

## PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG CHỊU HẠN-*GmMyb* Ở ĐẬU TƯƠNG

Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ

### SUMMARY

#### Towards over-expression of *GmMyb* - a potential drought tolerance transcription factor

Among abiotic stress factors, drought has a biggest impact on crop yield worldwide. Previous studies have shown that many transcription factors from the Myb family could play a significant role in drought tolerance. We isolated a *GmMyb* gen from soybean under mild drought conditions of 7% sorbitol. *GmMyb* was inserted into the 35S overexpression cassette in pRTL2 plasmid. This *GmMyb* overexpressing cassette was then incorporated into the binary vector pZY101-Asc which carries the Basta herbicide resistance selection marker. Successful transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with this construct provides starting material for creating and studying potential drought tolerance crops.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, cDNA, drought tolerance, *GmMyb*, pZY101-Asc, soybean.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hạn hán là tình trạng lượng nước tự nhiên thấp hơn mức trung bình trong một thời gian dài trên diện rộng và mang tính khu vực. Trong các yếu tố bất lợi của môi trường, hạn hán ảnh hưởng lớn nhất đến năng suất cây trồng trên toàn thế giới (Boyer, 1982). Một số mô hình dự đoán biến đổi khí hậu cho thấy hạn hán sẽ xảy ra thường xuyên hơn trong tương lai do những tác động dài hạn của hiện tượng ấm lên toàn cầu (Salinger và cộng sự, 2005; Cook và cộng sự 2007). Kết quả là diện tích đất canh tác ngày càng bị thu hẹp. Trước những thách thức nêu trên, việc nghiên cứu phát triển những giống cây trồng mới có khả năng thích ứng, chống chịu các điều kiện bất thuận đang là một trong những mục tiêu hàng đầu của các nhà khoa học.

Khả năng chịu hạn ở cây trồng là tính trạng được kiểm soát bởi nhiều gen. Những công trình nghiên cứu về cơ chế phân tử khả năng chịu hạn của thực vật trong những năm gần đây đã chỉ ra rằng:

Các gen tham gia vào quá trình chịu hạn của thực vật được chia thành hai nhóm: Nhóm 1- gen điều khiển (gen tổng hợp protein điều khiển quá trình phiên mã - transcription factor, kinase...) và Nhóm 2- gen chức năng (gen tham gia vào quá trình tổng hợp photphatase, protease, late embryogenesis abundant (LEA), các protein sinh tổng hợp amino acid, đường: proline, mannitol, sorbitol làm cho thực vật tạo ra hàng loạt phản ứng sinh hóa và sinh lý để tồn tại và thích nghi (Kazuo và Kazuo, 2005). Các nghiên cứu đã cho thấy khi cây gặp điều kiện bất lợi (hạn, mặn...), chỉ cần một gen điều khiển hoạt động sẽ kích hoạt hàng loạt các gen chức năng hoạt động nhằm duy trì sự sống sót của cây trồng. Trong số các nhóm gen điều khiển, MYB là một họ gen lớn với hơn 190 gen được tìm thấy trong hệ gen của cây *Arabidopsis* (Riechmann và cộng sự, 2000). MYB đầu tiên được xác định là v-MYB nằm trong virus gia cầm myeloblastosis. Cho đến nay, đã có rất nhiều gen MYB được xác định và hầu hết là ở sinh vật Eukaryote. Protein MYB được chia ra thành 3 nhóm (1, 2 và 3) căn

cứ vào số lần lặp lại của các nhóm liên kề trong domain MYB. Trong số 3 nhóm này, gen mã hóa cho nhóm 2 xuất hiện chủ yếu ở tế bào thực vật. Gen MYB là gen điều khiển tham gia vào nhiều vai trò khác nhau như điều khiển sự phát triển và hình thành vai trò của tế bào, đáp ứng lại sự thay đổi môi trường, khả năng chống chịu sâu bệnh hại và ảnh hưởng của các hormone sinh học. Ở đậu tương gen này được gọi là Glycine max gene-GmMyb (Liao và cộng sự, 2008). Để phục vụ nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng, cần lựa chọn phân lập và thiết kế vector tăng cường biểu hiện gen kháng hạn GmMyb (XM\_003549497).

