

TĂNG CƯỜNG QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP TINH BỘT Ở CÂY MÔ HÌNH THUỐC LÁ THÔNG QUA VIỆC CHUYỂN GEN MÃ HÓA ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE CỦA VI KHUẨN

Lê Thu Ngọc¹, Nguyễn Mậu Hưng¹, Đinh Văn Hùng³, Nguyễn Thị Minh Hồng^{1,2}, Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Hồng Đức

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài: 23.9.2015

Ngày nhận đăng: 25.3.2016

TÓM TẮT

Tinh bột là polysaccharide dự trữ của thực vật, đóng vai trò quan trọng bậc nhất trong chế độ dinh dưỡng của con người cũng như nhiều loài động vật, đồng thời là nguyên liệu thô trong công nghiệp chế biến thực phẩm và công nghiệp vật liệu. Do đó, một trong các hướng nghiên cứu được quan tâm hiện nay là làm tăng hàm lượng tinh bột trong cây trồng trên cơ sở tăng cường hoạt động của một số gen mã hóa các enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột. ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase) đã được chứng minh là enzyme điều hòa quan trọng, điều chỉnh tốc độ phản ứng của toàn bộ chu trình sinh tổng hợp glycogen ở vi khuẩn và tinh bột ở thực vật. Trong nghiên cứu này, gen nhân tạo đã tối ưu mã *AGPopt* với kích thước 1,5 kb có nguồn gốc từ gen *glgC* mã hóa cho enzyme AGPase của vi khuẩn *E. coli* mang đột biến thay thế glycine bằng aspartic acid ở vị trí 393 nhằm giảm ái lực với các chất ức chế đã được nối ghép với vector chuyển gen thực vật và chuyển vào cây mô hình thuốc lá, hoạt động dưới sự điều khiển của promoter 35S. Sự tích hợp của gen *AGPopt* vào genome thực vật được khẳng định bằng kỹ thuật PCR và Southern blot, đồng thời phương pháp lai Western blot đã phát hiện sự biểu hiện của AGPase trong các dòng thuốc lá chuyển gen. Đặc biệt, phép đo hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá ở 7 dòng chuyển gen cho thấy có 5 dòng chứa lượng tinh bột trong lá cao hơn dòng đối chứng không chuyển gen, trong đó 1 dòng có mức tăng cao nhất là 56%, 4 dòng còn lại có mức tăng từ 18%-44%. Những bằng chứng này bước đầu cho thấy việc biểu hiện gen *AGPopt* là một chiến lược hiệu quả giúp tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở thực vật.

Từ khóa: ADP-Glc pyrophosphorylase, gen *glgC*, sinh tổng hợp tinh bột, thuốc lá biến đổi gen

MỞ ĐẦU

Tinh bột là dạng dự trữ carbon quan trọng nhất ở các sinh vật nhân chuẩn quang hợp hoặc một số loài phát sinh không có khả năng quang hợp như ký sinh trùng ngành Apicomplexa và nhóm tảo đơn bào hai roi (Ball & Morell, 2003). Về cấu tạo, tinh bột là một glucose polymer gồm các đơn phân α -glucan nối với nhau bằng liên kết α -1,4 và phân nhánh ở các vị trí liên kết α -1,6 (Ball *et al.*, 1996). Ở thực vật bậc cao, tinh bột được tổng hợp trong lục thể (plastid) của cả các tế bào quang hợp và không quang hợp. Là carbohydrate dự trữ chủ yếu, tinh bột đóng vai trò quan trọng trong suốt chu kỳ sống của thực vật. Trong lá, một phần nhỏ carbon đồng hóa thông qua quang hợp được giữ lại trong lục lạp (chloroplast) ở dạng tinh bột chứ không được chuyển hóa thành sucrose để vận chuyển đến các bộ phận khác. Dạng

tinh bột tạm thời này sẽ được phân hủy vào ban đêm để cung cấp cơ chất cho quá trình hô hấp ở lá và tiếp tục tổng hợp sucrose cho việc phát triển khác của cây. Sự cung cấp carbon từ tinh bột được cho là cần thiết cho sự sống và sinh trưởng bình thường của cây (Smith, Stitt, 2007). Trong các cơ quan không diễn ra quá trình quang hợp như thân, rễ, củ và hạt, sucrose có thể được chuyển hóa thành một lượng lớn tinh bột dự trữ trong một loại lục thể chuyên biệt gọi là bột lạp (amyloplast). Tinh bột lưu trữ sẽ được tái huy động để hỗ trợ các pha sinh trưởng của cây như tạo cây con sau khi nảy mầm hoặc khi cây cần nguồn carbon cho một số quá trình đặc biệt như tiết mật hoa (Fincher, 1989; Razem *et al.*, 1999). Với vai trò dinh dưỡng là nguồn cung cấp calo, hầu hết tinh bột của cây trồng đều dùng trực tiếp làm thực phẩm cho con người hoặc thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, nhu cầu sử dụng tinh bột trong công nghiệp đang ngày một tăng

lên do những tính chất lý hóa của chúng như dùng làm chất tạo độ sánh nhớt cho thực phẩm dạng lỏng, là tác nhân làm bền cho thực phẩm dạng keo, là yếu tố kết dính và làm đặc, tạo độ cứng và đàn hồi cho nhiều thực phẩm. Đặc biệt tinh bột đang là nguồn vật liệu chủ yếu cho thể hệ nguyên liệu sinh học đầu tiên do đặc tính dễ lên men (Zeeman *et al.*, 2010).

Quá trình tổng hợp tinh bột bao gồm ba bước quan trọng xảy ra trong lục lạp và bột lạp: i) Cung cấp Glc-6-P vào trong các lạp thể, ii) Tổng hợp ADP-Glc từ Glc-1-P, và iii) Tổng hợp tinh bột từ ADP-Glc (Alisdair *et al.*, 2002). Như vậy, bước phân ứng không thể thiếu, tạo ra cơ chất cho con đường sinh tổng hợp tinh bột là sự tổng hợp ADP-Glc từ Glc-1-P và ATP được xúc tác bởi ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase). ADP-Glc là phân tử đường môi đồng vai trò chất cho (glucosyl donor) trong phản ứng tổng hợp chuỗi α -glucan được xúc tác bởi các enzyme tổng hợp tinh bột (starch synthase) (Munyikwa *et al.*, 1997). Nhiều nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh AGPase là một enzyme điều hòa trong con đường sinh tổng hợp glycogen ở vi khuẩn và tinh bột ở thực vật. Ở *E. coli* và *Salmonella*, bằng phương pháp gây đột biến hóa học, người ta đã thu được một số dạng đột biến về khả năng tích lũy glycogen, trong đó AGPase của chúng có các đặc tính điều hòa đã bị biến đổi. Kết quả phân tích cho thấy có mối liên hệ trực tiếp giữa ái lực của AGPase với chất hoạt hóa Fruc-1,6-bisP và khả năng tích lũy glycogen của các thể đột biến (Ballicora *et al.*, 2003). Khi nghiên cứu trên các sinh vật quang hợp sản sinh oxy, cụ thể ở tảo lục đơn bào *Chlamydomonas reinhardtii*, Ball và đồng tác giả (1991) đã phân lập được các thể đột biến thiếu hụt tinh bột và thấy rằng AGPase của chúng không được hoạt hóa bởi 3-phosphoglyceric acid (3-PGA). Các dữ liệu thực nghiệm so sánh khác cũng chứng minh sự điều hòa dị lập thể của AGPase đóng vai trò quan trọng về mặt sinh lý trong cả mô quang hợp và không quang hợp ở thực vật bậc cao (Giroux *et al.*, 1996; Smidansky *et al.*, 2002). Như vậy, con đường sinh tổng hợp glycogen ở vi khuẩn và tinh bột ở thực vật được điều hòa một cách hiệu quả ở bước đầu tiên – tổng hợp cơ chất ADP-Glc xúc tác bởi AGPase.

Ở thực vật, AGPase là một protein có cấu trúc dị tứ phân (heterotetramer) phức tạp, được tạo thành từ 2 chuỗi polypeptide riêng biệt là một cặp tiểu đơn vị lớn (large subunit) và một cặp tiểu đơn vị nhỏ (small subunit), hai tiểu đơn vị này được mã hóa bởi hai gen khác nhau. Tiểu đơn vị lớn có kích thước 54-60

kDa, trong khi kích thước tiểu đơn vị nhỏ là 51-54 kDa tùy loài thực vật (Martin and Smith, 1995). Các nghiên cứu đã chỉ ra hai tiểu đơn vị có vai trò khác nhau, trong đó tiểu đơn vị nhỏ được cho là có cả chức năng xúc tác và điều hòa, còn tiểu đơn vị lớn chủ yếu chịu trách nhiệm điều hòa các đặc tính dị lập thể của tiểu đơn vị nhỏ (Frueauf *et al.*, 2003; Baris *et al.*, 2009), tuy nhiên cả hai đều cần thiết để AGPase hoạt động hiệu quả nhất (Frueauf *et al.*, 2001; Tiessen *et al.*, 2002). Yêu cầu này khiến cho việc tác động về mặt di truyền đến AGPase ở thực vật là một thách thức vì đòi hỏi phải cải biến sự biểu hiện hoặc hoạt động của nhiều gen. Thêm vào đó, AGPase thực vật được hoạt hóa bởi 3-PGA, bị ức chế bởi photphate vô cơ (Pi) và được điều hòa bởi trạng thái oxy hóa khử của tế bào (Ballicora *et al.*, 2000; Tiessen *et al.*, 2002; Geigenberger, 2003). Trong khi đó, AGPase vi khuẩn là một protein có cấu trúc đồng tứ phân (homotetrameric) và được điều hòa bởi các chất tác động khác với ở thực vật. Enzyme này được hoạt hóa bởi Fruc-1,6-bisP và bị ức chế bởi adenosine monophosphate (AMP) (Morán *et al.*, 2007). AGPase ở vi khuẩn *E. coli* được mã hóa bởi đơn gen *glgC* và một điều quan trọng là có hoạt tính mạnh gấp vài trăm lần so với AGPase thực vật. Ngoài ra, các nghiên cứu đã xác định được một số vị trí được cho là các điểm điều hòa dị lập thể quan trọng. Người ta thấy rằng AGPase *E. coli* mang đột biến điểm thay thế glycine bằng aspartic acid ở vị trí 336 (G336D) có thể hoạt động hiệu quả mà không cần chất hoạt hóa Fruc-1,6-bisP, có ái lực cao hơn với cơ chất (ATP và Glc-1-P) và giảm ái lực với chất ức chế AMP (Ihemere *et al.*, 2006). Kết quả chuyển và biểu hiện đặc hiệu gen này trong củ khoai tây (dưới sự điều khiển của promoter patatin) cho thấy hoạt tính AGPase tăng 36%, đồng thời tăng 35% hàm lượng tinh bột trong củ (Stark *et al.*, 1992).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế vector chuyển gen vào thực vật mang gen *AGPopt* có nguồn gốc từ gen *glgC* ở *E. coli* mã hóa cho enzyme AGPase đã được tạo đột biến G336D và cải biến mã để phù hợp với hệ thống tổng hợp protein ở thực vật; tạo các dòng thuộc lá chuyển gen biểu hiện AGPase vi khuẩn được định hướng tới lục lạp dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S và đánh giá tác động của enzyme này tới quá trình sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột trong lá các dòng chuyển gen. Kết quả của nghiên cứu này sẽ góp phần tạo tiền đề cho các chiến lược nâng cao sản lượng tinh bột ở cây trồng bằng công nghệ gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*; vector tách dòng pUC/AGPopt mang gen *AGPopt* được tổng hợp nhân tạo bởi hãng IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ), vector chuyển gen vào thực vật pBI121; chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2260 do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Thu thập thông tin, tối ưu hóa mã di truyền và tổng hợp nhân tạo gen *AGPopt*

Tim kiếm và khai thác thông tin trình tự nucleotide của gen *glgC* mã hóa cho enzyme AGPase ở vi khuẩn *E. coli* trên ngân hàng GenBank (mã số V00281.1), cải biến trình tự để tạo đột biến G336D. Tối ưu hóa mã di truyền bằng chương trình Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) và Codon Optimization 2.0 của Invitrogen. Đoạn nucleotide mã hóa cho chuỗi peptide tín hiệu dẫn protein vào lục lạp có nguồn gốc từ gen *rbcS* mã hóa tiểu phần nhỏ của enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase ở *Arabidopsis* được gắn vào đầu 5', đồng thời trình tự mã hóa cho đuôi c-myc được gắn vào đầu 3' của đoạn DNA. Hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI* được thêm vào đầu 5' và 3' của gen, theo thứ tự tương ứng. Gen *AGPopt* được đặt tổng hợp nhân tạo tại hãng Integrated DNA Technologies (Mỹ) và được nhân dòng trong vector pUCIDT-AMP.

Thiết kế vector chuyển gen vào thực vật mang gen *AGPopt*

Vector tách dòng pUCIDT-AMP mang gen nhân tạo *AGPopt* và vector chuyển gen pBI121 đồng thời được cắt tạo đầu sole bằng cặp enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI*. Đoạn gen *AGPopt* nhân tạo và vector pBI121 thu được sau khi tinh sạch được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép dưới sự xúc tác của T4-DNA ligase. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E. coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Vector chuyển gen tái tổ hợp pBI121/AGPopt sau khi được kiểm tra bằng cách cắt enzyme hạn chế được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* C58/pGV2260 bằng phương pháp xung điện phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

Phương pháp chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Quy trình chuyển gen *AGPopt* vào giống thuốc lá *N. tabacum* K326 thông qua *Agrobacterium* được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) có cải tiến. Mảnh lá thuốc lá có diện tích 1cm² được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen pBI121/AGPopt có OD₆₀₀ = 0,7 trong khoảng 10-20 phút và được đặt lên môi trường tạo đa chồi MS+1 mg/l BAP. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, chuyển mảnh lá sang môi trường chọn lọc MS+1 mg/l BAP có bổ sung kháng sinh cefotaxim 500 mg/l và kanamycine 50 mg/l. Sau 5 - 6 tuần, các chồi phát triển tốt được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ MS + 0,1 mg/l NAA. Sau 3 - 4 tuần cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3-4 lá thật sẵn sàng cho ra bầu trấu : cát (1:1). Cây phát triển với 4-5 lá thật thì chuyển ra trồng trong bầu chứa giá thể dưới điều kiện nhà kính

Phân tích cây chuyển gen bằng các kỹ thuật sinh học phân tử

Kỹ thuật PCR

Sử dụng DNA tổng số tách chiết từ lá các dòng thuốc lá chuyển gen và pha loãng tới nồng độ 100 ng/ μ l làm khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *AGPopt* bằng cặp mồi đặc hiệu *AGPopt_F* (5'-ATGGCAAGCATGATTCTAGTAGT-3') và *AGPopt_R* (5'-CAGTTCATCTTTATTAAGGTC-3'). Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 20 μ l gồm: 1 μ l DNA, 10 μ l DreamTaq PCR Master Mix 2X, 1 μ l mồi xuôi, 1 μ l mồi ngược và 7 μ l nước khử ion vô trùng. Quá trình nhân gen gồm các bước sau: 94°C/3 phút; 30 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/1 phút, 57°C/30 giây, 72°C/1 phút; 72°C/10 phút, bảo quản mẫu ở 4°C.

Kỹ thuật lai Southern blot

60 μ g DNA tổng số tách chiết từ lá các dòng thuốc lá chuyển gen dương tính với phản ứng PCR được tinh sạch và xử lý bằng *XbaI*. Các phân đoạn DNA được phân tách trên gel agarose 1% và chuyển sang màng Nilon tích điện dương. Màng sau đó được lai với mẫu dò được tổng hợp nhờ bộ Kit Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) với đoạn dò là sản phẩm PCR nhân gen *AGPopt*. Nhiệt độ lai 42°C (với dung dịch lai chứa 50% formamide và NaCl 1M) và rửa màng ở 65°C (0,1X SSC). Quy trình hiện màng được thực hiện theo kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Scientific).

Kỹ thuật lai Western blot

0,1 g lá các dòng thuốc lá chuyển gen được nghiền mịn trong nitor lỏng và hòa trong 500 μ l dung dịch đệm chiết (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM $MgCl_2$; 2 mM DTT; 2,5 mM PMSF; 0,1% Triton-X-100). Hỗn hợp sau đó được ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu dịch nổi có chứa protein. Nồng độ các mẫu protein tổng số được định lượng bằng phương pháp Bradford. 30 μ g protein tổng số tách chiết từ mỗi dòng thuốc lá được phân tách bằng điện di SDS-PAGE trên gel 12%, sau đó được chuyển lên màng Nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter của hãng Thermo Scientific Pierce ở 25 V, 1,3 A trong 20 phút. Sau khi phủ màng bằng sữa tách béo 5% pha trong PBST 0.05% trong 3 giờ, màng được ủ với kháng thể 1 anti-cmyc qua đêm trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 3 giờ. Sự có mặt của protein tái tổ hợp được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate).

Phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột trong lá

Các bước xác định hàm lượng tinh bột trong lá các dòng thuốc lá chuyển gen được thực hiện theo hướng dẫn của bộ Kit phân tích tinh bột (Starch (HK) Assay Kit, Sigma).

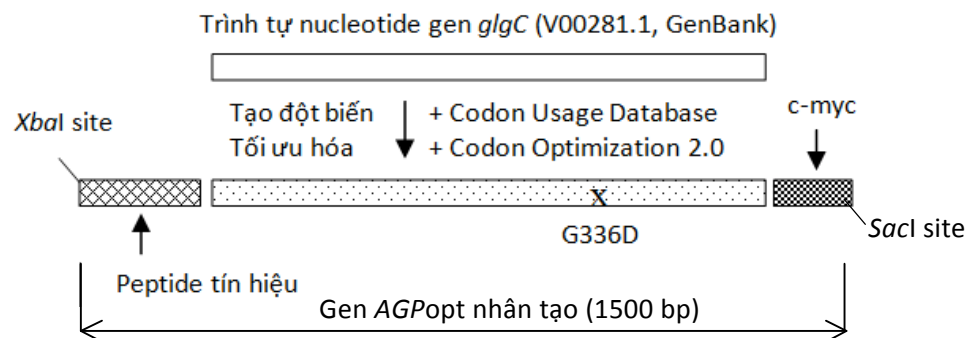
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cải biến, tối ưu mã di truyền và tổng hợp nhân tạo gen *AGPopt*

Thực vật được xem là hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp với nhiều điểm khác biệt so với hệ thống biểu hiện vi khuẩn. Sự biểu hiện của gen đích trong hệ thống thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong

đó có mã di truyền, promoter và terminator... Mỗi một loài thực vật có các mã di truyền ưu tiên khác nhau. Do đó, việc cải biến mã di truyền mà không làm thay đổi trình tự amino acid sẽ giúp cho việc tăng cường sự biểu hiện protein tái tổ hợp. Sơ đồ quá trình thiết kế gen nhân tạo *AGPopt* được thể hiện ở hình 1.

Sau khi tạo đột biến G336D, việc tối ưu mã di truyền được chúng tôi thực hiện dựa trên cơ sở các bộ mã thay đổi sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở thực vật nhưng không làm thay đổi trình tự của amino acid. Trình tự nucleotide và trình tự acid amin suy diễn của các đoạn gen trước và sau khi đổi mã được kiểm tra và so sánh bằng phần mềm BioEdit. Kết quả cho thấy, gen *glgC* và gen *AGPopt* đã cải biến mã có trình tự nucleotide tương đồng 74%. Tuy nhiên ngoài vị trí tạo đột biến G336D, các vị trí sai khác còn lại không làm ảnh hưởng đến quá trình dịch mã (không công bố). Ngoài ra, gen *AGPopt* còn được gắn thêm đoạn trình tự 171 nucleotide mã hóa cho 57 amino acid của chuỗi peptide tín hiệu dẫn protein vào lục lạp có nguồn gốc từ gen *rbcS* mã hóa tiểu phần nhỏ của ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase ở *Arabidopsis* vào đầu 5', trong khi đó đầu 3' được bổ sung 48 nucleotide mã hóa cho 11 amino acid trong đuôi c-myc (giúp phát hiện protein tái tổ hợp thông qua phương pháp lai Western). Đồng thời, để thuận tiện cho việc cắt và nối ghép gen trong quá trình thiết kế vector chuyển gen vào thực vật, hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI* được thêm vào đầu 5' và 3' của gen *AGPopt*, theo thứ tự tương ứng. Gen *AGPopt* sau khi thiết kế có kích thước 1500 bp được tổng hợp nhân tạo tại hãng Integrated DNA Technologies (Mỹ) và được nhân dòng trong vector pUCIDT-AMP.



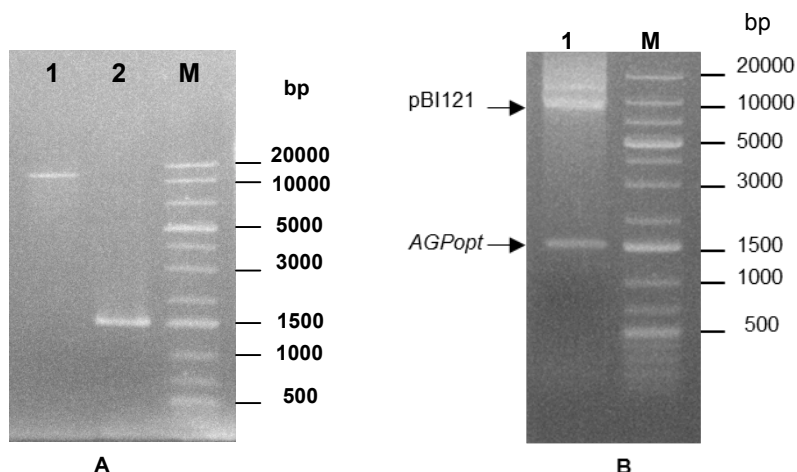
Hình 1. Sơ đồ thiết kế gen *AGPopt* nhân tạo.

