

Thiết kế vector biểu hiện mang gen *OsNAC1* được điều khiển bởi promoter cảm ứng điều kiện bất lợi *RD29A*

Phạm Thu Hằng^{1,*}, Nguyễn Duy Phương¹, Trần Lan Đài³,
Phan Tuấn Nghĩa², Phạm Xuân Hội¹

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

²*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

³*Trường Đại học Quy Nhơn, 170 An Dương Vương, Quy Nhơn, Bình Định, Việt Nam*

Nhận ngày 27 tháng 5 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 8 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 11 năm 2014

Tóm tắt: Gen *OsNAC1* đã được nghiên cứu và chứng minh vai trò tăng cường khả năng kháng hạn của lúa. Việc sử dụng các promoter cảm ứng với điều kiện bất lợi của môi trường, trong đó có promoter *RD29A*, để điều khiển biểu hiện của gen đáp ứng stress đã được rất nhiều nghiên cứu trước đây áp dụng thành công. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và nhân dòng promoter cảm ứng hạn *RD29A* từ hệ gen của cây *Arabidopsis thaliana* bằng phản ứng PCR và thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* dựa trên bộ khung của vector pCAMBIA1301. Trình tự mã hóa *OsNAC1* được tách dòng từ vector nhân dòng pJET/*OsNAC1* và lắp ghép vào hệ vector biểu hiện pCAM-Rd. Các vector tái tổ hợp pCAM-Rd/*NAC1-S* và pCAM-Rd/*NAC1-AS* sẽ được sử dụng cho nghiên cứu chuyển gen vào cây mô hình thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Từ khóa: Chịu hạn, lúa, *OsNAC1*, *RD29A*, chuyển gen.

1. Mở đầu

Dưới điều kiện bất lợi của môi trường như hạn, mặn, lạnh..., thực vật phải thay đổi các quá trình sinh lý và sinh hóa để tồn tại và thích nghi. Ở mức độ phân tử, điều kiện bất lợi môi trường sẽ làm cho thực vật gia tăng mức độ biểu hiện và tích lũy của hàng loạt các gen và protein đáp ứng bất lợi môi trường. Quá trình biểu hiện của các gen liên quan tới đáp ứng

chống chịu điều kiện bất lợi của thực vật được điều khiển bởi một loạt các promoter cảm ứng stress [1]. Trong số đó, *RD29A* là một promoter cảm ứng với các điều kiện môi trường bất lợi như hạn, mặn và lạnh và đã được nghiên cứu rất chi tiết. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng, trình tự promoter *RD29A* chứa hai vùng có hoạt tính *cis* liên quan đến sự biểu hiện dưới điều kiện bất lợi của môi trường là vùng đáp ứng ABA (the ABA-responsive element (ABRE) và vùng cảm ứng mất nước (the dehydration – responsive element (DRE)/C-repeat (CRT) [2]. Promoter *RD29A* đã được phân lập và nghiên

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983938784
Email: phamhang2412@gmail.com

cứ chức năng hoạt động trên nhiều đối tượng cây khác nhau như *Arabidopsis thaliana*, thuốc lá và lúa mì [3-6].

Họ NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) là họ gen lớn nhất thuộc nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã được tìm thấy ở thực vật, có vai trò quan trọng trong sự phát triển và đáp ứng với điều kiện bất lợi của thực vật. Các protein trong họ gen này có đặc điểm chung là trình tự liên kết DNA bảo thủ được biết đến như là miền NAC ở vùng đầu N. Ngược lại, vùng đầu C biến đổi thường chứa các miền hoạt hóa và rất đa dạng cả về chiều dài và trình tự [7]. Cho tới nay đã có khoảng 117 gen NAC trong hệ gen *Arabidopsis* và 151 gen NAC trong hệ gen lúa, 26 gen NAC ở họ cam chanh, 152 gen NAC ở đậu tương và thuốc lá đã được phân lập nhưng chỉ một số ít gen NAC được nghiên cứu chức năng [8-10].

OsNAC1 là một gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ NAC có liên quan đến tính chống chịu với bất lợi môi trường ở lúa được phân lập từ lúa và đã được nghiên cứu chi tiết đặc tính [11-13]. Cây lúa chuyển gen *OsNAC1* tăng cường tính chịu hạn, mặn và kết quả phân tích microarray cho thấy biểu hiện của gen ngoại sinh *OsNAC1* đã hoạt hóa hàng loạt gen chức năng liên quan đến tính chịu hạn. Kết quả thử

thử nghiệm trên đồng ruộng các cây lúa chuyển gen *SNAC1* cho năng suất cao hơn 22-34% so với các cây đối chứng ở điều kiện hạn [12].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chúng tôi tiến hành thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter *RD29A* với mục tiêu làm tạo nguồn vật liệu cho công tác nghiên cứu tạo giống cây trồng chống chịu hạn, mặn theo định hướng chuyển gen.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Hạt giống cây *Arabidopsis thaliana* kiểu *Colombia* do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp; chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và các vector pCAM-Ubi, pJET/NAC1 do Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Các đoạn oligonucleotide dùng cho phản ứng PCR nhân bản gen được thiết kế dựa trên trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới (mã số AY973635.1) và tổng hợp bởi hãng Sigma (bảng 1).

