

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *DEFENSINI* VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN ĐỂ TẠO DÒNG NGŨ CHUYỂN GEN KHÁNG MỌT

Vì Thị Xuân Thủy<sup>1</sup>, Lò Thị Mai Thu<sup>1</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Vũ Thanh Thanh<sup>3</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Tây Bắc

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

<sup>4</sup>Trường Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài: 25.3.2016

Ngày nhận đăng: 12.5.2016

### TÓM TẮT

Defensin thực vật là protein đa chức năng, ức chế sự sinh trưởng của nấm, chống vi khuẩn, làm thay đổi kênh màng, ức chế hoạt động của trypsin,  $\alpha$ -amylase. Defensin của thực vật có 18 nhóm, trong đó nhóm 1 bao gồm các defensin có khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase hoặc trypsin. Trong ruột mọt ăn ngô, defensin liên kết với trung tâm hoạt động của  $\alpha$ -amylase trong ruột mọt, dẫn đến ức chế quá trình tiêu hóa tinh bột của mọt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày đặc điểm của gen *ZmDEF1* từ mRNA, DNA của mẫu ngô địa phương Sơn La (kháng mọt tốt) và mẫu ngô lai LVN99 (kháng mọt kém). Gen *ZmDEF1* phân lập từ mRNA có kích thước 243 nucleotide, mã hoá protein defensin1 gồm 80 amino acid. Gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA có chiều dài 345bp, gồm hai exon và một intron (102 bp). Trình tự gen *ZmDEF1* (DNA) của các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 6 vị trí nucleotide trong đó trên exon1 có hai điểm sai khác (vị trí 43, 53); intron chứa một điểm sai khác (vị trí 150), exon2 có 3 điểm sai khác (vị trí 203, 263 và 297). Trình tự amino acid suy diễn từ gen *ZmDEF1* của mẫu ngô địa phương Sơn La chứa 8 cystein tạo nên 4 cầu nối disulfide, mẫu ngô lai LVN99 có 7 cystein. Vector chuyển gen vào thực vật pBetaPhaso-*ZmDEF1* được thiết kế chứa promoter Phasoline biểu hiện *ZmDEF1* đặc trưng ở hạt. Cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* đã chuyển thành công và thu được 4 dòng cây thuốc lá chuyển gen biểu hiện gen *ZmDEF1* ở mức độ phiên mã. Đây là cơ sở để chuyển cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* vào cây ngô để tạo mẫu ngô chuyển gen có khả năng kháng mọt cao.

**Từ khóa:** *Defensin, cysteine, ZmDEF1, mọt ngô, kháng mọt, Zea mays*

### MỞ ĐẦU

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong những cây ngũ cốc chính có giá trị kinh tế cao, góp phần nuôi sống 1/3 dân số thế giới. Trên thế giới, cây ngô hiện đứng thứ ba về diện tích, đứng thứ hai về sản lượng và đứng đầu về năng suất. Ngô được dùng để sản xuất ra khoảng 650 sản phẩm khác nhau trong công nghiệp lương thực, thực phẩm, dược và công nghiệp nhẹ. Ngô góp phần vào việc ổn định sản lượng ngũ cốc trên thế giới và có vai trò quan trọng trong kinh tế và thương mại quốc tế. Nhu cầu về lương thực, thức ăn chăn nuôi và nhiên liệu trên thế giới ngày một tăng, theo tính toán, vào 2017 phải sản xuất thêm 200 triệu tấn ngô và lúa mì mới đáp ứng được yêu cầu thực tiễn (Edgertom, 2009)

Là ngũ cốc giàu tinh bột, hạt ngô là một trong đối tượng dễ bị mọt xâm hại. Mọt ngô (*Sitophilus*

*zeamais* Motsch) là loại đa thực, có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc, các loại đậu, hạt có dầu và nhiều sản phẩm thực vật khác. Thức ăn thích hợp nhất với mọt là hạt ngô và gạo. Mọt trưởng thành dùng vòi khoét một lỗ sâu vào hạt, đẻ trứng ở đó và tiết ra một thứ dịch nhầy để bít kín lỗ đó lại. Sâu non nở ra trong hạt ngô, ăn phôi trước, sau đó mới đến nội nhũ và các bộ phận khác làm cho hạt chỉ còn lại một lớp vỏ mỏng. Khi đầy sức, sâu non đục những lỗ nhỏ lộ rõ trên hạt để vũ hoá bay ra ngoài và tiếp tục chu trình phá hoại (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999; Throne *et al.*, 1994).