*GmMyb\_F*: ATGGCCCAGCGCCGCA  
*GmMyb\_R*: TCAGCAAGGCTTAATTT  
*GmMyb\_KpnI\_F*: GC GGTACC ATGGCCCAGCGCCGCA  
*GmMyb\_BamHI\_R*: GC GGATCC TCAGCAAGGCTTAATTTCAAAACCTA  
*pRTL2\_F*: GGCGCGCC AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCA  
*pRTL2\_R*: GGCGCGCC TGCATGCCTGCAGGTCACTGGA

## **2. Phương pháp nghiên cứu**

### ***Trồng và xử lý hạn***

Hạt đậu tương Williams 82 được cho nảy mầm trong xô nhựa chứa đất giá thể, tưới nước đầy đủ hàng ngày. Sau ba tuần, ngừng tưới nước trong 3 ngày, xử lý hạn nhân tạo bằng cách tưới 200 ml dung dịch sorbitol 7% (w/v). Mẫu lá được thu tại 5 thời điểm: Ngay trước khi xử lý hạn, sau xử lý hạn 1h, 5h, 12h và 24h, xử lý lạnh sâu trong nitơ lỏng (-196°C) để làm ngưng toàn bộ các phản ứng sinh hóa, ngăn chặn sự phân hủy ARN thông tin. Mẫu lá được nghiền cùng nitơ lỏng trong cối sứ đã được làm lạnh bằng nitơ lỏng cho đến khi thu được bột mịn. Dùng 30 mg bột mịn mẫu lá để tách ARN theo quy trình tách của bộ kit

## **II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Vật liệu nghiên cứu**

Giống đậu tương sử dụng cho thí nghiệm là Williams 82. Các vật liệu và hóa chất bao gồm: Bộ kit tách ARN tổng số SV total RNA isolation system (Promega); enzyme reverse transcriptase; đoạn môi polyT; ống eppendorf 1,5 ml và 2 ml; ống PCR 0,2ml; đầu côn các cỡ 10, 100, 1000 $\mu$ l, nước cất, chày sứ, cối sứ, nitơ lỏng, bộ kit tinh sạch ADN Gencatch PCR purification kit. Các enzyme Pfu polymerase, Taq polymerase, T4 ligase, thang ADN chuẩn 1 kb plus từ Fermentas; các vector: pGEMT, pRTL2, pZY101-Asc. Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu gồm:

SV Total ARN isolation (Promega). Mẫu ARN tổng số thu được kiểm tra bằng Nanodrop và điện di.

### ***Tổng hợp cDNA***

Các mẫu RNA tổng số thu từ các mẫu lá khác nhau được dùng để tổng hợp thư viện cDNA. Mạch bổ sung với ARN thông tin được tổng hợp nhờ enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase với đoạn môi oligo dT<sub>20</sub>. Thành phần phản ứng gồm: ARN tổng số (5 $\mu$ g), oligo (dT)<sub>20</sub> 50 $\mu$ M (1 $\mu$ l), dNTP 10 mM (1 $\mu$ l), nước cất đã qua xử lý DEPC (4 $\mu$ l); ủ hỗn hợp trong 5 phút ở 65°C, sau đó chuyển sang giữ trên đá trong 2 phút. Thêm vào hỗn hợp enzyme: Dịch đệm 10x (2 $\mu$ l), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (4 $\mu$ l), DTT 0.1 M (2 $\mu$ l), RnaseOUT 40 U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l),

superScript III RT 200U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l), trộn nhẹ nhàng rồi thu bằng ly tâm nhanh, ủ trong 50 phút ở 50°C. Ngưng phản ứng phiên mã ngược bằng cách ủ 5 phút ở 80°C. Làm lạnh ống nghiệm trên đá, thu bằng cách ly tâm nhanh, sau đó thêm 1 $\mu$ l RnaseH và ủ ở 37°C trong 20 phút để phân hủy ARN.

**Khuếch đại gen *GmMyb* từ thư viện cDNA**

Gen *GmMyb* được khuếch đại từ thư viện cDNA chịu hạn với cặp mồi đặc hiệu *GmMyb\_F* và *GmMyb\_R* với thành phần phản ứng: dung dịch đệm 10X (5 $\mu$ l), dNTP 10 mM (5  $\mu$ l), mồi *GmMyb\_F* 10 $\mu$ M (5 $\mu$ l), mồi *GmMyb\_R* 10  $\mu$  M (5 $\mu$ l), Pfu polymerase 10 U/ $\mu$ l (1,25 $\mu$ l), cDNA (1 $\mu$ l), H<sub>2</sub>O (27,75 $\mu$ l). Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: Biến tính ở 95°C trong 3 phút; 40 chu kỳ: Biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; kéo dài lần cuối ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR sau khi đã được kiểm tra kích thước bằng điện di được tinh sạch bằng bộ kit Gencatch PCR purification theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**Tạo đầu dính cho sản phẩm PCR**