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

Tên mồi	Trình tự mồi
RD-Fw	5'- <u>AAGCTTC</u> GACTCAAAACAACTTA-3'
RD-Rv	5'- <u>GGATCC</u> AATCAAACCCTTTATTCC-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
NOS-Rv	5'-AGACCGGCAACAGGATTCAA-3'
35S-Fw	5'-CCCACTATCCTTCGCAA-3'
GUS-Rv	5'-GATTCACGGGTTGGGGTTTCT-3'
NAC1-Fw	5'- <u>GGATCC</u> ATGGGGATGGGGATGAGGAG-3'
NAC1-Rv	5'- <u>GGATCCT</u> CAGAACGGGACCATGCCCA-3'

2.2. Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của cây *Arabidopsis* được tách chiết theo phương pháp của Doyle và cộng sự [14], sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nito lỏng, sau đó được bổ sung 500 μ l dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500 μ l 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 RD29A:

Promoter RD29A phân lập từ DNA tổng số của cây *A. thaliana* bằng kỹ thuật PCR với chu kỳ nhiệt: 94^oC-5 phút; (94^oC – 30 giây, 56^oC – 20 giây, 72^oC - 40 giây) x 35 chu kỳ; 72^oC - 7 phút và bảo quản ở 4^oC. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET-TM Gel Extraction* của hãng Fermentas. Promoter RD29A nhân bản bằng PCR được nhân dòng bằng bộ kit pGEMT Easy theo qui trình đi kèm của hãng Promega. Plasmid tái tổ hợp pGEMT/RD29A được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit GenJET-TM Plasmid Miniprep của hãng Fermentas và bảo quản ở -20^oC.

Thiết kế vector pCAMBIA-RD29A:

Vector tách dòng pGEM- RD29A và vector pCAMBIA-Ubi được xử lý đồng thời với *Hind*III và *Bam*HI. Trình tự promoter RD29A được ghép nối vector pCAMBIA1301 mạch bằng enzyme T4 ligase (Invitrogen) để tạo vector tái tổ hợp pCAM-RD29A. Plasmid tái tổ hợp pCAM-RD29A được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit GenJET-TM Plasmid Miniprep (Fermentas) và bảo quản ở -20^oC.

Thiết kế cấu trúc biểu hiện promoter RD29A:OsNAC1:NosT

Vector tách dòng pJET-OsNAC1 và vector biểu hiện pCAM-RD29A được xử lý đồng thời với enzyme *Bam*HI. Trình tự mã hóa của *OsNAC1* được ghép nối vào vector biểu hiện tại vị trí đa điểm cắt (Multi cloning sites) nằm giữa vùng promoter RD29A và vùng kết thúc phiên mã *NosT* nhờ enzyme T4 Ligase (Invitrogen) . Thử biến nạp sau khi sàng lọc bằng phản ứng PCR với hai cặp môi RD-Fw/NAC1-Rv và RD-Fw/NAC1-Fw được nuôi trong môi trường LB để tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp.

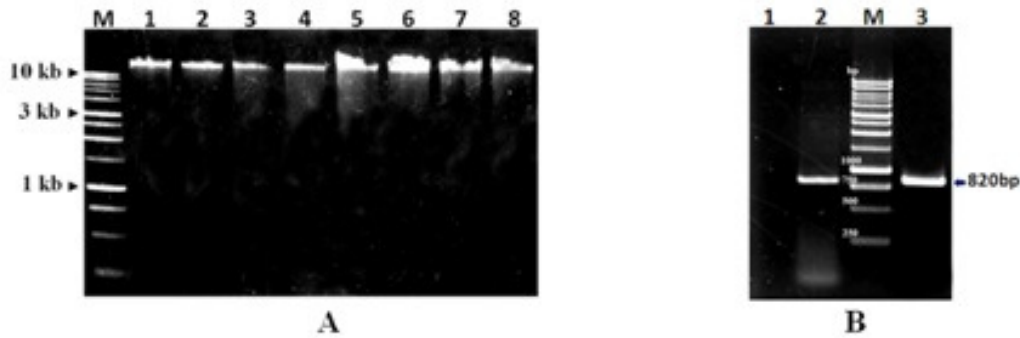
Giải và phân tích trình tự promoter RD29A

Vector tái tổ hợp pGEM-RD29A được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự [15] 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 Gene Bank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0.

3. Kết quả và thảo luận

Phân lập promoter RD29A từ DNA tổng số của cây Arabidopsis

Trước đây đã có nhiều nghiên cứu chứng minh vai trò của promoter RD29A đối với đáp ứng chống chịu điều kiện bất lợi của cây *A. thaliana* [1]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập promoter RD29A từ cây *A. thaliana* để phục vụ thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã tăng cường tính chống chịu điều kiện bất lợi ở lúa *OsNAC1*. Hạt *A. thaliana* được gieo trồng đến giai đoạn một tháng tuổi, chúng tôi thu toàn bộ lá và thân cây, nghiền mẫu trong nito lỏng, sau đó tách chiết DNA tổng số bằng CTAB. Kết quả điện di mẫu tách chiết DNA trên gel agarose 1% cho thấy các mẫu DNA thu được hoàn toàn tinh sạch, không bị lẫn RNA (hình 1A). Mẫu DNA tách chiết được bảo quản trong đệm TE ở -20^oC.



Hình 1. Kết quả nhân bản trình tự promoter *RD29A* từ DNA tổng số.

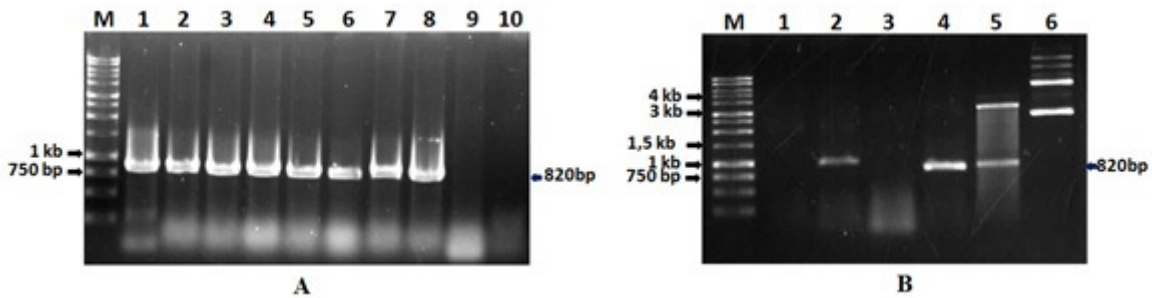
Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm DNA tổng số của *A. thaliana* trên gel agarose 1%; giếng 1 - 8: các mẫu DNA tổng số tách chiết từ *A. thaliana*. (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn promoter *RD29A* trên gel agarose 1%; giếng 1: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2: khuôn là DNA tổng số, giếng 3: sản phẩm PCR tinh sạch bằng bộ kit *GenJET™ Gel Extraction*. Giếng M: thang DNA chuẩn 1 kb.

Dựa vào trình tự nucleotide của gen *RD29A* được công bố trên ngân hàng gen (AY973635.1), chúng tôi đã thiết kế cặp mồi *RD29A-F/RD29A-R* (bảng 1) để sử dụng cho phản ứng PCR nhân bản promoter *RD29A* từ cây *Arabidopsis thaliana*. Phản ứng PCR được thực hiện 35 chu kỳ, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 20 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy chúng tôi đã thu được một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 1B, giếng 2), tương ứng với kích thước lý thuyết của promoter *RD29A* cần nhân bản là 823 bp. Đối với phản ứng đối chứng âm không có DNA tổng số trong hỗn hợp phản ứng, chúng tôi không thu được băng DNA này (hình 1B, giếng 1). Kết quả này cho thấy chúng tôi đã nhân bản được đoạn DNA mong muốn từ DNA tổng số của *A. thaliana* bằng cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế. Sản phẩm PCR nhân bản promoter *RD29A* sau đó được chúng tôi tinh sạch bằng bộ kit *GenJET™ Gel Extraction* (Fermentas) và điện di kiểm tra lại trên gel agarose 1% (hình 1B, giếng 3). Sản phẩm

PCR tinh sạch này được chúng tôi sử dụng cho thí nghiệm nhân dòng và giải trình tự sau này.

Nhân dòng promoter *RD29A*

Sản phẩm PCR tinh sạch được chúng tôi ghép nối trực tiếp với vector pGEM-T, sử dụng bằng bộ kit nhân dòng pGEM®-T Vector System II (Promega). Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 50μg/ml, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Theo lý thuyết, các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường có màu trắng là khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp, trong khi đó các khuẩn lạc có màu xanh là những khuẩn lạc mang plasmid nguyên bản tự đóng vòng. Kết quả kiểm tra các thể biến nạp bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu (*RD-Fw/RD-Rv*) cho thấy chúng tôi đã thu được các thể biến nạp dương tính (hình 2A). Để khẳng định kết quả thu được, chúng tôi đã tinh sạch plasmid từ khuẩn lạc dương tính và kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau và xử lý cắt bằng enzyme giới hạn *HindIII/BamHI*.



Hình 2. Kết quả nhân dòng promoter *RD29A* vào vector pGEM-T.

Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc mang pGEM/RD29A với cặp mồi đặc hiệu RD-Fw/RD-Rv; giếng 1 - 9: sản phẩm PCR từ khuôn là khuẩn lạc số 1 - 9; giếng 10: đối chứng âm (khuôn là H₂O). (B) Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/RD29A bằng PCR (giếng 1 - 4) và phản ứng cắt giới hạn (giếng 5 & 6); giếng 1 & 2: PCR với cặp mồi T7/SP6; giếng 3 & 4: PCR với cặp mồi RD-Fw/RD-Rv; giếng 1 & 3: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 2 & 4: khuôn là pGEM/RD29A; giếng 5: sản phẩm phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI/*Hind*III; giếng 6: vector pGEM/RD29A nguyên bản. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb.

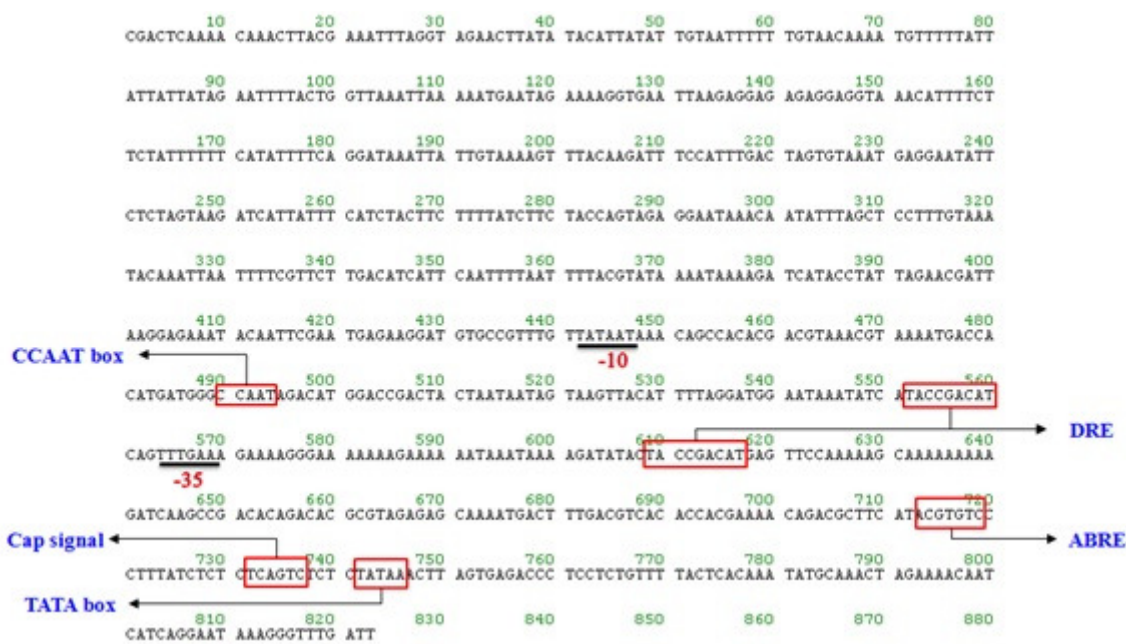
Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được chúng tôi thực hiện với 2 cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu của vector pGEM-T (T7/SP6) có khoảng cách 186 bp trên vector pGEM-T và cặp mồi đặc hiệu của đoạn gen *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv). Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% trên hình 2B cho thấy với cặp mồi đặc hiệu chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 2B, giếng 4). Sản phẩm PCR với cặp mồi vector cho một băng DNA có kích thước khoảng 1,0 kb, kích thước này phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết, bao gồm 823 bp của đoạn gen *RD29A* và 186 bp của vector pGEM-T (hình 2B, giếng 2). Tiếp đó, do trên cặp mồi đặc hiệu được dùng để nhân bản đoạn gen *RD29A* chúng tôi có thiết kế trình tự nhận biết của hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III, vì vậy, để kiểm plasmid tái tổ hợp thu được, chúng tôi thực hiện phản ứng cắt đồng thời bằng enzyme giới hạn *Bam*HI/*Hind*III. Kết quả thu được trên hình 2B cho thấy sản phẩm của phản ứng cắt cho hai băng DNA, băng DNA thứ nhất có kích thước khoảng 3,0 kb là bộ khung nguyên bản của vector pGEM-T,

băng DNA còn lại là đoạn promoter *RD29A* có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 2B, giếng 5). Các kết quả thu được này cho phép chúng tôi khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công trình promoter *RD29A* vào vector pGEM-T.