Defensin thực vật là protein nhỏ bao gồm 45-54 amino acid, giàu cysteine. Defensin là protein đa chức năng, ức chế sự sinh trưởng của nấm, chống vi khuẩn, ức chế hoạt động của trypsin,  $\alpha$ -amylase (Bloch *et al.*, 1991; Carvalho, Gomes, 2011; Melo *et al.*, 2002; Zhang, Lewis, 1997). Dựa vào đặc điểm

trình tự và chức năng Nicole và Marilyn (2013) đã chia defensin thực vật thành 18 nhóm. Trong đó, nhóm 1 gồm các defensin có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase (SI  $\alpha$  2-3, aainhi21) hoặc trypsin (Cpthio1). Liu và đồng tác giả (2006) đã phân lập defensin từ cây đậu xanh (VrD1) và chứng minh được vai trò chống côn trùng, kháng mốc của VrD1. Vì có hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase nên VrD1 có khả năng kìm hãm sự tiêu hóa tinh bột trong ruột một. Pelegrini và đồng tác giả (2008) đã nghiên cứu hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase của defensin phân lập từ cây đậu đũa (VuD1) và cho thấy VuD1 có khả năng ức chế cao đối với  $\alpha$ -amylase của một, nhưng lại thấp với động vật có vú.

Các mẫu ngô lai được trồng ở Việt Nam hiện nay cho năng suất cao nhưng sản lượng, giá thành, chất lượng bị giảm đáng kể do hạt của các mẫu ngô này rất dễ bị mốc xâm hại. Các mẫu ngô địa phương Việt Nam tuy có năng suất thấp, hạt nhỏ nhưng có khả năng kháng mốc tốt. Hiện nay, nhiều biện pháp bảo quản hạt ngô sau thu hoạch đã được áp dụng,

nhưng tốn thời gian, hiệu quả thấp và tổn thất sau thu hoạch vẫn rất lớn. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng công nghệ tạo giống ngô kháng mốc đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, trong đó có chiến lược tạo cây ngô chuyển gen. Trong nghiên cứu này, gen *defensin1* được phân lập từ mẫu ngô lai LVN99 và ngô địa phương Sơn La và thiết kế vector chuyển gen mang gen *defensin1* phục vụ việc phát triển mẫu ngô chuyển gen có khả năng kháng mốc cao.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu ngô địa phương thu thập ở tỉnh Sơn La và mẫu ngô lai LVN99 do Trung tâm mẫu cây trồng Sơn La cung cấp (Bảng 1) được sử dụng làm vật liệu cho việc phân lập gen. Các chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ ; *A. tumefaciens* CV58 và các loại vector pBT, p201-SLHEP, pBetaPhaso-dest được sử dụng trong quá trình nhân dòng, thiết kế vector chuyển gen và chuyển vào thực vật.

**Bảng 1.** Các mẫu/ giống ngô sử dụng nghiên cứu.

Tên mẫu	Địa điểm thu mẫu	Trọng lượng 1000 hạt (g) ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )	Màu sắc hạt	Khả năng kháng mốc
Sơn La	Mai Sơn - Sơn La	220,82 $\pm$ 0,63	Tím	Tốt
LVN99	Mẫu ngô lai LVN99	290,92 $\pm$ 1,16	Đỏ	Kém

RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent KIT; cDNA được tổng hợp theo hướng dẫn của bộ kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis KIT. Gen *defensin1* phân lập từ ngô (*ZmDEF1*) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF-F/ZmDEF-R* (*ZmDEF-F*: 5'- ACGCG TCGACATGGCGCCGTCTCGACGCA0 -3' và *ZmDEF-R*: 5'CCCAAGCTTGAGATCTTCTTGAGA AGCAC-3') và ở chu kỳ nhiệt 94oC/4 phút, 30 chu kỳ của 94oC/45 giây – 58oC/30 giây – 72oC/60 giây) và 72oC/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, tinh sạch theo GeneJET PCR Purification KIT, gắn vào vector tách dòng pBT. Vector tách dòng được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng sốc nhiệt (42oC trong 1 phút 30 giây). *E. coli* DH5 $\alpha$  mang vector tách dòng được chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal, IPTG, kháng sinh carbenicilin. Xác định khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử của

Sambrook và Russell (2001).

Trình tự gen *ZmDEF1* được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130 - USA/Japan. Số liệu được xử lý bằng phần mềm BioEdit, DNASTar.

Vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1* được thiết kế bằng cách gắn gen *ZmDEF1* vào khung vector chuyển gen thực vật pBetaPhaso theo cơ chế trao đổi chéo đặc hiệu vị trí của phage  $\lambda$  như mô tả của Karimi và đồng tác giả (2002).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

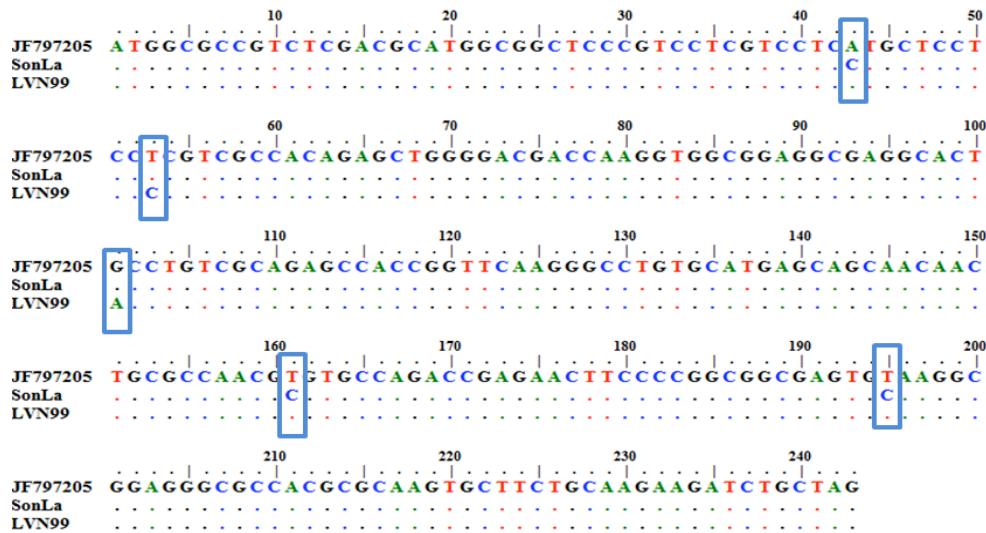
### Tách dòng và xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ mRNA

Dựa trên trình tự có mã số JF797205 trên Ngân hàng gen Quốc tế, cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1-F/ZmDEF1-R* đã được thiết kế để khuếch đại đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1* với kích thước ước tính khoảng 0,25kb. Ở ngô, *ZmDEF1* chỉ được phiên mã

ở hạt non và hạt trưởng thành, còn các mô khác thì không hoạt động và hoạt động dưới sự cảm ứng của methyl jasmonate hoặc ABA (Baosheng *et al.*, 2011). Do đó, RNA tổng số được tách từ lá của cây ngô non 5 - 7 ngày tuổi, nảy mầm từ hạt đã được xử lý ABA trước khi nảy mầm. RNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA. Phản ứng PCR nhận bản đoạn mã hóa của gen *ZmDEF1* với cặp mồi đặc hiệu, kết quả kiểm tra sản phẩm RT-PCR bằng điện di trên gel agarose thu được cả hai mẫu ngô đều cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 0,25 kb. Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pBT, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và chọn lọc

khủng lạc chứa pBT tái tổ hợp bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi M13. Những khuẩn lạc màu trắng dương tính với colony-PCR có khả năng mang vector tái tổ hợp *pBT\_ZmDEF1*. Plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng được kiểm tra sự có mặt của gen *ZmDEF1* bằng cách cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, các dòng khuẩn lạc trắng dương tính với colony - PCR đều mang plasmid tái tổ hợp (*pBT\_ZmDEF1*). Các plasmid tái tổ hợp được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* phân lập từ các ngô nghiên cứu cho thấy các trình tự gen thu được có kích thước 243 bp (Hình 1).



**Hình 1.** Trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ mRNA của các mẫu ngô Sơn La và giống ngô lai LVN99 và JF797205 trên Ngân hàng gen Quốc tế.

So sánh trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* ở 2 mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* bố trên Ngân hàng gen Quốc tế có mã số JF797205 cho thấy gen DEF1 của giống ngô Việt Nam có độ tương đồng 99,2 đến 99,6%. Như vậy nghiên cứu này đã phân lập và tách dòng thành công gen *ZmDEF1* từ mẫu ngô Sơn La và giống ngô lai LVN99. Giữa các trình tự gen *ZmDEF1* có 5 vị trí nucleotide sai khác ở các vị trí nucleotide thứ 43, 53, 101, 161 và 195 (Hình 1). Đặc biệt ở vị trí thứ 101, thuộc bộ ba quy định amino acid thứ 34 của chuỗi polypeptide, ở mẫu Sơn La là G còn LVN99 là A nên rất có thể dẫn đến sự sai khác amino acid giữa

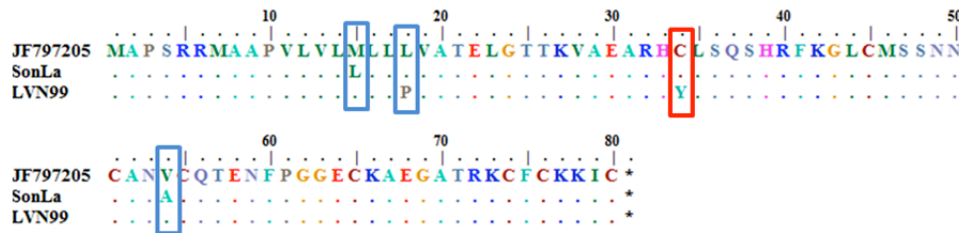
hai trình tự. Vì thế trình tự amino acid suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu được tiếp tục nghiên cứu.

Trình tự amino acid suy diễn từ gen *ZmDEF1* của hai mẫu ngô nghiên cứu và JF797205 đều có 80 amino acid như thể hiện trong hình 2. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Baosheng và đồng tác giả (2011) khi phân lập gen *ZmDEF1* từ giống ngô NongDa108 phục vụ chuyển gen với mục đích kháng nấm. Hình 4 cho thấy, giữa các trình tự nghiên cứu có 4 vị trí amino acid khác nhau ở các vị trí thứ 15, 18, 34, 54 của protein defensin1.

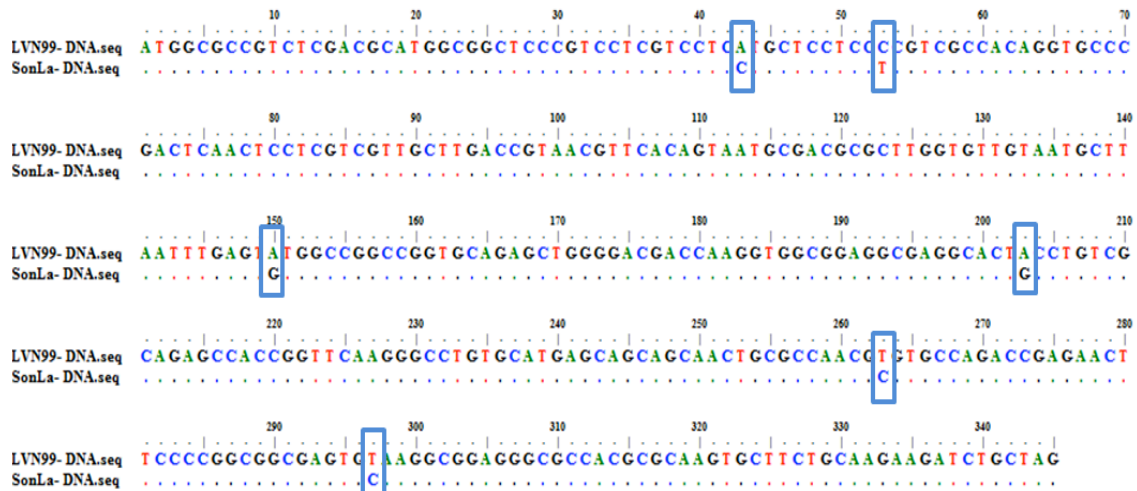
Cấu trúc của defensin thực vật gồm vùng tín hiệu dẫn ở đầu N và vùng chức năng nằm ở đầu C. Vùng chức năng thường chứa từ 45- 55 amino acid (Carvalho, Gomes, 2011). Ở ngô, gen DEF1 có vùng tín hiệu dẫn gồm 31 amino acid và vùng chức năng gồm 49 amino acid. Vùng chức năng có chứa 8 phân tử cystein (Cys) ở các vị trí amino acid thứ 3, 14, 20, 24, 34, 43, 45, 49, tạo nên 4 cầu disulfide giữa các cặp Cys3 – Cys49, Cys14 – Cys34, Cys20 – Cys43, Cys24 – Cys45 giúp cho sự ổn định cấu trúc không gian của defensin (Baosheng *et al.*, 2011). Cầu nối disulfide giữa các cystein trong vùng chức năng của defensin được biết giữ vai trò quan trọng trong quyết định ức chế  $\alpha$ - amylase ở ruột mọt. Như chỉ ra trong Hình 2, vùng chức năng của protein suy diễn của các mẫu ngô nghiên cứu có 2 vị trí amino acid sai khác nhau ở vị trí 3 và 23. Đặc biệt ở vị trí amino acid thứ 3 các mẫu ngô địa phương Sơn La và JF797205 đều là Cys để tạo cầu nối disulfide với Cys thứ 49, còn giống ngô lai LVN99 thì vị trí thứ 3

