

# ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC XỬ LÝ THIẾU NƯỚC LÊN SỰ BIẾN ĐỘNG CỦA GEN *MtDHDPS1* MÃ HÓA DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE TRONG CÂY *MEDICAGO TRUNCATULA*

## Effects of water stress treatment on fluctuations of *MtDHDPS1* gene encoding of dihydrodipicolinate synthase in *Medicago truncatula*

Hoàng Thị Kim Hồng<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Hạnh<sup>2</sup>, Đinh Tiến Hoàng<sup>1</sup>, Đặng Thanh Long<sup>4</sup>, Ngô Thị Minh Thu<sup>5</sup>  
Nguyễn Việt Hà<sup>3</sup>, Phạm Thị Hồng Trang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng, 215 Điện Biên Phủ, Phường 15, Bình Thạnh, Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Công Ty Scavi Huế, ĐT9, TT. Phong Điền, Phong Điền, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

<sup>4</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

<sup>5</sup> Trường Đại học Duy Tân, 254 Nguyễn Văn Linh, Thanh Khê, Đà Nẵng, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Hoàng Thị Kim Hồng (Thư điện tử: htkhong@hueuni.edu.vn)

(Ngày nhận bài (received): 8-9-2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 21-10-2019)

**Tóm tắt.** Bài báo này trình bày các kết quả đạt được trong nghiên cứu ảnh hưởng của việc xử lý thiếu nước lên sự biến động của gen *MtDHDPS1* mã hóa dihydrodipicolinate synthase (*MtDHDPS*, EC 4.2.1.52) trong lá cây *M. truncatula*. Enzyme *MtDHDPS* đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình điều hòa sinh tổng hợp lysine trong nhóm cây họ đậu nói chung và cây *M. truncatula* nói riêng. Các cây 3 tuần tuổi bị xử lý thiếu nước từ 5 ngày hoặc 10 ngày, sau đó tiến hành thu lấy mẫu để nghiên cứu. Kết quả phân tích định lượng mRNA bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy việc xử lý stress thiếu nước đã làm thay đổi mức độ biểu hiện của gen này, trong đó giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của gen *MtDHDPS1* ở cả hai loại mẫu đã xử lý hạn 5 ngày và 10 ngày đều thấp hơn so với mẫu đối chứng không xử lý thiếu nước tương ứng, đồng thời mức độ biểu hiện gen *MtDHDPS1* ở cây xử lý hạn 5 ngày cao hơn so với cây xử lý hạn 10 ngày là  $2^{5,53} = 46,2$  lần.

**Từ khóa:** Dihydrodipicolinate synthase (*MtDHDPS*), gen *MtDHDPS1*, *Medicago truncatula*, xử lý stress thiếu

**Abstract.** This paper presents the results of the effect of water stress treatment on the fluctuation of the *MtDHDPS1* gene encoding dihydrodipicolinate synthase (*MtDHDPS*, EC 4.2.1.52) in leaves of *M. truncatula*. Enzyme *MtDHDPS* plays an important role in the regulation of lysine biosynthesis in the Legume group, in general, and *M. truncatula*, in particular. The 3-week-old plants were treated with water stress in shortage for 5 days and 10 days, then the samples were corrected for research. The results of quantitative mRNA analysis by RT-PCR technique show that the water stress treatment has changed the expression level of this gene, in which the threshold cycle value (Ct) of *MtDHDPS1* gene in both 5-day and 10-day drought-treated samples is lower than the corresponding untreated control water

samples, and the level of MtDHDPS1 gene expression in 5-day drought-treated plants is  $2^{5.53} = 46.2$  times as high as that in the 10-day drought-treated plants.

**Keywords:** Dihydrodipicolinate synthase (MtDHDPS), gene *MtDHDPS1*, *Medicago truncatula*, water stress treatment

## 1 Mở đầu

Cây *Medicago truncatula* là đối tượng thực vật mô hình của nhóm cây họ đậu và chúng sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực nghiên cứu khác nhau trên thế giới, đặc biệt trong nghiên cứu sinh tổng hợp amino acid và con đường chuyển hóa aspartate để tạo thành lysine [1, 2]. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy lysine là một amino acid thiết yếu quan trọng nhất, cần có trong khẩu phần ăn của con người và động vật, tuy nhiên bản thân người và động vật không tự tổng hợp được lysine mà phải lấy từ nguồn thức ăn bên ngoài do thực vật cung cấp, đặc biệt là nguồn lysine từ hạt ngũ cốc [3].

Trong thực tế, quá trình chuyển hóa lysine ở thực vật C3 và C4 hầu như đã được nghiên cứu rất nhiều với mục đích nhằm cải thiện chất lượng dinh dưỡng để cung cấp nguồn lysine cần thiết cho đời sống của con người. Ở thực vật C3 và C4, quá trình tổng hợp lysine được điều hòa chủ yếu bởi cơ chế ức chế ngược của lysine đối với enzyme DHDPS. Nhiều loài thực vật có khả năng tổng hợp lysine, nhưng nếu lượng lysine tổng hợp và tích lũy quá nhiều trong cơ thể sẽ gây độc và ảnh hưởng đến sự sống của thực vật [4]. Khả năng ức chế ngược của lysine đối với hoạt động của DHDPS là một trong những cơ chế quan trọng giúp thực vật điều hòa và cân bằng lượng lysine trong cơ thể. Theo các tài liệu đã được công bố hiện nay thì DHDPS đã được tách từ nhiều nguồn thực vật khác nhau như ngô, lúa mì, rau dền, đậu và thuốc lá [5-8]. Ở các loài thực vật này, DHDPS thường được mã hóa bởi một họ đa gen (multigene family). Các nghiên cứu trên ngô cho thấy xuất hiện vài gen đồng dạng (isogene) DHDPS, tương tự như thế, các nhà khoa học cũng tìm thấy hai gen khác nhau trong họ DHDPS xuất hiện ở lúa mì và *A. thaliana* [2, 9]. Hai gen đồng dạng *DHDPS1* và *DHDPS2* đã được xác định và đặc tính trong *Arabidopsis thaliana*, trong đó những dòng *A. thaliana* đột biến bị knock-out *DHDPS2* thường biểu hiện khả năng tăng cường tính chống chịu cho cây [2].

