

PHÂN LẬP PROMOTER *OSHOX24* HOẠT ĐỘNG CẢM ỨNG STRESS Ở LÚA

Phạm Xuân Hội¹, Trần Thị Thúy Nga², Nguyễn Duy Phương¹

¹Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 20.5.2015

Ngày nhận đăng: 20.02.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu tạo giống cây trồng dựa trên công nghệ chuyển gen thực vật đã trở thành xu hướng phổ biến, được rất nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm. Chính vì vậy, việc phân lập và nghiên cứu đặc tính một tập hợp đầy đủ các gen/promoter liên quan tới tăng cường tính chống chịu stress của thực vật và mối liên hệ giữa mặn, hạn và nhiệt độ cao là yêu cầu quan trọng đầu tiên cho việc chọn tạo giống chống chịu bất lợi ngoại cảnh. Gần đây, một số nghiên cứu trên cây mô hình đã chứng minh các gen được điều khiển bởi promoter *Oshox24* có nguồn gốc từ lúa chỉ biểu hiện đặc hiệu trong các điều kiện stress và không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây trong điều kiện bình thường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập đoạn DNA mang trình tự promoter *Oshox24* từ lúa *Oryza sativa* Indica bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự promoter *Oshox24* đã phân lập có kích thước 1.612 bp và tương đồng 90% so với trình tự DNA có mã số AP004868.3 đã công bố trên Genbank. Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn DNA phân lập được có chứa 15 yếu tố hoạt hóa *cis* đáp ứng stress, thuộc 5 nhóm ABRE, MYBRS/MYCRS, DRE, NACRS, ZFHDRS, và một hộp TATA tại vị trí 1482 – 1488 chứng tỏ Promoter *Oshox24* đóng vai trò quan trọng trong điều hòa biểu hiện gen trong điều kiện stress. Promoter *Oshox24* đã được đưa vào vector biểu hiện pCAMBIA1300 để phục vụ cho các nghiên cứu tạo giống cây chuyển gen chống chịu yếu tố stress môi trường.

Từ khóa: Chuyển gen, lúa Indica, *Oshox24*, promoter, stress

MỞ ĐẦU

Các yếu tố môi trường bất lợi như hạn, mặn, lạnh... là những nguyên nhân chính gây ảnh hưởng tới sinh trưởng của thực vật, làm giảm năng suất cây trồng (Yi N, Kim YS, Jeong MH, Oh SJ, Jeong JS, Park SH, Jung H, Choi YD, Kim JK (2010) Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. *Planta* 232(3): 743-754). Do hậu quả của hiện tượng biến đổi khí hậu toàn cầu, các hiện tượng thời tiết cực đoan xuất hiện với tần suất ngày một tăng và tính chất ngày càng phức tạp. Tính riêng hạn và mặn đã gây ảnh hưởng tới khoảng 10% diện tích đất canh tác trên toàn thế giới và làm giảm hơn 50% sản lượng của các cây ngũ cốc quan trọng (Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville: 158-1203). Kỹ thuật di truyền là một phương tiện rất hữu ích để tạo ra các giống cây trồng có sức chống chịu cao với điều kiện môi trường bất lợi.

Cho đến nay, nhờ áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, rất nhiều gen biểu hiện trong điều kiện stress và các nhân tố phiên mã đáp ứng stress điều khiển các gen này đã được phát hiện và nghiên cứu chức năng (Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshiwara K (2012) Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res* 19: 37-49; **Error! Reference source not found.**). Sự biểu hiện của các nhân tố phiên mã đáp ứng stress này có thể tăng cường khả năng chống chịu stress cho cây chuyển gen thông qua quá trình hoạt hóa biểu hiện các gen chức năng mã hóa sản phẩm protein trực tiếp tham gia bảo vệ tế bào thực vật chống lại yếu tố stress (Todaka D, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. *Rice* 5: 6.). Promoter *CaMV35S* là promoter được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu chuyển gen thực vật để điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển (Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic

virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812). Tuy nhiên, sự biểu hiện liên tục của các gen chức năng hay gen mã hóa nhân tố phiên mã đáp ứng stress có thể gây ảnh hưởng tới sinh trưởng của cây chuyển gen trong điều kiện môi trường bình thường. Ví dụ, sự biểu hiện liên tục của gen mã hóa CBF/DREB1 dưới sự điều khiển của promoter 35S trong cây chuyển gen mô hình giúp tăng khả năng chống chịu stress nhưng đồng thời cũng ảnh hưởng rõ rệt tới sinh trưởng của cây trong điều kiện không có stress (Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406). Tương tự, rất nhiều gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ NAC khi được biểu hiện liên tục dưới sự điều khiển của promoter hoạt động liên tục *ubiquitin* (có nguồn gốc từ ngô) cũng làm chậm tốc độ sinh trưởng của cây chuyển gen so với cây đối chứng trong điều kiện bình thường (Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60; Yi N, Kim YS, Jeong MH, Oh SJ, Jeong JS, Park SH, Jung H, Choi YD, Kim JK (2010) Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. *Planta* 232(3): 743-754). Chính vì vậy, việc sử dụng các promoter cảm ứng hoạt động đặc hiệu với yếu tố stress có thể giảm thiểu những tác động phụ của gen chuyển trong các nghiên cứu chuyển gen đáp ứng stress.

Đặc trưng của các promoter hoạt động cảm ứng stress là có mang các yếu tố hoạt hóa *cis* (*cis*-acting element) đóng vai trò là vị trí liên kết với nhân tố phiên mã (được kích hoạt bởi các tín hiệu stress) để điều hòa biểu hiện của các gen liên quan (**Error! Reference source not found.; Error! Reference source not found.**). Các yếu tố hoạt hóa *cis* đáp ứng điều kiện stress được chia thành 3 nhóm, bao gồm (1) nhóm liên quan tới con đường điều hòa phụ thuộc hormone ABA như yếu tố *cis* ABRE (chứa motif – T/CACGTGG với trình tự lõi ACGT), MYCRS (trình tự nhận biết MYC – CANNTG), MYBRS (trình tự nhận biết MYB – A/TAACCA và C/TAACG/TG)... , (2) nhóm không phụ thuộc ABA như yếu tố *cis* DRE (có trình tự lõi A/GCCGAC)... và (3) liên quan đến cả hai con đường trên như yếu tố *cis* NAC (có chứa trình tự lõi CATGTG), ZFHDRS (chứa một motif bảo thủ TT/AAATT)...(**Error! Reference source not**

found.; Error! Reference source not found.). Một số promoter hoạt động cảm ứng stress như *RD29A* hay *lip9* đã được phát hiện và chứng minh không gây ảnh hưởng tới sinh trưởng của cây chuyển gen (Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.; **Error! Reference source not found.; Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60. Gần đây, Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60. (2014) đã phát hiện promoter *Oshox24* ở lúa Japonica mang những đặc điểm đặc trưng của một promoter có khả năng cảm ứng đặc hiệu với những bất lợi của môi trường. Cây *Arabidopsis* được chuyển cấu trúc *Oshox24:GUS* biểu hiện hoạt tính β -glucuronidase khi được xử lý với stress hạn, mặn và ABA, đồng thời không biểu hiện gen chuyển trong điều kiện bình thường.**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập promoter *Oshox24* từ lúa Indica bằng kỹ thuật PCR và thiết kế vector biểu hiện ở thực vật pCAMBIA1300 mang cấu trúc biểu gen *Oshox24:Nos* để phục vụ các nghiên cứu chuyển gen liên quan tới tăng cường sức chống chịu stress ở thực vật. Giống lúa *Oryza sativa* Pusa Basmati 1 được sử dụng trong nghiên cứu là một giống lúa có khả năng thích nghi rất tốt với điều kiện khí hậu khô nóng rất khắc nghiệt và được trồng rất phổ biến ở Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tạo giống cây trồng chuyển gen chống chịu stress sau này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

DNA tổng số của giống lúa *Oryza sativa* Pusa Basmati 1 (PB1) do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp; chủng vi khuẩn *E. coli* DH5a được đặt mua của hãng Fermentas (Mỹ), vector biểu hiện pCAM-Ubi được Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) thiết kế dựa trên bộ khung vector

pCAMBIA1300 đặt mua từ hãng Norvagen (Mỹ); vector pGEM-T mạch thẳng có đầu T được đóng gói kèm trong bộ kit pGEM®-T Easy Vector Systems của hãng Promega.

Các đoạn oligonucleotide dùng cho phản ứng PCR nhân bản DNA được thiết kế dựa trên các trình tự DNA đã được công bố trên GenBank và được tổng hợp bởi hãng Sigma (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mỗi	Trình tự mỗi	Đoạn DNA nhân bản (Kích thước)
HOX24-Fw	5'-AAGCTTGGCGATCGAAAGCTTTGCCGA-3'	Promoter <i>OsHox24</i> (1612 bp)
HOX24-Rv	5'-GGATCCTTTCCCAAGCTCCAGGTAGG-3'	
T7-Fw	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Vùng MCS trên pGEM-T (168 bp)
SP6-Rv	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'	
HYG-Fw	5'-AAACTGTGATGGACGACACCGT-3'	Gen <i>Hygromycin</i> trên CAMBIA1300 (294 bp)
HYG-Rv	5'-GTGGCGATCCTGCAAGCTCC -3'	

Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của cây chuyển gen được tách

chiết theo phương pháp của **Error! Reference source not found.**, sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nitor lỏng, sau đó được bổ sung 500 µl dung dịch CTAB 2% (có chứa RNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500 µl hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn hợp sau được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA tinh sạch.

Phân lập promoter *Oshox24* từ DNA tổng số

Promoter *Oshox24* được phân lập từ DNA tổng số của lúa bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu HOX24-Fw/HOX24-Rv theo chu trình nhiệt: 94°C – 30 giây, [55°C -> 63°C] – 20 giây, 72°C – 40 giây; phản ứng được thực hiện 35 chu kì. Sản phẩm PCR đặc hiệu được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET-TM Gel Extraction* của hãng Fermentas.

Nhân dòng và giai trình tự promoter *Oshox24*

Promote *Oshox24* nhân bản bằng PCR được nhân dòng bằng bộ kit pGEM-T Easy theo quy trình đi kèm của hãng Promega. Plasmid tái tổ hợp pGEM/*Hox24* được tách chiết từ vi khuẩn *E.coli* bằng bộ kit GenJET-TM Plasmid Miniprep (Fermentas) và được kiểm tra bằng phương pháp PCR với hai cặp mồi HOX24-Fw/HOX24Rv, T7-Fw/SP6-Rv và phương pháp xử lý với enzyme cắt giới hạn *EcoRI*.

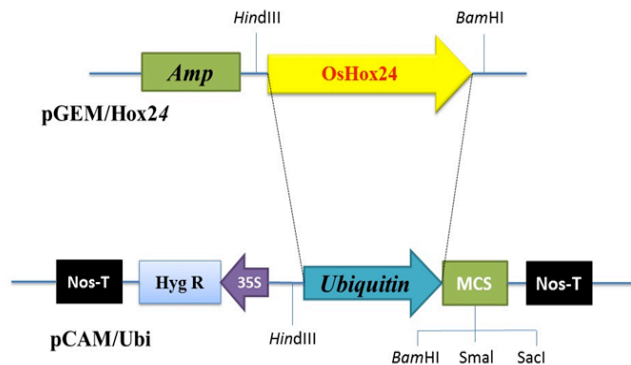
Promoter *Oshox24* được giải trình tự đầy đủ theo phương pháp của Sanger F, Micklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467. và đọc bằng hệ

thống máy giải trình tự ABI 3100. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0.

Thiết kế vector biểu hiện pCAM/Hox24

Vector pGEM/Hox24 và pCAM/Ubi được xử lý đồng thời với *Hind*III/*Bam*HI. Đoạn trình tự

promoter *Oshox24* được ghép nối vào vector pCAMBIA1300 mạch thẳng nhờ T4 DNA ligase (Invitrogen) để tạo vector tái tổ hợp pCAM-Hox24 (Hình 1). Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với hai cặp mồi HYG-Fw/HYG-Rv; HOX24-Fw/HOX24-Rv và phương pháp xử lý enzyme giới hạn *Hind*III/*Bam*HI.



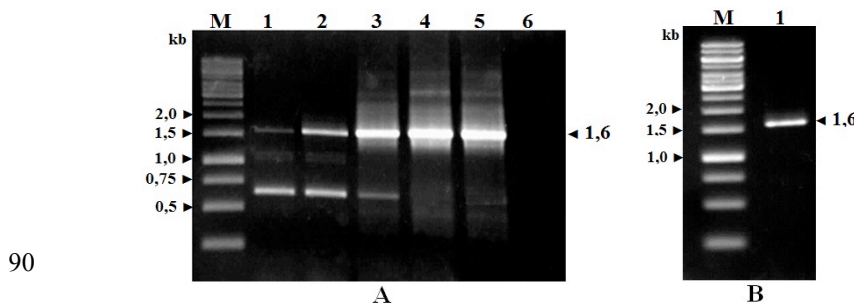
Hình 1. Sơ đồ ghép nối *Oshox24* vào pCAMBIA1300. Promoter *Ubiquitin* trên vector pCAM/Ubi được thay thế bởi đoạn DNA mang trình tự của promoter *Oshox24* trên vector nhân dòng pGEM/Hox24 tại vị trí nhận biết của *Hind*III/*Bam*HI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

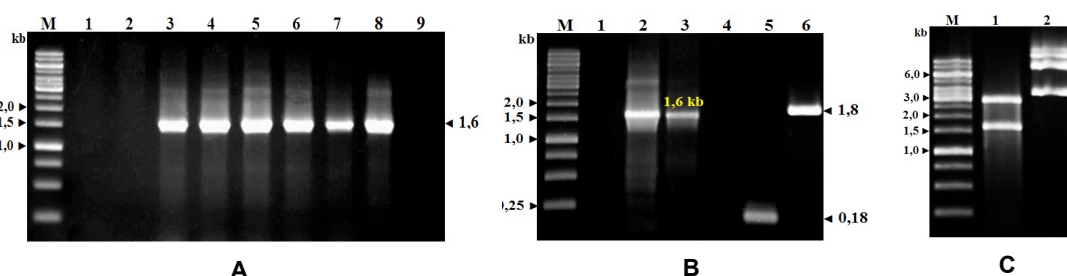
Phân lập promoter *Oshox24* từ DNA tổng số của lúa

Dựa vào trình tự nucleotide của promoter *Oshox24* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới, thiết kế cặp mồi HOX24-Fw/HOX24-Rv (Bảng 1) để sử dụng cho phản ứng PCR đặc hiệu nhân bản promoter *Oshox24* từ DNA tổng số đã tách được từ giống lúa Pusa Basmati 1. Phản ứng PCR được thực hiện với 35 chu kì, ở các nhiệt độ gắn mồi từ 55°C đến 63°C trong 20 giây. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy ở nhiệt độ gắn mồi 61°C và 63°C, đã thu được một băng DNA duy nhất có kích thước xấp xỉ 1,6 kb (Hình 2A, giếng 4 & 5), tương ứng với kích thước lý thuyết của promoter *Oshox24* đã

được công bố. Đối với các phản ứng PCR ở nhiệt độ gắn mồi thấp hơn, sản phẩm phản ứng cho một số băng DNA không đặc hiệu (Hình 2B, giếng 1 - 3). Kết quả này cho thấy đã nhân bản được đoạn DNA mong muốn từ DNA tổng số của *A. thaliana* bằng cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế. Băng DNA đặc hiệu cũng được cắt chính xác trên bản gel, và thu lại bằng bộ kit tinh sạch DNA của hãng Fermentas. Sản phẩm PCR nhân bản promoter *Oshox24* sau đó được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET-TM Gel Extraction* (Fermentas) và điện di kiểm tra lại trên gel agarose 1% (Hình 2B, giếng 1). Sản phẩm PCR tinh sạch này được sử dụng cho thí nghiệm nhân dòng và giải trình tự sau này.



Hình 2. Phân lập promoter *Oshox24* từ DNA tổng số của lúa *Oryza sativa* Pusa Basmati 1 bằng PCR. (A) Sản phẩm PCR nhân bản *Oshox24* với các nhiệt độ gắn mồi khác nhau được điện di trên gel agarose 1%; giếng 1-5: khuôn là DNA tổng số của lúa; giếng 6: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 1: PCR ở nhiệt độ gắn mồi 55°C; giếng 2: PCR ở nhiệt độ gắn mồi 57°C; giếng 3: PCR ở nhiệt độ gắn mồi 59°C; giếng 4: PCR ở nhiệt độ gắn mồi 61°C; giếng 5: PCR ở nhiệt độ gắn mồi 63°C.



Hình 3. Nhân dòng promoter *OsHox24* vào vector pGEM-T. (A) Sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc mang pGEM/Hox24 với cặp mồi đặc hiệu HOX24-Fw/HOX24-Rv được điện di trên gel agarose 1%; giếng 1 – 7: PCR từ khuôn là các khuẩn lạc số 1 – 7; giếng 8: đối chứng dương (khuôn là DNA tổng số); giếng 9: đối chứng âm (khuôn là H₂O). (B) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/Hox24 (đòng khuẩn lạc số 1) bằng PCR; giếng 1, 2 và 3: PCR với cặp mồi HOX24-Fw/HOX24-Rv; giếng 4, 5 và 6: PCR với cặp mồi T7-Fw/SP6-Rv; giếng 1 và 4: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 2: đối chứng dương (khuôn là DNA tổng số); giếng 3 và 6: khuôn là pGEM/Hox24; giếng 5: đối chứng dương (khuôn là pGEM nguyên bản). (C) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/Hox24 (đòng khuẩn lạc số 1) bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI*; giếng 1: sản phẩm cắt giới hạn; giếng 2: pGEM/Hox24 nguyên bản. Giếng M: thang DNA 1kb.

Nhân dòng promoter *Oshox24*

Sản phẩm PCR tinh sạch được ghép nối vào vector pGEM-T bằng bộ kit nhân dòng bộ kit nhân dòng pGEM®-T Vector System II (Promega). Kết quả kiểm tra các thể biến nạp bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu HOX24-Fw/HOX24-Rv cho thấy đã thu được các thể biến nạp dương tính, sản phẩm PCR khi được điện di trên gel agarose cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1,6 kb tương ứng với kích thước lý thuyết của *Oshox24* (Hình 3, giếng 2 – 7). Để khẳng định kết quả thu được, đã tinh sạch plasmid từ khuẩn lạc dương tính (đòng số 1) và kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau và xử lý với enzyme cắt giới hạn *EcoRI*.

Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được thực hiện với hai cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu cho vector pGEM (T7-Fw/SP6-Rv) có khoảng cách 186 bp trên vector pGEM; cặp mồi đặc hiệu cho promoter *Oshox24* (HOX24-Fw/HOX24-Rv). Các sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di trên hình 3B cho thấy đối với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của

promoter *Oshox24*, thu được một băng DNA có kích thước khoảng 1,6 kb (Hình 3B, giếng 3) tương ứng với kích thước của *Oshox24*. Đối với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vector, thu được một băng DNA khoảng 1,8 kb (Hình 3B, giếng 6); kích thước này phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết bao gồm 1,6 kb chiều dài promoter *Oshox24* và 186 bp của đoạn DNA trên vector pGEM (Hình 3B, giếng 5).

Tiếp theo, do trên vector pGEM có hai vị trí nhận biết của enzyme *EcoRI* nằm cách nhau vài chục nucleotide và ở hai phía của đoạn DNA được chèn vào vector, đồng thời trong trình tự promoter *OsHox24* không có trình tự nhận biết của enzyme này. Do đó, đã thực hiện phản ứng cắt giới hạn pGEM/Hox24 bằng *EcoRI* để xác định sự có mặt của promoter *Oshox24* trong vector tái tổ hợp. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn cho thấy sự xuất hiện của hai băng DNA, băng DNA thứ nhất có kích thước khoảng 3,0 kb là bộ khung vector pGEM và băng thứ hai chính promoter *Oshox24* có kích thước khoảng 1,6 kb. Các kết quả thu được này cho phép khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công promoter *Oshox24* vào vector pGEM-T.



Hình 4. Một phần trình tự promoter *OsHox24* (vị trí 431- 1612). Promoter *Oshox24* chứa 15 yếu tố hoạt hóa *cis* (các vị trí được đóng khung), bao gồm ABRE (1 motif), MYBRS (3 motif), MYCRS (9 motif), DRE (1 motif), NACRS (1 motif) và ZFHDRS (1 motif) và hộp TATA ở vị trí 1482- 1488 (TATA BOX).

Phân tích trình tự promoter *Oshox24*

Để khẳng định chính xác promoter đã phân lập được là promoter *Oshox24*, tiến hành giải trình tự promoter trong vector tái tổ hợp pGEM/Hox24. Kết quả giải trình tự sau đó được phân tích lại bằng phần mềm BioEdit và so sánh với trình tự DNA tương đồng đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy đoạn DNA phân lập được từ lúa Indica có chiều dài là 1.612 bp và tương đồng ~90% với trình tự *OsHox24* của lúa Japonica (mã số AP004868.3).

Các phân tích chi tiết hơn bằng phần mềm BioEdit cho thấy trình tự đoạn DNA phân lập được có chứa 15 yếu tố hoạt hóa *cis* (*cis* acting-element) thuộc 5 nhóm yếu tố *cis* liên quan tới đáp ứng điều hòa hoạt động gen đáp ứng chống chịu stress bao gồm: ABRE (1 motif), MYBRS (3 motif), MYCRS (9 motif), DRE (1 motif), NACRS (1 motif) và ZFHDRS (1 motif) (Hình 4). Ngoài ra, trong trình tự promoter *Oshox24* phân lập được cũng có chứa một

hộp TATA đặc trưng cho các promoter của sinh vật nhân chuẩn tại vị trí 1482 – 1488.

Từ các kết quả thu được có thể kết luận đã phân lập và nhân dòng thành công promoter *Oshox24* của giống lúa Pusa Basmati 1. Sản phẩm nhân dòng được chúng tôi sử dụng cho các thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện tiếp theo.

Thiết kế vector biểu hiện pCAMBIA1300 mang promoter *Oshox24*

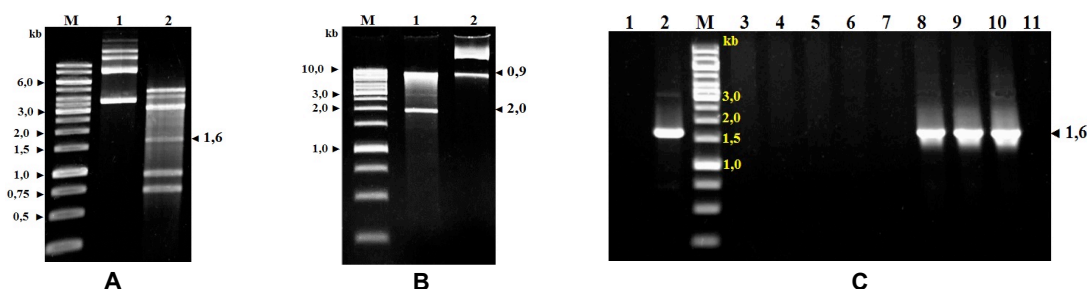
Trong nghiên cứu này, để thiết kế vector biểu hiện ở thực vật pCAMBIA1300 mang cấu trúc biểu hiện gen đích được điều khiển bởi promoter *Oshox24*, sử dụng bộ khung vector biểu hiện pCAM-Ubi (Hình 1) làm nguyên liệu cho thí nghiệm. Do promoter *Ubiquitin* nằm giữa vị trí nhận biết của hai enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Bam*HI trên vector pCAM-Ubi nên khi thiết kế cặp mồi đặc hiệu sử dụng phản ứng PCR nhân bản promoter *Oshox24*, đã đưa thêm trình tự nhận biết của hai enzyme này nhằm thay thế trình tự promoter *Oshox24* vào vị trí

của promoter *Ubiquitin* trên vector pCAM/Ubi. Hai vector pGEM/Hox24 và pCAM/Ubi đã được xử lý đồng thời bằng *HindIII/BamHI* (Hình 5A&B). Tuy nhiên, do trong trình tự promoter *Oshox24* cũng có một vị trí nhận biết khác của enzyme *HindIII* tại vị trí 905, vì vậy để thu được promoter *Oshox24* có chiều dài đầy đủ, phản ứng cắt giới hạn pGEM/Hox24 đã được tối ưu điều kiện để xảy ra không hoàn toàn.

Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn đối với vector pGEM/Hox24 cho thấy có xuất hiện 6 băng DNA có kích thước khác nhau trong đó băng DNA có kích thước 1,6 kb chính là promoter *Oshox24* với chiều dài đầy đủ (Hình 5A, giếng 2). Đối với sản phẩm cắt hoàn toàn của vector pCAM/Ubi, đã thu

được hai băng DNA, một băng DNA kích thước khoảng 9,0 kb tương ứng là bộ khung vector biểu hiện pCAMBIA1300 và một băng DNA có kích thước khoảng 2,0 kb tương ứng với đoạn promoter *Ubiquitin* đã được cắt ra (Hình 5B, giếng 1).

Đoạn DNA mang trình tự promoter *Oshox24* được ghép nối vào khung vector pCAMBIA1300 mạch thẳng bằng T4 DNA ligase và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Thể biến nạp sau đó được chúng tôi sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho promoter (HOX24-Fw/HOX24-Rv). Khuẩn lạc dương tính có sản phẩm PCR cho 1 băng DNA kích thước 1,6 kb trên bản điện di (Hình 5C, giếng 8, 9 và 10) được chọn để tách chiết plasmid và kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR và cắt enzyme giới hạn.



Hình 5. Ghép nối tự promoter *OsHox24* vào hệ vector pCAMBIA1300. Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1%. (A) Xử lý pGEM/Hox24 bằng *HindIII/BamHI* không hoàn toàn; giếng 1: vector pGEM/Hox24 nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Xử lý pCAM-Ubi bằng *HindIII/BamHI*; giếng 1: sản phẩm cắt giới hạn; giếng 2: vector pCAM-Ubi nguyên bản. (C) Sàng lọc thể biến nạp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi HOX24-Fw/HOX24-Rv, giếng 1: đối chứng âm (khuôn là H₂O), giếng 2: đối chứng dương (khuôn là pGEM/Hox24), giếng 3 – 11: sản phẩm PCR khuôn là các khuẩn lạc. Giếng M: thang DNA 1kb.

Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuôn là plasmid tinh sạch cho thấy, với cặp mồi đặc hiệu cho hệ vector pCAMBIA1300 (HYG-Fw/HYG-Rv) và đặc hiệu cho promoter *Oshox24* (HOX24-Fw/HOX24-Rv), đã thu được các sản phẩm PCR có kích thước lần lượt khoảng 0,3 kb (Hình 6A, giếng 1) và 1,6 kb (Hình 6A, giếng 3) phù hợp với kích thước lý thuyết. Khi xử lý plasmid tái tổ hợp này với hai enzyme giới hạn *HindIII/BamHI*, đã thu được một băng DNA có kích thước 8,0 kb là bộ khung vector pCAMBIA1300 và hai băng DNA kích thước lần lượt khoảng 0,9 kb và 0,7 kb tương ứng với chiều dài đoạn promoter *Oshox24* bị cắt làm đôi (Hình 6B, giếng 1).

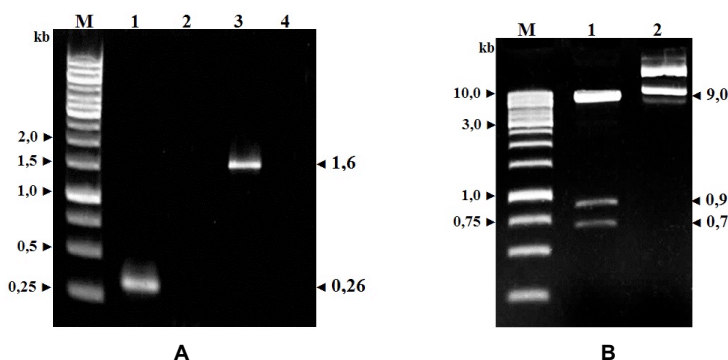
Các kết quả này chứng tỏ đã thay thế thành công trình tự promoter biểu hiện liên tục *Ubiquitin* trong vector biểu hiện pCAM/Ubi bằng trình tự promoter

cảm ứng điều kiện bất lợi *Oshox24* để tạo thành vector biểu hiện mới ở thực vật pCAM/Hox24.

Việc sử dụng các promoter hoạt động liên tục như *35S*, *Ubiquitin* hay *Actin*... để biểu hiện gen quan tâm trong cây chuyển gen thường mang lại hiệu quả rõ rệt. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, sự biểu hiện liên tục của một gen đáp ứng điều kiện stress lại gây ảnh hưởng tiêu cực tới sinh trưởng và phát triển của thực vật trong điều kiện bình thường (Yi *et al.*, 2010). Một giải pháp cho vấn đề này là sử dụng các promoter chỉ cảm ứng hoạt động đặc hiệu trong những điều kiện stress nhất định, ví dụ như *RD29A* (*A. thaliana*), *Lip9*, *OsNAC6* và *OsLEA3-1* (lúa), *HVA22* (lúa mạch)... *OsHox24* là một trong số các promoter được phân lập từ lúa gân đáy, đã được chứng minh hoạt động đặc hiệu với điều kiện stress (Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six

drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60). Các dòng lúa được chuyển cấu trúc *Hox24:GUS* chỉ biểu hiện gen đích trong điều kiện stress, trong khi tốc độ sinh trưởng trong điều kiện bình thường cao hơn rõ rệt so với các dòng lúa biểu hiện liên tục gen chuyển, chứng tỏ sự hoạt động của promoter *OsHox24* không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây chuyển gen (Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60). Trong nghiên cứu này, đoạn DNA mang trình tự của promoter *OsHox24* đã được phân lập từ giống lúa Pusa Basmati 1. Trình tự promoter phân lập được cũng mang các yếu tố *cis* đáp ứng stress tương tự một số promoter đáp ứng stress đã

được nghiên cứu trước đây như ABRE, MYBRS, MYCRS, DRE, NACRS và ZFHDRS (Yi N, Kim YS, Jeong MH, Oh SJ, Jeong JS, Park SH, Jung H, Choi YD, Kim JK (2010) Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. *Planta* 232(3): 743-754.). Trình tự promoter *OsHox24* đã được chúng tôi đưa vào vector biểu hiện gen trong tế bào thực vật pCAMBIA1300 để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về hoạt động chức năng của promoter, từ đó hướng tới mục tiêu tạo ra giống cây trồng chuyển gen chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường, đồng thời vẫn cho năng suất ổn định trong điều kiện bình thường.



Hình 6. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAM/Hox24. (A) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/Hox24 bằng PCR; giếng 1 và 3: khuôn là pCAM/Hox24, giếng 2 và 4: đối chứng âm (khuôn là H₂O), giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi HYG-Fw/HYG-Rv, giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi HOX24-Fw/HOX24-Rv. (B) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAM/Hox24 bằng enzyme cắt giới hạn *HindIII/BamHI*; giếng 1: sản phẩm cắt giới hạn, giếng 2: pCAM/Hox24 nguyên bản. Giếng M: thang DNA 1kb.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp PCR, sử dụng mẫu DNA tổng số tách chiết từ giống lúa *Oryza sativa* Pusa Basmati 1, đã phân lập thành công promoter *Oshox24* cảm ứng với điều kiện stress. Đoạn trình tự promoter *Oshox24* phân lập đã được chúng tôi nhân dòng thành công vào vector pGEM-T và giải trình tự đầy đủ. Trình tự promoter *Oshox24* có mức độ tương đồng 90% so với trình tự promoter đã được công bố trên Ngân hàng gen Thế giới (mã số AP004868.3), có chứa 15 yếu tố hoạt hóa *cis* đáp ứng stress (thuộc 5 nhóm ABRE, MYBRS/MYCRS, DRE, NACRS, ZFHDRS) và một hộp TATA ở vị trí 1482-1488. Sản phẩm nhân dòng promoter *Oshox24* đã được đưa vào vector pCAMBIA1300 để tạo ra cấu trúc biểu hiện gen ở thực vật nhằm phục vụ các nghiên cứu chuyển gen đáp ứng stress.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen” (2014), thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Thủy sản. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Beatriz XC, Francisco ARO, Leonardo FE, Roberto RM (2011) Drought tolerance in crop plants. *Am J Plant Physiol* 5: 241-256.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville: 158-1203.

- Gao JP, Chao DY, Lin HX (2008) Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. *Rice* 1: 36-51.
- Jewell MC, Campbell BC, Godwin ID (2010) Transgenic plants for abiotic stress resistance. In *Transgenic Crop Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 67-132.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshiwara K (2012) Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res* 19: 37-49.
- Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47-60.
- Nguyễn Duy Phương, Phạm Thu Hằng, Phạm Xuân Hội (2014) Phân lập gen mã hóa OsNAC5 liên quan tới tính chống chịu stress từ giống lúa Indica. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 30(4): 40-47.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- Sanger F, Micklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Todaka D, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. *Rice* 5: 6.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.
- Yi N, Kim YS, Jeong MH, Oh SJ, Jeong JS, Park SH, Jung H, Choi YD, Kim JK (2010) Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. *Planta* 232(3): 743-754.

ISOLATION OF STRESS-INDUCIBLE PROMOTER *OSHOX24* FROM RICE

Pham Xuan Hoi^{1,✉}, Tran Thi Thuy Nga², Nguyen Duy Phuong¹

¹*Institute of Agricultural Genetics, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

²*University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

SUMMARY

Plant improvement based on plant transformation technology has become a popular trend all over the world. The isolation and characterization of a complete set of genes/promoters associated with abiotic stress and the cross-talk among salinity, drought or temperature stresses are required for success in generating abiotic stress-resistant varieties. Recently, several studies on model plants demonstrated that the stress-responsive genes under the control of rice promoter *Oshox24* were expressed specifically under stress conditions, while not affecting plant growth under normal conditions. In this study, we isolated DNA segments carrying the *Oshox24* promoter from an Indica rice variety by PCR using specific primers. The *Oshox24* promoter was cloned into the pGEM-T vector and fully sequenced. The nucleotide sequence of the isolated promoter *Oshox24* was 1612 bp in size and had similarity of 90% in comparison to the Japonica rice promoter *Oshox24* (published in GenBank as ID AP004868.3). Results of sequence analysis showed that the Indica *Oshox24* promoter contains 15 stress-responsive *cis*-acting elements including 5 important groups ABRE, MYBRS/MYCRS, DRE, NACRS and ZFHDRS, and a TATA box located at position 1482 to 1488, suggesting that *Oshox24* promoter plays an important role on regulation of abiotic stress inducible genes. The *Oshox24* promoter was inserted into the expression vector pCAMBIA1300 for generating abiotic stress resistant plants in the future.

✉ Author for correspondence: Tel: +84-4-37481321; E-mail: xuanhoi.pham@gmail.com

Keywords: *Gene transformation, Indica rice, Oshox24, promoter, stress*