

BIỂU HIỆN TẠM THỜI GEN MÃ HÓA PROTEIN ZmLEA14A TRÊN CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Hà Hồng Hạnh¹, Lê Thị Thu Hiền^{1,2}, Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2,✉}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hthue@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.4.2019

Ngày nhận đăng: 26.5.2019

TÓM TẮT

Các protein LEA là một họ gồm nhiều protein được tích lũy lượng lớn ở giai đoạn phát triển muộn của phôi hạt và trong các mô tăng trưởng khi cây bị stress. Các protein này được chứng minh có vai trò trong sự hình thành tính chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi ở thực vật như hạn, mặn. Gen mã hóa các protein LEA ở ngô được chia thành 9 nhóm gồm: LEA 1, LEA 2, LEA 3, LEA 4, LEA 5, LEA 6, SMP, Dehydrin và AtM. Việc ứng dụng các gen LEA thông qua kỹ thuật di truyền nhằm cải tiến tính chịu hạn cho thực vật đã và đang được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Trong nghiên cứu này, hai cấu trúc pCAM/35S-ZmLEA14A-35S và pCAM/Ubi-ZmLEA14A-35S mang đoạn gen ZmLEA14A phân lập từ cây ngô Tè vàng 1 của Việt Nam đã được sử dụng để chuyển gen vào lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agro-infiltration. Kết quả kiểm tra lai miễn dịch giữa protein tách chiết từ mẫu lá bị lây nhiễm *A. tumefaciens* chứa các cấu trúc đã thiết kế với kháng thể đặc hiệu cho thấy có sự biểu hiện của protein ZmLEA14A tái tổ hợp trên lá cây thuốc lá *N. benthamiana*. Qua đó cho thấy, hai cấu trúc chứa gen ZmLEA14A đã được thiết kế hoàn chỉnh để hoạt động phiên mã và dịch mã trên cây mô hình và sẵn sàng cho các nghiên cứu chuyển gen ổn định vào thực vật.

Từ khóa: Agro-infiltration, biểu hiện gen, ngô, *Nicotiana benthamiana*, ZmLEA14A

MỞ ĐẦU

Chức năng của các protein LEA trong thực vật được các nhà khoa học quan tâm đến là chức năng bảo vệ thành tế bào. Protein này được phát hiện có nhiều trong hạt và trong các mô tăng trưởng khi cây bị stress do thiếu nước, do mặn, và do lạnh (Grelet *et al.*, 2005, Goyal *et al.*, 2005). Phân tích mức độ biểu hiện của protein LEA và đặc điểm cấu trúc đại phân tử cho thấy vai trò bảo vệ cây chống chịu mất nước của các protein này (Ingram, Bartels, 1996). Theo nghiên cứu của Battaglia năm 2008, các protein LEA được phân thành bảy nhóm khác nhau. Các protein LEA thuộc nhóm 1, 2, 3, 4, 6 và 7 là các protein LEA điển hình có tính ưa nước, có tỷ lệ cysteine và dư lượng tryptophan thấp, tỷ lệ các glycine, axit glutamic, lysine và dư lượng threonine cao. Ngược lại, protein LEA nhóm 5 có hàm lượng kỵ nước cao. Dựa trên các chuỗi axit amin và các motif, protein LEA nhóm 5 được phân thành ba nhóm nhỏ là 5A, 5B và 5C (Battaglia *et al.*, 2008). Các phân nhóm protein LEA 5C được đặc trưng bởi tỷ lệ ưa nước thấp, tỷ lệ dư

lượng không phân cực cao và cấu trúc nhiệt không ổn định (Battaglia *et al.*, 2008; Wolkers *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Hơn nữa, các protein LEA 5C được gấp lại và có nhiều dải β hơn đường xoắn ốc α , khác với nhóm 5A và 5B (Hundertmark *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Những khác biệt về tỷ lệ dư lượng và đặc điểm vật lý của nhóm 5C với các nhóm protein LEA khác liên quan nhiều đến khả năng chịu stress.

Gần đây, do sự phát triển của công nghệ giải trình tự mới, toàn bộ trình tự bộ gen của các loại cây có giá trị như lúa, ngô và bông đã được nghiên cứu (Li *et al.*, 2018; Hirsch *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015). Dựa vào chuỗi protein LEA, các họ protein LEA có thể được xác định và mô tả thông qua các phương pháp dự đoán toàn bộ hệ gen. Trong cây lúa, 34 gen ứng cử viên LEA (OsLEA) đã được xác định thông qua tìm kiếm HMMER (<http://hmmer.janelia.org/>) (Wang *et al.*, 2007). Bằng cách sử dụng phương pháp tương tự 242, 136 và 142 vùng DNA ứng cử viên mã hóa protein LEA đã được xác định trong ba giống bông vùng cao là *Gossypium hirsutum*, *G. arboreum*

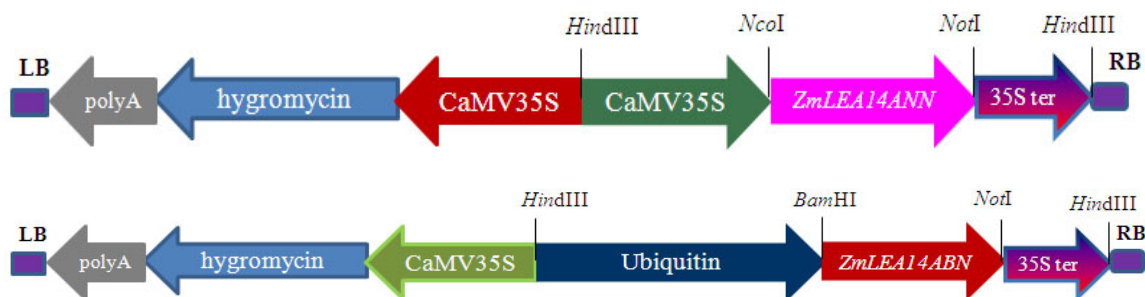
và *G. raimondii* (Magwanga *et al.*, 2018). 83 protein bao gồm 51 thành viên trong *Arabidopsis* và 32 thành viên giả định trong cây ngô đã được phân thành 9 nhóm gồm LEA 1, LEA 2, LEA 3, LEA 4, LEA 5, LEA 6, SMP, Dehydrin, và AtM (Li *et al.*, 2016). Gen và motif cấu tạo của các thành viên LEA có tính bảo thủ cao ở mỗi nhóm, biểu thị chức năng bảo tồn. Nghiên cứu cho thấy rằng gen *ZmLEA* đã được phân phối không đều trên nhiễm sắc thể ngô. Nhiễm sắc thể 8 chứa 7 thành viên LEA, trong khi đó là nhiễm sắc thể 2 và 4 chỉ chứa 1 thành viên. 6, 5 và 4 gen *LEA* được phân phối tương ứng trên nhiễm sắc thể 1, 6 và 3. Tám gen *LEA* còn lại được phân bố trên các nhiễm sắc thể 5, 7, 9 và 10 (Li *et al.*, 2016). Việc sử dụng kỹ thuật di truyền để sử dụng các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn cho thực vật trong điều kiện đồng ruộng cũng đã được nghiên cứu (Grelet *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2007). Ví dụ, gen *HVA1* mã hóa protein LAE nhóm 3 của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) đã chuyển nạp thành công vào cây lúa để tăng cường tính chống chịu khô hạn và mặn trong điều kiện ở nhà lưới (Xu *et al.*, 1996). Các nghiên cứu cho thấy việc sử dụng gen *LEA* trong nghiên cứu chuyển gen nhằm tăng cường tính chịu hạn cho cây sẽ có tiềm năng ứng dụng tốt.

Trong công bố trước của chúng tôi, gen *ZmLEA14A* từ cây ngô Tê vàng 1 của Việt Nam đã được phân lập, tách dòng, qua phân tích trình tự và dự đoán các motif trên vùng gen *ZmLEA14A* cho thấy gen này nằm trong nhóm 5C của họ gen *ZmLEA* ở ngô. Hai cấu trúc vector pCAMBIA1300 mang gen *ZmLEA14A* đã được thiết kế và biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* (Bui Manh Minh *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả chuyển gen *ZmLEA14A* tạm thời vào cây mô hình thuốc lá nhằm kiểm tra sự hoạt động biểu hiện ra protein của gen ở cả 2 cấu trúc đã thiết kế.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu thực vật và chủng vi khuẩn

Cây thuốc lá *N. benthamiana* được lưu trữ tại Viện Nghiên cứu Hệ gen. Các chủng vi khuẩn: *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S và pCAM/Ubi-*ZmLEA14A*-35S đã được thiết kế tại Viện Nghiên cứu Hệ gen. Sơ đồ các cấu trúc được trình bày trên hình 1.



Hình 1. Sơ đồ vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S và pCAM/Ubi-*ZmLEA14A*-35S.

Biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá *N. benthamiana*

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 có chứa Ti plasmid được nuôi cấy trong môi trường YEB chứa kháng sinh Kanamicine (50 mg/l), Rifamicine (50 mg/l) qua đêm ở 28°C. Sau khi ly tâm dịch khuẩn ở 4°C với tốc độ 5000 v/p trong 10 phút, cặn tế bào được hòa tan lại trong đệm chứa 10mM MES và 10mM MgSO₄. Dịch hòa tan được giữ trong đá 20 phút. Sau đó, dịch khuẩn được bơm nhẹ nhàng vào lá cây thuốc lá *N. benthamiana* 4 - 6 tuần tuổi, giai đoạn 4 - 6 lá. Cây tiếp tục được trồng trong điều kiện 24°C, 16 giờ

chiếu sáng/ 8 giờ tối, độ ẩm 80%. Sau 3 ngày, mẫu lá tại các vị trí đã tiêm vi khuẩn *A. tumefaciens* được thu thập để tách chiết protein (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2008).

Kiểm tra sự biểu hiện của gen bằng kỹ thuật Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền bằng nito lỏng, sau đó hòa tan trong đệm SDS (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% (w/v), Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol), biến tính mẫu ở 95°C, 10 phút và ly tâm 4300 v/p, 30 phút, 4°C. Với 10 - 30 µg protein sau khi

được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1.3A trong 20 phút. Sau khi được blocking bằng sữa tách béo 5% trong 5 giờ, màng được ủ với kháng thể AP conjugated antibody đã được hòa loãng 1:2000 trong 10ml Dilution buffer lắc nhẹ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng với 20ml TBST và 20ml TBS. Với 10ml dung dịch 1-Step NBT/BCIP bổ sung lên màng và ủ trong 15 - 30 phút hoặc cho đến khi xuất hiện màu. Sau đó, rửa màng với nước trong 10 phút và làm khô màng trên giấy thấm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chăm sóc và huấn luyện cây *N. benthamiana* trong phòng thí nghiệm

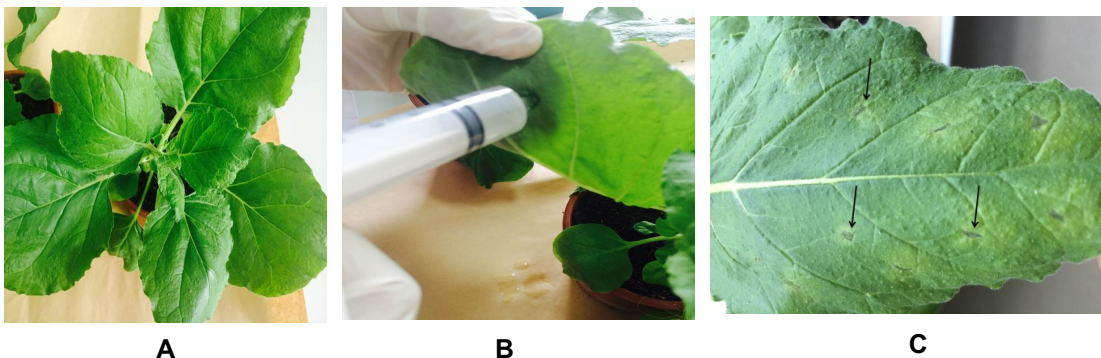
Việc biểu hiện tạm thời gen trên cây thuốc lá có thể tiến hành trên một vài loài. Tuy nhiên, loài thuốc lá *N. benthamiana* đã được nhiều tác giả chọn để làm biểu hiện protein theo phương pháp biểu hiện tạm thời thông qua *A. tumefaciens* như protein CryIA (c) từ vi khuẩn *Bt*, protein GP5 từ virus gây bệnh tai xanh lợn và protein HA/H7N9 polymer dung hợp IgMfc (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2008, Hồ Thị Thương *et al.*, 2015; Lê Thị Thủy *et al.*, 2017). Loài *N. benthamiana* thích nghi với điều kiện khí hậu ôn đới nên nhiệt độ thích hợp là 21 - 24°C và là loài ưa ẩm. Nhưng với khí hậu của nước ta là nhiệt đới thì việc trồng loài này đại trà trong điều kiện tự nhiên rất khó khăn. Chúng tôi đã thử các điều kiện chăm sóc cây con khác nhau trong phòng thí nghiệm và đã tìm được điều kiện thích hợp như sau: Hạt của cây thuốc lá được cho gieo mầm trong môi trường MS đặc, khoảng 3 - 4 tuần dưới điều kiện chiếu sáng 12

giờ, nhiệt độ 24°C. Sau đó, cây con được đã đưa ra giá thể đất trộn trấu để trồng cây trong phòng thí nghiệm trong 1 - 2 tuần với thời gian chiếu sáng 12 giờ, độ ẩm 80%, nhiệt độ 24°C. Như vậy, việc cây được trồng hoàn toàn trong điều kiện phòng thí nghiệm đã cho kết quả tốt do chúng tôi đã tối ưu được về nhiệt độ và độ ẩm thích hợp khi trồng cây trong phòng thí nghiệm.

Nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp vào lá cây *N. benthamiana*

Hai chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector mang gen *ZmLEA14A* đã được thiết kế là pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S và pCAM/Ubi-*ZmLEA14A*-35S (Hình 1 mô tả sơ đồ của 2 vector này). Trong 2 cấu trúc, gen *ZmLEA14A* đều được gắn với đoạn peptide myc để làm dấu hiệu nhận biết cho kháng thể đặc hiệu kháng myc và kích thước lý thuyết protein được tính toán là khoảng 22kDa. Vì thế, nếu protein *ZmLEA14A* được biểu hiện trong lá cây sẽ được phát hiện nhờ sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng myc.

Sau khoảng 4 - 6 tuần trồng trong điều kiện độ ẩm cao và nhiệt độ thích hợp 24°C, cây đã đạt đến giai đoạn 4 - 6 lá (Hình 2A) được sử dụng để tiêm khuẩn vào lá (Hình 2B). Vi khuẩn được nuôi cấy ở 28°C trong 12 giờ được ly tâm thu cặn tế bào và được hòa tan lại trong môi trường có chứa MES và MgSO₄ để có môi trường phù hợp nhằm kích hoạt khả năng biểu hiện của cấu trúc trên vector. Mỗi lá cây được nhiễm khuẩn tại nhiều vị trí khác nhau, trên mỗi cây sử dụng 3 - 4 lá để nhiễm khuẩn. Lá cây sau 3 ngày nhiễm khuẩn đã có dấu hiệu của sự phản ứng với vi khuẩn tại vị trí tiêm và chuyển sang màu vàng thì được thu thập để tách protein tổng số (Hình 2C).



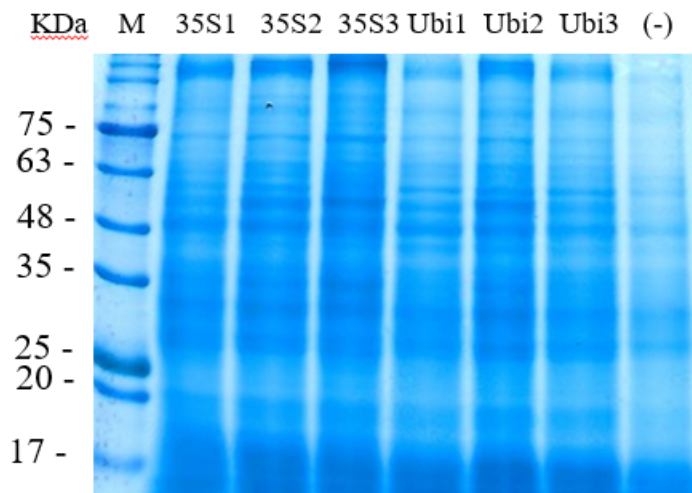
Hình 2. Các bước thực hiện nhiễm khuẩn vào lá cây *N. Benthamiana*. (A) Cây *N. benthamiana* giai đoạn 4 - 6 lá; (B) Nhiễm khuẩn vào lá cây bằng xi lanh; (C) Lá cây sau 3 ngày nhiễm khuẩn.

