

PHÂN LẬP PROMOTER (ĐOẠN ĐIỀU KHIỂN) CẢM ỨNG NHIỆT *AtHSP18.2* VÀ ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP

Nguyễn Chi Mai¹, Nguyễn Tường Vân², Trần Mỹ Linh³, Lê Quỳnh Liên^{3*}

¹Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

³Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *lienle@imbc.vast.vn

TÓM TẮT: Promoter (đoạn điều khiển) là đoạn trình tự nucleotide nằm về phía đầu 5' của vị trí khởi đầu phiên mã và có vai trò khởi động quá trình phiên mã tạo protein. Vì vậy, điều khiển tổng hợp protein thông qua các promoter đặc hiệu là một trong những yếu tố quan trọng để kiểm soát quá trình sản xuất protein tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2 (*AtHSP18.2*-promoter) được phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana*, để phục vụ cho việc điều khiển biểu hiện protein tái tổ hợp ở các mức nhiệt độ khác nhau trong tế bào thực vật. Trình tự đoạn nucleotide của *AtHSP18.2*-promoter tương tự với các trình tự promoter cảm ứng nhiệt (mã số X17295.1 và AB006705.2) đã công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK. Các nhân tố cảm ứng nhiệt (Heat shock element: HSE) trên promoter có trình tự bảo thủ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc điều hòa biểu hiện gen đích bằng cảm ứng nhiệt. Đoạn trình tự của *AtHSP18.2*-promoter đã được gắn vào vector chuyển gen pXK7FNF2.0/HSP18.2, tạo thành cassette biểu hiện gen mã hóa protein huỳnh quang xanh (GFP) dưới sự điều khiển của promoter này. Kiểm tra hoạt động của *AtHSP18.2*-promoter trên các dòng tế bào thuốc lá BY-2 chuyển gen *gfp* ở 3 điều kiện nhiệt độ 35, 37 và 42°C cho thấy điều kiện cảm ứng tốt nhất là 37°C/2h. Tại điều kiện cảm ứng 37°C/2h, *AtHSP18.2*-promoter cũng đã được chứng minh điều khiển thành công biểu hiện kháng nguyên HA1 của virus cúm gia cầm H5N1 trong tế bào thuốc lá nuôi cấy BY-2. Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam phân lập và chứng minh hoạt động hiệu quả của promoter cảm ứng nhiệt trên các dòng tế bào thuốc lá. Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề cho những nghiên cứu và phát triển sản xuất protein tái tổ hợp trên hệ thống tế bào thực vật BY-2.

Từ khóa: *Arabidopsis thaliana*, BY-2, GFP, HSP18.2, promoter cảm ứng nhiệt.

MỞ ĐẦU

Sản xuất protein có ích và một số hợp chất khác bằng công nghệ sinh học thực vật đang là một hướng nghiên cứu ứng dụng triển vọng do sự gần gũi của thực vật trong lịch sử phát triển của loài người. Cho tới nay, protein tái tổ hợp có thể thu nhận được từ cây trồng chuyển gen, cơ quan/tế bào/mô thực vật nuôi cấy. Phương pháp phổ biến nhất để sản xuất được một protein tái tổ hợp là chuyển gen mã hóa cho protein đó vào một vector hoặc một hệ thống vector biểu hiện thích hợp dưới sự điều khiển của một hoặc một vài promoter (đoạn điều khiển) tương thích. Trong quá trình hoạt động của gen, promoter đóng vai trò như một công tắc đóng mở gen. Trên thực tế, sự biểu hiện của hầu hết các gen đều bị điều khiển bởi promoter để quyết định thời gian, vị trí các gen được hoạt động trong các mô, tế bào hoặc giai đoạn sinh trưởng của sinh vật đó. Vì vậy, kiểm soát biểu

hiện protein thông qua hoạt động của promoter là một trong những yếu tố đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất protein tái tổ hợp. Cho tới nay, hai dạng promoter thường được sử dụng để điều khiển quá trình tổng hợp protein là: (i) constitutive promoter hay còn gọi là promoter cơ định là promoter được hoạt hóa liên tục dẫn đến việc protein được biểu hiện ở toàn bộ mô/cơ quan thực vật; (ii) specific promoter hay còn gọi là promoter đặc hiệu, điều khiển sản xuất protein tại không gian, thời gian và điều kiện cảm ứng nhất định [2].

Nhiệt độ là một trong những tác nhân bất lợi phổ biến nhất và gây hại nhiều nhất cho cây trồng. Vì vậy, các protein cảm ứng nhiệt và promoter của chúng đóng vai trò thiết yếu trong quá trình điều khiển quá trình sinh lý, hóa sinh ở thực vật nhằm giảm những tác động bất lợi của nhiệt độ. Promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2 được phân lập lần đầu tiên từ cây *Arabidopsis*

bởi nhóm tác giả Takahashi et al. (1989) [6]. Đoạn promoter này có chiều dài 720 bp trong đó có 6 đoạn nucleotide có trình tự bảo thủ gồm (nGAAn) được gọi là nhân tố cảm ứng nhiệt (HSE: heat shock element) [6]. Promoter HSP18.2 hoạt động ở nhiệt độ cảm ứng tối ưu khác nhau tùy thuộc vào từng đối tượng thực vật và phương thức cảm ứng nhiệt [4, 6]. Sử dụng promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2 phân lập từ *Arabidopsis thaliana*, Yoshida et al. (1995) [9] đã điều khiển thành công biểu hiện gen *gus* (beta-glucuronidase) trên các tế bào BY-2. Sau 2 h cảm ứng ở nhiệt độ 37°C, hoạt tính của enzyme này đã tăng lên 1000 lần so với trước cảm ứng [9]. Nhằm tạo tiền đề cho việc nghiên cứu và phát triển sản xuất các protein tái tổ hợp trong tế bào thực vật, chúng tôi tiến hành phân lập promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2 (*AtHSP18.2*-promoter) từ *Arabidopsis thaliana* và sử dụng promoter này điều khiển biểu hiện protein chỉ thị huỳnh quang xanh (GFP: Green Fluorescent Protein) cũng như kháng nguyên HA1 của virus cúm gia cầm H5N1. Promoter *AtHSP18.2*-promoter hoạt động hiệu quả trong điều kiện cảm ứng 37°C.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt *Arabidopsis thaliana* (kiểu gen Col. 0) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Di truyền thực vật, Trường Đại học Tự do Brussels, Vương quốc Bỉ. Tế bào BY-2 được cung cấp bởi TS. Erwin Witters, Phòng thí nghiệm Hóa sinh thực vật, Trường Đại học Anwept, Vương Quốc Bỉ. Tế bào BY-2 nuôi cấy và chuyển gen theo qui trình của Nguyễn Thanh Vân và nnk. (2010) [8].

Thiết kế cặp môi đặc hiệu

Cặp môi đặc hiệu nhân đoạn *AtHSP18.2*-promoter được thiết kế bằng phần mềm BioEdit dựa trên các trình tự *AtHSP18.2*-promoter mã số AB006705.2, X17295.1, EF090413.1 trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Mỗi xuôi được thiết kế thêm trình tự của enzyme giới hạn *HindIII* và mỗi ngược được thiết kế thêm trình tự của enzyme giới hạn *SpeI* để thuận tiện cho việc lai ghép vào các vector chuyển gen trong những thí nghiệm tiếp sau.

Cặp môi nhân đoạn gen mã hóa kháng nguyên HA1 của virus cúm gia cầm A/H5N1 được thiết kế dựa vào trình tự đoạn HA1 đã đổi mã do PTN Di truyền thực vật, ĐH Tự do Brussels (Vương quốc Bỉ) cung cấp. Mỗi xuôi và mỗi ngược (HA1F/HA1R) có gắn đoạn attB1 và attB2 thuận tiện cho thí nghiệm gắn sản phẩm PCR vào vector chuyển gen. Ngoài ra, mỗi ngược HA1R còn gắn thêm 30 nucleotide của đoạn Myc để thuận tiện cho thí nghiệm phân tích protein sau này.

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách từ lá bánh tẻ cây *A. thaliana* 4 tuần tuổi theo qui trình tách chiết DNA của bộ QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN). DNA tổng số được tách từ các cụm tế bào BY-2 sau 4-6 tuần trên môi trường chọn lọc bằng phương pháp của Doyle và Doyle (1990) [1].

Phản ứng PCR: DNA tổng số tách từ lá cây *A. thaliana* hoặc từ cụm tế bào BY-2 được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR nhân đoạn promoter HSP18.2 với cặp môi 5'*AtHSP18.2* và 3'*AtHSP18.2*. Chu trình nhiệt như sau: 94°C: 3'; 25 chu kỳ bao gồm (94°C: 50", 50°C/55°C/60°C:30", 72°C: 1'); 72°C: 10'; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng bộ kit thôi gel của hãng QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit).

