

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2020

Công trình được hoàn thành tại:
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN – TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

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

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:.....

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
học tại Trường Đại học Sư phạm-Đại học Thái Nguyên

Vào hồinăm 2020

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên
3. Thư viện Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên

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*, (SCIE, Q2) <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10076-x>
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 HỌC* 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.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Flavonoid là sản phẩm tự nhiên quan trọng có vai trò bảo vệ thực vật và sức khỏe con người. Isoflavone thuộc nhóm flavonoid chứa nhiều trong hạt đậu tương, biểu hiện các đặc tính chống oxy hóa, chống ung thư, kháng khuẩn và chống viêm. Isoflavone trong hạt đậu tương dễ sử dụng cho người, còn 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, trong đó 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 chính là CHI loại I và CHI loại II. Các CHI loại I được tìm thấy trong hầu hết các loại thực vật, nhưng các CHI loại II chỉ có ở cây họ đậu. Gen *GmCHI1A* ở đậu tương thuộc CHI loại II nằm trên nhiễm sắc thể số 20, mã hóa enzyme CHI1A. Các kết quả nghiên cứu biểu hiện gen CHI đều khẳng định sự biểu hiện mạnh gen *CHI* đều làm tăng hàm lượng isoflavonoid 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 flavonoids khác. Đến nay mới chỉ có nghiên cứu của Lyle Ralston et al (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 của gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương theo hướng tiếp cận tạo dòng cây chuyển gen có hàm lượng isoflavone cao.

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. Ngoài ra, đậu tương còn là loại cây trồng có giá trị kinh tế và là cây cải tạo đất. Đáng chú ý là trong hạt đậu

tương chứa isoflavone, đặc biệt là dạng aglucone được hệ tiêu hóa người hấp thu nhanh, nhưng hàm lượng lại rất thấp. Đây là lý do thu hút được sự quan tâm nghiên cứu trong việc cải thiện hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương.

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 cây đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* có hàm lượng isoflavone cao hơn cây 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.

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 thế 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.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 139 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (5 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (36 trang); Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (15 trang); Chương 3: Kết quả và thảo luận (43 trang); Kết luận và đề nghị (2 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (2 trang); Tài liệu tham khảo (16 trang); Phụ lục (6 trang). Luận án có 14 bảng, 36 hình, 3 phụ lục và tham khảo 126 tài liệu và một số trang web.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 126 tài liệu và một số trang web, trong đó có 17 tài liệu tiếng Việt, 109 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: (1) Cây đậu tương và isoflavone trong hạt đậu tương; (2) Enzyme CHI và gen mã hoá CHI; (3) Chuyển gen ở đậu tương và phân tích biểu hiện gen CHI.

Hạt Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) chứa protein và lipid với hàm lượng cao, chứa nhiều amino acid không thay thế, 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. Đáng chú ý là trong hạt đậu tương chứa isoflavone. 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, 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 thấp, 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.

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 aglucone (daidzein, genistein, glycitein). Dạng glycoside có trọng lượng phân tử lớn được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người, trong khi đó, dạng aglucone được hấp thụ nhanh hơn, nhưng hàm lượng lại rất thấp.

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 axit amin. 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. Cách tiếp cận tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa trong con đường tổng

hợp phenylpropanoid là kỹ thuật được ứng dụng để làm tăng hàm lượng isoflavone ở nhiều loài thực vật khác nhau.

Các nghiên cứu chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* ở đậu tương đều sử dụng lá mầm hạt chín là vật liệu nhận gen. Khả năng tiếp nhận gen của đậu tương bằng 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, ... Các nghiên cứu chuyển gen *CHI* từ loài này sang loài khác cho kết quả là cây chuyển gen có sự tích lũy flavonoid tăng và tăng hơn cây không chuyển gen rất nhiều lần. Nghiên cứu biểu hiện tăng cường gen *CHI* của chính loài đó còn ít được đề cập.

Gen *GmCHI1A* của đậu tương đã được phân tích biểu hiện ở năm men, cây Sâm đất, tuy nhiên, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen với 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. Hướng nghiên cứu biểu hiện mạnh gen *GmCHI1A* (overexpression of *GmCHI1A* gene) 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, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

Các giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu: Năm giống đậu tương ĐT51, ĐT26, DT90, DT84, DT2008 được sử dụng trong các thí nghiệm trong luận án. 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 DT90, DT84, DT2008 do Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

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 cmcy, vector chuyển gen pCB301. 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.

Các cặp mồi PCR sử dụng trong nghiên cứu gồm *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R*; *CHI-NcoI-F/CHI-SacI-R*; *nptII-F/nptII-R*; *pUC18-F/pUC18-R*

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

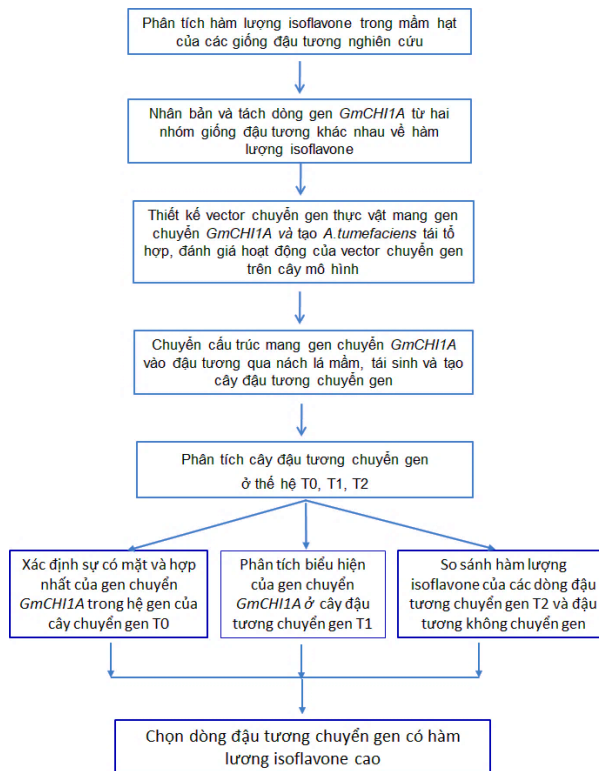
Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5' - 3')	Sản phẩm (bp)
<i>CHI-NcoI-F/</i> <i>CHI-NotI-R</i>	ATGCCATGGATGGCAACGATCACCGCGGTT TTGCGGCCGCGACTATAATGCCGTGGCTC	677 (cDNA)
<i>CHI-NcoI-F/</i> <i>CHI-SacI-R</i>	CATGCCATGGATGGCAACGATCAGCGCGGTT CGAGCTCGTCACTATAATGCCGTGGCTC	722
<i>nptII-F/</i> <i>nptII-R</i>	GAGGCTATTCGGCTATGACTG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

Hóa chất: Các loại kit thao tác phân tử từ các hãng Fermentas, Bio-Neer. Các loại enzyme sử dụng của hãng Fermentas: *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.

Thiết bị: 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 Advant 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 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ tổng quát các thí nghiệm thực hiện trong luận án

2.2.1. Nhóm phương pháp phân tích hàm lượng isoflavone

Hạt đậu tương nảy mầm được 3 ngày tuổi, thu mầm làm nguyên liệu để chiết rút daidzein và genistein. Định lượng daidzein và genistein được thực hiện theo phương pháp AOAC Official 2008.03 và Chen và cs (2001).

2.2.2. Nhóm phương pháp phân lập gen

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*.

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.

Nhân bản gen *GmCHI1A*: Gen *GmCHI1A* được khuếch đại từ cDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R.

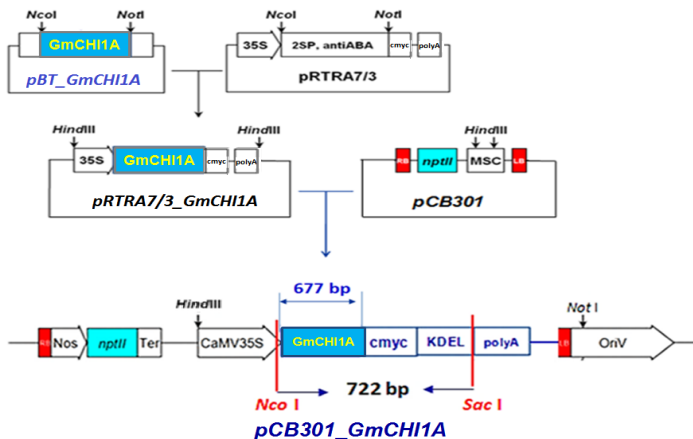
Điện di kiểm tra: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agrose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1 µg/ml.

Tách dòng và xác định trình tự gen *GmCHI1A*: Kỹ thuật tách dòng gen được thực hiện theo Sambrook và cs.

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 được thực hiện theo sơ đồ hình 2.3.



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

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

Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* thông qua *A. tumefaciens* vào mảnh lá và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được thực hiện như mô tả của Topping (1998). Tách chiết DNA tổng số từ lá thuốc lá thực hiện theo Saghai-Marooof và cộng sự (1992). Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong hệ gen của các cây thuốc lá chuyển gen ở thể 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.

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 Olhoft và cs (2006) [128] và Nguyễn Thu Hiền (2014) [3]. 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.

Xác nhận sự hiện diện và hợp nhất của gen chuyển vào hệ gen cây đậu tương: Xác nhận sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong các cây chuyển gen T0 bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-SacI-R*. Kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI1A* vào hệ gen cây chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot

Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp rCHI1A: Protein tổng số được chiết xuất từ lá đậu tương chuyển gen và các cây không chuyển gen được tách bằng điện di trên gel 10% SDS-PAGE (Laemmli 1970). Xác định sự biểu hiện protein tái tổ hợp bằng Western blot và định lượng protein CHI tái tổ hợp bằng ELISA như được mô tả của Sun et al. (2006).

2.2.6. Xử lý dữ liệu sinh học

Các dữ liệu hàm lượng isoflavone của các mẫu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, phần mềm Statistical Package for the Social Science (SPSS) ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Kiểm định trị số thống kê theo Duncan ở mức ý nghĩa α bằng 0,05.

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

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 Hà Nội, 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.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GENGmCHI1A 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

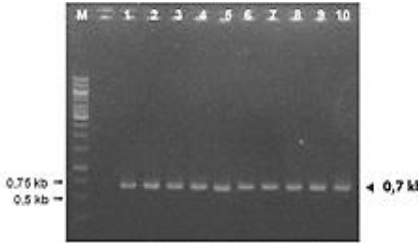
Tiến hành khảo sát hàm lượng isoflavone (daidzein và genistein) của 5 giống đậu tương (ĐT26; ĐT51; DT2008; DT84; DT90) bằng phương pháp sắc ký HPLC, kết quả cho thấy, ở giống đậu tương ĐT26, trong hạt đậu tương nảy mầm 3 ngày tuổi có hàm lượng daidzein và genistein cao nhất (64,27 mg/100 g), giống DT2008 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 > DT90 > DT84 > DT2008

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

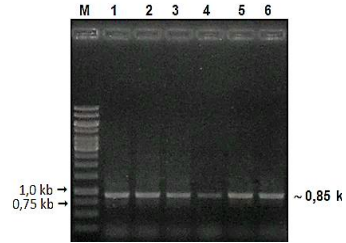
Kết quả nhân bản và kiểm tra sản phẩm tách dòng gen *GmCHI1A* bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thể hiện ở hình 3.3 và hình 3.4.

Chọn các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *GmCHI1A* của bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008, DT84 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. 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 đã sử dụng trong thiết kế cặp mồi PCR là 98,93% (ĐT51); 98,93% (DT84); 98,78% (DT2008), 97,87% (ĐT26).



Hình 3.3. A. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI1A*. (M: thang DNA 1kb; 1, 2: ĐT26; 3, 4: ĐT51; 5, 6: DT84; 7, 8: DT90; 9, 10: DT2008);



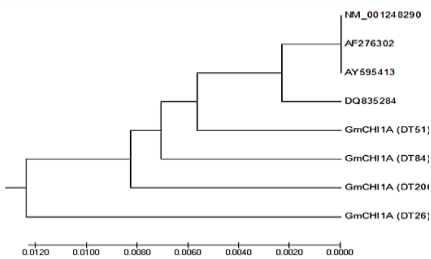
Hình 3.4. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR với cặp mồi pUC18F/pUC18R. M: thang DNA 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6: các dòng khuẩn lạc có kiểu hình trắng được kiểm tra bằng colony-PCR

Như vậy, kết quả phân tích BLAST đã cho thấy đoạn DNA phân lập từ mRNA của bốn giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT2008, DT84 là đoạn mã hóa gen *GmCHI1A* của đậu tương. Gen *GmCHI1A* (cDNA) của các giống đậu tương nghiên cứu có 657 nucleotide, mã hóa 218 amino acid. Các trình tự gen *GmCHI1A* đã được công bố trên GenBank lần lượt mang các mã số là LT594994.1, LT594995.1, LT594993.1, LT594996.1.

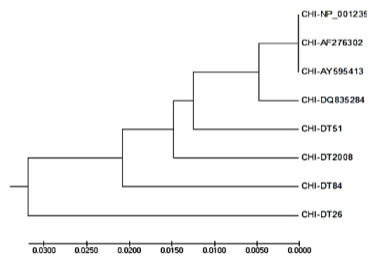
3.1.3. Sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid của gen *GmCHI1A*

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 được lựa chọn để phân tích sự đa dạng dựa trên trình tự nucleotide và trình tự amino acid. Sơ đồ hình cây ở hình 3.8 và 3.9 được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide theo phương pháp UPGMA bằng phần mềm MEGA7. Kết quả phân tích ở hình 3.8 cho thấy, dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmCHI1A*, 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%. Ở hình 3.9, sơ đồ hình cây được thiết lập theo phương pháp UPGMA dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen *GmCHI1A* cho thấy các giống đậu tương phân bố trong hai nhánh chính, nhánh chính thứ nhất chỉ có giống ĐT26 và nhánh chính thứ hai gồm 7 giống còn lại, khoảng cách di truyền được xác định là 3,0 %.



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



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

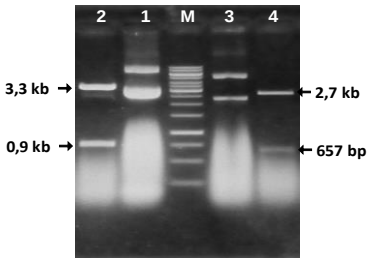
3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN *GmCHI1A*

Để chuyển gen *GmCHI1A* vào thực vật và có thể kiểm tra biểu hiện sản phẩm protein của gen, vector biểu hiện gen thực vật pCB301 mang promoter *CaMV35S* đã được thiết kế để điều khiển biểu hiện gen *GmCHI1A* ở thực vật.

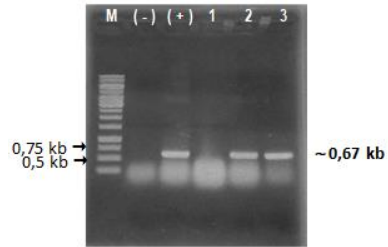
3.2.1. Tạo cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A*

Vector pRTRA7/3 chứa promoter *CaMV35S* khởi động phiên mã, trình tự nucleotide xác định chuỗi peptide c-myc và trình tự nucleotide xác định đoạn KDEL. Mở vòng vector pRTRA7/3 bằng cặp enzyme *NotI/NcoI* tạo được 2 phân đoạn DNA có kích thước 0,9 kb và 3,3 kb, trong đó đoạn DNA có kích thước 3,3 kb và đoạn DNA mang các trình tự

