầm (Aragão và cs, 2000; Wang và Xu, 2008), nửa hạt (Paz và cs, 2006), mô sẹo (Hong và cs, 2007) và các lá mầm chưa trưởng thành (Parrott và cs, 1989; Yan và cs, 2000; Ko và cs, 2003, 2004) [45]. Tuy nhiên, trong số các vật liệu này rất ít vật liệu mang lại hiệu quả biến nạp, cho nên ít được ứng dụng. Margie MP và cs (2004) đã tiến hành cải tiến phương pháp nách lá mầm không qua giai đoạn nuôi cấy nảy mầm trước khi lây nhiễm với vi khuẩn *A. tumefaciens*. Phương pháp này có ưu điểm hơn các phương pháp trước đó là thời gian được rút ngắn, hiệu quả biến nạp nâng cao (3,8%) [67]. Cho tới nay, các kết quả công bố về hiệu quả của kỹ thuật sử dụng lá mầm, gây tổn thương ở nách vẫn mang lại hiệu quả cao hơn các phương pháp khác [5].

Nách lá mầm được lây nhiễm khuẩn *A. tumefaciens* chứa gen chuyển sẽ hình thành nên các khối u tại các vết thương. Từ các khối u, hình thành một số chất mới như nopalins và octopins được gọi chung là opines, các chất opine này không tồn tại ở những cây bình thường. Bên cạnh đó, các khối u không ngừng tăng trưởng kể cả khi đã tiêu diệt hết các vi khuẩn trong cây đã bị nhiễm là do *A. tumefaciens* có chứa các plasmid có kích thước lớn và có khả năng tự sao chép độc lập. Những vi khuẩn có plasmid mang gen gây khối u cho cây này được gọi là Ti-plasmid (Tumor inducing plasmid). Do không được dùng trực tiếp trong các thí nghiệm chuyển gen vì một số nhược điểm: có kích thước lớn, mang các gen

gây khối u, không thể tự nhân lên... Vì vậy, các nhà khoa học đã cải tiến Ti-plasmid, cắt bỏ hầu hết các gen không cần thiết và thay vào đó là các gen chỉ thị cho chọn lọc, gen đánh dấu và các promoter thích hợp để Ti plasmid có thể nhân lên và biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*, *A. tumefaciens* và tế bào thực vật. Khi lây nhiễm vào tế bào thực vật, một phần nhỏ của Ti-plasmid khoảng 25 kb được gọi là T-DNA được chuyển và gắn vào hệ gen của thực vật. Nhờ vậy đoạn T-DNA tồn tại trong hệ gen của thực vật mà nó gắn vào. [4].

Thành công nhất trong chuyển gen ở đậu tương là tạo ra giống kháng thuốc diệt cỏ (N-phosphonomethyl-glycine; Roundup) [78]. Giống đậu tương chuyển gen Roundup Ready được thương mại hóa từ năm 1996 và được trồng ở hầu hết các vùng trồng đậu tương kể từ năm 2004 [114]. Gen 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase đã được chuyển vào đậu tương làm tăng khả năng chịu glyphosate ở mức độ cao (glyphosate là chất ngăn chặn hoạt động của enzyme, xúc tác tổng hợp amino acid thơm) [79]. Ngoài ra, việc chuyển gen acetohydroxyacid synthase phân lập từ cây *Arabidopsis*, gen 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase phân lập từ *Pseudomonas fluorescens*, gen phosphinothricin acetyltransferase phân lập từ vi khuẩn đất đã tăng cường khả năng chống chịu các chất imazapyr, isoxaflutole và phosphinothricin trong thuốc diệt cỏ [58].

Kỹ thuật chuyển gen mã hóa enzyme chìa khóa trong quá trình chuyển hóa tổng hợp các chất đã cho thấy tiềm năng cải thiện các đặc tính của cây đậu tương, như tăng cường năng suất, chất lượng hạt và nâng cao khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh. Cây đậu tương chuyển gen *ArP5CR* đã biểu hiện cao về khả năng chịu hạn và chịu nhiệt do sự gia tăng nồng độ proline [31]. Hiện nay, việc tập trung nghiên cứu nhằm cải thiện các chất dinh dưỡng trong sản phẩm đậu tương là mối quan tâm lớn nhất, như tăng cường tích lũy protein, amino acid thiết yếu, dầu và acid béo, các chất chuyển hóa thứ cấp và khoáng chất [68]. Clemente và Cahoon (2009) đã nghiên cứu

theo hướng tăng cường tính ổn định oxy hóa, hàm lượng acid béo ω -3 và tăng tổng lượng dầu trong hạt đậu tương chuyển gen [28]. Đặc biệt, đậu tương có chứa nồng độ acid oleic cao đã được cấp phép theo quy định đưa vào thương mại hóa từ năm 2010 [23].

Trong những năm gần đây đã có một số tác giả ở Việt Nam đã quan tâm nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở cây đậu tương và tập trung vào hướng cải thiện, nâng cao khả năng chịu hạn, kháng sâu của cây đậu tương. Trần Thị Cúc Hòa (2007), đã tiến hành nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam và đã thu được một số dòng đậu tương biến đổi gen có sự thay đổi về năng suất, khả năng kháng sâu bệnh [9]. Nguyễn Thị Thúy Hương (2009) chuyển gen *GmP5CSm* vào giống đậu tương DT84 với 1262 mẫu biến nạp thu được 3 dòng cây dương tính với PCR, hiệu suất là 0,24% [10]. Nguyễn Thu Hiền (2011) biến nạp cấu trúc chứa đoạn gen *HA1* của virus H5N1 vào 650 mẫu lá mầm của giống đậu tương DT12 thu được 8 dòng cây dương tính với PCR, tương ứng với hiệu suất chuyển gen là 1,23% [7]. Với hệ thống vector *pCambia3301*, Trần Thị Cúc Hòa (2007) đã sử dụng biến nạp cho 42 giống đậu tương khác nhau qua nách lá mầm và thu được kết quả khá cao ở tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* (trung bình 60,4%). Kết quả phân tích Southern blot cho thấy hiệu quả chuyển gen đạt 2-5% [9]. Nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen kháng SMV và BYMV Lò Thị Mai Thu và cs (2014) đã chuyển thành công cấu trúc *CPi (SMV-BYMV)* vào hai giống đậu tương DT12 và DT2008 bằng phương pháp lây nhiễm qua nách lá mầm đã thu được 5 dòng cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 từ giống DT12 và 19 dòng cây chuyển gen từ giống DT2008 dương tính với PCR, hiệu suất chuyển gen đạt lần lượt là 1,35% và 2,24% [15]. Hạt đậu tương chứa nhiều protein và lipid, do vậy trong thực tế tái sinh các mẫu biến nạp rất khó khăn, cùng với đặc điểm về điều kiện khí hậu thời tiết nhiệt đới của nước ta mà các mẫu tái sinh sau biến nạp rất dễ bị nhiễm vi khuẩn và vi

nấm. Chính vì vậy nghiên cứu điều kiện tối ưu cho tái sinh và chuyển gen ở cây đậu tương vẫn đang là vấn đề được tiếp tục quan tâm và nghiên cứu.

1.3.2. Tiếp cận kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện các thành phần của hạt

Cải thiện hàm lượng và chất lượng protein

Đậu tương được xem là cây trồng sản xuất protein có hiệu quả nhất trong các loại cây nông nghiệp. Kỹ thuật chuyển gen được ứng dụng nhằm tăng cường hàm lượng, chất lượng protein trong hạt đậu tương. Protein đậu tương có hàm lượng dinh dưỡng được xem tương đương với protein của thịt và trứng, ngoại trừ sự khác biệt về amino acid chứa lưu huỳnh đặc biệt là methionine [35]. Vì vậy để tăng cường các loại protein có hàm lượng methionine cao ở hạt đậu tương, người ta đã chuyển gen mã hóa β -casein phân lập từ trâu, bò và zein phân lập từ ngô vào cây đậu tương theo nguyên tắc thiết kế vector chuyển gen chứa promoter biểu hiện ở hạt [62]. Mặc dù chưa có thông tin về hiện tượng tăng hàm lượng amino acid tự do chứa các gốc lưu huỳnh trong hạt đậu tương, nhưng ba loại amino acid quan trọng khác là lysine, tryptophan và threonine đã tăng đáng kể trong hạt đậu tương bởi sự biểu hiện gen mã hóa các enzyme liên quan đến chuỗi phản ứng tổng hợp các amino acid này [85]. Cải thiện hàm lượng các loại amino acid trong hạt đậu tương được xem là một cách tiếp cận đáng tin cậy để nâng cao chất lượng dinh dưỡng của hạt đậu tương. Mặc dù các loại protein có hoạt tính sinh học chiếm tới 3% so với tổng hàm lượng protein trong hạt, nhưng các loại protein có hoạt tính được học chiếm tỷ lệ rất nhỏ so với hàm lượng protein dự trữ trong hạt. Thay vào đó, một giải pháp khác là sử dụng các protein dự trữ chính trong hạt, β -conglycinin và glycinin, như là một chất vận chuyển các peptid có hoạt tính sinh học. Một peptid sáu vòng có hoạt tính sinh học, novo-kinin đã được ghép vào tiểu đơn vị α của β -conglycinin ở 4 vị trí bằng cách thay thế amino acid, và các hạt đậu chuyển gen chứa các protein đã được thay đổi với sự biểu hiện các đặc tính mong muốn [125].

Cải thiện thành phần dầu

Khoảng 75% lượng dầu thực vật sử dụng trên thế giới có nguồn gốc từ dừa, hạt đậu tương, hạt cải dầu, hạt hướng dương và một số cây trồng khác. Dầu từ hạt đậu tương được sử dụng rộng rãi với nhiều giá trị khác nhau. Kỹ thuật chuyển gen đã được ứng dụng nhằm mục đích cải thiện hàm lượng dầu và thành phần dầu trong hạt đậu tương. Dầu trong hạt ở dạng triacylglycerol, gen mã hóa acyltransferase đã được chuyển vào đậu tương để tăng cường sinh tổng hợp triacylglycerol kết quả làm tăng tối đa 3,2% hàm lượng dầu trong hạt [88]; hoặc tăng sự tích tụ của acid vernolic acid và 12-epoxyoctadeca-9,15-dienoic acid (12-epoxy-18: 2 $\Delta^{9,15}$) trong hạt đậu tương chuyển gen [22].

Đặc tính của dầu được quyết định bởi thành phần lipid. Các phương pháp chuyển gen có thể cung cấp nhiều lựa chọn để làm thay đổi thành phần dầu trong hạt đậu tương cho các mục đích sử dụng khác nhau. Dầu đậu tương có các thành phần palmitic, stearic, oleic, linoleic và acids linoleic [123]. Hàm lượng cao của các acid béo không no trong dầu đậu tương làm cho dầu không ổn định và có mùi khó chịu. Phương pháp chuyển gen mang cấu trúc RNAi làm bất hoạt gen liên quan đến sự tổng hợp acid béo không no đã được ứng dụng để cải thiện đặc tính này ở cây đậu tương [55].

Vitamin E bao gồm các dạng khác nhau như tocopherol và tocotrienols (dạng α , β , γ và δ). Tất cả đều có khả năng chống oxy hoá lipid, trong đó mạnh nhất là α -tocopherol [21]. Vitamin E được dùng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm như chất chống oxy hoá, đồng thời cũng được dùng cho người và động vật để giúp phòng bệnh. Trong chế biến đậu tương, tocopherol được chiết xuất cùng dầu. Thành phần của chúng chỉ chiếm 1,5% hàm lượng dầu được chiết xuất, nhưng chúng có vai trò quan trọng đối với sự ổn định và không bị oxy hoá của dầu [46]. Tác động vào bước chính để chuyển đổi γ -tocopherol sang α -tocopherol làm tăng hàm lượng α -tocopherol lên 95% của tocopherol toàn phần trong hạt đậu tương chuyển gen [101].

Cải thiện hàm lượng saponin, isoflavone và một số thành phần khác

Saponin là một nhóm chất có cấu trúc đa dạng phân bố nhiều trong các loài thực vật. Dựa trên cơ sở cấu trúc hoá học người ta đã xác định saponin ở đậu tương được phân bố trong bốn nhóm (A, B, E và DDMP) và chúng có tác dụng dược học khác nhau như chống phù lipid, chống lại sự nhân lên của tế bào ung thư trực tràng. Theo Takagi và cs (2011), gen mã hóa cho β -amyrin synthase tham gia tổng hợp một loại chất trong quá trình sinh tổng hợp saponin của hạt đậu tương chuyển gen đã bị ức chế bởi cơ chế RNAi [100]. Hạt đậu tương chứa số lượng lớn các acid phytic và chúng sẽ giải phóng phosphor và myoinositol trong quá trình hạt nảy mầm. Cây đậu tương chuyển gen có nồng độ phosphor tăng gấp 3 lần và phytate giảm 3 lần [26].

Cho đến nay, đậu tương được xem là nguồn thực phẩm chính cung cấp các phytoestrogen - estrogen thực vật. Các sản phẩm từ đậu tương có chứa hàm lượng isoflavone cao ngày càng được sử dụng rộng rãi. Đối với cây đậu tương, isoflavone cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của cây đậu tương bằng cách kích thích sự hình thành nốt sần bởi vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium*. Đồng thời, nhờ có isoflavone mà đậu tương có thể bảo vệ và chống lại côn trùng và các bệnh như *Phytophthora*. Ngoài ra, isoflavone còn có thể đáp ứng môi trường khi gặp hạn hán. Các nhà khoa học đã xác định rằng cấu trúc hóa học của isoflavone trong đậu tương là tương tự hormon estrogen. Đặc biệt là isoflavone đậu tương có thể gắn vào các thụ thể estrogen đồng thời phát huy tác dụng kích thích tổ trên động vật có vú. Đó là, isoflavone có thể bắt chước tác dụng của estrogen trong một số mô và ngăn chặn các tác động của estrogen ở một số mô khác [128]. Chính vì vậy biểu hiện gen làm nâng cao hàm lượng isoflavone trong đậu tương là vấn đề đang rất được quan tâm nghiên cứu.

Isoflavonoid là các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học tích lũy trong hạt đậu tương trong quá trình phát triển. Lượng isoflavonoid có trong hạt đậu

tương rất khác nhau, tùy thuộc vào yếu tố di truyền và môi trường. Các thí nghiệm đã được tiến hành để xác định xem isoflavonoid có được tổng hợp trong các mô hạt trong quá trình phát triển hay được tạo ra trong các cơ quan thực vật khác và vận chuyển đến hạt nơi chúng tích tụ. Một phân tích về isoflavonoid bằng HPLC đã phát hiện ra các hợp chất trong tất cả các cơ quan của cây đậu tương, nhưng lượng isoflavonoid có mặt khác nhau tùy thuộc vào mô và giai đoạn phát triển. Nồng độ lớn nhất được tìm thấy trong hạt và lá trưởng thành [32]. Năm 2011, các nhà khoa học Canada đã nghiên cứu sự phân bố của isoflavone và sự biểu hiện của các gen và các enzyme mã hóa tương ứng liên quan đến tổng hợp isoflavone bằng cách sử dụng phiên mã ngược định lượng (QRT-PCR). Các gen được nghiên cứu bao gồm PAL, CHS, CHI, CHR và IFS. Huilan Chen và cs (2011) đã đánh giá hàm lượng isoflavone trong giai đoạn lấy hạt (R5) ở giống có hàm lượng isoflavone cao AC Proteina và giống có hàm lượng isoflavone thấp là AC Orford. Kết quả cho thấy, ở giai đoạn R5, sự biểu hiện của các gen liên quan đến tổng hợp isoflavone được quan sát thấy ở tất cả các bộ phận của cây bao gồm lá, thân, rễ, hoa, vỏ và hạt. Trong đó, hàm lượng thấp nhất ở vỏ và hạt, cao nhất ở lá và rễ. Bên cạnh đó cũng phát hiện ra biểu hiện gen giữa các giống cây cũng có sự khác biệt khi theo dõi nồng độ isoflavone của chúng [47]. Có thể là sự biểu hiện gen trong các phần khác nhau được nghiên cứu sẽ thay đổi trong quá trình phát triển của cây. Theo Gutierrez-Gonzalez và cs (2010), sự biểu hiện của các gen liên quan đến tổng hợp isoflavone trong hạt đậu tương thay đổi trong suốt quá trình phát triển của cây [42].

1.3.3. Nghiên cứu biểu hiện gen *CHI*

Con đường phenylpropanoid tạo ra một loạt các sản phẩm tự nhiên của thực vật. Trong đó, một enzyme chìa khóa tham gia sinh tổng hợp isoflavone là CHI, xúc tác cho phản ứng tạo flavanone để tạo thành các sản phẩm cuối là flavonoid và isoflavonoid. Cho đến nay đã có một số nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa enzyme CHI ở các loài thực vật khác nhau được công bố (Bảng 1.3)

Bảng 1.3. Một số nghiên cứu biểu hiện gen *CHI* ở thực vật

STT	Đối tượng	Năm	Quốc gia	Tác giả
1	Ngô	2001	Mỹ	Dong X và cs[34]
2	Cà chua	2002	Anh	Verhoeven và cs [110]
3	Hành tây (<i>Allium cepa</i>)	2004	Mỹ	Kim và cs [56]
4	Nấm men	2005	Mỹ	Lyle và cs [65]
5	Thuốc lá	2005	Nhật Bản	Nishihara và cs [73]
6	Cam thảo (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)	2009	Trung Quốc	Zhang và cs [121]
7	Cây bạc hà (<i>Agastache rugosa</i>)	2012	Hàn Quốc	Tuan và cs [109]
8	Lạc (<i>Arachis hypogaea</i> L)	2012	Trung Quốc	Yue và cs [118]
9	Cây đậu dầu (<i>Millettia pinnata</i>)	2013	Trung Quốc	Hui Wang và cs [48]
10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2015	Trung Quốc	Wenbo và cs [115]
11	Họ Đậu	2015	Trung Quốc	Wang và cs [114]
12	<i>Lupinus angustifolius</i> L.	2015	Ba Lan	Prysiecka và cs [84]
13	Nho đỏ (<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Cabernet Sauvignon</i>)	2017	Trung Quốc	Shi và cs [93]
14	Cà chua	2017	Mỹ	Lim và cs [63]
15	Sâm đất (<i>Talinum paniculatum</i>)	2018	Việt Nam	Vũ và cs [16]
16	<i>Scutellaria lateriflora</i>	2018	Hàn Quốc	Tuan và cs [112]
17	Hoa mẫu đơn (<i>Paeonia lactiflora</i> Pall)	2018	Trung Quốc	Wu và cs [116]
18	Rau diếp (<i>Lettuce</i>)	2019	Mỹ	Gurdon và cs [40]
19	Nghệ tây (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	2019	Trung Quốc	Guo và cs [39]
20	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	2019	Trung Quốc	Sun và cs [99]

Cây đậu dầu (*Millettia pinnata*) là cây ngập mặn duy nhất trong họ Đậu. Tuy nhiên nếu độ mặn tăng thì khả năng sinh trưởng, phát triển của đậu dầu bị suy giảm hoặc chết khi độ mặn tăng lên quá cao. Vì vậy, việc cải thiện, nâng cao khả năng chịu mặn bằng kỹ thuật biến đổi gen là vấn đề được quan tâm. Trong các gen được nghiên cứu trong cây đậu dầu, CHI là enzyme quan trọng trong sinh tổng hợp flavonoid, là enzyme chìa khóa tham gia sinh tổng hợp anthocyanin, liên quan chặt chẽ với khả năng chịu mặn của cây đậu dầu. Các phân tích tiến hóa đã cho thấy enzyme *MpCHI* là họ hàng gần của các CHI họ Đậu. Protein *MpCHI* bao gồm 221 amino acid (23,64 kD), có chiều dài peptide, dư lượng amino acid, vị trí gắn cơ chất và vị trí phản ứng rất giống với các CHI họ Đậu khác. Trong nghiên cứu của Hui Wang và cs (2013) cho thấy, sự biểu hiện của gen *CHI* phân lập từ cây đậu dầu (*MpCHI*) trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đã làm tăng khả năng chịu mặn, điều này gợi ý rằng enzyme *MpCHI* trong con đường sinh tổng hợp flavonoid có thể điều chỉnh khả năng chịu mặn của cây đậu dầu [48].

Trong một nghiên cứu khác của Tuan và cs (2012) ở cây Bạc hà Hàn Quốc (*Agastache rugosa*) đã cho thấy hoạt động của enzyme CHS và CHI trong con đường phenylpropanoid dẫn đến việc tổng hợp tilianin và rosmarinic acid. Hai sản phẩm tự nhiên có nhiều đặc tính hữu ích về mặt dược lý. Phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC cho thấy mô hình tích lũy tilianin phù hợp với biểu hiện của CHS và CHI trong các bộ phận khác nhau của cây *A. rugosa* [112].

Đột biến mất chức năng của gen *ArCHIL* (*Arabidopsis chalcone isomerase-like*) trong cây *A. thaliana* dẫn đến giảm mạnh nồng độ proanthocyanidin và flavonol trong hạt, nhưng không giảm nồng độ anthocyanin trong lá. Mặt khác, khi biểu hiện mạnh *ArCHIL*, có thể phục hồi một phần kiểu hình đột biến khi gây đột biến mất chức năng của *CHIL* và đồng thời làm tăng tích lũy proanthocyanidin và flavonol trong cây *Arabidopsis* [107].

Việc tổng hợp flavonoid trong cây có thể được thay đổi bằng cách điều chỉnh mức độ biểu hiện của CHI. Ở cây cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), biểu hiện của CHI dẫn đến việc tổng hợp flavonoid tăng lên trong rễ tơ. Mặt khác, có thể ngăn chặn sinh tổng hợp flavonoid bằng cách ức chế CHI trong hành tây và thuốc lá [56], [73], [121].

Trong một số nghiên cứu khác như ở cây *Arabidopsis*, khi có mặt của CHI thì mới hình thành flavonol. Trong vỏ cà chua không có CHI và naringenin và khi tiến hành thí nghiệm làm tăng lượng CHI đã dẫn đến sự gia tăng lên 78 lần hàm lượng flavonoid [94], [110]. Bằng chứng khác ở ngô cho thấy ngoài chức năng xúc tác cho phản ứng xảy ra một cách tự nhiên thì sự hiện diện của CHI là cần thiết để tạo thành flavone [34].

Năm 2012, Yue Zhang và cs đã nhân dòng và biểu hiện thành công gen *CHI* ở cây lạc. Kết quả chỉ ra rằng, đó là gen *CHI* loại I mã hóa peptide có 255 amino acid [118]. Lyle Ralston và cs (2005) đã tạo flavonoid và isoflavonoid bằng sinh tổng hợp trong nấm men khi nghiên cứu biểu hiện gen *CHI1* và *CHI2* ở đậu tương [65]. Năm 2015, Wang và cs đã nghiên cứu enzyme *CHI1* đã khẳng định đây là enzyme chỉ có trong cây họ Đậu [114]. Bên cạnh đó, Gutierrez-Gonzalez và cs (2010) đã chỉ ra sự tích lũy isoflavone trong cây phụ thuộc vào mức độ biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa và chịu tác động của việc cung cấp đầy đủ nước [42].

Tóm lại, các nghiên cứu chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* ở đậu tương đều sử dụng lá mầm hạt chín làm vật liệu nhận gen. Khả năng tiếp nhận gen của đậu tương theo cách gây tổn thương rách lá mầm và lây nhiễm *A.tumefaciens* tái tổ hợp đã được nghiên cứu và khẳng định hiệu quả cao hơn các phương pháp biến nạp khác. Nhiều tác giả đã ứng dụng kỹ thuật này theo hướng cải thiện hàm lượng các chất thứ cấp, nâng cao khả năng chịu hạn, tăng cường tính kháng sâu, kháng virus, ... của cây đậu tương. Các nghiên cứu chuyển gen *CHI* từ loài này

sang loài khác đều cho kết quả là cây chuyển gen có sự tích lũy flavonoid tăng và tăng hơn cây không chuyển gen rất nhiều lần. Trong khi nghiên cứu biểu hiện tăng cường gen *CHI* của chính loài đó còn ít được đề cập. Riêng gen *GmCHI1A* của đậu tương đã được phân tích biểu hiện ở nấm men và cây Sâm đất, tuy nhiên nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật biểu hiện quá mức gen *GmCHI1A* để cải thiện hàm lượng *CHI1A* tái tổ hợp trong định hướng nâng cao hàm lượng isoflavone ở mầm hạt đậu tương còn chưa được nghiên cứu. Vì vậy, hướng nghiên cứu biểu hiện mạnh gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương nhằm tạo nguyên liệu phục vụ chọn giống đậu tương có sự tích lũy isoflavone cao, tạo nguyên liệu phục vụ sản xuất các chế phẩm sinh học đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của công tác chăm sóc và bảo vệ sức khỏe con người ở nước ta.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

2.1.1. Các giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu

Năm giống đậu tương ĐT51, ĐT26, DT90, DT84, DT2008 được sử dụng làm các thí nghiệm trong nghiên cứu phân tích hàm lượng isoflavone và nhân bản gen *GmCHI1A*, trong đó các giống DT2008 được sử dụng nghiên cứu biểu hiện mạnh gen *GmCHI1A* (Hình 2.1). Hai giống ĐT51 và ĐT26 do Trung tâm nghiên cứu và phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp; ba giống còn lại DT90, DT84, DT2008 do Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.