này là tyrosine (Y). Vì vậy, trong cấu trúc protein defensin1 của giống ngô lai LVN99 có thể chỉ có 3 cầu nối disulfide, đặc điểm này có thể liên quan đến tính ổn định của protein và rất có thể làm giảm hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase, tăng tính mầm cảm với mọt của giống ngô này.

Về không gian ba chiều, defensin gồm 3 phiến gấp  $\beta$  và một chuỗi xoắn  $\alpha$ . Trong đó giữa nếp gấp  $\beta$  thứ 2 và thứ 3 có vùng Loop 3, vùng này có chức năng quan trọng trong ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase của mọt. Do có sự liên kết giữa Loop 3 với trung tâm hoạt động (3 Loop: Loop A, Loop B, Loop C) của  $\alpha$ - amylase ở mọt, đã ngăn cản cơ chất tinh bột đi vào (Lin *et al.*, 2007). Sự ức chế này biểu hiện thấp đối với  $\alpha$ - amylase của động vật có vú, vì có sự sai khác về độ dài của 3 Loop trung tâm hoạt động của  $\alpha$ -amylase của động vật rút ngắn và mở rộng hơn nên Loop 3 của defensin1 không liên kết vào được.



**Hình 2.** Trình tự amino acid suy diễn của defensin1 của mẫu ngô Sơn La, giống ngô LVN99 và JF797205 trên Ngân hàng gen Quốc tế.



**Hình 3.** Trình tự gen *ZmDEF1* của mẫu ngô Sơn La và giống ngô lai LVN99 phân lập từ DNA.

**Tách dòng và xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ DNA**

DNA tổng số của mẫu ngô địa phương Sơn La và giống ngô lai LVN99 được tách từ lá của cây non có từ 3 - 4 lá thật. Gen *ZmDEF1* được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1-F/ZmDEF1-R*. Kết quả kiểm tra bằng điện di trên gel agarose cho thấy xuất hiện một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 0,35 kb. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gắn vào vector tách dòng pBT, biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 $\alpha$ , chọn lọc dòng mang gen bằng phản ứng bằng colony – PCR. Vector nhân dòng mang gen *ZmDEF1* được kiểm tra bằng cắt với enzyme giới hạn *BamHI* và giải trình tự gen *ZmDEF1*.

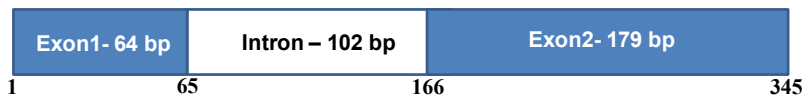
Kết quả cho thấy gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA của giống LVN99 và mẫu ngô địa phương Sơn La có chiều dài 345 bp (Hình 3).

So sánh trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA và phân lập từ cDNA cho phép tìm ra đặc điểm cấu trúc của gen. Đồng thời để làm căn cứ để phân tích sự có mặt của gen chuyển trong hệ gen cây ngô chuyển gen. So sánh trình tự gen *ZmDEF1* của mẫu ngô địa phương Sơn La và LVN99 phân lập từ

cDNA và DNA cho thấy gen có cấu tạo gồm 2 exon xen kẽ bởi 1 intron có chiều dài là 102 bp (Hình 4).

Như vậy, kết quả phân tích này là cơ sở sử dụng cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1-F/ZmDEF1-R* để phân biệt cây ngô mang gen chuyển *ZmDEF1* với cây không chuyển gen bằng phản ứng PCR. Đối với ngô mang gen chuyển, cặp mồi này có thể khuếch đại *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn DNA là 345 bp, đồng thời khuếch đại cả *ZmDEF1* chuyển thêm cho kích thước đoạn DNA là 243bp. Cây không chuyển gen chỉ khuếch đại được một sản phẩm là gen *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn DNA là 345 bp.