Dòng hóa promoter HSP 18.2: Sản phẩm thôi gel được gắn vào plasmid tách dòng pCR2.1 và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5- α theo phương pháp sốc nhiệt, sau đó nuôi trên môi trường LB có bổ sung kanamycin (50 mg/L) ở 37°C. Kiểm tra sự có mặt của promoter HSP18.2 bằng phản ứng colony-PCR với cặp môi M13F và M13R. Tách plasmid từ các khuẩn lạc dương tính bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Xác định trình tự gen trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer và sử dụng phần mềm BioEdit để so sánh trình tự đoạn *AtHSP18.2*-promoter thu được với các trình tự promoter tương tự đã công bố.

Thiết kế vector biểu hiện GFP và thử nghiệm chuyển gen vào dòng tế bào BY-2: Đoạn promoter *AtHSP18.2*-promoter được gắn vào vector chuyển gen thực vật pXK7FNF2.0 (Phòng thí nghiệm Hệ thống thực vật, Đại học

Ghent, Vương quốc Bỉ) thông qua vị trí cắt của enzyme giới hạn *Hind*III và *Spe*I (Fermentas), tạo thành vector chuyển gen pXK7FNF2.0/HSP18.2. Vector này được biến nạp vào dòng tế bào huyền phù theo qui trình của Nguyễn Thanh Vân và nnk. (2010) [8]. Sau chuyển gen, các dòng tế bào được nuôi trên môi trường BY2M có bổ sung 50 mg/L kanamycin.

Thiết kế vector biểu hiện HA1 và thử nghiệm chuyển gen vào dòng tế bào BY-2: đoạn gen mã hóa kháng nguyên HA1 được nhân lên theo phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu theo chu trình nhiệt như sau: 94°C: 5 phút, 30 chu kỳ (94°C: 45 giây, 50°C: 30 giây, 68°C: 30 giây), 68°C: 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector pXK7FNF2.0/HSP18.2 bằng phương pháp lai Gateway theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Mỹ) tạo nên vector chuyển gen pXK7FNF2.0/HSP18.2-HA1. Vector này cũng được sử dụng để chuyển gen mã hóa HA1 vào tế bào BY-2 theo qui trình của Nguyễn Thanh Vân và nnk. (2010) [8].

Cảm ứng nhiệt và phân tích dòng tế bào chuyển gen bằng soi GFP: Các dòng tế bào sống sót trên môi trường chọn lọc được cảm ứng ở nhiệt độ 35°C-42°C/1-2h. Biểu hiện của gen chỉ thị GFP được kiểm tra bằng phương pháp soi nổi dưới kính hiển vi huỳnh quang (ECLIPSE E800, Nikon, Nhật Bản) với kính lọc sắc B-2A, bước sóng kích thích tín hiệu FITC 490 nm, hiển thị và chụp ảnh tế bào bằng camera DS Nikon. Những cụm tế bào mang gen cần chuyển sẽ phát ra màu xanh lục sáng đặc trưng [3].

Lai miễn dịch Western blot: Những tế bào thuốc lá được biến nạp vector pXK7FNF2.0/HSP18.2-HA1 sống sót trên môi trường bổ sung kanamycin sẽ được chọn lọc sơ bộ bằng PCR với cặp mồi và chu trình nhiệt tương tự trên. Sau đó, các dòng tế bào PCR dương tính được nuôi lỏng, cảm ứng nhiệt và đánh giá biểu hiện kháng nguyên HA1 bằng lai miễn dịch Western blot theo qui trình sau: Mẫu tế bào thuốc lá được nghiền mịn, bổ sung 500 µl đệm PBS 1X. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút rồi thu 500 µl dịch nổi sang ống mới, xác

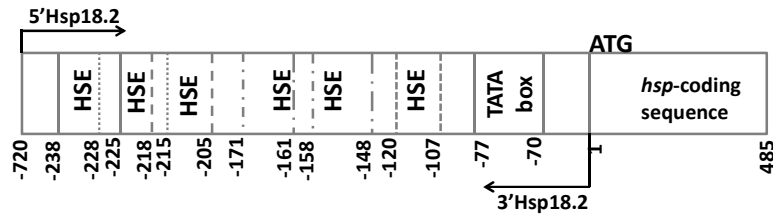
định nồng độ rồi bổ sung 100 µl Dye Protein vào mỗi 30 µg protein tổng số, sau đó ủ mẫu ở 95°C trong vòng 5 phút và đặt trong đá 10 phút. Protein tổng số được điện di trên gel SDS-polyacrylamide 12% rồi được chuyển sang màng nitrocellulose (Hybond C, Đức). Sau khi được ủ 1 h tại nhiệt độ phòng với dung dịch BSA 3%, màng được rửa sạch trong dung dịch TBS Tween 0,1% rồi tiếp tục ủ với dung dịch kháng thể kháng cmyc nồng độ 1:700 (PTN Miễn dịch, ĐH Tự do, Vương quốc Bỉ cung cấp) trong 1-2 h tại nhiệt độ phòng. Phản ứng miễn dịch phát hiện sự có mặt của protein HA1-C-Myc được thực hiện bằng cách ủ màng với dung dịch kháng thể kháng huyết thanh chuột có gắn peroxidase (nồng độ 1: 1000, Sigma, Hoa Kỳ) tại nhiệt độ phòng trong 1 h. Cuối cùng sử dụng Kit BioRad Horse Peroxidase conjugate substrate kit (BioRad, Hoa Kỳ) để hiện màu phản ứng trên màng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích trình tự promoter của gen *HSP18.2* và thiết kế cặp mồi đặc hiệu

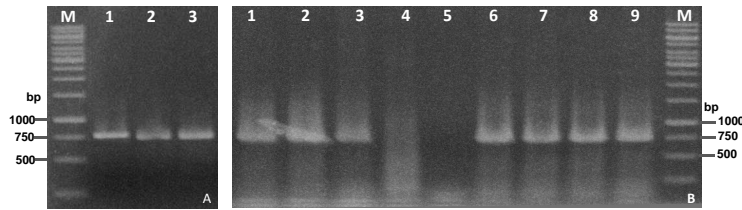
Trình tự số X17295.1 trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK có chiều dài 1440 bp trong đó đoạn mã hóa cho gen *hsp18.2* từ vị trí nucleotide số 1 đến 485. Từ vị trí số 1 ngược trở lại đầu 5' tới vị trí -720 là đoạn nucleotide mang 6 trình tự HSE đặc trưng của promoter cảm ứng nhiệt (Hình 1). Sử dụng phần mềm BioEdit, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi 5'AtHSP18.2 và 3'AtHSP18.2 để phân lập đoạn promoter điều khiển phiên mã của gen *hsp18.2* từ vị trí nucleotide -720 đến vị trí nucleotide 0 (hình 1). Đoạn trình tự phân lập được sẽ mang 6 trình tự nhân tố cảm ứng nhiệt HSE đảm bảo cho sự hoạt động của promoter. Cặp mồi thiết kế có trình tự như sau (ký tự in đậm là trình tự enzyme giới hạn): 5'AtHSP18.2: **AAGCTTC** CCGTCATTTCTTCTG; 3'AtHSP18.2: **ACTA** GTGGTTCGTTGCT TTTCG.

Đoạn promoter sẽ được nhân lên từ DNA tổng số của *A. thaliana*, dự kiến sẽ có chiều dài khoảng 750 bp.

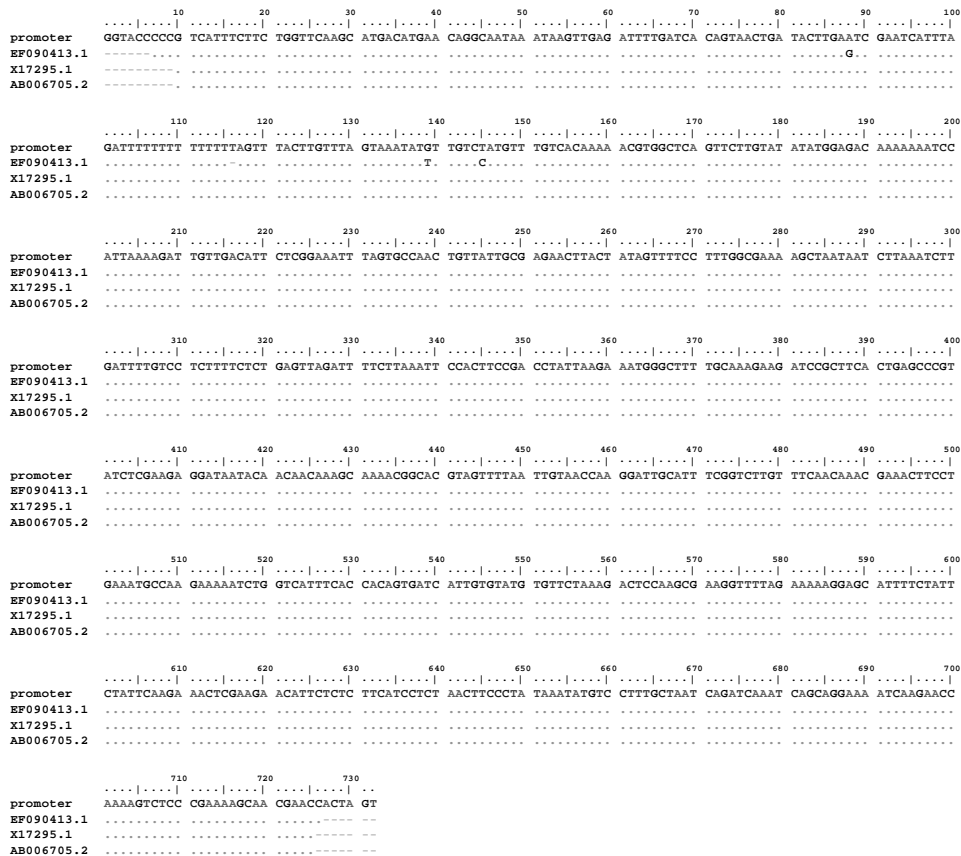


Hình 1. Sơ đồ cấu trúc đoạn AtHSP18.2-promoter của gen *hsp18.2*

ATG: bộ ba mã khởi đầu; *hsp*-coding sequence: đoạn mã hóa cho gen *hsp18.2* trong đó số thứ tự các nucleotide được đánh số kể từ 1-485 bắt đầu từ bộ ba mã khởi đầu ATG và ngược về đầu 5' là đoạn AtHSP18.2-promoter; HSE: heat shock element; TATA box: hộp TATA đặc trưng cho promoter.

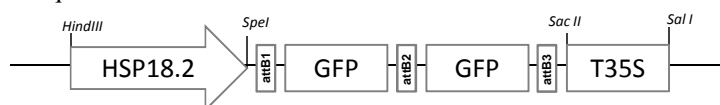


Hình 2. A: Xác định nhiệt độ gắn mồi thích hợp để nhân đoạn AtHSP18.2-promoter (Giếng 1: 50°C; Giếng 2: 55°C; Giếng 3: 60°C). B: Colony-PCR chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang đoạn AtHSP18.2-promoter (Giếng 1-9: dòng khuẩn lạc 1-9)



Hình 3. So sánh đoạn trình tự promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2

Promoter: đoạn trình tự AtHSP18.2-promoter; EF090413.1, X17295.1 và AB006705.2: đoạn trình tự đã công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK.



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc vector pXK7FNF2.0/HSP18.2

Phân lập promoter cảm ứng nhiệt của gen *hsp18.2*

Nhằm xác định điều kiện tối ưu để phân lập AtHSP18.2-promoter, chúng tôi đã tiến hành PCR với cặp mồi 5'AtHSP18.2 và 3'AtHSP18.2 tại các nhiệt độ bất cặp mồi khác nhau là 50°C, 55°C và 60°C. Sản phẩm PCR thu được đều cho băng điện di có kích thước xấp xỉ 750 bp (Hình 2A) bằng kích thước tính toán lý thuyết của đoạn promoter HSP18.2. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ bất cặp mồi cao nhất (60°C) để tăng tính đặc hiệu của phản ứng trùng hợp chuỗi PCR. Sau khi dòng hóa đoạn AtHSP18.2-promoter vào vector pCR2.1, sự có mặt của vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng kỹ thuật colony-PCR với cặp mồi M13F và M13R. Quan sát trên hình 2B cho thấy băng sản phẩm đặc hiệu kích thước 750 bp xuất hiện ở 7 dòng/ 9 dòng khuẩn lạc kiểm tra, chứng minh đoạn AtHSP18.2-promoter đã được gắn vào vector pCR2.1.