Hình 2.1. Hạt của 5 giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu

Giống đậu tương ĐT26 được chọn tạo từ tổ hợp lai ĐT2000 x ĐT12 và được công nhận giống, đưa vào sản xuất thử từ năm 2008. Giống đậu tương ĐT26 có hoa màu trắng, hạt màu vàng và rốn nâu đậm, quả chín có màu nâu. Thời gian sinh trưởng trung bình từ 90 - 95 ngày, chiều cao cây từ 50 - 60cm, phân cành khá (2,0 - 2,5 cành/cây). Năng suất trung bình đạt 22 - 28 tạ/ha. Để đảm bảo tiềm năng cho năng suất của giống cao nên canh tác trong vụ đông, vụ xuân và nhân hạt ở vụ hè. Trong điều kiện thâm canh cao ở diện tích hẹp, năng suất giống có thể đạt tới 30-32 tạ/ha. Giống ĐT26 có ưu điểm ở khả năng kháng bệnh gỉ sắt, đốm nâu, chống chịu ruồi đục thân và chống đổ khá.

Giống đậu tương DT51 được chọn tạo từ tổ hợp lai giữa LS17 x DT2001 và được công nhận từ năm 2012. Giống đậu tương DT51 có hoa màu tím, hạt vàng và rốn nâu đậm, quả chín có màu vàng. Thời gian sinh trưởng trung bình 90 - 95 ngày, chiều cao cây 45 - 55cm, phân cành khá (hơn 2 cành/cây). Theo đánh giá, DT51 có ưu điểm vượt trội về năng suất cao do có thể trồng được 3 vụ/năm, có thể cho năng suất từ 20-29 tạ/ha. Do hệ rễ có khối lượng nốt sần nhiều nên tổng hợp được hàm lượng đạm cao và cải tạo đất rất tốt. Tuy nhiên, giống DT51 bị nhiễm nhẹ bệnh virus, đốm nâu và chống đổ khá. Để đạt được năng suất cao nên canh tác trong vụ hè, xuân và vụ đông.

Giống đậu tương DT2008 là giống lai giữa hai giống DT2001 x HC100 (gốc Mexico) kết hợp với phương pháp đột biến thực nghiệm và chọn lọc theo tiêu chuẩn thích ứng với chống chịu. Đặc điểm nổi trội của giống đậu tương đột biến chịu hạn DT2008 là: cây sinh trưởng khỏe, phân nhiều nhánh nên số quả trên cây cao từ 35 - 200 quả (trung bình 40 quả/cây), tỷ lệ hạt/quả từ 2,0 - 2,2; năng suất trung bình đạt 20 - 40 tạ/ha; hệ rễ khỏe và có nhiều nốt sần nên vừa có khả năng chịu hạn cao vừa có khả năng cải tạo đất tốt hơn các giống khác; chất lượng hạt khá: protein đạt 40,3%, lipit 13,4%; hạt to màu vàng, khối lượng 1000 hạt đạt 230-250 g và dễ để giống. Giống đậu tương DT2008 có thể canh tác trong vụ xuân, vụ hè thu, vụ đông và vụ đông xuân.

Giống đậu tương DT84 do Viện di truyền nông nghiệp tạo ra từ tổ hợp lai DT80 x ĐH4 bằng phương pháp lai hữu tính, kết hợp với gây đột biến thực nghiệm bằng tác nhân gamma Co60kral trên dòng lai F3-D333. Giống DT84 đang được trồng phổ biến do có khả năng cho năng suất cao, chống đổ tốt và nhiễm bệnh ở mức độ nhẹ đến trung bình với một số bệnh hại chính. Đặc điểm của giống là: hoa màu tím; hạt to tròn, màu vàng tươi, ít nứt, khối lượng 1000 hạt từ 160-180 g, chất lượng hạt tốt; năng suất cao trung bình đạt 15 - 25 tạ/ha, trong điều kiện thâm canh cao có thể đạt 30 tạ/ha. Thời gian sinh trưởng vụ xuân là 115 - 120 ngày, vụ thu 90 - 95 ngày, vụ đông 110 - 115 ngày.

Giống đậu tương DT90 được chọn tạo bằng phương pháp lai hữu tính kết hợp xử lý đột biến của tổ hợp lai G.7002 x Cọc chùm ở thế hệ F2, được công nhận giống quốc gia năm 2002. Giống thuộc dạng sinh trưởng hữu hạn, khối lượng 1000 hạt lớn 200 - 220g, hàm lượng protein cao 43 - 47%, chiều cao cây 35 - 45cm. Giống có khả năng chống đổ tốt, chống chịu các bệnh phấn trắng, gỉ sắt, sương mai tốt, chống chịu khá với bệnh đốm nâu vi khuẩn, chịu lạnh tốt, chịu nóng khá, thích hợp canh tác 3 vụ/năm (xuân, hè thu và vụ đông), ưu thế năng suất vụ đông có thể tới 30 tạ/ha tùy thuộc vào thời tiết và điều kiện thâm canh.

2.1.2. Các vector và chủng vi khuẩn

Các vector sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: vector tách dòng pBT, vector pRTRA7/3 chứa promoter 35S và đuôi cmyc, vector chuyển gen pCB301. Sơ đồ cấu trúc các loại vector trình bày ở phụ lục 1. Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α sử dụng trong tách dòng và chủng *Agrobacterium tumefaciens* CV58 sử dụng trong chuyển gen. Các vector và chủng vi khuẩn do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.1.3. Các cặp môi sử dụng cho PCR

Các cặp môi PCR có trình tự nucleotide và sản phẩm khuếch đại đoạn DNA có kích thước dự kiến được trình bày ở bảng 2.1.

Trong các cặp môi trên, cặp môi *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* và *CHI-NcoI-F/CHI-SacI-R* được chúng tôi thiết kế dựa trên trình tự gen *CHI* của đậu tương mang mã số NM_001248290, còn cặp môi *nptII-F/nptII-R* và *pUC18-F/pUC18-R* do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Bảng 2.1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi sử dụng trong PCR và kích thước sản phẩm DNA dự kiến

Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5' - 3')	Sản phẩm dự kiến (bp)
<i>CHI-NcoI-F/</i> <i>CHI-NotI-R</i>	ATGCCATGGATGGCAACGATCACCGCGGTT	677 (cDNA)
	TTGCGGCCGCGACTATAATGCCGTGGCTC	
<i>CHI-NcoI-F/</i> <i>CHI-SacI-R</i>	CATGCCATGGATGGCAACGATCAGCGCGGTT	722
	CGAGCTCGTCACTATAATGCCGTGGCTC	
<i>nptII-F/nptII-R</i>	GAGGCTATTCGGCTATGACTG	963
	ATCGGGAGCGGCGATAACCGTA	
<i>pUC18-F/</i> <i>pUC18-R</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	838
	CAGTATCGACAAAGGAC	

2.1.4. Hóa chất và thiết bị

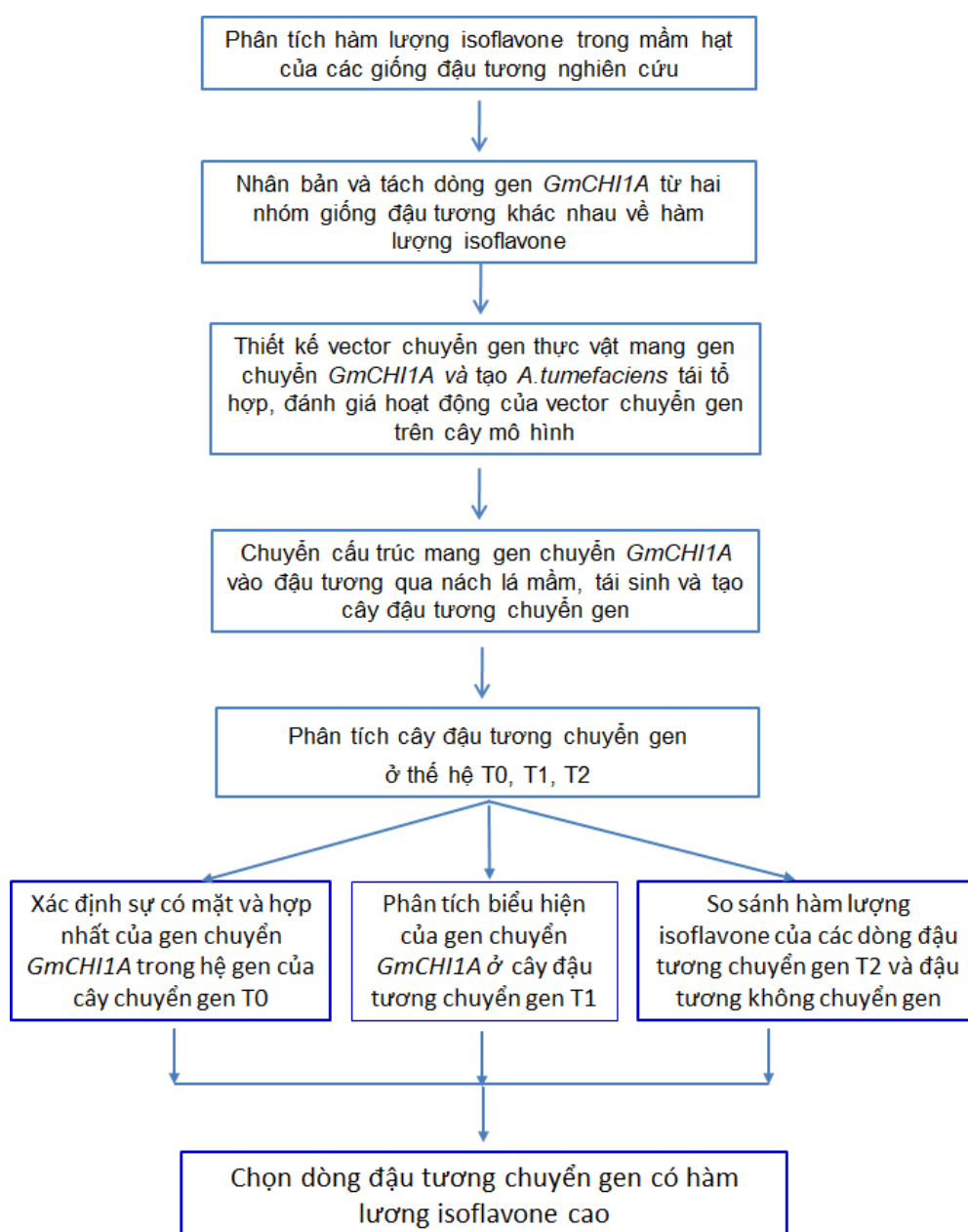
Kít Trizol Reagents - tách chiết RNA tổng số; kít Maxima® First Strand cDNA Synthesis - tổng hợp cDNA; kít GeneJET PCR Purification - tinh sạch sản phẩm PCR; kít Plasmid Extraction - tách chiết plasmid từ vi khuẩn được mua từ hãng Fermentas và Bio-Neer. Các enzyme sử dụng được mua của hãng Fermentas gồm: *BamHI*, *NotI*, *NcoI*, *HindIII*, *SacI*, T4 ligase...

Các hoá chất: bacto pepton, yeast extract, agarose, sucrose, glucose, trypton, x-gal, KCl, tris HCl, EDTA, NaOH, MgSO₄, MgCl₂, glycerol, CaCl₂; các loại kháng sinh kanamycin, rifamycine, cefotaxime, carbenicillin... của các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số hãng khác.

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transillumination, Bio-Rad, Mỹ), máy Voltex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Plulser, máy xác định hàm lượng nucleic acid NanoDrop, thiết bị giải trình tự nucleotide tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) và các thiết bị hiện đại khác.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Luận án đã sử dụng các nhóm phương pháp nghiên cứu, bao gồm: 1) Nhóm phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone; 2) Nhóm phương pháp phân lập gen; 3) Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen thực vật; 4) Nhóm phương pháp tạo cây chuyển gen và phân tích cây chuyển gen; và 5) Phân tích, xử lý số liệu. Sơ đồ các thí nghiệm thực hiện trong luận án được thể hiện ở hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ tổng quát các thí nghiệm thực hiện trong luận án

2.2.1. Nhóm phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone

Phân tích định lượng daidzein và genistein được thực hiện theo phương pháp AOAC Official 2008.03 và Chen và cs (2001) [25].

Hạt đậu tương cho nảy mầm ở điều kiện nhiệt độ phòng, khi được 3 ngày tuổi làm nguyên liệu để chiết rút daidzein và genistein. Dịch chiết chứa daidzein và genistein được chiết từ mầm hạt đậu tương sử dụng dung môi thích hợp.

Dịch chiết thu được sau đó được loại tạp, làm sạch mẫu qua hệ thống SPE. Dịch thu được sau đó được phân tích trên hệ thống HPLC.

2.2.2. Nhóm phương pháp phân lập gen

2.2.2.1. Thiết kế cặp mồi PCR nhân gen *GmCHI1A*

Từ thông tin về trình tự gen *CHI* của đậu tương mang mã số NM_001248290 trên GenBank, cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* đã được thiết kế nhân bản đoạn mã hóa của gen *GmCHI1A*. Trình tự đoạn mã hóa của gen *GmCHI1A* được nhân bản dự kiến có kích thước là 657 nucleotide. Khi thiết kế cặp mồi, trình tự chứa điểm cắt của enzyme *NcoI* và *NotI* được thêm vào, cho nên khi khuếch đại gen *GmCHI1A* từ cDNA bằng cặp mồi trên thì kết quả sẽ cho sản phẩm PCR với kích thước là $9 + 657 + 11 = 677$ nucleotide (Bảng 2.1).

Vector chuyển gen *pCB301-GmCHI1* sau khi thiết kế sẽ bao gồm trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* và trình tự nucleotide mã hoá peptid c-myc, KDEL, nên cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI-SacI-R* được thiết kế để nhân bản đoạn DNA *GmCHI1A_cmyc_KDEL* có kích thước dự kiến là $677 + 33 + 12 = 722$ nucleotide (Bảng 2.1).

2.2.2.2. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

RNA tổng số được tách từ mầm đậu tương sử dụng kit Trizol® Regents (Invitrogen) tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng bộ kit Maxima®

First Strand cDNA Synthesis của hãng Fermentas để tổng hợp cDNA từ RNA tổng số đã tách chiết theo quy trình chỉ dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2.2. Nhân bản gen *GmCHI1A*

Gen *GmCHI1A* được khuếch đại từ cDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R*. Thành phần phản ứng PCR được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR với Master Mix

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	<i>CHI-NcoI-F</i>	10 pmol/μl	1,0
3	<i>CHI-NotI-R</i>	10 pmol/μl	1,0
4	DNA hoặc cDNA khuôn	500 ng/μl	2,0
5	Nước khử ion	-	8,5
Tổng thể tích			25

PCR nhân gen *GmCHI1A* được thực hiện theo chu trình nhiệt là 94°C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kì, 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.

2.2.2.3. Điện di kiểm tra

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agrose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1 μg/ml.

2.2.2.3. Tách dòng và xác định trình tự gen *GmCHI1A*

Kỹ thuật tách dòng gen được thực hiện theo Sambrook và cs [91].

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Gene JET PCR Purification, sau đó gắn vào vector pBT để tạo plasmid tái tổ hợp. Thành phần và điều kiện phản ứng mô tả ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng gắn gen *GmCHI1A* vào vector tách dòng

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	T4 DNA Ligase Buffer	10X	2,0
2	T4 DNA Ligase	5 u/μl	1,0
3	<i>GmCHI1A</i>	100 ng/μl	12,0
4	pBT	100 ng/μl	3,0
5	Nước khử ion	-	2,0
Tổng			20
<i>Điều kiện phản ứng: 20°C trong 3 giờ</i>			

Biến nạp vector tách dòng tái tổ hợp vào tế bào khả biến E.coli DH5α

Hỗn hợp gồm 5 μl vector tái tổ hợp và 50 μl dịch tế bào khả biến đặt trong nước đá 20 phút, sau đó chuyển ngay vào bể ổn nhiệt ở 42°C trong thời gian 1 phút 30 giây rồi đưa ngay vào nước đá trong thời gian 10 phút. Sau khi sốc nhiệt bổ sung 150 - 300 μl LB lỏng để nuôi phục hồi ở 37°C, lắc 200 rpm trong vòng 1 giờ. Cấy trải 150 - 250 μl dịch khuẩn lên môi trường LB đặc có bổ sung carbenicillin 50 mg/l, X-gal 30 mg/l và IPTG 100 μM và nuôi ở 37°C trong vòng 16 giờ. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn thể hiện ở phụ lục 2.1

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*.

Tách chiết plasmid bằng kit Plasmid Extraction theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các plasmid tái tổ hợp mang gen *GmCHI1A* được xác định trình tự trên máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

2.2.2.4. Phân tích trình tự gen

Sử dụng các phần mềm BLAST trong NCBI, BioEdit, Lasergene, MEGA trong phân tích dữ liệu về gen *GmCHI1A*, phân tích đa dạng dựa trên trình tự nucleotide, trình tự amino acid suy diễn.

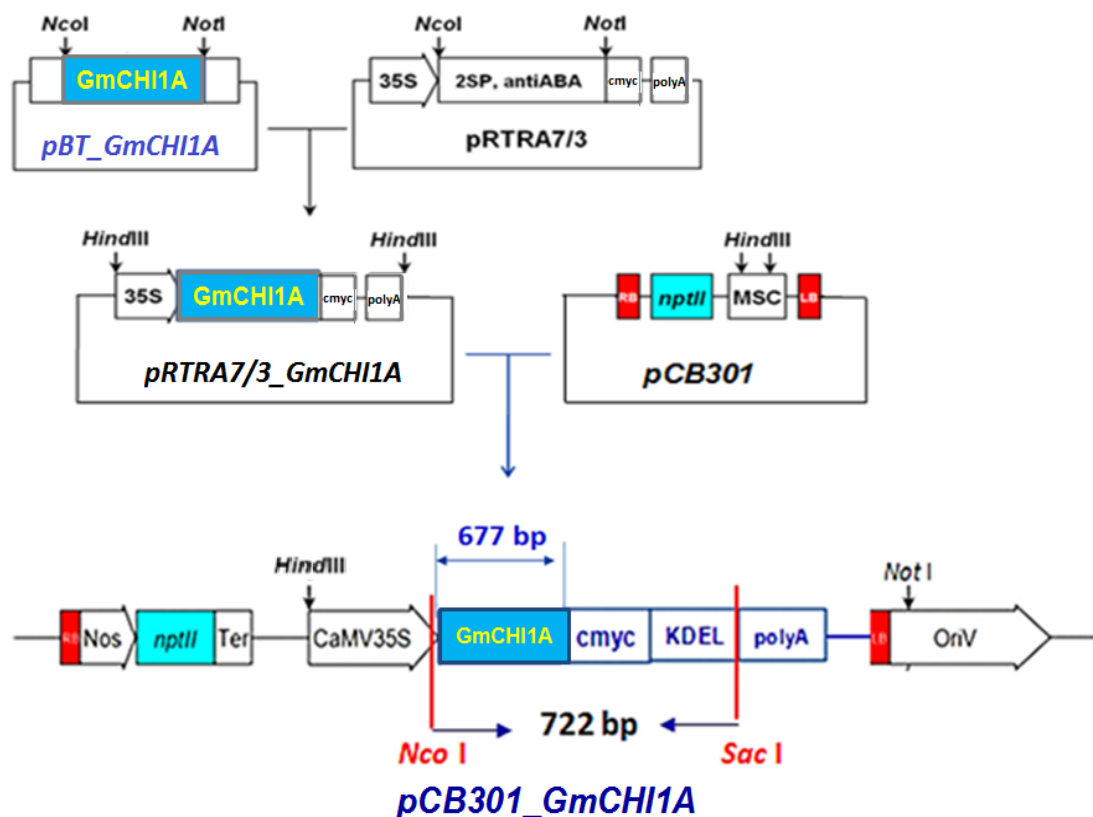
2.2.3. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen *GmCHI1A*

Các thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* được thực hiện theo sơ đồ hình 2.3.

2.2.3.1. Thiết kế và kiểm tra kết quả vector chuyển gen

Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển GmCHI1A

Xử lý song song vector tái tổ hợp *pBT_GmCHI1A* và vector *pRTRA7/3* bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* tạo các đầu dính tương ứng. Sau đó dựa vào kích thước phân đoạn DNA, lựa chọn và tinh sạch các băng điện di theo chỉ dẫn của kit GeneJET PCR Purification để thu nhận gen chuyển *GmCHI1A* và vector mở vòng *pRTRA7/3*. Trộn gen *GmCHI1A* với vector *pRTRA7/3* sau khi tinh sạch, bổ sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_GmCHI1A* mang cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA*.



Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*

Vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_GmCHI1A* được nhân dòng trong *E.coli* DH5 α và chọn dòng bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R*

Tạo vector chuyển gen pCB301

Xử lý đồng thời vector *pRTRA7/3_GmCHI1A* và vector *pCB301* với *HindIII*, sau đó chọn và tinh sạch các băng DNA điện di theo kích thước để thu nhận các thành phần cần cho việc tạo vector chuyển gen gồm: cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA* khoảng 1,5kb; vector mở vòng *pCB301* khoảng 5,5kb. Trộn cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA* tinh sạch với vector *pCB301* đã mở vòng, bổ sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector chuyển gen thực vật *pCB301_GmCHI1A*. Tiến hành chọn dòng bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu.

2.2.3.2. Tạo dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 mang vector chuyển gen

Hỗn hợp tế bào khả biến *A.tumefaciens* CV58 và vector *pCB301-GmCHI1A* đặt trong cuvette được xung điện với thông số 400 Ω , 2,5 kV, 2,5 μ F rồi đưa ngay vào nước đá, sau 5 phút bổ sung 200 μ l LB lỏng và đảo nhẹ. Chuyển hỗn dịch đã xung điện sang ống Eppendorf 2ml, nuôi phục hồi ở 28°C, lắc 200 rpm trong 2 giờ. Cấy trải trên đĩa petri môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L, ủ 28°C trong 48 giờ. Tiến hành chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pCB301_GmCHI1A* bằng colony-PCR, dòng vi khuẩn dương tính sẽ được giữ chủng, nuôi trong LB lỏng và sử dụng trong chuyển gen.

2.2.4. Nhóm phương pháp phân tích hoạt động của vector chuyển gen trên cây thuốc lá

2.2.4.1. Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm

Vi khuẩn *A.tumefaciens* mang gen chuyển *GmCHI1A* được nuôi chọn lọc trong 15ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C lắc 200 rpm, 48 giờ. Chuyển 10ml dịch huyền phù tế bào trên vào

50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi 28°C, lắc 200 rpm đến khi $OD_{600nm} = 0,6 - 0,8$ là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp. Ly tâm toàn bộ dịch tế bào ở 4°C, 5000 rpm, 15 phút. Hoà tan tế bào lắng vào 40ml dung dịch $\frac{1}{2}MS + AS$ 50 μ l đặt trong nước đá lạnh.

2.2.4.2. Chuyển gen *GmCHI1A* vào thuốc lá thông qua *A.tumefaciens*

Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp vào mảnh lá và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được thực hiện như mô tả của Topping (1998) [105]. Môi trường nuôi cấy lá thuốc lá chuyển gen được trình bày ở phụ lục 2.2.

Lá thuốc lá được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 1×1 cm, sau đó các mảnh lá được ngâm trong dịch khuẩn *A.tumefaciens* tái tổ hợp trong 10 phút. Chuyển các mảnh lá nhiễm khuẩn sang môi trường MS bổ sung BAP và kháng sinh chọn lọc kanamycin để tái sinh đa chồi. Các chồi chuyển vào môi trường RM, bổ sung kanamycin để tạo rễ. Các cây chuyển gen *in vitro* được ra trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới.

2.2.4.3. Phương pháp phân tích cây thuốc lá chuyển gen

Tách chiết DNA tổng số từ lá thuốc lá thực hiện theo Saghai-Marooof và cs (1984) [90]. Điện di kiểm tra DNA tổng số được tiến hành trên gel agarose 0,8%. Tách chiết RNA tổng số từ lá cây thuốc lá chuyển gen bằng bộ kit Trizol Reagents. Tổng hợp cDNA bằng bộ kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis.

Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong hệ gen của các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 được phân tích bằng PCR. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI1A* ở mức phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR. Cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* sử dụng cho PCR và RT-PCR nhân bản gen *GmCHI1A* (Bảng 2.1).

2.2.5. Nhóm phương pháp biến nạp và phân tích cây đậu tương chuyển gen

Phương pháp chuyển gen ở đậu tương nhờ *A.tumefaciens* qua nách lá mầm thực hiện dựa trên nghiên cứu của Olhofs và cs (2006) [76] và Nguyễn Thu Hiền (2014) [8]. Các thể hệ chuyển gen ở đậu tương được ký hiệu: T0, T1, T2, ... Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm chuyển ra trồng trong bầu và sau đó trồng trong nhà lưới gọi là T0; hạt của cây chuyển gen T0 nảy mầm thành cây được gọi là T1; hạt của cây chuyển gen T1 nảy mầm thành cây được gọi là T2.