Kiểm tra protein tổng số và lai Western blot

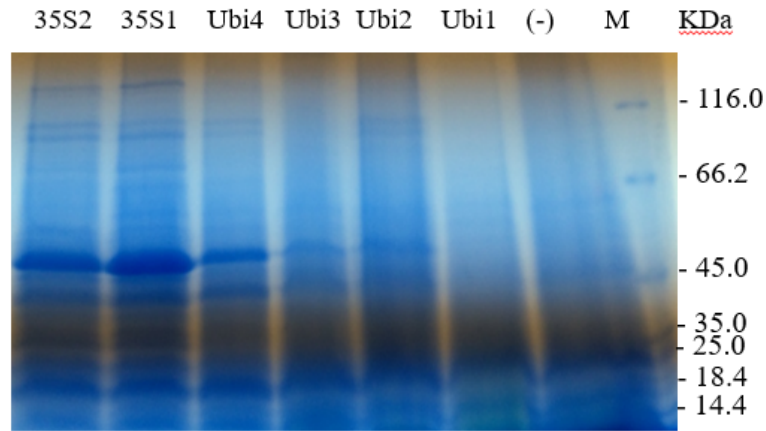
Protein tổng số từ các lá trên 1 cây được tách chiết và đo nồng độ protein. Khoảng 20 μ g protein tổng số được điện di trên gel acrylamide để kiểm tra. Trong một vài lần nhiễm đầu tiên, cho thấy lượng protein thu được không đạt yêu cầu ở các mẫu thí nghiệm (số liệu không công bố ở đây). Với lần lây nhiễm và tách protein tổng số tiếp theo (Hình 3), lượng mẫu lá dùng để tách protein tổng số được tăng lên (3 lá/1 cây), sau quá trình tách chiết, 30 μ l protein tổng số được dùng để điện di. Kết quả cho thấy, đối với lá không có vi khuẩn thì lượng protein tổng số ít hơn trong cả các lần tách chiết. Các mẫu protein tổng số này được sử dụng trong thí nghiệm lai Western với kháng thể emyc-APconjugate. Tuy nhiên, trong lần này thí nghiệm lai chưa cho kết quả dương tính do chúng tôi đã sử dụng một lượng kháng thể khá loãng (tỉ lệ 1: 5000) khi lai. Mặc dù vậy, chúng tôi cũng dự đoán do hàm lượng protein tổng số được tách chiết và điện di chưa nhiều vì thế thí nghiệm nhiễm khuẩn lên lá được lặp lại và có thay đổi cho tối ưu hơn.

Vi khuẩn tiếp tục được tiêm nhiễm vào lá thuốc lá với một số thay đổi như thay đổi thành phần dung dịch MES dùng hòa tan vi khuẩn từ 5mM đến 8 mM và 10mM MES cùng với 10mM MgSO₄ và tốc độ ly tâm thu tế bào vi khuẩn được giảm từ 5000v/p còn 4300 v/p để tránh vỡ tế bào hơn. Sau 3 ngày lây nhiễm, kết quả tách chiết protein tổng số của các mẫu đã đồng đều hơn. Một điểm nhận thấy đồng nhất của những lần nhiễm khác nhau là đều có băng protein trên 45kDa khá đậm ở mẫu pCAM/35S-

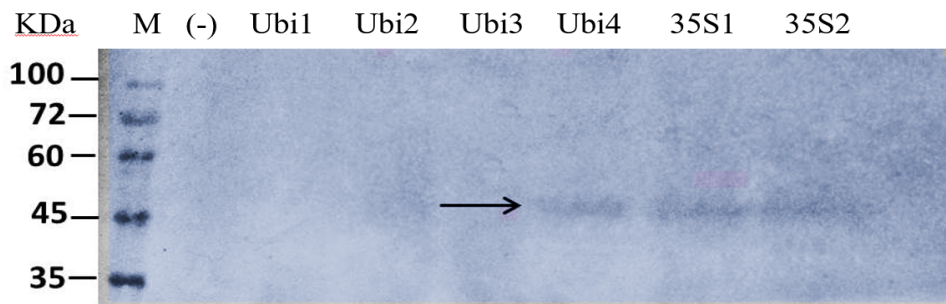
ZmLEA14A-35S (Hình 4) Ngoài ra, với dịch vi khuẩn hòa trong dung dịch MES/MgSO₄ ở 10mM thì lượng protein thu được nhiều hơn và có băng 45kDa đậm hơn. Lượng protein thu được của các mẫu pCAM/35S-*ZmLEA14A-35S* cao hơn các mẫu pCAM/Ubi-*ZmLEA14A-35S*. Điều này có thể lý giải rằng: sự biểu hiện mỗi chủng có sự khác nhau trên lá. Sau đó, phản ứng lai Western được tiến hành với protein ở lần nhiễm này và tín hiệu lai đã xuất hiện ở vùng kích thước tương ứng trên mẫu pCAM/35S-*ZmLEA14A-35S* và pCAM/Ubi-*ZmLEA14A-35S*. Từ đó cho thấy có sự biểu hiện ra protein tái tổ hợp trên lá *N. benthamiana*, kích thước của băng tín hiệu lai lớn hơn kích thước dự đoán của protein *ZmLEA14A* khi thiết kế vào vector. Điều này được giải thích là do trong quá trình thiết kế gen *ZmLEA14A* đã gắn thêm đuôi nucleotide mã hóa cho peptide KDEL vào vùng cuối của gen. KDEL là một đoạn tín hiệu để dẫn đường protein sau khi tổng hợp thì được chuyển đến lưới nội chất. Trong thực vật, quá trình đường hóa hoặc quá trình xử lý hậu dịch mã thường xảy ra trong lưới nội chất và điều này xảy ra đối với rất nhiều protein. Vì vậy, protein *ZmLEA14A* sau khi biểu hiện có thể đã có xảy ra quá trình xử lý hậu dịch mã nên tạo protein có kích thước lớn hơn dự đoán khi thiết kế. Với kết quả lai Western blot có tín hiệu lai trên các mẫu pCAM/35S-*ZmLEA14A-35S* đường chạy 35S1 và 35S2, mẫu pCAM/Ubi-*ZmLEA14A-35S* đường chạy Ubi4, cho thấy gen *ZmLEA14A* đã biểu hiện ra protein ở trên lá cây *N. benthamiana* (Hình 5).



Hình 3. Kết quả tách chiết protein tổng số. M: Marker protein, (-): lá không nhiễm khuẩn, 35S1-35S2-35S3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/35S-*ZmLEA14A-35S*; Ubi1-Ubi2-Ubi3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/Ubi-*ZmLEA14A-35S*.



Hình 4. Kết quả tách chiết protein tổng số sau khi tối ưu điều kiện nhiễm khuẩn. M: Marker protein, (-): lá không nhiễm khuẩn, 35S1-35S2-35S3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/35S-ZmLEA14A-35S; Ubi1-Ubi2-Ubi3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/Ubi-ZmLEA14A-35S.



Hình 5. Kết quả lai Western thể hiện sự biểu hiện của protein ZmLEA14A. M: Marker protein, (-): lá không nhiễm khuẩn, 35S1-35S2-35S3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/35S-ZmLEA14A-35S; Ubi1-Ubi2-Ubi3: lá nhiễm khuẩn mang pCAM/Ubi-ZmLEA14A-35S.

Phương pháp biểu hiện tạm thời trên lá đã được sử dụng rộng rãi nhằm kiểm tra sự biểu hiện của gen trong cấu trúc mới nhờ ưu thế nhanh và không yêu cầu phải có chỉ thị chọn lọc có trên vector do vậy sẽ dễ dàng cho các thao tác khi nghiên cứu. Đồng thời, biểu hiện tạm thời trên các tế bào thực vật sẽ ưu thế hơn khi biểu hiện trong tế bào prokaryote hay hệ biểu hiện khác. Ví dụ, các gen có intron sẽ vẫn được biểu hiện vì đã có sẵn các hệ thống cần thiết cho chỉnh sửa sau phiên mã và dịch mã trong tế bào thực vật (Hellens *et al.*, 2005). Sự biểu hiện tạm thời của gen trong tế bào biểu mô của cây thuốc lá có tính hiệu quả cao hơn hẳn so với cây *Arabidopsis*. (Sparkes *et al.*, 2006). Đến nay, hệ thống biểu hiện tạm thời với ưu thế nhanh và có thể triển khai quy mô lớn đã được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu tác động qua lại của

một số protein cùng tham gia trong một con đường sinh tổng hợp nào đó, ví dụ tổng hợp acid béo LC-PUFA (Wood *et al.*, 2009), DHA (Petrie *et al.*, 2010) hay ứng dụng trong việc sản xuất kháng thể và kháng nguyên của một số tác nhân gây bệnh như *Ebola virus* (Huang *et al.*, 2010), *Influenza virus* (Landry *et al.*, 2010), *Human immunodeficiency virus* (Rosenberg *et al.*, 2013, Sugata *et al.*, 2018), *Dengue virus* (Kim *et al.*, 2015), *Plasmodium falciparum* (Beiss *et al.*, 2015), và *Rift Valley fever virus* (Sandiswa *et al.*, 2019). Như vậy, việc lựa chọn biểu hiện tạm thời gen ZmLEA14A trên cây *N. benthamiana* là phù hợp và đồng thời đã có kết quả biểu hiện ra protein cho thấy hai cấu trúc được thiết kế đã hoạt động tốt trên cây mô hình và sẵn sàng cho các nghiên cứu chuyển gen ổn định vào thực vật.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp biểu hiện tạm thời để kiểm tra được sự biểu hiện của gen *ZmLEA14A* trong hai cấu trúc pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S và pCAM/Ubi-*ZmLEA14A*-35S trên cây mô hình. Protein tái tổ hợp đã được biểu hiện trên lá cây thuốc lá *N. benthamiana* thể hiện qua kết quả lai Western dương tính với kháng thể đặc hiệu kháng cmyc. Qua đó cho thấy, hai cấu trúc chứa gen *ZmLEA14A* đã được thiết kế hoàn chỉnh để hoạt động phiên mã và dịch mã trên cây mô hình và sẵn sàng cho các nghiên cứu chuyển gen ổn định vào thực vật.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với kinh phí từ đề tài cấp cơ sở do Viện Nghiên cứu hệ gen chủ trì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A.A (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148: 6-24.
- Beiss V, Spiegel H, Boes A, Kapelski S, Scheuermayer M, Edgue G, *et al.* (2015) Heat-precipitation allows the efficient purification of a functional plant-derived malaria transmission-blocking vaccine candidate fusion protein. *Biotechnol Bioeng* 112: 1297-1305.
- Bui Manh Minh, Nguyen Thuy Linh, Ha Hong Hanh, Le Thi Thu Hien, Nguyen Xuan Thang, Nong Van Hai and Huynh Thi Thu Hue (2019) A *LEA* gene from a Vietnamese maize landrace can enhance drought tolerance of transgenic maize and tobacco. *Agronomy* 9(2): 62.
- Goyal K, Walton L.J, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388:151-157.
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH (2005) Identification in pea seed mitochondria of late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* 137: 157-167.
- Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Chu Thị Kim Hoàng, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 của virus gây bệnh lùn tai xanh trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp Agro-infiltration. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31 (1): 53-61.
- Hirsch C.N, Hirsch C.D, Brohammer A.B, Bowman M.J, Soifer I, Barad O, Shem-Tov D, Baruch K, Lu F, Hernandez A.G, *et al.* (2016) Draft assembly of elite inbred line ph207 provides insights into genomic and transcriptome diversity in maize. *Plant Cell* 28: 2700-2714.
- Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, Zeitlin L, *et al.* (2010) High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng* 106: 9-17.
- Hundertmark M, Hincha D.K (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genom* 9: 118-139.
- Huỳnh Thị Thu Huệ, Trần Thị Ngọc Diệp, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải (2008) Thiết kế vector và kiểm tra biểu hiện của gen cryIA(c) trên lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4), 1-6
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.
- Kim M.Y, Reljic R, Kilbourne J, Ceballos-Olvera I, Yang M.S, Reyes-del Valle J, *et al.* (2015) Novel vaccination approach for dengue infection based on recombinant immune complex universal platform. *Vaccine* 33: 1830-1838.
- Landry N, Ward B.J, Trépanier S, Montomoli E, Dargis M, Lapini G, *et al.* (2010) Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against H5N1 influenza. *PLoS ONE* 5: e15559.
- Lê Thị Thủy, Lê Thu Ngọc, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2017) Biểu hiện Protein HA/H7N9 Polymer dung hợp IgMFc trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp Agroinfiltration. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33 (1): 105-115.
- Li X, Wu L, Wang J, Sun J, Xia X, Geng X, Wang X, Xu Z, Xu Q (2018) Genome sequencing of rice subspecies and genetic analysis of recombinant lines reveals regional yield- and quality-associated loci. *BMC Biol* 16: 102.
- Li, F, Fan G, Lu C, Xiao G, Zou C, Kohel R.J, Ma Z, Shang H, Ma X, Wu J, *et al.* (2015) Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nat Biotechnol* 33: 524-530.
- Li, X and Cao J (2016) Late embryogenesis abundant (LEA) gene family in maize: identification, evolution, and expression profile. *Plant Mol Biol* 34(1): 15-28.
- Magwanga R.O, Lu P, Kirungu J.N, Lu H, Wang X, Cai X, Zhou Z, Zhang Z, Salih H, Wang K, *et al.* (2018) Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet* 19: 6-37.
- Petrie J.R., Shrestha P, Liu Q, Mansour M.P, Wood C.C, Zhou X.R, Nichols P.D, Green A.G, Singh S.P (2010) Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. *Plant Method* 6: 8.

