

Phân tích *in Silico* họ gen Glutamate dehydrogenase ở cây đậu tương (*Glycine max* L.)

Cao Phi Bằng*

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ, Việt Nam

Nhận ngày 30 tháng 3 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 16 tháng 4 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 6 năm 2017

Tóm tắt: Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2~4) là enzyme xúc tác phản ứng thuận nghịch khử amin hóa glutamate tới α -ketoglutarate hoặc 2-oxoglutarate. Chúng tôi xác định được mười gen mã hóa GDH trong hệ gen của cây đậu tương. Các protein GDH suy diễn có kích thước 637 hoặc 411 amino acid, ngoại trừ GmGDH06. Phân tích cây phá hệ được xây dựng từ các GHD của đậu tương và các cây khác cho thấy các GDH của đậu tương được xếp vào hai nhóm, hai gen nhóm I và tám gen nhóm II. Các protein nhóm II có motif bảo thủ tín hiệu khu trú ti thể, motif bảo thủ gắn cơ chất đặc hiệu α -ketoglutarate và vùng gắn đặc hiệu coenzyme NADH. Các protein nhóm I cũng có vùng gắn cơ chất đặc hiệu nhưng có vùng gắn coenzyme NADPH. Sự biểu hiện của các gen GDH của cây đậu tương khác nhau ở các mô khác nhau. Bốn gen *GmGDH03*, *GmGDH04*, *GmGDH05* và *GmGDH07* biểu hiện ở tất cả các mô ở tất cả các giai đoạn phát triển được nghiên cứu. Các *GmGDH* biểu hiện ở mô sinh sản mạnh hơn ở mô sinh dưỡng, ngoại trừ *GmGDH06*, gen biểu hiện đặc hiệu ở nốt sần.

Từ khóa: Glutamate dehydrogenase, biểu hiện gen, cây phá hệ, đặc trưng của gen, đậu tương.

1. Mở đầu

Đậu tương (*Glycine max*) là một trong những cây trồng quan trọng nhất và được trồng nhiều nơi trên thế giới. Hạt đậu tương chứa nhiều protein và dầu. Đậu tương là thực phẩm có lợi cho sức khỏe [1, 2]. Một đặc điểm đáng chú ý là loài cây này còn có khả năng cố định nitơ tự do trong khí quyển nhờ hệ vi sinh vật cộng sinh trong bộ rễ của chúng. Nhờ giá trị cao, hệ gen của đậu tương đã được giải trình tự xong vào năm 2010 bởi tập thể các nhà khoa học Mỹ dẫn đầu bởi Stacey (Trung tâm Quốc

gia về Công nghệ sinh học), Shoemaker (Nhóm nghiên cứu côn trùng trên cây ngũ cốc và Di truyền cây nông nghiệp USDA-ARS), Jackson (Khoa Nông học, Đại học Purdue), Schmutz (Trung tâm giải trình tự hệ gen HudsonAlpha), và Rokhsar (Viện nghiên cứu hệ gen). Phiên bản hệ gen của cây đậu tương hiện có kích thước xấp xỉ 975 Mb, gồm có 20 nhiễm sắc thể [3].

Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2~4) là enzyme xúc tác phản ứng thuận nghịch khử amin hóa glutamate tới α -ketoglutarate hoặc 2-oxoglutarate nhờ sử dụng NADH hoặc NADPH như là coenzyme [4]. GDH có ở khắp các sinh vật từ vi khuẩn đến các sinh vật nhân chuẩn. Ở thực vật, enzyme này rất phong phú và có mặt ở nhiều cơ quan,

*ĐT.: 84-904922412.

Email: phibang.cao@hvu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4503>

định khu ở ti thể, lục lạp và dịch bào [4]. Glutamate dehydrogenase tham gia vào quá trình đồng hóa NH_4^+ ở thực vật cùng với hệ thống GS/GOGAT. Enzyme này tham gia vào sự cân bằng glutamate nội mô, amino acid giữ vai trò trung tâm trong nhiều quá trình trao đổi chất [5, 6]. Các GDH thường liên quan tới tính chống chịu của thực vật thông qua cân bằng N/C của thực vật [7]. Về cấu trúc, các GDH có mang hai vùng bảo thủ đặc trưng là vùng gắn Glutamate và vùng gắn NAD(P) [8]. Nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng ở thực vật có ít nhất hai gen mã hóa cho GDH, một mã hóa cho dưới đơn vị α và một mã hóa cho dưới đơn vị β , hai dưới đơn vị này kết hợp với nhau theo các tỉ lệ khác nhau có thể tạo thành 7 dạng isozyme khác nhau [9]. Các họ GDH đã được phân tích ở *Arabidopsis* [10], ở lúa [11], ở cà chua [12]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về sự điều hòa biểu hiện của các gen *GDH* còn chưa nhiều. Đến nay, sự biểu hiện của *GDH* được biết là có đáp ứng với các tác nhân bất lợi vô sinh như hạn, mặn, nhiệt độ, kim loại nặng và sự thiếu carbon [5, 13, 14]. Rất gần đây, sự biểu hiện của các gen *GDH* trong quá trình chín của quả cà chua cũng được báo cáo [12, 15]. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu toàn diện về họ gen *GDH* trên quy mô hệ gen của cây đậu tương, loài cây có khả năng cố định N_2 .

Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới việc xác định các gen mã hóa cho các GDH trong hệ gen của cây đậu tương. Đồng thời chúng tôi trình bày các kết quả phân tích về các đặc tính hóa-lí và cấu trúc cũng như sự biểu hiện của các gen này thông qua phân tích kết quả RNAseq (giải trình tự ARN).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Cơ sở dữ liệu về các trình tự hệ gen và RNAseq ở cây đậu tương

Trình tự hệ gen của cây đậu tương được lấy từ Schmutz et al. (2010) [3]. Dữ liệu RNAseq được lấy từ Severin et al. (2010) [16].

2.2. Xác định các gen thuộc họ GDH ở cây đậu tương

Các protein GDH của cây *Arabidopsis thaliana* [7, 10, 14, 17, 18] được dùng làm khuôn dò để tìm kiếm các gen tương đồng trên toàn hệ gen của cây đậu tương nhờ chương trình TBLASTN.

2.3. Xây dựng cây phả hệ

Cây phả hệ được xây dựng từ các protein GDH nghiên cứu nhờ phần mềm MEGA5 [19] sau khi chúng được sắp dây bằng MAFFT [20].

2.4. Phân tích các đặc điểm hóa - lí

Các đặc điểm vật lí, hóa học của các gen/protein được phân tích bằng các công cụ của ExPASy [21]. Cấu trúc exon/intron được xây dựng nhờ GSDS 2.0 [22].

2.5. Khảo sát sự biểu hiện gen

Sự biểu hiện của các gen được phân tích qua kết quả RNAseq (giải trình tự tập hợp ARN thông tin) của cây đậu tương [16]

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định họ gen GDH ở cây đậu tương và đặc điểm của chúng

Khi sử dụng chương trình TBLASTN với khuôn dò là các protein GDH của *A. thaliana*, chúng tôi đã xác định các GDH của cây đậu tương là một họ đa gen nhỏ với 10 gen. Protein suy diễn của các gen này mang vùng bảo thủ tương ứng với mã số PF02812 và PF00208 trong ngân hàng gen. Đây vốn là hai vùng bảo thủ đặc trưng cho các GDH đã biết. So về kích thước của họ gen, cây đậu tương có họ GDH lớn hơn so với của cây *A. thaliana*, cây cà chua và cây lúa. Thực vậy, số lượng gen *GDH* được báo cáo của các loài trên chỉ là 4 gen [11, 12, 18].

Các đặc điểm vật lí của các gen và protein suy diễn được thể hiện trong bảng 1. Các gen này quy định các protein có kích thước rất gần

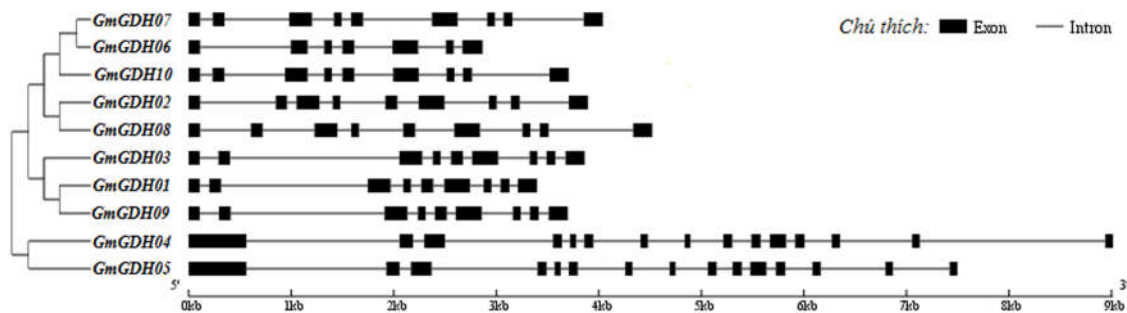
nhau, có độ dài 411 và 412 amino acid, ngoại trừ GmGDH04, GmGDH05 và GmGDH06. Hai protein đầu có 637 amino acid trong khi protein thứ ba chỉ có 330 amino acid. Ngoại trừ ba protein này, các protein khác có khối lượng dao động khoảng 44,5 kD, gần giống với các GDH đã biết của *Bryopsis maxima* [23], *Nicotiana plumbaginifolia* [24], *A. thaliana* [10]. Các

protein GDH của cây đậu tương có tính axit yếu đến trung tính.