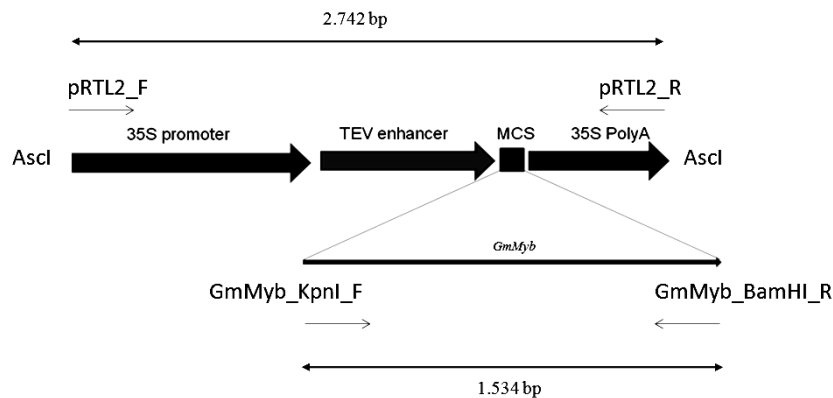
Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gắn thêm đầu dính adenine bằng cách ủ với các thành phần sau ở 72°C trong 30 phút: Sản phẩm PCR tinh sạch (7 $\mu$ l), Taq DNA polymerase 10x buffer (1 $\mu$ l), dATP 10mM (0,2 $\mu$ l), Taq DNA polymerase (0,5 $\mu$ l), H<sub>2</sub>O (1,3 $\mu$ l).

**Thiết kế vector nhân dòng gen *GmMyb***

Sản phẩm PCR của gen *GmMyb* đã gắn đầu dính adenine được gắn vào vector nhân dòng pGEM-T bằng cách ủ với các thành phần sau qua đêm ở 4°C: 2X Rapid Ligation Buffer (5  $\mu$  l), pGEM-T plasmid (50ng), Sản phẩm PCR gắn đầu dính (1  $\mu$  l), T4 DNA ligase (1  $\mu$  l).

**Thiết kế cassette biểu hiện gen**

Để biểu hiện gen *GmMyb*, gen được gắn vào giữa cassette 35S::PolyA của vector pRTL2, tạo thành cassette biểu hiện gen 35S::*GmMyb*::PolyA (hình 1).



Hình 1: Cassette biểu hiện gen *GmMyb* trong vector pRTL2

*GmMyb* được khuếch đại từ pGEMT-*GmMyb* như sau: Đệm 10x (5 $\mu$ l), dNTP 10mM ( $\mu$ l), *GmMyb\_KpnI\_F* 10 $\mu$ M (5 $\mu$ l), *GmMyb\_BamHI\_R* 10  $\mu$  M (5 $\mu$ l), Pfu polymerase 10 U (1,25 $\mu$ l), pGEMT-*GmMyb* plasmid 50 ng, H<sub>2</sub>O (27,75 $\mu$ l) theo chu trình: Biến tính ở 95°C trong 3 phút; 40 chu kỳ: Biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; kéo dài lần cuối ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di và tinh sạch, cắt giới hạn lần lượt với KpnI và BamHI. Với KpnI, ủ mẫu gồm các thành phần sau ở 37°C trong 1 giờ: 10X NEBuffer1 (5 $\mu$ l), sản phẩm PCR (20 $\mu$ l), enzyme KpnI (2,5 $\mu$ l), H<sub>2</sub>O (22,5 $\mu$ l). Sau đó tiếp tục cắt với BamHI như sau: thêm 10X NEBuffer 3 (6 $\mu$ l), enzyme BamHI (2,5 $\mu$ l), H<sub>2</sub>O (1,5 $\mu$ l), tiếp tục ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tương tự, cắt giới hạn vector pRTL2 với KpnI và BamHI sau đó xử lý với enzyme shrimp alkaline phosphatase (SAP) ở 37°C trong 1 giờ. Tinh sạch bằng kit Gencatch.

Sản phẩm cắt giới hạn với KpnI và BamHI của gen *GmMyb* và plasmid pRTL2 sau khi đã tinh sạch được gắn bởi enzyme nối T4 ligase. Plasmid pRTL2-*GmMyb* thu được được biến nạp vào *E. coli DH5 $\alpha$* . Khuẩn lạc mang gen được xác nhận bằng PCR khuẩn lạc. Cassette biểu hiện gen được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu pRTL2\_F và pRTL2\_R, được xử lý với enzyme cắt giới hạn AscI. Phản ứng gồm: 10x NEBuffer 4 (5 $\mu$ l), sản phẩm PCR (20 $\mu$ l), enzyme AscI (2,5  $\mu$  l), H<sub>2</sub>O (22,5 $\mu$ l), ủ qua đêm ở 37°C sau đó ủ ở 65°C trong 20 phút để bất hoạt enzyme. Sản phẩm cắt giới hạn được tinh sạch bằng kit

Gencatch như đã mô tả ở trên. Tương tự, vector nhị thể pZY101-Asc được cắt giới hạn bằng AscI, xử lý với shrimp alkaline phosphatase và tinh sạch bằng Gencatch.

