

MÔ TẢ ĐẶC ĐIỂM HÓA VÀ KHẢO SÁT SỰ BIỂU HIỆN CỦA HỌ GEN *DEHYDRIN* Ở CÂY QUÝT ĐƯỜNG (*Citrus clementina*)

Cao Phi Bằng

Trường Đại học Hùng Vương

Email: phibang.cao@hvu.edu.vn

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 13.10.2014

TÓM TẮT

Tổng số 6 gen mã hóa cho các dehydrin (DHN) đã được tìm thấy trong hệ gen của cây quýt đường (*Citrus clementina*). Nghiên cứu này hướng tới xác định các đặc trưng lý-hóa, cấu trúc và sự biểu hiện của các DHN ở loài cây này nhờ các phương pháp *in silico*. Cả 6 DHN đều có tính ưa nước cao. Chỉ số béo cao của chúng gợi ý các DHN của cây quýt đường thuộc nhóm các protein ổn định với nhiệt độ cao. Hai gen CcIDHN1 và CcIDHN6 có vùng mã hóa liên tục trong khi bốn gen còn lại có vùng mã hóa không liên tục, một vùng không mã hóa ngăn cách hai vùng mã hóa tại vùng phân mảnh S. Từ 3 tới 6 cấu trúc xoắn α lưỡng cực được xác định trong cấu trúc không gian của chúng. Bên cạnh đó, các serin có khả năng phosphoryl hóa cũng được xác định trong vùng phân mảnh S. Chỉ có hai gen *CcIDHN1* và *CcIDHN2* biểu hiện ở nhiều loại mô khác nhau dưới các điều kiện khác nhau của môi trường.

Từ khóa: Biểu hiện gen, cấu trúc gen, Dehydrin (DHN), đặc trưng của gen, *in silico*.

Characterisation and Expression Survey of Dehydrin Gene Family in Clementine (*Citrus clementina*)

ABSTRACT

A total of six dehydrin (DHN) genes have been found in the whole genome of Clementine (*Citrus clementina*). This work aimed to study the characteristics and structure of DHN in this species. All of six DHN proteins were highly hydrophilic. Their high aliphatic index suggested that clementine DHN might be thermostable proteins. Only two KS-type genes, CcIDHN1 and CcIDHN6, had no intron. Therefore, four others were discontinuous coding genes with an intron which separates two exons within the S fragment. The predicted 3D modeling structure showed many amphipathic α -helices in the secondary structure of DHN proteins. In addition, the serine phosphorylation sites also were predicted in the S fragment region. Two clementine DHN genes, CcIDHN1 and CcIDHN2, expressed in many different tissues under various environmental conditions.

Keywords: Dehydrin (DHN), gene expression, gene structure, gene characterisation, *in silico*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dehydrin (DHN) mã hóa các protein được xếp vào nhóm II của họ Late Embryogenesis Abundant protein (LEA) (Close, 1996). Các protein này đóng vai trò rất quan trọng trong việc bảo vệ tế bào trước quá trình mất nước (Rorat, 2006; Hanin et al., 2011).

Khối lượng phân tử của các DHN biến đổi trong một phạm vi rộng trong khoảng 9-200kD.

Các DHN được xác định đều có ái lực cao với nước, tính chất này giúp chúng giữ được nước ngay cả trong điều kiện tế bào mất nước mạnh. Phân mảnh K, đặc trưng cho các DHN, có khả năng tạo thành cấu trúc xoắn lưỡng cực, cấu trúc này giữ vai trò quan trọng trong sự tương tác của DHN với các màng và các protein (Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Bên cạnh đó, phân mảnh S, có mặt ở các DHN thuộc phân nhóm KnS, YnSKn và SKn, có chứa các axit

amin serine có khả năng bị phosphoryl hóa. Sự phosphoryl hóa này là một cơ chế quan trọng trong quá trình điều hòa sự gắn với cơ chất cũng như gắn với màng của các DHN (Hanin et al., 2011; Yang et al., 2012).

Đã có khá nhiều nghiên cứu được thực hiện để khám phá cấu trúc và chức năng của các DHN ở các thực vật thân cỏ kiểu mẫu như *Arabidopsis* (Hundertmark and Hinch, 2008), cây lúa (Wang et al., 2007). Tuy nhiên, cấu trúc và đặc điểm của DHN của cây thân gỗ mới chỉ được báo cáo gần đây ở cây nho (Yang et al., 2012) và cây dương (Liu et al., 2012), những cây có lá rụng vào mùa đông. Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới xác định cấu trúc và các đặc trưng vật lý và hóa học của các DHN ở cây quýt đường. Đồng thời, sự biểu hiện của các gen trong họ này cũng bước đầu được khảo sát.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Các đặc điểm hóa - lí

Các đặc điểm vật lí, hóa học của các gen/protein nghiên cứu được khảo sát nhờ các công cụ của ExPASy (Expert Protein Analysis System (Gasteiger et al., 2005)).