So sánh hai trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA của mẫu ngô địa phương Sơn La và giống ngô lai LVN99 để thấy được sự đa hình gen *ZmDEF1*, kết quả so sánh hai trình tự thể hiện ở Bảng 2. Sự sai khác tại 6 vị trí nucleotide giữa mẫu Sơn La và LVN99 xảy ra trên cả intron và exon. Trên exon1 có hai điểm sai khác (vị trí 43, 53); intron chứa một điểm sai khác (vị trí 150), exon 2 có 3 điểm sai khác (vị trí 203, 263 và 297). Sai khác ở intron không làm thay đổi vùng mã hoá, do vậy không làm thay đổi các amino acid trong chuỗi polypeptid, tuy nhiên nó góp phần làm tăng sự đa hình gen *ZmDEF1* của mẫu ngô nghiên cứu.



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc của gen *ZmDEF1* của ngô.

Bảng 2. Sự sai khác về trình tự nucleotide gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA của mẫu ngô địa phương Sơn La và giống ngô lai LVN99.

STT	Vị trí	Sơn La	LVN99	Vùng sai khác
1	43	C	A	Exon1
2	53	T	C	Exon1
3	150	G	A	Intron
4	203	G	A	Exon 2
5	263	C	T	Exon 2
6	297	C	T	Exon 2

**Thiết kế cấu trúc chuyển gen thực vật mang gen *ZmDEF1***

Trình tự nucleotide gen *ZmDEF1* của mẫu ngô Sơn La được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen thực vật và chuyển vào cây thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Vector chuyển gen mang

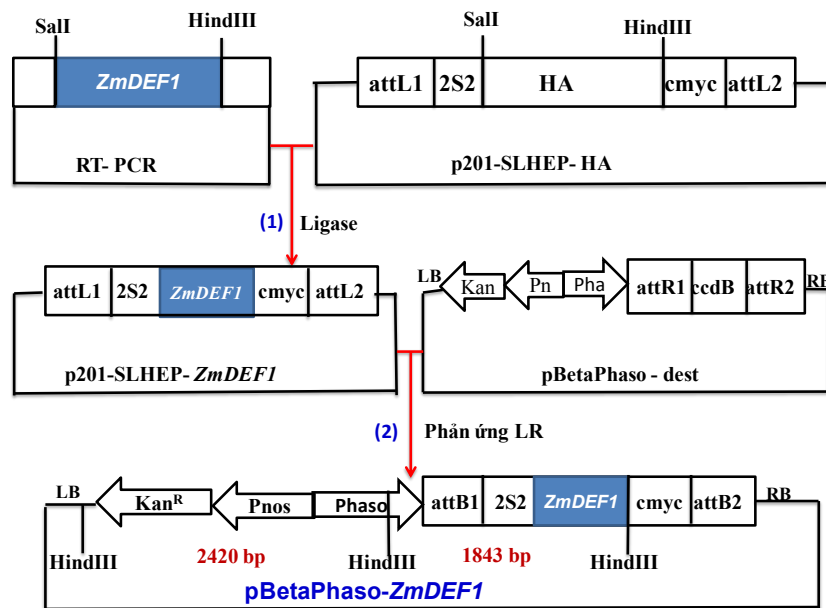
gen *ZmDEF1* được phát triển như mô tả ở hình 5.

Trên hình 5, sản phẩm RT-PCR tinh sạch của mẫu Sơn La và vector p201-SLHEP - HA được xử lý đồng thời bởi hai enzyme *SalI/HindIII*. Khi xử lý hai enzyme *SalI/HindIII* vector p201-SLHEP - HA cắt đoạn HA và vị trí này được gắn sản phẩm RT-PCR khi đã xử lý hai enzyme *SalI/HindIII* nhờ enzyme

nối thu được p201-SLHEP - *ZmDEF1*. Vector p201-SLHEP - *ZmDEF1* có 2 vị trí tái tổ hợp attL1 và attL2, *ZmDEF1* được gắn xen vào giữa 2 vị trí này. Trên vector còn chứa gen kháng kháng sinh kanamycin và vị trí gắn mồi, phục vụ cho việc chọn các dòng khuẩn lạc mang plasmid mong muốn.

p201- SLHEP- *ZmDEF1* tham gia phản ứng LR với pBetaPhaso-dest có trình tự attR trao đổi với attL để tạo vector chuyển gen nhị thể pBetaPhaso-*ZmDEF1* và đồng hóa vào tế bào khả biến *E. coli* DH5a. Sản phẩm của quá trình biến nạp được nuôi trên môi trường chọn lọc có chứa

