

XÁC ĐỊNH PROMOTOR BIỂU HIỆN GEN *dhs-21* MÃ HOÁ DICARBONYL/L-XYLULOSE REDUCTASE TRONG *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Lê Thọ Sơn^{1,2,✉}, Joohong Ahnn², Jeong Hoon Cho³, Nguyễn Huy Hoàng⁴

¹Viện Công nghệ sinh học lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp, Việt Nam

²Trường Khoa học tự nhiên, Đại học Hanyang, Seoul 133-791, Hàn Quốc

³Trường Sư phạm, Đại học Chosun, Gwangju 500-712, Hàn Quốc

⁴Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: sonacademiasinica@gmail.com

Ngày nhận bài: 12.9.2014

Ngày nhận đăng: 20.4.2017

TÓM TẮT

Dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR) là một enzyme thuộc nhóm dehydrogenase và thực hiện chuyển hoá L-xylulose thành xylitol với sự tham gia của cofactor NADH hoặc NADPH *in vitro*. Enzyme này có mặt ở nhiều loài sinh vật thuộc vi khuẩn, nấm và động thực vật. Những nghiên cứu liên quan trước đã công bố nhiều kết quả về cấu trúc, tính chất và hoá sinh của enzyme nhưng chức năng sinh học của nó vẫn còn là bí ẩn và khó thực hiện trên động vật mô hình chuột hay tế bào người vì có nhiều gen đồng dạng DCXR. Rất may mắn, trong nghiên cứu trước chúng tôi đã khẳng định rằng trong hệ gen tuyến trùng (giun tròn) mô hình *Caenorhabditis elegans* tự nhiên chỉ có một gen mã hóa DCXR đó là dehydrogenase-21 (*dhs-21*). Vì vậy, *Ce.dhs-21* và *C. elegans* là mô hình thuận lợi cho nghiên cứu biểu hiện và chức năng sinh lý của nhóm enzym DCXR. Nghiên cứu này xác nhận sự biểu hiện của gen *dhs-21* ở mức *in vivo*. Chúng tôi đã xác định và thực hiện chuyển ba trình tự promoter và gen *dhs-21* vào vector tái tổ hợp gắn Green Fluorescent Protein (GFP). Những vector tái tổ hợp đó được chuyển vào trong giun lưỡng tính *dhs-21(jh129)* và *C. elegans* N2 bằng kỹ thuật chuyển gen vi tiêm (microinjection). Kết quả cho thấy promoter p2 điều hoà biểu hiện của gen *dhs-21* ổn định và giống với tiêu bản immunogold Electric Microscopy (EM). *dhs-21* biểu hiện trong giun lưỡng tính và giun đực từ giai đoạn phôi thai cho tới khi giun chết. DHS-21 xuất hiện ở trong tế bào chất của tế bào ruột, tế bào biểu mô ống sinh dục (gonad sheath cells), tế bào utse (uterin seam cell).

Từ khoá: Biểu hiện của gen *dhs-21*, *Caenorhabditis elegans*, chuyển gen bằng kỹ thuật vi tiêm (microinjection), dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR), green fluorescent protein (GFP), promoter, tuyến trùng mô hình.

MỞ ĐẦU

Dicarbonyl/ L-xylulose reductase (DCXR) thuộc nhóm aldo-keto reductase và xuất hiện ở rất nhiều sinh vật bậc thấp cho tới sinh vật bậc cao. Trong nấm men, nó thực hiện chuyển hoá L-xylulose thành xylitol theo cả hai chiều ngược và xuôi. Trong nhóm sinh vật tiến hóa hơn bao gồm động vật, DXCR xúc tác chuyển hoá L-arabinose trong con đường trao đổi chất (oxy hóa khử) oxy-reductive L-arabinose (Fonseca *et al.*, 2007). Trong sinh vật bậc cao, DCXR thực hiện xúc tác phản ứng chuyển hoá đường trong trao đổi đường ví dụ như glucose (Kaneko *et al.*, 1997). Sự thiếu hụt DCXR gây ra hội chứng Pentosuria (nồng độ L-xylulose và/hoặc xylitol cao

và gây ra chẩn đoán nhầm bệnh tiểu đường ở người (Lane, Jenkins, 1985).

