

THIẾT KẾ VECTOR CÓ VÙNG TI-DNA MANG GEN *CODA* VÀ MỘT SỐ CẤU TRÚC HỖ TRỢ CHỌN LỌC CÂY CHUYỂN GEN

Bùi Thị Thu Hương^{1,3*}, Hồ Thị Hương¹, Bùi Văn Thắng², Lê Văn Sơn³, Lê Trần Bình³

¹Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, *btthuonhgp@gmail.com

²Trường Đại học Lâm nghiệp

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Những yếu tố bất lợi từ môi trường như hạn, mặn, úng, nhiệt độ cao thường làm mất cân bằng áp suất thẩm thấu, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của thực vật nói chung và cây trồng nói riêng. Glycine betaine đã được chứng minh là có khả năng giúp cây chống lại điều kiện bất lợi trên. Vì vậy, nhằm phục vụ công tác tạo giống cây có khả năng chống chịu những yếu tố bất lợi phi sinh học khác nhau, công nghệ gen hiện nay được cho là một phương tiện giải quyết hiệu quả nhiệm vụ trên. Bài báo này trình bày kết quả thiết kế vector tái tổ hợp mang gen mã hóa choline oxidase, tham gia vào sinh tổng hợp glycine betain (*codA*). Ngoài ra, ở vùng T-DNA của vector được thiết kế chứa gen chỉ thị glucuronidase (*Gus*) và gen hygromycin phosphotransferase có thể giúp sự lựa chọn cây chuyển gen dễ dàng hơn. Cấu trúc vector tái tổ hợp đã được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* thành công và bước đầu tạo được cây thuốc lá chuyển gen có khả năng chịu mặn.

Từ khóa: Choline oxydase, gen *codA*, gen chọn lọc, gen chỉ thị, glycine betaine.

MỞ ĐẦU

Biến đổi khí hậu đang là một thách thức lớn đối với nhân loại, cũng như đối với nông nghiệp. Sản lượng cũng như chất lượng nông sản giảm do cây trồng đang chịu những yếu tố bất lợi từ môi trường. Ứng dụng công nghệ gen trong việc nghiên cứu nhằm tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng bằng cách kích thích cây trồng tổng hợp các chất thẩm thấu tương thích, giúp cho tế bào có thể vượt qua các điều kiện cực đoan là một yêu cầu cấp thiết cho các nhà khoa học. *CodA* là gen mã hóa choline oxidase, một enzyme chìa khóa trong quá trình tổng hợp và tích lũy glycine betaine, duy trì áp suất thẩm thấu trong tế bào [6, 11]. Gen *codA* đã được chuyển vào một số loài cây trồng và chúng được tăng cường được khả năng chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi như cây *Arabidopsis thaliana* tăng cường khả năng chịu lạnh, nhiệt và băng giá [2, 8], cây cải bẹ, bạch đàn, cà chua có khả năng chịu mặn và oxy hóa [1, 7, 12].

Nhằm giúp cho việc chọn lọc cây chuyển gen dễ dàng và thuận lợi, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả thiết kế một số cấu trúc vector chuyển gen chứa gen *codA*, gen chỉ thị và gen chọn lọc ở vùng T-DNA, nhằm tăng cường tính chống chịu điều kiện bất lợi của môi

trường. Những kết quả này sẽ là tiền đề thúc đẩy nhanh chóng công tác chuyển gen tạo ra các giống cây trồng có khả năng chống chịu tốt với các yếu tố phi sinh học bất lợi phục vụ cho công tác chọn giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng pCAMBIA1301 mang gen *Gus* và 2 vector pBI121 (pBI121/35S-P-*TP-codA-cmyc*, pBI121/35S-*codA-cmyc*) mang gen *codA* nhân tạo có bổ sung một đoạn 30 nucleotide mã hóa đoạn peptide c-myc giúp cho phát hiện mức độ biểu hiện gen chuyển. Riêng vector pBI121/35S-*TP-codA-cmyc* đã được bổ sung thêm một đoạn TP dài 216 nucleotide mã hóa tín hiệu dẫn (signal peptide) giúp vận chuyển enzyme vào trong lục lạp. Các vector này do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Các cặp mồi đặc hiệu cho 2 gen *TP-codA-cmyc* và *codA-cmyc* được tổng hợp từ hãng Macrogen (Hàn Quốc), có trình tự như bảng 1.

Các chủng vi khuẩn *E. coli* (DH5 α), *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 và giống thuốc lá K₃₂₆ với cây con đã phát triển được 3-4 lá thật được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm phục vụ cho chuyển gen do phòng Công

nghe tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Thực hiện các phản ứng cắt enzyme giới hạn, lai tạo vector tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn theo phương pháp sốc nhiệt hoặc xung điện của Cohen et al. (1972) [4]. DNA plasmid được tách chiết và làm sạch theo phương pháp của Sambrook et al. (2001) [9]. DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp môi đặc theo chu

trình nhiệt như sau: 94°C/3 phút, 94°C/30 giây, (57-60°C)/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây; 72°C/7 phút, 4°C/30 phút, 25 chu kì.

Chuyển vector tái tổ hợp vào thuốc lá qua *A. tumefaciens* theo phương pháp của Topping (1998) [10]. Các dòng cây thuốc lá chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm mô tế bào để kiểm tra biểu hiện của gen *Gus* [5] và đánh giá khả năng chịu mặn theo phương pháp của Wang et al. (2003) [13] và Barunava et al. (2010) [3].

Bảng 1. Các cặp môi đặc hiệu cho 2 gen *TP-codA-cmyc* và *codA-cmyc*

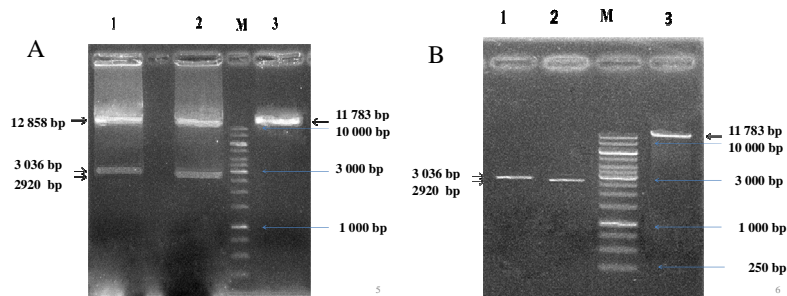
Tên cặp môi	Trình tự nucleotide	Nhân gen	Kích thước đoạn DNA nhân(bp)
F/ <i>TP-XbaI</i> R/ <i>cmyc-SacI</i>	5'GCTCTAGAATGGCACAAATTAACA3' 5'CGAGCTCTCAATTCAGATCCTCTTC3'	<i>TP-codA</i>	1904
F/ <i>codA-XbaI</i> R/ <i>cmyc-SacI</i>	5'GCTCTAGAATGCACATCGATAATATTGA3' 5'CGAGCTCTCAATTCAGATCCTCTTC3'	<i>codA</i>	1688

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu nhận các đoạn gen quan tâm bằng enzyme giới hạn

Nghiên cứu đã xác định được 2 plasmid pBI121/35S-*TP-codA-cmyc*, pBI121/35S-*codA-*

cmyc và vector nhận pCAMBIA1301/35S-*gus* có cùng điểm cắt giới hạn *HindIII* và *EcoRI*, có thể thu được đoạn gen mục tiêu và mở vòng vector nhận, chúng tôi tiến hành xử lý chúng đồng thời 2 enzyme này. Điện di kiểm tra sản phẩm cắt enzyme giới hạn được chỉ ra ở hình 1.



Hình 1. Sản phẩm cắt vector bởi *HindIII/EcoRI* (A) và sản phẩm tinh sạch đoạn gen (B)

M. Thang marker DNA 1 kb; 1,2,3 (A): Sản phẩm cắt pBI121/35S-*TP-codA-cmyc*, pBI121/35S-*codA-cmyc* và pCAMBIA1301/35S-*Gus*; 1,2,3 (B): Sản phẩm tinh sạch đoạn gen 35S-*TP-codA-cmyc*, 35S-*codA-cmyc* và pCAMBIA1301/35S-*Gus*

Các mẫu cắt bằng enzyme giới hạn được điện di trên gel agarose cho các băng vạch khá

rõ ràng, kích thước phù hợp tính toán theo lí thuyết (hình 1A). Các đoạn gen quan tâm gồm

35S-TP-codA-cmyc, 35S-codA-cmyc và pCAMBIA1301/35S-Gus có kích thước tương ứng khoảng 3036, 2820 và 11783 bp được thu nhận và tinh sạch. Sử dụng 5 µl sản phẩm tinh sạch điện di kiểm tra (hình 1B). Kết quả thu được cho thấy, sản phẩm tinh sạch có hàm lượng cao, không bị đứt gãy, phù hợp với kích thước như tính toán lý thuyết. Mỗi giếng có một vạch băng tương ứng với kích thước như mong muốn, chứng tỏ quá trình tinh sạch thành công, sản phẩm đủ điều kiện để thực hiện phản ứng ghép nối bằng T₄ ligase để tạo vector tái tổ hợp.

Kết quả tạo vector chuyển gen

Các đoạn gen sau khi tinh sạch được tiến hành phản ứng ghép nối nhờ T4 ligase. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH-5α bằng phương pháp sốc nhiệt và được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh

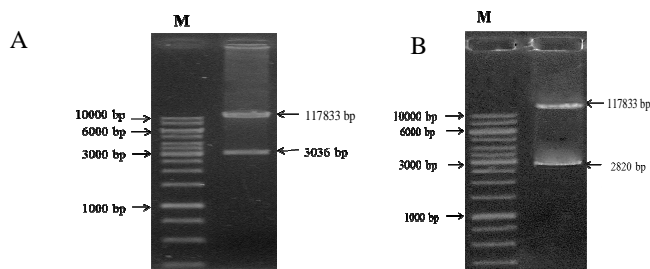
kanamycin. Các plasmid thu được từ các khuẩn lạc được kiểm tra bằng phản ứng cắt bởi HindIII/EcoRI, kết quả được trình bày ở hình 2.

Kết quả điện di cho các vạch băng sáng, rõ, không đứt gãy và có kích thước như lý thuyết đã tính toán, điều này chứng tỏ quá trình thiết kế vector tái tổ hợp thành công như hình 3.

Tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

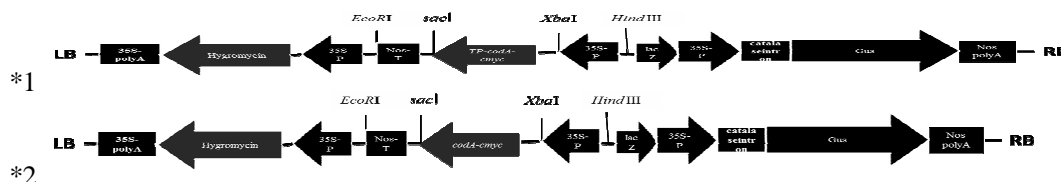
Tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp

Vector tái tổ hợp được biến nạp vào *A. tumefaciens* và được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh. Chọn một số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch để tiến hành phản ứng colony-PCR bằng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm phản ứng được điện di kiểm tra trên gel agarose, kết quả thể hiện ở hình 4.



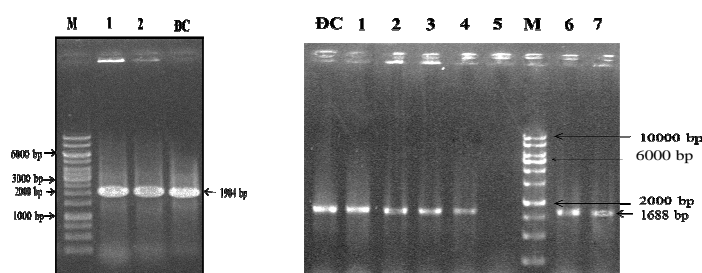
Hình 2. Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng HindIII/EcoRI

(A). pCAMBIA1301/35S-TP-codA-cmyc/35S-Gus; (B) pCAMBIA1301/35S-codA-cmyc/35S-Gus.



Hình 3. Sơ đồ T- DNA tái tổ hợp

(*1). mang cấu trúc gen 35S-TP-codA-cmyc; (*2). mang cấu trúc gen 35S-codA-cmyc.



Hình 4. Sản phẩm PCR- colony các khuẩn lạc *A. tumefaciens*

M. marker DNA 1kb; giếng ĐC: đối chứng dương; giếng 1,2: các dòng khuẩn lạc biến nạp vector pCAMBIA1301/35S-TP-codA-cmyc/35S-Gus (A); giếng 1,2,3,4,5,6,7: các dòng khuẩn lạc biến nạp vector pCAMBIA1301/35S-codA-cmyc/35S-Gus (B)

Hình 4A cho thấy, ở 2 khuẩn lạc phân tích có xuất hiện băng DNA kích thước tương đương với đối chứng khoảng 1904 bp. Trong tự ở hình 4B, 6/7 dòng khuẩn lạc có băng kích thước khoảng 1688 bp đúng với kích thước lý thuyết tính toán. Kết quả trên chứng tỏ, đã tạo thành công các chủng *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp.

Tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

Mảnh thuốc lá sau khi được biến nạp với chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp được theo dõi một số chỉ tiêu thu được như bảng 2.

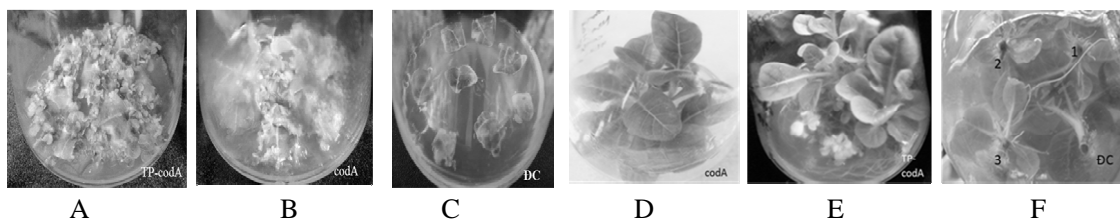
Mảnh cây thuốc lá được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng sẽ tái sinh chồi. Trong môi trường tái sinh có bổ sung Hygromycin, chỉ có tế

bào nào được tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* xâm nhập mới có khả năng phát triển chồi. Các mảnh lá được chuyển hai cấu trúc vector này có tỷ lệ tạo chồi khá cao (> 97%) còn với cây WT1, tỷ lệ mảnh lá phát sinh chồi trong môi trường có kháng sinh là 0% (bảng 1, hình 5C). Tuy nhiên, sự chuyển cấu trúc gen vào hệ gen tế bào thành công hay không thể hiện sự sống sót của các chồi và sự tạo rễ trong môi trường ra rễ có kháng sinh chọn lọc. Ở đây, tỷ lệ các chồi sống sót và ra rễ trong môi trường này đối với cây được chuyển cấu trúc *1 là 52,46% và cấu trúc *2 là 46,15%, còn WT2 (tỷ lệ chồi ra rễ trong môi trường không có kháng sinh là 93,6%). Bên cạnh những chồi được hình thành trong môi trường tái sinh chồi nhưng không phát triển (héo, úa hay không ra rễ-hình 5D,E và F) là những chồi được chuyển gen thành công.

Bảng 2. Sự phát sinh hình thái của các mẫu thuốc lá chuyển gen in vitro

Đối tượng	Khả năng hình thành chồi		Khả năng hình thành rễ		Tỷ lệ số dòng dương tính X-gluc (%)
	Số mảnh lá thí nghiệm (mảnh)	Tỷ lệ mảnh lá hình thành chồi (%)	Tổng số chồi nuôi cấy (chồi)	Tỷ lệ số chồi ra rễ (%)	
TN1	137	98,73	182	52,46	19,78
TN2	96	97,77	158	46,15	18,99
WT1	62	0	-	-	-
WT2	60	97,2	129	93,6	-

TN1. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *1 trên môi trường có Hygromycin; TN2. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *2 trên môi trường có Hygromycin; WT1(ĐC). Mảnh lá không chuyển gen trên môi trường có Hygromycin; WT2(ĐC). Mảnh lá không chuyển gen trên môi trường không có Hygromycin



Hình 5. Mẫu cây thuốc lá trong môi trường tái sinh chồi (A, B và C) và môi trường ra rễ (D, E và F) có kháng sinh Hygromycin

A, B và C: Các mảnh lá cây thuốc lá đã chuyển cấu trúc *1(35S-TP-codA-cmyc), *2(35S-codA-cmyc) và mảnh thuốc lá không chuyển gen (ĐC) trong môi trường tái sinh chồi sau 2,5 tuần; D, E: Các chồi cây thuốc lá phát triển từ mảnh thuốc lá đã chuyển cấu trúc *1(35S-TP-codA-cmyc), *2(35S-codA-cmyc) trong môi trường ra rễ sau 2,5 tuần; F: Các chồi cây thuốc lá phát triển từ mảnh thuốc lá đã chuyển cấu trúc *1 hoặc *2 (cây 1, 2, 3) và chồi thuốc lá phát triển từ mảnh thuốc lá không chuyển gen (ĐC) trong môi trường ra rễ sau 3,5 tuần.

Tuy nhiên, các dòng thuốc lá chuyển gen có khả năng sống sót trên môi trường có Hygromycin được khẳng định đã chuyển cấu trúc Ti hay không, được tiến hành nhuộm hóa mô tế bào với X-gluc, kết quả thu được tỷ lệ số dòng dương tính (có màu xanh đặc trưng) khoảng 18,89% với cây được chuyển cấu trúc

*2 và 19,78% với mẫu cây được chuyển cấu trúc *1 (bảng 2 và hình 6).

Các dòng thuốc lá chuyển gen chịu được hygromycin có biểu hiện dương tính hay âm tính với X-gluc được thử nghiệm khả năng chịu muối (NaCl), kết quả thu được chỉ ra ở bảng 3.



Hình 6. Mẫu thuốc lá in vitro chuyển cấu trúc *1 (A) và *2 (B) khi được xử lý X-gluc

Bảng 3. Khả năng chịu muối của các dòng thuốc lá chuyển gen

Đối tượng	Số dòng thí nghiệm	Tỷ lệ mảnh thuốc lá sống trên MT muối NaCl 50mM sau 1 tuần nuôi cấy (%)	Tỷ lệ chồi thuốc lá sống trên NaCl 250mM sau 1 tuần nuôi cấy (%)
TN1.1	36	77,78	83,33
TN1.2	30	10,00	16,67
TN2.1	30	50,00	53,33
TN2.2	30	3,33	6,67
WT1(ĐC1)	1	0,00	0,00
WT2(ĐC2)	1	0,00	0,00

TN1.1. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *1 trên môi trường có Hygromycin dương tính X-gluc; TN1.2. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *1 trên môi trường có Hygromycin âm tính X-gluc; TN2.1. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *2 trên môi trường có Hygromycin dương tính X-gluc; TN2.2. Mảnh lá được chuyển cấu trúc *2 trên môi trường có Hygromycin âm tính X-gluc; WT1(ĐC1). Mảnh lá không chuyển gen trên môi trường có Hygromycin; WT2(ĐC2). Mảnh lá không chuyển gen trên môi trường không có Hygromycin.

Những dòng thuốc lá chuyển gen có biểu hiện dương tính với X-gluc có tỷ lệ về khả năng chịu muối cao (trên 50%). Điều này chứng tỏ có thể sử dụng sự biểu hiện của gen Gus là một dấu hiệu nhận biết cây chuyển gen. Bên cạnh đó, một số dòng thuốc lá âm tính với X-gluc vẫn có khả năng chịu muối (với tỷ lệ thấp chỉ đạt 3%-10%). Dòng thuốc lá có mẫu lá không thấy biểu hiện của gen Gus nhưng vẫn có khả năng chịu muối có thể được giải thích bởi cấu trúc Ti-DNA có thể đã được chuyển vào một vị trí nào đó trên genome, nhưng gen Gus chưa có điều kiện biểu hiện gen (thể hiện ở một bộ phận khác ngoài mẫu lá đem xử lý X-gluc hay ở một giai đoạn phát triển nào đó của cơ thể) nhưng gen *codA* đã hoạt động giúp cây có khả

năng chịu được muối. Những cây không chuyển gen (WT) không có khả năng chịu được muối.

KẾT LUẬN

Thiết kế thành công 2 vector pCAMBIA1301 có vùng T-DNA mang cấu trúc gen 35S-(TP)-*codA-cmyc* và một số cấu trúc hỗ trợ chuyển gen vào thực vật.

Chuyển thành công vector tái tổ hợp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens*, sẵn sàng cho việc chuyển vào thực vật.

Vector tái tổ hợp chứa gen *CodA* bước đầu được chuyển vào thuốc lá và xác định được vai trò của một số cấu trúc hỗ trợ vùng T-DNA trong chọn lọc cây chuyển gen như gen kháng

Hygromycin, α -glucuronidase (GUS). Các dòng thuốc lá chuyển gen bước đầu được chứng minh có khả năng chống chịu được điều kiện mặn (nồng độ muối NaCl cao) của môi trường nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad R., Kim M. D., Back K. H., Kim H. S., Lee H. S., Kwon S. Y., Murata N., Chung W. I., Kwak S. S., 2008. Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt and drought stresses. *Plant Cell Rep.*, 27: 687-698.
- Alia H. H., Sakamoto A., Murata N., 1998. Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.*, 16 : 155-161.
- Barunava P., Sudipta R., Andreas R., Arun L. M., 2010. Enhanced salt tolerance of transgenic tobacco plants by co-expression of PcINO1 and McIMT1 is accompanied by increased level of myo-inositol and methylated inositol, *Protoplasma*, Springer-Verlag DOI 10.1007/s00709-010-0163-3. [Http://www.academia.edu/302606/](http://www.academia.edu/302606/).
- Cohen S., Chang N., A. C. Y., Hsu L., 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69: 2110-2114.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., 1987. *GUS* fusion: α -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6: 3901-3907.
- Hasegava P. M., Bressan R. A., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.
- Trần Thị Phương Liên, 2010. Protein và tính chống chịu ở thực vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Prasad K. V. S. K., Sharmila P., Kumar P. A., Pardha Saradhi P., 2000. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with a bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Mol. Breed.*, 6: 489-499.
- Sakamoto A., Murata N., 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 163-171.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 2002. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Topping J. S., 1998. Tobacco transformation. *Methods of molecular biology, Plant virology protocols*, 81: 365-372.
- Yu X., Kikuchi A., Matsunaga E., Morishita Y., Nanto K., 2009. Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted house. *Plant Biotechnol.*, 26: 135-141.
- Wang Xian Yan, Shan Xiao Yi, Yang Ai Fang, Zhang Ju Zen, 2003. Construction of plant expression vector and analysis herbicide resistance and salt tolerance of transgenic tobacco. *China Journal of Agricultural Biotechnology*, 1(2): 85-91.

CONSTRUCTING VECTOR HAVING TI- DNA CONTAINED CODA GENE AND SOME TRANSPLANTS SELECTION ASSISTANCE STRUCTURES

Bui Thi Thu Huong^{1,3}, Ho Thi Huong¹, Bui Van Thang², Le Van Son³, Le Tran Binh³

¹Hanoi University of Agriculture

²Vietnam Forestry University

³Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Adverse factors from the environment, such as, drought and salinity, water logging and high temperatures often cause serious effects on the growth and development of plant or crop yield. *CodA* gene found in *Arthrobacter globiformis* encode for choline oxidase involved in the biosynthesis of glycine betaine have been shown to be transferable to some plants which help them resist such adverse conditions. Vector recombinant pCAMBIA1301 has been successfully designed with the *codA* gene. Additionally, the Ti-DNA region contains the remarkable gene *Gus* and a hygromycin resistance selected gene that also can help researcher select transgenic plants quickly and easily. The recombinant vector structure is also successfully transferred into *A. tumefaciens* that have tested by PCR. The vector was ready transferred in to tobacco in order to produce valuable tolerance varieties to salt.

Keywords: *CodA* gene, choline oxidase, glycine betaine, transgenic vector, selection gene, remarkable gene.

Ngày nhận bài: 16-3-2013