2.2. Cấu trúc không gian

Cấu trúc exon/intron được xây dựng nhờ công cụ GSDS 1.0 (Guo et al., 2007).

Cấu trúc không gian của phân tử protein được xây dựng nhờ Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009).

2.3. Dự đoán các vị trí phosphoryl hóa

Dự đoán các vị trí phosphoryl hóa của các protein bằng phần mềm Musite phiên bản trực tuyến (Gao et al., 2010).

2.4. Khảo sát sự biểu hiện gen

Sự biểu hiện của các gen được khảo sát bằng cách đếm số lượng EST trong các cơ sở dữ liệu tồn tại trên trang web NCBI (taxid:85681) nhờ chương trình TBLASTN.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm của các dehydrin của cây quýt đường

Các DHN của cây quýt đường có độ dài từ 297 tới 1259 nucleotit. Kích thước trình tự protein suy diễn có kích thước từ 98 tới 234 axit amin, tương ứng với khối lượng phân tử từ 11,1 kD tới 26,7 kD, trong đó, CcIDHN6 có kích thước nhỏ nhất (297 nucleotit, 98 amino acid), CcIDHN5 có trình tự gen dài nhất (1259 nucleotit) nhưng CcIDHN2 có chiều dài trình tự protein suy diễn lớn nhất (234 amino acid). Các CcIDHN có điểm đẳng điện (pI) dao động từ 5,44 tới 9,40 (Bảng 1). Trong đó, bốn DHN có tính axit yếu (CcIDHN1, CcIDHN2, CcIDHN4 và CcIDHN5), CcIDHN6 trung tính, riêng CcIDHN3 có tính kiềm mạnh. Cả sáu CcIDHN đều có tính ưa nước cao với các giá trị GRAVY nằm trong phạm vi từ -1,042 tới -1,857, trong đó CcIDHN6 có độ ưa nước cao nhất. Các chỉ số béo của các DHN ở cây quýt đường khá cao,

Bảng 1. Đặc điểm của các dehydrin ở cây quýt đường

Gen	Phân nhóm	Chiều dài gen/đoạn mã hóa	Kích thước protein suy diễn(aa)	Khối lượng phân tử protein suy diễn (kD)	pI	GRAVY	Chỉ số béo	Số intron	Vị trí khu trú dưới tế bào
CcIDHN1	KS	408/408	135	14,8	6,57	-1,587	43,26	0	Tế bào chất
CcIDHN2	SKn	834/705	234	26,7	5,62	-1,626	47,52	1	Tế bào chất
CcIDHN3	YnSKn	646/474	158	16,6	9,40	-1,141	36,46	1	Nhân/Tế bào chất
CcIDHN4	SKn	623/543	180	20,1	5,43	-1,382	50,56	1	Nhân
CcIDHN5	YnSKn	1259/624	208	22,0	6,15	-1,042	49,37	1	Nhân
CcIDHN6	KS	297/297	98	11,1	7,26	-1,857	37,76	0	Nhân

trong khoảng từ 36,46 tới 50,56. Chỉ số này đại diện cho thể tích tương đối bị chiếm bởi các axit amin có chuỗi bên béo như alanine, valine, leucine và isoleucine. Chỉ số này thường cao ở các protein bền nhiệt hơn so với các protein thường. Các kết quả về đặc điểm của các CcIDHN này phù hợp với các DHN của cây dương đã được báo cáo (Rorat, 2006; Hanin et al., 2011; Liu et al., 2012).

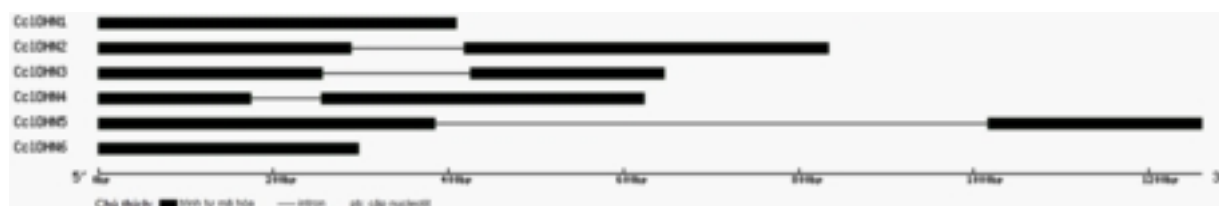
Các DHN của cây quýt đường có thể khu trú trong tế bào chất (CcIDHN1 và CcIDHN2) hoặc trong nhân tế bào (CcIDHN4, CcIDHN5 và CcIDHN6). Riêng CcIDHN3 có thể khu trú hoặc trong tế bào chất hoặc trong nhân tế bào.

3.2. Cấu trúc của các dehydrin của cây quýt đường

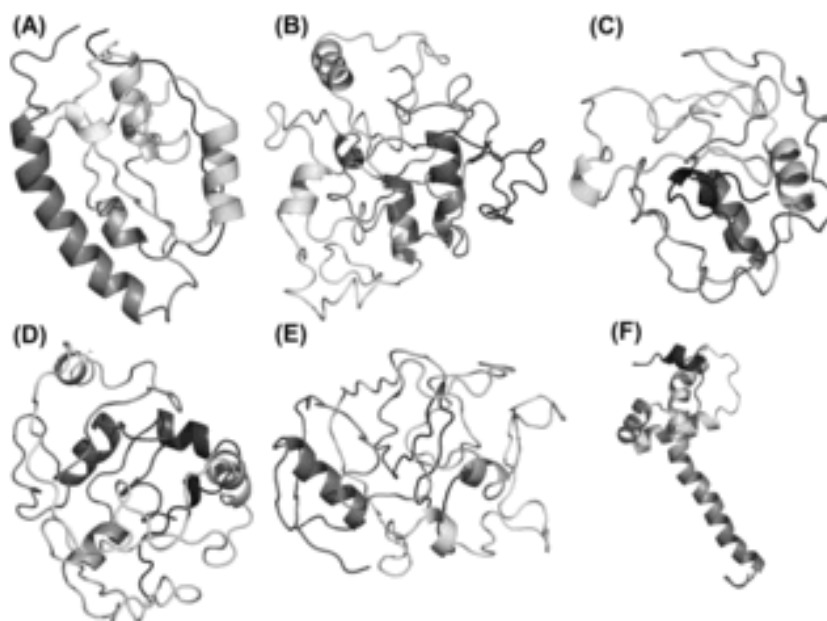
Xét về cấu trúc exon/intron (trình tự mã hóa/không mã hóa), chỉ hai gen *CcIDHN1* và

CcIDHN6 không có intron trong khi bốn DHN còn lại có một intron (*CcIDHN2*, *CcIDHN3*, *CcIDHN4* và *CcIDHN5*). Các intron của cả bốn gen này đều nằm bên trong vùng phân mảnh S và chia cắt hai exon của gen. Đặc điểm này cũng gặp ở các DHN của cây nho (Yang et al., 2012).

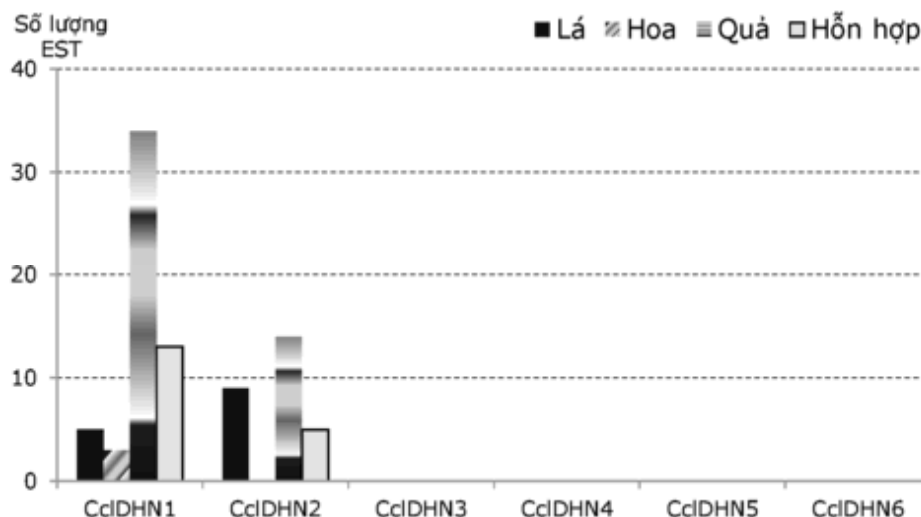
Cấu trúc không gian của các protein DHN của cây Quýt đường được xây dựng nhờ phần mềm Phyr2 phiên bản trực tuyến (Hình 2). Kết quả cho thấy, các DHN của cây quýt đường đều có các cấu trúc xoắn α lưỡng cực, cấu trúc rất phổ biến ở các DHN của các loài khác (Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Nhờ các cấu trúc xoắn α lưỡng cực, các DHN có khả năng tương tác với các phân tử protein khác hay các màng sinh học, từ đó thể hiện được chức năng bảo vệ của chúng (Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Trong đó, CcIDHN4 (Hình 2D) có sáu cấu trúc xoắn α , CcIDHN1 (Hình 2A) và CcIDHN2 (Hình 2B)



Hình 1. Cấu trúc exon/intron của các dehydrin ở cây quýt đường



Hình 2. Mô hình 3D cấu trúc bậc hai của các dehydrin của cây quýt đường



Hình 4. Kết quả khảo sát sự biểu hiện gen của các dehydrin của cây quýt đường

Bốn gen *CcIDHN3*, *CcIDHN4*, *CcIDHN5* và *CcIDHN6* không biểu hiện trong các mô và điều kiện thí nghiệm mà từ đó các EST được phân tích. Giữa hai gen *CcIDHN1* và *CcIDHN2*, gen thứ nhất biểu hiện mạnh hơn ở mô lá nhưng biểu hiện yếu hơn ở mô hoa và quả so với gen thứ hai. Kết quả tương tự cũng được quan sát trong trường hợp hỗn hợp của nhiều mô khác nhau trong cây. Các kết quả nghiên cứu về sự biểu hiện các gen DHN của cây quýt đường tương đồng với sự biểu hiện của nhiều gen DHN của các loài thực vật khác đã được báo cáo như ở cây đại mạch, cây thuốc lá và cây cà chua (Rorat et al., 2004; Rorat, 2006).

4. KẾT LUẬN

Trong công trình này chúng tôi đã xác định các đặc trưng của sáu gen *DHN* ở cây quýt đường. Các DHN này có kích thước phân tử nhỏ, khu trú trong nhân hoặc tế bào chất. Tất cả các DHN của cây quýt đường có ái lực nước mạnh. Hai DHN phân nhóm KS (*CcIDHN1* và *CcIDHN6*) không có intron trong khi bốn DHN còn lại có một intron nằm trong vùng mã hóa phân mảnh S. Tất cả 6 DHN nghiên cứu đều có các cấu trúc xoắn α lưỡng cực giúp chúng gắn được với các protein khác hoặc với các màng sinh học để thực hiện chức năng bảo vệ. Nhiều vị trí phosphoryl hóa được tìm thấy tại các axit

amin serin trong vùng phân mảnh S của các DHN của cây quýt đường. Chỉ hai *CcIDHN1* và *CcIDHN2* biểu hiện mạnh trong các mô lá và mô hoa, quả của cây quýt đường. Không phát hiện được sự hiện diện của các EST tương ứng với bốn DHN còn lại trong các mô trên trong điều kiện thí nghiệm. Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng, cung cấp các thông tin về đặc trưng và sự biểu hiện của một họ gen tham gia vào sự bảo vệ tế bào của cây quýt đường.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ chương trình nghiên cứu khoa học cơ bản của Trường Đại học Hùng Vương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Close T.J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97: 795-803.
- Gao J., Thelen J.J., Dunker A.K. and Xu D. (2010). Musite, a tool for global prediction of general and kinase-specific phosphorylation sites. *Mol. Cell Proteomics*, 9: 2586-2600.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Wilkins M.R., Appel R.D. and Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In* The proteomics protocols handbook. Springer, pp 571-607.

- Guo A.Y., Zhu Q.H., Chen X. and Luo J.C. (2007). GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan*, 29: 1023-1026.
- Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S. and Masmoudi K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1503-1509.
- Hundertmark M. and Hinch D.K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9: 118 doi: 10.1186/1471-2164-9-118.
- Kelley L.A. and Sternberg M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.*, 4: 363-371.
- Liu C.C., Li C.M., Liu B.G., Ge S.J., Dong X.M., Li W., Zhu H.Y., Wang B.C. and Yang C.P. (2012). Genome-wide Identification and Characterization of a Dehydrin Gene Family in Poplar (*Populus trichocarpa*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 848-859.
- Rorat T. (2006). Plant dehydrins - Tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 11: 536-556.
- Rorat T., Grygorowicz W.J., Irzykowski W. and Rey P. (2004). Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, 218: 878-885.
- Wang X.S., Zhu H.B., Jin G.L., Liu H.L., Wu W.R. and Zhu J. (2007). Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 172: 414-420.
- Yang Y., He M., Zhu Z., Li S., Xu Y., Zhang C., Singer S.D. and Wang Y. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biol.*, 12: 140 doi:10.1186/1471-2229-12-140.