Cassette biểu hiện *GmMyb* và vector pZY101 sau khi đã được cắt giới hạn và tinh sạch được gắn bằng T4 ligase ở 4°C trong 16h. Vector nhị thể pZY101-*GmMyb* được biến nạp vào *A. tumefaciens* bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa streptomycin và spectinomycin. Khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xử lý hạn với dòng đậu tương Williams 82, thu mẫu lá, tổng hợp cDNA, phân lập gen *GmMyb* và đưa vào vector biểu hiện pZY101-Asc dưới sự điều khiển của promoter 35S. Sau khi xử lý hạn nhân tạo 12h, cây chưa có biểu hiện thiếu nước trầm trọng nhưng đã có biểu hiện của gen *GmMyb*.



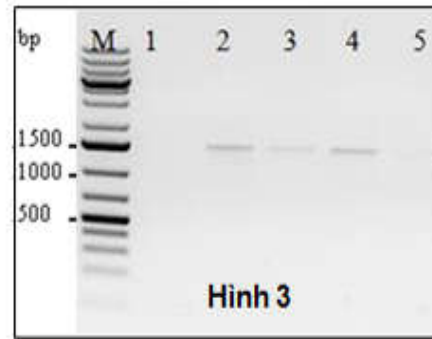
Hình 2: Cây đậu tương 3 tuần tuổi (A) và sau khi xử lý hạn 24h (B).

#### Tách chiết ARN từ mẫu lá sau xử lý hạn

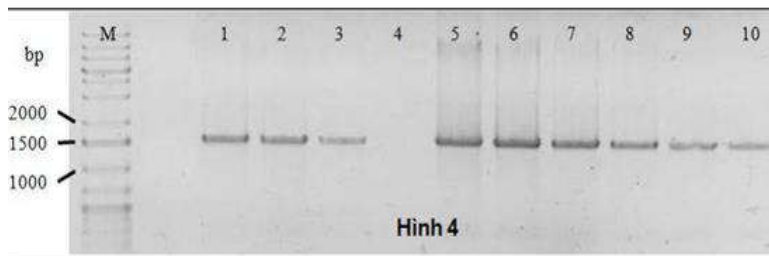
ARN tổng số thu được có chất lượng tốt, kết quả phân tích các mẫu ARN cho thấy các mẫu đều có chỉ số A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> và A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> trong khoảng giới hạn từ 1.8

đến 2.2 với nồng độ cao trên  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Kết quả điện di cũng cho thấy các mẫu ARN có chất lượng cao, không bị phân hủy. Từ các mẫu ARN này, tiến hành tổng hợp 5 thư viện cDNA. Dựa vào trình tự nucleotide của gen *GmMyb* công bố trên ngân hàng gen, tiến hành thiết kế cặp mồi đặc hiệu *GmMyb\_F* và *GmMyb\_R* để khuếch đại trình tự nucleotide có chứa phần mã hóa gen *GmMyb*. Sản phẩm PCR gen *GmMyb* được thể hiện trong Hình 3. Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR rõ nét nhất ở các mẫu 1h, 5h và 12h với kích thước khoảng trên 1500 bp, phù hợp với kích thước mong đợi (1534 bp). Sản phẩm PCR được tinh sạch rồi xử lý với *Taq* polymerase để tạo đầu dính và được gắn vào plasmid pGEMT. Vector pGEMT mang gen *GmMyb* được biến nạp vào chủng khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ , nuôi trên môi trường chọn lọc có chứa ampicillin, X-gal và IPTG. Các khuẩn lạc màu trắng mọc trên môi trường chọn lọc được PCR kiểm

tra. Kết quả cho thấy trừ khuẩn lạc số 4, các khuẩn lạc đều cho kết quả dương tính với cặp mồi đặc hiệu và kích thước sản phẩm vào khoảng 1500 đúng với kích thước mong đợi (Hình 4).



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ các thư viện cDNA. M: Thang chuẩn DNA 1kb plus, Fermentas, 1-5 lần lượt các mẫu cDNA thu ở 0h, 1h, 5h, 12h và 24h sau khi xử lý hạn.



Hình 4: Kết quả điện di 10 mẫu PCR khuẩn lạc mang gen *GmMyb*. M: Thang chuẩn DNA 1kb plus, Fermentas. 1 - 10: PCR khuẩn lạc.

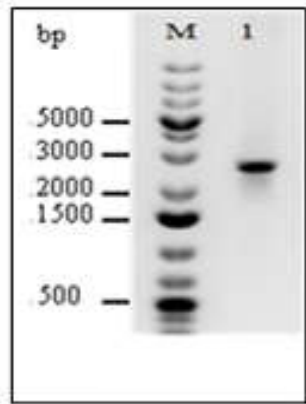
#### So sánh trình tự gen *GmMyb* tách được với cơ sở dữ liệu

Tiến hành tách chiết plasmid ADN từ khuẩn lạc 5, 6 và 7 (Hình 4) để tiến hành giải trình tự gen. So sánh trình tự *GmMyb* phân lập được với trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI nucleotide collection, trình tự gen *GmMyb* từ cả 3 chủng khuẩn trùng khớp với gen *GmMyb* (ID: 100127377).

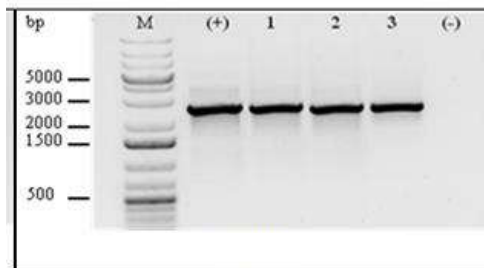
#### Thiết kế cassette biểu hiện gen *GmMyb*

Cassette biểu hiện gen *GmMyb* được thiết kế trên plasmid pRTL2. Gen *GmMyb* được khuếch đại với mồi xuôi mang trình tự giới hạn KpnI và mồi ngược mang trình tự giới hạn BamHI. Sản phẩm PCR và plasmid pRTL2 được cắt giới hạn lần lượt bởi BamHI và KpnI, tinh sạch và nối bằng T4

ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào DH5 $\alpha$ . Các chủng khuẩn mang pRTL2-*GmMyb* được kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi pRTL2\_F và pRTL2\_R cho thấy sản phẩm PCR có chứa đủ trình tự promoter, TEV, gen *GmMyb* và đoạn 35S polyA để cho kích thước như mong đợi là 2.742 bp (Hình 5).



Hình 5: Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra vector biểu hiện gen *GmMyb*. M: Thang chuẩn DNA 1kb plus, Fermentas. 1: pRTL2-*GmMyb*.



Hình 6: Ảnh điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang vector pZY101-*GmMyb*. M: Thang chuẩn DNA 1kb plus, (+): pRTL2-*GmMyb*, 1 - 3: các khuẩn lạc, (-): đối chứng âm.

Vector nhị thể pZY101 và cassette biểu hiện gen 35S:*GmMyb*:polyA được cắt giới hạn với enzyme *AscI*, tinh sạch rồi gắn vào nhau tạo thành vector biểu hiện pZY101:*GmMyb*. Vector này được biến nạp

trực tiếp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA101 bằng phương pháp xung điện, cấy trên môi trường thạch có bổ sung kháng sinh chọn lọc spectinomycin và streptomycin. Khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả cho thấy tất cả 3 khuẩn lạc kiểm tra đều mang cassette với kích thước gần 3.000 bp, phù hợp với kích thước mong đợi là 2.742 bp (Hình 6).

#### IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập và thiết kế thành công vector biểu hiện gen *GmMyb* (XM\_003549497) dưới sự điều khiển của promoter 35S. Với việc chọn vector tăng cường biểu hiện gen điều khiển *GmMyb* mở ra tiềm năng nghiên cứu, chọn tạo các giống đậu tương cũng như cây trồng biến gen mới có khả năng chịu hạn mới.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boyer JS (1982) *Plant productivity and environment*. Science 218, 443-448.
2. Cook ER, Seager R, Cane MA, Stahle DW (2007) *Earth Sci Rev* 81:93-134.
3. Kazuo N, Kazuko YS (2005) *Molecular studies on stress-responsive gene expression in Arabidopsis and improvement of stress tolerance in crop plants by regulon biotechnology*. JARQ39 (4): 221- 229.
4. Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) *Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes*. Science 290 (5499), 2105 10.

5. Salinger MJ, Sivakumar MVK, Motha R (2005) *Climatic Change* 70:341-362. ngày 6/5/2013  
Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

Ngày nhận bài: 18/4/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý