

PHÂN LẬP VÀ CHUYỂN GIEN ĐIỀU KHIỂN CHỊU HẠN *MTOSDREB2A* VÀO GIỐNG LÚA CHÀNH TRỤI THÔNG QUA *AGROBACTERIUM*

CAO LỆ QUYÊN, TRẦN TUẤN TÚ, PHẠM XUÂN HỘI

Viện Di truyền Nông nghiệp

Ở nước ta hiện nay, hạn hán đã và đang là một trong những nguyên nhân chính làm giảm năng suất cây trồng; thậm chí có nơi, có vụ, hiện tượng hạn hán gây thất thu, làm sản lượng nông nghiệp không ổn định, gây ảnh hưởng đến an ninh lương thực quốc gia. Vấn đề càng trở nên bức xúc khi hầu hết đất canh tác bị hạn nặng lại tập trung ở những vùng đất khó canh tác, vùng sâu, vùng xa nơi mà cuộc sống của người nông dân chủ yếu dựa vào sản phẩm nông nghiệp. Vì vậy, việc tạo ra các giống cây trồng có tính kháng hạn cao có ý nghĩa đặc biệt quan trọng góp phần tăng và ổn định năng suất, xóa đói giảm nghèo, ổn định xã hội, tăng dân trí và vị thế quốc gia.

Hàng loạt các nghiên cứu chuyển gen đáp ứng stress hạn vào cây trồng nhằm tăng cường tính kháng hạn ở thực vật đã được tiến hành trong những năm vừa qua, kết quả đã tạo ra những cây chuyển gen tăng cường tính chống chịu với điều kiện hạn [2, 12, 14]. Tuy nhiên, tính trạng chịu hạn là một tính trạng đa gen, do nhiều gen chức năng tham gia trực tiếp đáp ứng điều kiện hạn và các gen điều khiển tính chịu hạn. Vì vậy, việc chuyển hàng loạt các gen chức năng nhằm tạo ra các cây trồng biến đổi gen tăng cường khả năng chịu hạn là nhiệm vụ bất khả thi.

Các gen mã hóa prôtêin điều khiển quá trình phiên mã tham gia vào tính kháng hạn bám vào trật tự ADN đặc hiệu (*cis-acting element*) trong đoạn điều khiển gen (*promoter*) của các gen chức năng tham gia điều khiển tính chịu hạn và cùng với enzym sinh tổng hợp ARN (*RNA polymerase*) thực hiện quá trình phiên mã các gen chức năng này. Các nghiên cứu về *promoter* đã phát hiện rất nhiều gen chức năng tham gia điều khiển tính chịu hạn chứa trật tự ADN đặc hiệu. Vì vậy, khi một gen điều khiển biểu hiện sẽ sinh ra các prôtêin bám vào trật tự

ADN đặc hiệu trên prômôtor của nhiều gen chức năng tham gia điều khiển tính chịu hạn và hoạt hoá sự biểu hiện của các gen này, kết quả là thực vật tăng cường tính chịu hạn. Điều này giải thích vì sao tính trạng chịu hạn là tính trạng đa gen nhưng chỉ cần chuyển một gen điều khiển tính chịu hạn có thể làm tăng sức chống hạn của cây chuyển gen. Các nghiên cứu về hệ gen đã đưa ra kết luận gen điều khiển chiếm 6 - 9% tổng số gen trong mỗi hệ gen, ví dụ ở *Arabidopsis* có 2.057 gen điều khiển được phát hiện trên tổng số 26.000 gen trong hệ gen [9]. Rất nhiều nghiên cứu về đặc tính của gen điều khiển trên cây mô hình *Arabidopsis* và lúa đã chứng minh nhóm gen này đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong việc tăng cường tính chịu hạn ở thực vật. Vì vậy, việc phân lập và nghiên cứu đặc tính của các gen điều khiển đang trở thành vấn đề thời sự mang tính toàn cầu, thu hút sự quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới.

Gen mã hóa nhân tố khởi đầu phiên mã *DREB2* tương tác với trật tự ADN đặc hiệu *DRE* trên vùng khởi động gen của các gen chức năng sinh ra trong điều kiện hạn và hoạt hoá sự biểu hiện của các gen này. *DREB2* đầu tiên được phát hiện ở *Arabidopsis* vào năm 1998. Hai gen *DREB2A* và *DREB2B* chỉ biểu hiện trong điều kiện hạn và mặn. Tuy nhiên biểu hiện của các gen *DREB2A* và *DREB2B* trong các cây chuyển gen không hoạt hoá biểu hiện của các gen chức năng liên quan đến chịu hạn trong điều kiện sinh trưởng bình thường và kết quả là cây chuyển gen không có tính chịu hạn. Điều này được lý giải rằng nhóm gen này cần quá trình sửa đổi sau phiên mã, ví dụ như qua quá trình phosphoryl hóa (*phosphorylation*) để chuyển prôtêin sang dạng hoạt hoá [4]. Gen *DREB2A* được thay đổi cấu trúc bằng việc loại bỏ 30 axit amin tương ứng với trật tự từ 136 đến

165 để tạo ra dạng *DREB2ACA*. Kết quả, sự biểu hiện của gen *DREB2ACA* giúp cây chuyển gen *Arabidopsis* tăng cường đáng kể tính chịu hạn. Các phân tích sử dụng kỹ thuật Microarray và Northern blot đã chứng minh là biểu hiện gen *DREB2ACA* trong cây chuyển gen hoạt hoá sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng tham gia vào tính chịu hạn ở thực vật [7, 8]. Do tính quan trọng của vấn đề chịu hạn ở thực vật, hàng loạt các nghiên cứu tập trung việc phân lập và nghiên cứu đặc tính của nhóm gen *DREB2* điều khiển tính chịu hạn trên các đối tượng thực vật khác nhau. Ở lúa, gen *OsDREB2A* được phân lập và công bố vào năm 2003. *OsDREB2A* chỉ biểu hiện trong điều kiện hạn và mặn và biểu hiện của *OsDREB2A* tăng cường tính chịu hạn và mặn trong cây *Arabidopsis* chuyển gen [3]. Ở lúa mì, gen *DREB2* được phân lập và phát hiện biểu hiện mạnh trong điều kiện lạnh, mặn và hạn [10, 11]. Ở lúa mạch, gen *DREB2* có tên là *HvDRF1* cũng được công bố là tích lũy trong điều kiện hạn, mặn và tham gia trực tiếp vào điều hoà ABA [13]. Ngoài *Arabidopsis*, gen *ZmDREB2A* cũng đã được phân lập và nghiên cứu đặc tính chi tiết ở ngô. Không giống như ở *Arabidopsis* (*DREB2A*), gen *ZmDREB2A* tạo ra hai dạng transcript và qua phân tích Real-time PCR thì chỉ có dạng transcript hoạt tính sinh ra đáng kể trong điều kiện hạn. Ngoài ra, qua thí nghiệm phân tích hoạt hoá phiên mã (transactivation assay) ở tế bào trần *Arabidopsis* thì *ZmDREB2A* có khả năng hoạt hoá quá trình phiên mã (transactivation activity) mạnh hơn nhiều *DREB2A*. Vì vậy, quá trình sửa đổi sau dịch mã là không cần thiết trong việc tạo ra prôtêin hoạt tính trong trường hợp gen *ZmDREB2A*. Sự biểu hiện liên tục gen *ZmDREB2A* làm tăng cường tính chịu hạn rõ rệt trong các cây chuyển gen. Kết quả này cho thấy có sự khác nhau về cơ chế điều khiển tính chịu hạn trong cùng nhóm gen giữa cây mô hình hai lá mầm và cây một lá mầm [6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập gen *MtOsDREB2A* từ thư viện xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền, thiết kế vector chuyển gen bằng kỹ thuật gateway và chuyển vector biểu hiện mang gen *MtOsDREB2A* vào giống lúa Chành trụi thông qua kỹ thuật chuyển gen sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Nguồn thư viện cADN xử lý hạn: Thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền được sinh tổng hợp tại Trung tâm Công nghệ Sinh học và Kỹ thuật gen Quốc tế (ICGEB), New Delhi, Ấn Độ.

Nguồn thực vật nhận gen: Giống lúa Chành trụi được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, đã được khảo sát khả năng tạo callus (91%) và tái sinh (> 80) [1].

Các bộ kit và vector: Vector nhân dòng pUC19-Ubi và vector nhận pBCKH được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu của GS. Shinozaki (Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trung tâm Quốc tế về Khoa học Nông nghiệp Nhật Bản, JIRCAS). Bộ kit Gateway[#] LR Clonase[#] II enzym mix để thực hiện phản ứng Gateway mua của hãng Invitrogen.

Các chủng vi khuẩn: Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 được cung cấp bởi Bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Các trật tự môi PCR và hóa chất: Các trật tự môi PCR đặc hiệu nhân dòng gen *MtOsDREB2A* và kiểm tra sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* trong các vector và vi khuẩn được mua của hãng Sigma. Hóa chất sử dụng trong nuôi cấy mô và sinh học phân tử được mua bởi các hãng Merk, Sigma và Invitrogen.

2. Phương pháp

Nhân dòng gen *MtOsDREB2A* từ thư viện cADN xử lý hạn giống lúa Mộc tuyền: Dựa trên trình tự các gen *DREB2A* được công bố trên Gene Bank của các giống lúa Japonica và Pokali chúng tôi lựa chọn 20 nucleotide ở hai đầu 5', 3' vùng ORF của gen *DREB2A* và trật tự nhận biết của enzym *Bam*H I để thiết kế trật tự môi đặc hiệu như sau: ***OsDREB2A-F***: 5'-ATGGATCCATGGAGCGGGGGGAGGGGA - 3'OH; ***OsDREB2A-R***: 5'-ATCCTAGGCTAATAGGAGAAAAGGCTA-3'OH. Phản ứng PCR được thực hiện với nồng độ môi 10 pmoL, dNTPs 0,2 mM, *Taq* polymerase 2,5 U với chu kỳ nhiệt: khởi đầu 94°C trong 5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (94°C - 45 giây, 55°C - 45 giây, 72°C -

60 giây), kéo dài 7 phút ở 72°C. Sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra trên gel Agarose 1%, tiến hành thổi gel bằng cột Genelute™ Minus EtBr (Sigma Cat G-2166). Sản phẩm PCR tiếp đó được xử lý với enzym giới hạn *Bam*H I và gắn vào vector nhân dòng pUC19-Ubi đã xử lý *Bam*H I và loại gốc phosphate trước đó để tạo vector nhân dòng mang gen *MtOsDREB2A* và đồng thời là vector cho trong phản ứng clonase. Sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* xuôi chiều trong vector nhân dòng pUC19-Ubi được kiểm tra bằng cặp môi **Ubi-F**: 5'-CCCTGCCTTCAT ACGCTATT-3'OH và **OsDREB2A-R**, với sản phẩm ước đoán khoảng 900-bp. Gen sau đó được đọc trình tự trên hệ thống ABI 3100, kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Gene Bank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 6.0.

Thiết kế vector chuyển gen mang gen *MtOsDREB2A* bằng kỹ thuật Gateway: Kỹ thuật Gateway (Invitrogen) được sử dụng để tạo vector chuyển gen thực vật (*binary vector*) với thành phần phản ứng (5 µl) được thiết lập như sau: 1 µl đệm LR clonase, 50 ng vector cho (pUC19-Ubi-*MtOsDREB2A*), 10 ng vector nhận (pBCKH), 2,5 µl đệm TE và 0,5 µl enzym Clonaza. Phản ứng được tiến hành trong 1 giờ ở 25°C, sau đó bổ sung proteinaza K để loại bỏ prôtêin. Sản phẩm phản ứng được biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5α khả biến đã chuẩn bị. Tiến hành sàng lọc vi khuẩn mang vector chuyển gen trên môi trường LB chứa 50 µg/ml kanamycin, sự tồn tại xuôi chiều của gen *MtOsDREB2A* trong vector chuyển gen được kiểm tra bằng phản ứng PCR với môi đặc hiệu **GW-F**: 5'-CAGCTATGACCATGATTACGC-3'OH và **OsDREB2A-R**, với sản phẩm theo tính toán sẽ có kích thước xấp xỉ 2,9 kb. Vector chuyển gen sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp xung điện sử dụng máy ECM 630 (BTX) với các thông số như sau: điện dung 25 µF, điện thế 2,4 KV, điện trở 200 µ trong thời gian 5 giây. Sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* trong vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 được kiểm tra lại bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu **OsDREB2A-F/R**.

Chuyển cấu trúc mang gen *MtOsDREB2A* vào lúa *Chành trĩ*: Các callus

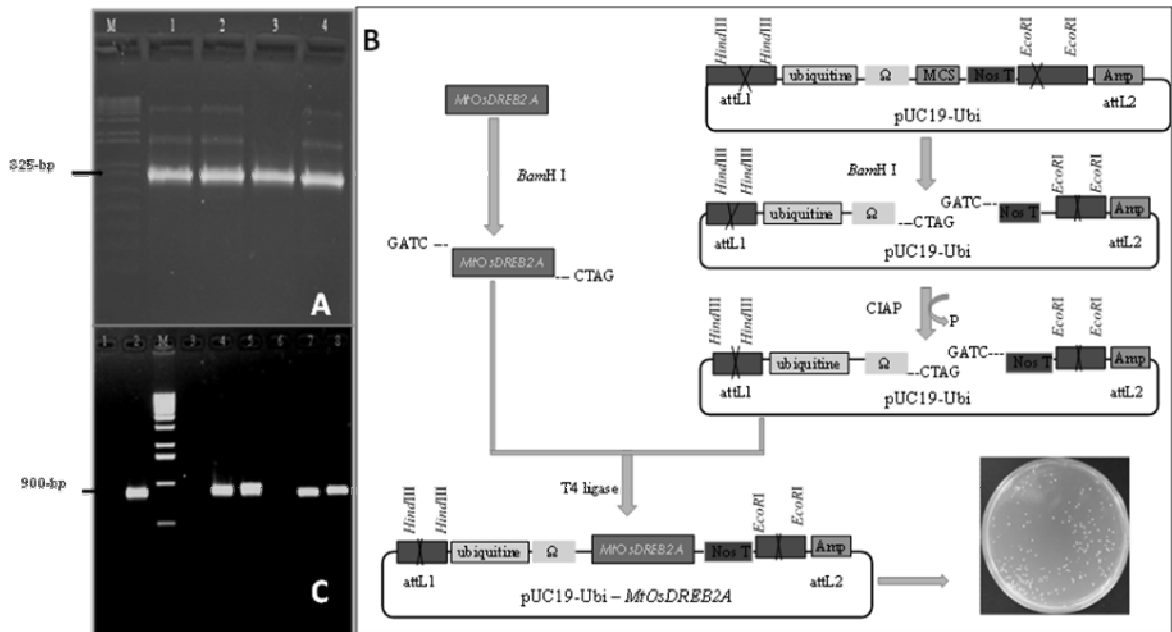
tốt (có màu vàng, khô, đường kính 1-3 mm) của lúa *Chành trĩ* - được tạo ra trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l 2,4D trong 10 ngày, ở 28°C trong tối - được gom lại và trải đều lên môi trường MS có ngăn bởi giấy lọc và nuôi ở 28°C trong 3 ngày trước khi tiến hành chuyển gen. Một khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang gen *MtOsDREB2A* được nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C qua đêm trong 5ml môi trường YEM lỏng có bổ sung 50 mg/l kanamycin. Dung dịch vi khuẩn sau đó được pha loãng với 30 ml môi trường AAM [3], bổ sung acetosyringone ở nồng độ 30 µg/ml. Các callus đã lựa chọn ở trên được chuyển lên tấm lưới đã khử trùng và được ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn ở trên trong 90 giây, thỉnh thoảng lắc nhẹ. Các callus sau đó được làm khô và chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy **MS-AS** (môi trường MS có bổ sung 15 mg/l acetosyringone, 300 mg/l casein, 2 mg/l 2,4D, 10 g/l glucose và 30 g/l sucrose) có ngăn bởi giấy lọc, giữ trong tối ở 28°C trong 3 ngày. Các callus sau đó được tiến hành loại bỏ các vi khuẩn dư thừa trên bề mặt bằng cách rửa nhiều lần với dung dịch nước cất khử trùng có bổ sung 500 mg/l cabernicillin. Chuyển các callus sang môi trường chọn lọc **MS-S** (môi trường MS có bổ sung 300 mg/l casein, 2 mg/l 2,4D, 30 g/l sucrose và 50 mg/l hygromycin), nuôi trong tối 2 tuần ở 28°C (lặp lại 1 lần). Các callus sinh trưởng trên môi trường MS-S sau đó được chuyển sang môi trường tái sinh MS-R (môi trường MS có bổ sung 15 ml/l nước dừa và 50 mg/l hygromycin), nuôi trong điều kiện 25°C, độ ẩm 50-70%, quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ sáng 3000 Lux. Sau 4 tuần, các cụm chồi sinh trưởng tốt được tách ra và tiến hành cho ra rễ trên môi trường MS/2 (nồng độ muối khoáng giảm 1/2). Khi các cây lúa T₀ có hệ rễ phát triển tốt và đạt chiều cao khoảng 7-10 cm sẽ được đưa ra ngoài môi trường làm quen trước khi cấy ra các chậu thí nghiệm. Các cây lúa chuyển gen T₀ sau đó được kiểm tra sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* trong hệ gen bằng cách tách chiết ADN từ lá lúa theo phương pháp CTAB có cải tiến để thu ADN tổng số cho phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu **Ubi-F** và **Nos-TR**: 5'-AGACCGGCAACAGGATTCAA-3'OH, sản phẩm PCR khi điện di trên gel agarose 1% sẽ có kích thước dự đoán khoảng 1,2 kb.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen *MtOsDREB2A* từ thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền:

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại gen *MtOsDREB2A* từ thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền (hình 1A) cho thấy sản phẩm khuếch đại rõ nét có kích thước xấp xỉ 825-bp. Kích thước 825-bp là kích thước đã được dự đoán tương ứng với khung đọc mở của các gen *DREB2A* đã được phát hiện ở lúa Japonica và Pokali [6]. Sản phẩm khuếch đại ngoài ra còn mang hai vị trí nhận biết của enzym *BamH* I ở hai đầu phía ngoài khung đọc mở của gen *MtOsDREB2A*. Sản phẩm khuếch đại sau đó được gắn vào vector nhân dòng pUC19-Ubi nhờ vị trí nhận biết này. Vector nhân dòng

pUC19-Ubi được thiết kế dựa trên cấu trúc của vector pUC19 có gắn thêm promoter Ubiquitine và enhancer Ω trước vùng MCS cho phép điều hòa biểu hiện gen lạ được chèn trong vị trí MCS ở thực vật. Sau khi sản phẩm khuếch đại gen *MtOsDREB2A* được gắn vào vector nhân dòng pUC19-Ubi chúng tôi đã thu được vector pUC19-Ubi-*MtOsDREB2A* vừa là vector nhân dòng cho gen này vừa là vector cho trong phản ứng clonase khi sử dụng kỹ thuật gateway để tạo vector chuyển gen thực vật (hình 1B). Vector cho pUC19-Ubi-*MtOsDREB2A* sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α và tiến hành sàng lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin nhờ gen kháng ampicillin trên vector cho (hình 1B).



Hình 1. Kết quả phân lập gen *MtOsDREB2A* trong vector nhân dòng pUC19-Ubi

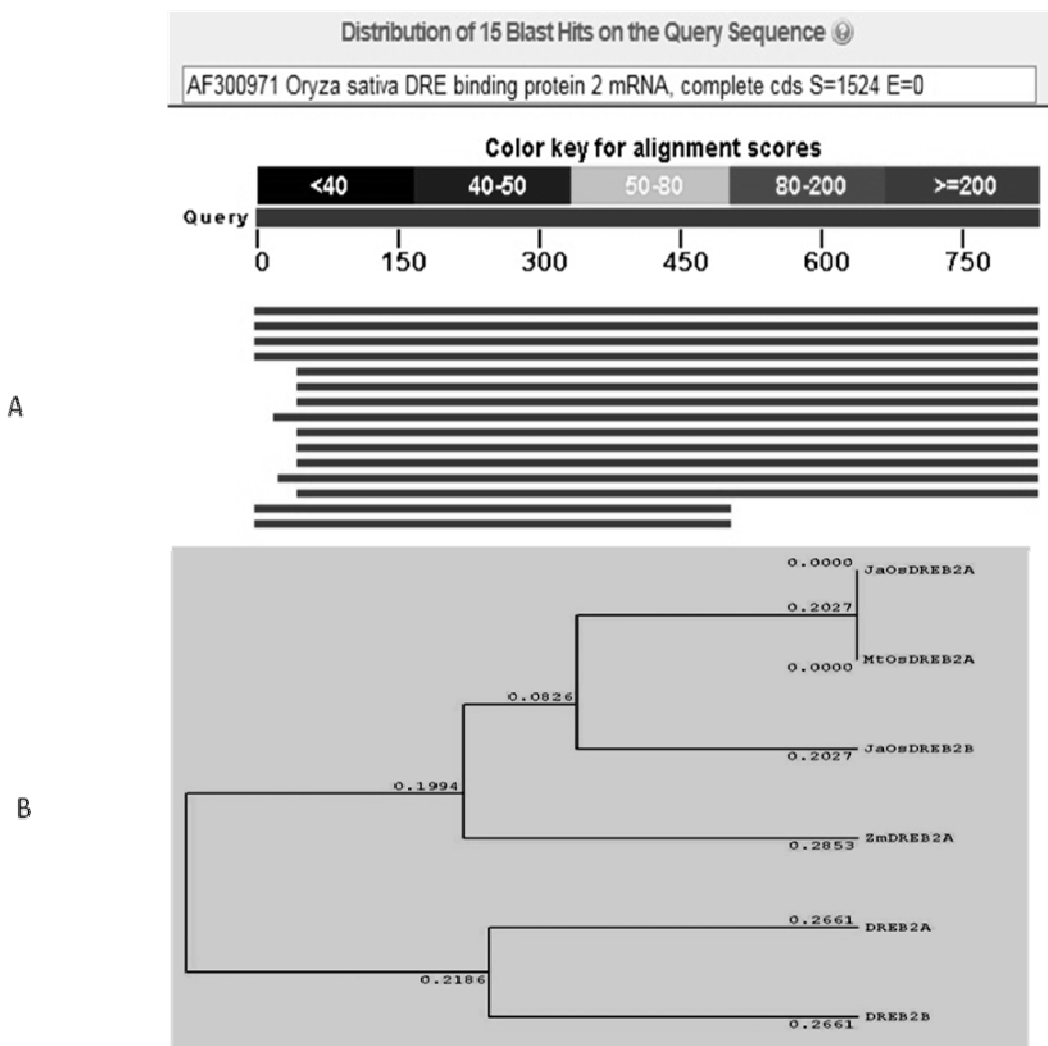
A. Kết quả khuếch đại gen *OsDREB2A* từ thư viện xử lý hạn lúa Mộc tuyền: M- thang ADN chuẩn 1 kb (Invitrogen); giếng 1-4 sản phẩm nhân gen từ thư viện với cặp môi đặc hiệu *OsDREB2A*-F/R; **B.** Sơ đồ tách dòng gen *MtOsDREB2A* trong vector nhân dòng pUC19-Ubi. **C.** Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen *MtOsDREB2A* trong vector nhân dòng pUC19-Ubi: M- thang ADN chuẩn 1kb (Invitrogen); Giếng 1, 3 và 6 cho kết quả gen *MtOsDREB2A* gắn ngược chiều (âm tính); Giếng 2, 4, 5, 7 và 8 có băng điện di kích thước xấp xỉ 900-bp tương ứng với các khuẩn lạc mang gen *MtOsDREB2A* gắn xuôi chiều trong vector pUC19-Ubi.

Tuy nhiên, do trong phản ứng tách dòng chúng tôi chỉ sử dụng một vị trí enzym giới hạn *BamH* I nên hoàn toàn có thể xảy ra trường hợp

gen *MtOsDREB2A* bị gắn ngược chiều trong vector pUC19-Ubi. Để có thể loại bỏ trường hợp này chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với các

khuẩn lạc được chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên hình 1C cho thấy trong số 8 khuẩn lạc được chọn để kiểm tra sự gắn xuôi chiều của gen *MtOsDREB2A* trong vector nhân dòng thì có 5 khuẩn lạc (khuẩn lạc số 2, 4, 5, 7 và 8) cho kết quả dương tính là băng ADN có kích thước xấp xỉ 900-bp. Các khuẩn lạc số 1, 3 và 6 không cho sản phẩm khuếch đại có thể là các khuẩn lạc mang vector trống hoặc các khuẩn lạc có mang gen *MtOsDREB2A* nhưng bị gắn ngược chiều. Sản phẩm khuếch đại cho kích thước 900-bp ở các khuẩn lạc số 2, 4, 5, 7 và 8 là do chúng tôi

đã lựa chọn môi xuôi Ubi-F được thiết kế để bắt cặp với vùng cuối cùng của promoter Ubiquitine còn môi ngược được lựa chọn là là môi ngược đặc hiệu của chính gen *MtOsDREB2A*. Nếu gen được gắn đúng chiều thì sản phẩm khuếch đại trong phản ứng PCR sẽ phải có kích thước khoảng 900-bp bao gồm kích thước của gen *MtOsDREB2A*, kích thước vùng enhancer Ω và kích thước của môi Ubi-F. Ngược lại, nếu gen được gắn ngược chiều thì phản ứng PCR sẽ không cho sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 900-bp.



Hình 2. Kết quả so sánh trình tự gen *MtOsDREB2A* với một số gen trong nhóm DREB2A bằng phần mềm Blast (A) và Genetyx 6.0 (B).

Khuẩn lạc số 5 cho kết quả khuếch đại tốt nhất đã được chúng tôi lựa chọn để tiến hành

nuôi cấy, tách plasmid với khối lượng lớn để giải trình tự gen *MtOsDREB2A* và đồng thời

làm nguyên liệu cho phản ứng clonase ở bước tiếp theo. Kết quả giải trình tự trên hệ thống ABI 3100 (dữ liệu không trình bày) cho thấy gen chúng tôi đã phân lập có kích thước chính xác 825-bp. Tiến hành so sánh với các trình tự gen có sẵn trên Gene Bank bằng phần mềm Blast

(hình 2A), chúng tôi nhận thấy gen chúng tôi đã phân lập từ thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền có 100% tương đồng với các trình tự cADN mã hóa gen *DREB2A* ở lúa Japonica (mã số: NM 001048642.1; AF 300971.2; AK 067313.1; AK 21956.1).

```

DREB2A      1: MAVYDQSGDRNRQTQIDT-SRKRKRSRSDGTTVAERLKR-WKEYNETVEEVSTK--K--- 53
DREB2B      1: MAVYEQTGTGTEQPK-----KRKSRARAGGLTVADRLKK-WKEYNEIVEASAVKEGKPK 52
JaOsDREB2A  1: MERGEGRGG-----DCSVQVRKKRTRRKSDGPDSTIAETIKWQKQNKLOEENSSR-KAP- 54
JaOsDREB2B  1: M----- 1
MtOsDREB2A  1: MERGEGRGG-----DCSVQVRKKRTRRKSDGPDSTIAETIKWQKQNKLOEENSSR-KAP- 54
ZmDREB2A    1: MTLDAQNHAMPQPPALQPGRRKKRPRRSRDGPTSVAAVIQRWAERNKHLEYESEEAAKRPR 60

DREB2A      54: RKVPARAGSKKGCМКGKGGPEPNSRCSTFRGVRRQRIWGKQVAEIREPNRGRRLWLGTFPTAQE 113
DREB2B      53: RKVPARAGSKKGCМКGKGGPDNSHCSTFRGVRRQRIWGKQVAEIREPKIGTRLWLGTFPTAEK 112
JaOsDREB2A  55: ----AKGSKKGCМКGKGGPEPNSRCAYRGVRRQRIWGKQVAEIREPNRGRRLWLGTFPTALE 110
JaOsDREB2B  2: ----K-----GKGGPENTRCDFRGVRRQRIWGKQVAEIREPNQOSRLWLGTFPTAEA 48
MtOsDREB2A  55: ----AKGSKKGCМКGKGGPEPNSRCAYRGVRRQRIWGKQVAEIREPNRGRRLWLGTFPTALE 110
ZmDREB2A    61: KA-PARAGSKKGCМКGKGGPDNTCCGGRGVRRQRIWGKQVAEIREPNRVDRLWLGTFPTAED 119

DREB2A      114: AASAYDEAAAKAMYGPLARLNFPRSDASEVTSTSSQSE----- 150
DREB2B      113: AASAYDEAAATAMYGLARLNFQSVGSEFTSTSSQSE----- 149
JaOsDREB2A  111: AAHAAYDEAAARAMYGPTARVNFADNSTDANSRGTAPSLMMSNGPATIPSDKDELESPPF 170
JaOsDREB2B  49: AACAYDEAAARAMYGP MARTNFQHHAPAASVQVALAA----- 85
MtOsDREB2A  111: AAHAAYDEAAARAMYGPTARVNFADNSTDANSRGTAPSLMMSNGPATIPSDKDELESPPF 170
ZmDREB2A    120: AARAAYDEAAARAMYGDLARTNFGQDATTSAQA-ALAS----- 155

DREB2A      151: ----- 151
DREB2B      150: ----- 150
JaOsDREB2A  171: IVANGPAVLYQPDKKDVLERVVPEVQDVKTEGNSGLKRVCCQERKNMEVCESEGIVLHKEV 230
JaOsDREB2B  86: ----- 86
MtOsDREB2A  171: IVANGPAVLYQPDKKDVLERVVPEVQDVKTEGNSGLKRVCCQERKNMEVCESEGIVLHKEV 230
ZmDREB2A    156: ----- 156

DREB2A      151: -----V-CTVETPG--CVH--VK 163
DREB2B      150: -----V-CTVENKAVVCGDVVCVK 166
JaOsDREB2A  231: NISYDYFNVHEVVMIIVELSADQKTEVHEEYQEGDDGFSLFSY----- 274
JaOsDREB2B  86: -----VKCALPGGLTASKSRTS 103
MtOsDREB2A  231: NISYDYFNVHEVVMIIVELSADQKTEVHEEYQEGDDGFSLFSY----- 274
ZmDREB2A    156: -----T-----S 157

DREB2A      164: TEDPDCESKPFSGGVEPMY-----CLENGAEEMKRGVKADKHULSEFHNHYSIDIL 214
DREB2B      167: HEDTDCESNPFSQLDVRREESCGTRPDSC TVGHQ-DMNSSLNLDL-L-EFEQYYWQVQL 223
JaOsDREB2A  275: ----- 275
JaOsDREB2B  104: TQASADVQDVL TGGLSACESTTTTINNQSDVVS TLHKPEEVSEISSPLRAPPVLEDGS 163
MtOsDREB2A  275: ----- 275
ZmDREB2A    158: AQAAPTAVEALQTGTS--CESTTTSNYS--DIASTSHKPEASD-ISSSLKAKCPA---G- 208

DREB2A      215: KEKEKQKEQGIVETCQQQ---QD-SLS-----VADYGWPN--DVD--CSHLDSDFMFD 260
DREB2B      224: QEKEKPKQEEEE---IQQQQEQQQQLQPDLL-TVADYGWPNISNDIVNDCTSDFPNECFD 280
JaOsDREB2A  275: ----- 275
JaOsDREB2B  164: NEDKAESVTYDENIVSQRAPPEAEASNGR-GEE--VFE-PLEPIASLPEDQGDYD--FD 217
MtOsDREB2A  275: ----- 275
ZmDREB2A    209: ---SCG---IQEQT-----PSVAD---K---E--VFG-LEPITNLPDGGDG---FD 242

```

Hình 3. Kết quả so sánh trình tự axit amin của gen MtOsDREB2A. So với các gen DREB2A, DREB2B, JaOsDREB2A, JaOsDREB2B, ZmDREB2A: có sự tương đồng rất lớn trong miền AP2 (vùng đánh dấu màu đen); gen MtOsDREB2A có sự tương đồng hoàn toàn với gen JaOsDREB2A

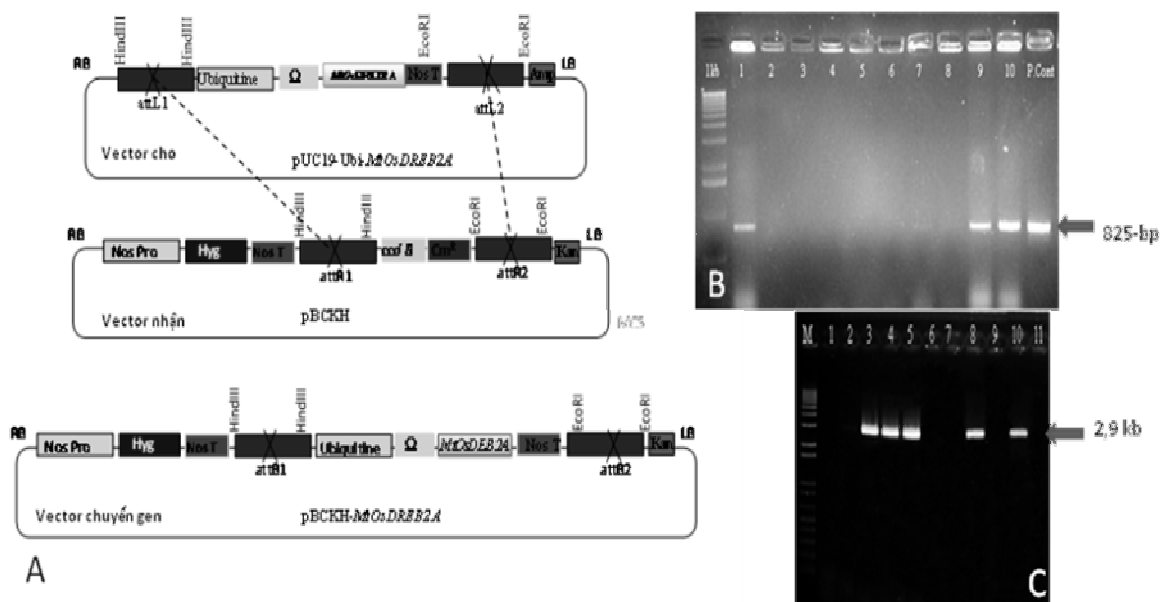
Kết quả tiến hành phân tích trình tự axit amin dự đoán của gen đã phân lập với các trình tự axit amin của các gen *DREB2A*, *DREB2B*, *JaOsDREB2A*, *JaOsDREB2B* và *ZmDREB2A*

trên phần mềm Genetyx 6.0 cho thấy trình tự protein dự đoán có miền AP2 có mức độ tương đồng cao với các gen còn lại trong nhóm *DREB2* ở các cây lúa Japonica, ngô và

A. thaliana (hình 4). Đồng thời sử dụng chương trình này chúng tôi cũng đã xây dựng được cây quan hệ phát sinh của gen *MtOsDREB2A* với các gen khác trong nhóm *DREB2*. Kết quả cho thấy gen *MtOsDREB2A* có độ tương đồng 100% với gen *JaOsDREB2A*, 78,17% với gen *DREB2* ở *A. thaliana* và 71,47% với gen *ZmDREB2A* ở ngô (hình 3). Các kết quả phân tích trình tự kháng định chúng tôi đã phân lập được gen *DREB2A* từ thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền, là nguồn nguyên liệu gen điều khiển tính chịu hạn từ chính giống lúa của Việt Nam.

Thiết kế vector chuyển gen theo kỹ thuật gateway: Hệ thống gateway dựa trên phản ứng tái tổ hợp của enzym LR clonase, gần đây trở

thành xu thế mới trong các nghiên cứu thiết kế các vector được nhiều phòng thí nghiệm sử dụng do có nhiều ưu điểm: (1). Phản ứng tái tổ hợp nhanh, nhạy và tạo ra các vector chuyển gen có khả năng biểu hiện cao; (2). không cần nhiều plasmid trong quá trình thiết kế; (3). Khi đã thiết lập được hệ thống gateway (entry vector = vector cho và destination vector = vector nhận) thì chỉ cần một phản ứng tái tổ hợp của enzym LR clonase là chuyển trực tiếp cả cassette gồm promoter, gen cần chuyển và trật tự kết thúc phiên mã từ vector nhân dòng (vector cho) sang vector chuyển gen. Vì vậy rất tiện lợi cho các phòng thí nghiệm cần thiết kế nhiều vector chuyển gen.



Hình 4. Kết quả thiết kế vector chuyển gen *MtOsDREB2A* sử dụng kỹ thuật Gateway

A. Sơ đồ minh quá trình thiết kế vector chuyển gen pBCKH-Ubi sử dụng kỹ thuật Gateway; **B.** Kết quả kiểm tra sự tồn tại của cassette promoter Ubiquitine, enhancer Ω và gen *MtOsDREB2A* trong vector chuyển gen: M- thang ADN chuẩn 1kb (Invitrogen; giếng 1, 2, 6, 7, 9 và 11 cho kết quả âm tính; giếng 3, 4, 5, 8 và 10 cho băng điện di xấp xỉ 2,9 kb tương ứng với các khuẩn lạc chứa cassette xuôi chiều trong vector chuyển gen pBCKH; **C.** Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *MtOsDREB2A* trong vi khuẩn *Agrobacterium*: giếng 1, 9, 10 và 11 cho băng điện di xấp xỉ 825-bp tương ứng với các vi khuẩn có mang vector chuyển gen pBCKH-*MtOsDREB2A*.

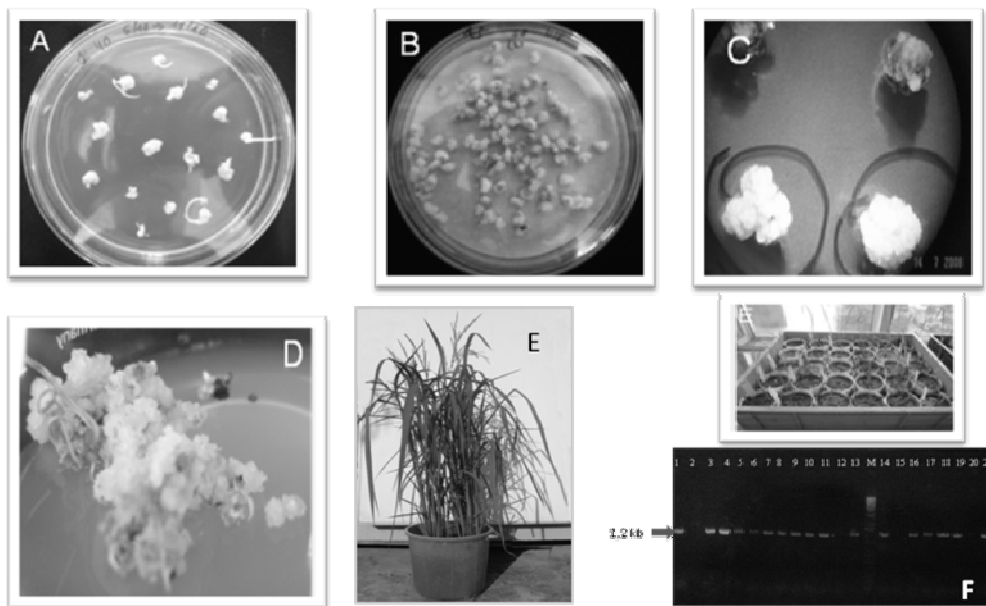
Theo hệ thống gateway, vector cho (hình 4) có bộ khung là vector nhân dòng pUC19, gắn thêm vào một cassette gồm promoter Ubiquitine, vị trí MCS và trật tự kết thúc phiên mã (NosT) được giới hạn hai đầu là vị trí cắt của enzym tái tổ hợp clonase (attL1, attL2). Trong

nghiên cứu này, vector pUC19-Ubi mang gen *MtOsDREB2A* đã được trình bày ở trên là vector cho. Vector nhận (hình 3) có bộ khung là vector pBI101, gắn thêm vào một cassette gồm promoter, gen *ccdB* và gen chloramfenicol và vùng kết thúc phiên mã được giới hạn hai đầu là

vị trí cắt của enzym tái tổ hợp clonase (attR1, attR2). Gen *ccdB* là gen của virus, rất độc cho *E. coli*, vì vậy chỉ khi phản ứng tái tổ hợp xảy ra thì cassette của vector cho sẽ chuyển sang gắn vào vector nhận và sản phẩm của phản ứng tái tổ hợp khi chuyển vào *E. coli* mới có thể cho các khuẩn lạc khi nuôi trên môi trường LB chứa kháng sinh kanamycin. Các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường LB có bổ sung kanamycin được kiểm tra sự tồn tại của cassette mang gen cần chuyển thông qua phản ứng PCR với mỗi xuôi GW-F bám đặc hiệu phía cuối vùng NosT bên trái và mỗi đặc hiệu *OsDREB2A*-R. Nếu phản ứng clonase thành công cassette mang gen cần chuyển được chuyển sang vector nhận thì phản ứng PCR sẽ tạo ra và sản phẩm khuếch đại có kích thước theo tính toán khoảng 2,9 kb. Kích thước 2,9 kb tương ứng với sự cộng dồn kích thước gen *MtOsDREB2A* (825-bp), vùng enhancer Ω và promoter Ubiquitine (xấp xỉ 2 kb) và vùng vị trí nhận biết attB1 và kích thước mỗi xuôi. Kết quả

điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (hình 3A) cho thấy với 11 khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường LB bổ sung kanamycin có 5 khuẩn lạc (số 3, 4, 5 8 và 10) cho kết quả dương tính. Khuẩn lạc số 8 cho kết quả khuếch đại tốt nhất được chúng tôi lựa chọn để nuôi cấy tách plasmid để biến nạp vào *A. tumefaciens* EHA105 sử dụng phương pháp xung điện. Sự tồn tại của vector chuyển gen trong vi khuẩn *Agrobacterium* được khẳng định thông qua phản ứng PCR với các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường LB có bổ sung kanamycin với cặp mỗi đặc hiệu cho gen *MtOsDREB2A*. Kết quả trên hình 3B cho thấy với 10 khuẩn lạc chúng tôi thu được 3 khuẩn lạc (số 1, 9 và 10) cho kết quả dương tính với sản phẩm khuếch đại rõ nét có kích thước xấp xỉ 825-bp. Khuẩn lạc số 10 được lựa chọn để làm nguyên liệu cho thí nghiệm chuyển gen thực vật.

Chuyển gen *MtOsDREB2A* vào lúa Chành trĩ:



Hình 4. Kết quả chuyển gen *MtOsDREB2A* vào giống lúa Chành trĩ

A. Callus lúa trên môi trường MS bổ sung 2,4D; **B.** Callus lúa trên môi trường đồng nuôi cấy; **C.** Callus lúa trên môi trường chọn lọc. **D.** Tái sinh callus lúa; **E.** Lúa chuyển gen sau 3 tháng; **F.** Kết quả kiểm tra sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* trong cây lúa chuyển gen: M- ADN chuẩn 1kb (Invitrogen); Giếng 1 đối chứng dương, giếng 2 đối chứng âm; giếng 12, 15 và 20 cho kết quả âm tính, các giếng còn lại tương ứng với các cây mang gen *MtOsDREB2A* trong hệ gen.

Để nghiên cứu biểu hiện của gen *MtOsDREB2A*, chúng tôi tiến hành chuyển gen

MtOsDREB2A vào giống lúa Chành trĩ thông qua *Agrobacterium* EHA105. Toàn bộ quá trình

hình thành callus, lây nhiễm và tái sinh cây được tiến hành theo các phương pháp đã được tối ưu bởi Nishimura [5]. Từ 100 hạt lúa giống Chành trĩu được vào nuôi cấy, chúng tôi thu được 91 callus sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l 2,4D. Sau 15 ngày trên môi trường chọn lọc MS-S, có 30 callus còn sống sót và sau khoảng 3 - 4 tuần trên môi trường tái sinh MS-R chúng tôi thu được 25 dòng lúa có chồi sinh trưởng bình thường trên môi trường chứa hygromycin. Như vậy, hiệu suất chuyển gen của giống lúa Chành trĩu là 25%. Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh, các cây lúa non phát triển tốt được chuyển sang môi trường ra rễ (hình 4A, B, C và D). Sau 10 ngày, cây được chuyển sang các cốc đất và nuôi trong điều kiện phòng nuôi cấy có phủ nilon trong 2 tuần. Cuối cùng cây được chuyển tiếp sang các xô to và được trồng ở điều kiện bên ngoài môi trường (hình 4E).

Các cây lúa chuyển gen sau đó được kiểm tra sự tồn tại của gen *MtOsDREB2A* trong genome bằng phản ứng PCR với cặp mồi Ub-F và Nos-TR. Kích thước theo tính toán của sản phẩm khuếch đại xấp xỉ 1,2 kb tương ứng với kích thước gen 825-bp, vùng enhancer 100-bp và vùng Nos-T phía phải 200-bp. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại trên gel agarose 1% cho thấy với 21 dòng lúa chuyển gen sinh trưởng tốt ở môi trường ngoài có ít nhất 16 dòng lúa cho kết quả dương tính, với các băng điện di có kích thước xấp xỉ 1,2 kb (hình 4F). Các cây này sau đó được thu hạt nhằm lưu trữ và tiến hành các thí nghiệm tiếp theo ở thế hệ T₁, T₂ như thử nghiệm khả năng chịu hạn, thí nghiệm Southern, Northern hay Western blotting để khẳng định sự tồn tại ổn định của gen trong hệ gen của giống lúa Chành trĩu.

III. KẾT LUẬN

Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *OsDREB2A-F/R* đã thiết kế cho phép chúng tôi phân lập được gen *MtOsDREB2A* từ thư viện cADN xử lý hạn của giống lúa Mộc tuyền. Đây là nguồn gen điều khiển chịu hạn từ chính nguồn thực vật của Việt Nam, là cơ sở cho các nghiên cứu gen điều khiển chịu hạn khác trên cây lúa Việt Nam tiếp theo. Kỹ thuật gateway đã giúp rút ngắn thời gian thiết lập vector

chuyển gen trong nghiên cứu của chúng tôi. Việc áp dụng thành công kỹ thuật này cho phép chúng tôi có thể mở rộng và tiến hành đồng thời các thí nghiệm chuyển gen khác nhau vào cây lúa. Quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens* của nhóm tác giả Nishimura [5] mặc dù được tối ưu trên cây lúa Japonica nhưng vẫn thích hợp với cây lúa Chành trĩu (giống indica) của Việt Nam với hiệu suất chuyển gen đạt tới 25%. Các cây chuyển gen sau đó có khả năng sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà kính cũng như trên ruộng thí nghiệm.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ kinh phí bởi Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp 2007 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Lệ Quyên và cs., 2008: Tạp chí Sinh học, 30(3): 141-147.
2. Bartels D., Sunkars R., 2005: Critical review in plant science, 24: 23-58.
3. Dubouzet J. G. et al., 2003: Plant Journal, 33: 751-763.
4. Liu Q. et al., 1998: Plant Cell, 10: 1391-1406.
5. Nishimura A., Aichi I. and Matsuoka M., 2007: Nature protocols, 1(6): 2796-2802.
6. Qin F., 2007: Plant Journal, 50(1): 54-69.
7. Sakuma Y. et al., 2006a: The Plant Cell, 18: 1292-1309.
8. Sakuma Y., et al., 2006b: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 103: 18822-18827.
9. Seki M. et al., 2001: The Plant Cell, 13: 61-72.
10. Shen Y. G. et al., 2003a: Theor. Appl. Genet., 106: 923-930.
11. Shen Y. G. et al., 2003: Atriplex hortensis. Theor. Appl. Genet., 107: 155-61.
12. Umezawa T., 2006: Current Opinion in Biotechnology, 17: 113-122.
13. Xue G. P., 2003: Plant J., 33: 373-83.
14. Zhang J. Z., Creelman R. A., Zhu J. K., 2004: Plant physiology, 135: 615- 621.

GENETIC ENGINEERING OF GENE ENCODING TRANSCRIPTION FACTOR *MTOSDREB2A* FROM VIETNAMESE RICE VARIETY CHANH TRUI FOR DROUGHT STRESS TOLERANCE

LE QUYEN CAO, TUAN TU TRAN, XUAN HOI PHAM

SUMMARY

DREB1/CBFs and *DREB2s* are transcription factors belonging to the DREBP transcription factor subfamily that specifically interact with a cis-acting element, DRE/CRT, which involved in the expression of many genes responsive to drought, high-salt and cold stresses. Many DREB2 transcription factors, including *DREB2A*, and *DREB2A CA* (*Arabidopsis*), *OsDREB2A* (rice), *ZmDREB2A* (maize)... have been cloned and proved to play an important role in drought and high-salt stress tolerance in plant. In this study, we report the cloning, sequencing analysis and transformation of a *DREB2A* homolog named *MtOsDREB2A* from Moc tuyen rice variety (Vietnamese cultivar rice). Interestingly, *MtOsDREB2A* has an Open Reading Frame of 825-bp that is totally identity to Japonica rice *OsDREB2A* (accession numbers: NM 001048642.1; AF 300971.2; AK 067313.1; AK 121956.1). The ORF of *MtOsDREB2A* was cloned into the expression vector driven by ubiquitin promoter and transferred into a Vietnam highland rice variety, named Chanh trui by the *Agrobacterium*-mediated transfer method. As a result, from 100 Chanh trui seeds for callus formation, 25 lines transgenic rice plants were identified and PCR analysis demonstrates that 16 lines transgenic rice plants have contained the interested gene in genome.

Ngày nhận bài: 12-11-2008