

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN MÃ HÓA MANNITOL-1-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (*mtlD*) TỪ CHỦNG *Escherichia coli* JM109 ĐỂ CHUYỂN VÀO CÂY NGÔ

Lê Bắc Việt, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Huy Hoàng,
Nông Văn Hải, Huỳnh Thị Thu Huệ*

Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Ngô (*Zea mays* L.) là một trong những cây ngũ cốc quan trọng trong việc đáp ứng lương thực và thức ăn chăn nuôi. Nhu cầu sử dụng ngô ngày càng tăng, tuy nhiên, năng suất và sản lượng của cây ngô chịu ảnh hưởng rất lớn bởi những điều kiện môi trường, trong số đó, khô hạn là một trong những nguyên nhân đáng kể. Ở thực vật, mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) là một enzyme xúc tác chuyển hóa fructose 2 với 6-phosphate thành mannitol 1-phosphate trong quá trình quang hợp. Với mục đích phục vụ nghiên cứu chuyển gen, nhằm tạo cây ngô mang gen *mtlD* góp phần làm tăng chiều cao, khối lượng tươi và khô, tăng khả năng chịu mặn và hạn của cây nhờ sự tích lũy mannitol, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *mtlD*. Gen *mtlD* được phân lập từ chủng *E. coli* JM109, nhân dòng trong vector pJET1.2, xác định trình tự và cải biến trình tự bằng phần mềm OptimumGeneTM cho phù hợp với thực vật. Gen sau cải biến đã được tái tổ hợp vào vector trung gian pRTRA giữa vùng chứa 35S promoter và 35S terminator tạo nên cấu trúc biểu hiện gồm 35Spro::*mtlD*::35S, sau đó, cấu trúc đã được gắn vào vector biểu hiện pCAMBIA1300 và biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* để làm nguyên liệu chuyển gen vào cây ngô.

Từ khóa: *E. coli*, gen *mtlD*, mannitol-1-phosphate dehydrogenase, cây ngô, thiết kế vector.

MỞ ĐẦU

Khô hạn là nguyên nhân gây thất thoát 24 triệu tấn ngô mỗi năm (Heisey et al., 1999). Khô hạn làm giảm năng suất do ức chế cây phát triển và làm giảm quá trình quang hợp ở cây (Tarczynski et al., 1992); giảm quang hợp trong điều kiện khô hạn là do hai yếu tố thiếu nước và diệp lục bị mất nước. Sự mất nước của tế bào còn dẫn đến sự mất sức căng tế bào, đây là hiện tượng phổ biến ở thực vật trong điều kiện khô hạn (Blumwald, 2000). Để duy trì sức căng tế bào, thực vật thường tích lũy các chất có khối lượng phân tử thấp, có thể hòa tan (Wang et al., 2003). Vì vậy, để sống sót được trong điều kiện hạn hán, thực vật đã hình thành nhiều cơ chế chống chịu khác nhau. Trong phản ứng với sự thiếu nước, thực vật đã tích lũy các chất có thể hòa tan như polyols, amino axit, các hợp chất amino bậc ba và bậc bốn, các hợp chất sulfonium. Những hợp chất hòa tan này đóng vai trò quan trọng giúp bảo vệ tế bào không bị mất nước (Almeida et al., 2007; Wang et al., 2003). Sự tích lũy các hợp chất hòa tan (đường, đường rượu, proline...) trong phản ứng với sự thiếu nước đã được nghiên cứu ở nhiều loài

thực vật khác nhau (Bandurska & Jozwiak 2010; Bhauso et al., 2014).

Mannitol (đường rượu = sugar alcohol) là sản phẩm quang hợp chủ yếu ở thực vật bậc cao, được tìm thấy ở 70 họ thực vật khác nhau. Vai trò lý sinh của mannitol ở thực vật được cho là tham gia vào quá trình điều hòa thẩm thấu, tích lũy và sử dụng năng lượng (Stoop et al., 1996). Mannitol là chất có thể hòa tan và giải phóng gốc hydroxyl trong nhiều phản ứng phi sinh học khác nhau, điều này mang lại khả năng chống chịu hạn ở nhiều thực vật. Nhiều gen ở vi khuẩn liên quan đến khả năng chống chịu các điều kiện môi trường khác nhau đã được xác định. Vai trò của các gen này ở vi khuẩn trong việc đáp ứng với các phản ứng chống chịu đã được biết đến, nhiều chiến lược mới có thể được áp dụng để tăng khả năng chống chịu ở thực vật.

mtlD là một gen của vi khuẩn mã hóa cho enzyme mannitol 1-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.17) chuyển hóa fructose 2- và 6-phosphate thành mannitol-1-phosphate. Trong thực vật chuyển gen, gen này chuyển hóa mannitol 1-phosphate thành mannitol nhờ phosphatase không đặc hiệu (Rathinasabapathi

B, 2000). Thời gian gần đây, gen *mtlD* đã được nghiên cứu chuyên vào một số cây trồng như lúa (Huizhong et al., 2000), thuốc lá (Karakas et al., 1997; Tarczynski et al., 1992), lạc (Bhauso et al., 2014), cà tím (Prabhavathi et al., 2002), lúa mỳ (Abebe et al., 2003), lúa mạch (Maheswari et al., 2010). Kết quả thu được đều đã làm tăng chiều cao cây, khối lượng tươi và khô, tăng khả năng chịu mặn, chịu hạn của cây trồng nhờ sự tích lũy manitol. Từ đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập gen mã hóa *mtlD* từ chủng vi khuẩn *E. coli* JM109, cải biến gen và thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp để phục vụ công tác chuyển gen vào cây ngô.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn *E. coli* JM109 và DH5 α được cung cấp từ bộ chủng vi khuẩn của Phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ gen. Bên cạnh đó, vector tách dòng pJET1.2 được đặt hàng từ hãng Thermofisher Scientific trong bộ CloneJet PCR Cloning Kit. Vector trung gian pRTRA được thiết kế có sẵn trình tự của promoter và terminator 35S cùng với vùng giới hạn của enzyme *NotI/BamHI*, vector biểu hiện pCAMBIA 1300 và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* được cung cấp bởi Phòng Đa dạng hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen. Các enzyme giới hạn *NotI*, *BamHI*, *HindIII* và *BglII* được nhập từ hãng Thermofisher Scientific, Lithuania.

Phân lập và tách dòng gen *mtlD* từ chủng *E. coli* JM109

Chủng vi khuẩn *E. coli* JM109 được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani (LB) lỏng qua đêm ở 37°C. Từ dịch nuôi tế bào, DNA genome của chủng *E. coli* được tách chiết theo phương pháp cải tiến của Sambrook et al. (1989) sử dụng chloroform/isoamylalcohol để chiết, sau đó DNA được rửa lại bằng ethanol 96-100% và hòa vào dung dịch TE. Từ đó, DNA genome được sử dụng làm khuôn cho PCR khuếch đại gen *mtlD* bằng cặp mồi đặc hiệu với trình tự mồi xuôi: 5'-ATACTACTAG TATGAAAGCATTACATTTTGGCGCAG-3' và mồi ngược: 5'-ACCACTGCAGTTATT GCATTGCTTTATAA-3'. Điều kiện phản ứng

khuếch đại gen *mtlD* bao gồm: 1X Buffer; 0,4 mM dNTPs; 1 mM MgCl₂; 0,4 mM mỗi mồi; 20 ng DNA genome và 2U Dream *taq* DNA polymerase (Thermofisher Scientific, Lithuania). Chu trình nhiệt PCR được cài đặt như sau: 95°C/3 phút; (95°C/30 giây, 55°C/45 giây, 72°C/2 phút) \times 30 chu kỳ; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% và nhuộm bằng ethidium bromide.

Kết thúc quá trình PCR, sản phẩm DNA gen *mtlD* được tinh sạch qua bộ kit GeneJET Gel Extraction (Thermofisher Scientific) và xử lý đầu bằng trước khi được gắn với vector tách dòng pJET1.2 ở 22°C trong 10 phút. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 60 giây. Khuẩn lạc thu được trên đĩa biến nạp có bổ sung ampicilin nồng độ ban đầu 50 mg/ml được nuôi cấy và tách chiết DNA plasmid theo phương pháp sử dụng các dung dịch SOL I, II và III (Sambrook et al., 2011). Sản phẩm DNA plasmid được cắt kiểm tra bằng *BglII* và giải trình tự gen tự động trên hệ thống 3500 Genetic Analyzer (Hoa Kỳ) bằng cặp mồi giải trình tự của vector pJET1.2.

Cải biến gen *mtlD* để chuyển gen vào cây ngô

Để phù hợp cho việc chuyển gen vào cây ngô, gen *mtlD* từ *E. coli* JM109 cần được cải biến cho phù hợp với gen thực vật bằng cách làm giàu tỷ lệ %GC trong trình tự gen mà không làm thay đổi trình tự amino axit. Để đánh giá sự cải biến gen này, chỉ số CAI (codon adoption index) từ phần mềm Optimum GeneTM được sử dụng ứng với mỗi vật chủ được chuyển gen vào. Cụ thể, gen được cải biến cho đến khi chỉ số này đạt dao động từ 0,8-1 coi như cải biến thành công. Cuối cùng, gen *mtlD* sau cải biến được đặt tổng hợp hóa học có cải thêm trình tự giới hạn của *BamHI* tại đầu 5' và *NotI* tại đầu 3' ở công ty IDT (Intergrated DNA Technology), Singapore.

Chuyển gen *mtlD* đã cải biến vào vector trung gian pRTRA

Vector trung gian pRTRA và DNA plasmid mang gen tổng hợp hóa học được xử lý đồng thời bằng *NotI* và *BamHI* trước khi được gắn với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase (Thermofisher Scientific) ở 16°C qua đêm. Sản

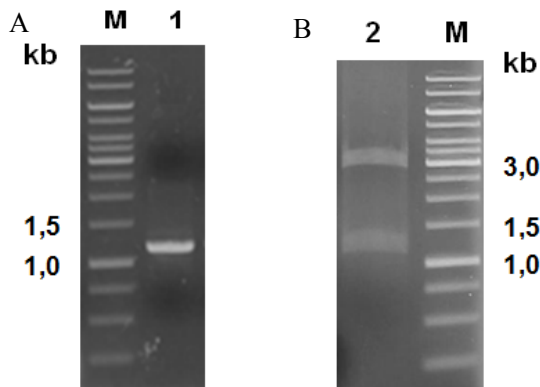
phẩm gắn sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 60 giây. Cuối cùng, sản phẩm DNA plasmid sau tách chiết từ các khuẩn lạc biến nạp được cắt kiểm tra đồng thời bằng 2 enzyme giới hạn kể trên trước khi chạy điện di trên gel agarose 0,8%.

Thiết kế vector biểu hiện chuyển gen vào cây ngô

Vector trung gian pRTRA mang gen *mtlD* cải biến và vector biểu hiện pCAMBIA 1300 được xử lý đồng thời với enzyme giới hạn *Hind*III với mục đích chuyển toàn bộ gen *mtlD* cải biến và promoter 35S vào pCAMBIA 1300. Tương tự như trên, đoạn DNA chèn được gắn vào vector pCAMBIA nhờ xúc tác của T4 ligase. Sản phẩm gắn sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 60 giây. Cuối cùng, sản phẩm DNA plasmid sau tách chiết từ các khuẩn lạc biến nạp được cắt kiểm tra bằng *Hind*III trước khi chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. vector biểu hiện thực vật pCAMBIA 1300 tái tổ hợp được biến nạp vào vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp xung điện.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tách dòng gen *mtlD*



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR gen *mtlD* (A) và sản phẩm xử lý kiểm tra DNA plasmid tái tổ hợp bằng *Bgl*II (B) trên gel agarose 0,8%.

1. Sản phẩm PCR, 2. DNA plasmid, M: marker DNA chuẩn 1 kb

Từ DNA genome tách chiết từ chủng vi khuẩn, gen *mtlD* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR nhờ cặp mồi đặc hiệu đã nêu ở trên. Sản phẩm PCR gen *mtlD* được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% trước khi được nhuộm bằng ethidium bromide và quan sát thấy dưới tia cực tím (UV) (hình 1A).

Trên điện di đồ, sản phẩm PCR gen *mtlD* thể hiện đặc hiệu một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1,1 kb, hoàn toàn phù hợp với kích thước gen *mtlD* trên lý thuyết khi thiết kế mồi. Bên cạnh đó, băng DNA có hình ảnh rõ nét, không bị đứt gãy, đủ điều kiện để tiến hành tinh sạch và tách dòng trong vector pJET1.2.

Để tách dòng gen *mtlD* trong vector pJET1.2, sản phẩm PCR gen *mtlD* cần được xử lý đầu bằng trước khi gắn với vector pJET1.2. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α và DNA plasmid từ các khuẩn lạc trên đĩa biến nạp có bổ sung sẵn kháng sinh ampicillin được tách chiết và xử lý kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bgl*II (hình 1B). Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm xử lý DNA plasmid từ chủng biến nạp bằng *Bgl*II cho 2 băng DNA rất đặc hiệu. Băng DNA phía trên có kích thước khoảng 3,0 kb rất phù hợp với kích thước vector pJET1.2 trong bộ kit thương mại hóa của hãng ThermoFisher Scientific. Trong khi đó băng DNA phía dưới có kích thước khoảng 1,1 kb, đúng bằng kích thước sản phẩm PCR đã thu được ở trên. Kết quả này chứng tỏ rằng gen *mtlD* từ chủng *E. coli* JM109 đã được tách dòng thành công trong vector pJET1.2 và đủ điều kiện để tiến hành giải trình tự gen bằng cặp mồi trong bộ kit tách dòng.

Sau quá trình đọc trình tự, chúng tôi thu được trình tự gen *mtlD* từ chủng *E. coli* JM109 và so sánh với trình tự gen *mtlD* từ chủng *E. coli* khác đã được công bố trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh trình tự gen *mtlD* phân lập được với gen *mtlD* trên hệ thống Ecogene cho thấy gen *mtlD* phân lập được có độ tương đồng gần 100% so với gen *mtlD* từ chủng *E. coli* K12 có mã số truy cập EC10616 trên Ecogene. Biến đổi duy nhất xảy ra ở vị trí nucleotide thứ 1016 trên gen chuyển đổi từ nucleotide A thành G (g.1016A>G). Hệ quả của sự thay thế nucleotide này đó là đã gây ra thay đổi một

amino axit từ aspartic axit thành glycine tại codon thứ 339 (p.Asp339Gly). Trình tự gen *mtlD* phân lập từ *E. coli* JM109 đã được chúng tôi đăng ký trên ngân hàng gen (GenBank) của hệ thống NCBI với mã số truy cập KT124226.

Cải biến gen *mtlD* phục vụ công tác chuyển gen thực vật

Trình tự gen *mtlD* được phân lập từ *E. coli* JM109 khi đưa lên phân tích trên công cụ OptimumGeneTM-Codon Optimization cho kết quả chỉ số CAI chỉ đạt 0,67. Do đó, cần thiết phải có sự cải biến gen tại những codon chứa nhiều nucleotide A và T thành các codon chứa nhiều G và C thích hợp cho biểu hiện trong thực

vật mà không làm ảnh hưởng đến trình tự amino axit của gen ban đầu. Thông qua phần mềm mã hóa amino axit Expasy (www.expasy.org), chúng tôi nhận thấy được gen *mtlD* phân lập từ vi khuẩn *E. coli* JM109 mã hóa cho một protein gồm 382 amino axit. Trên trình tự của gen *mtlD* có 179 bộ ba codon giàu AT có thể thay thế tại vị trí nucleotide thứ 3 thành các bộ ba giàu GC thích hợp ở thực vật. Tỷ lệ các bộ ba giàu AT trên gen *mtlD* của vi khuẩn chiếm 45,19% trên toàn bộ gen. Kết quả này cũng cho thấy có rất nhiều khả năng cho việc lựa chọn các bộ ba cho việc thay thế để làm giàu thành phần GC trong gen giúp cho việc biểu hiện của gen này trong thực vật đạt hiệu quả cao.

Bảng 1. Trình tự các bộ ba mã hóa amino axit được thay thế

STT	Bộ ba mã hóa gốc	Bộ ba mã hóa sau cải biến	Số lượng trong gen <i>mtlD</i>
1	TAT	TAC	4
2	AAT	AAC	5
3	ATT	ATC	10
4	TTA	TTG	3
5	ATA	ATC	1
6	CTT	CTC	2
7	CAA	CAG	3
8	CGT	CGC	9
9	AAA	AAG	19
10	TTT	TTC	7
11	GTT	GTG	8
12	GTA	GTG	11
Tổng			82

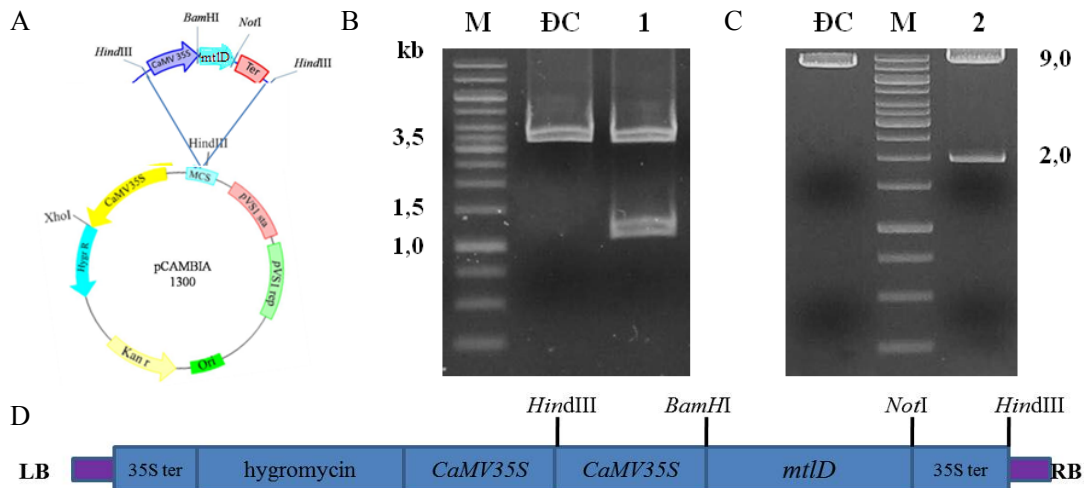
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn các bộ ba mã hóa nhằm nâng cao chỉ số CAI của gen khi đưa vào biểu hiện trong vật chủ là cây ngô, các bộ ba này phải phân bố đều trên gen đồng thời phải có chỉ số các amino axit gây ảnh hưởng không tốt lên biểu hiện gen (negative CIS elements) thấp nhất có thể (nhỏ hơn 3). Kết quả lựa chọn các bộ ba để thay thế được thể hiện ở bảng 1. Gen *mtlD* được cải biến tại hơn 82 codon chứa nhiều AT và nucleotide thứ 3 được chuyển đổi thành G hoặc C nhưng không làm thay đổi trình tự amino axit. Sau khi cải biến, tỷ lệ GC trong gen đã tăng lên từ 53,15% lên 60,03% và chỉ số CAI của gen *mtlD* tương thích biểu hiện trong cây ngô đã tăng lên 0,81, một chỉ số hoàn toàn phù hợp cho việc chuyển gen sau cải biến vào biểu hiện trong cây ngô.

Thiết kế vector biểu hiện ở thực vật mang gen *mtlD*

Trong nghiên cứu này, để thiết kế được vector biểu hiện mang gen *mtlD*, chúng tôi đã gắn gen *mtlD* cải biến vào vector trung gian pRTRA đã có sẵn cấu trúc gồm promoter 35S và 35S terminator bằng cách chèn vào với 2 đầu dính là điểm nhận biết của enzyme *Bam*HI và *Not*I. Tiếp theo đó, đoạn DNA bao gồm gen *mtlD* cải biến và promoter 35S được chuyển vào vector biểu hiện pCAMBIA1300 để tạo vector chuyển gen (hình 2A). Vector trung gian pRTRA có mang có kích thước khoảng 3,5 kb và vector tách dòng mang gen *mtlD* cải biến được xử lý đồng thời bằng *Bam*HI và *Not*I để mở vòng vector pRTRA và thu gen *mtlD* cải biến được cắt ra từ vector tách dòng. Hai sản

phẩm DNA này được tinh sạch và gắn với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase trước khi được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . DNA plasmid từ các khuẩn lạc trên đĩa biến nạp có bổ sung sẵn kháng sinh chọn lọc được tách chiết và xử lý kiểm tra bằng tổ hợp 2 enzyme giới hạn kể trên (hình 2B). Từ vector trung gian pRTRA

tái tổ hợp, sau khi được xử lý bằng *Hind*III, đoạn DNA chèn gồm gen *mtlD* cải biến và promoter 35S được chuyển vào vector biểu hiện pCAMBIA 1300. DNA plasmid tách chiết từ khuẩn lạc biến nạp được cắt kiểm tra bằng *Hind*III trước khi điện di trên gel agarose 0,8% (hình 2C).



Hình 2. Sơ đồ vector biểu hiện (A), điện di đồ cắt kiểm tra vector tái tổ hợp [pRTRA + *mtlD*] bằng *Bam*HI/*Not*I (B) và vector [pCAMBIA + 35S + *mtlD*] bằng *Hind*III (C). Sơ đồ cấu trúc biểu hiện trong vector pCAMBIA1300 (D)

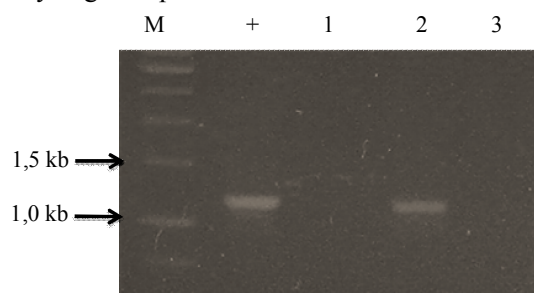
1. DNA plasmid [pRTRA + *mtlD*]; 2. DNA plasmid [pCAMBIA + 35S + *mtlD*]; M. marker DNA chuẩn 1 kb, ĐC: DNA plasmid đối chứng.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt DNA plasmid tách chiết cho thấy hai băng DNA đặc hiệu đối với plasmid tách chiết được, còn plasmid đối chứng chỉ có một băng DNA duy nhất. Trong đó, đối với plasmid tách chiết từ vector trung gian pRTRA, băng DNA phía trên có kích thước khoảng 3,5 kb, tương ứng đúng với kích thước vector pRTRA ban đầu, trong khi băng DNA phía dưới có kích thước đạt khoảng 1,1 kb, hoàn toàn đúng với kích thước gen *mtlD* đã thu được. Ngược lại, plasmid đối chứng chỉ cho một băng DNA duy nhất đúng bằng kích thước vector pRTRA (hình 2A). Sau đó, tại sản phẩm cắt kiểm tra với vector pCAMBIA1300, plasmid tách chiết cho băng DNA phía trên có kích thước hơn 9 kb đúng với kích thước vector pCAMBIA 1300 đối chứng khi cắt bằng *Hind*III. Trong khi đó, băng DNA phía dưới ở plasmid tách chiết có kích thước

khoảng 2 kb đúng với tổng kích thước đoạn chèn gồm gen *mtlD* 1,1 kb, promoter 35S khoảng 0,5kb và terminator khoảng 0,3 kb (hình 2C). Kết quả trên chứng minh được rằng chúng tôi đã thiết kế được vector biểu hiện pCAMBIA1300 mang gen *mtlD*. Sơ đồ cấu trúc biểu hiện mang gen đích *mtlD* và cấu trúc mang gen *Hyg* là chỉ thị chọn lọc thực vật được thể hiện ở hình 2A và D.

Vector tái tổ hợp pCAMBIA1300 trên được sử dụng trong thí nghiệm biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp xung điện. Sau đó, các khuẩn lạc mọc trên môi trường kháng Kanamycine và Cefotaxim được chọn để kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhân gen *mtlD*. Kết quả PCR thể hiện trên hình 3 cho thấy trong 3 dòng được lựa chọn để nhân đoạn gen *mtlD* thì dòng số 2 cho kết quả dương

tính (hình 3, đường chạy 2). Như vậy, dòng *A. tumefaciens* đã có sự tái tổ hợp với gen *mtlD*, dòng này sẽ được sử dụng trong nghiên cứu chuyển gen tiếp theo.



Hình 3. Kiểm tra sự có mặt gen *mtlD* trong vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng PCR khuẩn lạc

M: Marker 1kb; +: PCR từ vector tái tổ hợp; 1-3: PCR từ 3 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens*.

Tham khảo những nghiên cứu thực hiện chuyển gen *mtlD* vào thực vật ở những cây trồng như lúa (Huizhong et al., 2000), lạc (Bhauso et al., 2014), cà tím (Prabhavathi et al., 2002), lúa mì (Abebe et al., 2003), lúa mạch (Maheswari et al., 2010), chúng tôi nhận thấy, vector biểu hiện tái tổ hợp được tạo ra trong nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc sử dụng làm nguyên liệu thực hiện chuyển gen để tạo ra cây trồng chuyển gen có khả năng chống chịu được điều kiện bất lợi của môi trường như hạn hán.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, tách dòng và xác định được trình tự gen *mtlD* từ chủng *E. coli* JM109. Đồng thời, gen *mtlD* này đã được cải biến và tái tổ hợp thành công vào trong vector pCAMBIA1300 và biến nạp được vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* để làm nguyên liệu trong công tác chuyển gen vào thực vật với vật chủ là cây ngô nhằm tăng khả năng chịu hạn cho cây.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ về kinh phí từ Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cho đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen” giai đoạn 2014-2018.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abebe T., Guenzi A. C., Martin B., Cushman J. C., 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.*, 131(4): 1748-1755.
- Almeida A. M., Cardoso L. A., Santos D. M., Torne J. M., Feveireiro P. S., 2007. Trehalose and its applications in plant biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.*, 43(3): 167-177.
- Bandurska H., Jozwiak W., 2010. A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.*, 79(2): 111-116.
- Bhauso T. D., Thankappan R., Kumar A., Mishra G. P., Dobaria J. R., Rajam M. V., 2014. Over-expression of bacterial *mtlD* gene confers enhanced tolerance to salt-stress and water-deficit stress in transgenic peanut (*Arachis hypogaea*) through accumulation of mannitol. *Australian Journal of Crop Science*, 8(3): 413-421.
- Blumwald E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4): 431-434.
- Heisey P. W., Edmeades G. O., 1999. Maize production in droughtstressed environments: technical options and research resource allocation. Part 1 of CIMMYT 1997/98 world maize facts and trends, Mexico. D.F.: CIMMYT.
- Huizhong W., Danian H., Ruifang L. U., Junjun LIU., Qian Q., Xuexian P., 2000. Salt tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) with *mtlD* gene and *gutD* gene. *Chinese Sci Bull.*, 45(5): 1685-1689.
- Karakas B., Ozias-Akins P., Stushnoff C., Suefferheld M., Rieger M., 1997. Salinity and drought tolerance in mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.*, 20(3): 609-616.
- Maheswari M., Varalaxmi Y., Vijayalakshmi A., Yadav B.K., Sharmila P., Venkateswarlu B., Vanaia M., Pardha

