

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GENE THAM GIA CON ĐƯỜNG SINH TỔNG HỢP CÁC HỢP CHẤT COUMARIN Ở CÂY *Arabidopsis thaliana* BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHUYỂN HÓA

IDENTIFICATION BY METABOLIC SCREENING OF GENES INVOLVED IN THE COUMARINS BIOSYNTHESIS PATHWAY OF *Arabidopsis thaliana*

Nguyễn Vũ Phong (*), Alain Hehn (**), Frédéric Bourgaud (**)

(*), Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm TP.HCM, Việt Nam

(**) Laboratoire Agronomie Environnement, ENSAIA-INPL Nancy, Pháp

ABSTRACT

Coumarins are secondary metabolites involved in the mechanism of response to stress and adaptation of plants to their environmental conditions. Although their important roles the coumarin biosynthesis pathway is poorly understood. The objective of this work was to carry out metabolic profiles of *Arabidopsis thaliana* mutants insertional and to try to characterize the *ortho*-hydroxylation step at the molecular level.

The HPLC (high performance liquid chromatography) analysis on 8 different mutants showed that 3 of them (CYP78A6, CYP84A4 and CYP706A2) exhibit 5 fold weaver scopoletin content than the wild-type. In order to test the implication of these P450 in the biosynthesis pathway, we cloned the genes and programmed to express the corresponding protein in a yeast expression system. As the genes seemed not to be constitutively expressed, plants were treated to enhance the expression level. We could amplify and clone CYP84A4 from mRNA extracted from plants treated by wounding after 1 and 4h, and by 2,4D after 24h. Yeast expression will now be performed for CYP84A4 and CYP706A2 and a metabolic screening will be realized.

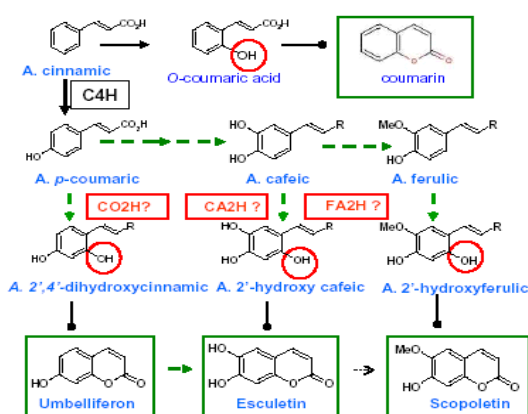
Key words: *Arabidopsis thaliana*; scopoletin; biosynthesis of coumarins; P450 cytochrome; heterologue expression.

MỞ ĐẦU

Coumarins là nhóm hợp chất thứ cấp có vai trò quan trọng trong cơ chế phản ứng với stress và sự thích ứng của cây đối với môi trường sống. Sự sinh tổng hợp của các chất này thường được kích thích bởi các stress do tác nhân sinh học hoặc không sinh học gây nên. Bên cạnh đó, các hợp chất này còn được sử dụng rộng rãi trong y học và sản xuất các loại mỹ phẩm. Mặc dù vậy, con đường sinh tổng hợp các hợp chất coumarin vẫn chưa được hiểu rõ. Ngày nay, việc nghiên cứu các enzyme tham gia trong con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, nhất là các cytochrome 450 (P450), nhằm cải

biến chúng theo hướng có lợi cho sản xuất đang rất được quan tâm (Bourgaud và *ctv.*, 2006).