2.2.5.1. Biến nạp và tạo cây đậu tương chuyển gen

Tạo nguyên liệu biến nạp gen: Hạt đậu tương khử trùng khô bằng khí clo tạo ra từ hỗn hợp javen 100 ml + HCl 3ml đậm đặc trong 16 giờ, sau đó cho nảy mầm trên môi trường GM (Phụ lục 2.3). Sau 3-4 ngày mầm được cắt bỏ rễ, chồi mầm, bỏ vỏ, tách đôi lá mầm, loại bỏ đỉnh sinh trưởng, cắt cuống lá mầm và cắt bớt phần đầu lá mầm. Gây tổn thương lá mầm ở vị trí nách lá bằng dao và kim nhọn. Lá mầm loại bỏ cuống, đã tổn thương được sử dụng làm nguyên liệu biến nạp gen và nuôi cấy *in vitro*.

Lấy nhiễm và đồng nuôi cấy: Lá mầm tổn thương được ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens* trong 40 phút và sau đó được nuôi cấy trong môi trường đồng nuôi cấy (môi trường CCM: muối B5 0,16 g/l; MES 3,9 g/l; sucrose 30 g/l; agar 5 g/l; vitamin B5 1,0 mg/l; AS 0,2 mM; L-cysteine 400 mg/l; natri thiosulfate 158 mg/l; DTT 154 mg/l; GA3 0,25 mg/l và BAP 1,5 mg/l; pH = 5,4) trong tối 5 ngày.

Cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM: Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được rửa trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM) có bổ sung cefotaxim 400 mg/l với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Các mảnh lá mầm được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường tái sinh đa chồi SIM lần 1 (muối B5 0,3052 g/l; MES 0,59 g/l; sucrose 30 g/l; vitamin B5 1,0 mg/l; BAP 2 mg/l và kanamycin 50 mg/l), có bổ sung cefotaxim 400 mg/l

trong thời gian 2 tuần. Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 75 mg/l (lần 2).

Kéo dài chồi: Sau 2 - 3 tuần, các chồi sống sót được loại bỏ mảnh lá mầm và chuyển sang nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi (SEM) có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Thành phần môi trường SEM gồm MS 4,3 g/l; MES 0,59 g/l; sucrose 30 g/l; agar 5 g/l; vitamin B5 1,0 mg/l; L-asparagine 50 mg/l; glutamic acid 100 mg/l; GA3 0,5 mg/l; IAA 0,1 mg/l và kanamycin 50 mg/l) trong 2 tuần.

Tạo rễ: Khi các chồi cao khoảng 2-3 cm sẽ được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường ra rễ RM, có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường RM gồm MS 1,58 g/l; MES 0,59 g/l; sucrose 20 g/l; agar 5,0 g/l; IBA 0,1 mg/l và vitamin B5 1,0 mg/l trong 20 ngày để tạo rễ.

Chuyển cây in vitro ra trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới: Những cây hoàn chỉnh, khoẻ mạnh được đưa ra bầu có thành phần 1 trấu hun: 1 cát. Sau khoảng 1 - 2 tuần, các cây sống sót được trồng ra nhà lưới. Thời điểm ra cây trong năm được chọn vào vụ xuân, vụ xuân hè.

2.2.5.2. Xác nhận sự hiện diện và sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* vào hệ gen cây đậu tương

Tách chiết DNA tổng số từ lá đậu tương chuyển gen và các cây đối chứng không chuyển gen theo Saghai-Marooof và cs (1984) [90].

*Xác nhận sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong các cây chuyển gen T0:* DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-SacI-R*, với kích thước dự kiến là 722 bp (Bảng 2.1). Phản ứng PCR nhân đoạn DNA được thực hiện theo chu trình nhiệt 94 °C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kì, 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 kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1.0 %.

Kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển GmCHI1A vào hệ gen cây chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot: Cấu trúc pCB301_GmCHI chứa gen *nptII*, do vậy sử dụng phân tích Southern blot để phát hiện gen *nptII* trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen. Southern blot được thực hiện theo phương pháp của Southern (1975) [96]. Gen *nptII* được khuếch đại bằng cách sử dụng PCR với cặp mồi *nptII-F/ nptII-R*. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0 %, rồi được tinh sạch. Mẫu PCR sau khi tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp DNA dò theo hướng dẫn của bộ kit Biotin Deca Labeling kit (Themoscientific). Sau đó, thực hiện phản ứng hiện màng theo Biotin Chromogenic Detection Kit (Themoscience): Tách chiết DNA tổng số từ cây đậu tương chuyển gen và không chuyển gen, thu 30 - 50 µg DNA tinh sạch và xử lý bằng enzyme giới hạn *SacI*. Điện di sản phẩm cắt bởi enzyme giới hạn trên gel agarose 1% và chuyển sang màng lai. Bổ sung DNA dò gen *nptII* đã được đánh dấu trong đệm chứa 50% formamid, ở nhiệt độ 42 °C. Rửa màng lai ở nhiệt độ 65 °C trong đệm 0,1X SSC. Hiện kết quả lai trên màng và quy trình hiện màng được thực hiện theo kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Scientific).

2.2.5.3. Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp CHI1A bằng Western blot và ELISA

Các cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 cho kết quả Southern blot được phân tích sự biểu hiện của protein CHI tái tổ hợp ở thế hệ T1. Protein tổng số được chiết xuất từ lá đậu tương chuyển gen và các cây không chuyển gen, sau đó được tách bằng điện di trên gel 10 % SDS-PAGE như mô tả của Laemmli [61]. Phân tích Western blot để xác định sự biểu hiện protein tái tổ hợp được thực hiện theo mô tả của Sun và cs [98].

Thí nghiệm ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) gián tiếp định lượng protein CHI tái tổ hợp thông qua định lượng protein chứa đuôi cmyc theo mô tả của Sun và cs [98]

2.2.5.4. Phân tích hàm lượng isoflavone (daidzein, genistein) của các dòng đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật HPLC

Phân tích định lượng hàm lượng daidzein và genistein được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp theo Chen và cs [25].

2.2.6. Xử lý dữ liệu sinh học

Các dữ liệu về hàm lượng isoflavone của các mẫu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm Statistical Package for the Social Science (SPSS) để xác định các trị số thống kê như: giá trị trung bình, phương sai, độ lệch chuẩn, sai số trung bình mẫu. Kiểm định trị số thống kê theo Duncan ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ và $\alpha = 0,001$.

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN

Các thí nghiệm được thực hiện từ tháng 8/2015 đến tháng 11/2018.

Thí nghiệm phân tích hàm lượng isoflavone trong mầm đậu tương được thực hiện tại Phòng Công nghệ Thực phẩm - Viện Kiểm nghiệm và vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia, Bộ Y tế.

Các thí nghiệm khuếch đại gen, tách dòng phân tử, chuyển gen, phân tích cây chuyển gen được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Di truyền học, Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen, phân tích Southern blot, Western blot, ELISA được tiến hành tại Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

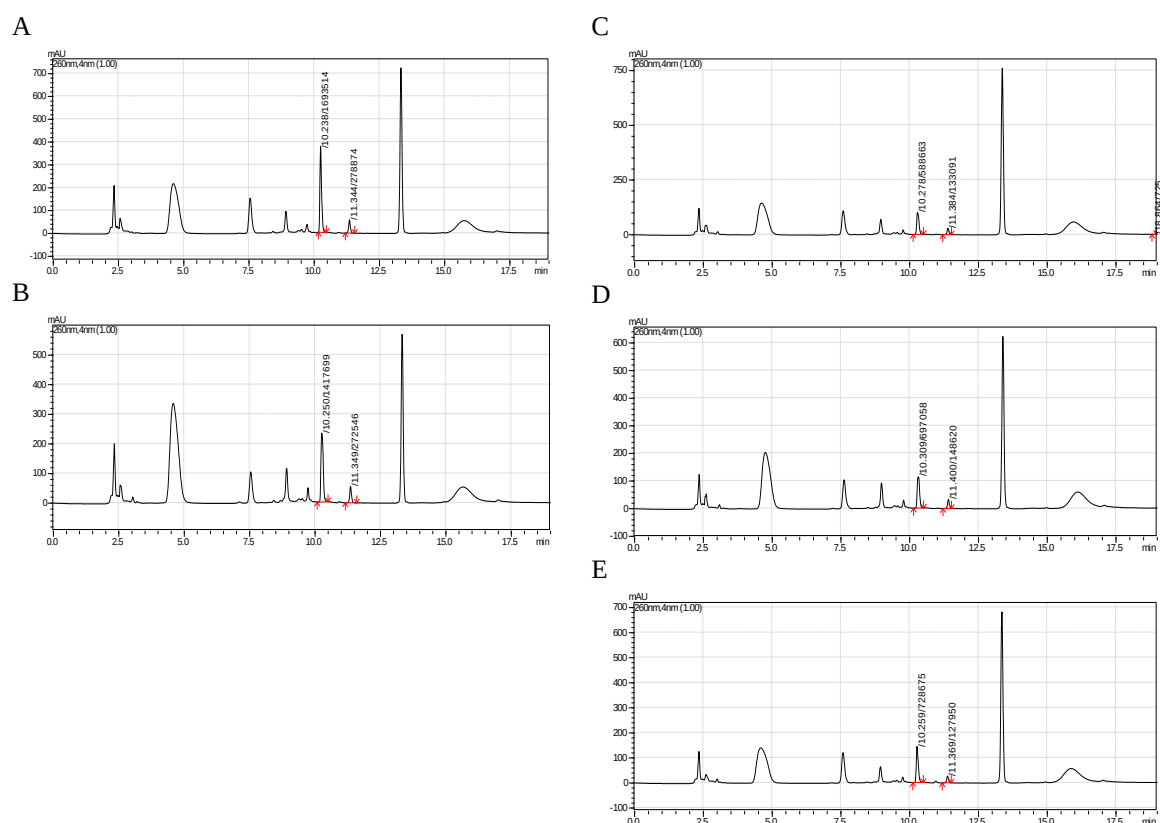
Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục Sinh học, Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *GmCHI1A* PHÂN LẬP TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG

3.1.1. Hàm lượng daidzein và genistein trong mầm hạt của một số giống đậu tương trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam

Tiến hành khảo sát hàm lượng isoflavone (daidzein và genistein) của 5 giống đậu tương (ĐT26; ĐT51; DT2008; DT84; DT90) trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp sắc ký HPLC, kết quả sắc ký đồ phân tích HPLC định lượng daidzein và genistein chiết từ mầm hạt đậu tương 3 ngày tuổi được thể hiện ở bảng 3.1.

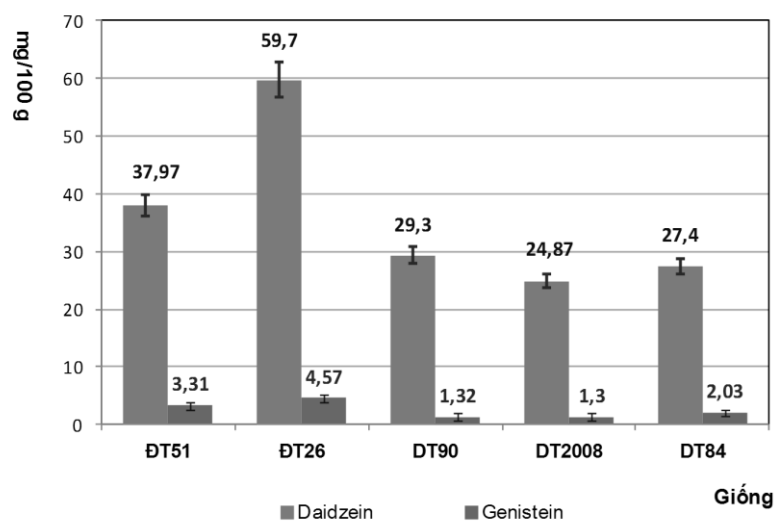


Hình 3.1. Sắc ký đồ phân tích daidzein và genistein từ mầm hạt đậu tương ở giai đoạn nảy mầm 3 ngày tuổi. A: ĐT26; B: ĐT51; C: DT2008; D: DT84; E: DT90

Bảng 3.1. Hàm lượng isoflavone trong mầm 3 ngày tuổi của 5 giống đậu tương (mg/100g)

Isoflavone	ĐT51	ĐT26	ĐT90	ĐT2008	ĐT84
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

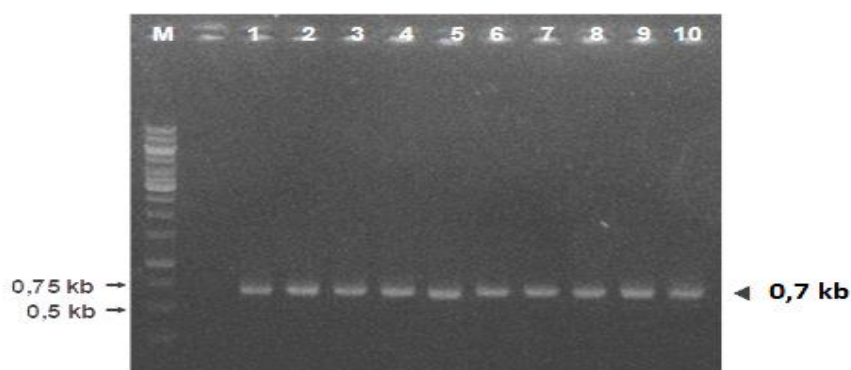
Kết quả bảng 3.1 cho thấy, ở giống đậu tương ĐT26, mầm 3 ngày tuổi có hàm lượng daidzein và genistein cao nhất (64,27 mg/100 g), giống ĐT2008 có hàm lượng thấp nhất (26,17 mg/100 g). Hàm lượng daidzein và genistein có sự khác biệt giữa 5 giống đậu tương ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,001$. Có thể xếp theo thứ tự giảm dần về hàm lượng isoflavone (daidzein+genistein) của 5 giống đậu tương nghiên cứu: ĐT26 > ĐT51 > ĐT90 > ĐT84 > ĐT2008 (Hình 3.2).



Hình 3.2. Biểu đồ so sánh hàm lượng daidzein và genistein trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của các giống đậu tương ĐT51, ĐT26, ĐT90, ĐT2008, ĐT84 ($\bar{x}$; thanh đứng trên mỗi biểu đồ là sai số chuẩn (S_x); đơn vị: mg/100 g; mức ý nghĩa $\alpha=0,001$).

3.1.2. Tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* từ cây đậu tương

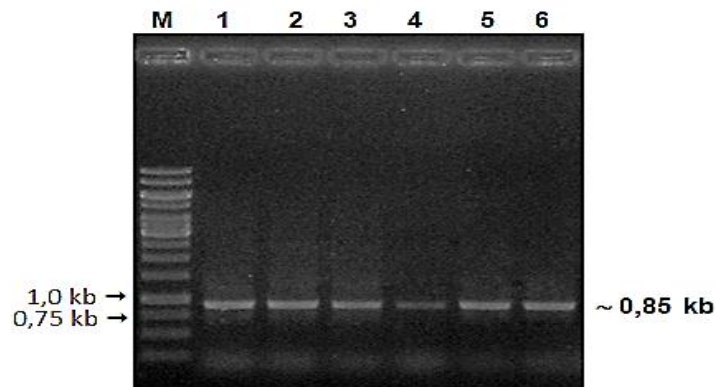
Dựa trên trình tự gen *GmCHI* mang mã số NM_001248290 trên Genbank, cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* đã được thiết kế để khuếch đại đoạn gen *GmCHI1A* dự kiến có kích thước 677 nucleotide, bao gồm đoạn mã hóa (657 nucleotide), đoạn nucleotide chứa điểm cắt của enzyme *NcoI* (9 nucleotide) và enzyme *NotI* (11 nucleotide). Kết quả nhân bản gen *GmCHI1A* bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế được thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI1A*. M: thang DNA 1kb; 1, 2: DT26; 3, 4: DT51; 5, 6: DT84; 7, 8: DT90; 9, 10: DT2008.

Hình 3.3. cho thấy một băng DNA có kích thước khoảng 0,7 kb, ứng với kích thước đoạn mã hóa của gen *GmCHI1A* như đã thiết kế. Đoạn DNA (gen *GmCHI1A*) từ bản gel được tinh sạch và tiến hành tách dòng bằng vector pBT và tế bào khả biến *E.coli* DH5 α . Đoạn gen *GmCHI1A* được gắn vào vector tách dòng pBT tạo vector tái tổ hợp *pBT_GmCHI1A*, kiểm tra vector tái tổ hợp và biến nạp vào *E.coli*.

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* để thu được đoạn DNA. Băng DNA trên bản gel điện di có kích thước khoảng 0,85 kb (Hình 3.4) đúng như 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 *GmCHI1A*.



Hình 3.4. Hình ảnh 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.

Chọn các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *GmCHI1A* của bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008, DT84 - là đại diện cho 2 nhóm kết quả có hàm lượng isoflavone cao và nhóm có hàm lượng isoflavone thấp để tiến hành giải trình tự nucleotide, kết quả thu được đoạn DNA có kích thước 657 nucleotide đúng như dự kiến khi thiết kế cặp mồi nhân bản gen bằng PCR.

Phân tích trực tuyến bằng chương trình BLAST trong NCBI, kết quả cho thấy các trình tự gen *GmCHI1A* phân lập được có hệ số tương đồng với trình tự NM_001248290 trên GenBank là 98,93% (ĐT51); 98,93% (DT84); 98,78% (DT2008), 97,87% (ĐT26). Hình 3.5 thể hiện kết quả phân tích BLAST trình tự gen *GmCHI1A* phân lập từ giống đậu tương ĐT26.

	Des	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Glycine max chalcone--flavonone isomerase 1A (CHI1A), mRNA	1136	1136	100%	0.0	97.87%	NM_001248290.2
☒	Glycine max chalcone isomerase 1A mRNA, complete cds	1136	1136	100%	0.0	97.87%	AY595413.1
☒	Glycine max chalcone isomerase (CHI) mRNA, complete cds	1136	1136	100%	0.0	97.87%	AF276302.1
☒	Soybean clone JCVI-FLGm-1O22 unknown mRNA	1131	1131	100%	0.0	97.72%	BT089242.1
☒	Glycine max chalcone isomerase A mRNA, complete cds	1125	1125	100%	0.0	97.56%	DQ835284.1

Hình 3.5. Kết quả phân tích bằng BLAST trên NCBI trong nhận diện trình tự gen *GmCHI1A* phân lập từ giống đậu tương ĐT26.

Như vậy, kết quả phân tích BLAST đã cho thấy đoạn DNA phân lập từ mRNA của bốn giống đậu tương DT26, DT51, DT2008, DT84 đã được xác định là vùng mã hóa của gen *GmCHI1A* của đậu tương có 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. Kết quả so sánh các trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* phân lập từ bốn giống đậu tương DT26, DT51, DT2008, DT84 với trình tự mang mã số NM_001248290 trên GenBank được trình bày ở hình 3.6 và bảng 3.2.

	10	20	30	40	50	60
NM_001248290	ATGGCAACGA	TCAGCGCGGT	TCAGGTGGAG	TTCCTGGAGT	TTCCAGCGGT	GGTTACTTCA
GmCHI1A (DT26)			..GC.....			
GmCHI1A (DT51)			..GT.....	..G..C...		G
GmCHI1A (DT84)		..G.....				
GmCHI1A (DT2008)			A....	T...		
	70	80	90	100	110	120
NM_001248290	CCAGCCTCCG	GCAAGACCTA	TTTCCTCGGC	GGCGCAGGGG	AGAGAGGATT	GACGATTGAG
GmCHI1A (DT26)			..A.....	C...		..C.....
GmCHI1A (DT51)		...T.....				T....
GmCHI1A (DT84)			A....			
GmCHI1A (DT2008)			..A.....			
	130	140	150	160	170	180
NM_001248290	GGGAAGTTCA	TAAAGTTCAC	AGGCATAGGA	GTATACTTGG	AGGATAAGGC	GGTGCCATCA
GmCHI1A (DT26)		...G.....		C...		
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)		G....				
GmCHI1A (DT2008)		G....				T....
	190	200	210	220	230	240
NM_001248290	CTCGCCGCTA	AGTGGGAAGG	TAAACTTCA	GAGGAGTTAG	TTACACCCCT	CCACTTCTAC
GmCHI1A (DT26)						
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)						
GmCHI1A (DT2008)						
	250	260	270	280	290	300
NM_001248290	AGGGATATCA	TTTCAGGGCC	GTTTGAAAAG	CTAATTAGAG	GGTCGAAGAT	TCTGCCATTG
GmCHI1A (DT26)						
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)	...C.....					
GmCHI1A (DT2008)						
	310	320	330	340	350	360
NM_001248290	GCTGGCGCTG	AATACTCAAA	GAAGGTGATG	GAAAACTGCG	TGGCACACAT	GAAGTCTGTT
GmCHI1A (DT26)						
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)						
GmCHI1A (DT2008)						
	370	380	390	400	410	420
NM_001248290	GGGACTTACG	GTGATGCTGA	AGCCGCAGCC	ATTGAAAAGT	TTGCTGAAGC	CTTCAAGAAT
GmCHI1A (DT26)					T...	
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)						
GmCHI1A (DT2008)						

	430	440	450	460	470	480
NM_001248290	GTGAATTTTG	CACCTGGTGC	CTCTGTTTC	TACAGACAAT	CACCTGATGG	AATCTTGGGG
GmCHI1A (DT26)			..A..A..			
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)						
GmCHI1A (DT2008)						
	490	500	510	520	530	540
NM_001248290	CTT-GTTTCT	CTGAAGATGC	AACAATACCA	GAAAAGGAGG	CTGCAGTGAT	AGAGAACAAG
GmCHI1A (DT26)	...G.....					
GmCHI1A (DT51)	...A.....					
GmCHI1A (DT84)	...A.....					
GmCHI1A (DT2008)	...A.....					
	550	560	570	580	590	600
NM_001248290	GCTGTATCAG	CGGCGGTCTT	GGAGACCATG	ATTGGTGAAC	ATGCTGTTTC	CCCTGACTTA
GmCHI1A (DT26)						
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)						..A..
GmCHI1A (DT2008)						
	610	620	630	640	650	
NM_001248290	AAACGCAGTT	TGGCTTCTCG	ATTGCCTGCG	GTATTGAGCC	ACGGCATTAT	AGTCTGA
GmCHI1A (DT26)			C.....			G..T...
GmCHI1A (DT51)						
GmCHI1A (DT84)				...G..G.		
GmCHI1A (DT2008)			...G.....	..T.....		...G...

Hình 3.6. Trình tự gen *GmCHI1A* (cDNA) phân lập từ mRNA của bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008, DT84. NM_00124890: mã số của trình tự gen *GmCHI1A* trên GenBank.

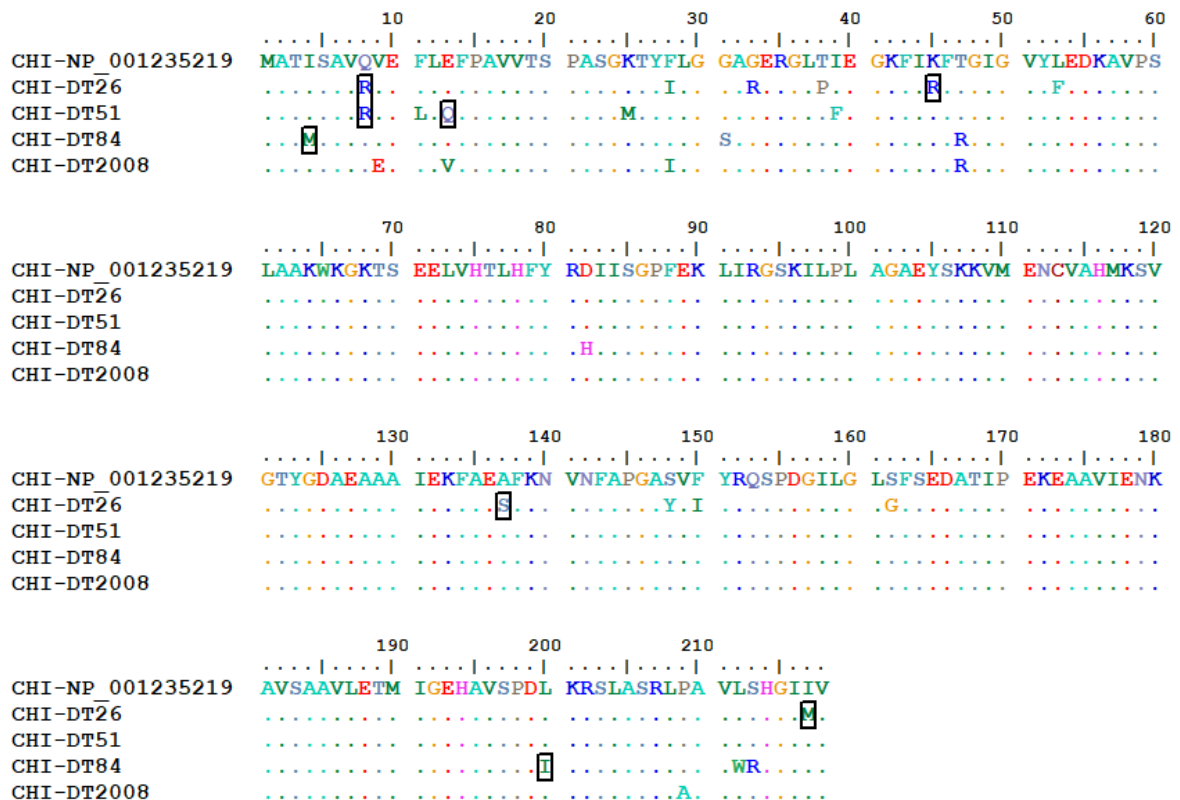
Kết quả so sánh ở bảng 3.2 cho thấy trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* giữa các giống đậu tương có 31 vị trí nucleotide sai khác, thể hiện ở sự thay thế nucleotide và sự thay thế bao gồm cả các base cùng loại và khác loại. Cụ thể là C → G; G → C; T → A; A → T; A → G; G → A; A → C; C → A; G → T; T → G. Tuy nhiên sự sai khác này có làm thay đổi trình tự amino acid hay không, cần phải tiếp tục so sánh các trình tự amino acid.

Bảng 3.2. Những vị trí sai khác về trình tự nucleotide của *GmCHI1A* giữa các giống đậu tương và trình tự gen *GmCHI1A* mang mã số NM_001248290

TT	Vị trí nucleotide	NM_001248290	ĐT26	ĐT51	ĐT84	ĐT2008
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

Từ các kết quả phân tích trên có thể rút ra kết luận rằng gen *GmCHI1A* đã được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam DT26, DT51, DT2008, DT84. Các trình gen *GmCHI1A* đã được công bố trên GenBank lần lượt mang các mã số là LT594994.1, LT594995.1, LT594993.1, LT594996.1.

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ 5 trình tự gen thuộc các giống đậu tương DT26, DT51, DT2008, DT84 và NM_00124890 cho thấy, các trình tự amino acid suy diễn từ trình tự gen *GmCHI1A* 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 3.7, Bảng 3.3). Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* đã dẫn đến sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của các giống đậu tương và có ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme CHI hay không cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ mối liên hệ này.



Hình 3.7. Trình tự amino acid suy diễn từ gen *GmCHI1A* của giống đậu tương DT26, DT51, DT84 và DT2008 so với NM_001248290

Bảng 3.3. Những vị trí sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI1A* giữa các giống đậu tương và trình tự gen mang mã số NM_001248290

TT	Vị trí amino acid	NM_001248290	ĐT26	ĐT51	ĐT84	ĐT2008
1	4	I	I	I	M	I
2	8	Q	R	R	Q	Q
3	9	V	V	V	V	E
4	11	F	F	L	F	F
5	13	E	E	Q	E	V
6	25	K	K	M	K	K
7	28	F	I	F	F	I
8	31	G	G	G	S	G
9	33	G	R	G	G	G
10	38	T	P	T	T	T
11	39	I	I	F	I	I
12	45	K	R	K	K	K
13	47	T	T	T	R	R
14	53	L	F	L	L	L
15	82	D	D	D	H	D
16	137	A	S	A	A	A
17	148	S	Y	S	S	S
18	150	F	I	F	F	F
19	162	S	G	S	S	S
20	200	L	L	L	I	L
21	209	P	P	P	P	A
21	212	L	L	L	W	L
23	213	S	S	S	R	S
24	217	I	M	I	I	I

3.1.3. Sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI1A*

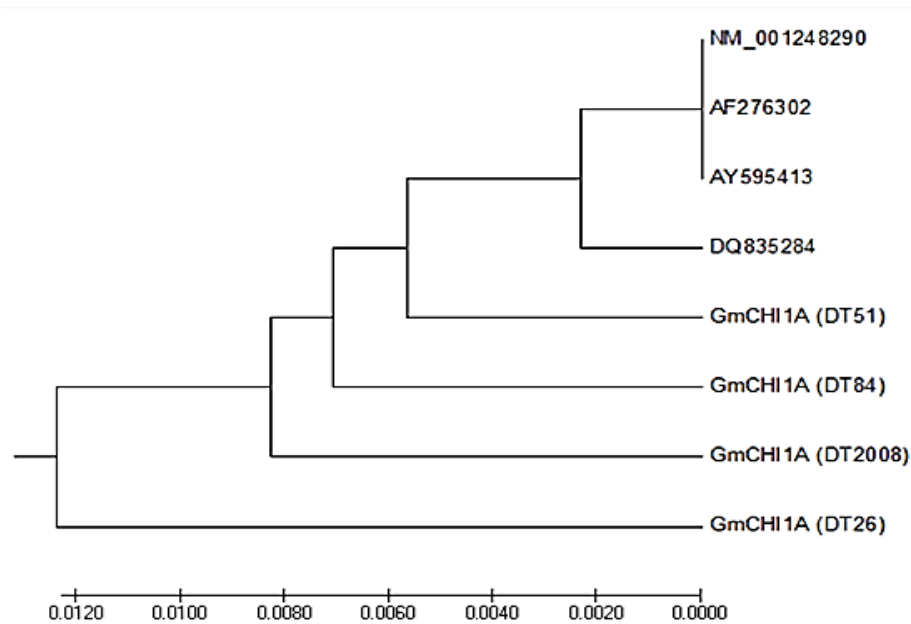
Khi phân tích bằng BLAST trong NCBI, bốn trình tự gen *GmCHI* trên GenBank mang mã số AF276302, DQ191401, DQ835284 và NM_001248290 cùng với 4 trình tự phân lập từ các giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT84 và DT2008 đã được lựa chọn để phân tích sự đa dạng dựa trên trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI1A* phân lập từ cây đậu tương (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Các trình tự gen *GmCHI1A* của các giống đậu tương Việt Nam và các trình tự có mã số trên GenBank được sử dụng trong phân tích

STT	Giống đậu tương/mã số trên GenBank	Quốc gia	Năm công bố	Tác giả
1	ĐT26 (LT594994)	Việt Nam	2016	Le và cs[133]
2	ĐT51 (LT594995)	Việt Nam	2016	Le và cs [134]
3	DT84 (LT594993)	Việt Nam	2016	Le và cs [132]
4	DT2008 (LT594996)	Việt Nam	2016	Le và cs [135]
5	NM_001248290	Trình tự tham chiếu	2019	Gutierrez-Gonzalez và cs [140]
6	DQ835284	Hàn Quốc	2007	Chung and Nam [130]
7	AY595413	Mỹ	2005	Ralston và cs [127]
8	AF276302	Đài Loan	2001	Chiu và cs [126]

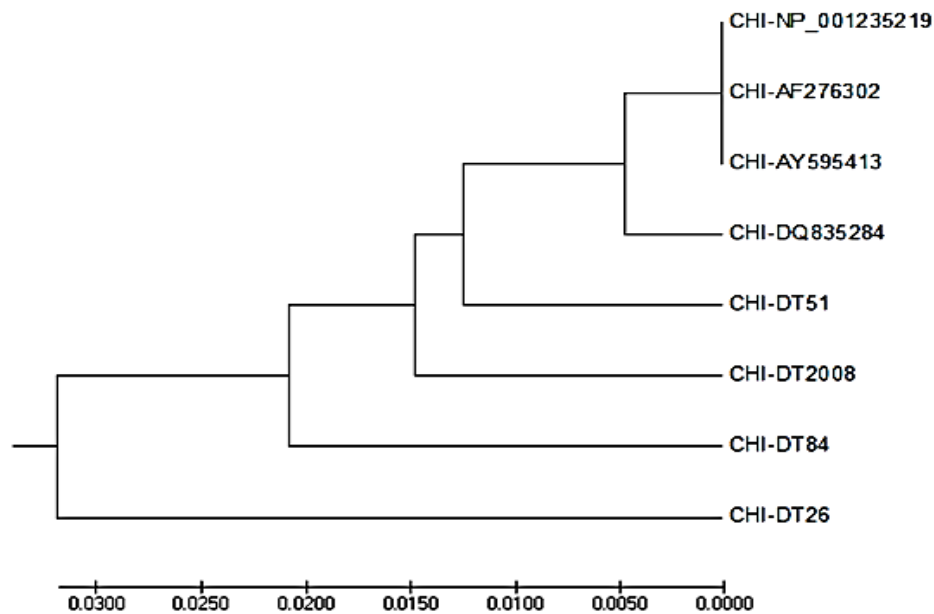
Sơ đồ hình cây ở hình 3.8 được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide theo phương pháp UPGMA bằng phần mềm MEGA7. Khoảng cách tiến hóa phân tử được tính toán bằng phương pháp khả năng tổng hợp tối đa và được tính theo đơn vị số lượng thay thế ở mỗi vị trí. Sự thay đổi giữa điểm trong các trình tự được mô hình hóa với phân phối gamma (tham số hình dạng = 1). Kết quả phân tích ở hình 3.8 cho thấy, dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI*, các giống đậu tương phân bố trong hai nhánh, giống đậu tương ĐT26 phân bố ở một nhánh

và 7 giống còn lại phân bố ở nhánh thứ hai, với khoảng cách di truyền là 1,2%. Nhánh thứ hai chia làm hai nhánh phụ và mỗi nhánh phụ lại chia làm hai nhánh. Ba trình tự mang mã số NM_001248290, AY595413, AF276302 không có điểm sai khác, phân bố trong cùng một nhóm. Giống DT51, DT2008 và DT84, mỗi giống phân bố ở một nhánh phụ.



Hình 3.8. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A* được thiết lập theo phương pháp UPGMA

Ở hình 3.9 trình bày sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI* được thiết lập theo phương pháp UPGMA cho thấy 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, khoảng cách di truyền được xác định là 3,0 %. Các giống đậu tương có trình tự mang mã số NM_001248290, AY595413, AF276302 không có sự khác nhau và xếp cùng một nhóm.



Hình 3.9. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu tương dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI1A* được thiết lập theo phương pháp UPGMA

Trong mầm hạt đậu tương 3 ngày tuổi, mầm của giống đậu tương DT26 có hàm lượng daidzein và genistein cao nhất (64,27 mg/100 g), giống DT51 có hàm lượng daidzein và genistein cao thứ hai (41,28 mg/100 g), giống DT2008 và DT84 có hàm lượng daidzein và genistein thấp nhất. Như vậy sự khác nhau về trình tự amino acid của enzyme CHI giữa giống DT26, DT51 và DT2008, DT84 có liên quan đến sự chuyển hóa tổng hợp daidzein và genistein trong hạt đậu tương nảy mầm hay không cần tiếp tục làm sáng tỏ; đồng thời cần khảo sát tìm kiếm sự khác biệt về hoạt động của gen *GmCHI1A* ở giống DT26 so với giống đậu tương khác có liên quan gì với sự tích lũy isoflavone. Những thông tin này là cơ sở ban đầu cho việc sử dụng trình tự gen *GmCHI1A* phân lập từ giống DT26, giống có hàm lượng daidzein và genistein trong mầm hạt cao nhất để thiết kế vector chuyển gen trong nghiên cứu mối liên quan giữa biểu hiện mạnh gen *GmCHI1A* với hàm lượng isoflavone.

3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN *GmCHI1A*

Để chuyển gen *GmCHI1A* vào thực vật và có thể kiểm tra biểu hiện sản phẩm protein tái tổ hợp của gen, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện gen thực vật pCB301 mang promoter *CaMV35S* để điều khiển biểu hiện gen *GmCHI1A* ở thực vật. Vector chuyển gen thực vật mang gen *GmCHI1A* được thiết kế theo sơ đồ ở hình 2.2 (Chương 2), bao gồm các thí nghiệm tạo cấu trúc chứa gen đích và gắn cấu trúc mang gen đích đã thiết kế vào vector chuyển gen.

3.2.1. Tạo cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A*

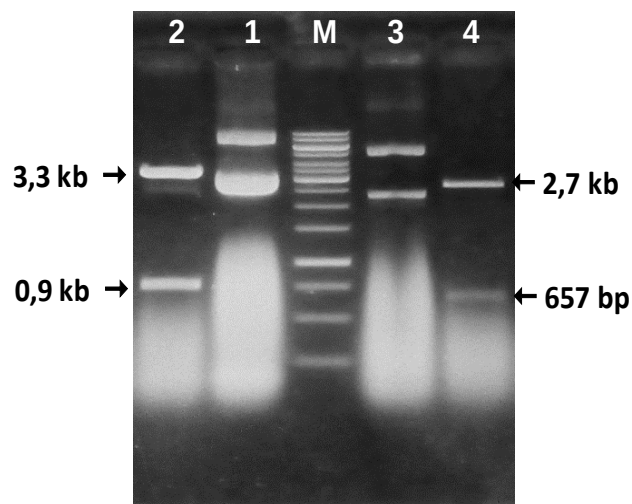
Thu nhận gen GmCHI1A và vector mở vòng pRTRA 7/3

Vector *pBT_GmCHI1A* chứa gen *GmCHI1A* phân lập từ giống đậu tương ĐT26, vector trung gian *pRTRA7/3* chứa promoter *CaMV35S* - là promoter mạnh phân lập từ virus gây khảm súp lơ, có thể khởi động phiên mã gen chuyển ở tất cả các tế bào và mô trên cơ thể thực vật. Vector *pRTRA7/3* chứa đuôi *polyA* giúp ổn định cấu trúc phân tử mRNA trong tế bào chất; đặc biệt vector này còn cung cấp trình tự nucleotide mã hóa chuỗi peptide kháng nguyên c-myc để có thể dễ dàng xác định được sự có mặt của sản phẩm protein tái tổ hợp khi dùng kháng thể tương ứng bằng Western blot hoặc ELISA.

Tiến hành thí nghiệm xử lý song song vector tái tổ hợp *pBT_GmCHI1A* và vector *pRTRA7/3* bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* tạo các đầu dính tương ứng. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt bởi cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* bằng điện di trên gel agarose 1,0% được thể hiện ở hình 3.10. Trên hình 3.10, ở làn điện di số 2, vector *pRTRA7/3* cắt bằng cặp enzyme *NcoI/NotI* thu được 2 băng điện di có kích thước khoảng 3,3 kb và 0,9 kb. Phân đoạn DNA có kích thước khoảng 0,9 kb là đoạn 2SP và antiABA không sử dụng. Phân đoạn 3,3 kb chính là đoạn *pRTRA7/3* mở vòng mang các trình tự cần thu nhận để phát triển vector

tái tổ hợp. Kết quả điện di sản phẩm DNA tinh sạch sau khi cắt bằng *NcoI/NotI* nhận được một băng duy nhất có kích thước như ước tính khoảng 3,3 kb là đoạn DNA *35S_cmyc_KDEL* chứa promoter 35S, trình tự nucleotide mã hóa peptide c-myc và trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL. Cấu trúc *35S_cmyc_KDEL* sử dụng để thiết kế vector chuyển gen.

Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp *pBT_GmCHI1A* bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* ở hình 3.10 cho thấy, ở làn điện di số 4 có hai băng điện di có kích thước khoảng 657 bp và 2,7 kb. Trong đó, phân đoạn DNA 657 bp chính là gen *GmCHI1A* cần thu nhận. Việc sử dụng cặp enzyme hạn chế như trên sẽ đảm bảo cho gen đích gắn thuận chiều với promoter 35S trên vector tái tổ hợp.



Hình 3.10. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt mở vòng *pRTRA7/3* và cắt *pBT-GmCHI1A* bằng cặp enzyme *NcoI/NotI*.

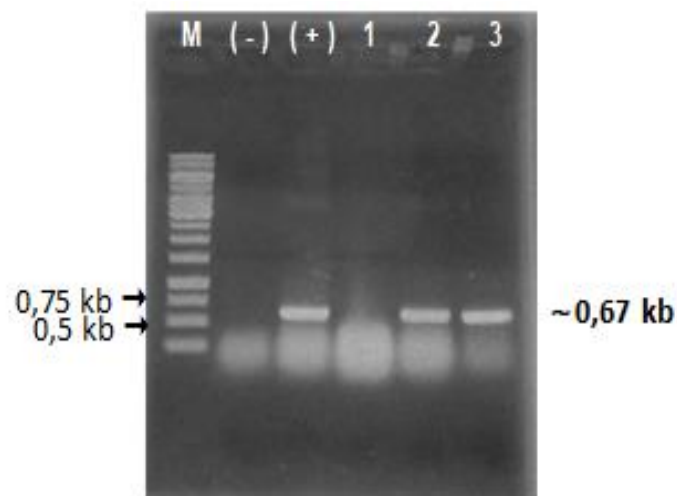
M: Thang DNA 1 kb; 1: Vector *pRTRA7/3* không cắt bằng enzyme *NotI* và *NcoI*; 2: Sản phẩm cắt vector *pRTRA7/3* bằng enzyme *NcoI* và *NotI*; 3: Vector tái tổ hợp *pBT-GmCHI1A* không cắt bằng enzyme *NotI* và *NcoI*; 4: Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp *pBT-GmCHI1A* bằng enzyme *NcoI* và *NotI*;

Như vậy, chúng tôi đã thu nhận được gen *GmCHI1A* từ vector tách dòng *pBT_GmCHI1A* và vector mở vòng *pRTRA7/3*. Sau đó dựa vào kích thước phân đoạn DNA, kit Gene JET PCR Purification đã được sử dụng để tinh sạch và thu nhận gen chuyển *GmCHI1A* và vector mở vòng *pRTRA7/3*.

Tạo cấu trúc tái tổ hợp pRTRA7/3_GmCHI1A

Gen *GmCHI1A* được trộn với vector *pRTRA 7/3* sau khi tinh sạch, bổ sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình ghép nối để tạo được vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_GmCHI1A* mang cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A-cmyc-polyA*.

Vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_GmCHI1A* được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α và chọn dòng bằng colony - PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* (Hình 3.11).



Hình 3.11. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *GmCHI1A* từ các dòng khuẩn lạc.

M: Thang DNA 1 kb; (-): Colony-PCR từ khuẩn lạc *E.coli* không được biến nạp *pRTRA7/3_GmCHI1A*; (+): PCR nhân gen *GmCHI* từ vector *pBT_GmCHI1A*; 1-3: Colony-PCR từ các dòng khuẩn lạc được biến nạp *pRTRA7/3_GmCHI1A*

Kết quả điện di kiểm tra ở hình 3.11 cho thấy, có 2 trong 3 dòng khuẩn lạc xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 0,67 kb tương ứng với kích thước của gen *GmCHI1A* (cùng xuất hiện ở làn điện di đối chứng dương). Như vậy, đã chọn được hai dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp mang gen *GmCHI1A*. Plasmid tái tổ hợp pRTRA_*GmCHI1A* tách chiết và tinh sạch từ các khuẩn lạc dương tính với colony-PCR được sử dụng để thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* phục vụ tạo vector chuyển gen ở thực vật.

3.2.2. Tạo vector chuyển gen pCB301_*GmCHI1A*

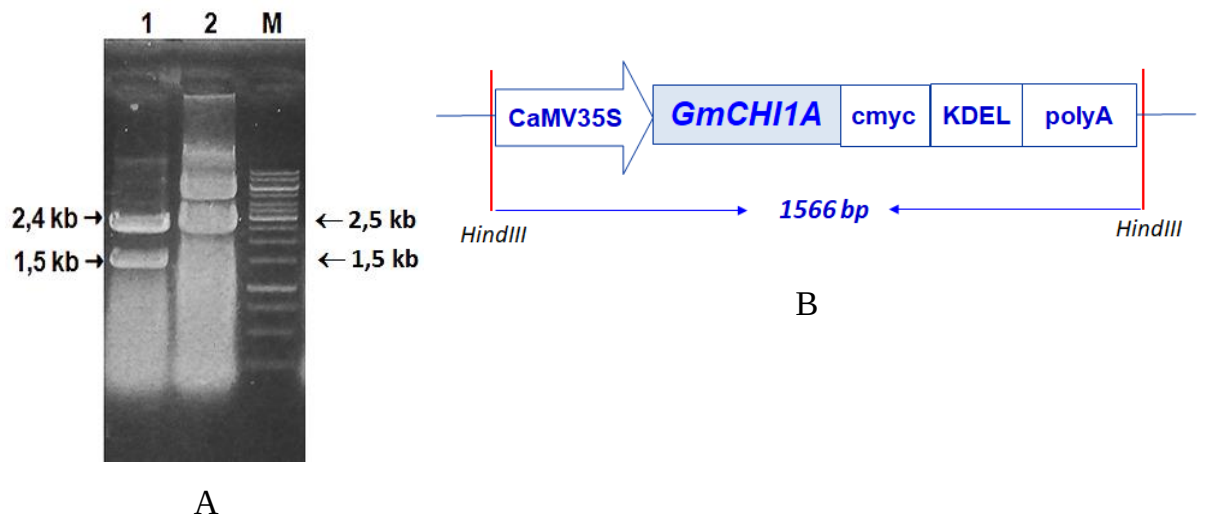
Trong các thí nghiệm tạo vector chuyển gen, vector chuyển gen pCB301 được lựa chọn vì có cấu trúc phù hợp để có thể gắn cấu trúc mang gen chuyển tạo thành vector tái tổ hợp. Quá trình tạo vector chuyển gen pCB301_*GmCHI1A* gồm các thí nghiệm thu nhận cấu trúc mang gen *GmCHI1A* bằng enzyme giới hạn, cắt mở vòng vector pCB301 và gắn cấu trúc chứa gen chuyển *GmCHI1A* vào vector chuyển gen pCB301.

*Thu nhận cấu trúc 35S_*GmCHI1A*_cmv_*polyA**

Tiến hành cắt vector pRTRA7/3_*GmCHI1A* bằng enzyme *HindIII* thu được cấu trúc mang gen chuyển 35S_*GmCHI1A*_cmv_*polyA* (1,5 kb) và đoạn DNA có kích thước 2,4 kb (Hình 3.12 A). Cấu trúc và kích thước của 35S_*GmCHI1A*_cmv_*polyA* thể hiện ở hình 3.12B.

Mở vòng vector chuyển gen pCB301 bằng HindIII

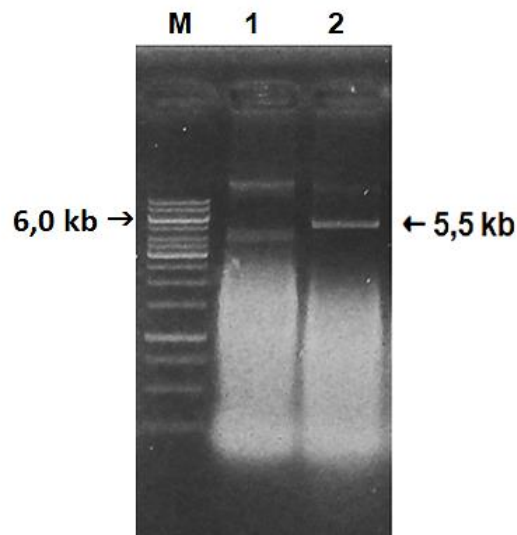
Kết quả thí nghiệm cắt vector chuyển gen pCB301 nhận được phân đoạn DNA với kích thước 5,5 kb, đây chính là vector pCB301 mở vòng. Điện di sản phẩm tinh sạch sau khi cắt mở vòng plasmid pCB301 trên gel agarose 0,8% thu được băng DNA có kích thước khoảng 5,5 kb (Hình 3.13) phù hợp với kích thước đã tính toán. Sản phẩm DNA tinh sạch đảm bảo sử dụng tốt cho thí nghiệm tạo vector chuyển gen.



Hình 3.12. A: Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid *pRTRA7/3_GmCHI1A* bằng *HindIII*.

M: thang DNA 1kb; Làn điện di số 1: plasmid *pRTRA7/3_GmCHI1A* được cắt bởi *HindIII*; Làn điện di số 2: plasmid *pRTRA7/3_GmCHI1A* không cắt;

B: Sơ đồ cấu trúc và kích thước của đoạn *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA* thu nhận được

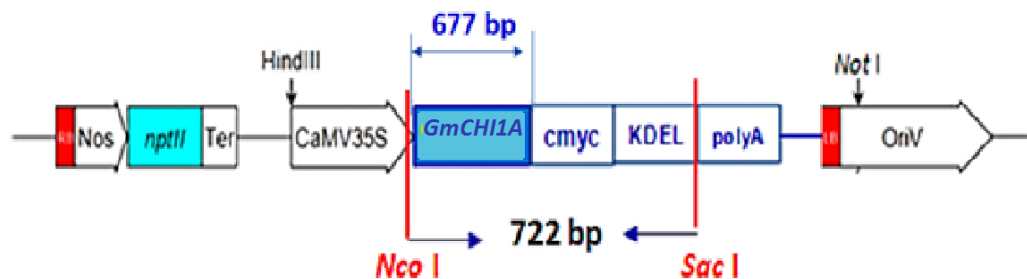


Hình 3.13. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pCB301.

M: thang DNA 1kb; Làn điện di số 1: plasmid không cắt bởi *HindIII*; Làn điện di số 2: Sản phẩm DNA đích mở vòng từ vector pCB301

Gắn cấu trúc chứa gen chuyển GmCHI1A vào vector chuyển gen pCB301

Sử dụng T4 ligase để gắn cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA* vào vector pCB301 mở vòng tạo vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*. Cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* được thiết kế cho PCR để nhân bản gen *GmCHI1A* có kích thước 677 bp. Trong vector *pCB301_GmCHI1A* gen *GmCHI1A* có 677 bp, gắn thêm trình tự nucleotide mã hóa peptid cmyc (33 bp) và KDEL (12 bp), cho nên đoạn DNA *GmCHI1A_cmyc_KDEL* trong vector *pCB301_GmCHI1A* có 722 bp (Hình 3.14).

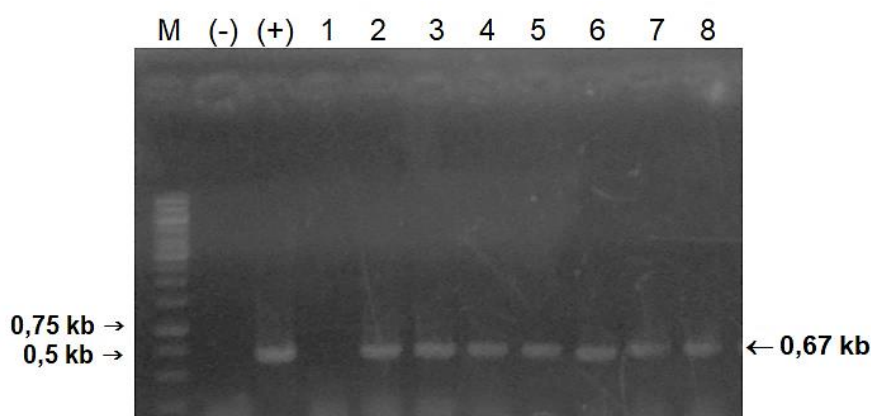


Hình 3.14. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*.

RB: Bờ phải; Nos: Tổng hợp nopaline; *nptII*: gen kháng kanamycin; Ter: terminator; *CaMV35S*: promoter *CaMV35S*; *GmCHI1A*: gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* (*GmCHI1A*) phân lập từ cây đậu tương; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hoá peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL; *poly A*: Chuỗi polyA; LB: Bờ trái; *OriV*: Vùng khởi động sao chép của *A.tumefaciens*

Sản phẩm thí nghiệm được biến nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E.coli* DH5 α bằng sốc nhiệt để nhân dòng và chọn dòng *E.coli* DH5 α sau khi biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin. Thực hiện colony-PCR một số khuẩn lạc với cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI- NotI-R* để lựa chọn dòng *E.coli* DH5 α mang vector chuyển gen *GmCHI1A*, kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.15 đã xác nhận dòng vi khuẩn chứa

vector tái tổ hợp *pCB301_ GmCHI1A*. Kết quả cho thấy, trong 8 dòng khuẩn lạc được kiểm tra có 7 dòng dương tính với colony-PCR. Những dòng khuẩn lạc dương tính này được nuôi trong LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc (kanamycin) để nhân dòng vector tái tổ hợp cho biến nạp vào *A.tumefaciens* phục vụ chuyển gen.



Hình 3.15. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *GmCHI1A* từ khuẩn lạc *E.coli* tái tổ hợp.

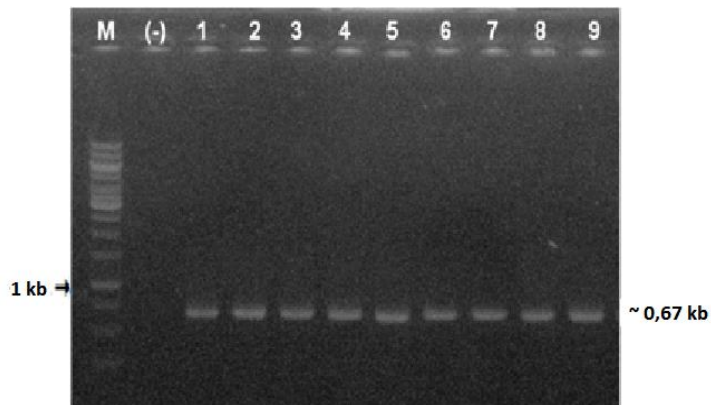
M: thang DNA 1kb; (-) Đối chứng; (+): Plasmid *pBT_GmCHI1A*; 1-8: Các dòng khuẩn lạc.

3.2.3. Tạo *A. tumefaciens* CV58 chứa vector chuyển gen *pCB301_ GmCHI1A*

Plasmid *pCB301_ GmCHI1A* tách chiết từ các dòng vi khuẩn *E.coli* dương tính với colony-PCR được tinh sạch, sau đó biến nạp vào *A.tumefaciens* CV58. Nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C và khi các khuẩn lạc xuất hiện trên mặt thạch thì tiến hành kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* để chọn dòng khuẩn lạc mang vector chuyển gen *GmCHI1A* (Hình 3.16).

Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.16 cho thấy, cả 9 dòng khuẩn lạc kiểm tra đều dương tính, trên gel điện di xuất hiện một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 0,67 kb, tương ứng với kích thước của gen

chuyển *GmCHI1A*, trong khi đó đối chứng âm không xuất hiện băng DNA. Điều đó chỉ ra rằng, chín dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* kiểm tra đều mang vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*. Các dòng *A.tumefaciens* chứa vector chuyển gen mang gen chuyển *GmCHI1A* được lưu giữ phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen ở thực vật.

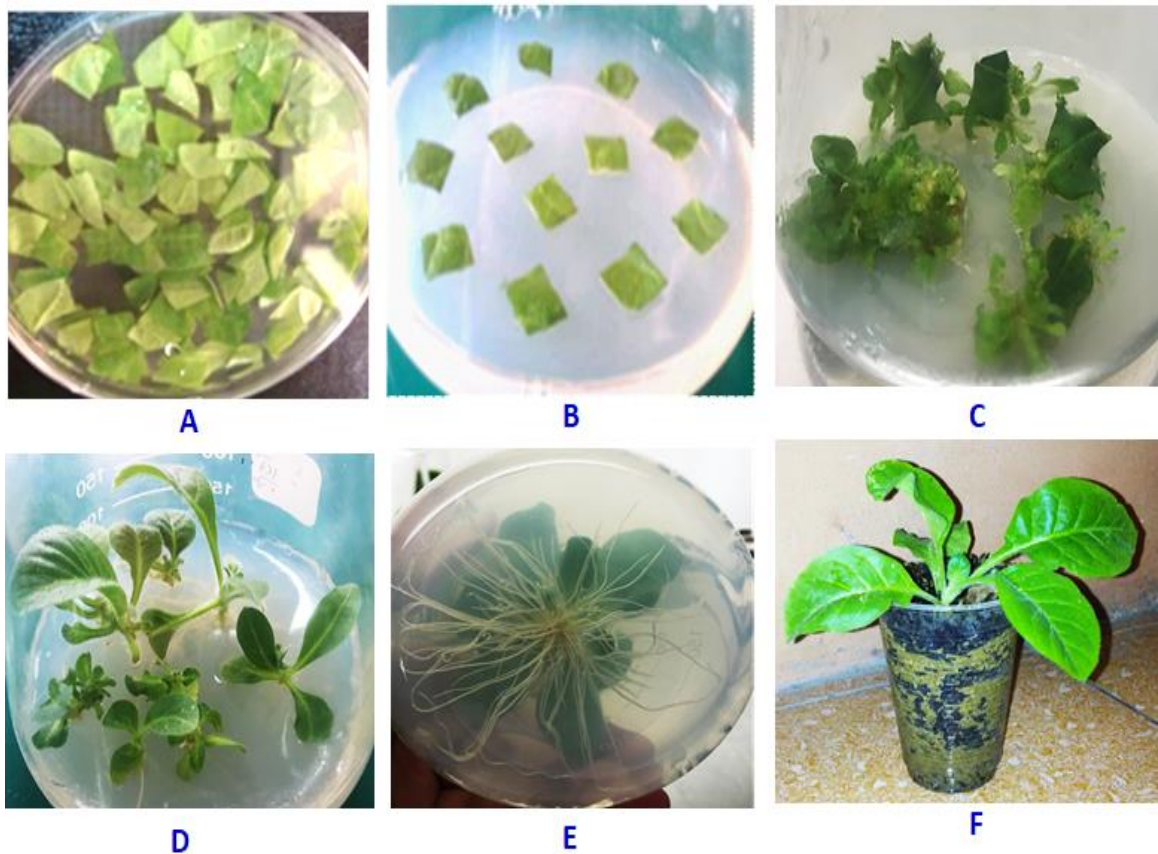


Hình 3.16. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR bằng cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* từ các dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens* CV58.

M: thang DNA 1kb; (-): Đối chứng âm - dòng *A.tumefaciens* không được biến nạp *pCB301_GmCHI1A*; 1-9: dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens* CV58 chứa vector *pCB301_GmCHI1A*.

3.2.4. Phân tích hoạt động của vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* trên cây thuốc lá

Tiến hành biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* thông qua lây nhiễm bởi *A.tumefaciens* vào mô lá thuốc lá (Hình 3.17). Kết quả thí nghiệm biến nạp trình bày ở bảng 3.5 cho thấy, sau ba lần biến nạp ở lô thí nghiệm thu được 83 mẫu tạo cụm chồi và qua chọn lọc bằng kháng sinh có 206 chồi sống sót. Ở môi trường tạo rễ có 163 chồi ra rễ và chọn lọc được 98 cây để chuyển ra trồng trong bầu đất. Kết quả cuối cùng lựa chọn được 30 cây sống sót trong điều kiện nhà lưới.



Hình 3.17. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen *GmCHI1A*.

A: các mảnh lá thuốc lá trong dịch khuẩn và lây nhiễm; B: Đồng nuôi cây trên môi trường CCM; C: Tái sinh đa chồi trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin; D: Kéo dài chồi; E: Ra rễ trên môi trường RM; F: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trên giá thể.

Lô đối chứng là các mảnh lá thuốc lá không biến nạp tái sinh trong môi trường không có kháng sinh chọn lọc (ĐC0) và có kháng sinh (ĐC1). Lô ĐC0 chuyển 10 cây ra trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới. Ở lô ĐC1, các mảnh lá không tái sinh chồi trong môi trường chứa kanamycin. Các cây thuốc lá chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được sử dụng để phân tích sự có mặt và sự hoạt động của vector mang gen chuyển *GmCHI1A*.

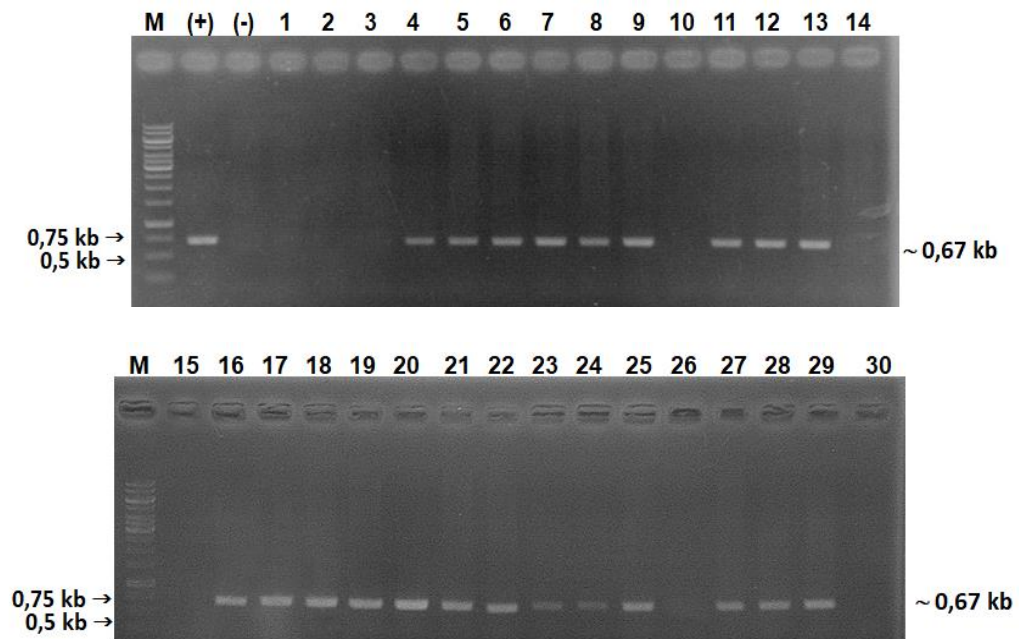
Bảng 3.5. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* vào thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu	Số mẫu sống tạo cụm chồi	Tổng số chồi	Số chồi sống sót ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây sống sót
Thí nghiệm	Lần biến nạp 1	30	29	68	48	36	12
	Lần biến nạp 2	30	28	71	54	32	8
	Lần biến nạp 3	30	26	67	41	30	10
Tổng		90	83	206	163	98	30
Đối chứng 0 (ĐC0)		30	30	97	65	42	10
Đối chứng 1 (ĐC1)		30	0	0	0	0	0

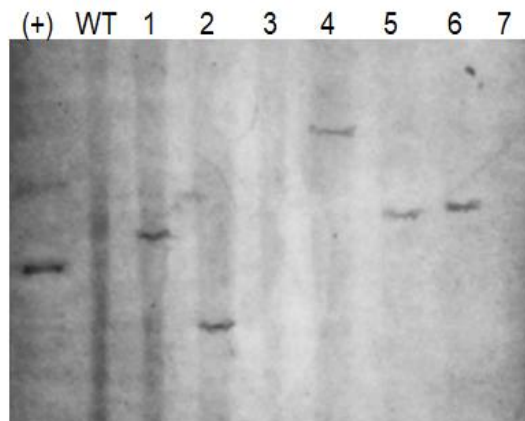
Ghi chú: ĐC1: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh. ĐC0: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

Thu lá non của 30 cây thuốc lá chuyển gen, tách chiết DNA tổng số và thực hiện phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* bằng PCR với cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R*, kết quả thể hiện ở hình 3.18A. Trên hình 3.18A, băng DNA có kích thước khoảng 0,67 kb xuất hiện ở 22 làn điện di, đó là từ DNA các cây số 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29 và các cây số 1, 2, 3, 10, 14, 15, 26, 30 không có băng DNA.

Chọn ngẫu nhiên 7 cây thuốc lá T0 dương tính với phản ứng PCR, sinh trưởng phát triển bình thường để phân tích Southern blot, kết quả được thể hiện ở hình 3.18B.



A



B

Hình 3.18. A-Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển *GmCHI1A* từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.

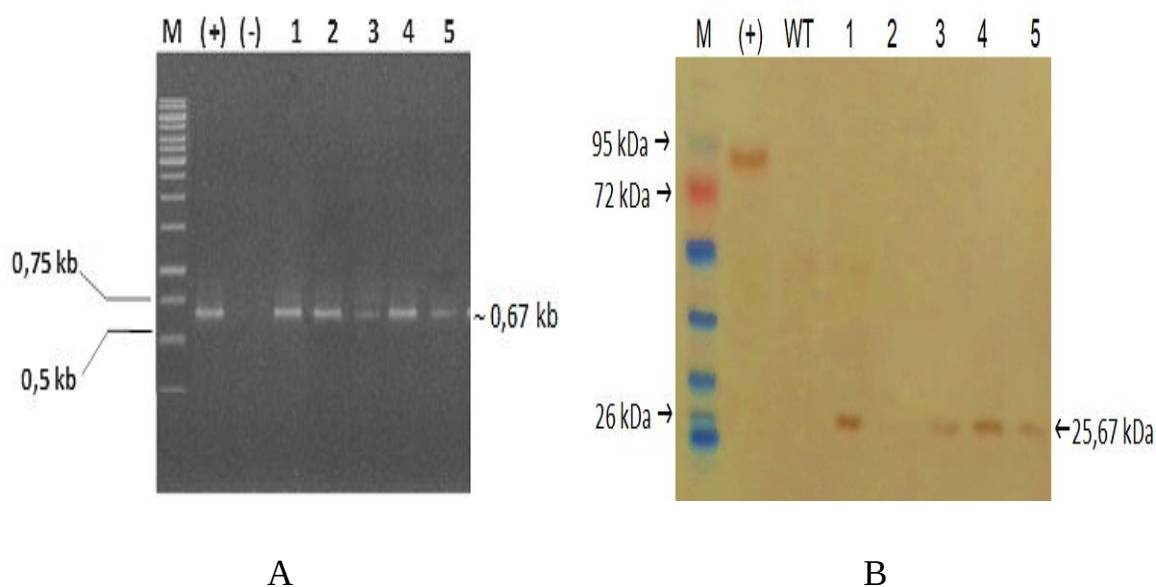
M: thang DNA 1kb; (+): Plasmid *pBT_GmCHI1A* (đối chứng dương); (-) Cây không chuyển gen (WT-đối chứng âm); 1-30: Các cây thuốc lá chuyển gen ở T0.

B- Kết quả Southern blot các mẫu thuốc lá chuyển gen *GmCHI1A*.

(+):Plasmid *pCB301_GmCHI1A*; 1-7: Các dòng thuốc lá chuyển gen T0 (T01, T02, T03, T04, T05, T06, T07); WT: cây thuốc lá không chuyển gen.

Trên hình 3.18B thấy xuất hiện 5/7 lần điện di cho kết quả lai Southern. Các lần điện di ứng với ký hiệu các cây thuốc lá chuyển gen T0 và cây T01, T02, T04, T05, T06 xuất hiện băng DNA. Như vậy gen chuyển *GmCHI1A* đã hợp nhất vào hệ gen cây thuốc lá chuyển gen.

RNA tổng số tách chiết từ lá non của 5 cây thuốc lá chuyển gen (T01, T02, T04, T05, T06) dương tính với lai Southern, sinh trưởng, phát triển bình thường ở thể hệ T0 được sử dụng tạo cDNA và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R*. Kết quả nhân bản gen chuyển *GmCHI1A* (cDNA) từ mRNA của 5 cây thuốc lá chuyển gen cho thấy cả 5 lần điện di đều có băng DNA với kích thước khoảng 0,67 kb (Hình 3.19A). Kết quả này đã minh chứng gen chuyển *GmCHI1A* biểu hiện phiên mã tổng hợp mRNA.



Hình 3.19. A- Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR nhân gen *GmCHI1A* (cDNA) từ mRNA của 5 cây thuốc lá chuyển gen ở thể hệ T0.

M: thang DNA 1kb; (+): Plasmid *pBT_GmCHI1A* (đối chứng dương); (-) Cây không chuyển gen (WT-đối chứng âm); 1-5: Các cây thuốc lá chuyển gen ở T0.

B- Kết quả phân tích Western blot các cây thuốc lá chuyển gen thể hệ T0.

(+): Protein HA gắn c-myc; WT: Protein thu từ cây không chuyển gen; 1,2,3,4,5 mẫu protein thu các cây thuốc lá chuyển gen dương tính với lai southern blot

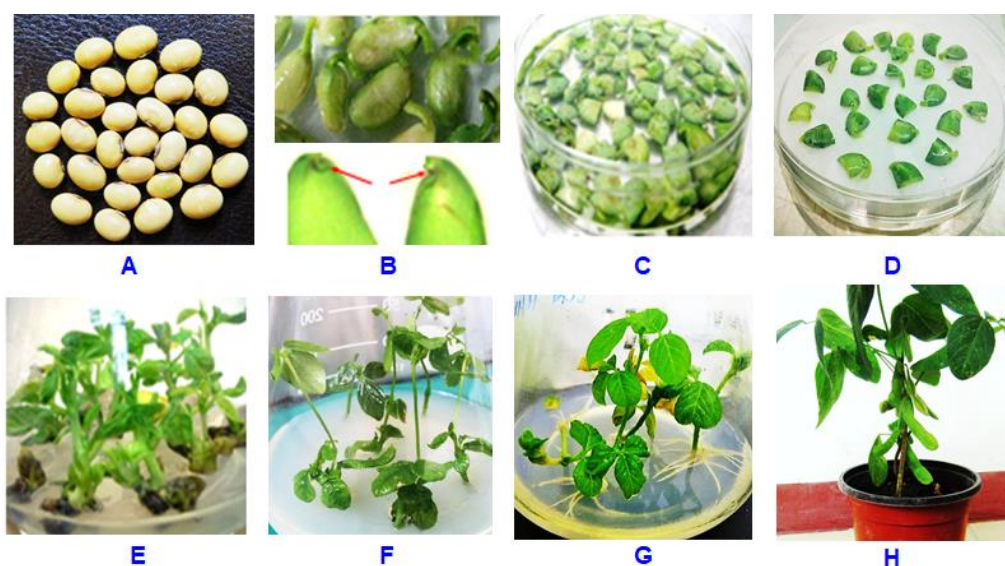
Tuy nhiên, kết quả phân tích Western blot ở hình 3.19.B chỉ thu được 4/5 cây T0 xuất hiện băng protein ứng với kích thước khoảng 25,67 kDa. Như vậy gen chuyển *GmCHI1A* đã dịch mã tổng hợp protein tái tổ hợp rCHI1A ở 4 cây thuốc lá T0 (T01, T03, T04, T05).

Từ các kết quả phân tích trên cây thuốc lá có thể rút ra nhận xét rằng vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* hoạt động tốt trong cây thuốc lá chuyển gen và có thể sử dụng để chuyển vào cây đậu tương và các cây trồng khác.

3.3. PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN *GmCHI1A* TRÊN CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN

3.3.1. Biến nạp cấu trúc *pCB301_GmCHI1A* vào đậu tương thông qua *A.tumefaciens*

Thí nghiệm chuyển cấu trúc *pCB301_GmCHI1A* vào giống đậu tương DT2008 được thực hiện qua 3 lần biến nạp với 390 mảnh lá mầm và tạo cây chuyển gen hoàn chỉnh được trình bày theo hình 3.20. Trong số 390 mẫu được biến nạp có 150 mẫu tạo chồi và chọn được 68 chồi chuyển sang môi trường SEM, bổ sung kháng sinh chọn lọc để kéo dài chồi. 38 chồi được chuyển sang môi trường ra rễ và chọn được 26 cây chuyển gen mang trồng trên trên giá thể. Song song với thí nghiệm chuyển gen, hai lô đối chứng là ĐC0 và ĐC1 cũng được thực hiện với 30 mẫu ở mỗi lô để so sánh. Ở lô ĐC0, lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh, kết quả thu được 16 cây *in vitro* mang trồng trên giá thể. Ở lô ĐC1, lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh bổ sung kháng sinh, kết quả là các lá mầm không tái sinh chồi (Bảng 3.6).



Hình 3.20. Kết quả tạo cây đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* từ giống DT2008 bằng kỹ thuật lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm hạt chín.

A: Hạt đậu tương DT2008 sau khi khử trùng bằng khí clo; B: Lá mầm được gây tổn thương thu từ hạt nảy mầm trên môi trường GM tạo nguyên liệu biến nạp; C: Lá mầm tổn thương ở nách lá ngâm trong dịch khuẩn và lây nhiễm trong 30 phút; D: Đồng nuôi cấy trên CCM ở điều kiện tối trong 5 ngày; E: Cảm ứng tạo đa chồi trên SIM, bổ sung BAP 2 mg/l + kanamycin 50 mg/l; F: Cắt bỏ lá mầm, chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM trong 2 tuần, bổ sung GA₃ 0,5 mg/l + IAA 0,1 mg/l + kanamycin 50 mg/l; G: Ra rễ trên môi trường RM, bổ sung IBA 0,1 mg/l trong 20 ngày; H: Cây chuyển gen trồng trên giá thể có tỷ lệ 1 trấu hun : 1 cát vàng.

Hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như môi trường nuôi cấy *in vitro* vật liệu chuyển gen, vector chuyển gen, thời gian, thao tác của người chuyển gen, hóa chất, thiết bị. Ở thí nghiệm này, hạt đậu tương được nuôi cấy trong môi trường MS từ 3-4 ngày, đây là thời điểm mà lá mầm được tách đôi dễ dàng. Lá mầm được gây tổn thương bằng dao hoặc kim nhọn ở vị trí nách lá giúp cho mẫu sản sinh ra các hợp chất phenolic có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn, làm tăng cường khả năng xâm nhiễm của *A.tumefaciens* vào mô đậu tương. Ngoài ra, tổ hợp các chất có chứa thiol (L-cysteine, dithiothreitol và sodium thiosulfate)

được bổ sung vào môi trường đồng nuôi cấy CCM giúp làm tăng khả năng gắn T-DNA vào hệ gen thực vật và do đó tăng hiệu quả chuyển gen. Bên cạnh đó, kháng sinh kanamycin được dùng như một chất chọn lọc ở giai đoạn tái sinh chồi và giai đoạn ra rễ để tạo ra được cây đậu tương mang gen chuyển.

Bảng 3.6. Kết quả biến nạp cấu trúc *pCB301_GmCHI1A* vào giống DT2008 nhờ *A. tumefaciens* qua nách lá mầm

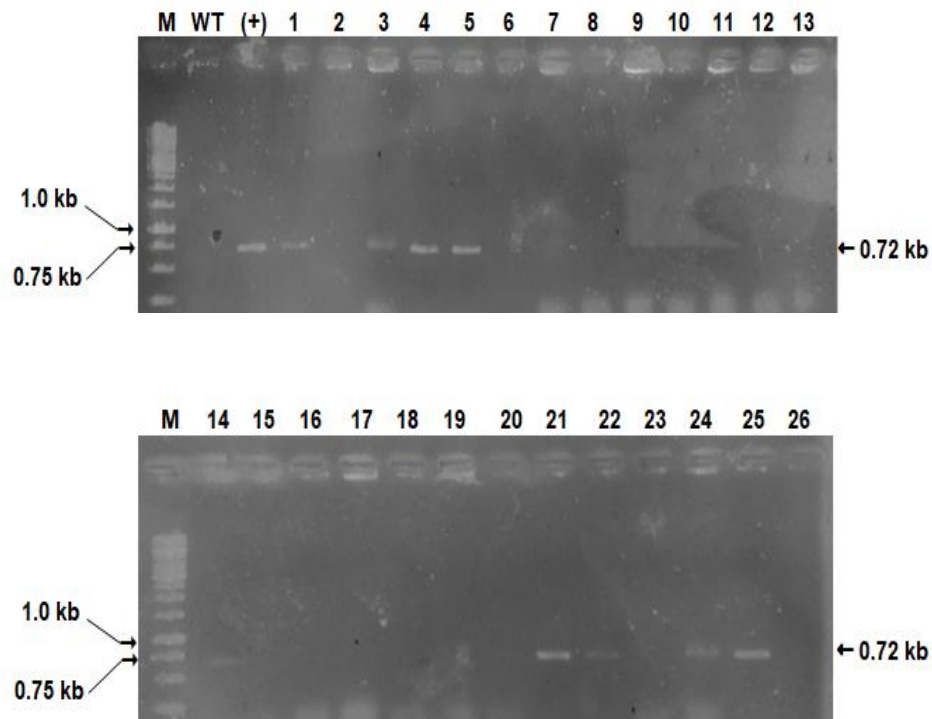
Thí nghiệm và đối chứng		Số lượng mẫu	Số tạo chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây sống trên giá thể
Thí nghiệm	Lần 1	136	52	26	13	10
	Lần 2	128	51	22	12	8
	Lần 3	126	47	20	13	8
Tổng		390	150	68	38	26
ĐC1		30	0	0	0	0
ĐC0		30	22	19	16	16

Ghi chú: *ĐC1*: Mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh. *ĐC01*: Mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

Các cây chuyển gen *in vitro* được chuyển ra trồng trên giá thể trong nhà lưới được ký hiệu là các cây T0. Hạt của các cây T0 nảy mầm thành cây T1 và hạt của các cây T1 nảy mầm thành các cây T2. Kết quả biến nạp cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A_cmyc_polyA* vào mô lá mầm đậu tương và tạo được 26 cây chuyển gen ở thế hệ T0 trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới. Các cây đậu tương T0 tiếp tục phân tích ở các thế hệ T1, T2.

3.3.2. Phân tích sự có mặt và sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* trong cây đậu tương chuyển gen T0

Sử dụng DNA tổng số tách từ lá non các cây đậu tương chuyển gen T0 và các cây đối chứng không chuyển gen cho phản ứng PCR với cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-SacI-R* để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A*. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen chuyển *GmCHI1A* được thể hiện ở hình 3.21.



Hình 3.21. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen chuyển *GmCHI1A* từ các cây đậu tương chuyển gen T0 và các cây đối chứng không chuyển gen.

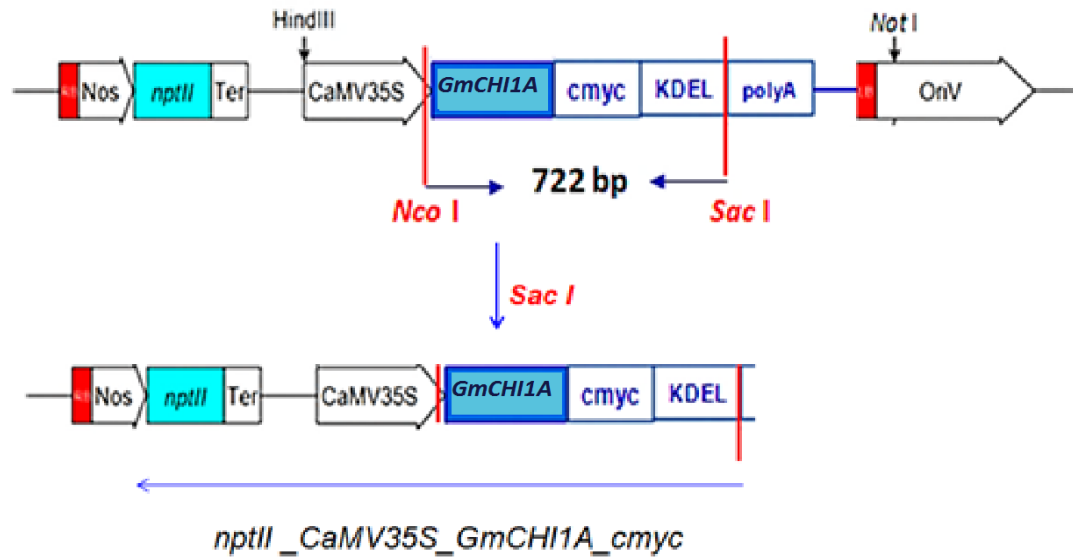
M: thang DNA 1 kb; (+): đối chứng dương-sản phẩm nhân gen *GmCHI1A* từ vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*; WT: kết quả nhân gen *GmCHI1A* từ cây không chuyển gen; 1-26: kết quả nhân gen *GmCHI1A* từ các cây đậu tương chuyển gen

Kết quả ở hình 3.21 cho thấy trên bản gel điện di có 8 làn chạy xuất hiện băng DNA, đó là các làn số 1, 3, 4, 5, 21, 22, 24 và 25 với kích thước khoảng 0,72 kb tương ứng với kích thước của gen chuyển *GmCHI1A*. Các cây đậu tương chuyển gen dương tính với PCR ở thế hệ T0 của giống DT2008 được ký hiệu là T0-1; T0-3; T0-4; T0-5; T0-21; T0-22; T0-24; T0-25. Ở làn điện di phân tích sản phẩm PCR từ DNA của các cây đối chứng không chuyển gen không xuất hiện băng DNA.

Trong cây đậu tương chuyển gen tồn tại hai gen, đó là gen *GmCHI1A* nội sinh có kích thước vùng mã hóa 657 bp và gen chuyển *GmCHI1A* chứa đoạn nucleotide mã hóa peptid c-myc và KDEL với kích thước 722 bp (đã mô tả ở hình 3.14). Sử dụng cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-SacI-R* để PCR nhân đoạn DNA cho kết quả chỉ có băng DNA có kích thước 722 bp, như vậy bước đầu xác nhận được gen chuyển *GmCHI1A* đã hiện diện trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen.

Các cây đậu tương cho kết quả dương tính với PCR được kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* vào hệ gen cây chuyển gen bằng phân tích Southern blot. DNA tổng số tách chiết từ lá của các cây đậu tương chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen được tinh sạch và xử lý bằng enzyme giới hạn *SacI* nhằm thu các đoạn *nptII* _*CaMV35S*_*GmCHI1A*_*cmcy* chứa gen *nptII* và gen *GmCHI1A* (Hình 3.22). Như vậy, nếu xác định được sự có mặt của gen *nptII* đồng thời sẽ xác nhận được gen chuyển *GmCHI1A* hợp nhất vào hệ gen cây đậu tương chuyển gen.

Gen *nptII* được nhân bản từ hệ gen cây đậu tương chuyển gen bằng PCR với cặp mồi *nptII-F / nptII-R*. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0 % và đoạn DNA tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp DNA dò cho kỹ thuật phân tích Southern blot.

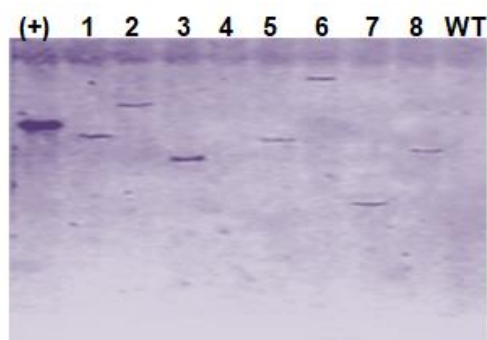


Hình 3.22. Sơ đồ cắt vector *pCB301_GmCHI1A* bởi enzyme *SacI* để tạo cấu trúc *nptII_CaMV35S_GmCHI1A_cmyc*

Sản phẩm cắt DNA từ các cây đậu tương chuyển gen T0-1; T0-3; T0-4; T0-5; T0-21; T0-22; T0-24; T0-25 bằng enzyme *SacI* được điện di trên gel agarose. Bản gel được chuyển sang màng lai và Southern blot được thực hiện. Kết quả phân tích Southern blot được thể hiện ở hình 3.23 cho thấy 7 cây T0 là T0-1, T0-3, T0-4, T0-21, T0-22, T0-24, T0-25 xuất hiện băng DNA, cây T0-5 và cây WT không cho kết quả lai Southern.

Hiệu suất chuyển gen đến thời điểm phân tích Southern blot là $7/390 = 1,79\%$. Sau khi hiện màng, trên màng lai mỗi băng DNA tương ứng với 1 bản copy. Mẫu WT không cho kết quả, chứng tỏ phản ứng lai đặc hiệu, mẫu dò không liên kết với gen nội sinh.

Như vậy, gen chuyển *GmCHI1A* đã hợp nhất vào hệ gen của cây đậu tương. Các dòng chuyển gen T0-1, T0-3, T0-4, T0-21, T0-22, T0-24, T0-25 cho kết quả lai Southern tiếp tục được đánh giá sự sinh trưởng và phát triển, thu hạt phục vụ các thí nghiệm phân tích các dòng cây chuyển gen ở thế hệ gen T1.



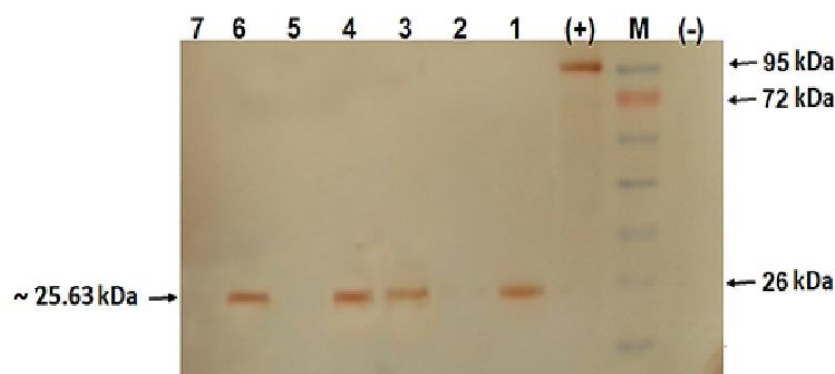
Hình 3.23. Kết quả phân tích Southern blot các cây đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* với đoạn dò *nptII* được đánh dấu bằng biotin.

(+): vector *pCB301-GmCHI*; 1-8: các dòng đậu tương chuyển gen dương tính với PCR (1: T0-1; 2: T0-3; 3: T0-4; 4: T0-5; 5: T0-21; 6: T0-22; 7: T0-24; 8: T0-25); WT: cây đậu tương không chuyển gen.

3.3.3. Phân tích biểu hiện protein CHI1A tái tổ hợp bằng Western blot và ELISA

Hạt của 7 cây chuyển gen T0 (T0-1, T0-3, T0-4, T0-21, T0-22, T0-24, T0-25) được gieo trồng ở từng lô thí nghiệm tương ứng với 7 dòng chuyển gen T1, ký hiệu là T1-1, T1-3, T1-4, T1-21, T1-22, T1-24, T1-25. Đồng thời các dòng đậu tương chuyển gen T1 được sử dụng phân tích sự biểu hiện protein CHI1A tái tổ hợp (ký hiệu là rCHI1A) bằng Western blot và ELISA. Protein tổng số được chiết từ lá đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 và các cây đối chứng không chuyển gen (WT) được sử dụng trong phân tích sự hiện diện của protein rCHI1A bằng kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide và Western blot. Protein rCHI1A trong cây chuyển gen có sự sai khác so với CHI nội sinh trong cây không chuyển gen là có thêm đuôi c-myc ở phía đầu C của chuỗi polypeptide. Do đó, kết quả phân tích Western blot cho phép phát hiện những protein trên màng lai nitrocellulose có mang đuôi c-myc khi gắn kháng thể phù hợp và cho phản ứng màu với cơ chất.

Bảy dòng đậu tương chuyển gen T1 (T1-1, T1-3, T1-4, T1-21, T1-22, T1-24, T1-25) đã được xác nhận gen chuyển *GmCHI1A* hợp nhất vào hệ gen cây đậu tương được tiếp tục phân tích sự biểu hiện của gen chuyển ở mức dịch mã tổng hợp protein. Kết quả phân tích Western blot của protein ở 7 dòng đậu tương chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được thể hiện ở hình 3.24.



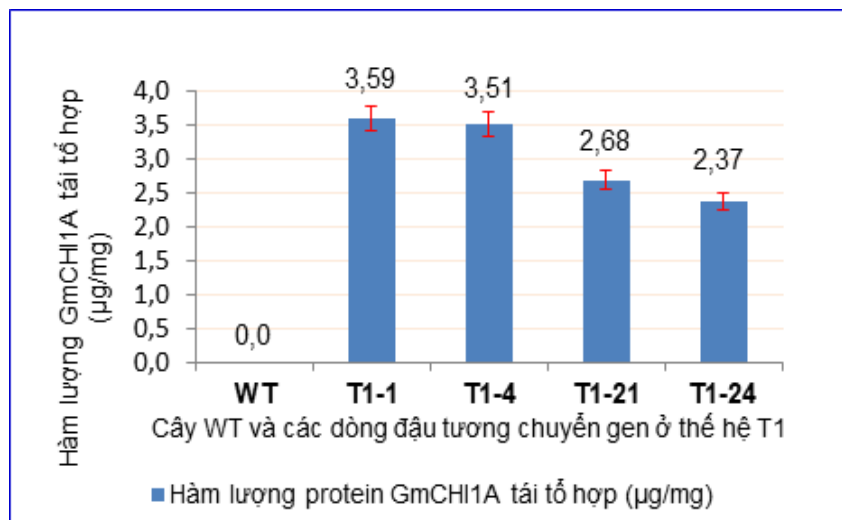
Hình 3.24. Kết quả phân tích Western blot protein từ các cây đậu tương chuyển gen thể hệ T1 và cây không chuyển gen

M: thang protein chuẩn; (+) đối chứng dương là protein HA gắn cmyc; (-) Đối chứng âm là mẫu protein thu từ cây không chuyển gen; 1-7 (T1-1, T1-3, T1-4, T1-21, T1-22, T1-24, T1-25): protein thu các cây đậu tương chuyển gen dương tính với lai Southern blot.

Kết quả ở hình 3.24 cho thấy, trong 7 dòng đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* ở thể hệ T1 có 4 dòng cho kết quả Western blot. Theo tính toán lý thuyết protein tái tổ hợp *GmCHI1A* (rCHI1A) có khối lượng phân tử là 23,98 kD, chuỗi peptide c-myc 1,21 kD và KDEL là 0,44 kD. Như vậy protein tái tổ hợp rCHI1A có khối lượng phân tử là 25,63 kD. Trên màng lai xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 25,63 kD, đó chính là protein tái tổ hợp rCHI1A. Trong số 7 dòng chuyển gen T1 có 4 dòng T1-1, T1-4, T1-21 và T1-24 biểu hiện protein tái tổ hợp rCHI1A. Như vậy, ở thời điểm phân tích sự

biểu hiện protein tái tổ hợp rCHI1A hiệu suất chuyển gen đạt đến thời điểm phân tích Western blot là $4/390 = 1,03\%$.

Kết quả so sánh mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp rCHI1A giữa các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 bằng kỹ thuật ELISA định lượng được thể hiện ở biểu đồ hình 3.25.



Hình 3.25. Hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A của các dòng đậu tương chuyển gen T1-1, T1-4, T1-21, T1-24 và cây đối chứng không chuyển gen (WT) từ phân tích ELISA

Hình 3.25 cho thấy, dòng đậu tương chuyển gen T1-1 có hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A cao nhất (3,59 µg/mg) và dòng T1-24 là thấp nhất (2,34 µg/mg). Hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A được xếp theo thứ tự từ cao đến thấp là T1-1 > T1-4 > T1-21 > T1-24. Như vậy có thể nhận xét rằng gen chuyển *GmCHI1A* được di truyền qua sinh sản hữu tính từ thế hệ T0 sang T1 và đã hoạt động phiên mã và dịch mã tổng hợp protein ở các cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1. Kết quả phân tích hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A trong các dòng đậu tương chuyển gen T1 đã cho thấy hàm lượng enzyme CHI của các dòng chuyển gen cao hơn hẳn cây không chuyển gen. Kết quả này đã chứng minh sự tăng

cường biểu hiện gen *GmCHI1A* trong các dòng đậu tương chuyển gen đã làm tăng hàm lượng protein CHI so với cây đối chứng không chuyển gen.

Từ kết quả biến nạp và chọn lọc cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 và T1, hiệu suất chuyển gen *GmCHI1A* vào đậu tương được thống kê ở bảng 3.7.

Bảng 3.7. Hiệu suất chuyển gen *GmCHI1A* vào giống đậu tương DT2008 ở các giai đoạn phân tích

Số mẫu biến nạp	Thế hệ T0						Thế hệ T1	
	Hiệu suất chuyển gen dựa trên số cây sinh trưởng bình thường trong nhà lưới		Hiệu suất chuyển gen dựa trên kết quả phân tích PCR		Hiệu suất chuyển gen dựa trên kết quả phân tích Southern blot		Hiệu suất chuyển gen dựa trên kết quả phân tích Western blot	
	Số cây sống trên giá thể	%	Số cây thu được sản phẩm PCR	%	Số cây có kết quả lai Southern blot	%	Số dòng có kết quả lai Western	%
390	26	6,67	8	2,05	7	1,79	4	1,03

Trên bảng 3.7, từ 390 mẫu biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* đã thu được 26 cây sinh trưởng và phát triển tốt trong nhà lưới đạt hiệu suất chuyển gen là 6,67%. Kết quả phân tích PCR xác nhận được 8 cây đậu tương chuyển gen dương tính, hiệu suất là 2,05% và 7 cây cho kết quả lai Southern, hiệu suất là 1,79%. Ở thế hệ T1 có 4 dòng đậu tương chuyển gen biểu hiện protein tái tổ hợp rCHI1A, đạt hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn này là 1,03%.

3.3.4. Phân tích hàm lượng daidzein và genistein của các dòng đậu tương chuyển gen

Hạt đậu tương của 4 dòng chuyển gen T1 (T1-1, T1-4, T1-21, T1-24) được trồng và tạo các dòng cây T2 (T2-1, T2-4, T2-21, T2-24). Bốn dòng T2 sinh

trưởng và phát triển bình thường, ra hoa, kết quả. Mầm hạt của 4 dòng chuyển gen ở thế hệ T2 (T2-1, T2-4, T2-21, T2-24) được sử dụng phân tích hàm lượng daidzein và genistein, kết quả phân tích được trình bày ở bảng 3.8.

Bảng 3.8. Sự thay đổi hàm lượng daidzein và genistein ở giai đoạn hạt nảy mầm của các dòng đậu tương chuyển gen so với các cây không chuyển gen

Cây WT và các dòng chuyển gen	Hàm lượng daidzein và genistein				
	Daidzein ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô)	Tăng so với WT (%)	Genistein ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô)	Tăng so với WT (%)	Tổng daidzein và genistein ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô)
WT	$253,05^a \pm 3,60$	100,00	$113,11^A \pm 1,78$	100,00	366,16
T2-1	$473,79^d \pm 9,63$	187,23	$524,64^D \pm 4,27$	463,93	998,43
T2-4	$457,07^c \pm 18,14$	180,62	$467,66^C \pm 17,97$	413,46	870,53
T2-21	$447,92^c \pm 14,87$	177,01	$499,72^C \pm 15,95$	441,80	947,64
T2-24	$421,22^b \pm 8,91$	166,46	$373,00^B \pm 9,82$	329,77	750,99

Ghi chú: Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số trung bình ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$); Các chữ cái giống nhau trong cùng 1 cột cho biết không có sự khác biệt. Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột biểu thị sự khác biệt đáng kể theo phép thử Duncan với $P < 0,05$.

So với đậu tương không chuyển gen (WT), bảng 3.8 cho thấy hàm lượng daidzein và genistein trong mầm hạt của các dòng đậu tương chuyển gen T2-1, T2-4, T2-21, T2-24 đều cao hơn và hàm lượng daidzein của các dòng chuyển gen tăng từ 166,46% đến 187,23%; hàm lượng genistein tăng từ 329,80% đến

463,93%. Dòng T2-1 có hàm lượng daidzein và genistein cao nhất, daidzein là 473,79 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô), genistein là 524,64 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô). Hai dòng T2-4 và T2-21 có hàm lượng daidzein và genistein sai khác không đáng kể. Dòng T2-24 có hàm lượng daidzein là 421,22 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô) và genistein là 373,00 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô). Trong khi đó mầm hạt của các cây không chuyển gen có hàm lượng daidzein là 253,05 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô) và genistein là 113,11 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng khô). Sự khác biệt được phân tích theo kiểm định Duncan với $P < 0,05$.

Kết quả phân tích hàm lượng daidzein và genistein của 4 dòng đậu tương chuyển gen T2 đã cung cấp thông tin về mối liên quan giữa sự biểu hiện quá mức của gen *GmCHI1A* với sự thay đổi hàm lượng isoflavone trong cây đậu tương chuyển gen.

3.4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.4.1. Enzyme CHI và hoạt động của gen *CHI*

Ở thực vật bậc cao, CHI xúc tác cho các phản ứng trong con đường phenylpropanoid để tạo ra các sản phẩm isoflavonoid, flavonoid, anthocyanin [77]. CHI tham gia phản ứng từ isoliquiritigenin tạo thành liquiritigenin và từ naringenin chalcone tạo thành naringenin. Liquiritigenin là tiền chất chuyển hóa tổng hợp glycitein và daidzein, naringenin là tiền chất chuyển hóa thành genistein, flavonoid, anthocyanin. Từ con đường phenylpropanoid đã tạo ra một loạt các sản phẩm tự nhiên, trong đó chalcone isomerase là một enzyme quan trọng xúc tác cho các phản ứng tổng hợp flavanone là tiền đề tổng hợp flavonoid và isoflavonoid [30].

Hoạt động của CHI trong con đường phenylpropanoid đã thu hút nhiều nghiên cứu về định hướng tăng hàm lượng flavonoid ở thực vật bằng các kỹ thuật tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme CHI. Theo hướng chuyển gen

CHI từ loài này sang loài khác, Li và cs (2006) đã thông báo về sự tăng cường biểu hiện protein *SmCHI* tái tổ hợp từ loài *S. medusa* đã làm tăng hàm lượng flavonoid tổng số ở cây thuốc lá lên 5 lần so với các cây không chuyển gen [62]. Protein *PsCHI1* tái tổ hợp từ cây hoa mẫu đơn biểu hiện ở thuốc lá đã làm tăng hàm lượng flavonol và flavone ở cây chuyển gen T1 gấp 3 lần so với cây không chuyển gen [64]. Cũng bằng kỹ thuật chuyển gen *CHI* của cây Dạ yến thảo vào cà chua, kết quả đã tạo được các cây cà chua chuyển gen có hàm lượng flavonol tăng đến 78 lần trong vỏ quả so với cây không chuyển gen [70]. Như vậy các nghiên cứu này đều cho thấy, chuyển gen *CHI* từ loài này sang loài khác đã làm tăng hàm lượng các loại flavonoid ở cây chuyển gen.

Theo Dastmalchi và Dhaubhadel (2015) hệ gen đậu tương có 4 phân họ với 12 gen *GmCHI*, trong đó phân họ II có ba gen *GmCHI* được gọi là CHI loại II gồm *GmCHI1A*, *GmCHI1B1*, *GmCHI1B2* [30]. Gen *GmCHI1A* ở đậu tương thuộc CHI loại II có bốn exon và ba intron nằm trên nhiễm sắc thể số 20 đã được chứng minh là có chức năng tham gia vào chuỗi phản ứng tổng hợp isoflavonoid ở hạt đậu tương [30]. Trên GenBank hiện có 8 gen *GmCHI1A* được công bố, trong đó có 4 trình tự *GmCHI1A* do chúng tôi phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam mang các mã số LT594994.1, LT594995.1, LT594993.1, LT594996.1 và được GenBank xác định thuộc CHI loại II nằm trên nhiễm sắc thể số 20 của đậu tương [132], [133], [134], [135]. Vùng mã hóa của gen *GmCHI1A* có 657 nucleotide, mã hóa cho 218 amino acid phân lập được từ bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT84, DT2008 phù hợp với các công bố của Ralston và cs (2005), Chiu và cs (2001), Chung và Nam (2007), Dastmalchi và Dhaubhadel (2019) [87],[141], [131], [135].

Gen *GmCHI1A* của cây đậu tương mã hóa protein enzyme CHI1A là một trong hai enzyme chìa khóa tham gia vào quá trình tổng hợp flavonoid và isoflavonoid trong con đường phenylpropanoid. Ở cây đậu tương, hoạt động của gen *GmCHI1A* mạnh nhất ở các mô đang trong giai đoạn sinh trưởng mạnh, như

mầm hạt trong giai đoạn nảy mầm, do vậy lựa chọn promoter điều khiển hoạt động của gen chuyển *GmCHI1A* là rất quan trọng. Promoter *CaMV35S* (35S) là một promoter mạnh có nguồn gốc từ virus gây bệnh khảm lá súp lơ (*Cauliflower Mosaic Virus - CaMV*). Promoter 35S có thể khởi động phiên mã cho gen trong tất cả các loại mô bào thực vật. Trong nghiên cứu của chúng tôi, promoter 35S được lựa chọn và là thành phần của cấu trúc mang gen chuyển (*35S_GmCHI1A_cmyc*) trong vector chuyển gen pCB301. Trong vector *pCB301_GmCHI1A*, promoter *CaMV35S* khởi động phiên mã của gen chuyển *GmCHI1A*, làm tăng tổng hợp enzyme CHI trong cây đậu tương chuyển gen.

Trong vector chuyển gen, gen *nptII* được lựa chọn làm chỉ thị chọn lọc ở giai đoạn tái sinh *in vitro*. Gen *nptII* mã hóa protein có đặc tính kháng kháng sinh kanamycin. Kanamycin được bổ sung trong cả giai đoạn tái sinh chồi, kéo dài chồi và ra rễ của các cây đậu tương được chuyển gen. Lúc này, cấu trúc mang gen chuyển có thêm đoạn DNA mã hóa kháng nguyên c-myc để làm cơ sở phát hiện và định lượng protein tái tổ hợp rGmCHI trong cây chuyển gen bằng Western blot và ELISA. Có nhiều cặp kháng nguyên - kháng thể được sử dụng cho mục đích chọn tạo cây chuyển gen, tuy nhiên việc gắn đuôi c-myc là một lựa chọn tốt và phù hợp vì tính hiệu quả, phổ biến và kinh tế cho nhiều nghiên cứu hiện nay. Như vậy, có thể thấy việc thiết kế cấu trúc hoàn chỉnh và phù hợp với tế bào chủ trong khâu thiết kế vector chuyển gen là cơ sở bước đầu quyết định sự thành công của kỹ thuật tạo cây đậu tương biến đổi gen.

3.4.2. Cây mô hình trong nghiên cứu chức năng gen

Cây *Arabidopsis thaliana* là hệ thống thực vật mô hình chính trong nhiều thập kỷ qua đã đạt được những tiến bộ to lớn trong nghiên cứu chức năng gen và tạo cây chuyển gen ở thực vật. Đến nay nhiều mô hình thực vật mới đang được đề xuất [24], trong đó có cây thuốc lá, mà chúng tôi sử dụng làm cây mô hình cho việc tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* ở đậu tương. Ngoài những ưu thế

về dễ nuôi cấy *in vitro*, tái sinh và hệ số tái sinh đa chồi cao, thuốc lá còn có hệ số tiếp nhận gen cao. Theo Tepfer (2017) cùng với cây *A. thaliana*, thuốc lá có thể đưa lên Trạm vũ trụ quốc tế để mô phỏng sự chuyển giao sự sống lên hành tinh khác [102].

Thuốc lá được sử dụng làm cây mô hình cho chuyển gen và tăng cường biểu hiện ở đậu tương đã được công bố trong những năm gần đây. Có thể kể đến công trình chuyển gen *GmP5CS* [11], gen *GmEXP1* [12], cấu trúc *RNAi* [15], *HA1* [8], *GmDREB2* [13]. Theo cách tiếp cận này, nghiên cứu của chúng tôi cũng sử dụng thuốc lá làm cây mô hình để chuyển gen *GmCHI1A* trước khi phân tích biểu hiện mạnh ở đậu tương trong mục đích tăng hàm lượng isoflavone. Hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích PCR đối với gen *GmEXP1* là 53,33% [12], của gen *GmDREB2* là 48,33% [13] và trong nghiên cứu của chúng tôi đối với gen *GmCHI1A* là 24,44%. Như vậy có thể thấy rằng hiệu suất biến nạp các gen có nguồn gốc từ đậu tương vào thuốc lá khá cao và phụ thuộc vào từng loại gen. Như vậy, kết quả biểu hiện thành công gen *GmCHI1A* ở cây thuốc lá là cơ sở để tiếp tục thực hiện biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen.

3.4.3. Chuyển gen ở đậu tương và phân tích biểu hiện gen *GmCHI1A*

Cho đến nay, kỹ thuật chuyển gen gián tiếp thông qua *A.tumefaciens* ở đậu tương do Olhoft và cs (2006) đề xuất [76] và được cải tiến phù hợp với điều kiện của nhiều phòng thí nghiệm nên được áp dụng rộng rãi và thu được nhiều kết quả đáng khích lệ [104]. Nghiên cứu của chúng tôi, chuyển gen vào giống đậu tương DT2008 cũng thực hiện theo mô tả của Olhoft và cs (2006), đặc biệt chúng tôi đã cải tiến kỹ thuật trong gây tổn thương lá mầm và chọn thời điểm ra cây đậu tương vào vụ xuân hoặc vụ xuân hè để phù hợp với điều kiện khí hậu Việt Nam. Trong phân tích cây đậu tương chuyển gen, các nghiên cứu thường sử dụng kỹ thuật PCR, Southern blot, Western blot [12], [13]. Các kỹ thuật này cũng được chúng

tôi áp dụng để phân tích gen chuyển *GmCHI1A* ở các cây đậu tương chuyển gen. Ở thế hệ cây chuyển gen T0, PCR và Southern blot được sử dụng để kiểm chứng sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* vào hệ gen cây đậu tương. Để đánh giá sự biểu hiện gen *GmCHI1A* và sự có mặt của protein tái tổ hợp rCHI1A ở trong cây chuyển gen ở thế hệ T1, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Western blot và ELISA. Hiện nay một kỹ thuật mới, Real time RT-PCR đã được nhiều nghiên cứu áp dụng trong phân tích sự biểu hiện gen chuyển ở mức phiên mã [12]. Kết quả phân tích Real time RT-PCR cung cấp thông tin về sự hoạt động phiên mã và đánh giá được mức độ phiên mã của gen chuyển trong cây chuyển gen, điều này sẽ rút ngắn thời gian phân tích, tăng hiệu quả nghiên cứu chức năng gen. Tuy nhiên, trong mục đích tạo dòng chuyển gen phục vụ chọn giống cây trồng có sự cải thiện một số đặc tính sinh học lại khó có thể đánh giá được. Bên cạnh đó, trong tế bào có cơ chế RNA interference (RNAi) mà khi hoạt động sẽ làm bất hoạt gen sau phiên mã. Vì thế khi xác định được gen chuyển phiên mã nhưng vẫn chưa thể có thông tin gen chuyển có được dịch mã hay không. Mặt khác, cơ chế RNAi ức chế biểu hiện gen bằng cách phân hủy mRNA và ức chế dịch mã của ribosome, vì vậy quá trình dịch mã tổng hợp protein không xảy ra và không có sản phẩm biểu hiện của gen chuyển. Chính vì vậy, theo chúng tôi, khi phân tích cây chuyển gen trong mục đích tạo dòng làm vật liệu chọn giống cần kết hợp kỹ thuật phân tích Real time RT-PCR và Western blot.

Chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* thông qua lây nhiễm ở nách lá mầm tổn thương đã được nhiều tác giả thực hiện thành công ở đậu tương. Kỹ thuật gây tổn thương được các tác giả Olhoft và cs (2001) [75], Xue và cs (2006) [117], Zhang và cs (1999) [120]. Các tác giả đều cho rằng, thao tác khéo léo trong gây tổn thương lá mầm hạt đậu tương sẽ tạo đủ mô đích cho sự xâm nhiễm của *A.tumefaciens*. Khi gây tổn thương nách lá mầm có thể sử dụng bàn chải làm từ thép không gỉ để tạo các vết thương, hoặc có thể sử dụng kim nhọn, dao để gây tổn thương lá mầm [124]. Trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng kim châm

kết hợp với dao nhọn để tạo các vết thương ở nách lá mầm nhằm tăng khả năng tiếp nhận gen khi biến nạp. Nhiều nghiên cứu chuyển gen gián tiếp ở đậu tương bằng lây nhiễm *A.tumefaciens* qua nách lá mầm đã được công bố. Đó là nghiên cứu của Donaldson và Simmonds (2000) [33], Olhofs và cs (2001) [75], Paz và cs (2006) [82], Trần Thị Cúc Hòa (2007) [9], Nguyễn Thị Thúy Hương (2011) [11], Nguyễn Thu Hiền (2012) [8], Lò Thị Mai Thu (2014) [15], Lò Thanh Sơn [12] và Đào Xuân Tân [13]. Các tác giả đều khẳng định, mức độ hình thành chồi ở nách lá mầm không những phụ thuộc vào kỹ thuật gây tổn thương nách lá mầm, mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của kiểu gen cây đậu tương.

Về hiệu suất chuyển gen ở đậu tương, các nghiên cứu đều thu được kết quả thường không cao. Hiệu suất chuyển gen *P5CS* vào giống đậu tương DT84 đạt 0,24% [11], hiệu suất chuyển gen *HA1* có nguồn gốc từ virus H5N1 vào giống đậu tương DT12 đạt hiệu suất 1,23% [8], hiệu suất chuyển cấu trúc RNAi vào giống đậu tương DT12 là 1,35%, vào giống DT2008 là 2,24% [15], chuyển gen *GmEXP1* vào giống đậu tương DT84 đạt tỷ lệ 0,53% [12], chuyển gen *GmDREB2* vào giống DT84 đạt 2,64% [13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hiệu suất chuyển gen *GmCHI1A* vào giống DT2008 ở giai đoạn phân tích PCR đạt 2,05%, giai đoạn phân tích Southern blot đạt 1,79%, giai đoạn phân tích Western blot đạt 1,03%. Như vậy có thể nhận xét rằng hiệu suất chuyển gen qua lây nhiễm *A.tumefaciens* vào nách lá mầm đậu tương phụ thuộc vào loại gen chuyển và kiểu gen của giống đậu tương.

Ralston và cs (2005) đã phân tích biểu hiện cả *GmCHI* loại I và loại II ở nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) đã có nhận xét là các enzyme CHI loại II cùng tồn tại với một isoflavone synthase và các chất chalcone khác được thêm vào môi trường nuôi cấy đã được chuyển đổi thành isoflavanone và isoflavone [87]. Trong nghiên cứu của Vũ Thị Như Trang và cs đã chuyển gen *GmCHI* loại II của đậu tương vào cây Sâm đất (*Talinum paniculatum*) đã tạo được hai dòng chuyển gen ở thế hệ T1. Kết quả khảo sát các dòng chuyển gen hàm lượng

flavonoid tổng số tăng lên từ 4,8 -7,4 lần so với cây không chuyển gen [112]. Khi khảo sát nhiều loại cây được liệu quý, thấy không có enzyme CHI loại II và không tồn tại nhánh tổng hợp isoflavone trong con đường phenylpropanoid, do vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi là cơ sở cho việc bổ sung enzyme CHI loại II từ cây họ Đậu vào các cây được liệu bằng kỹ thuật chuyển gen để thu nhận isoflavone.

Theo một hướng nghiên cứu về mối liên hệ giữa enzyme *GmCHI* với nấm gây bệnh thối rễ, thân ở đậu tương, Zhou và cs (2018) tìm thấy *GmCHI1A* có hàm lượng cao nhất ở rễ đậu tương và định vị ở mạng lưới nội chất. Sự biểu hiện quá mức của gen *CHI* trong rễ đậu tương đã làm giảm tích lũy sinh khối, giảm sự nảy mầm của bào tử và giảm sự tổn thương do nấm *Phytophthora sojae*. Những kết quả này đã chứng minh rằng *GmCHI1A* đóng vai trò tích cực trong phản ứng của đậu tương đối với *G. Sojae* [122]. Theo hướng tiếp cận tăng thu nhận isoflavone trong mầm hạt đậu tương, trong nghiên cứu này chúng tôi đã biểu hiện thành công gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương với sự điều khiển của promoter CaMV35S. Các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 (T1-1, T1-4, T1-21 và T1-24) có hàm lượng protein tái tổ hợp *GmCHI1A* từ 2,37-3,59 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Hạt của bốn dòng chuyển gen T1-1, T1-4, T1-21 và T1-24 cho nảy mầm và tạo được bốn dòng chuyển gen T2 (T2-1, T2-4, T2-21, T2-24) và mầm đậu tương T2 được phân tích hàm lượng daidzein và genistein. Kết quả phân tích bằng HPLC cho thấy, trong 100 g mầm đậu tương thu được 35,28 - 47,37 mg daidzein, tăng từ 1,39 - 1,87 lần so với mầm đậu tương không chuyển gen và 37,30 - 52,47 mg genistein, tăng từ 3,3- 4,64 lần so với đối chứng. Hàm lượng isoflavone (daidzein + genistein) của bốn dòng chuyển gen dao động từ 72,58 - 99,83 mg/100 g mầm, trong khi đối chứng không chuyển gen là 36,66 mg/100 g mầm. Như vậy, biểu hiện mạnh gen *GmCHI1A* ở đậu tương làm tăng hoạt độ của enzyme CHI và tăng sự tích lũy liquiritigenin và naringenin. Cùng với sự tham gia enzyme IFS làm tăng hàm lượng isoflavone và các flavonoid khác trong cây chuyển gen.

Thông tin kết quả phân tích isoflavone từ hạt khô của các giống đậu tương đại Hàn Quốc của Tsukamoto và cs (2018) đã cho thấy hàm lượng isoflavone tổng số dao động từ 50 mg/100g đến 551 mg/100 g hạt, trung bình 278 mg/100g. Trong đó hàm lượng genistin cao nhất (139,3 mg/100g, tiếp đến daidzin (93,9 mg/100 g) và thấp nhất là glycitin (25,0 mg/100 g) [108]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, dấu hiệu đáng chú ý là mầm của các dòng chuyển gen có hàm lượng genistein tăng so với mầm không chuyển gen và cao hơn hàm lượng daidzein. Isoflavone là sản phẩm tự nhiên quan trọng có thể sử dụng chăm sóc và bảo vệ sức khỏe con người [50]. Năm 1987, các nhà nghiên cứu đã khám phá ra genistein là loại chất ức chế protein-tyrosine kinase (PTK) tự nhiên. Sự ức chế PTK dẫn đến sự ức chế quá trình sản xuất leukotrien- là các sản phẩm của hiện tượng viêm, và hậu quả kéo theo sự kích thích tăng trưởng của khối u. Những nghiên cứu *in vitro* thấy rằng xử lý trước các dòng tế bào ung thư với genistein đã ức chế hoàn toàn sự sản xuất leukotrien [19]. Genistein có trong đậu tương là dược chất quý hiếm có khả năng chống oxy hóa, sản sinh ra lượng collagen đáng kể và phòng ngừa ung thư vú ở phụ nữ, ung thư tuyến tiền liệt ở nam giới và một số bệnh ung thư khác như ung thư kết tràng, ung thư phổi, ung thư da và ung thư máu [83]. Vì vậy, việc tạo ra dòng đậu tương có hàm lượng genistein cao có ý nghĩa thực tiễn trong công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Lần đầu tiên gen *GmCHI1A* được biến nạp và biểu hiện thành công ở cây đậu tương và đã làm tăng hàm lượng enzyme *GmCHI1A*. Mầm của các dòng đậu tương chuyển gen T2 có hàm lượng daidzein tăng từ 166,46% đến 187,23%, genistein tăng từ 329,80%-463,93% so với cây không chuyển gen. Đáng chú ý các dòng chuyển gen có hàm lượng genistein cao và tăng so với đối chứng không chuyển gen từ 3,3- 4,64 lần. Các dòng đậu tương chuyển gen T2-1, T2-4, T2-21, T2-24 có hàm lượng daidzein và genistein cao đã được chọn lọc để tiếp tục đánh giá ở các thế hệ sau.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Hàm lượng daidzein, genistein trong mầm hạt của năm giống đậu tương DT26, DT51, DT90, DT84 và DT2008 đã được khảo sát. Trong đó, giống đậu tương DT26 có hàm lượng daidzein, genistein cao nhất (64,27 mg/100g mầm), và hàm lượng thấp nhất ở giống DT2008. Vùng mã hóa của gen *GmCHI1A* phân lập từ mRNA của cây đậu tương có kích thước 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid.
2. Vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* chứa gen *GmCHI1A* và promoter CaMV35S được thiết kế và biến nạp thành công vào cây thuốc lá. Gen chuyển *GmCHI1A* được xác nhận đã hợp nhất vào hệ gen cây thuốc lá thông qua phân tích Southern blot, đã biểu hiện tạo protein tái tổ hợp rGmCHI1A ở các cây thuốc lá chuyển gen.
3. Gen chuyển *GmCHI1A* được biến nạp thành công vào giống đậu tương DT2008 bằng kỹ thuật lây nhiễm *A.tumefaciens* tái tổ hợp qua rách lá mầm, đã tạo được 26 cây đậu tương chuyển gen T0. Trong số đó, gen chuyển đã hợp nhất vào hệ gen đậu tương DT2008 và 4 cây đậu tương chuyển gen T1 nhận được từ T0 đã biểu hiện sản phẩm protein tái tổ hợp, hiệu suất chuyển gen đạt 1,03%.

Sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI1A* đã làm tăng hàm lượng enzyme CHI1A ở mầm và làm tăng hàm lượng daidzein từ 166,46% đến 187,23%, genistein từ 329,80%-463,93% so với cây không chuyển gen. Bốn dòng đậu tương chuyển gen T2-1, T2-4, T2-21, T2-24 là những vật liệu để tiếp tục chọn lọc và đánh giá ở các thế hệ sau.

Đề nghị

1. Trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI1A* giữa các giống đậu tương nghiên cứu đã phát hiện ra những sai khác. Đặc biệt là ở giống đậu tương ĐT26 có hàm lượng isoflavone khá cao. Do không nằm trong phạm vi nghiên cứu của luận án nên chưa xác định được những sai khác này có liên quan gì đến hàm lượng isoflavone hay không. Vì vậy, cần tiếp tục nghiên cứu để làm sáng tỏ thêm mối liên quan có thể có giữa các sai khác trong trình tự của gen này ở giống ĐT26 với hàm lượng isoflavone cao mà nó đã tạo ra.
2. Các dòng cây đậu tương chuyển gen T2-1, T2-4, T2-21, T2-24 có thể sử dụng làm vật liệu phục vụ chọn giống đậu tương, cho nên cần được tiếp tục phân tích ở các thế hệ tiếp theo để chọn tạo được dòng đậu tương có hàm lượng isoflavone cao và ổn định.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Huu Quan Nguyen, Thi Hong Trang Le, Thi Ngoc Lan Nguyen, Thu Giang Nguyen, Danh Thuong Sy, Quang Tan Tu, Thi Thu Thuy Vu, Van Son Le, Hoang Mau Chu, Thi Kim Lien Vu (2020), “Overexpressing GmCHI1A increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds“, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-020-10076-x>; (SCIE, Q2).
2. Lê Thị Hồng Trang, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Hữu Quân (2019), “Chuyển gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: Một mô hình cho tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 207(14), tr. 195-200.
3. Lê Thị Hồng Trang, Hồ Mạnh Tường, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2018) “Thiết kế vector chuyển gen mang gen *GmCHI* phân lập từ cây đậu tương”, *Proceedings Hội nghị CNSH toàn quốc 2018*, Nxb Khoa học tự nhiên Công nghệ tr. 83-87.
4. Lê Thị Hồng Trang, Trần Thị Thanh Vân, Hồ Mạnh Tường, Phạm Thanh Tùng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2016), “Đặc điểm của gen *GmCHI* phân lập từ các giống đậu tương khác nhau về hàm lượng isoflavone”, *TAP CHI SINH HOC* 38(2), tr. 236-242.

Các trình tự gen đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế

1. Le,T.H.T., Ho,T.M., Hoang,H.P., Le,S.V. and Chu,M.H.(2016), “*Glycine max* mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase(CHI) gene), cultivar DT26”, *GenBank*: LT594994.1.
2. Le,T.H.T., Ho,T.M., Hoang,H.P., Le,S.V. and Chu,M.H.(2016), “*Glycine max* mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase (CHI) gene), cultivar DT51”, *GenBank*: LT594995.1.
3. Le,T.H.T., Ho,T.M., Hoang,H.P., Le,S.V. and Chu,M.H.(2016), “*Glycine max* mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase (CHI) gene), cultivar DT84”, *GenBank*: LT594993.1.
4. Le,T.H.T., Ho,T.M., Hoang,H.P., Le,S.V. and Chu,M.H.(2016), “*Glycine max* mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase (CHI) gene), cultivar DT2008”, *GenBank*: LT594996.1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ Y tế, Viện Dinh dưỡng, *Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam* (2007), Nxb Y học
2. Tâm Diệu (2001), *Đậu nành nguồn dinh dưỡng tuyệt hảo*, Nxb TP. Hồ Chí Minh
3. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào (1999), *Cây Đậu Tương*, Nxb Nông Nghiệp
4. Trần Quốc Dung, Nguyễn Hoàng Lộc, Trần Thị Lệ (2006), *Công nghệ chuyển gen*, NXB Đại học Sư phạm, Huế
5. Nguyễn Tiến Dũng, Ngô Xuân Bình (2011), “Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của một số giống đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr.) của Việt Nam thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*”, *Kỷ yếu Hội nghị khoa học tuổi trẻ toàn quốc 2011*, tr. 338-343
6. Trần Văn Điền (2007), *Giáo trình cây đậu tương*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn (2011), “Nghiên cứu khả năng tái sinh và biến nạp gen qua rách lá mầm của hai giống đậu tương (*Glycine max* L.) ĐT12 và DT84 bằng *Agrobacterium*”, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(38), tr. 1305-1310.
8. Nguyễn Thu Hiền (2013) “*Nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein bề mặt của virus H5N1 vào cây đậu tương phục vụ sản xuất vaccine thực vật*“, Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên
9. Trần Thị Cúc Hòa (2007) “Nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam” *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 18, tr. 9 - 14.
10. Nguyễn Thị Thúy Hường, Trần Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2009), “Phát triển hệ thống tái sinh

- invitro ở cây đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) phục vụ chuyển gen”, *Tạp chí khoa học và công nghệ* Đại học Thái Nguyên, 52(4), tr. 82-88.
11. Nguyễn Thị Thúy Hương (2011) “*Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam*“, Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên
 12. Lò Thanh Sơn (2015), “*Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen GmEXPI liên quan đến sự phát triển bộ rễ của đậu tương*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Đại học Thái Nguyên
 13. Đào Xuân Tân (2017), “*Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen GmDREB2 nhằm cải thiện tính chịu hạn của cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)*. Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên.
 14. Phạm Văn Thiều (2008), *Cây đậu Tương - Kỹ thuật trồng và chế biến sản phẩm*, Nxb Nông nghiệp.
 15. Lò Thị Mai Thu, Lê Hồng Trang, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2014), “Nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen kháng soybean mosaic virus và bean yellow mosaic virus“ *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*. Đại học Thái Nguyên, 4(118), tr.111-115.
 16. Vũ Thị Như Trang (2018), “*Nghiên cứu nuôi cấy invitro và biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp flavonoid ở cây Thổ nhân sâm (Talinum paniculatum Gaertn)*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Đại học Thái Nguyên.
 17. Phan Lê Tư, Tôn Bảo Linh, Nguyễn Vũ Phong (2018), “Đánh giá khả năng tái sinh và chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* ở một số giống đậu nành, *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp*, 1, tr. 8-16

Tài liệu tiếng Anh

18. Akitha Devi MK , Sravan Kumar S , Giridhar P (2018), LC-ESI-MS based characterisation of isoflavones in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) from India., *Journal of Food Science and Technology*. 55(12), pp.5045-5054

19. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987), Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 262(12): 5592-5595.
20. Arijmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC (1996), "Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis", *Journal Nutrition*, 126, pp.161-167
21. Bramley P M, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH (2000), "Vitamin E", *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 80, pp. 13-938
22. Cahoon EB., Ripp KG, Hal SE, McGonigle B (2002), "Transgenic production of epoxy fatty acids by expression of a cytochrome P450 enzyme from *Euphorbia lagascae* seed", *Plant Physiology.*, 128, pp. 615-624
23. CERA (2010), *GM Crop Database*. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation; Washington D.C.
24. Chang CL John, Bowman M Elliot, Meyerowitz (2016), "Field Guide to Plant Model Systems", *Cell*, 167(2), pp. 325-339.
25. 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), pp. 387-395
26. Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA (2004), "Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability", *Plant Molecular Biology*, 56, pp. 895-904.
27. Chigen T, Muhammad AN, Ayaka K, Bao L, Jeong DL, Eunho S, Seung HY, Cemal K, Faheem SB, Gyuhwa C (2018), "Isoflavone profile diversity in Korean wild soybeans (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.)", *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42, pp.248-261

28. Clemente TE, Cahoon EB (2009), "Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content", *Plant Physiology*, 151(3), pp.1030-40.
29. Costa MA, Bedgar DL, Moinuddin SGA, Kin KW, Cardenas CL, Cochrane FC, Shockey JM, Helms GL, Amakura Y, Takahashi H (2005), "Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate: CoA ligase network in Arabidopsis: Syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation", *Phytochemistry*, 66, pp. 2072-2091.
30. Dastmalchi M, Dhaubhadel S, (2015), "Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family", *Planta*, 241(2), pp. 507-523
31. De Ronde JA, WA Cress, GHJ Kruger, RJ Strasser, and J van Staden (2004), "Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress", *Journal of Plant Physiology*, 161, pp.1211-1224.
32. Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R, Gijzen M (2003), "Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds", *Plant Molecular Biology*, 53(6), pp. 733-743.
33. Donaldson PA, Simmonds DH (2000), "Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean", *Plant Cell Reports.*, 19, pp. 478-484.
34. Dong X, Braun EL, Grotewold E, (2001). "Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes". *Plant Physiology*, 127, 46-57
35. FAO/WHO (1990), *Expert consultation on protein quality evaluation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