- Rosenberg Y.J, Walker J, Jiang X, Donahue S, Robosky J, Sack M, *et al.* (2015) A highly stable minimally processed plant-derived recombinant acetylcholin esterase for nerve agent detection in adverse conditions. *Sci Rep* 5: 13247.
- Sandiswa M, Ann E.M, Edward P.R (2019) Chimaeric Rift Valley Fever Virus-Like Particle Vaccine Candidate Production in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnol J* 14:1800238-47.
- Sparkes I.A, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion protein in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protocol* 1(4): 2019-25.
- Sugata R, Young J.O, Hiroyuki K, Krystal T.H, Kazuhito F and Nobuyuki M (2018) Hydroponic Treatment of *Nicotiana benthamiana* with Kifunensine Modifies the N-glycans of Recombinant Glycoprotein Antigens to Predominantly Man9 High-Mannose Type upon Transient Overexpression, *Front Plant Sci* 9: 62.
- Wang M, Li P, Li C, Pan Y, Jiang X, Zhu D, Zhao Q, Yu J (2014) SiLEA14, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet. *BMC Plant Biol* 14: 290-305.
- Wang X.S, Zhu H.B, Jin G.L, Liu H.L, Wu W.R, Zhu J (2007) Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 172: 414-420.
- Wolkers W.F, McCready S, Brandt W.F, Lindsey G.G, Hoekstra F.A (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1544: 196-206.
- Wood C.C, Petrie J.S, Shrestha P, Mansour M.P, Nichols D, Green A.G, Singh S.P (2009) A leaf- based assay using interchangeable design principles to rapidly assemble multistep recombinant pathways. *J Plant Biotech* 7(9): 914-924.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 115(1): 35-46.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-HD, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110: 249-257.

TRANSIENT EXPRESSION OF GENE ENCODING ZmLEA14A PROTEIN IN NICOTIANA BENTHAMIANA PLANT

Ha Hong Hanh¹, Le Thi Thu Hien^{1,2}, Huynh Thi Thu Hue^{1,2}

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

LEA protein family includes proteins accumulated in the late stage of embryogenesis and in vegetative tissues of stress-confronted plant. These proteins have been demonstrated to play a major role in plant response to abiotic stresses, such as drought and salinity stress. The genes coding for LEA proteins in maize are divided into 9 groups including LEA 1, LEA 2, LEA 3, LEA 4, LEA 5, LEA 6, SMP, dehydrin, and AtM. The application of LEA genes to improve drought tolerance for plants by genetic engineering has also been studied extensively all over the world. In this study, pCAM/35S-ZmLEA14A-35S vector and pCAM/Ubi-ZmLEA14A-35S vector contained the ZmLEA14A gene isolated from Te vang 1, these vectors were used to transient express into *Nicotiana benthamiana* tobacco leaves by agro-infiltration method. The results of immunoassay between cmc specific antibodies with proteins from infected leaves revealed the expression of recombinant ZmLEA14A protein in *N. benthamiana* leaves. Thereby, two constructs harbouring the ZmLEA14A gene work at transcription and translation levels in the model plant that could harnessed for stable transformation in plants.

Keywords: Agro-infiltration, expression gene, maize, *Nicotiana benthamiana*, ZmLEA14A