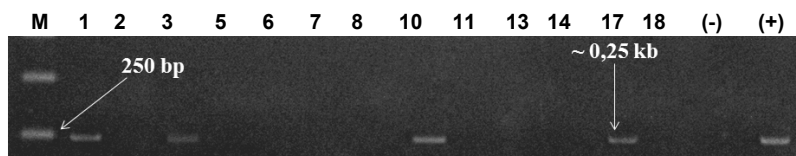
kháng sinh. Tuy nhiên, để xác định chính xác các plasmid tái tổ hợp mới được tạo thành đúng như mong đợi, phản ứng colony-PCR đã được thực hiện. Những dòng khuẩn lạc dương tính với phản ứng colony-PCR được sử dụng tách plasmid tái tổ hợp pBetaPhaso-*ZmDEF1*. Sau khi tách vector mang cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 và tiếp tục chọn dòng bằng phản ứng colony-PCR. Cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* chứa promoter Phasoline biểu hiện đặc trưng ở hạt (Mahesh *et al.*, 2003), cùng với trình tự 2S2 để tập trung protein vào nội nhũ hạt.



**Hình 5.** Sơ đồ phát triển vector chuyển gen biểu hiện ở thực vật mang gen *ZmDEF1*. (1) Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển p201-SLHEP - *ZmDEF1*; (2) Gắn cấu trúc gen mang gen chuyển *ZmDEF1* vào vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1*. (Phaso: Promoter Phasoline; attB1 và attB2: các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng LR; LB:left T-DNA border; RB: right T-DNA border; Kan<sup>R</sup>: gen kháng kanamycin)

Để kiểm tra hoạt động của cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1*, cấu trúc đã được chuyển vào cây thuốc lá C9-1 theo phương pháp của Topping (1998). Sau 2 lần biến nạp cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* vào các mảnh lá thuốc lá với 30 mảnh lá/lần đã thu được 18 dòng cây chuyển gen, phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới. Sau khoảng 3-4 tuần trong nhà lưới, lá cây chuyển gen sẽ được thu, tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả cho thấy có 13 dòng cây cho phản ứng PCR dương tính. Để kiểm tra hoạt động

của cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* ở mức độ phiên mã, phản ứng RT-PCR đã được tiến hành sử dụng mRNA được tách ra từ hạt của cây chuyển gen vì cấu trúc *ZmDEF1* được điều khiển hoạt động bởi promoter phasoline đặc trưng ở hạt. Kết quả thu được trong Hình 6 cho thấy có 4 dòng 1, 3, 10, 17 thể hiện hoạt động phiên mã của gen chuyển với sản phẩm RT-PCR có kích thước khoảng 0,25kb. Như vậy có 4/13 dòng cây mang gen *ZmDEF1* có biểu hiện ở mức độ phiên mã. Như vậy, vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1* được thiết kế phù hợp cho việc chuyển gen *DEF1* vào cây ngô.



**Hình 6.** Sản phẩm RT-PCR nhân gen *ZmDEF1* của dòng cây thuốc lá chuyển gen. (M: thang chuẩn DNA 1kb; 1 - 18: các dòng cây thuốc lá chuyển gen; (-): cây đối chứng không chuyển gen; (+): PCR từ vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1*).

## KẾT LUẬN

Gen *ZmDEF1* đã được phân lập từ mRNA của mẫu ngô địa phương Sơn La và giống ngô lai LVN99. Gen được phân lập có kích thước 243 nucleotide và mã hóa chuỗi polypeptide dài 80 amino acid. Trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* phân lập từ DNA có chiều dài 345 bp gồm hai exon một intron dài 102 bp, các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 6 vị trí nucleotide. Trình tự amino acid suy diễn của defensin1 mẫu ngô địa phương Sơn La chứa 8 cystein tạo nên 4 cầu nối disulfide, giống ngô lai LVN99 chỉ có 7 cystein. Cấu trúc chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1* đã được thiết kế thành công và hoạt động trên cây thuốc lá, đây là cơ sở để chuyển cấu trúc vào cây ngô với mục đích tạo dòng ngô chuyển gen kháng mọt cao.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành có sự dụng thiết bị Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ Sinh học và thuộc nội dung của đề tài Khoa học - Công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số: B2014-TN06-04 do PGS.TS Nguyễn Vũ Thanh Thanh làm chủ nhiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baosheng W, Jingjuan Y, Dengyun Z, Qian Z (2011) Maize defensin *ZmDEF1* is involved in plant response to fungal phytopathogens. *Afr J Biotechnol* 10 (72): 16128-16137.