35S_cmyc_KDEL. Gen *GmCHI1A* từ vector tách dòng *pBT_GmCHI1A* được cắt bằng cặp enzyme *NotI* và *NcoI* tạo 2 phân đoạn DNA có kích thước khoảng 0,67 kb và 2,7kb. Trong đó, phân đoạn DNA 0,66 kb chính là đoạn gen đích *GmCHI1A* cần thu nhận (Hình 3.10). Tinh sạch đoạn gen *GmCHI1A* và gắn vào vector *pRTRA7/3* nhờ phản ứng ligation dưới xúc tác của enzyme T4 ligase tạo cấu trúc vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_GmCHI1A* mang cấu trúc *CaMV35S_GmCHI1A-cmyc-polyA*. Nhân dòng trong *E.coli* DH5 α và kiểm tra bằng colony-PCR (Hình 3.11).



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*



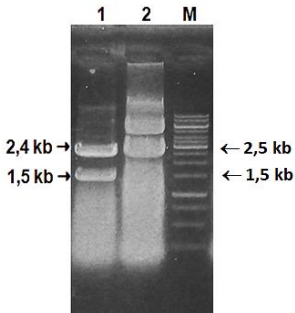
Hình 3.11. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhận bản gen *GmCHI1A* từ các dòng khuẩn lạc. M: Thang DNA 1 kb; (-): Colony-PCR từ khuẩn lạc *E.coli* không được biến nạp *pRTRA7/3_GmCHI1A*; (+): PCR nhận gen *GmCHI1A* từ vector *pBT_GmCHI1A*; 1-3: Colony-PCR từ các dòng khuẩn lạc được biến nạp *pRTRA7/3_GmCHI1A*

3.2.2. Tạo vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*

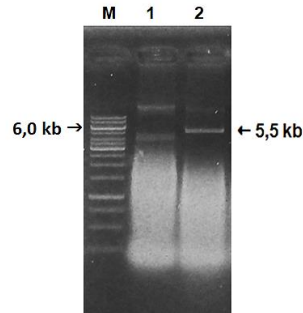
Thực hiện phản ứng cắt vector *pRTRA7/3_GmCHI1A* bằng *HindIII* thu nhận được cấu trúc 35S_ *GmCHI1A_cmyc_KDEL_polyA* (1,5 kb) và đoạn DNA có kích thước 2,4 kb (Hình 3.12). Mở vòng vector chuyển gen *pCB301* bằng *HindIII* nhận được hai phân đoạn DNA 5,502 kb (Hình

3.13). Gắn cấu trúc *35S_GmCHI1A_cmyc_KDEL* vào vector pCB301 tạo vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* (Hình 3.14).

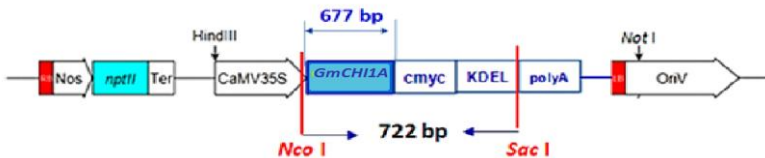
Biến nạp *pCB301_GmCHI1A* và nhân dòng trong *E.coli* DH5 α và chọn dòng khuẩn lạc bằng colony-PCR. Plasmid *pCB301_GmCHI1A* được tách chiết từ các dòng dương tính với PCR.



Hình 3.12. 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;



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

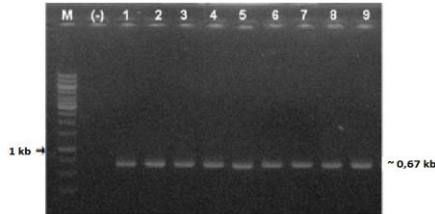


Hình 3.14. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*. *nptII*: gen kháng kanamycin; *CaMV35S*: promoter 35S; *GmCHI1A*: gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* (*GmCHI1A*) phân lập từ cây đậu tương; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hóa peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL

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

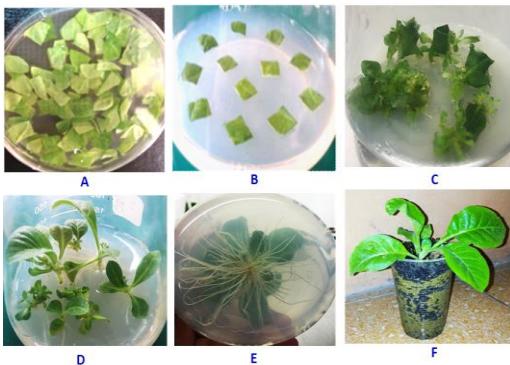
A.tumefaciens CV58. Nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C và khi các khuẩn lạc xuất hiện trên mặt thạch thì tiến hành kiểm tra bằng colony-PCR cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R* để chọn dòng khuẩn lạc mang vector chuyển gen *GmCHI1A* (Hình 3.16).



Hình 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: chín 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 lặp lại 3 lần được trình bày ở bảng 3.5. 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 tạo được 30 cây sống sót trong điều kiện nhà lưới.

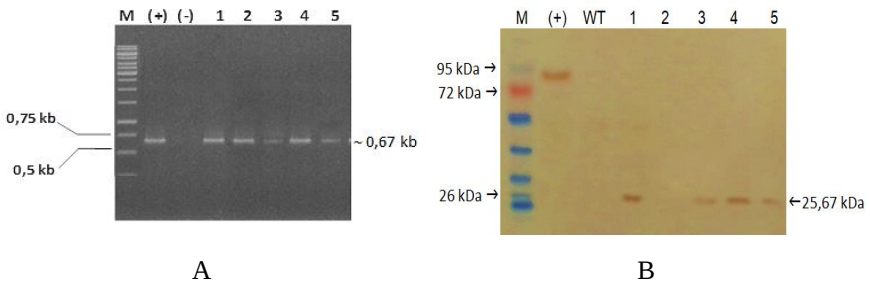


Hình 3.17. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen *GmCHI1A*. A: các mảnh lá thuốc lá trong dịch khuẩn và lây nhiễm; B: Đồng nuôi cây trên môi trường CCM; C: Tái sinh đa chồi trong môi trường chọn lọc chứa kanamicin; D: Kéo dài chồi; E: Ra rễ trên môi trường RM; F: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trên giá thể.

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 cho thấy band DNA có kích thước khoảng 0,67 kb xuất hiện ở 22 lần điện di, đó là 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 band 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 và kết quả xuất hiện 5/7 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, ở hình 3.19B, kết quả phân tích Western blot 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, T04, T05, T06).

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 qua 3 lần biến nạp với 390 mảnh lá mầm (Hình 3.20). Trong số 390 mẫu được biến nạp đã tạo được 26 cây chuyển gen mang trồng trên giá thể.

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

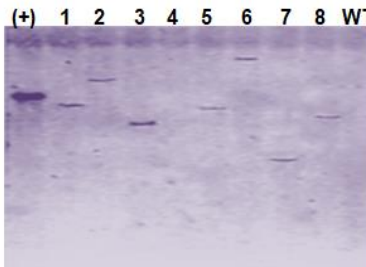
Sử dụng kỹ thuật PCR để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong 26 cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0. Từ DNA tổng số tách từ lá non các cây đậu tương chuyển gen T0 và các cây đối chứng không chuyển gen được sử dụng cho PCR với cặp mồi *CHI-NcoI-F/ CHI-SacI-R*. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen chuyển *GmCHI1A* cho thấy trên bản gel điện di có 8 lần chạy xuất hiện band DNA, đó là các lần 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 lần lượt là T0-1; T0-3; T0-4; T0-5; T0-21; T0-22; T0-24; T0-25. Ở lần điện di phân tích sản phẩm PCR từ DNA của các cây đối chứng không chuyển gen không thấy xuất hiện band DNA.

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 Southern blot. DNA tổng số được 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* để thu các đoạn *nptII_CaMV35S_GmCHI1A_cmyc* chứa gen *nptII* và gen

GmCHI1A. 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 band 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 band DNA tương ứng với 1 bản copy. Mẫu WT biểu hiện âm tính, chứng tỏ phản ứng lai đặc hiệu, mẫu dò không liên kết với gen nội sinh.