Giải trình tự đoạn promoter cảm ứng nhiệt của gen *HSP18.2*

Plasmid tách từ dòng khuẩn lạc số 1, 2, 3 (hình 2B) được đem đi giải trình tự. Kết quả đọc trình tự cho thấy ba plasmid tái tổ hợp đều mang đoạn AtHSP18.2-promoter có trình tự giống hệt nhau gồm 726 nucleotide. Bằng phần mềm BioEdit chúng tôi so sánh trình tự đoạn AtHSP18.2-promoter phân lập được và các trình tự promoter mang mã số EF090413.1, X17295.1 và AB006705.2 trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK. Đoạn AtHSP18.2-promoter đã phân lập giống hoàn toàn với trình tự X17295.1 và AB006705.2; sai khác với trình tự EF090413.1 tại 3 vị trí nucleotide 88, 139 và 145 (hình 3). Tuy nhiên, trình tự nucleotide của các nhân tố cảm ứng nhiệt HSE (hình 3, ký tự gạch chân) của 4 trình tự này giống nhau hoàn toàn. Như vậy, đoạn trình tự AtHSP18.2-promoter mang đầy đủ những yếu tố của một promoter cảm ứng nhiệt và 3 vị trí sai khác nêu

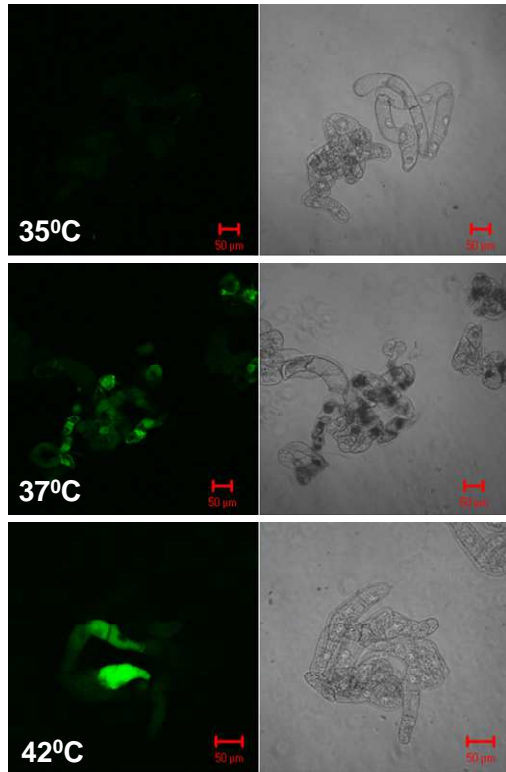
trên có thể sẽ không ảnh hưởng tới hoạt động của đoạn promoter cảm ứng nhiệt này.

Hoạt động của AtHSP18.2-promoter

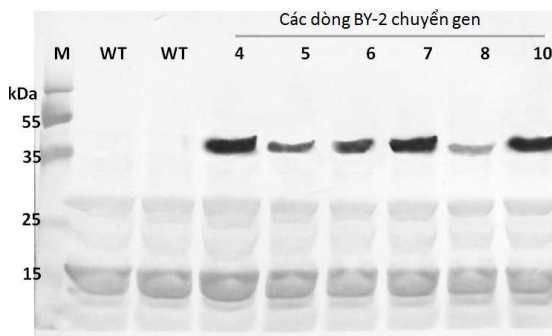
Để kiểm tra và khẳng định hoạt động của đoạn promoter cảm ứng nhiệt, chúng tôi thiết kế vector chuyển gen thực vật pXK7FNF2.0/HSP18.2 mang đoạn mã hóa protein huỳnh quang xanh GFP dưới sự điều khiển của AtHSP18.2-promoter (hình 4). Vector pXK7FNF2.0/HSP18.2 được chuyển vào dòng tế bào huyền phù BY-2 và được chọn lọc sơ bộ trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 50 mg/L kanamycin.

Sự có mặt của AtHSP18.2-promoter trong các dòng BY-2 trên một trường chọn lọc được kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 5'AtHSP18.2/3'AtHSP18.2 và khuôn mẫu là DNA tổng số tách từ các dòng tế bào BY-2 riêng lẻ sống sót trên môi trường chọn lọc sau 4 tuần. DNA tổng số từ 10/30 dòng tế bào cho đoạn sản phẩm kích thước khoảng 750 bp tương ứng với kích thước tính toán của đoạn promoter cảm ứng nhiệt. Điều này cho thấy 10 dòng tế bào này có mang vector tái tổ hợp pXK7FNF2.0/HSP18.2. Nuôi trong môi trường lỏng các khối tế bào kích thước 0,5 cm² tại điều kiện lắc 150 v/ph trong 1 h ở 25°C trước khi cảm ứng ở các mức nhiệt độ là 35, 37 và 42°C trong 2 h. Sau 2 h cảm ứng nhiệt trong điều kiện 35°C, hầu như không quan sát được màu xanh đặc trưng của protein huỳnh quang xanh ở các tế bào thuốc lá. Khi tăng nhiệt độ cảm ứng lên 37 và 42°C, nhiều tế bào đã phát ra ánh sáng xanh đặc trưng (hình 5). Quan sát các mẫu tế bào dưới kính hiển vi cho thấy không có nhiều sự khác biệt về số lượng tế bào phát huỳnh quang xanh thu được ở hai nhiệt độ 37°C và 42°C. Do đó nhằm bảo vệ tế bào tránh những tác động không mong muốn từ sự thay đổi nhiệt độ, chúng tôi lựa chọn điều kiện cảm ứng là 37°C/2h. Sự biểu hiện của GFP trong những dòng tế bào BY-2 chuyên

gen đã chứng minh vai trò điều khiển quá trình tổng hợp protein trong điều kiện cảm ứng nhiệt độ của promoter HSP18.2.



Hình 5. Biểu hiện của GFP tại các điều kiện nhiệt độ cảm ứng khác nhau. Kích thước thực tế 50 µm tương đương với đoạn thẳng chú thích trong hình vẽ.



Hình 6. Lai miễn dịch các dòng BY-2 với kháng thể đặc hiệu

M: thang chuẩn protein (Fermentas); WT: đối chứng âm các dòng tế bào không chuyển gen; 4, 5, 6, 7, 8, 10: các dòng BY-2 chuyển gen.

Phân tích sự biểu hiện của protein HA1 trong tế bào BY-2 bằng phương pháp lai miễn dịch

Sử dụng cặp môi HA1F/HA1R, 17 dòng tế bào BY-2 sống sót trên môi trường bổ sung kanamycin chọn lọc đã xuất hiện bằng DNA có kích thước khoảng 1000 bp đúng với kích thước của gen HA1, chứng tỏ đây là những dòng tế bào mang đoạn trình tự HA1. Những dòng tế bào này được chuyển sang môi trường lỏng cho những phân tích tiếp theo.

Để thuận tiện cho việc kiểm tra biểu hiện của protein tái tổ hợp bằng các phương pháp miễn dịch, đoạn polypeptide Myc (myc tag) thường được gắn vào đầu C hoặc đầu N của protein cần biểu hiện. Vì vậy, chúng tôi đã thiết kế bổ sung 30 nucleotide của đoạn Myc vào mỗi ngược, tạo nên đoạn HA1 trong thí nghiệm này sẽ được gắn thêm đoạn Myc ngay sau đoạn gen mã hóa HA1, trước mã kết thúc. Như vậy, protein HA1 tái tổ hợp sẽ được hình thành với đoạn C-Myc tag. Vì vậy, đánh giá sự có mặt của đoạn polypeptide này sẽ tương ứng với đánh giá biểu hiện của protein tái tổ hợp đó.

Protein tổng số từ hai dòng BY-2 không chuyển gen và 17 dòng tế bào PCR dương tính trên được phân tách trên gel polyacrylamide theo phương pháp điện di SDS-PAGE, chuyển qua màng nitrocellulose và lai với kháng thể đặc hiệu. Kháng thể đặc hiệu với C-myc (PTN Miễn dịch, ĐH Tự do Brussels, Vương quốc Bỉ) có phản ứng lai miễn dịch đặc hiệu với các dòng BY-2 chuyển gen số 4, 5, 6, 7, 8 và 10 (hình 6). Ở 6 dòng tế bào này, chúng tôi quan sát được băng protein có kích thước khoảng 35 kDa tương ứng với kích thước theo tính toán của protein HA1, tuy nhiên mức độ biểu hiện của mỗi dòng khác nhau. Các dòng số 4, 7 và 10 có biểu hiện protein HA1 cao nhất. Các dòng BY-2 số 6, 5 và 8 lần lượt có mức độ biểu hiện protein giảm dần. Hai dòng đối chứng âm đều không cho băng protein đặc trưng. Kết quả khẳng định sự biểu hiện của protein HA1 trong những dòng tế bào BY-2 nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Promoter cảm ứng nhiệt HSP18.2 đã được phân lập thành công từ cây *Arabidopsis thaliana*, không có sự sai khác nào về trình tự

nucleotide tại các vị trí của nhân tố cảm ứng nhiệt HSE để điều khiển sự phiên mã của gen với các trình tự đã HSP18.2 đã công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế GENBANK. Promoter này đã được sử dụng để điều khiển biểu hiện của protein huỳnh quang xanh GFP trong tế bào thuốc lá BY-2 với điều kiện cảm ứng tối ưu là 37°C/2h. Hơn nữa, AtHSP18.2-promoter cũng đã điều khiển thành công biểu hiện kháng nguyên HA1 của chủng virus cúm A/H5N1 với kết quả thu được 6 dòng tế bào biểu hiện protein HA1, trong đó 3 dòng có mức độ biểu hiện protein vượt trội. Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam phân lập và chứng minh hoạt động hiệu quả của promoter cảm ứng nhiệt trên các dòng tế bào thuốc lá nuôi cấy BY-2. Thành công bước đầu này đã tạo tiền đề cho việc điều khiển biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào thực vật ở những thời điểm và điều kiện nhất định.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí của đề tài Hợp tác quốc tế về KH&CN theo nghị định thư giữa Việt Nam và Vương Quốc Bỉ: “Nghiên cứu biểu hiện gen Glycoprotein 5 (GP5) của virus gây bệnh lợn tai xanh ở thuốc lá và đậu tương”. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn GS. G. Angenon và TS. Trần Thanh Thu (Đại học Tự do Brussels, Vương quốc Bỉ) đã cung cấp hạt *Arabidopsis*, đoạn trình tự nucleotide kháng nguyên HA1 của virus cúm gia cầm H5N1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
2. Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, 2007. Promoter và ứng dụng trong công nghệ gen thực vật. Tạp chí Công nghệ sinh học, 5(1): 1-18.
3. Liu A., Zhang S. B., Xu X. J., Ren D. T., Liu G.Q., 2004. Soluble expression and characterization of a GFP-fused pea actin isoform (PEAc1). Cell Res., 14(5):407-14.
4. Moriwaki M., Yamakawa T., Washino T., Kodama T., Igarashi Y., 1999. A comparison of GUS activity after liquid- and air-heat shock treatments in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* harboring the *Arabidopsis* HSP18.2 promoter- GUS chimeric gene, Plant Biotechnol., 16: 303-305.
5. Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R. M., Schiermeyer A., 2013. Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures. Curr. Pharm. Des., 19(31): 5531-5542 .
6. Takahashi T., Naito S., Komeda Y., 1989. The *Arabidopsis* HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. Plant J., 2: 751-761.
7. Twyman R. M., Schillberg S., Fischer R., 2013. Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Curr. Pharm. Des., 19(31): 5486-5494 .
8. Nguyen Thanh Van, Nguyen Tuong Van, Le Quynh Lien, 2010. Optimising in vitro culture and Agrobacterium-mediated transformation protocols of tobacco BY-2 cells, Tạp chí Công nghệ sinh học, 8(3B): 1205-1210.
9. Yoshida K., Kasai T., Garcia M.R., Shinmyo A., 1995. Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44(3-4): 466-72.

**ISOLATION OF HEAT SHOCK PROMOTER HSP18.2
FROM *Arabidopsis thaliana* AND APPLICATION
IN RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION**

Nguyen Chi Mai¹, Nguyen Tuong Van², Tran My Linh², Le Quynh Lien³

¹Centre for High technology Development, VAST

²Institute of Biotechnology, VAST

³Institute of Marine Biochemistry, VAST

SUMMARY

Promoter locating upstream on a DNA-coding sequence initiates transcription of a particular gene. Therefore, promoter plays a vital role in controlling the expression of recombinant proteins in Molecular Farming. In this study, the heat shock promoter HSP18.2 calling *AtHSP18.2*-promoter was isolated from *Arabidopsis thaliana*. The nucleotide sequence of *AtHSP18.2*-promoter is 100% homology with nucleotide sequences of two other promoters (Acc.No X17295.1 and AB006705.2). The heat shock elements HSP of these sequences are conserved, meaning the functional of the isolated sequence as an heat shock promoter. Vector pXK7FNF2.0/HSP18.2 was designated containing the coding sequence of Green fluorescent protein GFP under the control of *AtHSP18.2*-promoter and transferred into cultured tobacco cell BY-2. The condition of 37°C/2h was identified as the optimal temperature for heat shock induction. Additionally, the expression of HA1 of avian A/H5N1 virus was successfully controlled by promoter *AtHSP18.2*-promoter. In this study we have demonstrated for the first time the isolation and application in controlling recombinant protein expression of an heat shock *AtHSP18.2*-promoter. This is the basis for further investigation in production of significant proteins using BY-2 cells.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, BY-2, GFP, HSP18.2, heat shock promoter.

Ngày nhận bài: 8-6-2013