Thiết kế vector chuyển gen vào thực vật pBI121/AGPopt

Như đã trình bày ở trên, do trong quá trình thiết kế vị trí nhận biết của cặp enzyme giới hạn *Xba*I và *Sac*I đã được thêm vào 2 đầu của gen *AGPopt*, điều này tạo thuận lợi cho việc cắt nối gen trong thí nghiệm tiếp theo. Theo đó, các vector pUC/AGPopt và pBI121 được xử lý đồng thời bằng cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I. Đoạn gen *AGPopt* và vector pBI121 đã loại bỏ gen *gus* sau khi tinh sạch (Hình 2A) được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép dưới sự xúc tác của T4-DNA ligase tạo thành vector tái tổ hợp pBI121/AGPopt và được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Vector tái tổ hợp này được khẳng định bằng phản ứng PCR nhân gen *AGPopt* (không công

bổ) sử dụng môi đặc hiệu AGPopt_F/R và cắt kiểm tra bằng cặp giới hạn *Xba*I và *Sac*I.

Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 2B) cho thấy: sản phẩm của phản ứng cắt vector tái tổ hợp bằng cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I là hai băng DNA, trong đó một băng có kích thước 1,5 kb tương ứng với gen *AGPopt* và băng còn lại có kích thước lớn hơn 10 kb phù hợp với phần còn lại của vector pBI121. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen pBI121/AGPopt. Vector này sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/pGV 2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

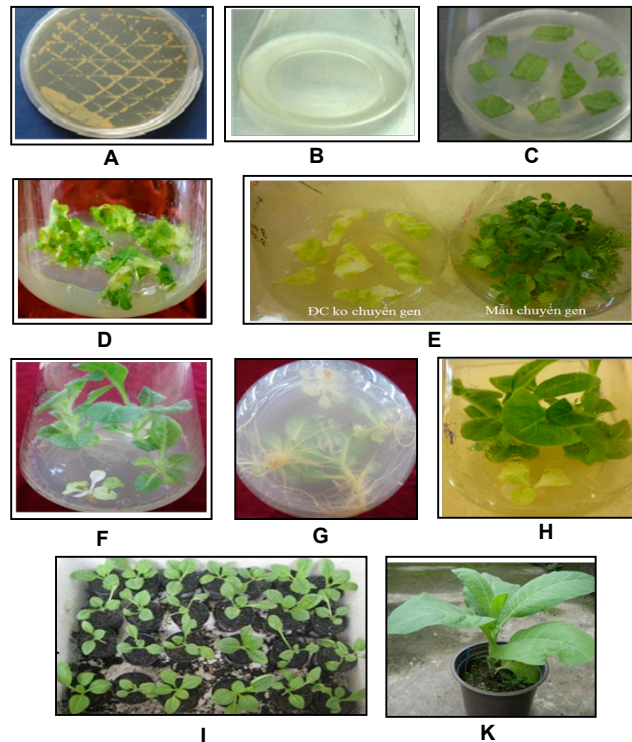


Hình 2. Kết quả thiết kế vector chuyển gen pBI121/AGPopt. (A) Tinh sạch đoạn gen *AGPopt* (2) và vector pBI121 đã xử lý loại bỏ gen *gus* (1) bằng cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I. (B) Kết quả cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pBI121/AGPopt bằng cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I (1); M: Thang DNA chuẩn 1kb Plus, Thermo Scientific.

Kết quả tạo các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt*

Trong chuyển gen thực vật, cây thuốc lá được xem là loại cây mô hình phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá chức năng gen bởi hệ thống tái sinh và tiếp nhận gen ngoại lai của cây rất hiệu quả, thời gian phân hóa từ mô đến tạo cây hoàn chỉnh khá ngắn, mặt khác cây thuốc lá là cây ngắn ngày, dễ trồng và chăm sóc nên dễ dàng thu được hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Bởi vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn cây thuốc lá làm cây mô hình để đánh giá ảnh hưởng của việc biểu hiện gen *AGPopt* đến quá trình sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột. Kết quả

chuyển gen *AGPopt* vào mảnh lá thuốc lá thông qua *Agrobacterium* cho thấy, sau khoảng 3 tuần từ các mảnh lá biến nạp đa số đều mọc lên các cụm chồi ở mép lá, tỉ lệ mẫu tạo đa chồi khá cao, đạt 81%. Trong khi đó, mẫu đối chứng âm không chuyển gen khi đặt trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l đều bị chết dần đi và hầu hết không thấy hiện tượng phát sinh chồi (Hình 3). Từ các cụm chồi, chúng tôi chọn 60 chồi khỏe, mập mạp chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc trong kháng sinh. Sau 4 tuần, chúng tôi thu được 53 cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3-4 lá thật để ra bầu trấu cát và trồng ngoài nhà lưới (Hình 3).

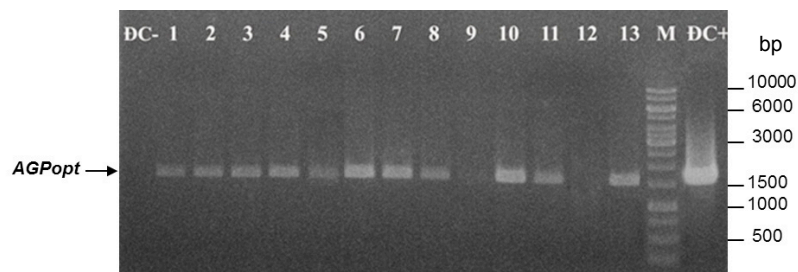


Hình 3. Một số hình ảnh chuyển gen *AGPopt* vào thuốc lá thông qua *Agrobacterium*. A: Khuẩn *Agrobacterium*, B: Dịch huyền phù vi khuẩn, C: Mẫu lá trên môi trường đồng nuôi cấy, D: Mẫu biến nạp sau 3 tuần trên môi trường tạo đa chồi, E: Mẫu biến nạp sau 5 tuần trên môi trường tạo đa chồi, F: Chồi trên môi trường ra rễ, G: Chồi ra rễ trên môi trường ra rễ sau 2 tuần, H: Cây hoàn chỉnh, I: Cây ra bầu trấu cát, K: Cây trồng trong nhà lưới sau 2 tuần.

Kiểm tra sự có mặt của gen *AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và Southern blot.

PCR là kỹ thuật phổ biến và đơn giản để bước đầu sàng lọc các dòng cây chuyển gen. Kết quả của phản ứng cho phép khẳng định sự tồn tại hay không của gen chuyển trong genome của cây kiểm tra. Chúng tôi sử dụng 200 ng DNA tổng số tách chiết từ lá 30 dòng thuốc lá chuyển gen 3 tuần tuổi được chọn ngẫu nhiên làm khuôn cho phản ứng PCR nhân

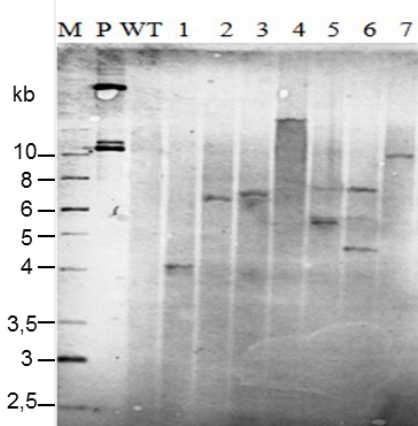
gen *AGPopt* với cặp mồi đặc hiệu *AGPopt*_F/R. Đồng thời, vector chuyển gen *pBI121/AGPopt* và DNA tổng số tách chiết từ lá cây thuốc lá không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm cho phản ứng. Hình ảnh điện di cho thấy có 27 dòng thuốc lá cho kết quả PCR dương tính với kích thước băng DNA sản phẩm là 1,5 kb tương ứng với gen *AGPopt* (Hình 4). Điều này chứng tỏ gen *AGPopt* có khả năng đã được chuyển thành công vào các dòng thuốc lá này.



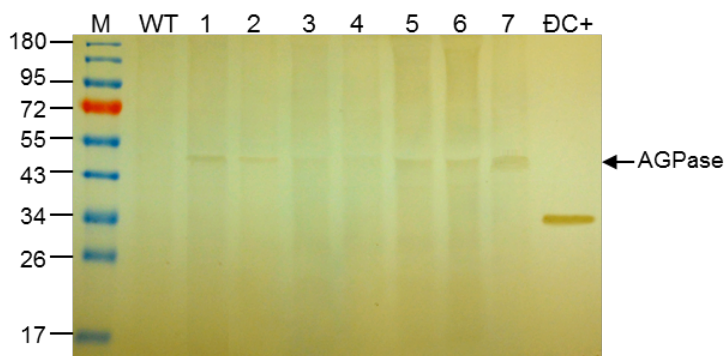
Hình 4. Điện di sản phẩm phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen *AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen 1-13: Các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt*, DC-: cây WT, DC+: phản ứng PCR sử dụng khuôn DNA là plasmid *pBI121/AGPopt*, M: thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific).

Đối với các dòng thuốc lá được xác định có mang gen *AGPopt*, chúng tôi tiếp tục tiến hành lai Southern blot để khẳng định sự tích hợp cũng như số lượng bản copy của gen chuyển trong genome cây chủ. Trên màng lai, mỗi băng tương ứng với 1 bản copy của gen *AGPopt* vì chúng tôi xử lý DNA tổng số của các dòng thuốc lá chuyển gen bằng *XbaI* là enzyme có điểm cắt duy nhất trong cassette. Phân tích lai Southern blot ở 7 dòng thuốc lá (Hình 5) cho thấy các dòng này đều xuất hiện 1 băng (dòng 1, 2, 3, 4, 7) hoặc 2 băng (dòng 5, 6) tương ứng với 1 hoặc 2 bản sao của gen *AGPopt* trong genome. Kích

thước của các băng không đồng đều cho thấy vị trí gắn của gen chuyển trong genome là khác nhau. Trong khi đó đối chứng không chuyển gen cho kết quả âm tính chứng tỏ phản ứng lai là đặc hiệu, mẫu dò không liên kết với gen nội sinh. Như vậy, gen *AGPopt* đã được chuyển thành công vào các dòng thuốc lá K326. Một số nghiên cứu cho thấy không chỉ số lượng bản copy gây ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen mà vị trí chèn của gen chuyển trong genome cũng đóng vai trò rất quan trọng (Yang *et al.*, 2013). Vì vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo để đánh giá khả năng biểu hiện gen ở các dòng cây.



Hình 5. Kết quả lai Southern blot các mẫu thuốc lá chuyển gen *AGPopt* (1-7); P: đối chứng dương plasmid pBI121/AGPopt; WT: đối chứng âm cây không chuyển gen; M: thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific).



Hình 6. Kết quả lai Western blot kiểm tra sự biểu hiện của gen *AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen (1-7); WT: đối chứng âm cây không chuyển gen; ĐC+: 25 ng protein ScFv_cmyc; M: marker protein (Thermo Scientific).

Đánh giá sự biểu hiện của gen *AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp Western blot.

Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp là đích đến quan trọng trong quá trình chuyển gen vào thực vật. Do trong trình tự của gen *AGPopt* chúng tôi đã thiết

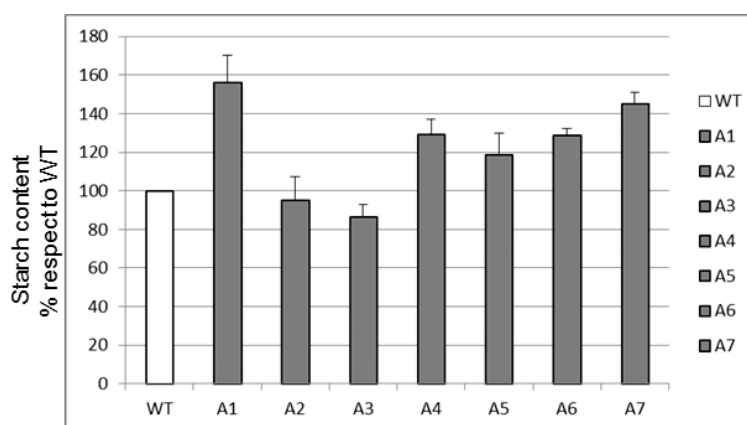
kế sẵn trình tự mã hóa cho đuôi c-myc ở đầu 3' nên để khẳng định một cách chắc chắn gen chuyển đã hoạt động và biểu hiện trong các dòng thuốc lá chuyển gen chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật lai Western blot sử dụng kháng thể anti-c-myc. Gen *AGPopt* nhân tạo có kích thước 1500 bp nên

theo tính toán lý thuyết, protein AGPase tái tổ hợp sau khi được tổng hợp sẽ có khối lượng phân tử khoảng 53 kDa. Kết quả lai Western blot (Hình 6) cho thấy tại các đường chạy protein tổng số tách chiết từ lá 7 dòng thuốc lá chuyển gen xuất hiện một băng vạch phù hợp với kích thước protein đích, trong khi ở dòng đối chứng âm không xuất hiện băng protein này. Điều này chứng tỏ protein tái tổ hợp AGPase đã được biểu hiện trong các dòng thuốc lá chuyển gen. Qua độ đậm nhạt của băng protein trên màng lai có thể thấy mức độ biểu hiện của gen chuyển ở các dòng thuốc lá là khác nhau. Cụ thể, ở dòng số 7 gen *AGPopt* biểu hiện mạnh hơn ở các dòng còn lại, đồng thời gen này biểu hiện yếu nhất ở dòng số 3 và 4. Điều này có thể được giải thích do cấu trúc gen chuyển đã được chèn vào các vùng khác nhau trong hệ gen cây chủ, gây ảnh hưởng đến sự hoạt động cũng như mức độ biểu hiện của gen ngoại lai. Kết quả lai Western blot cho phép chúng tôi khẳng định gen *AGPopt* đã hoạt động và protein tái tổ hợp AGPase của vi khuẩn đã được tổng hợp trong cây chủ.

Phân tích hàm lượng tinh bột trong lá các dòng thuốc lá chuyển gen

Phép đo hàm lượng tinh bột trong lá bằng phương pháp enzyme sử dụng bộ Kit Starch (HK) Assay được thực hiện dựa trên nguyên lý: i) Tinh bột được thủy phân thành glucose dưới sự xúc tác của amyloglucosidase; ii) Glucose tiếp tục được phosphoryl hóa bởi ATP trong phản ứng được xúc tác bởi hexokinase tạo thành Gluc-6P; iii) Gluc-6P sau đó bị oxy hóa thành 6-phosphogluconate khi có mặt NAD dưới sự xúc tác của glucose-6-phosphate

dehydrogenase (G6PDH), quá trình này đồng thời khử NAD thành NADH là chất hấp thụ ánh sáng có bước sóng 340 nm. Do đó, mức tăng độ hấp thụ ở 340 nm tỷ lệ thuận với nồng độ glucose và gián tiếp là hàm lượng tinh bột. Trong thí nghiệm này, để đảm bảo độ chính xác của kết quả, chúng tôi đã tiến hành chiết các mẫu lá 2 lần với cồn 80% và 1 lần với cồn 99% nhằm loại bỏ hoàn toàn lượng đường tự do có trong mẫu trước khi tiến hành các phản ứng enzyme. Kết quả xác định hàm lượng tinh bột cho thấy trong số 7 dòng thuốc lá chuyển gen được khảo nghiệm có 5 dòng chứa lượng tinh bột trong lá cao hơn dòng đối chứng không chuyển gen. Trong đó, hàm lượng tinh bột ở lá của dòng A1 đạt mức cao nhất, nhiều hơn 56% so với cây đối chứng, 4 dòng còn lại (A4, A5, A6 và A7) có mức tăng từ 18%-44%. Tuy nhiên, ở dòng thuốc lá chuyển gen A2 và A3, lượng tinh bột tích lũy trong lá được ghi nhận thấp hơn cây không chuyển gen. Ngoài ra, mức độ tăng hàm lượng tinh bột trong lá ở các dòng không tuyệt đối tương quan với mức độ biểu hiện protein AGPase vi khuẩn. Một số kết quả tương tự đã được báo cáo bởi Stark và đồng tác giả (1992) khi tiến hành chuyển gen *glgC16* do promoter patatin đặc hiệu củ điều khiển vào cây khoai tây. Hiện tượng hàm lượng tinh bột không tuyệt đối phụ thuộc vào mức độ biểu hiện của AGPase vi khuẩn được giải thích theo hai khả năng: việc biểu hiện ở một mức độ vừa phải nào đó của AGPase vi khuẩn là đủ để khắc phục tình trạng thiếu hụt cơ chất ADP-Glc cho sự sinh tổng hợp tinh bột, hoặc một khả năng khác có thể do lượng cơ chất Glc-1-P dùng cho phản ứng ADP-Glc pyrophosphorylase bản thân nó cũng là một bước giới hạn tốc độ.



Hình 7. Hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt* so với dòng đối chứng không chuyển gen A1-A7: các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt*, WT: cây không chuyển gen

KẾT LUẬN

Dựa vào trình tự của gen *glgC* trên GenBank với mã số V00281.1, chúng tôi đã cải biến và tổng hợp nhân tạo gen *AGPopt* mã hóa cho enzyme AGPase ở vi khuẩn *E. coli* mang đột biến G336D đồng thời được biểu hiện định hướng trong lục lạp với mã di truyền phù hợp với hệ thống thực vật. Gen *AGPopt* với kích thước 1500 bp đã được nối ghép thành công vào vector chuyển gen pBI121 dưới sự điều khiển của promoter 35S và chuyển vào cây mô hình thuốc lá. Sự hoạt động của cấu trúc 35S-*AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen đã được chứng minh giúp tăng hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá từ 18-56% so với cây đối chứng không chuyển gen. Kết quả này bước đầu cho thấy việc biểu hiện gen *AGPopt* là một chiến lược hiệu quả giúp tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở thực vật.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài “Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sản Việt Nam nhằm phát triển các giống sản có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen” thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ; thời gian thực hiện từ 6/2012 đến 6/2015. Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được tiến hành tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alisdair RF, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci* 7: 35-41.

Ball S & Morell M (2003) From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 54: 207-233.

Ball S, Guan H-P, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buleon A, Colonna P, Preiss J (1996) From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86: 349-352.

Ball S, Marianne T, Dirick L, Fresnoy M, Delrue B, Decq A (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low starch mutant is defective for 3-phospho-glycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 185: 17-26.

Ballicora M, Frueauf JB, Fu Y, Shurmann P, Preiss J (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose

pyrophosphorylase by thioredoxin. *J Biol Chem* 275: 1315-1320.

Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase; a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 213-225.

Baris I, Tuncel A, Ozber N, Keskin O, Kavakli IH (2009) Investigation of the interaction between the large and small subunits of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *PLoS Comput Biol* 5 (10): 1-14.

Fincher GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 40: 305-46.

Frueauf JB, Ballicora MA, Preiss J (2001) Aspartate residue 142 is important for catalysis by ADP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276 (46): 319-325.

Frueauf JB, Ballicora MA, Preiss J (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: site-directed mutagenesis of homologous aspartic acid residues in the small and large subunits. *Plant Journal* 33: 503-511.

Geigenberger P (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J Exp Bot* 54: 457-465.

Giroux MJ, Shaw J, Barry G, Cobb BJ, Greene T, Okita T, Hannah LC (1996) A single gene mutation that increases maize seed weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5824-5829.

Ihemere U, Arias-Garzon D, Lawrence S, Sayre R (2006) Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnol J* 4 (4): 453-65.

Morán-Zorzano MT, Viale AM, Muñoz FJ, Alonso-Casajús N, Eydallín GG, Zugasti B, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J (2007) *Escherichia coli* AspP activity is enhanced by macromolecular crowding and by both glucose-1,6-bisphosphate and nucleotide-sugars. *FEBS Lett* 581 (5): 1035-1040.

Munyikwa TRI, Langeveld S, Salehuzzaman SNIM, Jacobsen E, Visser RGF (1997) Cassava starch biosynthesis: new avenues for modifying starch quantity and quality. *Euphytica* 96: 65-75.

Razem FA, Davis AR (1999) Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. *Protoplasma* 206: 57-72.

Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ (2002) Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1724-1729.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30: 1126-1149.

Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore G (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* 258: 287-292.


Tiessen A, Hendriks JH, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM, Geigenberger P (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-transcriptional redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14: 2191–2213.

Topping JF (1998) Tobacco transformation. *Methods in Molecular Biology* 81: 365–372.

Yang X, Li F, Zhang X, Liu K, Wang Q, Zhang C, Liu C, Zhu W, Shan G, Chin CK, Fang W (2013) Integration and characterization of T-DNA insertion in upland cotton. *Czech J Genet Plant Breed* 49: 51-57.

Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 209-234.

ENHANCEMENT OF STARCH PRODUCTION IN TOBACCO THROUGH TRANSFER OF THE GENE ENCODING BACTERIAL ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE

Le Thu Ngọc¹, Nguyen Mau Hung¹, Dinh Van Hung³, Nguyen Thi Minh Hong^{1,2}, Pham Bich Ngoc¹, , Chu Hoang Ha¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (IBT, VAST)*


²*Hong Duc University (HDU)*

³*Thai Nguyen University of Science (TNUS)*

SUMMARY

Starch is the primary storage polysaccharide in plants. It not only plays a role as the most important nutritional component in the diet of humans and many animal species, but is also a raw material in the food processing industry or material industry. Therefore, a current research direction is the improvement of crops by increasing starch yields based on enhancing the activity of key enzymes involved in starch biosynthesis by genetic engineering. ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase) is an important regulatory enzyme for synthesis of glycogen in bacteria and starch in plants. In this paper, the 1.5 kb synthetic mutant of *AGPopt* gene derived from *E. coli* AGPase was inserted into the plant expression vector pBI121 under the control of 35S promoter. The efficiency of this construct was tested in transgenic *Nicotiana tabacum*. The integration of *AGPopt* into the plant genome was confirmed by PCR and Southern hybridization, and the expression of bacterial AGPase in transgenic lines was detected by Western hybridization. Interestingly, starch assays in 7 tobacco transgenic lines resulted in 5 lines displaying an increase in the levels of starch accumulated in the leaves, approximately 18%–56% higher than those of WT plants. These results indicate that the expression of *AGPopt* is one of effective strategies for enhanced starch production in plant.

Keywords: ADP-Glc pyrophosphorylase, *glgC* gene, starch biosynthesis, tobacco transgenic plant

 Author for correspondence: E-mail: pbngoc@ibt.ac.vn