Bloch JrC, Richardson M (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds or sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett* 279 (1): 101-104.

Carvalho Ade O, Gomes VM (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Design* 17(38): 4270-4293.

Egertom MD (2009) Increasing crop productivity to meet Global needs for feed, food and fuel. *Plant Physiol*, 149: 7-13.

Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gomez-Lim MA (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat Biotechnol*, 17: 1223-1226.

Lin KF, Lee TR, Tsai PH, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC (2007) Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin. *Protein* 68: 530-540.

Liu YJ, Cheng CS, Lai SM, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins* 63(4): 777-786.

Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) Gateway TM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.

Mahesh BC, Kenneth JB, Timothy CH (2003) Module-specific regulation of the  $\beta$ -phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J* 33: 853-866.

Melo FR, Rigden DJ, Franco OL, Mello LV, Ary MB, Grosside Sa MF, Bloch JrC (2002) Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins* 48 (2): 311-319.

Nicole L, Marilyn A (2013) Plant defensins: Common fold, multiple functions. *fungus biology reviews* 26: 121-131.

Pelegri PB, Lay FT, Murad AM, Anderson MA, Franco OL (2008) Novel insights on the mechanism of action of  $\alpha$ -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins* 73: 719-729.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Throne JE (1994) Life history of immature maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. *Environmental Entomology*, 23: 1459-1471.

Topping JF (1998) Tobacco transformation. *Methods of Mol. Biol* 81: 365-372.

Zhang Y, Lewis K (1997) Fabinins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol Lett* 149(1): 59-64.

## CHARACTERISTICS OF *DEFENSINI* GENE AND DESIGNING STRUCTURE TO CREATE RESISTANT TRANSGENIC CORN LINES TO WEEVILS

Vi Thi Xuan Thủy<sup>1</sup>, Lo Thi Mai Thu<sup>1</sup>, Ho Manh Tuong<sup>2</sup>, Le Van Son<sup>2</sup>, Nguyen Vu Thanh Thanh<sup>3</sup>, Chu Hoang Mau<sup>4,✉</sup>

<sup>1</sup>Taybac University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Thainguyen University of Sciences

<sup>4</sup>Thainguyen University of Education

### SUMMARY

Plant defensins are multifunctional proteins, inhibiting the growth of fungal, anti-bacterial, altering membrane channels, inhibiting activity of trypsin and  $\alpha$ -amylase. Plant defensin consists of 18 groups in which the group 1 includes defensins to inhibit either  $\alpha$ -amylase enzyme or trypsin. Defensins bind to the active site of  $\alpha$ -amylase in the weevil gut, thus inhibit starch digestion in weevils. In this report, we present the results of cloning and determining the *ZmDEF1* gene sequence isolated from mRNA and DNA of Sonla province local maize and LVN99 hybrid maize cultivar. The coding region of *ZmDEF1* gene isolated from some maize samples had the size of 243 nucleotides, encoding 80 amino acids. Gen *ZmDEF1* isolated from DNA had the size 345bp consists of two exons and one in tron (102 bp). The nucleotide sequences of *ZmDEF1* gene (DNA) of the samples have 6 positions nucleotide difference, on exon 1 has two points difference (position 43, 53), on intron has a difference (position 150), on exon 2 has 3 nucleotide site difference (203, 263 and 297 position). Deduced amino acid sequences of defensin of the Sonla local maize sample has 8 cysteines to make 4 disulfide bridges, while LVN99 hybrid maize has 7 cysteines, which can formed only 3 disulfide bridges. Transformation vector pBetaPhaso-*ZmDEF1* has been designed successfully, in which *ZmDEF1* is controlled by seed specific Phasoline promoter. The correct insertion and expression of *ZmDEF1* was examined in transgenic tobacco plants through PCR and RT-PCR, respectively. These results provide an firm evident for using the designed transformation vector to produce transgenic maize lines with an improved resistant ability to weevils.

**Keywords:** *Defensin, ZmDEF1, maize weevil, resistant to weevils, Zea mays*

---

✉ Authors for correspondence: E-mail: [chuhuangmau@tnu.edu.vn](mailto:chuhuangmau@tnu.edu.vn)