Các gen *GDH* của cây đậu tương mã hóa không liên tục, trong gen có từ 6 tới 14 intron (hình 1). Gen *GmGDH06* có 6 intron, hai gen *GmGDH04* và *GmGDH05* có 14 intron, các gen còn lại có 8 intron. Đặc điểm này giống với các gen *GDH* của cây cà chua [12].

Bảng 1. Các gen thuộc họ GDH của cây đậu tương và đặc điểm của chúng

Gen	Tên locus	Kích thước gen/CDS (bp)	Chiều dài protein (aa)	Khối lượng protein (kD)	pI	Nhiễm sắc thể	Số lượng intron
<i>GmGDH01</i>	Glyma01g41310	3397/1236	411	44,86	5,97	01	8
<i>GmGDH02</i>	Glyma02g07940	3894/1236	411	44,45	6,39	02	8
<i>GmGDH03</i>	Glyma05g05460	3862/1239	412	44,88	6,15	05	8
<i>GmGDH04</i>	Glyma07g01510	9015/1914	637	71,35	6,91	07	14
<i>GmGDH05</i>	Glyma08g20930	7498/1914	637	71,31	6,54	08	14
<i>GmGDH06</i>	Glyma11g16320	2867/993	330	36,17	5,72	11	6
<i>GmGDH07</i>	Glyma16g04560	4039/1236	411	44,55	6,04	16	8
<i>GmGDH08</i>	Glyma16g26940	4521/1236	411	44,52	6,28	16	8
<i>GmGDH09</i>	Glyma17g15740	3698/1239	412	44,71	6,09	17	8
<i>GmGDH10</i>	Glyma19g28770	3706/1236	411	44,53	5,97	19	8



Hình 1. Cấu trúc exon/intron của các gen GDH của cây đậu tương.

3.2. Các motif bảo thủ của các GDH ở cây đậu tương

Sự sắp dãy các protein GDH của cây đậu tương cho phép phát hiện các motif bảo thủ của chúng. Các motif bảo thủ được đánh dấu trong khung hoặc được tô màu nền (hình 2). Ở đầu amin (N-terminal), các GDH của cây đậu tương có mang motif bảo thủ là peptide tín hiệu định

hướng protein vào trong ti thể (đóng khung nét đứt), ngoại trừ GmGDH04 và GmGDH05. Motif gắn đặc hiệu cơ chất α -ketoglutarate (được đóng khung nét liền) có ở tất cả các GDH. Vùng gắn NAD(P)H được tô nền xám, trong đó, GmGDH04 và GmGDH05 có vùng gắn đặc hiệu NADPH (GxGx2Ax10G), các protein còn lại của cây đậu tương có vùng gắn đặc hiệu NADH (GxGx2Gx10G). Các Motif

bảo thủ này của các GmGDH tương đồng cao với các GDH của một số loài thực vật khác như lúa [11] thuốc lá [24], cà chua [12]. Kết quả sắp dãy các protein cũng cho phép phát hiện vùng bị xóa ở GmGDH06. Vùng này nằm giữa hai

motif peptide tín hiệu định hướng protein vào trong ti thể và motif gắn đặc hiệu cơ chất (hình 2). Vùng bị mất này giải thích tại sao *GmGDH06* có kích thước ngắn hơn và có số lượng intron ít hơn các GmGDH khác.

```

GmGDH01 MNALAAATNRNFRRAAHILGLD$TK---LENSLLIPFREIKVECTIPKDDGTLVSVYGFRIQ
GmGDH03 MNALAAATNRNFQRAARILGLD$SK---LEKSLIPFREVKVECTIPKDDGTLVSVYGFRIQ
GmGDH09 MNALAAATNRNFQRAARILGLD$SK---LEKSLIPFREIKVECTIPKDDGTLVSVYGFRIQ
GmGDH02 MNALAAATNRNFRLASRLLGLD$SK---LEKSLIPFREIKVECTIPKDDGSLATFVGFRIQ
GmGDH08 MNALAAATNRNFRLASRLLGLD$SK---LEKSLIPFREIKVECTIPKDDGSLATFVGFRIQ
GmGDH07 MNALAAATNRNFKLASRLLGLD$SK---LEKSLIPFREIKVECTIPKDDGTLQSVYGFRIQ
GmGDH10 MNALAAATNRNFKLASRLLGLD$SK---LEKSLIPFREIKVECTIPKDDGTLQSVYGFRIQ
GmGDH06 MNALAAATNRNFNLSRLLGLD$SK---LEKSLIPFREIK-----
GmGDH04 VEFIQAVQEAHQALERVIKNSRYINIMERLLEPERMIVFRVSWVDDRRGTCVNRGFRVQ
GmGDH05 VEFIQAVQEAHQALERVIKNSRYINIMERLLEPERMIVFRVSWVDDRRGTCVNRGFRVQ
: : * . . . . : : : : : : * * * * :

GmGDH01 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVADIPYGGAKGGIGCNPRDLSVSEL
GmGDH03 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVADIPYGGAKGGIGCNPRDLSISEL
GmGDH09 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVADIPYGGAKGGIGCNPRDLSISEL
GmGDH02 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVANTIPYGGAKGGIGCDPAKLSVSEL
GmGDH08 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVANTIPYGGAKGGIGCDPAKLSVSEL
GmGDH07 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVANTIPYGGAKGGIGCDPAELISEL
GmGDH10 HDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVANTIPYGGAKGGIGCDPAELISEL
GmGDH06 -----ATNIPYGGAKGGIGCDPAELISIFEL
GmGDH04 FNQSMGPCRGGIRFHPSMNLVAKFLGFQTLKNALSPYKLGGAAGGSDFDKGKSDNEI
GmGDH05 FNQSMGPCRGGIRFHPSMNLVAKFLGFQTLKNALSPYKLGGAAGGSDFDKGKSDNEI
: : * * * * . : * : * :

GmGDH01 ERLTRVFTQKIHDLIGIQRDVPAPDMGTNSQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIDLGG
GmGDH03 ERLTRVFTQKIHDLIGIQRDVPAPDMGTNAQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIDLGG
GmGDH09 ERLTRVFTQKIHDLIGVQRDVPAPDMGTNAQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIDLGG
GmGDH02 ERLTRVFTQKIHDLIGVQTDVPAPDMGTGQPQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIELGG
GmGDH08 ERLTRVFTQKIHDLIGVQTDVPAPDMGTGQPQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPVELGG
GmGDH07 ERLTRVFTQKIHDLIGTHTDVPAPDMGTGQPQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIDLGG
GmGDH10 ERLTRVFTQKIHDLIGTHTDVPAPDMGTGQPQTMAWILDEYSKFHGHSPAVVTGKPIDLGG
GmGDH06 DRLTRVFTQKIHDLIGTHTDVPAPYMGTPGQPQTMAWILDEYSKFHGHSPVVTGKPIDLGG
GmGDH04 MRFCQSFMSERYRGLGPKDLPSEEMGVGTREMGYLFQYRRLAGHFQGSFTGPRI FWSG
GmGDH05 MRFCQSFMSERYRGLGPKDLPSEEMGVGTREMGYLFQYRRLAGHFQGSFTGPRI FWSG
* : * . . . . : * . * : * : * . . . . : * : * : . * * : . *

GmGDH01 SLGREAAATGLGVI FATEALFAEYGKSI SDMTFVI QGF GNV GTWAAKSI YERGGKVIAVSD
GmGDH03 SLGREAAATGLGVV FATEALFAEYGKSI SDHTFVI IQGF GNV GTWAAKSI FERGGKVIAVSD
GmGDH09 SLGREAAATGLGVV FATEALFAEYGKSI SDHTFVI QGF GNV GTWAAKSI FERGGKVIAVSD
GmGDH02 SLGRDAATGRGVL FATEALLKEHGMSLSGQRLVI QGF GNV GSWAAKLISEKGGKVVAVSD
GmGDH08 SLGRDAATGRGVL FATEALLKEHGMSVSGQRFII IQGF GNV GSWAACLISEKGGKVVAVSD
GmGDH07 SLGRDAATGRGVL FATEALLNEYGKSVSGQRFVI QGF GNV GSWAACLISNKGGKVVAVSD
GmGDH10 SLGRDAATGRGVL FATEALLNEYGKSVSGQRFVI QGF GNV GSWAACLISEKGGKVVAVSD
GmGDH06 SLGRDVATGWGVL FATEALLNEYGKSVSGQRFVI QGF GNV GSWAACLISDKGGKVVAVSD
GmGDH04 SSLRPEATGYGLV FFAQLMLADMNKELKGLRCAVSGSGKIAMHVLEKLIAYGALPISVSD
GmGDH05 SSLRPEATGYGLV FFAQLMLADMNKELKGLRCVVS GSGKIAMHVLEKLIAYGALPISVSD
* * * * * : : : : . . . . : . * * : . : : * . : * *

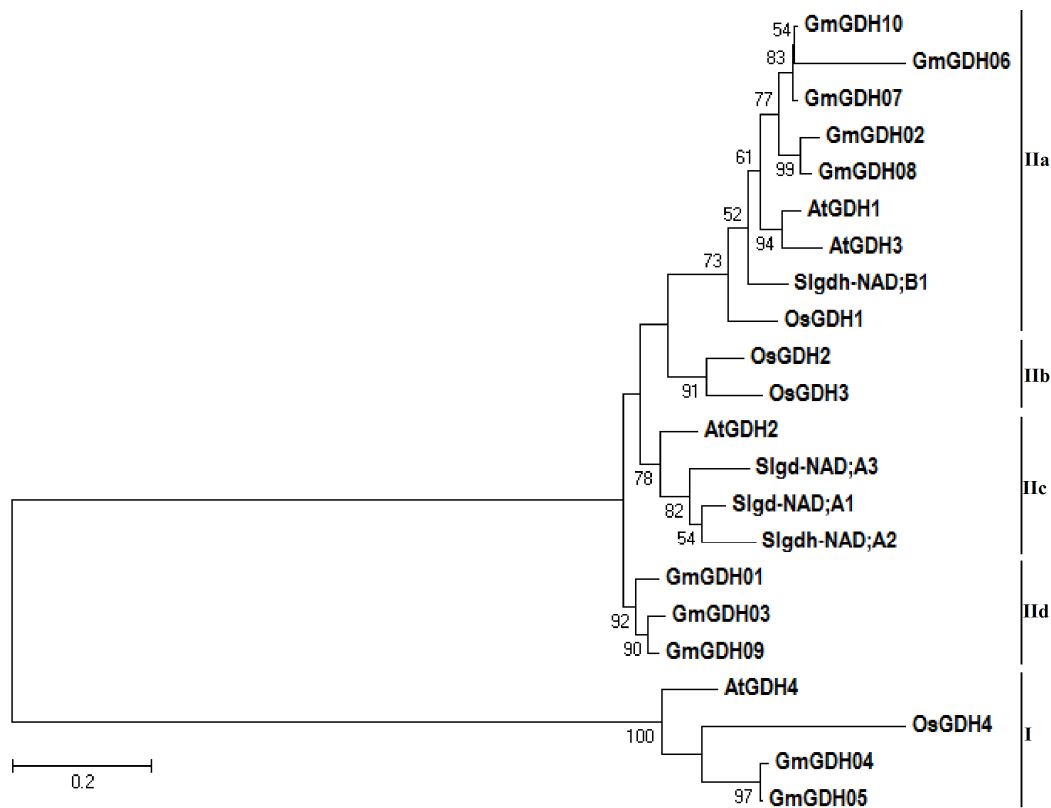
```

Hình 2. Kết quả sắp dãy vùng bảo thủ của các protein GDH của cây đậu tương. Dấu ★ đánh dấu các amino acid bảo thủ, các amino acid tín hiệu định hướng protein vào trong ti thể được đóng khung nét đứt, vùng gắn α -ketoglutarate được đóng khung nét liền, vùng gắn NAD(P)H được tô nền xám.

3.3. Phân tích cây phả hệ và phân loại các *Glutamate dehydrogenase*

Cây phả hệ được xây dựng từ các protein GDH của các loài đậu tương, *Arabidopsis*, cà chua và lúa được giới thiệu trong hình 3. Các protein này xếp ở hai nhánh lớn của cây phả hệ, trong đó có một nhánh nhỏ, chỉ gồm có hai trình tự của cây đậu tương, một của cây lúa và một của cây *Arabidopsis*. Nhánh còn lại phân chia thành nhiều nhánh nhỏ hơn. Sự phân bố của các GDH trong cây phả hệ cho phép phân chia các GDH của cây đậu tương thành hai nhóm chính, tương tự như ở các loài thực vật khác [11, 18]. Nhóm I gồm có hai gen *GmGDH04* và *GmGDH05*, xếp cùng nhánh với *AtGDH4* và *OsGDH4*. Tám gen còn lại của cây

đậu tương thuộc về nhóm II. Trong nhóm này, các GDH của cây đậu tương được chia thành hai phân nhóm nhỏ hơn khi chung phân bố ở hai phân nhánh khác nhau, phân nhóm IIa với các gen *GmGDH02*, *GmGDH06*, *GmGDH07*, *GmGDH08* và *GmGDH10*, các gen thuộc phân nhóm IId là *GmGDH01*, *GmGDH03* và *GmGDH09*. Hiện tượng tương tự cũng được thấy ở các loài khác như *Arabidopsis* (IIa và IIc), thuốc lá (IIa và IIc) và lúa (IIa và IIb). Sự phân chia các GDH thành hai nhóm khác nhau trên cây phả hệ phù hợp với cấu trúc của chúng, nhóm I gồm các protein có motif bảo thủ gắn NADPH (GxGx2Ax10G) trong khi nhóm II gồm các protein có motif bảo thủ gắn NADH (GxGx2Gx10G).



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng từ các GDH của cây đậu tương (Gm), cây *A. thaliana* (At) cây cà chua (Sl) và cây lúa (Os). Cây phả hệ được xây dựng với các tham biến: thuật toán Maximum Likelihood, mô hình Jones-Taylor-Thornton (JTT), phương pháp Bootstrap với 1000 lần lặp lại, giá trị bootstrap (%) được thể hiện trên mỗi nhánh (giá trị nhỏ hơn 50 không được thể hiện), tỷ lệ xích là số amino acid thay thế trên một vị trí.

Cây đậu tương cho phép phát hiện nhiều sự kiện nhân gen *GDH* trong hệ gen (Whole Genome Duplication, WGD) của cây đậu tương, hình thành nên các gen *GmGDH04* và *GmGDH05*, *GmGDH02* và *GmGDH08*, *GmGDH07* và cặp *GmGDH06* với *GmGDH10*, *GmGDH01* và cặp *GmGDH03* với *GmGDH09*. Các sự kiện nhân gen cũng xảy ra ở các loài khác, nhưng chỉ đối với các gen thuộc nhóm II.

3.4. Phân tích sự biểu hiện gen

Chúng tôi phân tích sự biểu hiện gen của các gen *GDH* qua kết quả RNAseq (giải trình tự các ARN thông tin) thu được từ các mô, cơ quan của cây đậu tương ở các giai đoạn phát triển khác nhau, gồm mô lá, mô hoa, mô quả (ở ba thời điểm), mô hạt (ở 7 thời điểm khác nhau), mô rễ và nốt sần. Bản đồ nhiệt giới thiệu sự biểu hiện của các gen (hình 4). Tất cả các gen *GDH* của cây đậu tương đều biểu hiện ở ít nhất một loại mô, mức độ biểu hiện khác nhau tùy từng gen và thay đổi tùy loại mô khác nhau.

Hai gen *GmGDH02* và *GmGDH06* là những gen biểu hiện yếu nhất, gen thứ nhất chỉ biểu hiện ở hoa trong khi gen thứ hai chỉ biểu hiện ở nốt sần. Các gen *GmGDH03*, *GmGDH04*, *GmGDH05* và *GmGDH07* là những gen biểu hiện ở tất cả các mô ở tất cả các giai đoạn phát triển được nghiên cứu. Xét ở từng mô khác nhau, ba gen *GmGDH04*, *GmGDH05* và *GmGDH07* biểu hiện mạnh nhất ở lá, gen *GmGDH07* biểu hiện mạnh nhất ở hoa, quả rễ và nốt sần, gen *GmGDH01* biểu hiện mạnh nhất ở hạt. Với mỗi gen, mức độ biểu hiện cao nhất được thấy ở các mô sinh sản (ngoại trừ *GmGDH06*). Sự biểu hiện khác nhau của các gen *GDH* ở các mô khác nhau đã được báo cáo ở *Arabidopsis* [14], cà chua [12]. Ngoài ra, những nghiên cứu về sự biểu hiện gen *GDH* dưới ảnh hưởng của các điều kiện môi trường đã được thực hiện ở lúa (trong điều kiện thiếu hụt nitơ và phospho) [11], ở thuốc lá (trong điều kiện thiếu hụt đường, nitơ, mangan và nhiễm độc kim loại nặng) [13, 24].

Gen	Mô														Chú thích
	Lá non	Hoa	Quả nhỏ (7 DAF)	Quả trung bình (10DAF)	Quả lớn (14DAF)	Hạt (10DAF)	Hạt (14DAF)	Hạt (21DAF)	Hạt (25DAF)	Hạt (28DAF)	Hạt (35DAF)	Hạt (42DAF)	Rễ	Nốt sần	
<i>GmGDH01</i>	0	1	4	1	1	18	27	17	24	16	22	12	1	0	30
<i>GmGDH02</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>GmGDH03</i>	1	3	2	2	2	4	10	5	3	1	2	1	2	1	20
<i>GmGDH04</i>	5	7	5	4	3	3	4	3	4	1	5	2	6	3	15
<i>GmGDH05</i>	5	8	5	6	4	4	3	3	5	2	4	3	8	6	10
<i>GmGDH06</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
<i>GmGDH07</i>	5	53	12	12	5	2	3	4	11	8	13	4	9	7	0
<i>GmGDH08</i>	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	DAF= ngày sau thụ tinh
<i>GmGDH09</i>	4	2	5	4	2	5	16	7	4	3	3	2	5	0	
<i>GmGDH10</i>	0	1	1	0	1	4	3	1	1	2	8	4	1	3	

Hình 4. Sự biểu hiện của các gen *GDH* của cây đậu tương trong các mô nghiên cứu.

4. Kết luận

Trong toàn hệ gen của cây đậu tương, có mười gen mã hóa các GDH, trong đó có hai gen thuộc nhóm I (nhóm NADPH-GDH) và 8 gen thuộc nhóm II (nhóm NADH-GDH). Các gen

này mã hóa không liên tục với 14 intron hoặc 8 intron, ngoại trừ gen *GmGDH06*. Các gen này quy định các protein có kích thước khá tương đồng, 637 amino acid hoặc 411 amino acid, ngoại trừ *GmGDH6* do có một vùng bị xóa. Phân tích cây phả hệ cho thấy các GDH của cây

đậu tương được xếp vào hai nhóm giống như ở nhiều thực vật khác, nhóm I (hai gen *GmGDH04* và *GmGDH05*) và nhóm II (gồm các gen còn lại). Các protein nhóm II có motif bảo thủ tín hiệu khu trú ti thể ở đầu amin, motif bảo thủ gắn cơ chất đặc hiệu α -ketoglutarate và vùng gắn đặc hiệu coenzyme NADH. So với các protein nhóm II, các protein nhóm I cũng có vùng gắn cơ chất đặc hiệu nhưng vùng gắn coenzyme khác biệt nhẹ khi gắn với NADPH. Sự biểu hiện của các gen trong họ *GDH* của cây đậu tương khác nhau ở các mô khác nhau. Gen *GmGDH02* biểu hiện đặc hiệu ở hoa trong khi *GmGDH06* biểu hiện đặc hiệu ở nốt sần. Chỉ bốn gen *GmGDH03*, *GmGDH04*, *GmGDH05* và *GmGDH07* biểu hiện ở tất cả các mô ở tất cả các giai đoạn phát triển được nghiên cứu. Ngoại trừ gen *GmGDH06*, các gen còn lại đều biểu hiện ở các mô sinh sản mạnh hơn ở các mô sinh dưỡng. Những kết quả nghiên cứu này bổ sung các thông tin khoa học về cấu trúc, phân loại, và vai trò của các gen *GDH* của cây đậu tương, mở đường cho việc tách dòng gen và phân tích đầy đủ chức năng của các gen trong họ *GDH* ở cây đậu tương.

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, tỉnh Phú Thọ.

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Friedman and D. L. Brandon, Nutritional and health benefits of soy proteins, *J Agric Food Chem* 49 (2001) 1069-86.
- [2] K. Liu, Soybeans as functional foods and ingredients, AOCS Publishing (2005).
- [3] J. Schmutz, S. B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, et al., Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature*, 463 (2010) 178-183.
- [4] F. Dubois, T. Tercé-Laforgue, M.-B. Gonzalez-Moro, J.-M. Estavillo, R. Sangwan, A. Gallais, et al., Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme?, *Plant Physiol and Biochem* 41 (2013) 565-576.
- [5] B. G. Forde and P. J. Lea, Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling, in *J Exp Bot* 58 (2007) 2339-58.
- [6] B. G. Forde, Glutamate signalling in roots, in *J Exp Bot.* 65 (2014) 779-787.
- [7] J. X. Fontaine, T. Terce-Laforgue, P. Armengaud, G. Clement, J. P. Renou, S. Pelletier, et al., Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism, in *Plant Cell* 24 (2012) 4044-4065.
- [8] P. J. Baker, K. L. Britton, P. C. Engel, G. W. Farrants, K. S. Lilley, D. W. Rice, et al., Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase, *Proteins* 12 (1992) 75-86.
- [9] K. A. Loulakakis and K. A. Roubelakis-Angelakis, Plant NAD(H)-Glutamate Dehydrogenase Consists of Two Subunit Polypeptides and Their Participation in the Seven Isoenzymes Occurs in an Ordered Ratio, *Plant Physiol* 97 (1991) 104-111.
- [10] F. J. Turano, S. S. Thakkar, T. Fang, and J. M. Weisemann, Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 113 (1997) 1329-1341.
- [11] X. Qiu, W. Xie, X. Lian, and Q. Zhang, Molecular analyses of the rice glutamate dehydrogenase gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation, *Plant Cell Rep* 28 (2009) 1115-1126.
- [12] G. Ferraro, S. Bortolotti, P. Mortera, A. Schlereth, M. Stitt, F. Carrari, et al., Novel glutamate dehydrogenase genes show increased transcript and protein abundances in mature tomato fruits, in *J Plant Physiol.* 169 (2012) 899-907.
- [13] F. M. Restivo, Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana glauca*: structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress conditions, *Plant Science* 166 (2004) 971-982.
- [14] Y. Miyashita and A. G. Good, NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation, in *J Exp Bot.* 59 (2008) 667-680.
- [15] G. Tsilikochrisos, G. Tsaniklidis, C. Delis, N. Nikoloudakis, and G. Aivalakis, Glutamate dehydrogenase is differentially regulated in

- seeded and parthenocarpic tomato fruits during crop development and postharvest storage, *Scientia Horticulturae* 181 (2015) 34-42.
- [16] A. J. Severin, J. L. Woody, Y. T. Bolon, B. Joseph, B. W. Diers, A. D. Farmer, et al., RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome, *BMC Plant Biol* 10 (2010) 160.
- [17] M. P. Purnell, D. S. Skopelitis, K. A. Roubelakis-Angelakis, and J. R. Botella, Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels, *Planta* 222 (2005) 167-180.
- [18] R. Inokuchi, K. I. Kuma, T. Miyata, and M. Okada, Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenetic and physiological perspectives, in *Physiol Plant*. 116 (2002) 1-11.
- [19] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol* 28 (2011) 2731-2739.
- [20] K. Katoh and D. M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol* 30 (2013) 772-780.
- [21] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in *The proteomics protocols handbook*, Springer, (2005) 571-607.
- [22] A. Y. Guo, Q. H. Zhu, X. Chen, and J. C. Luo, GSDS: a gene structure display server, *Yi Chuan* 29 (2007) 1023-1026.
- [23] R. Inokuchi, K. Motojima, Y. Yagi, K. Nakayama, and M. Okada, *Bryopsis maxima* (Chlorophyta) glutamate dehydrogenase: multiple genes and isozymes, *Journal of Phycology* 35 (1999) 1013-1024.
- [24] A. Ficarelli, F. Tassi, and F. M. Restivo, Isolation and characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotiana plumbaginifolia*, *Plant Cell Physiol* 40 (1999) 339-342.

In Silico Analysis of Glutamate Dehydrogenase Gene Family in Soybean (*Glycine max* L.)

Cao Phi Bang

Faculty of Natural Sciences, Hung Vuong University, Phu Tho, Vietnam

Abstract: Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2~4) are the enzymes which catalyze reversible deamination reaction of L-glutamate to 2-oxoglutarate or α -ketoglutarate (α -KG). We identified a total of ten GDH encoded genes in soybean genome. The full length sequence of predicted proteins had 637 or 411 amino acids, except GmGDH06. Analysis of phylogenetic tree constructed from GDH proteins of soybean and other plants showed that the soybean GDH were classified into two groups, the group I included two genes and the group II included eight genes. The group II proteins possessed a mitochondrial target motif, a conserved specific α -ketoglutarate binding and a specific NADH coenzyme binding region. The group I proteins also included a specific substrate binding but they contained a NADPH coenzyme binding. The expression of soybean GDH genes was dissimilar in different tissues. Four genes *GmGDH03*, *GmGDH04*, *GmGDH05* and *GmGDH07* expressed in all tissues at all studied development stages. In addition, all soybean GDH genes expressed stronger in reproductive tissues than in vegetative tissues, except *GmGDH06* which specifically expressed in nodules.

Keywords: Glutamate dehydrogenase, gene expression, phylogenetic tree, gene characterization, soybean.