Để khẳng định chính xác đoạn DNA được nhân dòng vào vector pGEM-T có đúng là promoter *RD29A* mong muốn hay không, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn DNA này trong vector tái tổ hợp pGEM-RD29A. Kết quả giải trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với trình tự gen *RD29A* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới (AY973635.1). Kết quả phân tích trình tự DNA cho thấy đoạn DNA phân lập được có chiều dài 823 bp, có trình tự tương đồng 100% với trình tự đã công bố trước đây của promoter *RD29A* [[1]]. Trình tự DNA phân lập được có chứa các vùng trình tự đặc trưng cần thiết của một promoter điều hòa biểu hiện gen: TATA-box (742-746), CCAAT-box (489-494); vùng tín hiệu gắn mũ G (732-737), vùng giàu GC (472-509) và hai yếu tố hoạt hóa *cis-acting* (552-560 và 609-617). Các phân tích sâu hơn cho thấy đoạn DNA của chúng tôi cũng chứa

các vùng liên quan đến cảm ứng trong điều kiện khô hạn: DRE (497-502), ABRE (712-719) và hai vùng trình tự 20 Nucleotide lặp trước (546-560) và lặp sau (603-622). Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện một vùng trình tự gần giống với

trình tự hoạt hóa As1 (682-689) đã được chứng minh là có chức năng điều khiển gen biểu hiện đặc hiệu ở rễ. Kết quả này phù hợp với những công bố trước đây về promoter *RD29A* của *Arabidopsis*.



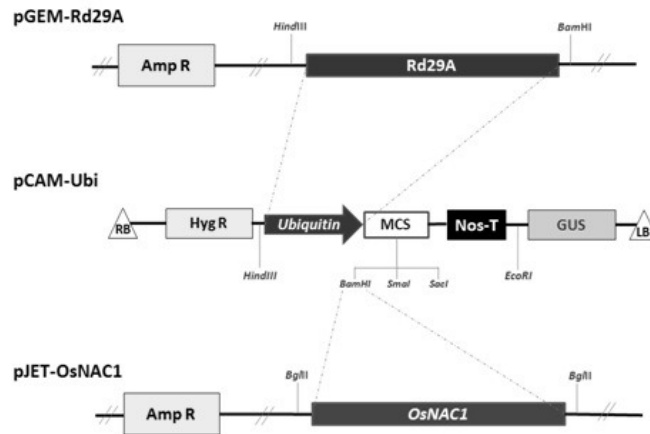
Hình 3. Kết quả phân tích trình tự gen *RD29A*.

Từ các kết quả thu được ở trên, chúng tôi có thể khẳng định đã phân lập và nhân dòng thành công promoter *RD29A* ở *A. thaliana*. Sản phẩm nhân dòng sẽ được chúng tôi tiếp tục sử dụng cho các nghiên cứu thiết kế vector biểu hiện mang gen *OsNAC1* được đặt dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng điều kiện bất lợi *RD29A*.

Thiết kế vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang promoter điều khiển RD29A

Trong nghiên cứu này, để thiết kế vector biểu hiện gen *OsNAC1* dựa trên hệ vector thương mại pCAMBIA1301, chúng tôi đã sử dụng vector pCAM-Ubi do phòng Bệnh học phân tử đã thiết kế làm nguyên liệu cho thí nghiệm (hình 4). Để thay thế trình tự promoter

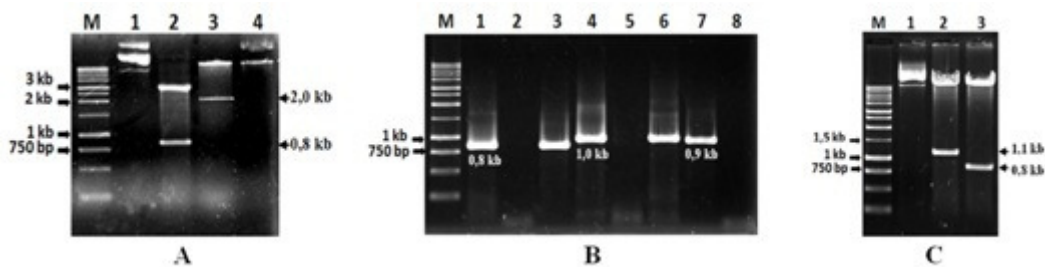
RD29A vào vị trí promoter *Ubiquitin* trong vector biểu hiện pCAM-Ubi, chúng tôi đã xử lý đồng thời 2 vector pGEM-*RD29A* và pCAM-Ubi với *HindIII/BamHI* (hình 5A). Sau khi tinh sạch sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn từ gel agarose, trình tự promoter *RD29A* (0,8 kb) được chèn vào vị trí promoter *Ubiquitin* (2,0 kb) đã được cắt bỏ trên vector biểu hiện pCAM-Ubi dưới tác dụng của enzyme T4 ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Sau khi sàng lọc thể biến nạp dương tính bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu promoter *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv), chúng tôi tiến hành tinh sạch plasmid từ các thể biến nạp này và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 4. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pCAM-Rd/OsNAC1.

Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuôn là plasmid tinh sạch cho thấy, với cặp mỗi đặc hiệu cho promoter *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv) và đặc hiệu cho hệ vector pCAMBIA1301 (35S-Fw/Gus-Rv) chúng tôi thu được các sản phẩm PCR có kích thước lần lượt khoảng 0,8 kb (hình 5B, giếng 1) và 1,0 kb (hình 5B, giếng 6), bằng với kích thước của hai băng DNA của phản ứng đối chứng dương sử dụng vector pGEM/RD29A (hình 5B, giếng 1) và vector pCAM-Ubi làm khuôn (hình 5B, giếng 3). Đối

với phản ứng PCR sử dụng mỗi đặc hiệu cho promoter *RD29A* và mỗi đặc hiệu cho vùng NOS, chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước khoảng 0,9 kb đúng với kích thước tính toán lý thuyết (hình 5A, giếng 7). Khi xử lý plasmid tái tổ hợp này bằng *HindIII/BamHI*, chúng tôi thu được băng DNA có kích thước 0,8 bp tương ứng với đoạn trình tự promoter *RD29A* và một băng DNA kích thước khoảng 12 kb là bộ khung vector pCAMBIA1301 (hình 4; hình 5C, giếng 3).



Hình 5. Kết quả ghép nối trình tự promoter *RD29A* vào hệ vector pCAMBIA1301.

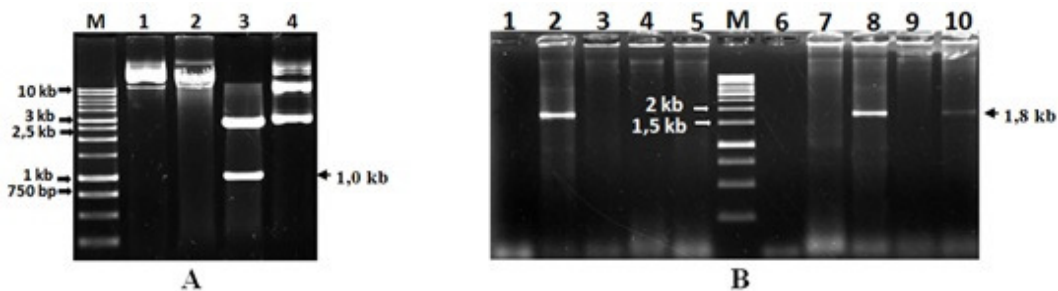
Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn pGEM/RD29A (giếng 1&2) và pCAM-Ubi (giếng 3&4) bằng *HindIII/BamHI* trên gel agarose 1%; giếng 1&4: vector nguyên bản; giếng 2&3: vector được xử lý với *HindIII/BamHI*. (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAM-Rd; giếng 1 – 3: PCR với cặp mỗi RD-Fw/RD-Rv; giếng 4 – 6: PCR với cặp mỗi 35S-Fw/GUS-Rv; giếng 7 & 8: PCR với cặp mỗi RD-Fw/NOS-Rv; giếng 1, 4 & 7: khuôn là pCAM-Rd; giếng 2, 5 và 8: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 3: đối chứng dương (khuôn là pGEM/RD29A); giếng 6: đối chứng dương (khuôn là pCAM-Ubi). (C) Kết quả điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn pCAM-Rd; giếng 1: vector pCAM-Rd nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *HindIII/EcoRI*; giếng 3: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *HindIII/BamHI*. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb.

Các kết quả này chứng tỏ chúng tôi 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 *RD29A*. Kết quả này được khẳng định chính xác hơn khi chúng tôi xử lý plasmid tái tổ hợp với *HindIII/EcoRI*, sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn khi được điện di trên gel agarose 1% cho 2 băng DNA, trong đó có một băng DNA là bộ khung vector pCAMBIA1301 có kích thước trên 10 kb và một băng DNA có kích thước khoảng 1,1 kb là tổng kích thước của đoạn promoter *RD29A* dài 0,8 kb và vùng kết thúc phiên mã NOS dài 0,3 kb (hình 4; hình 5C, giống 1).

Thiết kế vector biểu hiện pCAM-Rd mang gen OsNAC1

Để đưa trình tự mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* trên vector pJET/*OsNAC1* vào vector biểu hiện pCAM-Rd, chúng tôi đã xử lý 2 vector

này với enzyme *BamHI* (pCAM-Rd) và *BglII* (pJET/*OsNAC1*) (hình 6A). Các sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn được chúng tôi tinh sạch từ gel agarose và thực hiện phản ứng ghép nối nhờ tác dụng của enzyme T4 ligase. Do hai enzyme *BglII* và *BamHI* có khả năng tạo ra các sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn có đầu dính giống nhau nên đoạn gen *OsNAC1* có thể ghép nối được trực tiếp vào vector mạch thẳng pCAM-Rd đã được xử lý trước đó với enzyme Alkaline Phosphatase để khử gốc phosphate nhằm loại bỏ khả năng tự đóng vòng trong phản ứng ghép nối. Bằng phản ứng PCR với 2 cặp mồi RD-Fw/*NAC1*-Rv và RD-Fw/*NAC1*-Fw, chúng tôi đã sàng lọc được hai loại thể biến nạp mang 2 loại vector tái tổ hợp vector khác nhau: vector chứa trình tự mã hóa *OsNAC1* xuôi chiều (sense) pCAM-Rd/*NAC1*-S và vector chứa trình tự mã hóa *OsNAC1* ngược chiều (antisense) pCAM-Rd/*NAC1*-AS (hình 6B).