Con đường sinh tổng hợp các chất coumarin xuất phát từ sự biến đổi cinnamic acid theo hai hướng. Hướng thứ nhất bắt đầu bởi sự hydroxylation vị trí thứ 2 (*ortho*) của nhân vòng thơm tạo ra coumarin được miêu tả trong chloroplast của cây *Melilotus alba* (Kindl, 1971; Gestetner và Conn, 1974) và trong các microsome ở cây cà chua (Czichi và Kindl, 1975). Con đường thứ hai bắt đầu bởi sự hydroxylation cinnamic acid tại vị trí thứ 4 nhân vòng thơm bởi cinnamate-4-hydroxylase, một monooxygenase trong gia đình các P450. Phản ứng này là điểm khởi đầu của các con đường tổng hợp các phenylpropanoids như các coumarins, flavonoids, lignins. Scopoletin, esculetin và umbelliferon được tạo ra đầu tiên bởi phản ứng *ortho*-hydroxylation tuần tự các ferulic acid, cafeic acid và 2',4'-dihydroxycinnamic acid và phản ứng lactonization ngẫu nhiên (Bourgaud và *ctv.*, 2006).



Hình 1. Một phần con đường sinh tổng hợp các coumarin ở thực vật bậc cao (Theo Bourgaud và *ctv.*, 2006)

Ở cây *Arabidopsis thaliana*, Kai và *ctv.*, (2006) đã phát hiện lượng umbelliferon ở dạng vết và scopoletin cùng với scopolin với số lượng lớn bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC (High performance liquid chromatography). Để xác định gene mã hóa cho enzyme xúc tác phản ứng *ortho*-

hydroxylation, trong phạm vi của nghiên cứu này, 8 dòng *Arabidopsis thaliana* đột biến bằng phương pháp chuyển T-DNA (phương pháp knockout gen) được định lượng umbelliferon và scopoletin bằng phương pháp HPLC. Những cá thể đột biến không có sự hiện diện của scopoletin và/hoặc umbelliferon được ghi nhận. Tiếp đó, việc dòng hóa các gen bất hoạt này trong nấm men nhằm xác định đặc điểm sinh hóa của các enzym P450 tương ứng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây của 8 dòng *Arabidopsis* đột biến bằng chuyển đoạn T-DNA được sử dụng để định lượng scopoletin và umbelliferon bằng phương pháp HPLC. Các gene nghiên cứu được nhân dòng trong vi khuẩn *E.coli* TOP10 nhờ plasmid pCR\GW\TOPO và vi khuẩn *E.coli* XL1-Blue nhờ plasmid pYeDP60, dùng biểu hiện hoạt tính các P450 trong nấm men. Dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* WAT10 được dùng để nghiên cứu sự biểu hiện các P450 trong microsome.

Định lượng scopoletin & umbelliferon bằng HPLC

Cây được làm kiệt nước trước khi nghiền thành bột mịn. Ủ bột với dung dịch ethanol và nước (50:50) trong 2h ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm dung dịch 10.000 vòng trong 10 phút. Dịch nổi được thu nhận và lọc qua màng lọc 2µm trước khi phân tích bằng HPLC. Hai dung môi là nước + 0,1% trifluoroacetic acid và acetonitrile được sử dụng.

Ly trích DNA, RNA và tổng hợp cDNA

DNA tổng số và RNA được ly trích bằng cách nghiền cây con trong nitor lỏng, sau đó ly trích và tinh sạch với kit DNeasy Plant Mini Kit và RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Dùng DNase để loại bỏ DNA tạp nhiễm trong RNA ly trích. Chất lượng của DNA và RNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

cDNA được tổng hợp bằng SuperScript First-Strand DNA Synthesis Kit (Invitrogen) với 12µl RNA, 1µl 10mM dNTP Mix, 1µl Random primers (3µg.µl⁻¹) ủ 5 phút ở 65°C trong máy Thermocycler Bio-Rad. Sau đó 4µl 5X First Strand Buffer, 1µl 0,1M DDT và 1µl 200U/µl SuperScriptTMIII Reverse transcriptase được thêm vào hỗn hợp và ủ ở 25°C 5 phút; 50°C 1h. Sự bất hoạt phản ứng được thực hiện ở 70°C trong 15 phút.

Phản ứng PCR

Các đoạn primer được sử dụng có trình tự được thiết kế bổ sung các site restriction phục vụ cho

việc tái tổ hợp gen quan tâm trong plasmid pYeDP60. Phản ứng PCR được thực hiện với 1µl DNA mẫu; 5µl 10X Amplification Buffer; 1µl dNTP Mix 10mM; 1,5µl MgCl₂ 50mM; 5µl primer forward/reverse 10µM; 1µl *Taq* DNA polymerase 5U.µl⁻¹; 30,5µl nước. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR bao gồm: 95°C 5 phút; (95°C 30s; 50°C 45s; 72°C 90s) lặp lại 35 lần và 72°C 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dịch đệm TAE.

Kích thích sự biểu hiện của các gen nghiên cứu

Những cây hoang dại bị gây vết thương bởi một kẹp gỗ ở 3 vị trí trên mỗi lá. Tương tự jasmonic acid 100µM, salicylic acid 100µM và 2,4D (acid dichloro 2,4 phenoxy acetic) 250µM cũng được phun lên lá. Mẫu được thu nhận để đo hàm lượng scopoletin bằng HPLC và ly trích RNA.

Cloning

4µl sản phẩm PCR được ủ với 1µl vector pCP8/GW/TOPO (1µl/rxn), 1µl Salt solution (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) qua đêm ở nhiệt độ phòng. 3µl sản phẩm nối được ủ với các tế bào vi khuẩn khả nạp TOP10 theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Các dòng vi khuẩn màu trắng được tăng sinh và plasmid được thu nhận bằng Kit EZNATM Plasmid Miniprep (Omega). Để xác định những dòng vi khuẩn tái tổ hợp, 5µl plasmid được ủ với 1µl enzyme *Eco*RI hoặc *Hind*III trong 2µl buffer 10X REACT®3 hoặc 10X REACT®2 (Invitrogen) và 12µl nước cất ở 37°C trong 1h, kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Thu nhận các đoạn DNA bằng cách ủ 33µl plasmid với 3µl enzyme *Bgl*II hoặc *Bam*HI và 4µl buffer 10X REACT®3 ở 37°C trong 1h. Một phản ứng cắt được thực hiện tiếp theo với 20µl plasmid, 3µl *Eco*RI hoặc *Kpn*I trong 3µl buffer 10X REACT®3 hoặc 10X REACT®4 trong 1h, ở 37°C sau đó sản phẩm được điện di trên gel agarose 1%. Các đoạn DNA được thu nhận và tinh sạch bằng Kit QIAquick Gel Extraction. Phản ứng nối 35µl DNA thu nhận với 9µl pYeDP60 được thực hiện nhờ 1µl T4 ligase (400U.µl⁻¹) trong 5µl buffer 10X ở 14°C qua đêm. 1µl hỗn hợp nối được đặt trong 40µl dịch vi khuẩn XL1-Blue và ủ lạnh trong 1 phút. Việc chuyển các plasmid tái tổ hợp vào các tế bào vi khuẩn XL1-Blue được tiến hành với dòng xung điện (V = 2,5 kV; R = 200 (; C = 25 µF) của máy micropulser Bio-Rad trước khi thêm 500µl môi trường LB. Sau 30 phút ủ ở 37°C, dịch vi khuẩn được trải trên môi trường LB có thêm ampicilline (100µg.ml⁻¹). Sau 1 đêm ở 37°C, các dòng vi khuẩn được cấy chuyển và tăng sinh trong 2ml môi trường chọn lọc LB bổ sung ampicilline. Các plasmid tái tổ hợp được ly trích bằng Kit EZNATM Plasmid Miniprep (Omega).

Chuyển gen vào nấm men.

