

TÁCH DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN *IbOr* TỪ KHOAI LANG (*IMPOMEA BATATAS* L.) THAM GIA VÀO SỰ TÍCH LŨY CAROTENOID

Hồ Thị Hương, Nguyễn Thùy Ninh, Nguyễn Đức Thành [✉]

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nguyenducthanh_pcg@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 01.11.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2017

TÓM TẮT

Gen *Orange* (*Or*) được biết đến là gen mã hóa cho protein giàu DnaJ Zinc finger domain cysteine. Protein *Or* tham gia vào cấu trúc tăng cường tích lũy carotenoid và giúp cây chống lại điều kiện môi trường bất lợi. Với nỗ lực cải thiện chất lượng dinh dưỡng và khả năng chống lại điều kiện môi trường bất lợi cho cây ngô, trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng gen *IbOr* từ giống khoai lang Hoàng Long và thiết kế hai vector chuyển gen mang gen *IbOr* được điều khiển bởi promoter *Ubiquitin* hoặc *Globulin 1* (*Glo1*). Gen *IbOr* tách dòng có kích thước 942 bp, tương đồng tới 100% so với gen *IbOr* đã công bố trên Ngân hàng Gen có mã số HQ828087.1 và đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen với mã số KX792094.1. Protein suy diễn gồm 313 amino acid có vùng bảo thủ “ngón tay kềm” (Zinc finger) của DnaJ và HSP40. Chúng tôi cũng đã thiết kế được hai vector pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos*. Các vector này được chuyển vào chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58. Chủng *A. tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen được khẳng định qua kiểm tra bằng phản ứng colony PCR và cắt bằng các enzyme giới hạn phù hợp. Những kết quả thu được sẽ cung cấp nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu chuyển gen liên quan đến thể hiện gen *IbOr* và tạo cây ngô chuyển gen giàu carotenoid.

Từ khóa: Carotenoid, Globulin 1, gen *IbOr*, khoai lang Hoàng Long, Ubiquitin, vector chuyển gen

MỞ ĐẦU

Ngô là cây ngũ cốc quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu, nó nuôi sống 1/3 dân số thế giới và là cây lương thực đứng thứ ba sau lúa mì và lúa. Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực đứng thứ hai sau cây lúa. Chất lượng dinh dưỡng trong hầu hết các giống ngô rất thấp vì thiếu lysine, triptophan và hàm lượng tiền vitamin A gồm α -carotene, β -carotene, và β -cryptoxanthin thấp (Kurilich *et al.*, 1999). Để cải thiện chất lượng dinh dưỡng của ngô đã có nhiều cố gắng trong việc tạo giống ngô chất lượng protein cao (Sofi *et al.*, 2009) và gia tăng hàm lượng carotenoid, đặc biệt là các carotenoid tiền vitamin A (Wutzel *et al.*, 2012).

Carotenoid ở thực vật được tổng hợp ở màng các Lạp thể và dự trữ nhiều ở sắc lạp của hoa, quả và rễ (Howitt, Pogson, 2006). Sắc lạp có cơ chế đặc biệt cho dự trữ lượng lớn Carotenoid bằng việc tạo ra các cấu trúc được gọi là cấu trúc Carotenoid-lipoprotein nằm bên trong sắc lạp. Các cấu trúc này còn được

gọi là cấu trúc cô lập Carotenoid. Các cấu trúc cô lập làm nhiệm vụ như chỗ chứa để cô lập các Carotenoid và ngăn cản các sản phẩm cuối cùng của quá trình tổng hợp Carotenoid làm cản trở các khâu tổng hợp Carotenoid ở màng sắc lạp (Al Babili *et al.*, 1999). Gen *Or* được cho là có vai trò điều khiển quá trình phân hóa các Lạp thể không quang hợp thành sắc lạp (chronoplast) để tạo chỗ dự trữ cho Carotenoid.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu cải tiến hàm lượng carotenoid của thực vật bằng cách chuyển gen làm thay đổi thể hiện các gen tham gia vào quá trình tổng hợp carotenoid như: gạo vàng giàu β -carotene (*Oryza sativa*) được tạo ra bằng chuyển gen *phytoene synthase* (*PSY*) và *carotenoid desaturase* (*crtI*) từ *Erwinia uredovora* (Paine *et al.*, 2005). Sự làm câm gen *CHY-b* trong trái cây màu cam cũng làm tăng đáng kể nồng độ β -carotene (Pons *et al.*, 2014). Các gen *CrtB*, *CrtI* và *CrtY* từ vi khuẩn đã được chuyển vào khoai tây và cây khoai tây chuyển gen có củ màu vàng với hàm lượng β -carotene lên tới 47 μ g/g khối lượng khô (Diretto *et al.*, 2007,

2010). Siêu thể hiện gen *CrtI* dưới sự điều khiển của CaMV 35S promoter đã gia tăng đáng kể β -carotene và xanthophyll. Cây ngô chuyển gen *CrtB* và *CrtI* dưới sự điều khiển của promoter γ -zein cho hàm lượng Carotenoid đã tăng 34 lần so với cây ngô không chuyển gen (Romer *et al.*, 2000).

Áp dụng công nghệ gen dựa trên các gen mã hóa cho các enzyme tham gia vào các quá trình tổng hợp cũng như các quá trình trước và sau tổng hợp là rất khó khăn. Một cách tiếp cận mới và hiệu quả là tăng cường các chất trao đổi chất bằng cách tăng cơ quan dự trữ trong thực vật. Gen *Orange (Or)* không tham gia vào con đường tổng hợp carotenoid đã được tách từ cây súp lơ đột biến màu vàng cam (*Brassica oleracea* var. botrytis). Gen này mã hóa protein giàu DnaJ cysteine có vai trò làm tăng tích lũy β -carotene ở các mô khác nhau (Lu *et al.*, 2006). Gen *Or* từ cây súp-lơ đã được chuyển vào khoai tây (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) và kết quả cho thấy gen *Or* không chỉ duy trì mức độ β -carotene mà còn thúc đẩy dự trữ β -carotene tới 5 tháng trong điều kiện bảo quản lạnh (Li *et al.*, 2012, Lopez *et al.*, 2008). Sự biểu hiện cao gen *Or* tách từ *Arabidopsis (AtOr)* làm tăng hàm lượng carotenoid của mô sẹo lúa chuyển gen (Bai *et al.*, 2014). Bên cạnh đó, sự biểu hiện của gen *Or* tách từ khoai lang (*IbOr*) không chỉ làm tăng hàm lượng β -carotene trong mô sẹo chuyển gen mà còn làm tăng đáng kể α -carotene, lutein, β -cryptoxanthin với hàm lượng α -carotene, lutein và carotenoid tổng số cao hơn 10,6 đến 14 lần so với mô khoai lang trắng đồng thời cây chuyển gen *IbOr* còn làm tăng hoạt động chống oxy hóa và khả năng chịu mặn (Kim *et al.*, 2013). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng gen *Orange* từ giống khoai lang Hoàng Long (*IbOr*) và thiết kế vector chuyển gen mang gen *IbOr* dưới sự điều khiển của promoter *Ubiquitin* hoặc *Globulin 1 (Glo1)* với mục đích tạo nguồn vật liệu cho nghiên cứu chuyển gen liên quan đến sự biểu hiện của gen *IbOr* cũng như tạo cây ngô chuyển gen giàu carotenoid.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Giống khoai lang Hoàng Long (*Ipomea batatas* L. cv Hoang Long) được thu ở Bắc Giang. Đây là giống khoai lang đặc sản có thịt củ màu vàng đậm, ngọt bùi và có thể có hàm lượng carotenoid cao. Vector pJET1.2 blunt do hãng Thermo Scientific cung cấp, vector pCambia2300/*Ubiquitin/mir synthetic PDS/Nos*, pJET1.2 blunt/*Glo1* và chủng *A.*

tumefaciens C58 do phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp. Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α do hãng Invitrogen cung cấp. Cặp mồi Ubiquitin-F: 5'-TACTGCAG GTGCAGCGTGACC CG-3', Ubiquitin-R: 5'-TAGGATCCTGCAGAA GTAACACCAAACAA-3' và Glo1-F: 5'-AAGCTTGCACGGTAAGGAGAGTACGG-3', Glo1-R: 5'-CTGCAGGTGATGACCAGTTTCTTC CG-3' do hãng Macrogen (Hàn Quốc) cung cấp.

Cặp mồi đặc hiệu nhân đoạn gen *IbOr* bằng PCR do chúng tôi thiết kế bằng phần mềm primer 3 (NCBI) và dựa trên thông tin về gen *IbOr* trên Ngân hàng Gen (GenBank) có mã số HQ828087.1 có trình tự mồi xuôi: IbOr-F: 5' GCGGATCCATGGTATA TTCAGGTAGAATC 3' với điểm cắt enzyme *Bam*HI và mồi ngược IbOr-R: 5'-GCGAGCTCTT AATCAAATGGGTCAATTC 3' với điểm cắt *Sac*I và được hãng Macrogen (Hàn Quốc) cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Tách dòng gen *IbOr*

Mẫu khoai lang Hoàng Long được khử trùng bằng dung dịch 0,1% HgCl₂ và đưa vào nuôi cấy *in vitro*. Thân cây khoai lang nuôi cấy *in vitro* được sử dụng để tách gen *IbOr*. Thân được nghiền bằng Nito lỏng và RNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp sử dụng Trizol Reagents (Invitrogen, Mỹ). Sản phẩm RNA thu được được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp cDNA bằng phản ứng RT-PCR với bộ kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) và cặp mồi đặc hiệu nhân gen *IbOr* theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm phản ứng RT-PCR được tinh sạch bằng GeneJETTM gel extraction Kit (Thermo Scientific) và gắn vào vector tách dòng pJET1.2 blunt bằng enzyme T4-DNA ligase theo phương pháp của (Sambrook *et al.*, 2001). Vector tách dòng pJET1.2 blunt mang gen *IbOr* được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt (Cohen *et al.*, 1972). Dòng vi khuẩn mang gen *IbOr* được chọn lọc bằng phương pháp colony PCR và cắt plasmid bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Sac*I, sản phẩm được điện di trên gel agarose 1% và xác định trình tự đoạn gen thu được bằng phương pháp giải trình tự với cặp mồi pJET1.2 Forward Sequencing Primer, pJET1.2 Reverse Sequencing Primer trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

Thiết kế vector chuyển gen mang gen *IbOr*

Vector pCambia2300/*Ubiquitin- mir synthetic*

PDS/Nos được sử dụng cho thiết kế vector chuyển gen cùng với gen *IbOr*. Để làm việc này, pCambia2300/*Ubiquitin- mir synthetic PDS/Nos* và *pJET1.2/IbOr* cùng được cắt bởi enzyme giới hạn *Bam*HI và *Sac*I. Sản phẩm cắt được tinh sạch và nối với nhau nhờ enzyme T4-DNA ligase để tạo vector tái tổ hợp pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos*. Sau đó, vector tái tổ hợp này được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh chọn lọc Kanamycin 50 μ g/ml. Các dòng vi khuẩn mọc lên được kiểm tra sự có mặt của gen *IbOr* bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony PCR) với cặp mồi đặc hiệu cho gen *IbOr* (mồi ngược và mồi xuôi - *IbOr*-R/F) và bằng phản ứng cắt plasmid với cặp enzyme giới hạn *Bam*HI và *Sac*I.

Để kiểm tra sự biểu hiện khác nhau của promoter *Ubiquitin* (thể hiện ở cây ngũ cốc) và promoter *Globulin 1* (thể hiện ở hạt) đối với gen *IbOr*. Vector pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và *pJET1.2 blunt/Glo1* được cắt bằng enzyme giới hạn *Hind*III và *Bam*HI, sản phẩm cắt sau đó được tinh sạch, ghép nối để tạo vector tái tổ hợp pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos* và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α , khuẩn lạc mọc lên được kiểm tra bằng phương pháp colony PCR với cặp mồi đặc hiệu cho *Glo1* (mồi ngược và mồi xuôi- *Glo1*-R/F) và bằng phản ứng cắt plasmid với cặp enzyme giới hạn

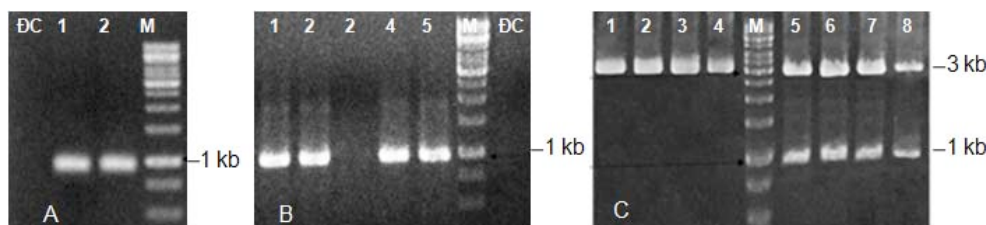
*Hind*III và *Sac*I.

Sau khi kiểm tra hai vector tái tổ hợp pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos* trong *E. coli* DH5 α , các vector này được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* C58 khả biến bằng phương pháp xung điện. *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp sau đó được nuôi trên môi trường LB đặc có kháng sinh Kanamycin 50 μ g/ml và Rifamycin 50 μ g/ml. Các dòng tế bào thu được kiểm tra bằng phản ứng colony PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm colony PCR và sản phẩm cắt plasmid được điện di trên gel agarose 1% và so sánh với thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific) để kiểm tra kích thước.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng gen *IbOr*

RNA tổng số từ giống khoai lang Hoàng Long được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR nhân dòng gen *IbOr* với cặp mồi đặc hiệu *IbOr*-R/F. Kết quả nhân dòng gen *IbOr* được trình bày ở hình 1A cho thấy, sản phẩm RT-PCR cho 1 băng tương ứng với kích thước gen *IbOr* là khoảng gần 1 kb (giếng 1 và 2), hai băng 1 và 2 đều gọn, đẹp, không lẫn băng, vạch lạ. Mẫu đối chứng (nước cất) không lên băng. Như vậy, có thể kết luận bước đầu rằng gen *IbOr* đã được nhân bản thành công.



Hình 1. A: Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen *IbOr*. DC: đối chứng âm (nước cất); giếng 1, 2: sản phẩm phản ứng RT-PCR với RNA tổng số; M: Marker 1kb (Thermo Scientific); B: sản phẩm colony PCR. Giếng 1 – 5: các dòng khuẩn lạc, DC: đối chứng âm (*E. coli* DH5 α); C: sản phẩm cắt vector pJET1.2 blunt/*IbOr*. Giếng 1-4: Plasmid của các dòng khuẩn lạc, giếng 5-8: các plasmid được cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI, *Sac*I, M: marker DNA 1kb (Thermo Scientific).

Vector pJET1.2 blunt được lựa chọn làm vector tách dòng. Đây là vector mở vòng đầu bằng và chứa gen kháng kháng sinh Ampicillin giúp cho việc chọn lọc khuẩn lạc sau này. Gen *IbOr* sau khi phân lập được gắn vào vector pJET1.2 blunt nhờ T4-DNA ligase và biến nạp vào *E. coli* DH5 α .

Hình 1B và 1C là kết quả kiểm tra 5 khuẩn lạc trong đó có 4 khuẩn lạc mang gen có kích thước đúng với kích thước của gen *IbOr* theo lý thuyết.

Mẫu đối chứng không lên băng. Sau khi kiểm tra bằng phản ứng colony PCR, 4 khuẩn lạc này được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicillin 100 μ g/ml. Plasmid tách chiết từ các khuẩn lạc này được cắt bằng *Bam*HI, *Sac*I (hình 1C), kết quả cho thấy có 2 băng: 1 băng tương ứng với kích thước của vector tách dòng pJET1.2 blunt gần 3 kb và 1 băng gần 1 kb tương ứng với gen *IbOr*. Kết quả này chứng tỏ vector tách dòng pJET1.2 blunt đã được gắn thêm gen *IbOr*.

Chọn 1 trong 4 khuẩn lạc mang vector pJET1.2 blunt/*IbOr* giải trình tự với cặp môi pJET1.2 Forward Sequencing Primer và pJET1.2 Reverse Sequencing Primer. Kết quả giải trình tự đoạn gen *IbOr* từ dòng khoai lang Hoàng Long cho kích thước 942 bp. Kết quả so sánh trình tự cho thấy số lượng nucleotide được so sánh và mức tương đồng nucleotide với gen *IbOr* có mã số HQ828087.1 trên GenBank tương ứng là 99% (928/942 nucleotide) và 100%. Protein suy diễn gồm 313 amino acid. Khi so sánh trình tự amino acid của gen *IbOr* tách dòng và HQ828987.1 bằng phần mềm BLAST (NCBI) cho kết quả chỉ có ba vị trí thay đổi nucleotide dẫn đến thay đổi amino acid (hình 2, bảng 1).

Kết quả tìm vùng bảo thủ (CD search, NCBI) cho thấy *IbOr* protein suy diễn của gen tách dòng có vùng bảo thủ “ngón tay kẽm” (Zinc finger) của DnaJ và HSP40. Kết quả dự đoán vị trí khu chủ của protein bằng phần mềm ProtComp v. 9.0 (Predict the sub-cellular localization for plant proteins, Softberry, Inc., USA) cho thấy protein này là protein ngoại bào, khu chủ ở tế bào chất. Cũng như các protein Or khác, vai trò của *IbOr* protein được cho là liên quan đến sự

tích lũy carotenoid ở một số cây trồng bởi vì khi thể hiện gen *Or* trong mô hoặc cây chuyển gen thì hàm lượng carotenoid được tăng lên đáng kể (Kim *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2014, Park *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2015).

Từ những kết quả trình bày ở trên chúng tôi kết luận rằng đã tách dòng thành công gen *IbOr* từ giống khoai lang Hoàng Long. Gen tách dòng đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen (GenBank) với mã số KX792094.1.

Thiết kế vector chuyển gen pCambia2300/*IbOr* điều khiển bởi promoter *Ubiquitin (Ubi)*

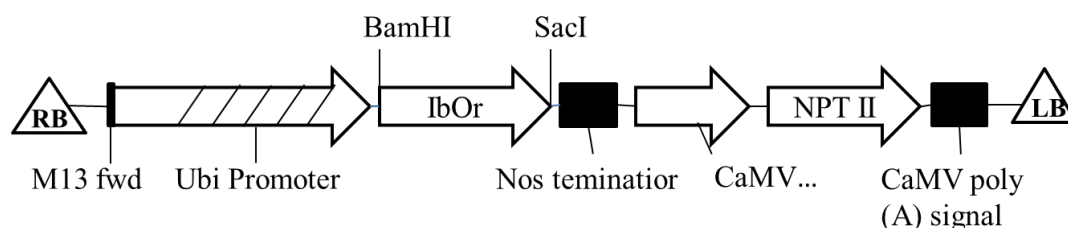
Gen *IbOr* tách từ giống khoai lang Hoàng Long được chèn vào vector pCambia2300/*Ubiquitin-mir synthetic PDS/Nos* có sẵn promoter *Ubiquitin (Ubiquitin)* là một promoter được dùng để biểu hiện gen ở nhiều bộ phận khác nhau của cây) và gen kháng kháng sinh Kanamycin dùng cho chọn lọc các dòng khuẩn lạc. Khi chuyển gen *IbOr* vào vector pCambia2300 có sẵn promoter *Ubiquitin* sẽ có cấu trúc vector chuyển gen như hình 3.

IbOr	1	MVYSGRILSLSSSTTPFHLSTSPFHSSRYHLHGRLKSRVRLRPMADADSSSFSSSV	60
		MVYSGRILSLSSSTTPFHLSTSPFHSSRYHLHGRLKSRVRLRPMADADSSSFSSSV	
IbOrange	1	MVYSGRILSLSSSTTPFHLSTSPFHSSRYHLHGRLKSRVRLRPMADADSSSFSSSV	60
IbOr	61	SPDKNAAGFCIEGPE TVQDFAQME LKEIQDNIRSRNKIFLHMEEVRRRLRIQQRIKNAE	120
		+PDKNAAGFCIEGPE TVQDFAQME LKEIQDNIRSRNKIFLHMEEVRRRLRIQQRIKNAE	
IbOrange	61	APDKNAAGFCIEGPE TVQDFAQME LKEIQDNIRSRNKIFLHMEEVRRRLRIQQRIKNAE	120
IbOr	121	LGILNEKQENELPNFP SFIPFLPPLTSANLKQYYATCFSLIAGVMLFGGLLAPTLELKL	180
		LG LNEKQEN+LPNFP SFIPFLPPLTSANLKQYYATCFSLIAGVMLFGGLLAPTLELKL	
IbOrange	121	LGNLNEKQENKLPNFP SFIPFLPPLTSANLKQYYATCFSLIAGVMLFGGLLAPTLELKL	180
IbOr	181	LGGETSYADFIRSMHLPMQLSDVDPIVASFSGGAVGVI SALMVVEINNVKQQEHRCKYCL	240
		LGGETSYADFIRSMHLPMQLSDVDPIVASFSGGAVGVI SALMVVEINNVKQQEHRCKYCL	
IbOrange	181	LGGETSYADFIRSMHLPMQLSDVDPIVASFSGGAVGVI SALMVVEINNVKQQEHRCKYCL	240
IbOr	241	GTGYLACARCSSTGSLVLI EPVSTVNRGDQPLSPPKTERCTNCSGSGKVMCPTCLCTGMA	300
		GTGYLACARCSSTGSLVLI EPVSTVNRGDQPLSPPKTERCTNCSGSGKVMCPTCLCTGMA	
IbOrange	241	GTGYLACARCSSTGSLVLI EPVSTVNRGDQPLSPPKTERCTNCSGSGKVMCPTCLCTGMA	300
IbOr	301	MASEHDPRIDPFD	313
		MASEHDPRIDPFD	
IbOrange	301	MASEHDPRIDPFD	313

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự amino acid của gen *IbOr* tách dòng và gen *IbOr* có mã số HQ828087.1 trên GenBank (*IbOrange*).

Bảng 1. Vị trí sai khác trong trình tự amino acid của gen *IbOr* tách dòng và gen *IbOrange* mã số HQ828087.1.

STT	Vị trí thay đổi nucleotide	Nucleotide trên gen <i>IbOr</i> tách dòng	Nucleotide trên gen <i>IbOrange</i>	Amino acid của gen <i>IbOr</i> tách dòng	Amino acid của gen <i>IbOrange</i>
1	181	T	G	S (Serine)	A (Alanine)
2	368	T	A	I (Isoleucine)	N (Asparagine)
3	391	G	A	E (Glutamic acid)	K (Lysine)



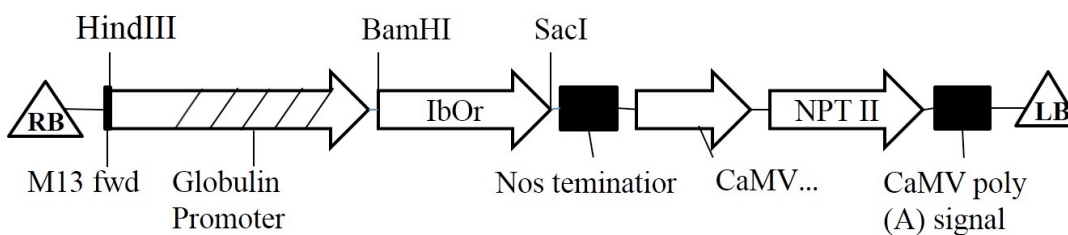
Hình 3. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCambia2300/Ubiqutin-IbOr-Nos.

Vector chuyển gen pCambia2300/Ubiqutin/*IbOr*/Nos sau đó được chuyển vào chủng *E. coli* DH5 α . Kết quả kiểm tra bằng phản ứng colony PCR với cặp mồi đặc hiệu *IbOr*-R/F với 4 khuẩn lạc mọc trên môi trường có kháng sinh Kanamycin cho kết quả dương tính và đều cho 1 băng có kích thước khoảng gần 1 kb phù hợp với kích thước của gen *IbOr*. Khi plasmid của các khuẩn lạc này được cắt bằng *Bam*HI và *Sac*I cho 2 băng: 1 băng tương ứng với kích thước của vector pCambia2300 là khoảng 10 kb và 1 băng gần 1 kb tương ứng với gen *IbOr*. Như vậy, từ kết quả kiểm tra bằng colony PCR và

bằng cắt enzyme giới hạn, chúng tôi kết luận rằng vector chuyển gen pCambia2300/Ubiqutin/*IbOr*/Nos đã được thiết kế và chuyển thành công vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α .

Thiết kế vector chuyển gen pCambia2300/*IbOr* điều khiển bởi promoter *Globulin 1 (Glo1)*

Globulin 1 (Glo1) là một promoter đặc hiệu ở hạt được tách từ dòng ngô CML161 và được chèn vào vector pCambia2300/Ubiqutin/*IbOr*/Nos bằng cách thay *Ubiqutin* bằng promoter *Glo1* với mục đích cho việc thể hiện gen ở hạt (Hình 4).



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCambia2300/*Glo1*/*IbOr*/Nos.

Vector pCambia2300/Ubiqutin/*IbOr*/Nos và pJET1.2 blunt/*Glo1* cùng được cắt bằng *Hind*III và *Bam*HI sau đó *Glo1* được gắn vào vector pCambia2300/.../*IbOr*/Nos nhờ enzyme T4 DNA ligase để tạo vector chuyển gen pCambia230/*Glo1*/*IbOr*/Nos. Vector pCambia230/

Glo1/*IbOr*/Nos được chuyển vào chủng *E. coli* DH5 α . Kết quả được kiểm tra bằng phản ứng colony PCR với cặp mồi đặc hiệu *Glo1*- R/F và cắt bằng enzyme giới hạn *Hind*III và *Sac*I để kiểm tra cả hai gen *Glo1* và *IbOr* trong vector chuyển gen.

Kết quả phản ứng colony PCR với cặp mồi Glo1- R/F cho kết quả dương tính với kích thước gần 1 kb tương ứng với gen *Glo1* và khi cắt plasmid bằng enzyme giới hạn *HindIII* và *SacI* cho 1 băng gần 2 kb tương ứng với tổng kích thước của promoter *Glo1* và gen *IbOr*. Như vậy có thể kết luận rằng vector pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos* đã được thiết kế thành công.

Tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen

Các vector chuyển gen pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos* được biến nạp vào *A. tumefaciens* C58 bằng phương pháp xung điện ở điện thế 2,38 kv. Sản phẩm của quá trình biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh Rifamycin 50 µg/ml + Kanamycin 50 µg/ml, các dòng khuẩn lạc được kiểm tra bằng phản ứng colony PCR với các cặp mồi đặc hiệu *IbOr*-R/F, *Ubiquitin*-R/F và *Glo1*-R/F. Kết quả nhận được cho thấy đã có 3 khuẩn lạc cho kết quả dương tính với 2 cặp mồi *IbOr*-R/F và *Ubiquitin*-R/F với kích thước 1 kb tương ứng với gen *IbOr* và 2 kb tương ứng với gen *Ubiquitin*. Và 2 khuẩn lạc dương tính với cặp mồi *IbOr*-R/F và *Glo1*-R/F với kích thước tương ứng là 1 kb. Kết quả này chứng tỏ các dòng khuẩn *A. tumefaciens* C58 được biến nạp đã mang vector chuyển gen pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos*. Những dòng *A. tumefaciens* này đã được lưu trữ trong glycerol ở -80°C để phục vụ cho chuyển gen liên quan đến thể hiện gen *IbOr* và tạo cây ngô chuyển gen giàu carotenoid.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng thành công gen *IbOr* từ giống khoai lang Hoàng Long và đã thiết kế thành công hai vector chuyển gen là pCambia2300/*Ubiquitin/IbOr/Nos* và pCambia2300/*Glo1/IbOr/Nos*. Các vector chuyển gen đã được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 cho mục đích chuyển gen trong tương lai. Những kết quả thu được sẽ cung cấp nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu chuyển gen liên quan đến thể hiện gen *IbOr* và tạo cây ngô chuyển gen giàu carotenoid.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ của đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu tạo cây ngô chuyển gen giàu Carotenoid” Mã số: VAST02.03/16-17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al Babili S, Hartung W, Kleinig H, Beyer P (1999) CPTA modulates levels of carotenogenic proteins and their mRNAs and affects carotenoid and ABA content as well as chromoplast structure in *Narcissus pseudonarcissus* flowers. *Plant Biol* 1: 607- 612
- Bai C, Rivera SM, Medina V, Alves R, Vilaprinco E, Sorribas A, Canela R, Capell T, Sandmann G, Christou P, Zhu C (2014) An *in vitro* system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation. *Plant J* 77: 464-475
- Cohen SN, Chang AC, Hersu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2110-2114
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007) Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLOS ONE* 2:e350
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R (2010) Transcriptional-metabolic networks in β -carotene-enriched potato tubers: the long and winding road to the golden phenotype. *Plant Physiol* 154: 899-912
- Howitt CA, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 29: 435-445
- Kim SH, Ahn YO, Ahn MJ, Jeong JC, Lee HS, Kwak SS (2013) Cloning and characterization of an *Orange* gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweet potato cultures. *Plant Physiol Biochemist* 70: 445-454
- Kurilich AC, Juvik JA (1999) Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J Agric Food Chem* 47:1948-55
- Li L, Yang Y, Xu Q, Owsiany K, Welsch R, Chitchumroonchokchai C, Lu S, Van Eck J, Deng XX, Failla M, Thannhauser TW (2012) The *Or* gene enhances carotenoid accumulation and stability during post-harvest storage of potato tubers. *Mol Plant* 5(2): 339-352
- Lopez AB, Van Eck J, Conlin BJ, Paolillo DJ, O'Neill J, Li L (2008) Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tuber. *J Exp Bot* 59: 213-223
- Lu S, Eck Van J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Kupper H, Earle ED, Cao J, Li L (2006) The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *Plant Cell* 18: 3594-3605
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy

- MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* 23: 482-487
- Park SC, Kim SH, Park S, Lee HU, Lee JS, Park WS, Ahn MJ, Kim YH, Jeong JC, Lee HS, Kwak SS (2015) Enhanced accumulation of carotenoids in sweetpotato plants overexpressing *IbOr-Ins* gene in purple-fleshed sweetpotato cultivar. *Plant Physiol Biochem* 86: 82-90
- Pons E, Alquézar B, Rodríguez A, Martorell P, Genovés S, Ramón D, Rodrigo MJ, Zacarías L, Pena L (2014) Metabolic engineering of β -carotene in orange fruit increases its in vivo antioxidant properties. *Plant Biotechnol* 12: 17-27
- Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* 18: 666-669
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sofi PA, Wani SA, Rather AG and Wani SH (2009) Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *J Plant Breed Crop Sci* 1(6): 244-253
- Wang Z, Ke Q, Kim MD, Kim SH, Chang, Ji CY, Jeong JC, Lee HS, Park WS, Ahn MJ, Li H, Deng BXX, Lee SH, Lim YP, Kwak SS (2015) Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato Orange gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance. *PLoS ONE* doi.org/10.1371/journal.pone.0126050
- Wurtzel TE, Cuttriss A, Vallabhaneni R (2012) Maize provitamin A carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Frontiers Plant Sci* 3: 1-12.

CLONING AND CONSTRUCTING TRANSFORMATION VECTOR CARRYING *IbOr* FROM THE SWEETPOTATO (*IMPOMEA BATATAS L.*) INVOLVED IN ACCUMULATION OF CAROTENOIDS

Ho Thi Huong, Nguyen Thuy Ninh, Nguyen Duc Thanh

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The *Orange* gene (*Or gene*) is known as a gene encoding the protein containing a cysteine-rich Zinc finger domain. The *Or* protein is an important component of the structure that involves in accumulation of carotenoids and enhancing the resistant ability of plant to environmental stresses. In an attempt to improve the nutritional quality and resistance to adverse environmental conditions of maize, in this article, we present the results on cloning *IbOr* gene from the sweetpotato cultivar Hoang Long and constructing transformation vectors carrying cloned *IbOr* gene under control of Ubiquitin (*Ubi*) or Globulin 1 (*Glo1*) promoter. The cloned *IbOr* gene was 942 bp in size and had similarity level of 100% comparing to the *IbOr* gene that was deposited in GenBank with Accession number HQ828087.1. The *IbOr* gene from sweetpotato Hoang Long was registered in GenBank under Accession number KX792094.1. The deduced protein consisted of 313 amino acids having Zinc finger domain of DnaJ and HSP40 proteins. We have also constructed two transformation vectors *pCambia2300/Ubiquitin/IbOr/Nos* and *pCambia2300/Glo1/IbOr/Nos*. These vectors were transformed successfully into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. The presence of the target gene (*IbOr*) and promoter (*Ubi* or *Glo1*) in the *A. tumefaciens* strains were confirmed by colony-PCR amplification with respective specific primer pairs and digested by suitable restriction enzymes. These vectors will provide important materials for further gene transfer research for the expression of *IbOr* gene and production of transgenic maize with ability to accumulate high carotenoids.

Keywords: Carotenoids, Globulin1, *IbOr* gene, transformation vector, sweetpotato Hoang Long, Ubiquitin