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 cây trên CCM ở điều kiện tối trong 5 ngày; E: Cầm ứng tạo đa chồi trên SIM, bổ sung BAP 2 mg L^{-1} + kanamycin 50 mg L^{-1} ; F: Cắt bỏ lá mầm, chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM trong 2 tuần, bổ sung GA_3 $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ + kanamycin 50 mg L^{-1} ; G: Ra rễ trên môi trường RM, bổ sung IBA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ trong 20 ngày; H: Cây chuyển gen trồng trên giá thể có tỷ lệ 1 trâu hun : 1 cát vàng.



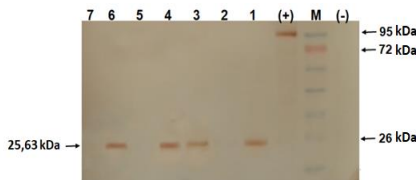
Hình 3.23. Kết quả phân tích Southern blot các cây đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* với đoạn dò *nptII* được đánh dấu bằng biotin. (+): vector *pCB301-GmCHI1A*; 1-8: các dòng đậu tương chuyển gen dương tính với PCR (1: T0-1; 2: T0-3; 3: T0-4; 4: T0-5; 5: T0-21; 6: T0-22; 7: T0-24; 8: T0-25); WT: cây đậu tương không chuyển gen.

Kết quả phân tích Southern blot cho thấy, 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.

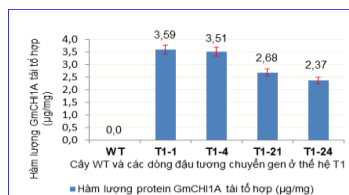
3.3.3. Phân tích biểu hiện protein *CHI1A* tái tổ hợp bằng Western blot và ELISA

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 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.

Kết quả phân tích Western blot của protein ở 7 dòng đậu tương chuyển gen và đối chứng không chuyển gen cho thấy, trong 7 dòng đậu tương chuyển gen *GmCHI1A* ở thế hệ T1 có 4 dòng cho kết quả Western blot (Hình 3.24). 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 Southern blot là $4/390 = 1,03\%$.



Hình 3.24. Kết quả phân tích Western blot protein từ các cây đậu tương chuyển gen thế hệ T1 và cây không chuyển gen. M: thang protein chuẩn; (+) đối chứng dương là protein HA gắn cmcy; (-) 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



Hình 3.25. Kết quả phân tích ELISA xác định 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)

Hình 3.25 cho thấy, hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A của 4 dòng đậu tương chuyển gen T1-1, T1-4, T1-21 và T1-24 dao động từ 2,37-3,59 µg/mg. Dòng T1-1 có hàm lượng protein tái tổ hợp rCHI1A cao nhất (3,59

µg/g), tiếp đến là dòng T1-4 (3,51 µg/g) và dòng T1-21(2,68 µg/g) và thấp nhất là dòng T1-24 (2,37 µg/g) (Hình 3.25).

Như vậy có thể nhận xét rằng gen chuyển *GmCHI1A* được di truyền qua sinh sản hữu tính từ thể hệ T0 sang T1 và đã hoạt động phiên mã và dịch mã tổng hợp protein ở các cây đậu tương chuyển gen ở thể hệ T1.

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

Mầm hạt của 4 dòng chuyển gen ở thể hệ T2 (T2-1, T2-4, T2-21, T2-24) được sử dụng phân tích hàm lượng daidzein và genistein (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 (µg/g khối lượng khô)	Tăng so với WT (%)	Genistein (µg/g khối lượng khô)	Tăng so với WT (%)	Tổng daidzein và genistein (µg/g khối lượng khô)
WT	253,05 ^a ± 3,60	100,00	113,11 ^A ± 1,78	100,00	366,16
T2-1	473,79 ^c ± 9,63	187,23	524,64 ^D ± 4,27	463,93	998,43
T2-4	457,07 ^b ± 18,14	180,62	467,66 ^C ± 17,97	413,46	870,53
T2-21	447,92 ± 14,87	177,01	499,72 ^{CD} ± 15,95	441,80	947,64
T2-24	421,22 ^b ± 8,91	166,46	373,00 ^b ± 9,82	329,77	750,99

Kết quả phân tích cho thấy, so với đậu tương không chuyển gen (WT), 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 139,17 % đến 186,86 %; hàm lượng genistein tăng từ 329,80 % đến 463,93 %. Sự khác biệt về hàm lượng isoflavone giữa các dòng chuyển gen và cây WR được phân tích theo kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

3.4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Ở thực vật bậc cao, CHI là một enzyme quan trọng xúc tác cho các phản ứng trong con đường phenylpropanoid để tạo ra các sản phẩm

isoflavonoid, flavonoid, anthocyanin (Oliver et al., 2005). Gen *GmCHI1A* của cây đậu tương mã hóa protein enzyme CHI1A được chúng tôi phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam đã được đăng ký trên GenBank, với các mã số LT594994.1, LT594995.1, LT594993.1, LT594996.1. Đoạn 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 and Dhaubhadel (2019).

Theo hướng nghiên cứu biểu hiện gen *CHI* của loài này ở loài khác đã được ghi nhận ở các kết quả biểu hiện SmCHI từ loài *S. medusa*, hoa mẫu đơn ở cây thuốc lá; biểu hiện gen *CHI* của cây Dạ yến thảo ở cà chua, kết quả đã tạo được các cây chuyển gen có hàm lượng flavonoid tăng lên nhiều lần so với cây không chuyển gen.

Ralston et al. (2005) đã phân tích biểu hiện cả *GmCHI* type I và type 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. Trong nghiên cứu của Vũ Thị Như Trang và cs đã phân tích biểu hiện gen *GmCHI* type II của đậu tương ở cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) và kết quả nhận được các dòng chuyển gen có hàm lượng flavonoid tổng số tăng lên từ 4,8 -7,4 lần so với cây không chuyển gen (Vu et al., 2018). Nhiều loại cây được liệu quý không tồn tại enzyme CHI type 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 type II từ cây họ đậu vào các cây được liệu bằng kỹ thuật chuyển gen để thu nhận isoflavone.

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 rCHI1A từ 2,37-3,59 µg/mg. Kết quả đã 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, Sự biểu hiện mạnh của gen *GmCHI1A* đã làm

tăng hàm lượng enzyme GmCHI1A và mầm 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. Như vậy có thể nói, sự 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 flavonoids khác trong cây chuyển gen.

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 (Jiang et al., 2015). 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 (Perabo et al., 2008). 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. Sự biểu hiện mạnh của gen *GmCHI1A* đã làm tăng hàm lượng enzyme CHI1A và mầm các dòng đậu tương chuyển gen T2 có hàm lượng daidzein và genistein tăng cao hơn đối chứng không chuyển gen.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Hàm lượng daidzein, genistein trong mầm hạt của năm giống đậu tương ĐT26, ĐT51, DT90, DT84 và DT2008 đã được khảo sát. Trong đó, giống đậu tương ĐT26 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.

1.2. 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.

1.3. Gen chuyển *GmCHI1A* được biến nạp thành công vào giống đậu tương DT2008 bằng kỹ thuật lây nhiễm *A.tumefaciens* tái tổ hợp qua nách 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.

2. Đề nghị

2.1. 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 DT26 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 DT26 với hàm lượng isoflavone cao mà nó đã tạo ra.

2.2. 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.

2.3. Kết quả của luận án đã chứng minh được sự tăng cường biểu hiện gen mã hoá enzyme chia khoá trong con đường sinh tổng hợp isoflavone của đậu tương đã làm tăng hàm lượng isoflavone trong mầm hạt đậu tương chuyển gen. Đây là cơ sở khoa học để có thể áp dụng vào các giống cây họ đậu và các loài thực vật khác trong định hướng nâng cao hàm lượng isoflavone để nghiên cứu các thực phẩm chức năng phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng.