CHUYỂN GIEN MÃ HÓA ENZYM MỞ XOẮN ADN (*PDH*45) VÀO CÂY THUỐC LÁ (*NICOTIANA TABACUM* L. cv *XANTHI*) QUA *AGROBACTERIUM* VÀ PHÂN TÍCH CÁC CÂY ĐƯỢC CHUYỂN GIEN

PHẠM XUÂN HỘI, TRẦN DUY QUÝ

Viện Di truyền nông nghiệp

PHAN TUẤN NGHĨA

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

NARENDRA TUTEJA

Trung tâm Kỹ thuật gien và Công nghệ sinh học quốc tế

Với chức năng xúc tác việc mở xoắn ADN sợi đôi để tạo ra hai sợi đơn, ADN helicaza đóng vai trò quan trọng trong tất cả mọi hoạt động trao đổi chất ADN. Rất nhiều ADN helicaza của các cơ thể khác nhau như vi khuẩn, thực khuẩn thể, nấm men, động vật có vú và con người đã được phát hiện, nghiên cứu đặc tính và xác định chức năng của chúng. Gần đây, gien mã hóa cho một ADN helicaza (PDH45) của cây đậu Hà Lan, là gien helicaza đầu tiên của giới thực vật, cũng đã được phân lập và nghiên cứu đặc tính. Các nghiên cứu hoạt tính enzym đã chứng minh PDH45 là một protein quan trọng với nhiều chức năng như tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein, duy trì các hoạt động cơ bản của tế bào và kích thích hoạt động của topoisomeraza I [11]. Trong công trình này, với mục đích đi sâu tìm hiểu vai trò sinh lý của enzym PDH45 trong quá trình sinh trưởng phát triển của thực vật, chúng tôi đã tiến hành các nghiên cứu chuyển gien *pdh*45 theo cả hai hướng có nghĩa (sense) và đối nghĩa (antisense) sử dụng cây thuốc lá làm mô hình thử nghiệm.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* cv *xanthi* do Trung tâm Kỹ thuật gien và Công nghệ sinh học quốc tế (TTKTG&CNSHQT) cung cấp. Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 đặt mua từ hãng Novagen. Vectơ chuyển gien thực vật pBI121 của hãng Clonetech. Các chất kháng sinh và hóa chất sử dụng trong các thí nghiệm của hãng Promega, Sigma, Serva, USB. Thí nghiệm được tiến hành tại TTKTG&CNSHQT, Niu Đeli.

2. Phương pháp

*a) Cấu trúc của các vectơ tái tổ hợp mang gien pdh*45 *theo cả hướng có nghĩa và đối nghĩa*

Vectơ pBI121 được sử dụng cho việc chuyển gien *pdh*45 vào thuốc lá theo cả hai hướng có nghĩa và đối nghĩa. Phần trình tự ADN mã hóa của gien *pdh*45 được nhân lên bằng PCR sử dụng mồi đầu 5' mang bộ ba khởi đầu và trình tự nhận mặt của NdeI và mồi đầu 3' mang bộ ba kết thúc và trình tự nhận mặt của *Xba*I. Sản phẩm của phản ứng PCR được gắn vào vectơ pGEM-T Easy, sau chuyển vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α để nhân lên plasmit tái tổ hợp. Plasmit tái tổ hợp được cắt bởi *EcoR* I sau phần mã hóa gien *pdh*45 được gắn vào vectơ pBluescript đã được cắt bằng *EcoR* I. Phần mã hóa gien *pdh*45 trong vectơ pBluescript lại được tách ra bằng cách cắt vectơ với *Xba*I và sau đó lại gắn vào vectơ pBI121 được cắt bằng cùng enzym. Sản phẩm gắn được chuyển vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và nuôi trên môi trường LB chứa 50μg/ml kanamyxin. Phần mã hóa gien *pdh*45 gắn vào vectơ pBI121 theo hướng có nghĩa và đối nghĩa được phân biệt bằng cách cắt plasmit tái tổ hợp (pBI121-PDH45) bởi *Hind*III và phân tích sản phẩm cắt trên gel agarosa 0,9%.

*b) Chuyển phần trình tự mã hóa gien pdh*45 *vào chủng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404

Plasmit tái tổ hợp pBI121-PDH45 theo cả hướng có nghĩa và đối nghĩa được chuyển vào chủng vi khuẩn LBA 4404 theo phương pháp làm đông lạnh-làm tan như mô tả của Horsch và cs. [5].

c) Chuẩn bị mẫu thuốc lá cho việc chuyển gien pdh45

Hạt thuốc lá được khử trùng bề mặt bởi dịch rửa (bleach 1% + tween-20 1%), trong 20 phút; etanol 70%, trong 2-3 phút và sau đó được rửa lại nhiều lần (9-10 lần) bằng nước cất. Hạt thuốc lá đã khử trùng được rải đều lên đĩa petri chứa môi trường cơ bản MS (3,44 g muối MS/l, sacaroza 3%, 1x vitamin B5 của Gamborg, pH 5,8 và agar 0,8%) và ủ ở điều kiện ánh sáng, độ ẩm và nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau khi hạt thuốc lá nảy mầm, các cây con được chuyển vào bình thủy tinh cao thành chứa 50 ml môi trường cơ bản MS. Cây thuốc lá lại được nhân lên và duy trì trong bình thủy tinh bằng việc cắt các đoạn thân chứa một chồi ngủ nuôi trong các bình thủy tinh khác nhau. Các cây thuốc lá khỏe mạnh với các lá bản to, phiến lá phẳng từ những cây thuốc lá còn non được sử dụng cho mục đích chuyển gien. Chọn các lá bánh tẻ, đồng đều, loại bỏ gân chính và viền xung quanh lá để tăng sự tiếp xúc với vi khuẩn, sau cắt nhỏ với kích thước đồng đều nhau (1-1,5 cm).

*d) Chuyển phần trình tự mã hóa gien pdh*45 *vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumafaciens*

Một khuẩn lạc dương tính của chủng vi khuẩn LBA 4404 chứa trình tự mã hóa gien *pdh*45 theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa được nuôi cấy lắc ở 28^0C trong 50 ml môi trường YEM (dịch chiết nấm men 0,04%, mannitol 10%, NaCl 0,01%, $MgSO_4.7H_20$ 0,02% và K_2HPO_4 0,05%) chứa 50 µg/ml kanamyxin. Sau 2-3 ngày, lấy 1 ml dịch nuôi vi khuẩn bão hòa nuôi trong 50 ml YEM ở cùng điều kiện cho tới khi mật độ tế bào (OD) đạt 0,5. Pha loãng dịch nuôi tế bào mật độ (OD) 0,5 tới 10 lần, sau cho các mẫu lá thuốc lá đã được chuẩn bị như ở trên vào ngâm từ 5-10 phút. Các mẫu lá thuốc lá được làm khô bởi giấy thấm, sau chuyển sang nuôi ở môi trường tái sinh (cơ bản MS, 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l NAA) không chứa kanamyxin.

đ) Chọn lọc, tái sinh và sinh trưởng của các cây chuyển gien

Sau 2-3 ngày cùng nuôi cấy trong môi trường tái sinh không chứa kanamyxin, các mẫu thuốc lá được chuyển sang môi trường chọn lọc (môi trường tái sinh chứa 300 µg/ml kanamyxin và 500 µg/ml cacbenixilin). Sau 3 đến 4 tuần, khi các chồi non đã xác định được thân cây, chúng được tách ra và nuôi trên môi trường ra rễ (cơ bản MS chứa 500 µg/ml cacbenixillin và 100 mg/ml kanamyxin). Khi các cây con đã định hình cả thân và rễ, chúng được chuyển sang nuôi ở bình vermiculit cho đến khi cây cứng cáp (10-15 ngày), sau đó được chuyển sang bình đất và nuôi ở điều kiện nhà kính.

e) Các phương pháp nhận biết gien pdh45 trong các cây chuyển gien

Sự sinh trưởng và phát triển của cây chuyển gien trên môi trường chọn lọc: môi trường chọn lọc như trình bày ở mục trên. Cây thuốc lá bình thường không có gien kháng kanamyxin nên không thể sinh trưởng trên môi trường chứa 300 µg/ml kanamyxin còn cây thuốc lá chuyển gien chứa gien kháng kanamyxin nên sinh trưởng bình thường trên môi trường chứa 300 µg/ml kanamyxin.

Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR): hệ gien của các cây chuyển gien sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc được sử dụng cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien *pdh*45. Ngoài ra, các cây chuyển gien theo hướng có nghĩa, phản ứng PCR sử dụng mồi đầu 5' chứa trình tự nhận mặt NdeI và bộ ba khởi đầu gien *pdh*45 với mồi gần đầu 5' và mồi gần đầu 3' trên gien GUS. Các cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa, phản ứng PCR sử dụng mồi đầu 3' chứa trình tự nhận mặt XbaI và bộ ba kết thúc gien *pdh*45 với mồi gần đầu 5' và mồi gần đầu 3' trên gien GUS.

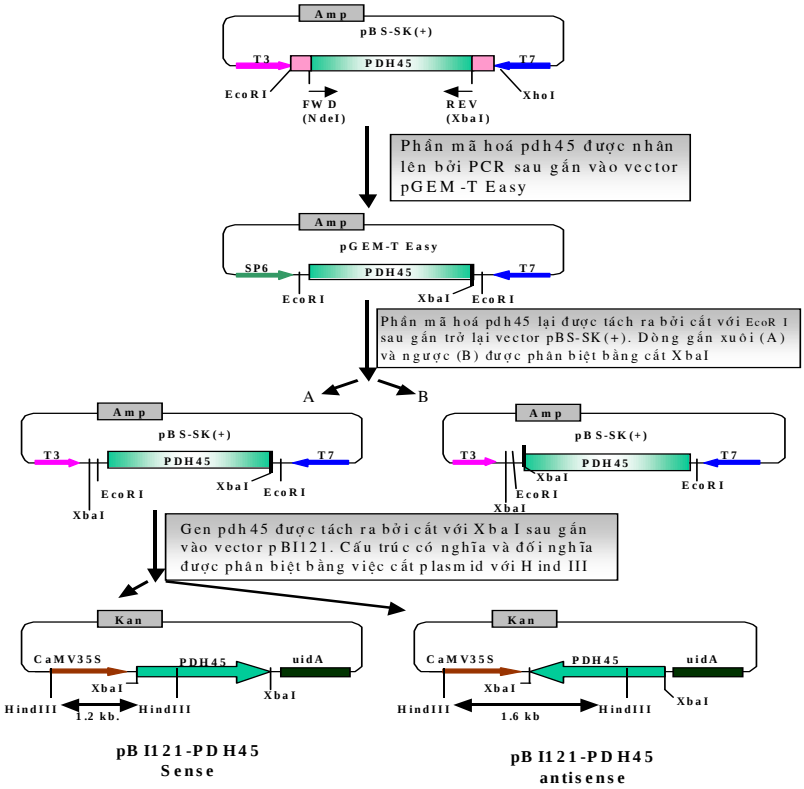
Phân tích GUS: sự biểu hiện của gien GUS trong các cây chuyển gien theo cả hướng có

nghĩa và tối nghĩa được xác định theo phương pháp hóa mô như mô tả của Jefferson (1987).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Quá trình hình thành các cấu trúc có nghĩa (sense construct) và đối nghĩa (antisense construct)

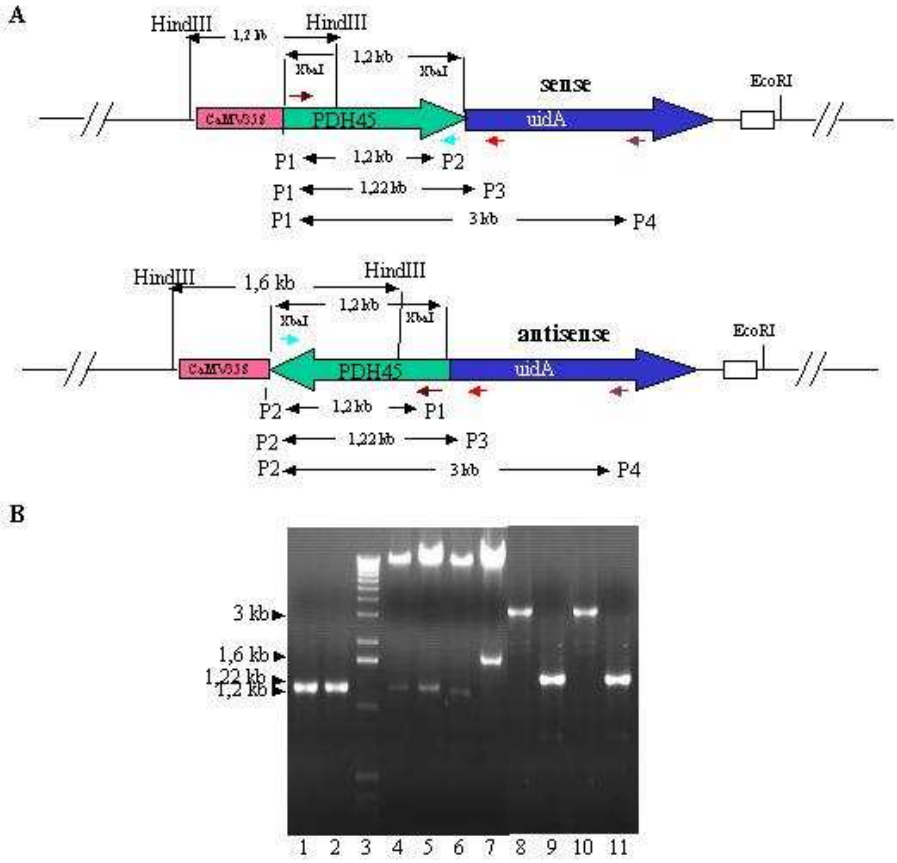
Biểu đồ của quá trình tạo các plasmit tái tổ hợp mang gien *pdh*45 được trình bày ở hình 1. Cả hai hướng có nghĩa và đối nghĩa, trật tự ADN mã hóa gien *pdh*45 được gắn vào vectơ chuyển gien *pBI*121 bởi vị trí *Xba*I, bên trái là chuỗi khởi động CaMV35 S, bên phải là trật tự ADN mã hóa gien GUS. Hai bộ ba khởi đầu (ATG), một cho gien *pdh*45 và một cho gien GUS đều nằm phía bên phải của chuỗi khởi động CaMV 35 S vì vậy sự biểu hiện của hai gien này cùng chịu sự điều khiển của chuỗi khởi động CaMV 35 S. Chỉ có một bộ ba kết thúc(transcription termination) cho cả gien *pdh*45 và GUS nằm ngay sau gien GUS nên khi vào trong cơ thể thực vật, quá trình phiên mã sẽ sinh ra một ARN thông tin tái tổ hợp (PDH45 - GUS fusion transcripts) còn quá trình dịch mã sẽ sinh ra hai protein (PDH45 và GUS) trong trường hợp cấu trúc có nghĩa và chỉ có một protein của gien GUS được sinh ra trong trường hợp cấu trúc đối nghĩa.



Hình 1. Quá trình tạo ra plasmit tái tổ hợp mang gen *pdh*45 theo cả hướng có nghĩa (sense) và đối nghĩa (antisense)

Để phân biệt cấu trúc có nghĩa và cấu trúc đối nghĩa, cũng như để khẳng định gien *pdh*45 đã được gắn vào vectơ chuyển gien *pBI*121, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật PCR và cắt plasmit tái tổ hợp bằng *Hind* III. Kết quả được trình bày ở hình 2. Cả cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa, phản ứng PCR đều cho sản phẩm 1,2 kb khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien *pdh*45 (hình 2B, cột 1, 2). Các phản ứng PCR sử dụng mồi đặc hiệu đầu 5' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu gần đầu 3' hoặc 5' của gien GUS với cấu trúc có nghĩa cho các sản phẩm tương ứng là 3 kb hoặc 1,22 kb (hình 2B, cột 8, 9) và các sản phẩm cùng kích thước cũng

được quan sát với cấu trúc đối nghĩa sử dụng các cặp mồi đặc hiệu đầu 3' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu gần đầu 3' hoặc 5' của gien GUS (hình 2B, cột 10, 11). Khi cắt cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa bằng *Xba* I, một băng khoảng 13 kb tương ứng với vectơ pBI 121 và một băng 1,2 kb tương ứng với trình tự mã hóa gien *pdh*45 đã được quan sát (hình 2B, cột 4, 5). Có một trình tự ADN nhận mặt bởi *Hind*III ở vị trí 388 - 393 trên gien *pdh*45 nên đặc tính này được sử dụng cho việc phân biệt cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa. Khi cắt cấu trúc có nghĩa bằng *Hind* III sẽ cho sản phẩm là các băng 13 kb và 1,2 Kb (hình 2B, cột 6) trong khi đó sản phẩm cắt sẽ là 12,6 kb và 1,6 kb, khi cắt cấu trúc đối nghĩa bằng *Hind* III (hình 2B, cột 7).



Hình 2. (A), Cấu trúc mạch thẳng của plasmit tái tổ hợp mang gien *pdh*45 theo cả hai hướng có nghĩa và đối nghĩa. (B), Chứng minh phần mã hóa gien *pdh*45 đã được gắn vào vectơ pBI121 theo cả hướng có nghĩa và đối nghĩa bằng PCR và cắt enzym giới hạn. Sản phẩm phản ứng PCR và cắt enzym giới hạn được điện di trên gel agaroza 0,9%, sau nhuộm với ethidium bromit

Cột 1 và 2: sản phẩm PCR của cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa sử dụng cặp mồi đặc hiệu của *pdh*45.

Cột 3: Thang chuẩn ADN 1kb.

Cột 4 và 5: sản phẩm cắt enzym giới hạn của cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa bởi *Xba* I.

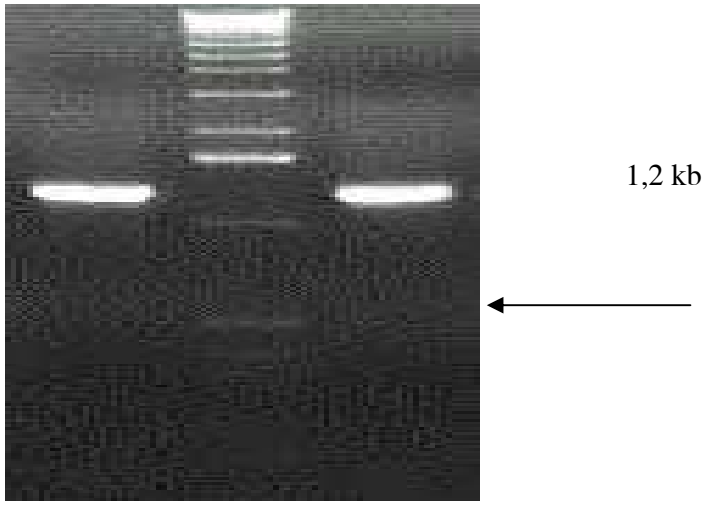
Cột 6 và 7: sản phẩm cắt enzym giới hạn của cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa bởi *Hind* III.

Cột 8 và 9: sản phẩm PCR của cấu trúc có nghĩa sử dụng mồi đặc hiệu đầu 5' của *pdh*45 với mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien GUS.

Cột 10 và 11: sản phẩm PCR của cấu trúc đối nghĩa sử dụng mồi đặc hiệu đầu 3' của *pdh*45 với mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien GUS.

2. Chuyển các cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa vào cây thuốc lá

Các cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa được chuyển vào chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 bằng phương pháp làm đông-làm tan. Các dòng phân tử tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường YEM - agar chứa 100 µg/ml kanamyxin và 12,5 µg/ml rifampixin. Sự có mặt của gien *pdh*45 cả hướng có nghĩa và đối nghĩa trong chủng vi khuẩn LBA 4404 được khẳng định bởi PCR sử dụng các mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien *pdh*45 và dịch nuôi vi khuẩn như sợi khuôn. Kết quả là các phản ứng PCR cho các sản phẩm có kích thước đúng như dự đoán. Một băng ADN kích thước 1,2 kb tương ứng với phần mã hóa gien *pdh*45 được phát hiện ở cả hướng có nghĩa và đối nghĩa (hình 3), chứng tỏ các cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa đã được chuyển vào vi khuẩn để tạo ra *Agrobacterium* tái tổ hợp.



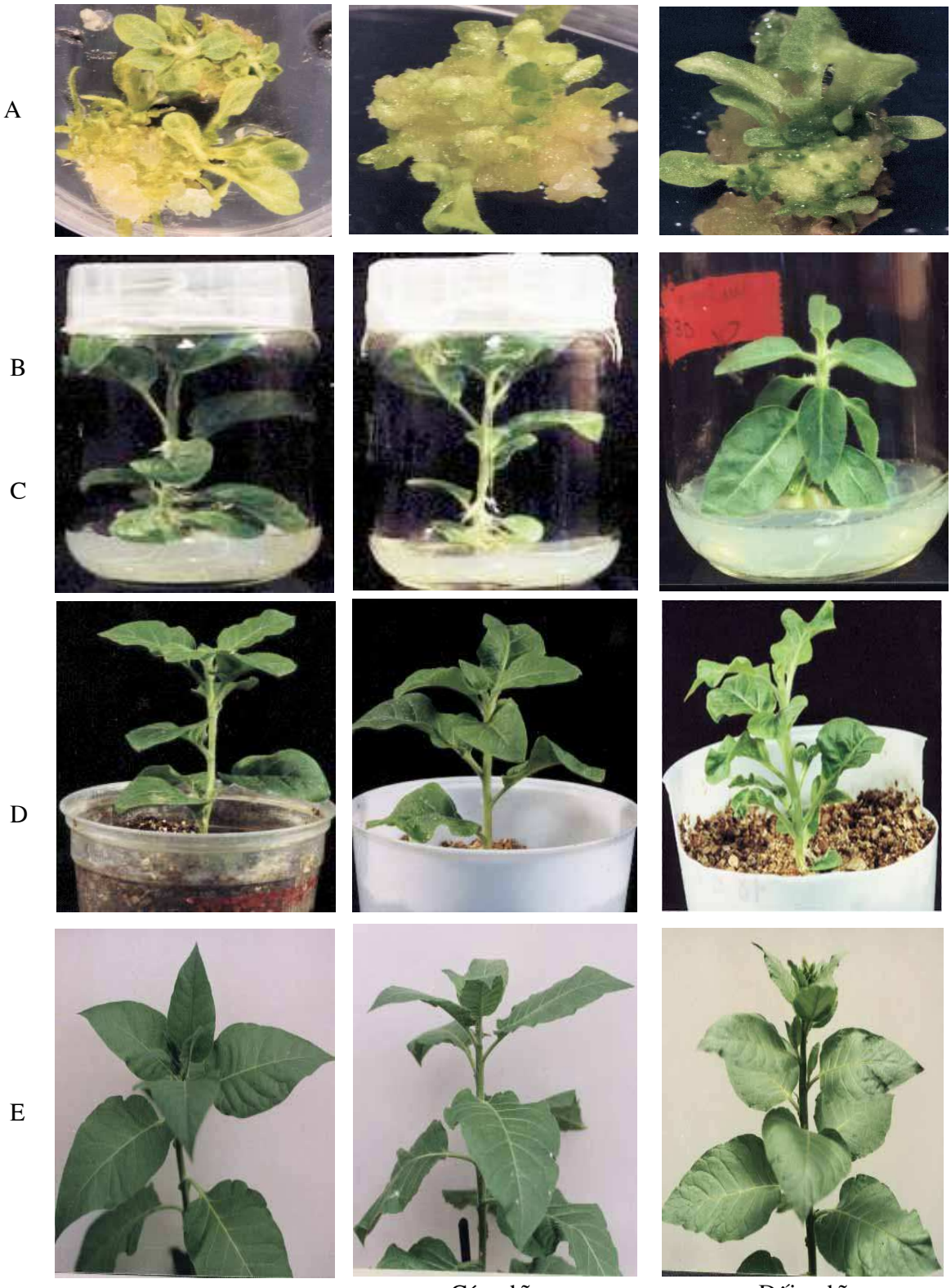
Hình 3. Chứng minh phần mã hóa gien *pdh*45 đã được chuyển vào *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 theo cả hướng có nghĩa và đối nghĩa bằng PCR. Sản phẩm phản ứng PCR được điện di trên gel agaroza 0,9% sau nhuộm với ethidium bromit

Cột 1 và 3: sản phẩm PCR của cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa sử dụng cặp mồi đặc hiệu của *pdh*45. Cột 2: thang chuẩn ADN 1 kb.

Việc chuẩn bị mẫu thuốc lá và quá trình chuyển *Agrobacterium* tái tổ hợp vào cây thuốc lá như mô tả ở phần phương pháp (c và d). Sau giai đoạn đồng nuôi cấy (2-3 ngày), các mẫu thuốc lá đã được chuyển gien được chuyển sang môi trường chọn lọc (cơ bản MS chứa 300 µg/ml kanamyxin và 500 µg/ml carbenixillin). Carbenixillin ở nồng độ 500 µg/ml đủ để giết chết vi khuẩn và ở nồng độ 300 µg/ml kanamyxin thì cây thuốc lá bình thường không thể phát triển được vì vậy các cây phát triển trên môi trường chọn lọc có thể tạm xem là các cây được chuyển gien vì các cây này có chứa gien kháng kanamyxin. 100 cây chuyển gien từ mỗi cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa được chọn lọc cho các bước phân tích tiếp theo. Các mẫu thuốc lá không chuyển gien (dạng hoang dại) được sinh trưởng trong cùng điều kiện trên môi trường không chứa kanamyxin. Hình 4 chỉ ra tốc độ sinh trưởng và hình thái của các cây chuyển gien theo hướng có nghĩa, đối nghĩa và cây không chuyển gien ở các giai đoạn phát triển khác nhau như: giai đoạn hình thành mô sẹo, sinh trưởng trong môi trường cơ bản MS, vermiculit, bình đất và giai đoạn chuẩn bị nở hoa.

3. Sự phát sinh hình thái của các cây chuyển gien

Như kết quả trình bày ở hình 4, có sự thay đổi về hình thái với các cây chuyển gien so với cây không chuyển gien. Sự thay đổi này được quan sát rất rõ ở các cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa, cụ thể ở lô này, mức độ hình thành mô sẹo ít và yếu hơn nhưng sinh trưởng

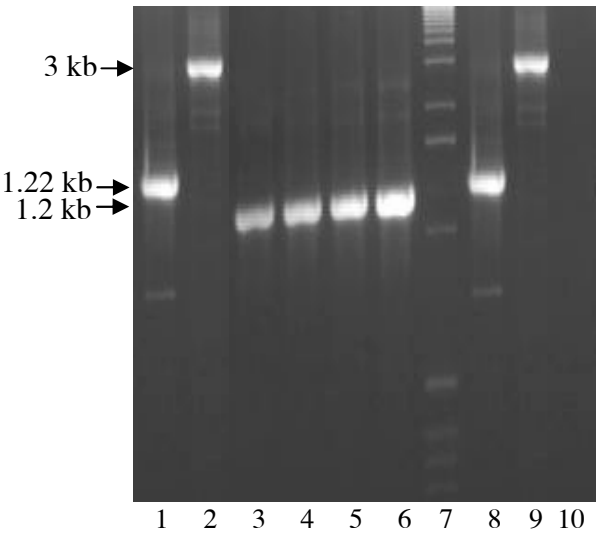


Hình 4. Sự sinh trưởng và đặc điểm hình thái của cây thuốc lá chuyển gien theo hướng có nghĩa (ở giữa), đối nghĩa (bên phải) và không chuyển gien (bên trái) ở giai đoạn hình thành mô sẹo (A), giai đoạn nuôi trong ống nghiệm (B), giai đoạn trong khay đất (C), giai đoạn trong nhà kính (D) và giai đoạn chuẩn bị nở hoa (E)

nhanh hơn; các mô sẹo có nhiều lông, màu xanh và vàng đậm và hình thành ít chồi hơn; các chồi cụm lại với nhau với các lá to, nhiều lông và có màu xanh tối (hình 4A, hình bên phải). Sự khác biệt về hình thái của các cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa cũng được quan sát ở các giai đoạn tiếp theo của quá trình sinh trưởng ở chỗ các cây này có đốt thân ngắn, lá xanh hơn, dày hơn, có lông, có hình mũi giáo và bản lá không phẳng (hình 4: A, B, C, D, E, các hình bên phải). 15 trong số 100 cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa có thời gian sinh trưởng sớm hơn so với các cây không chuyển gien từ 10-25 ngày (hình 4-E, ảnh bên phải). Tuy vậy, không thấy có sự khác biệt rõ rệt về hình thái giữa các cây chuyển gien theo hướng có nghĩa so với các cây không chuyển gien (hình 4: A, B, C, D, E, các hình ở giữa).