Hình 6. Kết quả ghép nối trình tự mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* vào vector pCAM-Rd.

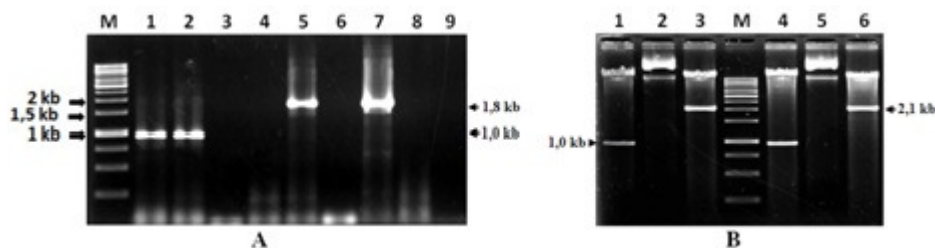
Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pCAM-Rd (giếng 1&2) và pJET/*OsNAC1* (giếng 3&4) bằng *BamHI*; giếng 1&3: sản phẩm cắt giới hạn; giếng 2&4: vector nguyên bản. B. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn lạc với cặp mồi RD-Fw/*NAC1*-Rv (giếng 1-5) và RD-Fw/*NAC1*-Fw (giếng 6-10); giếng 1, 6: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 2 - 5 & 7-10: khuôn là khuẩn lạc số 1 - 4. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1kb.

Để khẳng định sự có mặt của gen *OsNAC1* trong vector tái tổ hợp, chúng tôi đã tinh sạch plasmid từ các thể biến nạp dương tính và kiểm tra bằng PCR và cắt bằng enzyme giới hạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy, với cặp mồi *NAC1*-Fw/*NAC1*-Rv, cả 2 vector tái tổ hợp đều cho băng DNA khoảng 1,0 kb, tương ứng với kích thước của gen *OsNAC1* (hình 7A, giếng 1&2). Với cặp mồi RD-Fw/*NAC1*-Rv, chỉ có sản phẩm PCR từ

vector pCAM-Rd/*NAC1*-S cho kết quả dương tính (hình 7A, giếng 7). Ngược lại, với cặp mồi RD-Fw/*NAC1*-Fw, chỉ có sản phẩm PCR từ vector pCAM-Rd/*NAC1*-AS cho kết quả dương tính (hình 7A, giếng 5). Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn hai plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *BamHI* đã cho băng DNA có kích thước 1,0 kb đúng theo tính toán lý thuyết của đoạn gen *OsNAC1* (hình 7B, giếng 1 & 4). Các kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã

thiết kế thành công vector biểu hiện pCAM-Rd mang 2 trình tự có nghĩa (sense) và đối nghĩa (antisense) của gen *OsNAC1*, đặt dưới sự điều khiển của promoter *RD29A*. Kết quả này càng được khẳng định khi chúng tôi xử lý vector tái tổ hợp với đồng thời hai enzyme *HindIII/EcoRI*, sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn khi được điện di trên gel agarose 1% cho 2 băng DNA: bộ khung vector pCambia1301

kích thước 12,0 kb và cấu trúc biểu hiện gen *RD29A:OsNAC1:NOS* kích thước khoảng 2,1 kb (bao gồm *RD29A* 0,8 kb, đoạn gen *OsNAC1* 1,0 kb và vùng kết thúc phiên mã 0,3 kb) (hình 4; hình 7B-C, giếng 3 & 6). Cả hai vector tái tổ hợp này sẽ được chúng tôi sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu biểu hiện của gen *OsNAC1* trong cây mô hình.



Hình 7. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAM-Rd/NAC1-S và pCAM-Rd/NAC1-AS.

Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%; giếng 1 - 3: PCR với cặp mồi NAC1-Fw/NAC1-Rv; giếng 4 - 6: PCR với cặp mồi RD-Fw/NAC1-Fw; giếng 7 - 9: PCR với cặp mồi RD-Fw/NAC1-Rv; giếng 1, 4 & 7: khuôn là pCAM-Rd/NAC1-S; giếng 2, 5 & 8: khuôn là pCAM-Rd/NAC1-AS; giếng 3, 6 & 9: đối chứng âm (khuôn là H₂O). (B) Kết quả điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn pCAM-Rd/NAC1-S (giếng 1 - 3) và pCAM-Rd/NAC1-AS (giếng 4 - 6); giếng 1&4: sản phẩm cắt giới hạn bằng BamHI; giếng 2&5: vector nguyên bản; giếng 3&6: sản phẩm cắt giới hạn bằng HindIII/EcoRI. Giếng M: Thang DNA chuẩn 1 kb.

