

THIẾT KẾ THƯ VIỆN ADNc CHỊU HẠN Ở LÚA VÀ PHÂN LẬP GEN *NLI-IF1* BẰNG KỸ THUẬT SÀNG LỌC PHÉP LAI ĐƠN TRONG TẾ BÀO NẤM MEN

Nguyễn Duy Phương, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội*

Viện Di truyền nông nghiệp, (*)xuanhoi.pham@gmail.com

TÓM TẮT: Cơ sở dữ liệu về trình tự promoter đã chứng minh trình tự ADN đích CCTCCTCC có mặt phổ biến trong các promoter cảm ứng với điều kiện stress của các gen chức năng liên quan đến stress như hạn, mặn và lạnh. Ngoài ra, các nghiên cứu phân tích chức năng của hai promoter cảm ứng với stress cho thấy promoter JRC0332 biểu hiện đặc trưng trong điều kiện lạnh và promoter JRC0528 biểu hiện trong điều kiện mặn, hạn, lạnh và có mặt ABA. Cả hai promoter này đều có chứa trình tự đích. Trong nghiên cứu này, thư viện ADNc xử lý hạn từ ARN tổng số của giống lúa Niponpare đã được thiết kế và sử dụng cho mục đích sàng lọc gen. Chúng tôi đã sàng lọc gen từ thư viện ADNc bằng phương pháp lai phân tử trong tế bào nấm men (Yeast One Hybrid Assay) sử dụng 2 trình tự 50 nucleotit nằm trong trình tự lõi của 2 promoter JRC0332 và JRC0528, chứa trình tự đích. Chúng tôi đã phân lập được một ADNc mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF (Nuclear LIM interactor-interacting factor). Nghiên cứu *in vivo* trong tế bào nấm men đã cho thấy NLI-IF có khả năng tương tác đặc hiệu với trình tự đích.

Từ khóa: chịu hạn, lai nấm men, nhân tố phiên mã, NLI, thư viện ADNc.

MỞ ĐẦU

Cách tiếp cận hướng nghiên cứu về stress thực vật trên thế giới hiện nay đang tập trung vào việc phân lập và nghiên cứu đặc tính một tập hợp đầy đủ các gen liên quan đến bất lợi môi trường và mối liên hệ giữa các bất lợi mặn, hạn và nhiệt độ. Hàng trăm gen được cảm ứng trong các điều kiện bất lợi khác nhau và sản phẩm của các gen cảm ứng với điều kiện bất lợi được chia làm hai nhóm: nhóm các protein chức năng giúp thực vật chống lại bất lợi của môi trường và nhóm các protein điều khiển làm nhiệm vụ điều hòa biểu hiện gen và truyền tín hiệu trong quá trình đáp ứng điều kiện bất lợi. Các nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là họ gen lớn [8]. Gần đây, rất nhiều nghiên cứu về nhân tố phiên mã được thực hiện trên cây mô hình *Arabidopsis* và các loài thực vật khác đã chứng minh vai trò quan trọng của chúng trong quá trình điều hòa phản ứng của thực vật trong các điều kiện bất lợi môi trường. Thực nghiệm đã chứng minh, sự biểu hiện của các nhân tố phiên mã kích hoạt sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng, do đó làm tăng cường khả năng chịu hạn ở thực vật. Vì vậy, các nghiên cứu về các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến tính chịu hạn đang trở thành định hướng nghiên cứu đầy tiềm năng trong việc chọn tạo giống chịu hạn.

Đặc điểm đặc trưng của các protein điều

khiển (nhân tố phiên mã) là có hai vùng hoạt động (domain): vùng hoạt hoá các protein chức năng (activation domain) và vùng liên kết (binding domain) với các trật tự ADN đặc hiệu (cis-acting element) trên vùng điều khiển của gen (promoter). Dựa vào đặc tính bám ADN, kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men được hình thành để phân lập các nhân tố phiên mã. Nhân tố phiên mã đầu tiên (OLF-1) được phân lập bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men [13] và ngay lập tức trở thành phương pháp đầy tiềm năng trong việc phân lập các gen mã hóa các protein có khả năng bám ADN [16].

Ở thực vật, trật tự ADN đặc hiệu ABRE (ABA responsive element - yếu tố đáp ứng ABA) có trình tự lõi là ACGTGGC lần đầu tiên được phát hiện trên vùng điều khiển gen Em ở lúa mì [4]. Hai nhóm protein điều khiển quá trình phiên mã AREB/ABF bám vào trật tự ADN đặc hiệu ABRE trên các vùng điều khiển gen và hoạt hóa sự biểu hiện các gen chức năng liên quan đến kháng hạn [3, 13]. Tiếp theo, trật tự ADN đặc hiệu DRE/CRT (Dehydration Responsive Element/C repeat - yếu tố/đoạn C lặp lại đáp ứng hạn) có trình tự lõi là A/GCCGAC được phát hiện trên vùng điều khiển gen RD29 ở *Arabidopsis* [15] và sau này được phát hiện trên rất nhiều đoạn điều khiển gen của các gen chức năng biểu hiện trong điều kiện hạn, mặn, lạnh

[2, 5, 10]. Các gen điều khiển quá trình phiên mã thuộc nhóm AP2 (APETALA2)/ethylene-responsive element-binding factor (ERF) bám vào trật tự ADN đặc hiệu DRE và được đặt tên là DREB1/CBF và DREB2 [6]. Trật tự ADN đặc hiệu MYC và MYB có trình tự lõi là CANNTG (MYC) và C/TAACNA/G (MYB) được phát hiện trên vùng khởi động gen RD22. Các nhân tố phiên mã AtMYC và AtMYB bám vào trật tự ADN đặc hiệu MYC và MYB và hoạt hóa biểu hiện gen chức năng liên quan đến chịu hạn [1]. Trật tự ADN đặc hiệu nhóm gen NAC có trình tự lõi là CATGTG được phát hiện trên vùng khởi động gen ERD1. Ba nhân tố phiên mã họ NAC là ANAC019, ANAC055 và ANAC072 bám vào trật tự đặc hiệu nhóm NAC trên vùng khởi động gen chức năng và hoạt hóa biểu hiện các gen này [11]. Trong một nghiên cứu khác, Tran et al. (2007) [12] đã phân lập được một gen mã hóa nhân tố phiên mã liên kết đặc hiệu với một trình tự đích tương đồng với trình tự 14 bp nằm trong promoter của gen RPS1, có tên là trình tự ZFHDRS. Nhân tố phiên mã này hoạt hóa một số gen cảm ứng với điều kiện stress và làm tăng khả năng chống chịu stress của cây chuyển gen.

Gần đây, sử dụng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men với trình tự đích có chiều dài 50 nucleotid chứa trật tự DRE trên vùng khởi động gen JRC2606 chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã OsRap2.4B từ giống lúa Mộc Tuyền [7]. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả thiết kế thư viện ADNc từ ARN tổng số của giống lúa Niponpare đã xử lý hạn và phân lập gen NLI-IF1 (Nuclear LIM interactor-interacting factor), mã hóa cho một protein trung gian nằm trong phức hợp liên kết protein-protein, thuộc họ nhân tố phiên mã LIM, tham gia điều hòa quá trình phiên mã bằng phương pháp sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Giống lúa Niponpare được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu của Shinozaki tại Trung tâm Nghiên cứu Khoa học nông nghiệp Nhật Bản.

Chủng nấm men dùng trong kỹ thuật sàng lọc Yeast one-hybrid được cung cấp bởi phòng

thí nghiệm Sinh học Phân tử thực vật, thuộc Trung tâm Công nghệ sinh học và Kỹ thuật di truyền Quốc tế (International Centre of Genetic Engineering ADN Biotechnology), New Delhi, Ấn Độ.

Bộ kit tạo thư viện ADNc và các chủng vi khuẩn *E. coli* XLO và XL1-blue được cung cấp bởi hãng Stratagene.

Phương pháp

Tách chiết ARN tổng số của giống lúa Niponpare đã xử lý hạn

Hạt lúa Niponpare được phá ngủ ở 42°C trong 3 ngày, sau đó cho nảy mầm và sinh trưởng 15 ngày trong dung dịch MS ở 28°C, cây non được xử lý hạn bằng PEG 8000. ARN tổng số được tách chiết từ 5 g lúa đã xử lý hạn, sử dụng đệm GITC theo phương pháp của Sambrook et al. (1989) [8].

Tổng hợp ADNc và thiết kế thư viện xử lý hạn từ ARN của giống lúa Niponpare

Thư viện ADNc chịu hạn được xây dựng bằng kit sinh tổng hợp thư viện Hybrid-Zap 2.1 của hãng Stratagene, theo đó các phân tử ADNc có chiều xác định được tổng hợp từ 5 µg mARN tinh sạch từ ARN tổng số đã xử lý hạn của giống lúa Niponpare; 150 ng ADNc có chiều xác định được chèn vào vùng MCS (multi cloning site) của vector Hybrid Zap 2.1 tại vị trí của hai enzyme giới hạn EcoRI và XhoI bằng phản ứng ghép nối nhờ enzyme T4-ligase. Thư viện ADNc-Hybrid Zap 2.1 được đóng gói trong hỗn hợp protein Gigapack III Gold để tạo thành “thư viện Lambda phage tái tổ hợp”. Thư viện sau đó được kiểm tra kích thước và mức độ đại diện trước khi kích hoạt tạo ra thư viện ADNc-pAD-GAL4 bằng phương pháp *in-vivo*, sẵn sàng cho việc sàng lọc bằng kỹ thuật yeast one-hybrid [14].

Thiết kế trật tự đích lặp lại bằng kỹ thuật biến tính - phục hồi

Các cặp oligo được thiết kế dựa trên trình tự 50 nucleotide có chứa trật tự lõi CCTCCTCC của hai promoter JRC0528 và JRC0332. Từng cặp oligo được bắt cặp lại với nhau bằng phản ứng biến tính - phục hồi [7] để tạo các phân đoạn ADN sợi đôi có mang trình tự đích ở giữa, được giới hạn 1 đầu bằng vị trí nhận biết của

enzyme cắt giới hạn và 1 đầu là đầu dính gồi nhau hoặc cả 2 đầu đều là đầu dính có khả năng bắt cặp bổ sung với nhau. Các phân đoạn ADN được ghép nối lại bằng phản ứng sử dụng enzyme ADN T4-ligase để tạo thành các phân đoạn ADN lớn hơn có kích thước khác nhau. Mỗi phân đoạn ADN có chứa ít nhất 2 trật tự lõi CCTCCTCC, giới hạn 2 đầu bởi enzyme cắt giới hạn EcoRI và XhoI được nhân dòng trong vector pSKII và kiểm tra bằng phương pháp PCR và giải trình tự ADN sau đó.

Biến nạp tạo vector thông báo và tạo nấm men trong sàng lọc one-hybrid

Các trật tự đích từ vector nhân dòng sẽ được chuyển sang các vector pHis-Si và pLacZ nhờ phản ứng cắt và ghép nối tại 2 vị trí enzyme cắt giới hạn EcoRI và XhoI, để tạo thành các vector thông báo mang các trật tự đích khác nhau. Các vector thông báo này được biến nạp đồng thời vào chủng nấm men YM4271 để tạo 2 chủng nấm men cho phản ứng sàng lọc thư viện bằng kỹ thuật yeast one-hybrid theo từng cặp (vector

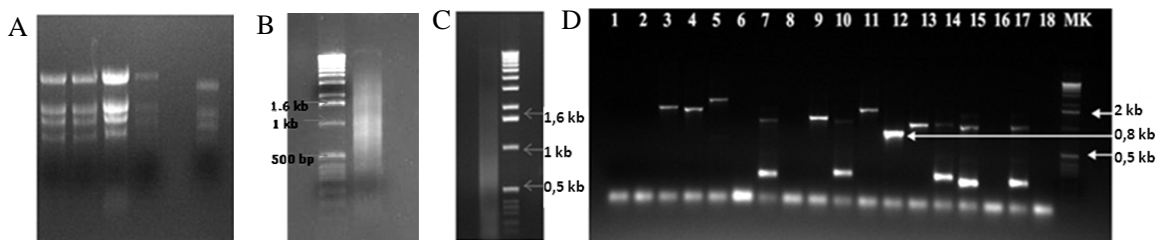
pHis-Si và pLacZ cùng mang một loại trật tự đích tương ứng với 2 promoter JRC0528 và JRC0332) theo quy trình sốc nhiệt của hãng clontech [16].

Sàng lọc thư viện ADNc- pAD-GAL4 bằng kỹ thuật Yeast One-Hybrid

Từng chủng nấm men được kiểm tra mức độ hoạt động cơ bản (nền) của vector thông báo pHis-Si (xác định nồng độ 3-AT bổ sung tối đa trong môi trường SD thiếu Histidine) và vector thông báo pLacZ (xác định thời gian chuyển hóa β -galactosides tối thiểu) trước khi tiến hành sàng lọc bằng kỹ thuật yeast one-hybrid. Thư viện ADNc- pAD-GAL4 xử lý hạn được biến nạp vào từng chủng nấm men và sàng lọc trên môi trường SD bổ sung 3-AT và thời gian chuyển hóa β -galactosides theo quy trình MATCHMAKER One-Hybrid System của hãng Clontech [16].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thiết kế thư viện ADNc “xử lý hạn” của giống lúa Niponpare



Hình 1. Kết quả kiểm tra các bước thiết kế thư viện ADNc xử lý hạn của giống lúa Niponpare

A. Kết quả tách chiết ARN tổng số; B. Kết quả sinh tổng hợp sợi I ADNc; C. Kết quả sinh tổng hợp sợi II ADNc; D. Kết quả kiểm tra kích thước thư viện ADNc bằng PCR với cặp mỗi đặc hiệu của vector pAD-GAL4 (5'-AD-Fw và 3'-AD-Rv).

ARN tổng số được tách từ lúa Niponpare 15 ngày tuổi đã xử lý hạn trong các khoảng thời gian 1h, 2h, 4h, 8h và 24h bằng đệm tách GITC (hình 1A). Sản phẩm ARN tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose biến tính và máy quang phổ nano-drop trước khi được tinh sạch để thu được sản phẩm ARN thông tin bằng phương pháp từ tính của hãng Promega. Sản phẩm ARN thông tin đã tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp sợi I với môi là đoạn oligo - dT (20 nucleotide) và phản ứng tổng hợp sợi II được tiến hành ngay sau đó đều sử dụng hóa chất và quy trình trong bộ kit sinh tổng hợp thư

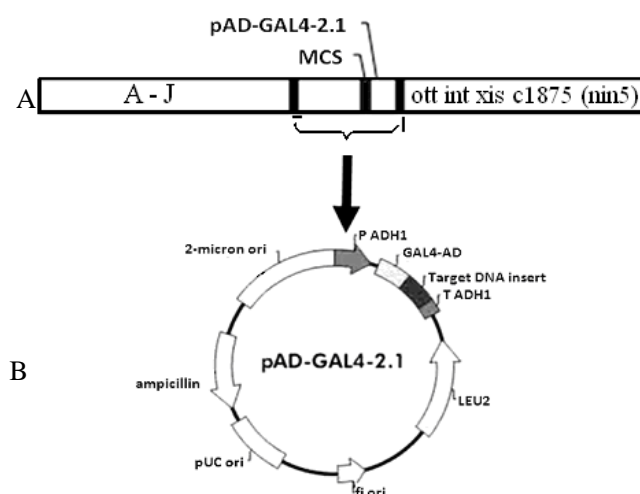
viện Hybrid-Zap2.1 của hãng Stratagene. Kết quả kiểm tra sơ bộ bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%, sản phẩm tổng hợp ADNc sợi I và sợi II đều đạt chất lượng mong muốn (vệt sáng dài, liên tục trong khoảng kích thước từ 500 bp đến hơn 1500 bp - hình 1B, C). Do đã thiết lập được phương pháp tinh sạch các phân đoạn ADN có kích thước lớn hơn 400 bp [7] nên trong nghiên cứu này mặc dù nguyên liệu phóng xạ không được sử dụng (như mô tả trong quy trình của hãng) nhưng chúng tôi vẫn tinh sạch được các phân tử ADNc có chiều xác định (đầu 5' có đầu dính của enzyme cắt giới hạn EcoRI, đầu 3' là đầu dính của enzyme cắt

giới hạn *Xho*I).

1 μ l dung dịch (150 ng) sản phẩm ADNc có chiều xác định được gắn với vector HybridZap-2.1 bởi enzyme T4-ligase, sản phẩm sau đó được đóng gói trong vỏ protein Gigapack III Gold để tạo thư viện ADNc - HybridZAP-2.1 sơ cấp theo đúng quy trình của hãng Stratagene. Kết quả chuẩn hóa và kiểm tra kích thước của thư viện ADNc sơ cấp cho thấy thư viện ADNc thu được có nồng độ 10^5 pfu/ μ l (số liệu không công bố) và kích thước đạt từ 800 - 2000 bp, tỉ lệ phage mang ADNc chiếm 85-92% (hình 1D). Kết quả tạo thư viện ADNc này phù hợp với yêu cầu của các thí nghiệm sàng lọc tiếp theo, vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khuếch đại thư viện theo quy trình của hãng Stratagene. Thư viện ADNc thứ cấp có nồng độ đạt 10^{10} pfu/ml, được chúng tôi bảo

quản trong DMSO 5% để phục vụ cho các thí nghiệm sàng lọc gen. Kết quả này tương đương với thư viện chịu hạn của giống lúa Mộc tuyền đã được xây dựng trong nghiên cứu trước đó của chúng tôi [7].

Để sử dụng trong phương pháp sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men, thư viện ADNc - HybridZAP-2.1 cần phải chuyển sang thư viện ADNc-pAD-GAL4. Vector HybridZAP-2.1 là một “binary vector” được thiết kế chứa các trình tự ADN đặc biệt cho phép cắt lambda phage tái tổ hợp thành dạng phagemid bằng phương pháp *in-vivo* trong tế bào *E. coli* chủng XLO để tạo ra vector biểu hiện pAD-GAL4 mang ADNc (hình 2). Chúng tôi sử dụng thư viện ADNc pAD-GAL4-2.1 làm đối tượng cho thí nghiệm sàng lọc gen bằng kỹ thuật lai nấm men (Y1H).



Hình 2. Cấu trúc vector Hybrid Zap 2.1 (A) và pAD-GAL4-2.1 (B)

Thiết kế các vector thông báo (reporter vector) mang các trình tự đích lặp lại

Các kết quả microarray phân tích biểu hiện của promoter trong hệ gen thực vật đã phát hiện một số lượng lớn các promoter hoạt động trong điều kiện stress, trong đó có 34 promoter chứa trình tự lõi (yếu tố *cis*-acting) CCTCCTCC. Chúng tôi đã thiết kế 3 cặp oligo nucleotide (1, 2 và 3) từ trật tự 50 nucleotide có chứa trình tự lõi của promoter JRC0332 và tương tự là 3 cặp oligo nucleotide (4, 5 và 6) cho promoter JRC0528. Đây là hai promoter hoạt động mạnh trong điều kiện stress, có cùng một yếu tố *cis*-acting nằm trong vùng hoạt hóa (hộp TATA) có

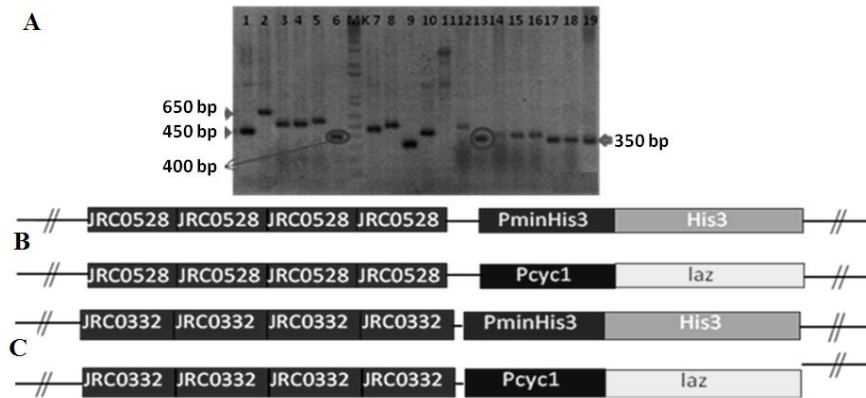
trình tự CCTCCTCC. Từng cặp oligo được bắt cặp với nhau để tạo thành các phân đoạn ADN sợi đôi bằng phương pháp biến tính-hồi phục. Theo đó các cặp oligo số 1 hoặc số 4 sau khi bắt cặp lại với nhau sẽ tạo thành các phân tử ADN sợi đôi mà đầu 5' mang đầu dính của enzyme cắt giới hạn *Eco*R I và đầu 3' là đầu dính 10 nucleotid. Tương tự, hai cặp oligo 2 hoặc 5 khi bắt cặp lại sẽ tạo ra các phân tử ADN sợi đôi có 2 đầu dính 10 nucleotid ở đầu 3' và đầu 5'; hai cặp oligo 3 và 6 tạo ra phân tử ADN sợi đôi có đầu dính 10 nucleotid ở đầu 5' và vị trí gắn của enzyme cắt giới hạn *Sma*I ở đầu 5'. Về nguyên tắc, khi có mặt enzyme gắn T4 ligase thì các

đoạn ADN 1, 2 và 3 (hoặc 4, 5 và 6) gắn với nhau để tạo trật tự đích có 3 lần lặp lại; đoạn ADN 1 và 3 (hoặc 4 và 6) gắn với nhau để tạo

trật tự đích có 2 lần lặp lại và đoạn ADN 2 hoặc 5 có thể tự gắn với nhau để tăng số lần lặp lại trình tự đích (hình 3).

- Cặp oligo thứ 1: AATTTGTGGCCTCGCTCCTCCTCCTCCACTCCACCACCC
CACCGGAGCGGAGGAGGAGAAGGAGGTGAGGTGGTGGG**TGGGCGGGCC**
- Cặp oligo thứ 2: **ACCCGCCCCGGT**GGCCTCGCCTCCTCCTCCTCCTCCACTCCACCACCCACCCGCCCGG
CACCGGAGCGGAGGAGGAGAAGGAGGTGAGGTGGTGGGCGGGCC**TGGGCGGGCC**
- Cặp oligo thứ 3: **ACCCGCCCCGGT**GGCCTCGCCTCCTCCTCCTCCTCCACTCCACCACCCACCCGCCCGGGCC
CACCGGAGCGGAGGAGGAGAAGGAGGTGAGGTGGTGGGCGGGCC**CGGG**
- Cặp oligo thứ 4: AATTCGAAAACGGAACGCCCCCCCTCCTCCCCTCTCCACGTC
GCTTTTGCCTTGCGGGGGGGGAGGAGGGGAGAGGTGCAGT**GACGCGCCA**
- Cặp oligo thứ 5: **ACTGCGGGT**CGAAAACGGAACGCCCCCCCTCCTCCCCTCTCCACGTCAGTGCAGCGGT
GCTTTTGCCTTGCGGGGGGGGAGGAGGGGAGAGGTGCAGTGCAGTGCAGCGCCA**TGACGCGCCA**
- Cặp oligo thứ 6: **ACTGCGGGT**CGAAAACGGAACGCCCCCCCTCCTCCCCTCTCCACGTCAGTGCAGCGGTCCC
GCTTTTGCCTTGCGGGGGGGGAGGAGGGGAGAGGTGCAGTGCAGTGCAGCGCCA**AGG**

Hình 3. Các cặp oligo mang trật tự lõi của promoter JRC0332 và promoter JRC0528



Hình 4. Kết quả kiểm tra các khuẩn lạc dương tính bằng PCR và sơ đồ minh họa giản lược các vector thông báo mang các trình tự đích 4 lần lặp lại

A. Điện di kiểm tra khuẩn lạc biến nạp tập hợp trình tự đích cho promoter JRC0528 và JR0332, các băng điện di có kích thước từ 350 bp đến 650 bp tương ứng với trình tự đích mang 3 đến 9 trật tự lõi, khuẩn lạc số 6 và 13 được lựa chọn để tách plasmid, giải trình tự và biến nạp vào vector thông báo có đánh dấu tròn như trên hình; Sơ đồ giản lược vector thông báo pHis-Si và pLacZ cho promoter JRC0528 (B) và promoter JR0332 (C) có mang 4 trật tự lõi, vector pHis-Si có promoter minHis3 điều khiển gen tổng hợp His3 trong khi vector pLacZ có gen Laz được điều khiển bởi promoter cyc1 có khả năng chuyển hóa β -galactosides.

Tập hợp các trình tự đích với số lần lặp lại khác nhau của promoter JRC0332 và JRC0528 được giới hạn đầu 3' là vị trí đầu dính của enzyme cắt giới hạn EcoRI và đầu 5' là của enzyme cắt giới hạn SmaI đã được nhân dòng trong vùng MCS (vị trí EcoRI và SmaI) của vector pSKII và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5 α khả biến, chọn lọc khuẩn lạc dương tính bằng phản ứng PCR với cặp mồi T3/T7.