Các chất carbonyl thường được tạo ra trong quá trình trao đổi chất và oxy hoá nội bào (Busch *et al.*, 2010). Trong số đó, các phân tử mang nhóm α -dicarbonyl có độ hoạt động cao và có khả năng kết hợp với các thành phần quan trọng trong tế bào để tạo ra những phức hợp bị đường hóa AGE (Advanced glycation end-products). Hàm lượng AGE thường gắn liền với bệnh ở thận và lão hoá sớm. DCXR khử phức chất mang α -dicarbonyl nhất định, các aldehyde và ketone xuất hiện nội tại hoặc xâm nhập vào cơ thể (Nakagawa *et al.*, 2002).

Ngoài ra, DCXR biểu hiện mạnh trong ung thư

ting hoàn vì vậy nó được sử dụng như là một chỉ thị trong chẩn đoán ung thư tinh hoàn ở người (Cho-Vega *et al.*, 2007a). DCXR được xác định biểu hiện trên màng tinh tử do vậy nó được cho là có thể giúp cho tinh trùng dung hợp với trứng (Cho-Vega *et al.*, 2007b).

Mặc dù các nghiên cứu đã xác định DCXR vai trò hoá sinh *in vitro* và dự báo vai trò sinh lý của chúng nhưng chưa có thực nghiệm chứng minh vai trò sinh lý của enzyme này. Chúng tôi tìm thấy gen *dhs-21* đồng dạng duy nhất của DCXR trong hệ gen của sinh vật mô hình *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Brenner, 1973). Có lẽ kết quả nghiên cứu *dhs-21* trong *C. elegans* sẽ là cơ sở tham khảo cho các nghiên cứu DCXR ở các đối tượng khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày phương pháp và kết quả xác định promoter điều hòa sự biểu hiện của gen *dhs-21* trong giun *C. elegans* N2.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các chủng giun được sử dụng bao gồm: *C. elegans* N2 (nhập từ trung tâm giun *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), Hoa Kỳ) (Sơn, 2015) và *dhs-21* (*jh129*) (Sơn *et al.*, 2011). Các chủng vi khuẩn bao gồm *E. coli* OP50 (nhập từ CGC) (May *et al.*, 2009) và DH5 α . Tất cả các hoá chất dùng trong thí nghiệm là Aldrich-Sigma và những enzyme giới hạn của hãng Roche và New England Biolabs (mua từ một số chi nhánh phân phối tại Hàn Quốc). Các vector được sử dụng pPD95_75 và pPD95_77 (tham khảo tại <http://www.addgene.org/kits/firelab/>)

Xác định loại protein

Để dự đoán được *dhs-21* mã hoá protein nào, trình tự amino acid suy luận từ thư viện cDNA được so sánh với ngân hàng trình tự protein (theo dữ liệu trên NCBI và wormbase). Tiếp đến, trình tự amino acid DHS-21 được so sánh với DXCR của người và họ chuột bằng chương trình Clustal X.

Tạo vector biểu hiện *Ex1*, *Ex2* và *Ex3*

Ba trình tự promoter tại đầu 5' của gen *dhs-21* trong genome được phân lập bằng kỹ thuật PCR. Để có DNA tổng số của hệ gen, ba cá thể giun được nhét vào ống PCR có 20 μ l dung dịch phân giải (30 mM Tris pH8, 8 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.7% NP40, 0.7% Tween 20, 100 μ g/ml proteinase K). Ống được ủ lạnh 60 phút ở -86°C trong tủ lạnh hoặc vài phút ở -196°C bằng nitrogen lỏng. Nhiệt độ lạnh làm rạn nứt lớp cutin bên ngoài bao bọc cơ thể giun và phá vỡ các tế bào. Tiếp đến ống mẫu được ủ nhiệt 60°C trong 30 phút; 95°C trong 15 phút; 04°C trong 10 phút bằng máy PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR system 9700). Kết quả DNA được giải phóng khỏi tế bào giun (Ahringer, 2006).