Nghiên cứu của Ellen và cộng sự đã cho thấy rằng trong cây *M. truncatula* ngoài hai gen đồng dạng là *DHDPS1* và *DHDPS2* (*MtDHDPS1* và *MtDHDPS2*), còn có thêm hai gen đồng dạng khác là *MtDHDPS3* và *MtDHDPS4* cùng tồn tại trong một số bộ phận như lá và rễ [2]. Các chứng cứ thực nghiệm trong nghiên cứu của họ còn cho thấy hầu hết hoạt động của bốn gen đồng dạng này đều bị ức chế ngược bởi lysine nhưng mức độ nhạy cảm của mỗi gen đối với lysine là khác nhau. Mặc dù vai trò cụ thể của từng gen đồng dạng này ở *M. truncatula* nói riêng và thực vật nói chung vẫn đang còn là những bí ẩn đang được dần dần khám phá, tuy nhiên nhiều giả thuyết đã cho rằng sự xuất hiện và đồng phối hợp của các gen đồng dạng này có thể đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa sinh tổng hợp lysine nhằm giúp cho thực vật tăng cường khả năng đáp ứng và thích nghi tốt với các điều kiện bất lợi của môi trường [10, 11].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả trong nghiên cứu ảnh hưởng của việc xử lý thiếu nước lên sự biến động gen *MtDHDPS1* mã hóa dihydrodipicolinate synthase (Mt DHDPS1) đồng thời xác định hoạt độ của enzyme MtDHDPS1 trong các mẫu lá cây *M. truncatula*.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

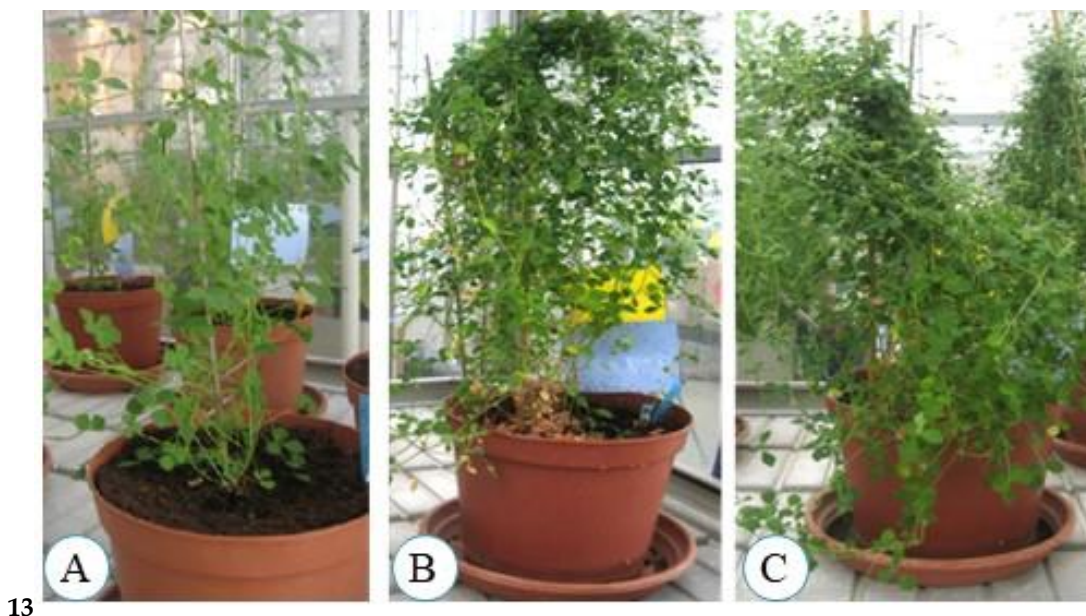
### Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu này là hạt giống *M. truncatula* dòng 2HA được cung cấp từ phòng thí nghiệm Di truyền thực vật, khoa Công nghệ sinh học, Đại học Vrije, Bỉ.

Hạt được khử trùng, nuôi cấy và tạo cây hoàn chỉnh theo phương pháp đã công bố của Hồng và cộng sự [12]. Chọn các chậu nhựa có lỗ thoát nước, cho đất sạch vào mỗi chậu, phun nước và giữ cho đất ẩm đều qua đêm. Chuyển cây mầm có hai lá lên trên chậu đất, trồng và chăm sóc trong điều kiện phòng thí nghiệm khoảng 1 tuần, sau đó chuyển ra vườn ươm. Trong tuần đầu tiên, khi cây con được chuyển ra trồng trong môi trường đất, cần dùng nắp nhựa đặt bên trên chậu để bảo vệ cây con và chống thoát hơi nước. Cây con sinh trưởng, phát triển tốt và tiếp tục trải qua các giai đoạn trưởng thành (Hình 1A), ra hoa, tạo hạt (Hình 1B) và thu hoạch hạt (Hình 1C).