4. Kết luận

Bằng phương pháp PCR, sử dụng mẫu DNA tổng số tách chiết từ giống cây *Arabidopsis thaliana*, chúng tôi đã phân lập thành công trình tự promoter *RD29A* cảm ứng với điều kiện stress. Đoạn trình tự promoter *RD29A* phân lập đã được chúng tôi nhân dòng thành công vào vector pGEM-T và giải trình tự đầy đủ. Trình tự promoter *RD29A* có mức độ tương đồng 100% so với trình tự promoter đã được công bố trên Ngân hàng gen Thế giới. Sản phẩm nhân dòng promoter *RD29A* đã được chúng tôi sử dụng để thiết kế cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1* mã hóa nhân tố phiên mã liên quan tới tính chịu hạn ở lúa dựa trên bộ khung của vector pCambia1301. Plasmid tái tổ hợp pCAM-Rd/NAC1-S (mang trình tự có nghĩa của *OsNAC1*) và pCAM-Rd/NAC1-AS (mang trình tự đối nghĩa của *OsNAC1*) đã được chúng tôi

tinh sạch và bảo quản để sử dụng cho các nghiên cứu biểu hiện gen trong cây mô hình sau này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of Rd22, a gene responsive to dehydration stress on *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Gener.*, 238 (1-2):17-25.
- [2] Wu Y., Zhou H., Que Y. X., Chen R. K. and Zang M. Q., 2008. Cloning and identification of promoter PRD29A and its application in sugarcane drought resistance. *Sugar Tech.*, 10(1): 36-41.
- [3] Zang N., Si H. J. and Wang Q., 2005. Cloning of RD29A gene promoter from *Arabidopsis thaliana* and its application in stress-resistance transgenic potato. *Acta. Agronomica Sinica*, 31(2):159-164.
- [4] Gao S. Q., Chen M. and Ma Y. Z., 2005. Activity of RD29A promoter in Wheat immature

- embryonic calli. Acta. Agronomica Sinica, 31(2):150-153.
- [5] Huang N. T. T., Mau C. H., Son L. V., Cuong N. H., Ha C. H., 2010. Tách dòng và đánh giá hoạt động của promoter cảm ứng khô hạn RD29A từ *Arabidopsis thaliana*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 8(4):1809-1814.
- [6] Sun X. H. and Chen M. J., 2002. A brief account of promoter cloning. Acta. Edulis Fungi, 9(3):57-62.
- [7] Ooka H., Satoh K., Nagata T., Otomo Y., Murakami K., Matsubara K., Osato N., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y., Suzuki K., Kojima K., Takahara Y., Yamamoto K. and Kikuchi S., 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Res., 10:239-247.
- [8] Rushton P. J., Bokowiec M. T., Han S., Zhang H., Brannock J. F. and Chen X., 2008. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. Plant Physiol., 147:280-295.
- [9] Hu R., Qi G., Kong Y., Kong D., Gao Q. and Zhou G., 2010. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. BMC Plant Biol., 10:145.
- [10] Nuruzzaman M., Manimekalai R., Sharoni A. M., Satoh K., Kondoh H. and Ooka H., 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. Gene, 465:30-44.
- [11] Hu H., Dai M., Yao J., Xiao B., Li X., Zhang Q. and Xiong L., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(35):12987-92.
- [12] Liu G., Li X., Jin S., Liu X., Zhu L., Nie Y. and Zhang X., 2014. Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. PLoS One, 9(1).
- [13] You J., Zong W., Li X., Ning J., Hu H., Li X., Xiao J. and Xiong L., 2013. The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. J. Exp. Bot., 64(2):569-83.
- [14] Doyle J. J. and Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13-15.
- [15] Sanger F., S. Micklen, and AR Coulson, 1977. DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.

Construction of Expression Vectors Containing *OsNAC1* Driven by Stress-Inducible RD29A Promoter

Phạm Thu Hằng¹, Nguyễn Duy Phương¹, Trần Lan Đài³,
Phan Tuấn Nghĩa², Phạm Xuân Hội¹

¹Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Phạm Văn Đồng, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hanoi, Vietnam

³Quy Nhon University, 170 An Dương Vương, Quy Nhon, Bình Định, Vietnam

Abstract: NAC family (NAM, ATAF1/2, CUC2), which is the largest plant transcription factor family, plays an important role in development and stress responses in plants. Previous studies used several stress-inducible promoters, including *RD29A* promoter, in overexpression of regulatory genes in order to improve drought tolerance of transgenic plants without induction of growth retardation. In this study, we cloned *Arabidopsis thaliana* *RD29A* promoter and constructed the plant expression vector carrying drought tolerance *OsNAC1* gene related in drought tolerance driven by *RD29A* promoter. A full-length ORF of *OsNAC1* was inserted at *Bam*HI site downstream of *RD29A* promoter in plant expression pCAMBIA1301. The recombinant vector pCAM-Rd/*OsNAC1* will be transformed into plant using *Agrobacterium tumefaciens* in further studies.

Keywords: Drought tolerance, *OsNAC1*, *RD29A*, gene transformation.