36. Ferrer JL., Austin MB., Stewart CJ., Noel JP., (2008), Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, *Plant Physiology Biochemistry*, 46(3), pp.356-70
37. Food Safety Commission Novel, Foods Expert Committee, 5/2006, Fundamental Concepts in the Safety Assessment of Foods Containing Soy Isoflavones for the purpose of Specified Health Use
38. Grażyna Szymczak, Magdalena Wójciak-Kosior, Ireneusz Sowa, Karolina Zapala, Maciej Strzemski, Ryszard Kocjan (2017), Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa, *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, pp. 40-48
39. Guo D, Gao Y, Liu F, He B, Jia X, Meng F, Zhang H, Guo M (2019), “Integrating molecular characterization and metabolites profile revealed CtCHI1's significant role in *Carthamus tinctorius* L.”, *BMC Plant Biology*, 19(1), pp. 376
40. Gurdon C, Poulev A, Armas I, Satorov S, Tsai M, Raskin I (2019), “Genetic and Phytochemical Characterization of Lettuce Flavonoid Biosynthesis Mutants” ,*Scientific Reports*, 9(1), pp. 3305
41. Gutha LR, Casassa LF, Harbertson JF, Naidu RA (2010), “Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves ”, *BMC Plant Biology*, 23(10), pp. 187-196.
42. Gutierrez-Gonzalez JJ, Guttikonda SK, Tran LS, Aldrich DL, Zhong R, Yu O, Nguyen HT, Sleper DA, (2010), “Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits”, *Plant Cell physiol*, 51(6), pp. 936-948
43. Hammond EG, Johnson LA, Su C, Wang T, White PJ (2005), Composition of Soybean: Soybean Oil, *Iowa State University*, pp. 579
44. Hany ES (2011), *Soybean and health*, Agricultural and biological sciences

45. Homrich MS, Wiebke-Strohm B, Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH (2012), "Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants", *Genetic and Molecular Biology*, 35(4), pp. 998-1010.,
46. Hoppe PP, Krennrich G (2000), "Bioavailability and potency of natural source and all-racemic α -tocopherol in the human: a dispute", *European Journal of Nutrition*, 39, pp. 183-193.
47. Huilan Chen, Philippe Seguin, Suha Jabaji, Wucheng Liu (2011), "Spatial distribution of isoflavones and isoflavone-related gene expression in high- and low-isoflavone soybean cultivars", *Canadian Journal of Plant Science*, 91(4), pp.697-705
48. Hui Wang, Tangjin Hu Jianzi Huang, Xiang Lu, Baiqu Huang, Yizhi Zheng (2013), "The Expression of *Millettia pinnata* Chalcone Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* Salt-Sensitive Mutants Enhances Salt-Tolerance", *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), pp.8775-8786.
49. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000), "Soy isoflavone aglucones are absorbed faster and in higher amounts than their glycosides in humans", *The Journal of Nutrition*, 130, pp. 1695-1699.
50. Jiang Fu, Wenguang Jing, Weihao Wang, Sha Chen, Jun Zhang, An Liu (2015), "A Novel and Effective Chromatographic Approach to the Separation of Isoflavone Derivatives from *Pueraria lobata*", *Molecules*, 20(3), pp.4238-4253.
51. Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (2000), "Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase", *Nature Structural and Molecular Biology*, 7, pp.786-791

52. Jez JM, Noel JP (2002), "Reaction mechanism of chalcone isomerase pH dependence, diffusion control, and product binding differences", *The Journal of Biological Chemistry*, 277, pp.1361-1369.
53. Jimenez VM, (2001), "Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones", *The Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* , 13, pp. 196-223
54. Jin AK, Seung BH, Woo SJ, Chang YY, Kyung HM, Jae GG, Ill MC, (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), pp.738-744.
55. Kasai M, Kanazawa A (2012), "RNA silencing as a tool to uncover gene function and engineer novel traits in soybean", *Breeding Science*, 61, pp. 468-479.
56. Kim S, Jones R, Yoo K, Pike L (2004), "Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon", *Molecular Genetics and Genomics*, 272, pp.411-419
57. King RA, Bignell CM (2000), "Concentrations of isoflavone phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods", *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, 57, pp. 70 - 78.
58. Kita Y, Hanafy MS, Deguchi M, Hasegawa H, Terakawa T, Kitamura K, Ishimoto M (2009), "Generation and characterization of herbicide-resistant soybean plants expressing novel phosphino-thricin N-acetyltransferase genes", *Breeding Science*, 59, pp.245-251.
59. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T (2019), "Isoflavone", *Molecules*, 24(6), 1076.
60. Kurzer MS (2000), "Hormonal effects of soy isoflavones: Studies in premenopausal and postmenopausal women", *The Journal of Nutrition*, 130, pp. 660-661.

61. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
62. Li F, Jin Z, Qu W, Zhao D, Ma F (2006), "Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco", *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, pp. 455 - 461.
63. Lim W, Li J (2017), "Synergetic effect of the Onion CHI gene on the PAP1 regulatory gene for enhancing the flavonoid profile of tomato skin", *Scientific Report*, 7(1):12377
64. Lin Z, Yan W, Lei R, Qianqian S, Baoqiang Z, Kun M, Xin G (2014), "Overexpression of Ps-CHI1, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 116, pp. 285-295.
65. Lyle R, Senthil S, Michiyo M, Oliver Y, (2005), "Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases", *Plant Physiology*, 137(4), pp. 1375-1388.
66. Maria GC, Miguel PM, Maria TC, Margarida MC (20 07), "The variability of isoflavones in soy seeds and the possibility of obtaining extracts for over the counter tablet preparations that can be standardized", *Industrial Crops and Products*, 26, pp. 85-92.
67. Margine MP, Huixia S, Zibiao G, Zhanyuan Z, Anjan KB, Wang K, (2004), "Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant", *Euphytica*, 136, pp. 167-169.
68. McGloughlin MN, (2008), "Nutritionally improved agricultural crops", *Plant Physiology*, 147(3), pp.939-53.
69. McKhann HI, Hirsch AM (1994), "Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest

- transcript levels occur in young roots and root tips”, *Plant Molecular Biology*, 24(1), pp. 767-777.
70. Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric DVCH, Tunen AJ, Verhoeyen ME (2001), “Overexpression of *petunia* chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols”, *Nature Biotechnology*, 19, pp. 470 - 474.
 71. Nestel P (2003), “Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions”, *Current Opinion in Lipidology*, 14, pp. 3 - 8.
 72. Ngaki MN, Louie GV, Philippe RN, Manning G, Pojer F, Bowman ME, Li L, Larsen E, Wurtele ES, Noel J (2012), “Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis”, *Nature*, 485, pp.530-533.
 73. Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S (2005), “Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene”, *FEBS Letters*, 57, pp.6074-6078.
 74. Norimoto S, Toshio A, Shusei S, Yasukazu N, Satoshi T, Shinichi A, (2003), “A Cluster of Genes Encodes the Two Types of Chalcone Isomerase Involved in the Biosynthesis of General Flavonoids and Legume-Specific 5-Deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*”, *Plant Physiology*, 131(3). pp. 941-951
 75. Olhoft PM, Somers DA (2001), “L-Cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells”, *Plant Cell Reports*, 20, pp. 706-711.
 76. Olhoft PM, Donovan CM, Somers DA (2006) Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. *Methods in Molecular Biology*, 343:385-396.
 77. Oliver Y, Brian MG (2005), “Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis”, *Advances in Agronomy*, 86, pp. 147-190

78. Owens LD, Cress DE (1985), "Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids", *Plant Physiology*, 77, pp.87-94.
79. Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re D, La Vallee BJ, Tinius CN, Rhodes K, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA (1995), "Development, identification, and characterization of aglyphosate-tolerant soybeanline", *Crop Science*, 35, pp.1451-1461.
80. Park SH, Lee CW, Cho SM, Lee H, Park H, Lee J, Lee JH (2018) Crystal structure and enzymatic properties of chalcone isomerase from the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. *Plos one*, 13(2).
81. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F (2014), "Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential", *Steroids*, 90, pp. 13-29
82. Paz B, Riobo P, Soito ML, Gil LV, Norte M, Femadez JJ (2006) "Detection and identification of glycochessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*" *Toxicon*, 48(6), pp. 661-9
83. Perabo FG, Von Löw EC, Ellinger J, Von Rücker A, Müller SC, Bastian PJ (2008), "Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer". *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 11(1), pp. 6-12.
84. Przysiecka Ł, Książkiewicz M, Wolko B, Naganowska B (2015), "Structure, expression profile and phylogenetic inference of chalcone isomerase-like genes from the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) genome", *Plant Science*, 6, 268
85. Qi Q, Huang J, Crowley J, Ruschke L, Goldman BS, Wen L, Rapp WD (2011), "Metabolically engineered soybean seed with enhanced threonine levels: biochemical characterization and seed-specific expression of lysine-insensitive variants of aspartate kinases from the enteric bacterium *Xenorhabdus bovienii*", *Plant Biotechnology*, 9, pp.193-204.

86. Qin WT, Zhang J, Wu HJ, Sun GZ, Yang WY, Liu J (2016), “Effects of drought stress on biosynthesis of isoflavones in soybean seedling”, *The Journal of Applied Ecology*, 27(12), pp. 3927-3934
87. Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, Yu O (2005) “Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases”. *Plant Physiology* 137: 1375-1388
88. Rao SS, Hildebrand D (2009), “Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast SLC1 gene”, *Lipids*, 44, pp. 945-951.
89. Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrpo MC, Nepomuceno AL, Ida EI (2007), “Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(1), pp. 19-24.
90. Saghai-Maroo MA, KM Soliman, RA Jorgensen, RW Allard, (1984), “Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81, pp. 8014-8018,
91. Sambrook J, Russell DW (2001), *Molecular cloning a Laboratory Manual*, Vol3.
92. Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer - Nechemias L, Wolfe BE, Brashears WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE (2001), “Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements”, *The Journal of Nutrients*, 131, pp.1362 – 1375
93. Shi P, Li B, Chen H, Song C, Meng J, Xi Z, Zhang Z (2017), “Iron Supply Affects Anthocyanin Content and Related Gene Expression in Berries of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon”, *Molecules*, 22(2), pp. 283
94. Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM (1995), “Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis”, *Plant*, 8, pp. 659-671.

95. Soderlund C, Descour A, Kudrna D, Bomhoff M, Boyd L, Currie J, Angelova A, Collura K, Wissotski M, Ashley E, Morrow D, Fernandes J, Walbot V, Yu Y (2009), “Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs”, *Plos Gene*, 5(11), pp. 740-747.
96. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503-517.
97. Sumardi D, Pancoro A, Yulia E, Musfiroh I, Prasetyono J, Karuniawan A, Syamsudin TS (2017), “Potential of local black soybean as a source of the isoflavones daidzein and genistein”, *International Food Research Journal* 24(5), pp. 2140-2145.
98. Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006) “Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce”, *FEBS Lett* 580, pp. 620-626.
99. Sun W, Shen H, Xu H, Tang X, Tang M, Ju Z, Yi Y (2019), “Chalcone Isomerase a Key Enzyme for Anthocyanin Biosynthesis in *Ophiorrhiza japonica*”, *Frontiers in Plant Science*, pp.10:865
100. Takagi K, Nishizawa K, Hirose A, Kita A, Ishimoto M (2011), “Manipulation of saponin biosynthesis by RNA interference-mediated silencing of β -amyrin synthase gene expression in soybean”, *Plant Cell Reports*, 30, pp. 1835-1846.
101. Tavva VS, Kim YH, Kagan IA, Dinkins RD, Kim KH, Collins GB (2007), “Increased α -tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* γ -tocopherol methyltransferase gene”, *Plant Cell Reports*, 26: pp. 61-70.
102. Tepfer D (2017), “DNA Transfer to Plants by *Agrobacterium rhizogenes*: A Model for Genetic Communication Between Species and Biospheres”, *Transgenesis and Secondary Metabolism*, pp 3-43.

103. Terai Y, Fujii I, Byun SH, Nakajima O, Hakamatsuka T, Ebizuka Y, Sankawa U (1996), "Cloning of chalcone-flavanone isomerase cDNA from *Pueraria lobata* and its overexpression in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, 8(1), pp. 183-190.
104. Tetsuya Yamada, Kyoko Takagi, Masao Ishimoto (2012), "Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis", *Breeding Science*, 61(5), pp. 480-494.
105. Topping JE, "Tobacco transformation" (1998), *Methods in Molecular Biology*, 81, pp. 365-372.
106. Tran TCH, Tran VH, La CT, (2008), "Transformation efficiencies of the soybean variety PC19 (*Glycine max* (L.) Merrill) using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotyledonary node method", *Omonrice*, 16, pp. 1-8.
107. Tsangalis D, Ashton JF, McGill AEJ, Shah NP (2002), "Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by beta-glucosidase-producing bifidobacteria". *Journal of Food Science*, 67, pp. 3104-3113
108. Tsukamoto C, MA Nawaz, A Kurosaka, B Le, JD Lee, E Son, SH Yang, C Kurt, S Baloch, G Chung (2018), "Isoflavone profile diversity in Korean wild soybeans (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.)", *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42, pp. 248-261
109. Tuan PA, Park WT, Xu H, Park NI, Park SU (2012), "Accumulation of tilianin and rosmarinic acid and expression of phenylpropanoid biosynthetic genes in *Agastache rugosa*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), pp. 5945-51
110. Verhoeyen ME, Bovy A, Collins G, Muir S, Robinson S, deVos CHR, Colliver S (2002), "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway". *Journal of Experimental Botany*, 53, pp. 2099-2106.

111. Vitale DC., Piazza C., Melilli B., Drago F., Salomone S. (2013), "Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability.", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(1), pp.15-25.
112. Vu TNT, Le THT, Hoang PH, Sy DT, Vu TTT, Chu HM(2018), "Overexpression of the Glycine max chalcone isomerase (GmCHI) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants", *Turkish Journal of Botany*, 42, pp. 551-558
113. Wang HJ, Murphy PA (1996), "Mass balance study of isoflavones during soybean processing", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp. 2377-2383.
114. Wang RK, Zhan SF, Zhao TJ, Zhou XL, Wang CE (2015), "Positive selection sites in tertiary structure of Leguminosae Chalcone isomerase 1", *Genetics and Molecular Research*, 14 (1), pp. 1957-1967
115. Wenbo Jiang, Qinggang Yin, Ranran Wu, Guangshun Zheng, Jinyue Liu, Richard A. Dixon, and Yongzhen Pang (2015), "Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*", *Journal of Experimental Botany*, 66(22), pp. 7165-7179.
116. Wu Y, Liu L, Zhao D, Tao J, (2018) "Age-associated methylation change of *CHI* promoter in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall)", *Bioscience Reports*, 38(5).
117. Xue RG, Xie HF, Zhang B (2006), "A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells", *Biotechnology Letters*, 28, pp. 1551-1557.
118. Yue Z, Han X, Mei Y, Chuanzhi Z, Aiqin L, Xingjun W (2012), "Cloning and expression analysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) *CHI* gene", *Molecular Biology and Genetics*, 15(1), pp. 5-5
119. Zenn ZC, Yi CC, Yi HC, Yen L (2006), "cDNA cloning and molecular characterization of 4-Coumarate: Coenzyme A ligase in *Eucalyptus camaldulensis*", *Taiwan Journal of Forest Science*, 21(1), pp. 87-100

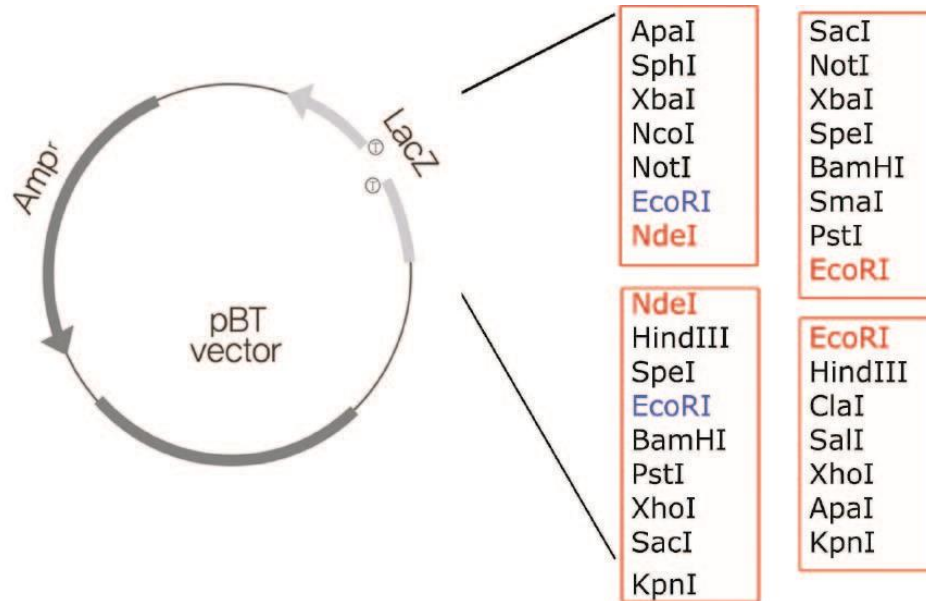
120. Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999), “The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56, pp. 37-46.
121. Zhang HC, Liu JM, Lu HY, Gao SL (2009), “Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment”, *Plant Cell Reports*, 28, pp.1205-1213
122. Zhou Y, Huang J, Zhang X, Zhu L, Wang X, Guo N, Zhao J, Xin H (2018) Overexpression of chalcone isomerase (CHI) increases resistance against *Phytophthora sojae* in soybean. *Journal of Plant Biology*. 61, pp. 309-319
123. Yadav NS (1996), “Genetic modification of soybean oil quality. In: Verma, D. P. S. and R.C.Shoemaker (eds.) Soybean”, *Genetics, Molecular Biology and Biotechnology, Cab International, USA*, pp. 165-188
124. Yamada T, Takagi K, Ishimoto M (2012), “Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis”, *Breeding Science*, 61, pp.480-494.
125. Yamada Y, Nishizawa K, Yokoo M, Zhao H, Onishi K, Teraishi M, Utsumi S, Ishimoto M, Yoshikawa M (2008), “Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novo-kinin”, *Peptides*, 29, pp. 331-337.
126. Yin YC, Zhang XD, Gao ZQ, Hu T, Liu Y (2019), “The Research Progress of Chalcone Isomerase (CHI) in Plants”, *Molecular Biotechnology*, 61(1), pp.32-52.
127. **Một số trang web**
128. <http://www.isoflavones.info/>
129. http://extension.agron.iastate.edu/soybean/uses_isoflavones.htm
130. <http://agriviet.com/nd/4020-ky-thuat-trong-cay-dau-nanh/>
131. <http://nhanonglamgiau.com/forum/threads/ky-thuat-trong-dau-tuong.605/>

132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595415>
133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/77456094>
134. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001249839
135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/14582262>
136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595413>
137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595414>
138. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595419>
139. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/114199182>
140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/225194708>
141. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1041610972>
142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1041610974>
143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1041610976>
144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1041610978>
145. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595415>
146. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001248290.2
147. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001249826.2
148. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001249168.2
149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595416>
150. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/77456096>
151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/77456100>
152. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001364454.1
153. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001364455.1
154. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001251461.2
155. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001364453.1
156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY595417>
157. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001249853.2
158. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001255112.2

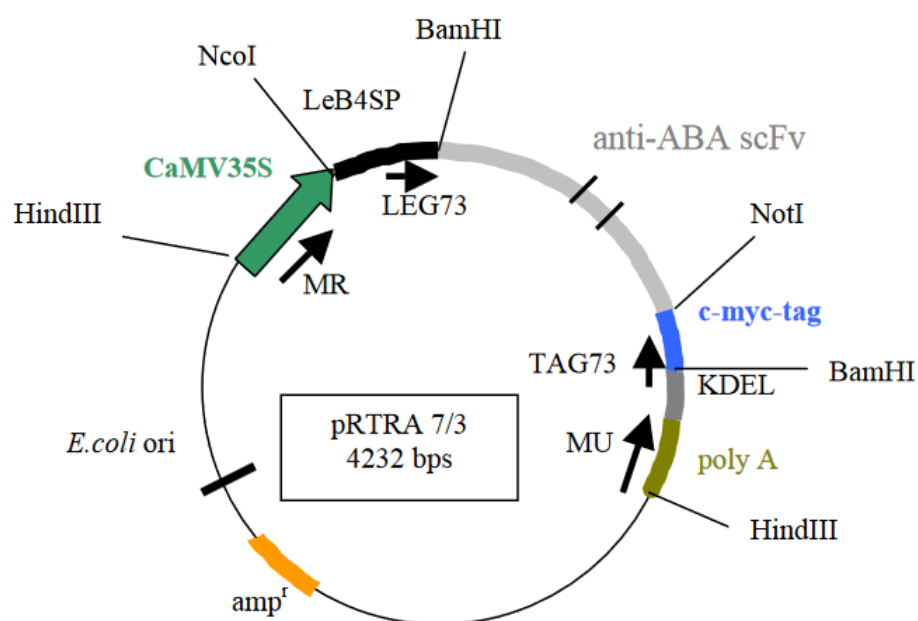
PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. SƠ ĐỒ CẤU TRÚC VECTOR pBT, pRTRA7/3, pCB301

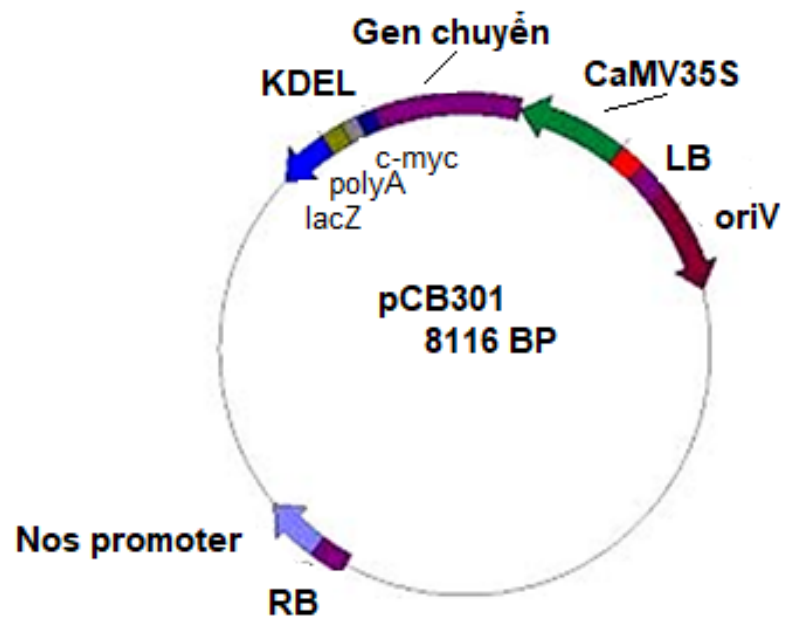
Phụ lục 1.1. Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pBT



Phụ lục 1.2. Sơ đồ cấu trúc vector pRTRA7/3



Phụ lục 1.3. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301



PHỤ LỤC 2. MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TRONG HỆ THỐNG TÁI SINH IN VITRO PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường	Thành phần
LB lỏng	Bacto pepton 10 g/l + NaCl 10 g/l + Yeast Extract 5 g/l, pH = 7
LB đặc	LB lỏng + agar 16g/l

2.2. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá chuyển gen

Hỗn hợp	Thành phần cho 1 lít dung dịch
Stock I	KNO ₃ 1,9 g + KH ₂ PO ₄ 0,17 g + NH ₄ NO ₃ 1,65 g + MgSO ₄ 0,37 g
Stock II	CaCl ₂ 0,44 g
Stock III	H ₃ BO ₃ 6,2 mg + MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg + CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg + CuSO ₄ .7H ₂ O 0,025 mg + ZnSO ₄ .7H ₂ O 8,6 mg + Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg + KI 0,83 mg
Stock IV	FeSO ₄ 27,8 mg + Na ₂ EDTA 37,3 mg
Stock V	Myo-Inositol 100 mg + Thiamine HCl 0,1 mg + Pyridoxine HCl 0,5 mg + Nicotic acid 0,5 mg + Glycine 2 mg
MS	20ml stock I + 10ml/stock (II, III, IV, V) + glucose 35g + agarose 8g
½MS	10ml stock I + 5ml/stock (II, III, IV, V)
GM	MS + BAP 1mg + sucrose 30 g + agar 9 g
RM	MS + IBA 0,1 mg + sucrose 30 g + agar 9 g

* Ghi chú: Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ ngày.

2.3. Môi trường tái sinh in vitro ở đậu tương

Môi trường	Thành phần
GM	Muối B5 3,052 g/l + sucrose 20 g/l + agar 6 g/l + vitamin B5 1 mg/l
CCM	Muối B5 0,316 g/l + MES 3,9 g/l + sucrose 30g/l + agar 5g/l + vitamin B5 1 mg/l + AS 0,2mM + L-cysteine 400 mg/l + Sodium thiosulfate 158 mg/l + DTT 154 mg/l + GA ₃ 0,25 mg/l + BAP 1,5 mg/l; pH = 5,4
SIM	Muối B5 3,052 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + vitamin B5 1 mg/l + BAP 1,5 mg/l
SEM	MS 4,3 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + agar 6 g/l + vitamin B5 1 mg/l + L-asparagine 50 mg/l + L-pyron glutamic acid 100 mg/l + IAA 0,1 mg/l + GA ₃ 0,5 mg/l
RM	MS 1,58 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 20 g/l + agar 6 g/l + IBA 0,1 mg/l + vitamin B5 1 mg/l