Các primer được thiết kế cho mỗi trình tự promoter với các đầu 5' gắn thêm trình tự cắt *Hind* III và đầu 3' gắn trình tự cắt *Xba*I (Bảng 1). Chu trình nhiệt để khuếch đại mỗi promoter bằng PCR như sau: biến tính DNA ở 95°C trong 03 phút; 20 chu kỳ PCR (biến tính ở 94°C trong 02 phút; gắn mồi ở 70°C trong 30 giây; phản ứng kéo dài sản phẩm ở 72°C từ trong 03 phút); kéo dài sản phẩm ở 72°C trong vòng 04 phút; hạ nhiệt phản ứng ở 04°C trong 10 phút.

Bảng 1. Các cặp mồi (primers) được sử dụng. Các mồi được gắn thêm những trình tự nucleotide cắt bởi enzyme giới hạn *Hind*III, *Xba*I, *Pst*I và *Sma*I tương ứng. Trình tự nucleotide được bôi đậm và gạch chân là vị trí cắt của enzyme giới hạn.

Tên mồi	Trình tự (5'>3')	Chiều	Phản ứng PCR
<i>Hind</i> III F1	CCC AAGCTT AGTTGAAGAACATCAG	Xuôi	p1
<i>Hind</i> III F2	CCC AAGCTT GATGAAACGGTTAG	Xuôi	p2
<i>Hind</i> III F3	CCC AAGCTT ACTTGAGAGAGCCAT	Xuôi	p3
<i>Xba</i> I R3	CTAG TCTAGAC ATTGTTTCGTCAGATGATA	Ngược	p1, p2, p3
<i>Pst</i> I IF	AA ACTGCAG GAG ATTAAGAAATG	Xuôi	gen <i>dhs-21</i>
<i>Sma</i> I IR	TT CCCGGG GTTATTCGAAAATC	Ngược	gen <i>dhs-21</i>

Sản phẩm PCR được chuyển vào vector pPD95_75 giữa vị trí *HindIII* và *XbaI*. Khi vector tái tổ hợp hoạt động GFP được tổng hợp. GFP phát ra màu ánh sáng bước sóng xanh 509 nm với đỉnh 540 nm khi hấp thụ sóng huỳnh quang 395 nm với đỉnh 470 nm (Chalfie *et al.*, 1994). Để không làm đột biến và thu được số lượng lớn vector, mỗi vector tái tổ hợp được chuyển vào trong tế bào khả biến DH5 α và nuôi cấy trên môi trường LA (LB broth + agar) có bổ sung 50 ng/ml ampicillin.

Tạo vector Ex4 [p2::*dhs-21*::GFP]

Toàn bộ gen *dhs-21* trong cosmid WRM062cA12 được nhân lên bằng PCR; sản phẩm này có mang trình tự cắt của enzyme *PstI* tại đầu 5' và *SmaI* tại đầu 3'. Gen *dhs-21* được kiểm tra trình tự để đảm bảo không có bất kỳ đột biến trình tự nucleotide nào sau khi gắn vào vector pPD95_77 giữa *PstI* và *SmaI*.

Kỹ thuật chuyển gen vi tiêm

Kỹ thuật vi tiêm được sử dụng để đưa các vector tái tổ hợp vào trong tế bào trứng dung hợp chưa thụ tinh trong buồng trứng giun lưỡng tính *C. elegans* N2 ở giai đoạn ấu trùng L4. Để biết giun có tiếp nhận vector sau khi vi tiêm, vector pRF4 mang *rol-6* đột biến trội gây ra kiểu hình roller được vi tiêm đồng thời. Xuất hiện F1 với kiểu hình roller thì chứng tỏ thí nghiệm chuyển gen vi tiêm thành công (Evans, 2005).

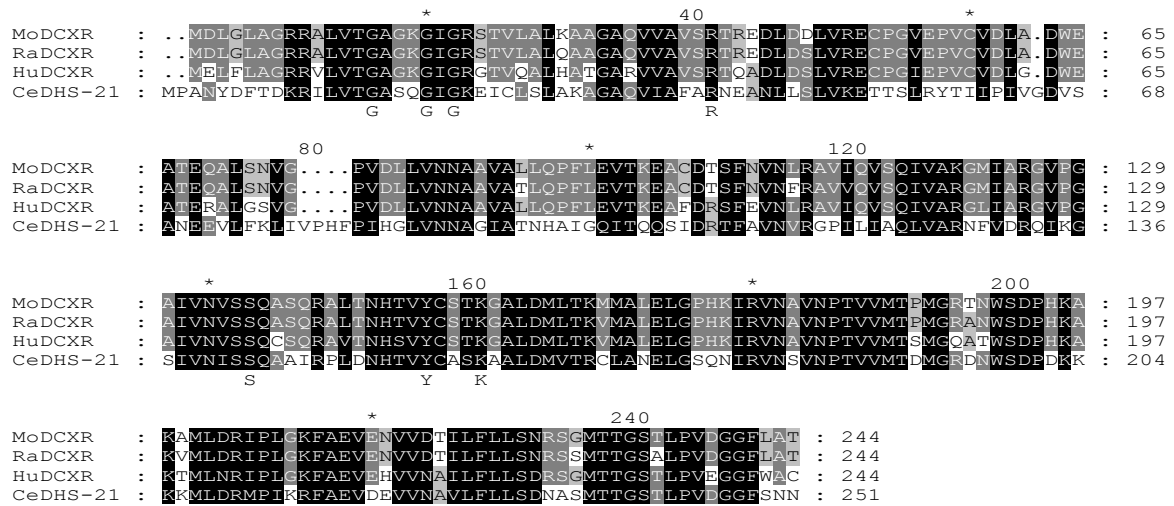
Biểu hiện của gen *dhs-21*

Các dòng giun được nuôi trong đĩa NGM (nematode growth medium) bao gồm: 3 g NaCl, 17 g agar, 2,5 g peptone, 975 ml H₂O, 01 ml 1M CaCl₂, 01 ml 5 mg/ml cholesterol trong ethanol, 01 ml MgSO₄ và 25 ml KPO₄ có nuôi cấy *E. coli* OP50. Giun được đưa lên tiêu bản và chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang (kính soi nổi Zeiss có gắn nguồn tia cực tím (UV)).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

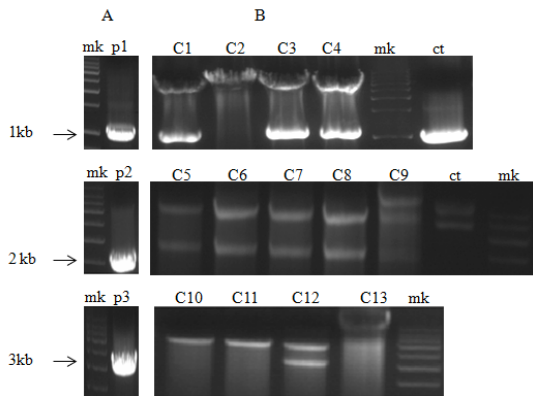
***dhs-21* mã hoá decarbonyl/L-xylulose reductase**

Dựa vào phân tích trình tự cDNA, DHS-21 có 251 amino acid, thuộc dạng dehydrogenase tiêu biểu vì có nhiều đặc điểm tương đồng với dehydrogenase ví dụ hai trình tự tương ứng với G8-XXX-G12-X-G14 đầu N là vị trí liên kết với cofactor (Grimm *et al.*, 2000) và Y155-XXX-K159 và S134 trình tự trong trung tâm phản ứng (Nakagawa *et al.*, 2002). DHS-21 có trình tự amino acid tương đồng với DCXR của chuột (Nakagawa *et al.*, 2002) (chuột nhà: 48% giống tuyệt đối và 67% giống tương đối; chuột Norway (Ishikura *et al.*, 2003) 49%-68%) và DCXR của người (Ishikura *et al.*, 2003) (47%-68%) (Hình 1).



Hình 1. So sánh trình tự amino acid của DHS-21 với DCXR. Mo-mouse (chuột nhà), Ra-rat (chuột Norway), Hu-human (người) và Ce-*C. elegans* và mã DCXR lần lượt là Q91X52, Q920P0, Q7Z4W1 và Q21929. Trình tự GxxxGxG₁₈R gắn kể NADH hoặc NADPH. Trình tự Sx₁YxxxK gắn L-xylulose.

Tạo vector tái tổ hợp *pdhs-21::GFP*

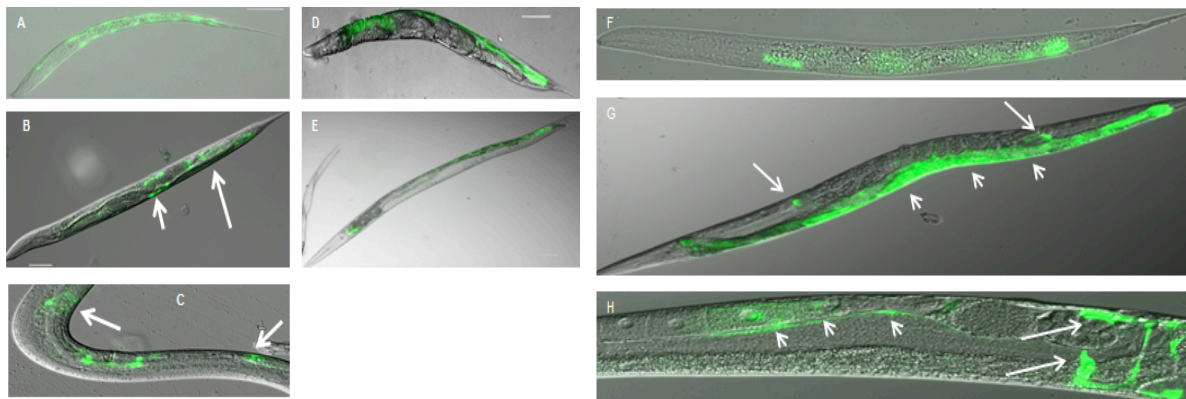


Hình 2. Xác định promoter. Độ lớn của các promoter từ sản phẩm PCR (A). Các dòng vi khuẩn có mang promoter được cắt bằng enzyme giới hạn *Hind* III và *Xba*I (B). C1, C3 và C4; C5, C6, C7, C8 và C9; C12 là những vector *Ex1*; *Ex2*; và *Ex3* mang promoter p1, p2 và p3 tương ứng; mk-thang tiêu chuẩn độ lớn vạch DNA; ct-đối chứng.

Thông thường các promoter điều hòa hoạt động phiên mã các gen mã hoá protein mang từ 12 đến 21 trình tự TATA trong khoảng 2-3 kb và nằm giữa gen quan tâm và gen đứng trước nó hoặc một phần của gen đứng trước nó. Thêm vào đó, phần mềm PROMO được dùng để tham khảo thêm vị trí bám của một số yếu tố phiên mã. Vì vậy, bằng cách phân

đoán từ hệ gen, ba trình tự promoter 1 (1052 bp), 2 (2027 bp) và 3 (2988 bp) (gọi tắt là theo thứ tự p1, p2 và p3) nằm ngay trước nucleotide A của mã khởi đầu trong gen *dhs-21* được chọn.

Ba promoter được khuếch đại từ hệ gen bằng kỹ thuật PCR (Hình 2A), sau đó được cắt bằng enzyme giới hạn và gắn vào vector pPD95_75 có GFP bằng DNA ligase. Từng vector được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α để tạo dòng khác nhau và do vậy có thể tăng lượng lớn vector giống hệt nhau. Kết quả, ba vector tái tổ hợp tương ứng *Ex1*, *Ex2* và *Ex3* đã được thiết kế (Hình 2B). Vì p1, p2 và p3 được phân lập ban đầu bằng kỹ thuật PCR nên có thể mang một đến vài đột biến điểm rải rác trong trình tự nucleotide. Các đột biến nhỏ rải rác được cho rằng ảnh hưởng không đáng kể tới khả năng điều hoà biểu hiện của gen. Thêm nữa, việc tìm một promoter với từ hai đến ba ngàn nucleotide không có bất kỳ đột biến điểm nào sẽ mất nhiều thời gian. Vì vậy những biểu hiện của gen dưới sự điều khiển của promoter có tính tương đối. Tuy nhiên, để biết hơn sự chính xác của biểu hiện của *dhs-21* dưới sự điều khiển promoter (Hình 3), kết quả immunogold EM (electron microscope) cũng được so sánh (Hình 4).



Hình 3. Biểu hiện tương đồng của gen *dhs-21* trong N2 và *dhs-21(jh129)*. *dhs-21* (màu xanh) biểu hiện trong tế bào biểu mô ngoài của ấu trùng L1 (A), utse (mũi tên ngắn) và cơ quan sinh sản (mũi tên dài) (B), cơ quan sinh sản đực (mũi tên) (C), ruột con lưỡng tính (D) và con đực (E). Biểu hiện của *dhs-21* trong ruột ấu trùng L1 (F), ruột (mũi tên ngắn), và cơ quan sinh sản đực (mũi tên dài) ở tuổi trưởng thành (G), cơ quan sinh sản cái (mũi tên ngắn) và utse (mũi tên dài) (H). Thước đo 50 hoặc 100 µm.

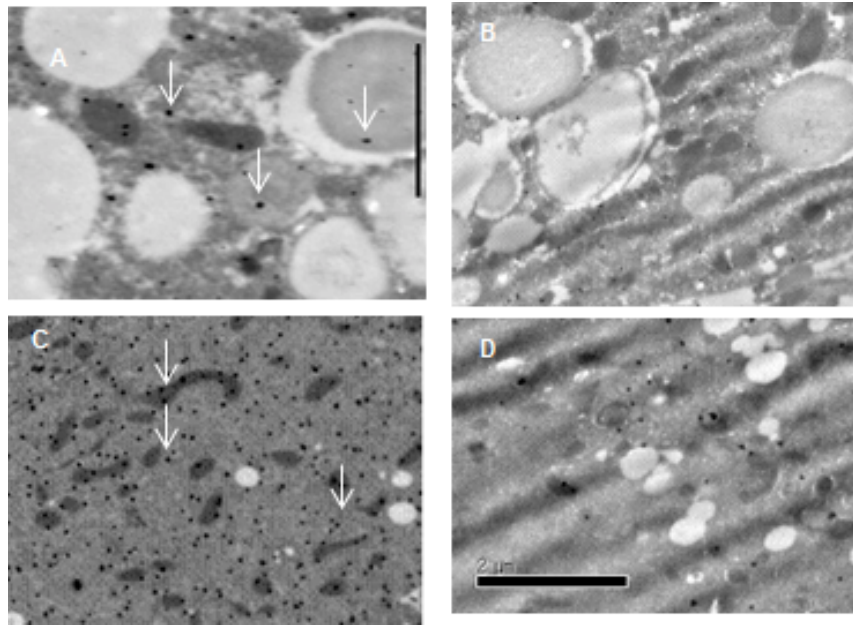
Biểu hiện của gen *dhs-21*

Tổng số 210 cá thể đột biến *dhs-21 (jh129)* được vi tiêm, 60 cá thể được vi tiêm với *Ex1*, 62 con với vector *Ex2* và 108 con với *Ex3*. Sau vi tiêm, một số

cá thể bị chết hoặc không thể sinh con do tổn thương và/hoặc độc tính vì lượng hoặc cấu trúc vector tái tổ hợp. Từ các dòng tái tổ hợp, chúng tôi đã chọn được 02 cá thể F1 có kiểu hình roller mang *Ex1*, 10 con kiểu hình di chuyển cuộn tròn (roller) mang *Ex2* và

03 cá thể kiểu hình roller mang *Ex3* từ thế hệ mẹ P0 được chuyển gen bằng vi tiêm. Tiếp tục theo dõi các thế hệ tiếp theo F2 và F3 bằng chỉ thị GFP dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy các dòng được chuyển *Ex3* biểu hiện GFP rất yếu và mất hoàn toàn ở thế hệ F2, F3 và F4; dòng được chuyển *Ex1* không biểu hiện GFP; ngược lại, 05 dòng mang *Ex2* biểu hiện GFP bền vững. Từ rất nhiều thế hệ, biểu hiện của *dhs-21* được xác định ở trong phân tế bào chất của tế

bào ở ruột và cơ quan sinh sản của cá thể lưỡng tính và đực liên tục trong toàn bộ vòng đời. *dhs-21* còn biểu hiện ở tế bào cơ quan sinh sản đực và utse (uterous seam cell) của con lưỡng tính ở giai đoạn trưởng thành (Hình 3A-E). *dhs-21* được biểu hiện ở các tế bào biểu bì ở giai đoạn ấu trùng L1 và L2. Biểu hiện ổn định này xuất hiện ở cả hai nhóm dòng chuyển gen có nguồn gốc từ *dhs-21* (*jh129*) và dòng tự nhiên N2.



Hình 4. Ảnh immunogold EM được nhuộm bởi kháng thể kháng DHS-21. Ruột của giun lưỡng tính N2 (a) và của dòng đột biến *dhs-21* (*jh129*) (b). Cơ quan sinh sản của N2 (c) và *dhs-21* (*jh129*) (d). Thước đo: 02 μm .

Để biết mô hình biểu hiện của gen, vector *Ex4* [p2::*dhs-21*::GFP] được tạo ra bằng cách gắn gen p2 và gen *dhs-21* vào vector pPD95_77 (có mang gen GFP). Kết quả là mô hình biểu hiện của gen *dhs-21* không khác nhau giữa *Ex4* và *Ex2* khi được chuyển vào giun *dhs-21(jh129)* và N2 (Hình 3F-H). Vì *Ex4* và *Ex2* là các vector ngoại lai nên cần kiểm tra độ tin cậy của biểu hiện *dhs-21*, trong một nghiên cứu khác (không mô tả chi tiết trong nghiên cứu này), chúng tôi đã so sánh với immunogold EM (Son le *et al.*, 2011) và kết quả cho thấy hoàn toàn tương đồng (Hình 4).

Vì p2 có thể điều khiển biểu hiện gen ở tế bào ruột, cơ quan sinh sản và utse, nên p2 có thể được dùng để biểu hiện gen khác với *dhs-21* c trong tế bào của ruột, cơ quan sinh sản và utse. Điều đặc biệt là chưa có công trình công bố nghiên cứu vai trò của utse, một cấu trúc chỉ được tạo từ một tế

bào duy nhất trong số 953 tế bào của cơ thể giun lưỡng tính (Sulston, Horvitz, 1977), vì vậy p2 mở ra một công cụ để nghiên cứu biểu hiện và chức năng của gen chỉ biểu hiện trong tế bào dung hợp utse.

KẾT LUẬN

Có những phương pháp khác nhau xác định biểu hiện của một gen. Phương pháp biểu hiện protein phát huỳnh quang (GFP, RFP và YFP) do promoter nhất định điều khiển cho phép nhìn được vị trí, và thời điểm phát triển mà gen được biểu hiện ở mức độ bào quan. Đây là một trong những tính chất quan trọng và thuận lợi khi sử dụng *C. elegans* làm mô hình khi nghiên cứu di truyền phân tử. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã dự đoán promoter của *dhs-21*, sử dụng enzyme giới hạn để tạo ra vector tái tổ hợp