Ủ 50µl tế bào nấm men khả nạp với 50µl AcLi 100mM/TE 1X hòa tan trong PEG 4000 (50%), 10µl DNA trứng cá hồi (10mg.ml⁻¹) trong 30 phút ở 100°C và 10µl plasmid tái tổ hợp. Sau đó tube được ủ 30 phút ở 30°C kết hợp với lắc nhẹ, tiếp đó ủ 15 phút ở 42°C trước khi đặt trên đá trong 2 phút. Các tế bào nấm men được thu nhận bằng ly tâm và rửa bằng nước cất, sau đó hòa trong 300 µl môi trường YPGA và ủ 2h ở 30°C. Sau đó các tế bào nấm men được hòa trong 500µL môi trường chọn lọc SGI và trải trên các đĩa chứa môi trường này ở 30°C. Sự xuất hiện của các dòng nấm men biến đổi gen được quan sát khoảng 3 ngày nuôi cấy. Ly trích microsome được tiến hành tiến hành theo phương pháp của Pompon và *ctv.*, 1996.

Xác định đặc tính sinh hóa của enzyme tương ứng

Ủ các microsome với các cơ chất: cinnamic acid; *o*-coumaric acid; *p*-coumaric acid; ferulic acid; herniarine; umbelliferon; scopoletin; esculetin với sự có mặt của 1mM NADPH. Phần dịch nổi được thu nhận và lọc qua màng 0,2µm sau đó được phân tích bằng HPLC nhằm xác định vai trò của enzyme tương ứng.

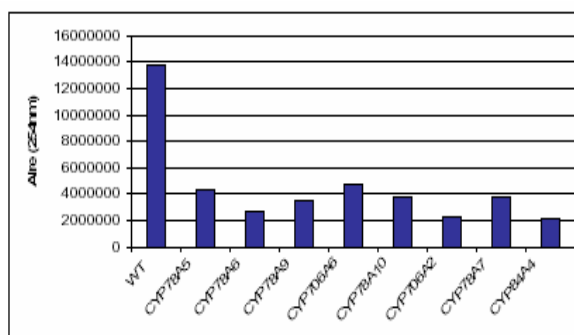
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu các cá thể đột biến có tiến trình tổng hợp scopoletin và umbelliferon khác với cây hoang dại

Dùng 50; 100; 200mg bột hòa tan lần lượt trong 1,5; 1; 1ml hỗn hợp nước: ethanol (50: 50 (v/v)). Với 100mg bột hòa tan trong 1ml dung môi cho kết quả phân tích tốt nhất. Công thức này được dùng để định lượng scopoletin và umbelliferon.

Kết quả phân tích bằng HPLC cho thấy không có sự xuất hiện của umbelliferon ở tất cả các mẫu

phân tích. Ngược lại, scopoletin được xác định hiện diện ở tất cả các mẫu và có sự khác biệt khoảng 5 lần giữa cá thể hoang dại và các cá thể đột biến. Điều này có thể liên quan đến việc sử dụng loài hoang dại được cung cấp từ IBMP Strassbourg trong khi các cá thể đột biến được cung cấp từ NASC. Kết quả so sánh giữa các cá thể đột biến cho thấy có sự giảm rõ rệt hàm lượng scopoletin ở 3 cá thể: CYP706A2; CYP78A6; CYP84A4. Nếu những gen này nằm trong con đường tổng hợp scopoletin, chúng tỏ có nhiều con đường trung gian khác tham gia vào quá trình tổng hợp các chất coumarin (Hình 1). Để kiểm tra giả thuyết này, 3 gene mã hóa cho các P450 nói trên được nghiên cứu phân lập và nhân dòng, sau đó được biểu hiện trong hệ thống nấm men. Điều này cho phép xác định vai trò các enzyme thông qua các thí nghiệm chọn lọc sinh hóa.