Các cây *M. truncatula* khỏe mạnh được chọn lọc và phân vào 4 lô khác nhau trong đó lô 1 và lô 2 làm lô đối chứng sau 5 ngày và 10 ngày không xử lý thiếu nước, cây được chăm sóc và tưới nước bình thường, lô 3 và lô 4 chứa các cây thí nghiệm được trồng và chăm sóc như các cây ở lô đối chứng tuy nhiên xử lý stress thiếu nước bằng cách không tưới nước và thu mẫu sau 5 ngày và 10 ngày xử lý.

Mẫu lá tách từ các cây *M. truncatula* trưởng thành ở các lô thí nghiệm được thu trong cùng thời điểm (9 giờ sáng) và cố định mẫu trong nitrogen để tách chiết và xác định hoạt độ của enzyme MtDHDPS, và đánh giá biểu hiện của gen *MtDHDPS1* ở các lô thí nghiệm và lô đối chứng bằng kỹ thuật qRT-PCR.



13

**Hình 1.** Hình thái cây *M. truncatula* qua các giai đoạn sinh trưởng khác nhau  
A: Cây ở giai đoạn trưởng thành; B: Cây ở giai đoạn ra hoa, tạo hạt và C: Cây ở giai đoạn thu hoạch hạt

## Tách chiết RNA từ lá và xác định hàm lượng, chất lượng của RNA

RNA tổng số trong mẫu lá cây *M. truncatula* được tách chiết bằng TRI-reagent (của hãng Sigma) và sử dụng Kít SV Total RNA Isolation System, Z3100 (Promega) để tinh sạch RNA. Mẫu lá được nghiền mịn với Nito lỏng, sau đó lấy 500 mg mẫu đồng nhất trong 1 ml TRI-reagent, lắc mạnh trong 5 phút, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Tiếp tục bổ sung 200  $\mu$ l Chloroform, trộn đều, và giữ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, sau đó ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, sau ly tâm, loại bỏ phần cặn và thu lấy dịch nổi bên trên rồi bổ sung thêm 200  $\mu$ l ethanol 95%, dùng pipette trộn đều 3-4 lần rồi chuyển toàn bộ dung dịch này vào cột lọc và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ phần dịch dưới cột lọc, tiếp tục bổ sung 600  $\mu$ l đệm rửa RNA (RNA Wash Solution) vào phía trên cột lọc, tiếp tục ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dung dịch ở phía dưới cột lọc. Tiếp tục bổ sung 50  $\mu$ l hỗn hợp gồm (40  $\mu$ l Yellow Core Buffer + 5  $\mu$ l 0,09M MnCl<sub>2</sub> + 5  $\mu$ l của Dnase I enzyme) đã được chuẩn bị trước đó vào chính giữa ở phía trên màng và ủ 15 phút ở 20-25°C. Tiếp tục bổ sung 200  $\mu$ l dung dịch ngừng phản ứng enzyme (Dnase Stop Solution) rồi ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, sau ly tâm loại bỏ dung dịch ở phía dưới cột lọc, tiếp tục bổ sung 600  $\mu$ l đệm rửa RNA (RNA Wash Solution) vào cột lọc và tiếp tục ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, sau ly tâm loại bỏ dung dịch ở phía dưới cột lọc. Tiếp tục bổ sung 250  $\mu$ l đệm rửa RNA (RNA Wash Solution) vào phía trên cột lọc và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút (làm khô cột). Chuyển cột lọc ở phía trên sang ống tube mới (1,5 ml), và bổ sung 100  $\mu$ l Water-DEPC vào trên màng lọc và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ cột lọc và thu lấy toàn bộ RNA ở phía dưới ống tube. Đánh dấu và bảo quản RNA ở -70°C để thực hiện cho các thí nghiệm tiếp theo.

Lượng RNA và độ tinh sạch của RNA có trong các mẫu nghiên cứu được xác định bằng cách đo mẫu RNA ở các bước sóng A230, A260 và A280 ở máy Nanodrop, ngoài ra, chất lượng của RNA được tách chiết còn được kiểm tra trên gel agarose 1,5% và nhuộm màu với thuốc nhuộm Midori green.

## Xác định sự biểu hiện gen DHDPS bằng kỹ thuật qRT-PCR

Tổng hợp sợi đầu tiên cDNA từ khuôn mẫu RNA theo kit của hãng Fermentas (RevertAid H minus first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific) trong một ống PCR chứa 250 ng oligo dT primer, 0,5 mg RNA, bổ sung nước không chứa nuclease (nuclease free water) để đạt được thể tích trong ống là 12  $\mu$ l, ly tâm nhanh để trộn đều hỗn hợp mẫu, rồi ủ ở 70°C trong 5 phút. Mẫu được làm lạnh trong đá rồi tiếp tục thêm 4  $\mu$ l dung dịch đệm phản ứng, 1  $\mu$ l chất ức chế Riboblock Ribonuclease (20 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l hỗn hợp dNTP (10 mM), 1  $\mu$ l RevertAid H Minus M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l) rồi ủ mẫu ở 42°C trong 60 phút để tổng hợp cDNA, sau đó ủ mẫu ở 70°C trong 10 phút để ngừng phản ứng. Phản ứng qRT-PCR được tiến hành trên máy CFX96 Touch real-time PCR, sử dụng microplate (96 giếng), mỗi giếng chứa 10  $\mu$ l hỗn hợp đệm Promega (Promega mix), 4  $\mu$ l cDNA và 6  $\mu$ l hỗn hợp mồi MtDHDPS1 gồm 3  $\mu$ l mồi xuôi và 3  $\mu$ l mồi ngược (10 pmol cho mỗi mồi) có trình tự như sau:

Mồi xuôi: 5'TGTGTGGAGTGGGAACGATGATC3'

Mồi ngược: 5' GAGCAAGAGCCGTGTTCAAACC3'

## Tách chiết và xác định hoạt độ của enzyme DHDPS

MtDHDPS1 được chiết từ lá ở các cây *M. truncatula* trưởng thành của các lô nghiên cứu. Các mẫu lá được nghiền với đệm chiết (100 mM đệm potassium phosphate, pH 8,0, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 20% glycerol và

10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Dịch chiết đồng nhất được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 20 phút và lọc qua giấy lọc Miracloth để loại bỏ các phần cặn, thu lấy dịch chiết và kết tủa với 60% ammonium sulphate bão hòa trong 30 phút, rồi ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 20 phút. Phần kết tủa được thu và hòa tan trong đệm hòa tan chứa 50 mM phosphate pH 7,6, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 20% glycerol và 10 mM sodium pyruvate và ủ ở 65°C trong 5 phút. Trong điều kiện này, hầu hết protein bị biến tính và được thu lấy sau khi ly tâm và bảo quản ở 20°C.

Hoạt độ của enzyme MtDHDPS1 được xác định theo phương pháp của Ghislain *et al.*, (1990) [7] trong 1 ml dịch phản ứng chứa 100 mM Tris-HCl pH8, 35 mM pyruvate, 2 mM L-aspartic- $\beta$ -semi-aldehyde (ASA) trung hòa, 35  $\mu$ l dung dịch aminobenzaldehyde (0,5 mg  $\beta$ -ABA/35  $\mu$ l ethanol tuyệt đối). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 60 phút, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung thêm 200  $\mu$ l of 12% trichloroacetic acid và tiếp tục ủ ở trong tối từ 60 - 90 phút, kết quả phản ứng sẽ làm chuyển màu của mẫu thí nghiệm và mức độ tạo màu đậm nhạt sẽ tùy thuộc vào lượng MtDHDPS1 có trong mẫu.

Hoạt độ của MtDHDPS1 được xác định bằng cách đo ở bước sóng 550 nm [7, 13]. Hoạt độ riêng của MtDHDPS1 trong mẫu lá *M. truncatula* ở các lô đối chứng và lô thí nghiệm được tính như lượng enzyme của mẫu cho phép tăng khả năng hấp thụ ở bước sóng 550 nm lên 0,001 ở mỗi phút trong sự hiện diện của L - ASA và được thể hiện bởi đơn vị (unit/mg protein) [2]. Hàm lượng protein trong mẫu được xác định theo phương pháp Bradford (1976), sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm mẫu protein chuẩn.

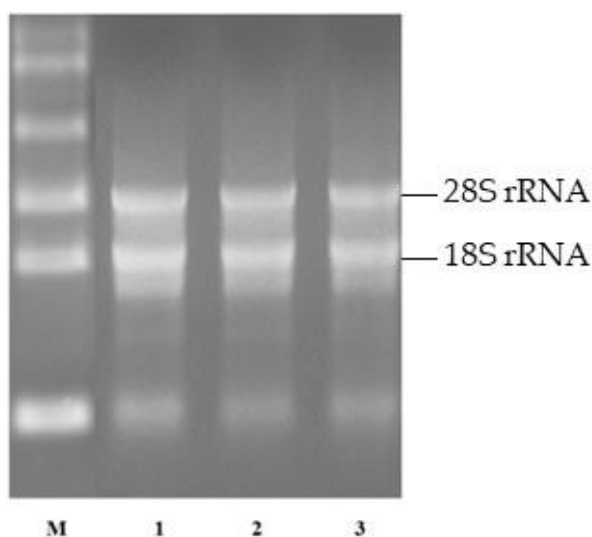
### 3 Kết quả và thảo luận

#### Kiểm tra chất lượng RNA tổng số

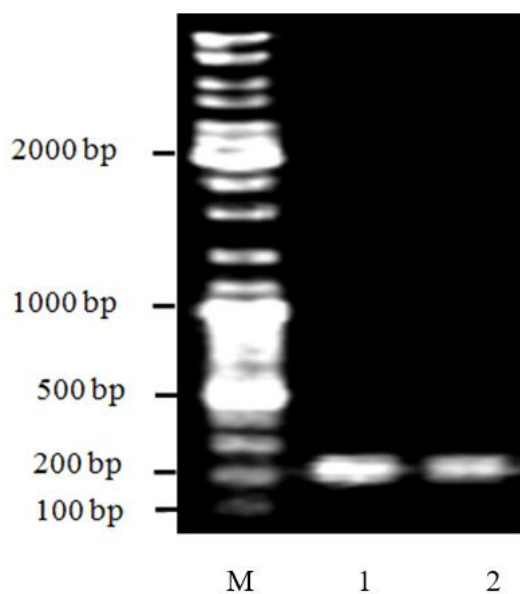
Kết quả điện di kiểm tra chất lượng RNA tổng số trên gel agarose 1% không biến tính thể hiện ở hình 2 cho thấy xuất hiện 2 băng RNA ribosome đậm, rõ sạch nên với kết quả này có thể kết luận với quy trình ly trích trong thí nghiệm của chúng tôi hoàn toàn có thể thu nhận được RNA với nồng độ cao, có độ sạch tốt nếu có sự tồn tại của RNA trong mẫu kiểm tra. Chất lượng của RNA tổng số này có thể sử dụng cho những thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