mang gen *gfp* và promoter đó. Khi promoter hoạt động, GFP được biểu hiện, đó cũng chính là biểu hiện của gen chủ định *dhs-21*.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn sự trợ giúp của Giáo sư Jae-Ran Yu tại trường đại học Koonkuk và Tiến sỹ Gunasekaran Singaravelu tại Viện Nghiên cứu Waksman, Hoa Kỳ vì những đóng góp khác trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahringer J (2006) Reverse genetics., in The C. elegans Research Community, eds. *WormBook*. doi/10.1895/wormbook.1.47.1, <http://www.wormbook.org>
- Brenner S (1973) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94
- Busch M, Franke S, Ruster C, Wolf G (2010) Advanced glycation end-products and the kidney. *ESCI* 40: 742-755
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- Cho-Vega JH, Tsavachidis S, Do KA, Nakagawa J, Medeiros LJ, McDonnell TJ (2007a) Dicarboxyl/L-xylulose reductase: a potential biomarker identified by laser-capture microdissection-micro serial analysis of gene expression of human prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16: 2615-2622
- Cho-Vega JH, Vega F, Schwartz MR, Prieto VG (2007b) Expression of dicarboxyl/L-xylulose reductase (DCXR) in human skin and melanocytic lesions: morphological studies supporting cell adhesion function of DCXR. *J Cutan Pathol* 34: 535-542.
- Evans TC (2005) Transformation and microinjection. In The C. elegans Research Community, eds. *WormBook*. doi/10.1895/wormbook.1.108.1, <http://www.wormbook.org>.
- Fonseca C, Romao R, Rodrigues de Sousa H, Hahn-
- Hagerdal B, Spencer-Martins I (2007) L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS J* 274: 3589-3600
- Grimm C, Maser E, Mobus E, Klebe G, Reuter K, Ficner R (2000) The crystal structure of 3alpha -hydroxysteroid dehydrogenase/carboxyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *J Biol Chem* 275: 41333-41339
- Ishikura S, Isaji T, Usami N, Nakagawa J, El-Kabbani O, Hara A (2003) Identification of amino acid residues involved in substrate recognition of L-xylulose reductase by site-directed mutagenesis. *Chem Bi Interact* 143-144: 543-550
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss M (1997) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. Academic Press, San Diego, CA
- Lane AB, Jenkins T (1985) Human L-xylulose reductase variation: family and population studies. *Ann Hum Genet* 49: 227-235
- May RC, Loman NJ, Haines AS, Pallen MJ, Boehnisch C, Penn CW, Lee CH, Kim J (2009) The genome sequence of *E. coli* OP50. *The WBG* 18: 1
- Nakagawa J, Ishikura S, Asami J, Isaji T, Usami N, Hara A, Sakurai T, Tsuritani K, Oda K, Takahashi M, Yoshimoto M, Otsuka N, Kitamura K (2002) Molecular characterization of mammalian dicarboxyl/L-xylulose reductase and its localization in kidney. *J Biol Chem* 277: 17883-17891
- Son le T, Ko KM, Cho JH, Singaravelu G, Chatterjee I, Choi TW, Song HO, Yu JR, Park BJ, Lee SK, Ahnn J (2011) DHS-21, a dicarboxyl/L-xylulose reductase (DCXR) ortholog, regulates longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 585: 1310-1316
- Son LT (2015) *Caenorhabditis elegans* - động vật mô hình trong nghiên cứu sinh học phân tử. *VJS*.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110-156

PROMOTERS OF THE *dhs-21* GENE ENCODING DICARBONYL/L-XYLULOSE REDUCTASE IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Le Tho Son^{1,2}, Joohong Ahnn², Jeong Hoon Cho³, Nguyen Huy Hoang⁴

¹College of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry, Vietnam

²College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Republic of Korea

³College of Education, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

⁴Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Dicarboxyl/L-xylulose (DCXR) was identified as a dehydrogenase. This type of enzyme was presented in

various forms of lives including bacteria, fungi, plants and animals. Generally, it converts L-xylulose to xylitol in the presence of either cofactor NADH or NADPH *in vitro*. Previous studies reported the biochemistry properties and crystal structure but largely uncovered biological roles of DCXRs. It was impossible to dissect the functions in mice or human cells that had many DCXR homologs in their genomes. Interestingly, the wild-type *Caenorhabditis elegans*, a well-known model organism in biological research, has only nuclear genomic *dhs-21* that encodes a unique homologous DCXR. Thus *Ce.dhs-21* and the host *C. elegans* were relevant for investigation of the physiologically-vital functions of the DCXR. This research aimed to the expression of *dhs-21 in vivo*. We defined three promoters, manipulated three relative reporter-constructs that conjugated the *dhs-21* gene and Green Fluorescent Protein (known as GFP) one. The construct vectors were transferred into wild-type *C. elegans* N2 and as well as the hermaphroditic loss of function *dhs-21(jh129)* by microinjection. In the results, we found that the expression pattern of *dhs-21* under the only p2-promoter construct was stable and similar to immunogold Electric Microscopy (EM) images. The *dhs-21* gene was expressed in both sexes of at all larval stages till the deaths of worms. DHS-21 was expressed in the cytosol of the intestinal, gonad sheath and uterous seam cell (utse).

Keywords: *Caenorhabditis elegans* as a model organism, dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR), expression of *dhs-21* gene, microinjection of genes, Green Fluorescent Protein (GFP), Nematode, Promotor