Hình 3. Hàm lượng scopoletin của cây *Arabidopsis* hoang dại và các dòng đột biến

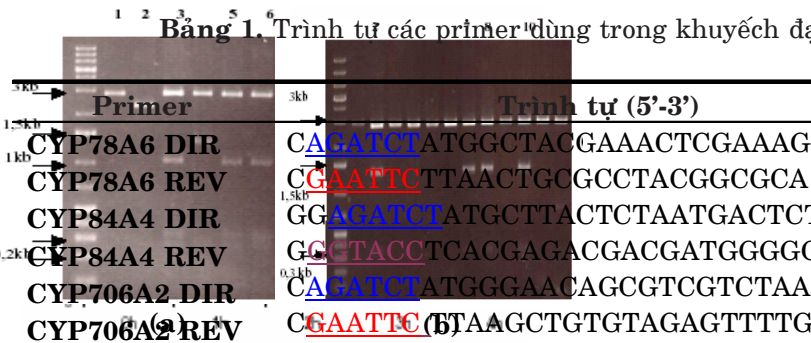
Khuếch đại các gen bằng phương pháp PCR

Do gene mã hóa cho CYP706A2 không chứa intron, việc khuếch đại gen này từ DNA genomic được thực hiện nhờ vào 2 primer miêu tả ở bảng 1 có bổ sung các site restriction cho phép thực hiện việc dòng hóa gen trong plasmid pYeDP60 biểu hiện trong nấm men. Ngược lại với gen mã hóa CYP706A2 (Hình 5a), các gen mã hóa cho CYP84A4 và CYP78A6 có chứa các intron. Việc khuếch đại các gen này được thực hiện từ mRNA.

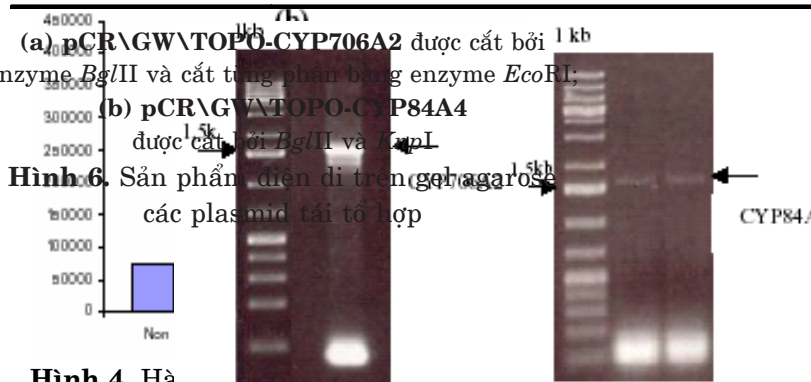
Mặc dù các điều kiện của phản ứng PRC đã được tối ưu hóa nhưng không tổng hợp được gen mã hoá cho CYP78A6 và CYP84A4 từ mRNA do các gen này có thể biểu hiện yếu hoặc không biểu hiện. Ở *Arabidopsis*, những biện pháp như gây vết thương, sử dụng dịch chiết của nấm bệnh và các hóa chất đã cho phép kích thích sự biểu hiện các gene mã hóa P450 và phân tích ở mức độ dịch mã con đường tổng hợp các chất phenylpropanoid (Carbello-Hurtado và *ctv.*, 1998; Bednarek và *ctv.*, 2005; Kai và *ctv.*, 2006). Để kích thích sự thể hiện của các gen, các cây con *Arabidopsis* được xử lý bằng cách gây vết thương và một số hóa chất.

Theo kết quả phân tích, hàm lượng scopoletin ở cây xử lý bằng cách tạo vết thương trên lá sau 1 (1) và 2h thấp hơn ở cây không xử lý (Hình 4a). Ngược lại, sau 3 và 4h, hàm lượng scopoletin tăng lên. Đối với các cây xử lý bằng các hóa chất có sự tăng rõ rệt lượng scopoletin (Hình 4b). Đặc biệt khi xử lý bằng 2,4D (2), lượng scopoletin tăng gấp 5 lần so với cây không xử lý. 1µl cDNA tổng hợp từ RNA ly trích từ (1) và (2) cho thể tích phản ứng PCR cuối cùng là 50µl với Plantinum *Taq* polymerase đã thu được sản phẩm PCR của gen CYP84A4 có kích thước khoảng 1,5kb (Hình 5b). Mặc dù các điều kiện phản ứng PCR đã được tối ưu hóa nhưng gen mã hóa cho CYP78A6 vẫn chưa được nhân dòng.

Nhân dòng các gene nghiên cứu trong tế bào vi khuẩn TOP10



Sản phẩm PCR gen mã hóa cho CYP706A2 được nối với vector pCR8/GW/TOPO và các plasmid được chuyển vào tế bào vi khuẩn TOP10. Có 3 dòng vi khuẩn cho hiệu quả 4 band với kích thước mong muốn khoảng 2799bp; 1011bp; 324bp; 264bp (Hình 6). Trình tự đối với gen mã hóa cho CYP84A4 có 4 dòng vi khuẩn thể hiện 3 band mong muốn là 2799bp; 1236bp; 321bp (Hình 6b).

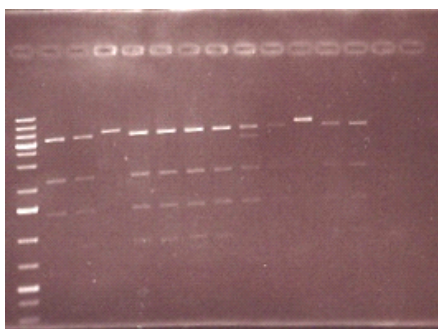


Hình 4. Hà (a) bằng vết thương và (b) chất hóa học

Hình 5. Điện di trên gel agarose sản phẩm PCR của gen mã hóa CYP706A2 và CYP84A

Dòng hóa các gen trong tế bào vi khuẩn XL10-Blue

Các đoạn gen mã hóa cho CYP706A2 và CYP84A4 được nối với plasmid pYeDP60 và nhân dòng trong tế bào vi khuẩn XL1-Blue. Kiểm tra bằng enzyme cắt *Hind*III (Hình 7) cho thấy các dòng vi khuẩn 2; 4; 5; 6; 7 thể hiện 7 band mong đợi: 5608bp; 2239bp; 1371bp; 869bp; 312bp; 308bp; 139bp mang gen mã hóa cho CYP706A2. Plasmid tái tổ hợp pYeDP60-CYP706A2 thu được tiếp tục chuyển vào trong nấm men WAT11. Các dòng mang gen mã hóa cho CYP84A4 vẫn đang được kiểm tra.



Hình 7. Kết quả điện di trên gel agarose của các plasmid pYeDP60-CYP706A2 cắt bằng enzyme *Hind*III.

Xác định đặc tính sinh hóa của enzyme tương ứng

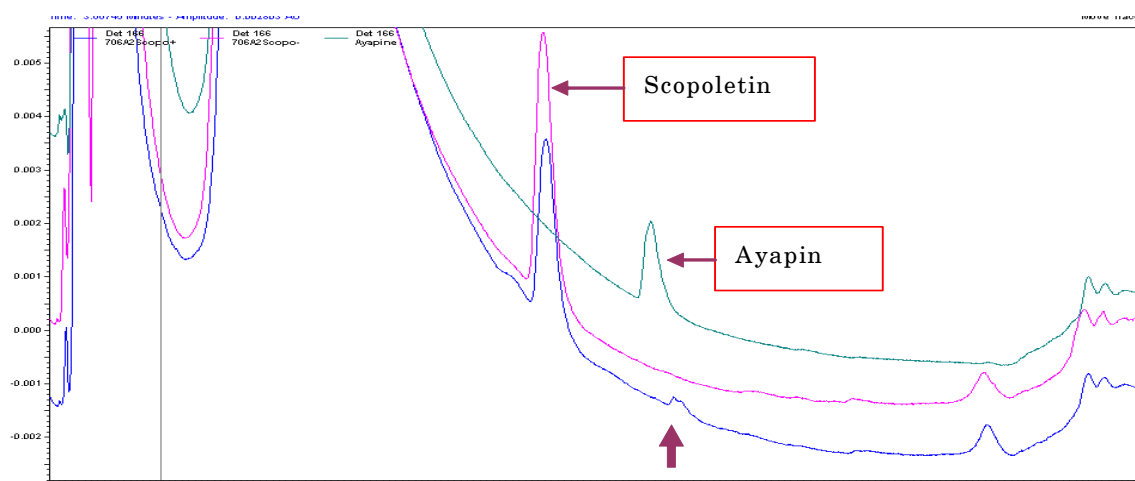
Dịch chiết của vi thể nấm men khi ủ với các cơ chất như cinnamic acid; *o*-coumaric acid; *p*-

coumaric acid; ferulic acid; herniarine; umbelliferon; esculetin với sự có mặt của 1mM NADPH khi phân tích bằng HPLC không thấy bất cứ phản ứng chuyển hóa nào xảy ra. Với cơ chất là scopoletin, kết quả cho thấy có sự xuất hiện của một pic gần giống như pic thể hiện của ayapin (hình 8). Thí nghiệm này cần phải được lặp lại với các nồng độ scopoletin khác nhau và xác định cấu trúc phân tử được tạo ra trong quá trình chuyển hóa để xác định vai trò của enzyme CYP706A2.

KẾT LUẬN

Trong khuôn khổ nghiên cứu các gen mã hóa các P450 có khả năng tham gia con đường tổng hợp các chất coumarins ở cây *Arabidopsis*, chúng tôi quan tâm đến giai đoạn *ortho*-hydroxylation của *p*-coumaric acid. Kết quả phân tích cho thấy chất umbelliferon không xuất hiện ở tất cả các mẫu. Ngược lại hàm lượng chất scopoletin đo được ở các cây CYP78A6, CYP84A4, CYP706A2 nhỏ hơn 5 lần so với cây hoang dại.

Gene mã hoá cho CYP706A2 được khuếch đại bằng PCR từ DNA geneomic. Gene mã hoá cho CYP84A4 được khuếch đại từ mRNA các cây bị gây stress bằng vết thương và các chất hoá học. Gene mã hoá cho CYP78A6 vẫn chưa thể dòng hóa được trong khuôn khổ nghiên cứu này. Hai gene mã hoá cho CYP706A2 và CYP84A4 đã được nhân dòng và biểu hiện trong nấm men. Việc xác định vai trò của enzyme CYP706A2 vẫn đang tiếp tục tiến hành.



Hình 8. Phân tích bằng HPLC khi ủ các microsome CYP706A2 với scopoletin và NADPH

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bednarek P., Schneider B., Svatos A., Oldham N., Hahlbrock K., 2005. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* 138, 1058–1070
- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U., 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev* 5, 293–308.
- Cabello-Hurtado F., Durst F., Jorriin J.V., Werck-Reichhart D., 1998. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry*, 49, 1029-1036.
- Czichi U., and Kindl H., 1975. Formation of *p*-coumaric acid and *o*-coumaric acid from *l*-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: Evidence of membrane-bound enzyme complexes. *Planta* 125, 115–125.
- Estévez-Braun A. and Gonzalez A.G., 1997. Coumarins. *Natural Product Reports*, 465-475
- Gestetner B, Conn E.E., 1974. 2-hydroxylation of trans-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba*. *Arch Biochem Biophys* 163, 617–624.
- Kai K., Shimizu B., Mizutani M., Watanabe K., Sakata K., 2006. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67, 379–386.
- Kindl H., 1971. *Ortho*-hydroxylation of aromatic carboxylic acids in higher plants. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 352: 78–84
- Pompon D., Louerat B., Bronnie A., Urban P., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Method Enzymol*, 272, 51-64.