#### Phân lập các đoạn gen *MtDHDPS1*

Kết quả phân lập từ hình 3 cho thấy sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen chỉ có một băng duy nhất, nồng độ cao, rõ nét, kích thước vào khoảng 250 bp khi so sánh với khối lượng thang chuẩn DNA có kích thước 100 - 1500 bp của hãng BioBase. Sở dĩ sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho các đoạn gen *MtDHDPS1* có kích thước cao hơn so với tính toán ban đầu là do đặc tính của enzyme xúc tác cho phản ứng bổ sung giữa các nucleotide là Taq DNA polymerase mà chúng tôi sử dụng. Enzyme này có khả năng kéo dài sản phẩm PCR bằng cách gắn thêm Adenin, số lượng Adenin gắn vào có thể lên đến 200 nucleotid [14]. Với tính đặc hiệu của kết quả PCR, nên bước đầu chúng tôi có nhận định rằng là đã nhân được các đoạn gene thành công.



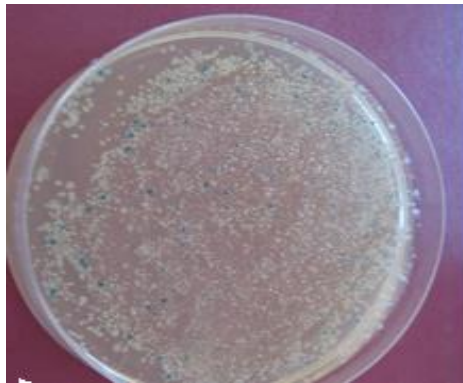
**Hình 2.** Ảnh điện di kiểm tra chất lượng của RNA tổng số trên gel agarose không biến tính. M: Marker (Invitrogen). RNA được tách chiết từ lá của cây *M. truncatula* ở điều kiện tưới nước đầy đủ (1), mẫu 5 ngày xử lý hạn (2) và mẫu 10 ngày xử lý hạn (3)



**Hình 3.** Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR trên gel agarose. M: thang chuẩn khối lượng phân tử DNA (100 - 10000 bp (GeneRuler™ DNA Ladder), 1 và 2: sản phẩm RT-PCR đối với đoạn gene *MtDHDPS1*

### Tạo dòng các đoạn gen *MtDHDPS1* vào vector pGEM®-T-easy (Promega)

Vector pGEM-T easy có kích thước khoảng 3015 bp, mang gen  $Amp^r$ , gene *lacZ*, polylinker và promoter đặc trưng cho các RNA polymerase (SP6, T7) ở hai bên vùng polylinker cho phép phiên mã đoạn DNA gắn trong vector thành nhiều RNA (hình 4). Các RNA này thường dùng làm mẫu dò hay dùng trong nghiên cứu cấu trúc và chức năng của RNA. Loại vector này đã được mở sẵn ở vùng tạo dòng trên gen *lacZ* mang hai đầu T, rất thích hợp cho việc gắn các sản phẩm PCR có mang hai đầu A.



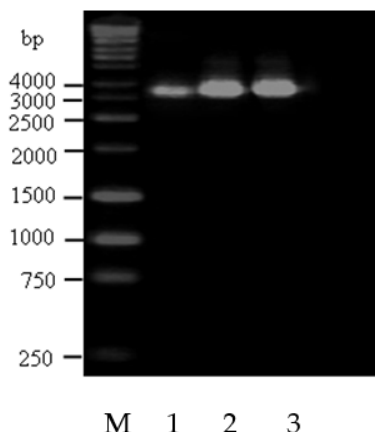
**Hình 4.** Kết quả sản phẩm gắn đoạn gen *MtDHDPS1* trên môi trường chọn lọc

Các đoạn gene *MtDHDPS1*, sau khi được phân lập bằng phản ứng PCR có gắn thêm Adenine (dA) vào đầu 3' (do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase) nhằm tạo liên kết bổ sung với Timin (dT) đã được thiết kế trong vector pGEM-T easy bằng phương pháp tạo dòng TA cloning [13]. Sản phẩm PCR sau khi thu hồi từ gel bằng kit isolate ii pcr and gel (Bioline). Hệ thống tinh sạch gel này dựa trên khả năng kết hợp giữa DNA với màng silica có trong cột dưới sự có mặt của hỗn hợp muối. Hỗn hợp muối này sẽ được loại ra khỏi DNA tinh sạch ở bước rửa. DNA tinh sạch sẽ được thu hồi với đệm có chứa nồng độ muối thấp. Hệ thống màng có thể kết hợp lên tới 25  $\mu$ g DNA và cho phép thu hồi sản phẩm sau 10 phút.

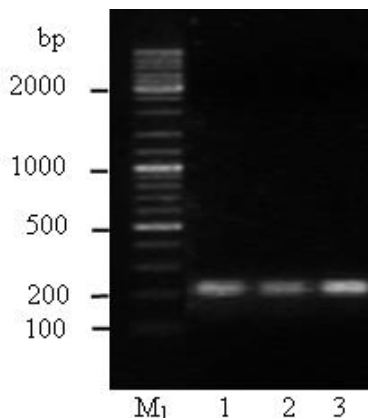
Quá trình tinh sạch này giúp loại bỏ khỏi sản phẩm PCR các thành phần không mong muốn như các đoạn DNA vệ tinh, các NTPs. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào vật chủ *E. coli* TOP10 và dàn đều trên môi trường chọn lọc Luria-Bertani (0,5% dịch chiết nấm men, 1% tryptone và 1% NaCl) (Vulfson và cs, 2001) + ampicilin 100  $\mu$ g/ml + 100 mM IPTG + 100 mg/ml X gal. Kết quả biến nạp thể hiện trên hình 4 cho thấy rằng có hai dòng khuẩn lạc xanh-trắng xuất hiện với tỷ lệ tương đương nhau. Khuẩn lạc trắng là khuẩn lạc có khả năng mang vector tái tổ hợp pGEM/*MtDHDPS1*. Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 3 khuẩn lạc trắng chuyển vào môi trường LB lỏng có bổ sung 100  $\mu$ g/ml ampicilin, nuôi qua đêm ở 37°C trong tủ lắc. Huyền dịch thu được (3 ml) tiến hành thu sinh khối, tách chiết và tinh sạch plasmid tái tổ hợp. Kiểm tra sự hiện diện của các đoạn gen *MtDHDPS1* bằng phản ứng PCR trực tiếp với cặp mồi đặc hiệu và gián tiếp thông qua cặp mồi M13 được thiết kế ở hai đầu vùng tạo dòng của vector pGEM-T easy (Promega).

Kết quả tách chiết plasmid thể hiện ở hình 5 cho thấy tất cả ba khuẩn lạc đều cho một băng DNA plasmid đậm, rõ nét và có kích thước tương đương với kích thước tính toán ban đầu. Kết quả PCR với cặp mồi đặc hiệu (Hình 5) và kết quả PCR với cặp mồi M13 (Hình 6) đều cho một băng DNA duy nhất, có nồng độ cao, kích thước băng DNA thu được tương đương với kích thước băng DNA phân lập ban đầu khoảng 250 bp và khoảng 450 bp (kết quả PCR với cặp mồi M13 bao gồm kích thước đoạn gene khoảng 250 bp + kích thước đoạn gene do cặp mồi M13 khuếch đại trên vector pGEM-T easy khoảng 200 bp). Qua đây kết luận được rằng, chúng tôi đã gắn thành công các đoạn gen *MtDHDPS1* vào vector pGEM-T easy và biến nạp được vào tế bào vật chủ *E. coli* chủng TOP10. Plasmid tái tổ hợp này được chúng tôi gửi phân tích trình tự nucleotide ở Công ty 1st BASE, Malaysia thông qua Công ty TNHH phát triển Công nghệ ứng dụng Việt Nam VNDAT bằng phương pháp đánh dấu huỳnh quang dideoxy-terminator trên máy 3130 ABI (Applied Biosystem) (Hình 7).





**Hình 5.** Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm tinh sạch plasmid tái tổ hợp trên gel agarose. Lane M: thang chuẩn khối lượng phân tử DNA ((Invitrogen); lane 1, 2 và 3: plasmid tái tổ hợp pGEM có chứa gen MtDHDPS1



**Hình 6.** Ảnh điện di kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen DHDPS1 từ khuẩn lạc trắng trên môi trường chọn lọc trên gel agarose. Lane M<sub>1</sub>: thang chuẩn khối lượng phân tử DNA (100 -10000 bp (GeneRuler™ DNA Ladder); lane 1, 2 và 3: khuẩn lạc dương tính 1, 2 và 3 có chứa gen MtDHDPS1

Kết quả phân tích trình tự các đoạn gene thu được kích thước 212 bp (đối với đoạn gen *MtDHDPS1*). Đoạn gen mang trình tự nucleotide đều có độ tương đồng cao đối vi các trình tự nucleotide đã được công bố trên ngân hàng gene thế giới (GenBank) với mã số là XM\_013613732 (99%) (Hình 7).

```

MtDHDPS1      1  GAGCAAGAGCCGTGTTCAAACCAATGGGATTTGGCATGTGGAAAAGCCAGTCAATCAAAG  60
  |||
XM_013613732 1127 GAGCAAGAGCCGTGTTCAAACCAATGGGATTTGGCATGTGGAAAAGCCAGTCAATCAAAG 1068

MtDHDPS1      61  GCAAGAGCTTAGAATTC AATGTGGGATTTTGGCCCCAAACATGAGTTCTCGCATCAACC 120
  |||
XM_013613732 1067 GCAAGAGCTTAGAATTC AATGTGGGATTTTGGCCCCAAACATGAGTTCTCGCATCAACC 1008

MtDHDPS1      121 CAGGAATCAGATTGCTTGCAACAGATATCACTCCAGTAGCTCCATAACCCCATCTAGCAT 180
  |||
XM_013613732 1007 CAGGAATCAGATTGCTTGCAACAGATATCACTCCAGTAGCTCCATAACCCCATCTAGCAT 948

MtDHDPS1      181 CATGGCATTGATCATCGTTCCCACTCCACACA 212
  |||
XM_013613732 947 CATGGCATTGATCATCGTTCCCACTCCACACA 916
    
```

**Hình 7.** Mức độ tương đồng giữa đoạn gen MtDHDPS1 của chúng tôi với đoạn gen MtDHDPS1 đã được công bố trên ngân hàng gene thế giới với mã số Genbank là XM\_013613732



### Thăm dò sự biến động của gen *MtDHDPS1* của cây *M. truncatula* xử lý thiếu nước

Để kiểm tra sự biến động của gen mã hóa tạo enzyme MtDHDPS1 xúc tác cho con đường chuyển hóa tổng hợp Lysine trong lá của cây *M. truncatula* qua các thời gian xử lý hạn khác nhau chúng tôi đã sử dụng phương pháp Realtime RT-PCR để kiểm tra. Chúng tôi sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen *MtDHDPS1* được Ellent và cộng sự công bố năm 2013 [2]. để thiết lập nên thí nghiệm này (thuốc nhuộm huỳnh quang SYBR).

SYBR Green là thuốc nhuộm liên kết không đặc hiệu với DNA mạch đôi. SYBR Green chỉ phóng thích một lượng nhỏ tín hiệu huỳnh quang khi nó ở dạng tự do trong dung dịch, nhưng tín hiệu huỳnh quang sẽ tăng lên 1000 lần khi nó liên kết với DNA mạch đôi. Như vậy, tín hiệu huỳnh quang tổng từ phản ứng sẽ tỷ lệ với lượng DNA mạch đôi hiện diện, và gia tăng trình tự mục tiêu được khuếch đại.

Mức độ biểu hiện ổn định của gen *DHDPS1* có trong cây *M. truncatula* được đánh giá thông qua các thời gian xử lý hạn khác nhau (xử lý hạn 5 ngày và 10 ngày). Chu kỳ ngưỡng (Ct: Threshold cycle) trong tất cả các mẫu phân tích là giá trị được sử dụng để so sánh mức độ biểu hiện của gen *MtDHDPS1*. Tỷ lệ biểu hiện gen được tính theo công thức sau:

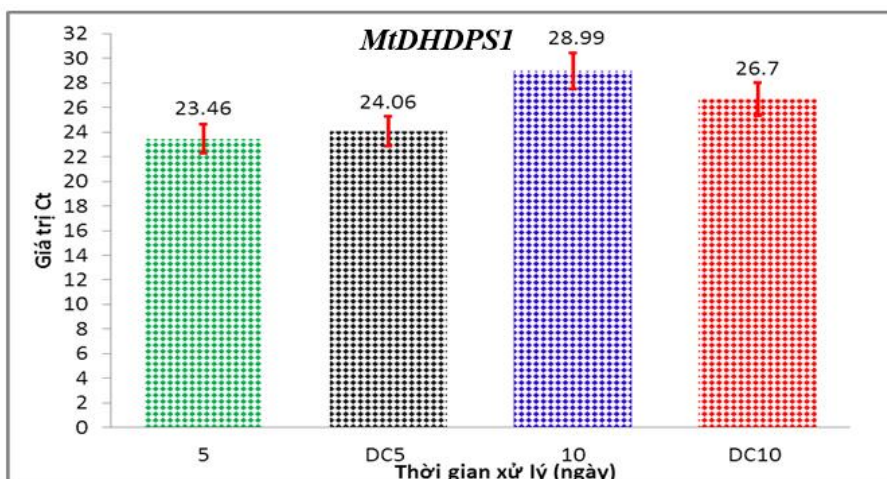
$$\text{Tỷ lệ biểu hiện gene } MtDHDPS1 = 2^{Ct[C]-Ct[T]} [4]$$

trong đó: Ct[C] là chu kỳ ngưỡng khuếch đại mRNA của gene *MtDHDPS1* không xử lý (đối chứng); Ct[T] là chu kỳ ngưỡng của khuếch đại mRNA của gene *MtDHDPS1* có xử lý 2: là lượng DNA tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ nhiệt

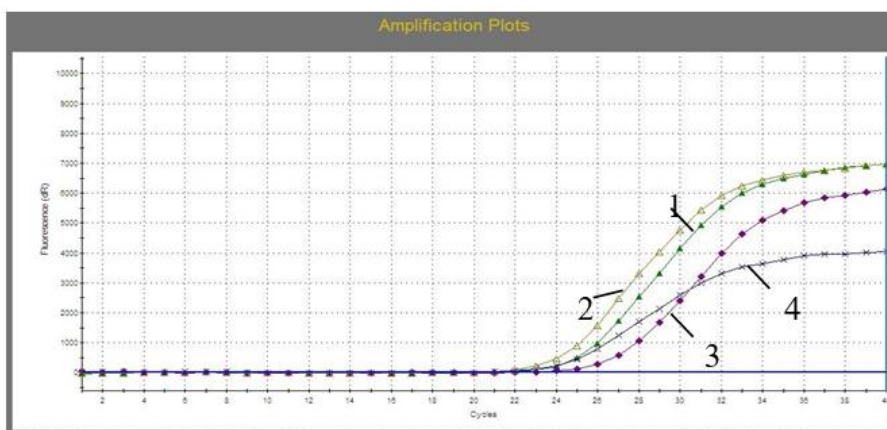
Phản ứng Realtime -PCR cho thấy tín hiệu huỳnh quang (Fluorescence) của các gen *MtDHDPS1* qua các thời gian xử lý thiếu nước khác nhau thì có sự thay đổi khác nhau.

Đối với mức độ biểu hiện của gen *MtDHDPS1* (Hình 8 và Hình 9). Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) ở mẫu lá thu được từ cây có thời gian xử lý hạn 5 ngày thấp hơn so với mẫu lá thu được từ cây xử lý hạn 10 ngày là 5,53 chu kỳ, tương đương với mức độ biểu hiện gen *MtDHDPS1* ở cây xử lý hạn 5 ngày cao hơn so với cây xử lý hạn 10 ngày là  $2^{5,53}$  lần.

Mặt khác, giá trị Ct thu được ở cây đối chứng 5 ngày thấp hơn so với cây đối chứng 10 ngày là 2,64 chu kỳ, tương ứng với mức độ biểu hiện ở cây đối chứng 5 ngày cao hơn so với cây đối chứng 10 ngày là  $2^{2,64}$  lần. Như vậy số chu kỳ ngưỡng dao động thu được từ mẫu lá giữa hai lần xử lý hạn cao hơn so với số chu kỳ ngưỡng dao động thu được từ mẫu lá của cây đối chứng 5 ngày và 10 ngày. Điều này cho ta thấy rằng mức độ biểu hiện gen *MtDHDPS1* từ mẫu lá thu được từ cây qua hai thời điểm xử lý hạn dao động lớn hơn so với đối chứng. Vậy, điều kiện xử lý hạn làm giảm rất lớn mức độ biểu hiện gen *MtDHDPS1* và đã làm thay đổi mức độ biểu hiện của gen này, trong đó giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của gen *MtDHDPS1* ở cả hai loại mẫu đã xử lý hạn 5 ngày và 10 ngày đều thấp hơn so với mẫu đối chứng không xử lý thiếu nước tương ứng, đồng thời mức độ biểu hiện gen *MtDHDPS1* ở cây xử lý hạn 5 ngày cao hơn so với cây xử lý hạn 10 ngày là 25,53 lần.



Hình 8. Kết quả xác định sự biến động của genMtDHDPS1 qua các thời gian xử lý hạn khác nhau



Hình 9. Đồ thị điển hình từ phản ứng Realtime RT-PCR xác định sự biến thiên của gen MtDHDPS1 có trong cây *M. truncatula* qua xử lý hạn với các thời gian khác nhau. 1: mẫu thu sau 5 ngày xử lý hạn, 2: mẫu đối chứng 5 ngày xử lý hạn, 3: mẫu thu sau 10 ngày xử lý hạn, 4: mẫu đối chứng 10 ngày xử lý hạn

#### 4 Kết luận

Từ nghiên cứu này chúng tôi rút ra kết luận sau: Đã phân lập đoạn gen MtDHDPS1 từ cây *M. truncatula* có kích thước 212 bp có trình tự nucleotide tương đồng cao đối với các trình tự nucleotide đã được công bố trên ngân hàng gene (GenBank) với mã số là XM\_013613732 (99%). Xử lý stress thiếu nước sau 5 ngày hoặc 10 ngày gây ảnh hưởng rõ rệt đến sự biến động của của gen MtDHDPS1 trong cây *M. truncatula*.

#### Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn Giáo sư Geert Angenon, Đại học Vrije (VUB) Bỉ đã cung cấp hạt giống *M. truncatula* cho chúng tôi triển khai nghiên cứu này. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số "106-NN.02-2014.13".

## Tài liệu tham khảo

1. Blickling S, Knäblein J. Feedback inhibition of dihydrodipicolinate synthase enzymes by L-lysine, *Biological Chemistry*. 1997;207-210.
2. Ellen E, Pieter VB, Thu TT, Geert A. *Medicago truncatula* dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) enzymes display novel regulatory properties. *Plant Molecular Biology*. 2013;81:401-415.
3. Galili G. Regulation of lysine and threonine synthesis. *The Plant Cell*. 1995; 7:899-906.
4. Dereppe C, Bold G, Ghisalba O, Ebert E, Schar HP. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase of pea. *Plant Physiology*. 1992; 98:813-821.
5. Frisch D, Gengenbach B, Tommey A, Sellner J, Somers D, Myers D. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. *Plant Physiology*. 1991; 96:444-452.
6. Frugoli J. *Medicago truncatula* as a model system in plant molecular biology. In: Kirti, P.B. (Editor), Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes. CRC Press, Taylor & Francis Group, Chapter. 2008;23: 339-352.
7. Ghislain M, Frankard V, Jacobs M. Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris*, a chloroplast-localized enzyme of the lysine pathway. *Planta*. 1990; 180:480-486.
8. Huguet T, Prosperi JM. *Medicago truncatula*: a legume model-plant. In: Genier G. (ed.), Prosperi J.M. (ed.). The Genus *Medicago* in the Mediterranean region: Current situation and prospects in research. *Zaragoza : Cihram*. 1996; 171-175.
9. Harrison MJ. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 1998; 1:360-365.
10. Long ĐT, Chương HV, Hồng HTK, Trang NTQ, Yến PTH, Khánh VP. Nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gene mã hóa kháng nguyên glycoprotein c của virus dịch tả vịt phân lập tại Thừa Thiên Huế. *Hue University Journal of Science: Natural Science*. 2018 09 20;127(1C):21. <https://doi.org/10.26459/hueuni-jns.v127i1c.4924>
11. Mantiri FR, Kurdyukov S, Lohar DP, Sharopova N, Saeed NA, Wang XD, VandenBosch KA, Rose RJ. The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. 2008; 146: 1622-1636.
12. Hồng HTK, Trang PTH, Long ĐT, Trang NTQ. Cloning and optimizing the expression of the DHDPS gene in the *Medicago truncatula*. *Legume Research*. 2019;482: 1-6.
13. Nolan KE, Rose RJ. Plant regeneration from cultured *Medicago truncatula* with particular reference to abscisic acid and light treatments. *Australian Journal of Botany*. 1998; 46: 151-160.
14. Rose RJ, Rose RJ. *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions. Review. *Functional Plant Biology*, 2008; 35: 253-264.