4. Khẳng định sự có mặt của gien *pdh*45 trong hệ gien (genom) của các cây chuyển gien

Việc các cây chuyển gien sinh trưởng bình thường trên môi trường chứa 300µg/ml kanamyxin chứng tỏ gien *pdh*45 đã được chuyển vào cơ thể của cây. Tuy nhiên để khẳng định thêm sự có mặt của gien *pdh*45 trong genom của các cây chuyển gien, chúng tôi đã tiến hành phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu của gien *pdh*45 và gien GUS như mô tả ở phần trên và phân tích sự biểu hiện của gien GUS trong các cây chuyển gien. 50 cây kháng kanamyxin từ mỗi hướng có nghĩa và đối nghĩa được phân tích bằng PCR và phân tích sự biểu hiện của gien GUS. Tất cả các sản phẩm phản ứng PCR sử dụng hệ gien các cây chuyển gien làm sợi khuôn cho kết quả như mong đợi. Hình 5 trình bày kết quả phân tích sự xuất hiện của gien *pdh*45 trong hệ gien của một số cây chuyển gien và không chuyển gien bằng phản ứng PCR. Cả cấu trúc có nghĩa và đối nghĩa phản ứng PCR đều cho sản phẩm 1,2 kb khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien *pdh*45 (hình 5: cột 3, 4 và 5, 6), trong khi đó các phản ứng PCR sử dụng mồi đặc hiệu đầu 5' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu gần đầu 5' hoặc 3' của gien GUS với cấu trúc có nghĩa cho các sản phẩm tương ứng là 1,22 kb hoặc 3 kb (hình 5, cột 1, 2) và các sản phẩm cùng kích thước cũng được quan sát với cấu trúc đối nghĩa sử dụng các cặp mồi đặc hiệu đầu 3' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu gần đầu 5' hoặc 3' của gien GUS (hình 5, cột 8, 9). Kết quả thí nghiệm chứng tỏ rằng gien *pdh*45 đã được gắn vào hệ gien của cây theo cả hướng có nghĩa và đối nghĩa.



Hình 5. Sự xuất hiện của gien *pdh*45 trong hệ gien thuốc lá. Sản phẩm PCR được điện di trên 0,9% agarosa sau nhuộm với ethidium bromit.

cột 1 và 2: sản phẩm PCR của cây chuyển gien hướng có nghĩa sử dụng mồi đặc hiệu đầu 5' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien GUS.

cột 8 và 9: sản phẩm PCR của cây chuyển gien hướng đối nghĩa sử dụng mồi đặc hiệu đầu 3' của gien *pdh*45 với mồi đặc hiệu đầu 5' và 3' của gien GUS.

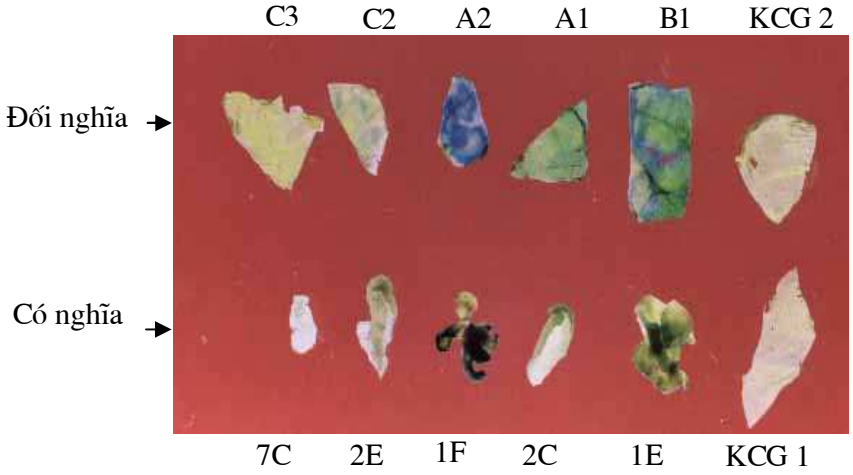
cột 3, 4, 5 và 6: sản phẩm PCR của cây chuyển gien hướng có nghĩa và đối nghĩa sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gien *pdh*45.

cột 10: sản phẩm PCR của cây thuốc lá không chuyển gien sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gien *pdh*45 (không có sản phẩm PCR).

Cột 7: thang chuẩn ADN 1 kb.

Cùng các cây đã phân tích bằng PCR được sử dụng cho nghiên cứu mức độ biểu hiện của gien GUS. Trong số 50 cây chuyển gien theo hướng có nghĩa thì có 12 cây có sự biểu hiện của gien GUS ở các mức độ khác nhau. Trong số 50 cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa thì có 10 cây có sự biểu hiện của gien GUS ở các mức độ khác nhau. Các gien chuyển vào cây được bố trí một cách ngẫu nhiên trên các nhiễm sắc thể khác nhau nên có thể nhiều bản gien

cùng được gắn vào hệ gien thực vật. Thêm vào nữa là khi chuyển gien, T plasmit có thể chuyển đoạn ADN chứa các gien cần chuyển mà không chứa trật tự chuỗi khởi động hoặc trật tự chuỗi khởi động bị thiếu. Số bản gien được gắn, vị trí gắn và trật tự đoạn ADN được gắn có ảnh hưởng rất lớn đến sự biểu hiện của gien nên chỉ có một số gien được chuyển có thể biểu hiện trong cây còn nhiều gien nằm trong hệ gien thực vật ở dạng trơ. Điều này giải thích tại sao tất cả các cây chuyển gien được phân tích bằng PCR cho kết quả các gien cần chuyển đã gắn vào hệ gien thực vật trong khi đó chỉ có 24% cây chuyển gien theo hướng có nghĩa và 20% cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa được phân tích bằng phương pháp hóa mô cho kết quả có sự thể hiện gien GUS. Hình 6 trình bày kết quả phân tích biểu hiện gien GUS của một số cây chuyển gien và không chuyển gien bằng phương pháp hóa mô.



Hình 6. Phân tích sự biểu hiện gien GUS trong cây thuốc lá chuyển gien bằng phương pháp hóa mô

A1, A2; B1; C2, C3 và 7C; 2E; 1F; 2C, 1E: các cây chuyển gien hướng đối nghĩa và có nghĩa.
KCG1 và KCG2: các cây thuốc lá không chuyển gien.

Một mẩu lá nhỏ từ các cây chyển gien và không chuyển gien được rửa trong đệm 50 mM Na-phốtphát pH = 7,0, sau nhuộm với 2 mM X-Glue trong đệm 50 mM Na-phốtphát pH = 7,0. Các mẩu lá được cho vào điều kiện chân không 5 phút sau ủ ở 37^{o}C qua đêm trong tối. Sau khi nhuộm, các mẫu lá được rửa sạch bằng cồn để loại chlorophyll trước khi phân tích.

III. THẢO LUẬN

Trong hơn hai thập kỷ qua, việc sử dụng kỹ thuật chuyển gien thực vật trong việc nghiên cứu chức năng của gien và tạo ra các cơ thể chuyển gien với các đặc tính nông học quý đã và đang trở thành phương pháp không thể thiếu được giúp các nhà khoa học hiểu được bản chất phân tử của các quá trình trong tế bào và công tác chọn tạo giống. ADN helicaza là nhóm enzym tham gia vào hầu hết các hoạt động trao đổi chất ADN, đặc biệt là quá trình phân chia tế bào, vì vậy đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì và điều khiển sự sinh trưởng, phát triển của các cơ thể sống. Chưa có công trình nào công bố về kết quả chuyển nhóm gien này vào thực vật, vì vậy các số liệu của chúng tôi thu được không có cơ sở để so sánh. Tuy nhiên, khi chuyển một gien ARN helicaza/RuazaIII, đã gây đột biến vào *Arabidopsis* đã gây nên sự rối loạn về phân chia tế bào trong quá trình biệt hóa của hoa, chứng tỏ gien ARN helicaza/RuazaIII, có vai trò trong việc điều khiển việc phân chia tế bào [6]. Gần đây, Wang và cs. [15] cũng phát hiện thấy rằng gien mã hóa cho một plastit DEAD-box RNA helicaza khi chuyển vào cây thuốc lá đã làm cho các cây thuốc lá chuyển gien có lá màu lốm đốm, rễ và hoa có hình dạng không bình thường. Tuy vậy, vẫn còn rất ít hiểu biết về cơ chế phân tử của việc tạo ra tình trạng rối loạn phân chia tế

bào trong quá trình biệt hóa hoa ở công trình nghiên cứu của Jacobssen và sự thay đổi hình thái của các cây chuyển gien trong công trình nghiên cứu của Wang. Khi phân tích sự biểu hiện của gien mã hóa eIF-4A8 trong các cây thuốc lá chuyển gien, Op Den Cam và Kuhlemerier (1998) đã phát hiện ra hàm lượng protein thay đổi qua quá trình photphoryl hóa. Sự tăng mức độ photphoryl hóa của eIF-4A đã được quan sát trong quá trình ống phấn nảy mầm, một giai đoạn cây trồng có tốc độ phát triển rất cao vì vậy mà hoạt động sinh tổng hợp protein cũng tăng cao. Kết quả trên đã chứng minh protein có vai trò trong quá trình dịch mã ARNtt bằng việc làm ổn định cấu trúc bậc hai của ARNtt. Trong công trình nghiên cứu của chúng tôi, sự thay đổi hình thái ở các cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa cũng được phát hiện, tuy nhiên cơ chế chi tiết vẫn là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu. Ở mức độ protein, PDH45 và eIF-4A3 (nhân tố khởi đầu của quá trình dịch mã) ở cây thuốc lá có độ đồng nhất là 86% [11]. Khi gien *pdh*45 được chuyển vào cây thuốc lá theo hướng đối nghĩa đã sử dụng bộ máy dịch mã của cây thuốc lá để sinh ra ARNtt đối nghĩa và ARNtt đôi nghĩa này sẽ liên kết bổ sung với ARNtt có nghĩa nội sinh được dịch mã từ gien eIF-4A3 của cây thuốc lá và kết quả là quá trình dịch mã không thực hiện được, eIF-4A3 nội sinh không được tạo thành. Sự thay đổi hình thái học của các cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa có thể là kết quả của sự sinh trưởng phát triển của cây thuốc lá trong sự vắng mặt của eIF-4A3 nội sinh. Điều này đã chứng minh vai trò quan trọng của PDH45 trong việc duy trì các hoạt động cơ bản của tế bào cũng như sự sinh trưởng phát triển của thực vật.

Ở thực vật, hiện tượng nở hoa là kết quả của sự chuyển đổi quá trình biệt hóa các cơ quan sinh dưỡng sang biệt hóa các cơ quan sinh sản mà quá trình này đòi hỏi sự hoạt hóa của một phức hợp tổng thể của nhiều gien điều hòa. Ở *Arabidopsis*, một số gien đã được công bố là có vai trò thúc đẩy nhanh quá trình nở hoa như: LEAFY (LFY), STERILE APETALA (SAP), APETATLA 1, 2 (AP 1,2), AGAMOUS (AG) [2, 10, 16]. Tuy nhiên, thông tin về phương thức hoạt động và tương tác của mỗi gien này trong phức hợp tổng thể vẫn còn rất hạn chế. Gần đây, Pena đã công bố rằng sự biểu hiện thường trực của các gien thúc đẩy nhanh quá trình nở hoa của *Arabidopsis* (LFY) hoặc (AP1) trong cam chanh đã rút ngắn giai đoạn cây non, làm cho cây hình thành hoa sớm, dẫn đến quả và hạt được hình thành sớm hơn bình thường [10].

Ở công trình nghiên cứu của chúng tôi, trong số 100 cây chuyển gien theo hướng đối nghĩa thì có 15 cây có thời gian sinh trưởng sớm hơn so với đối chứng từ 15-25 ngày và 7 cây có thời gian sinh trưởng dài hơn đối chứng 5-10 ngày. Phát hiện này sẽ rất có ý nghĩa cho các nhà chọn giống nếu như đặc tính này được duy trì ổn định qua các thế hệ. Tuy nhiên, hiện tượng rút ngắn thời gian sinh trưởng có thể chỉ là phản ứng sinh lý của cây khi có các gien lạ xuất hiện. Cơ chế phân tử cho quá trình rút ngắn thời gian sinh trưởng trong các cây chuyển gien là một vấn đề lý thú cần được làm sáng tỏ. Ngoài ra, các thí nghiệm của chúng tôi đang tập trung phân tích số bản gien *pdh*45 đã được gắn vào hệ gien của cây chuyển gien, sự biểu hiện của gien *pdh*45 trong các cây chuyển gien và phân tích sự ổn định của các đặc điểm hình thái, các đặc tính nông học của các cây chuyển gien ở các thế hệ tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Atanassova et al.**, 1995: *Plant* J., 8: 465-477.
2. **Byzova M. V. et al.**, 1999: *Genes Dev*., 13: 1002-10014.
3. **Fan J. Zheng S.**, and **Wang X.**, 1997: *Plant Cell,* 9: 2183-2196.
4. **Gray J. et al.**, 1992: *Plant Mol. Biol*., 19: 69-87.
5. **Horsch R. B. et al.**, 1985: *Science,* 227: 1229-1231.
6. **Jacobsen S. E.**, **Running M. P.** and **Meyerowitz E. M.**, 1999: *Development*, 126: 5231-5243.
7. **John L. et al.**, 1995. *Plant J*., 7: 483490.
8. **Lagrimmi L. M. et al.**, 1997: *Plant Physiol*., 114: 1187-1196.
9. **Paul M. J. et al.**, 1995: *Plant J*., 7: 535-542.
10. **Pena L. et al.**, 2001: *Nat. Biotechnol*., 19:

263-267.

11. **Pham X. H. et al.**, 2000: *Plant J.*, 24 (2): 219-229.
12. **Sheeky R. E.**, **Kramer M.** and **Hiatt W. R.**, 1998: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8805-8809.
13. **Shimada H. et al.**, 1993: *Theor. Appl. Genet.,* 86: 665-672.
14. **Tang G. Q.**, **Luscber M.** and **Sturm A.**, 1999: *Plant Cell*, 11: 179-189.
15. **Wang Y. et al.**, 2000: *Plant Cell*, 12: 2129-2142.
16. **Weigel D.**, 1995: *Annu. Rev. Genetics*, 29: 19-39.

TRANSFER OF GENE ENCODING FOR DNA UNWINDING HELICASE (*PDH*45) INTO TOBACCO PLANTS (*NICOTIANA TABACUM* L. cv *XANTHI*) BY USING *AGROBACTERIUM* AND ANALYSIS OF THE TRANSFORMED PLANTS

PHAM XUAN HOI, TRAN DUY QUY, PHAN TUAN NGHIA, NARENDRA TUTEJA

SUMMARY

PDH45, a DNA unwinding enzyme, has been determined to be an important multifunctional protein involved in the regulation of the protein synthesis, maintaining the basic activities of the cell and in the up regulation of the topoisomerase I activity (Pham et al., 2000). To understand the functional significance of PDH45 in plants, we introduced the PDH45 cDNA into the plant transformation pBI121 vector in both sense and antisense orientations under the control of the same strong constitutive CaMV 35S promoter. The *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 was transformed with the sense and antisense constructs and recombinant colonies were selected on kanamycin plates. The presence of recombinant plasmids in the kanamycin resistant colonies was confirmed by PCR and restriction digestion. Transgenic plants were obtained by co-cultivation of recombinannt *Agrobacterium tumefaciens* and a leaf disc of *Nicotiana tabacum* cv *xanthi*. A total of 100 kanamycin resistant plants for each sense and antisense orientations were selected for further analysis. 50 of each sense and antisense plants were analyzed for PCR and GUS assay. All PCR reactions led to positive products and twelve with sense and ten with antisense were GUS positive. The morphology change in antisense transgenic plants as compared with wild type plant has been observed at T1 generation. The altered morphology was observed from the callus generation media where antisense plants formed less and weak callus but faster growing. In rooting media, antisense transgenic plants gave rise to increase in greenness and the leaves were thicker, more hairy, and slightly lanceolate of compact appearance, internode distance decreased and unsmooth lamina. The change was observed in a large population of antisense transgenic plants and has continued during all plant development. In addition, some antisense transgenic plants had flowered earlier and resulted in shortening of the time for the plant growth compared to the sense transgenic plants.

Ngày nhận bài: 18-4-2002