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi T3/T7 cho thấy, cả hai bản điện di đều thu được các băng ADN có kích thước khác

nhau trong khoảng từ 300 đến 600 bp (hình 4A). Điều đó có nghĩa là cả hai tập hợp trình tự đích đều có các phân đoạn có kích thước khác nhau (từ 100 đến 400 bp) đã được chèn thành công trong vector nhân dòng pSKII. Các phân đoạn có kích thước khác nhau tương ứng với số lượng bản sao của trật tự lõi trong trình tự đích chúng tôi tạo ra là khác nhau. Cụ thể, với phân đoạn 300 bp, chỉ có 2 trật tự lõi trong trình tự đích lặp lại, phân đoạn 650 bp tương ứng với việc tồn tại 9 trật tự lõi trong trình tự đích. Lợi thế của phương pháp này là trong một phản ứng

chúng tôi có thể tạo ra nhiều trình tự đích có số lần lặp lại khác nhau. Việc sở hữu trình tự đích có số lần lặp lại khác nhau như vậy giúp chúng tôi có nhiều lựa chọn cho việc sàng lọc dựa trên mỗi tương tác phân tử ADN-protein. Cụ thể, nếu muốn sàng lọc các mối tương tác ADN-protein mạnh, chúng tôi có thể sử dụng trình tự đích có 2, 3 lần lặp lại để đưa vào vector thông báo (ngược lại với mỗi tương tác ADN-protein yếu chúng tôi có thể lựa chọn trình tự đích có 6-8 trật tự lỗi), sử dụng trong sàng lọc phân tử yeast one-hybrid.

Dựa trên kết quả điện di (hình 4A), chúng tôi đã lựa chọn các dòng khuẩn lạc số 6 (cho promoter JR0528) và khuẩn lạc số 13 (cho promoter JR0332) mang vector tái tổ hợp có chứa trình tự đích 4 lần lặp lại (sản phẩm PCR có kích thước khoảng 400 bp) của promoter đích để tách plasmid và giải trình tự nhằm khẳng định lại việc đã thiết kế được trình tự đích lặp lại cho 2 promoter kể trên. Hai vector pSKII tái tổ hợp mang trình tự đích 4 lần lặp lại của hai promoter JRC0528 và JRC3302 được xử lý với enzyme cắt giới hạn EcoRI và SmaI, sau đó ghép nối vào 2 vector thông báo pLacZ và pHis-Si (hình 4B và C tương ứng). Vector tái tổ hợp này được biến nạp đồng thời vào tế bào nấm men YM2471 bằng phương pháp sốc nhiệt trong nước lỏng; và bảo quản trong glycerol 20% ở -80°C để sử dụng cho các thí nghiệm lai phân

tử sàng lọc gen (Y1H) sau này.

Phân lập và phân tích trình tự của ADN mã hóa protein tương tác với yếu tố cis có trình tự lỗi CCTCCTCC

Trong kĩ thuật lai phân tử ADN-protein *in-vivo* (yeast one-hybrid), protein dung hợp được tạo ra từ vector biểu hiện pAD-GAL4 đóng vai trò như một nhân tố phiên mã sẽ liên kết/ tương tác với yếu tố cis-acting nằm trong trình tự đích của vùng hoạt hóa phiên mã trên vector thông báo pHis-Si/pLacZ, khởi động quá trình phiên mã của gen thông báo (His và LacZ) (hình 4C, D). Trên môi trường khuyết dưỡng (thiếu Histidine) có bổ sung chất ức chế cạnh tranh 3-AT, chỉ những tế bào nấm men có gen His biểu hiện mới có khả năng phát triển; và chỉ các tế bào nấm men có mang vector pLacZ mới hoạt tính β -galactosidase làm chuyển màu màng lai sang màu xanh. Trong nghiên cứu này, hai cặp vector thông báo là pHis-Si và pLacZ có mang trình tự đích 4 lần lặp lại được biến nạp đồng thời vào tế bào nấm men YM4271. Chọn lọc tế bào nấm men trên môi trường khuyết dưỡng (thiếu Histidine) và phương pháp đánh giá hoạt tính của β -galactosidase, chúng tôi đã thu được 2 dòng nấm mẹ có khả năng sống sót trên môi trường khuyết dưỡng bổ sung 3-AT ở nồng độ 10 mM và thời gian chuyển hóa β -galactosides trước 1 giờ.

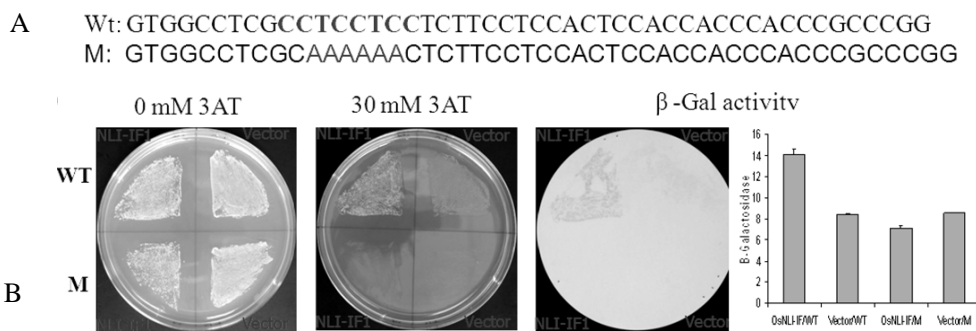
Bảng 1. Kết quả phân lập kiểu gen sử dụng kỹ thuật Y1H với 2 trình tự promoter JRC0528 và JRC0302

Promoter	
JRC0528	JRC0032
Dòng ADNc phân lập	
3 dòng mã hóa NLI-IF	5 dòng mã hóa NLI-IF
1 dòng mã hóa protein R2R3 typical-P-type	1 dòng mã hóa protein thuộc họ Zinc finger
1 dòng mã hóa protein cảm ứng lạnh	1 dòng mã hóa protein C3HC4-type ring finger
1 dòng mã hóa nhân tố ức chế dịch mã EIF 4D	1 dòng mã hóa protein liên kết ARN giàu glicine
1 dòng mã hóa dehydrogenase	1 dòng mã hóa protein ribosomal 60S
1 dòng mã hóa protein kết ARN giàu glycine	1 dòng mã hóa protein giống methallothionein
1 dòng mã hóa protein mang acyl	1 dòng mã hóa carboxylase ribulose-bisphosphate
1 dòng mã hóa liên kết ARN	1 dòng mã hóa protein chuyển hóa lipid
1 dòng mã hóa systeine synthase	1 dòng mã hóa protein ưu nhiệt
3 dòng mã hóa protein ưu nhiệt	4 trình tự vector
5 trình tự vector	1 dòng mã hóa protein liên kết axit béo

Các dòng nấm men có sự tăng cường biểu hiện đồng thời của cả hai gen His và LacZ là những dòng mang ADNc mã hóa cho protein có khả năng liên kết/tương tác đặc hiệu với yếu tố *-cis-acting* của promoter đích. Dựa trên sự biểu hiện của gen thông báo chúng tôi đã sàng lọc được 19 dòng tế bào nấm men mang ADNc mã hóa cho protein (nhân tố phiên mã) có khả năng liên kết/tương tác với trình tự đích nằm trong promoter IRC0528 và 18 dòng tế bào mang ADNc mã hóa cho protein có khả năng liên kết/tương tác với trình tự đích nằm trong promoter IRC0302. Tất cả đều được giải trình tự và so sánh với dữ liệu trên Ngân hàng gen (Genebank), kết quả các gen phân lập được trình bày trong bảng 1. Kết quả thu được cho thấy chúng tôi đồng thời phân lập được các dòng ADNc thuộc gen NLI-IF1 (Nuclear LIM interactor-interacting factor) trong cả 2 thí nghiệm phân lập gen khi sử dụng 2 trình tự đích khác nhau nằm trong vùng hoạt hóa của hai promoter JRC0528 và JRC0302. Đây là gen mã hóa cho một protein trung gian nằm trong phức hợp liên kết protein-protein, thuộc họ nhân tố phiên mã LIM, tham gia điều hòa quá trình phiên mã (mã số AK071909).

Để khẳng định NLI-IF1 là một gen mã hóa

cho nhân tố phiên mã và NLI-IF1 có khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự ADN đích để hoạt hóa biểu hiện của gen chức năng, chúng tôi đã sử dụng phương pháp biểu hiện gen *in-vivo* trong tế bào nấm men. Gen NLI-IF1 phân lập được từ thư viện ADNc được chúng tôi đưa vào vector biểu hiện Yep-GAP và biến nạp vào tế bào nấm men chứa vector thông báo pHis-Si và pLacZ để đánh giá biểu hiện *in-vivo* của gen. Chúng tôi đồng thời sử dụng các vector thông báo (pHis-Si và pLacZ) mang trình tự ADN đích đã bị thay thế trình tự lõi CCTCCTCC bằng trình tự AAAAAA để làm đối chứng âm cho thí nghiệm đánh giá khả năng liên kết đặc hiệu của NLI-IF1 với trình tự ADN đích. Protein NLI-IF được biểu hiện trong tế bào nấm men tái tổ hợp sẽ đóng vai trò “binding-domain”, liên kết đặc hiệu với trình tự đích trên vector thông báo và liên kết với các phân tử “acting-domain” có trong tế bào nấm men, từ đó hoạt hóa ARN polymerase, khởi động quá trình phiên mã của gen thông báo (His và LacZ). Chỉ có các tế bào nấm men mang vector tái tổ hợp Yep-GAP và có vector thông báo chứa trình tự lõi CCTCCTCC có thể sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc thiếu Histidine có bổ sung 3-AT và có hoạt tính β -galactosidase.



Hình 5. Kết quả đánh giá hoạt động của NLI-IF trong tế bào nấm men

A. Trình tự đích nguyên bản (Wt) và đột biến (M) nằm trong vùng promoter của vector thông báo pHis và pLacZ; B. Biểu hiện của gen thông báo trong các dòng tế bào nấm men tái tổ hợp khác nhau; M. vector thông báo có trình tự lõi trong promoter bị thay đổi AAAAAA; WT. vector thông báo có trình tự lõi CCTCCTCC trong vùng promoter; NLI-IF1. tế bào nấm men tái tổ hợp mang gen INL-IF1; Vector. tế bào nấm men tái tổ hợp mang vector YebGAP nguyên bản; 0 mM 3-AT: môi trường khuyết dưỡng không có 3-AT; 30 mM 3-AT: môi trường khuyết dưỡng bổ sung 3-AT 30 mM.

Kết quả thu được cho thấy, tế bào nấm men có vector thông báo mang trình tự đột biến không thể sinh trưởng trên môi trường chọn lọc

có bổ sung 3-AT ở nồng độ 30 mM và không có hoạt tính β -galactosidase. Tương tự, với các tế bào nấm men mang vector Yeb-GAP nguyên

bản không chứa trình tự mã hóa của gen *NLI-IF1*, gen thông báo LacZ và His cũng không được biểu hiện. Ngược lại, với các tế bào nấm men được biến nạp vector Yeb-GAP tái tổ hợp và vector thông báo mang trình tự lõi CCTCCTCC trong vùng điều khiển có thể sinh trưởng trên môi trường có 3-AT ở nồng độ 30 mM và có hoạt tính β -galactozidase (hình 5). Kết quả này chứng tỏ trình tự ADNc mà chúng tôi phân lập được mang trình tự mã hóa cho nhân tố phiên mã *NLI-IF1* từ thư viện ADNc xử lý hạn. Nhân tố phiên mã này có khả năng liên kết/tương tác đặc hiệu với trình tự lõi CCTCCTCC nằm trong vùng hoạt hóa của promoter JRC0528 và JRC0302.

KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật lai phân tử *in-vivo* trong tế bào nấm men, chúng tôi đã sàng lọc được một trình tự mã hoá cho nhân tố phiên mã *NLI-IF* từ thư viện ADNc xử lý hạn của giống lúa Niponpare. Nhân tố phiên mã này có khả năng liên kết/tương tác đặc hiệu với trật tự lõi CCTCCTCC nằm trong trình tự hoạt hoá của hai promoter cảm ứng điều kiện hạn JRC0332 và JRC0528. Để đi đến kết luận gen *NLI-IF* có khả năng bám đặc hiệu với trình tự đích hay không thì cần có thêm các kết quả nghiên cứu khác. Tuy nhiên, kết quả thu được ở trên cũng đã cho phép chúng tôi kết luận gen mã hoá *NLI-IF* là một gen điều khiển, có liên quan đến quá trình chống hạn của thực vật. Đặc biệt, protein của gen này tương tác đặc hiệu với trình tự lõi mà không phụ thuộc các trật tự lân cận trong trình tự đích. Điều này có nghĩa, protein của gen này không chỉ tương tác với trật tự lõi của 2 promoter chúng tôi đã nghiên cứu mà có thể nó còn có khả năng tương tác với promoter có chứa trật tự lõi của các gen chức năng đáp ứng điều kiện bất lợi khác ở thực vật. Điều này có thể hứa hẹn cho việc nghiên cứu chuyển gen *NLI-IFI* vào một số giống lúa mô hình/ chất lượng cao để nghiên cứu chức năng chi tiết cũng như khả năng áp dụng trong việc tăng cường tính chống chịu điều kiện bất lợi ở cây lúa nói riêng và thực vật nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki

- K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.
2. Baker S. S., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting element that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 24: 701-713.
3. Choi H, Hong J. H., Ha J., Kang J. Y., Kim S. Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element-binding factor. *J. Biol. Chem.*, 275: 1723-1730.
4. Gultinan M. J., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250: 267-271.
5. Jiang C., Lu B. and Singh J., 1996. Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 30: 679-684
6. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406.
7. Pham X. H., Tran T. T., 2009. Identification and sequence analysis of a DREB subfamily transcription factor involved in drought stress tolerance from rice. *J. Biol.*, 31(4): 74-81.
8. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7.19-7.22.
9. Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 58: 221-227.
10. Thomashow M. F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 50: 571-599.

11. Tran L. S., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S. D., Fujita Y., Maruyama K., Fujita M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9): 2481-98.
12. Tran L. S., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 20623-20628.
13. Uno Y., Furihata T, Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97: 11632-11637.
14. Wang M. M. and Reed R. R., 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*, 364: 121-126.
15. Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251-264.
16. Clontech. Yeast Protocols Handbook. http://www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17602.

CONSTRUCTION OF RICE DROUGHT cDNA LIBRARY AND IDENTIFICATION OF NLI-IF1 USING YEAST ONE HYBRID SCREENING

Nguyen Duy Phuong, Tran Tuan Tu, Pham Xuan Hoi

Agricultural Genetic Institute

SUMMARY

Rice database search on promoter sequences revealed a target sequence (CCTCCTCC) that commonly appears on stress inducible promoters of functional genes involved in abiotic stress, such as, drought, high salt and cold. In addition, promoter analysis of two stress inducible promoters, it shows that JRC0332 express specifically in cold stress and JRC0528 in ABA, high-salinity, drought and cold stresses respectively and both promoters contain the target sequence. In this study, we construct a drought cDNA library from total RNA of Niponpare variety for gene screening. Yeast one-hybrid screening technique using two target sequences of 50 nucleoties on JRC0528 and JRC0332 promoters contain the target sequence for drought cDNA library screening. We identify a cDNA encoding a Nuclear LIM interactor-interacting factor (NLI-IF1). *In-vivo* specific binding in Yeast suggested that NLI-IF1 bind specifically to the target sequence.

Key words: cDNA library, NLI, transcription factor, Drought tolerance, Yeast One Hybrid.

Ngày nhận bài: 12-8-2011