- Saradhi P., 2010. Metabolic engineering using *mtlD* gene enhances tolerance to water deficit and salinity in sorghum. *Biologia Plantarum*, 54(4): 647-652.
- Prabhavathi V., Yadav J. S., Kumar P. A., Rajam M. V., 2002. Abiotic stress tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) by introduction of bacterial *mannitol 1-phosphate dehydrogenase* gene. *Mol. Breed*, 9(2): 137-147.
- Rathinasabapathi B., 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, 86(4): 709-716.
- Sambrook J., Russell D., Green M., 2011. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Stoop J. M. H., Williamson J. D., Pharr D. M., 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.*, 1(2): 139-144.
- Taiz L., Zeiger E., 1998. Stress physiology. In *Plant physiology*, 2nd edn. Sunderland, MA., Sinauer Associates Inc: 725-757.
- Tarczynski M. C., Jensen R. G., Bohnert H. J., 1992. Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proceedings of the Nat. Aca. of Sci. of USA.*, 89(7): 2600-2604.
- Wang W., Vinocur B., Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.*, 218(1): 1-14.

CONSTRUCTION OF AN EXPRESSION VECTOR CARRYING GENE CODING MANNITOL-1-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (*mtlD*) FROM *Escherichia coli* JM109 STRAIN TO TRANSFER INTO MAIZE

Le Bac Viet, Nguyen Thi Kim Lien, Nguyen Huy Hoang,
Nong Van Hai, Huynh Thi Thu Hue*

Institute of Genome Research, VAST

SUMMARY

Maize (*Zea mays* L.) is one of the important cereal crops in the world, and the maize demand is increasing but the productivity and yield of maize have been affected by extreme adverse conditions, of tghose drought is one of the main factors reducing productivity due to inhibition of growth and decreasing photosynthesis in plants. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) is an enzyme that catalyzes the conversion of fructose 2- and 6-phosphate to mannitol-1-phosphate in the photosynthesis pathway of plants. To produce maize containing *mtlD* gene to increase the height, fresh and dry weight, salt/drought tolerance in host plant based on accumulation of mannitol, we constructed an expression vector carrying the *mtlD* gene. The *mtlD* gene was isolated from *E. coli* JM109, cloned and sequenced in vector pJET1.2. This sequence was then optimized by OptimumGene™ software to make it appropriate into plants. The modified gene was recombined into a mediate pRTRA vector containing 35S promoter and 35S terminator, the 35Spro::*mtlD*::35S cassette was constructed into pCAMBIA1300 Ti-plasmid. The new recombinant vector was transformed into *A. tumefaciens* which could be used as a material for maize transformation.

Keywords: *E. coli*, construction vector, *mtlD*, maize, mannitol-1-phosphate dehydrogenase.

Citation: Le Bac Viet, Nguyen Thi Kim Lien, Nguyen Huy Hoang, Nong Van Hai, Huynh Thi Thu Hue, 2017. Construction of an expression vector carrying gene coding mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MTLD) from *Escherichia coli* JM109 strain to transfer into maize. *Tap chi Sinh hoc*, 39(1): 61-67. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7073.

*Corresponding author: hthue@igr.ac.vn

Received 30 December 2015, accepted 20 March 2017