

độ của chế phẩm NAA trong hỗn hợp Paclotuzol (10%) + NAA

2. Đề nghị

Tiếp tục thực hiện thí nghiệm trên một số giống xoài khác và sử dụng thêm một số chế phẩm điều hòa sinh trưởng mới, nhằm tìm ra chế phẩm có hiệu lực tốt nhất trong việc nâng cao năng suất xoài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Minh Châu (1998). *Cây ăn quả Nam bộ*. Thông tin Khuyến nông Việt Nam, Bộ Nông nghiệp & PTNT số 2/1998, tr 10-15.
2. Vũ Công Hậu (1999), *Trồng cây ăn quả ở Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh.
3. Vũ Công Hậu, Lê Quang Mai, Đinh Văn Đức (1982), *Trồng cây ăn quả trong vườn*, NXB Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh, tr 9-14.
4. Phạm Thị Hương, Trần Thế Tục, Nguyễn Quang Thạch (2001), *Cây xoài và những điều cần biết*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Dương Minh, Võ Thanh Hoàng, Lê Thanh Phong (1997), *Cây xoài*, NXB Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh.
6. Viện Nghiên cứu cây ăn quả miền Nam. *Các chỉ tiêu cần theo dõi cho việc khảo sát một số giống cây ăn quả.*

Người phản biện
PGS. TS. Nguyễn Văn Việt

TÁCH CHIẾT VÀ PHÂN LẬP PROMOTER *OsNAC6* TỪ CÁC GIỐNG LÚA VIỆT NAM

Nguyễn Văn Đồng

SUMMARY

EXTRACTING AND ISOLATING *OsNAC6* PROMOTER FROM VIET NAM RICE VARIETIES

The new trend is continuous activation promoters replaced by induction promoter system that help to effective control the activity of the transform-genes into plant. In this study, we extracted *OsNAC6* promoter from the Vietnam rice varieties that grown under artificial drought condition for a week. It is used for inserting into pSK cloning vector in *E.coli*. Then it will be inserted into the pBIH expression vector and transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA105 and AGL1. The PCR analysis positive clones that grown on LB-agar selection medium plates (50mg/l kanamycin, 50mg/l hygromycin) with primers for *gus* gene (1786bp), *hpt* gene (514bp) and *OsNAC6* promoter (1507bp) tested successfully.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, rice, *OsNAC6*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Promoter thường được sử dụng hiện nay trong công nghệ sinh học là dạng hoạt hóa liên tục 35S promoter với *Arabidopsis*; ubiquitine promoter với lúa và ngô dẫn đến việc khó kiểm soát hàm lượng protein của gen điều khiển. Vấn đề này đã được giải quyết bằng việc thay thế các promoter hoạt hóa liên tục bằng các promoter cảm ứng

như *RD29* (Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2004), *OsNAC6* (Shinozaki *et al.*, 2005) đã khắc phục được tình trạng sinh trưởng yếu của cây chuyển gen. Xu hướng này đang là vấn đề thời sự trong các nghiên cứu áp dụng giống cây trồng chuyển gen có khả năng kháng với bất lợi thời tiết. Bài báo này trình bày kết quả bước đầu trong việc tách chiết phân lập promoter *OsNAC6* ở lúa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi sinh vật: *E.coli*: DH5 α ; *Agrobacterium*: EHA105, AGL1 và các dòng lúa của Việt Nam: CH1 và CH2 có nguồn gốc từ Viện Di truyền Nông nghiệp.

2. Phương pháp nghiên cứu:

Tách chiết ADN từ mẫu lá theo phương pháp của IRRI.

Sử dụng mẫu lá lúa của 2 dòng CH1 và CH2 để tách ADN tổng số theo phương pháp của IRRI. Thực hiện phản ứng PCR với mẫu ADN tổng số thu được với chu kỳ như sau: Ban đầu 94°C (2 phút), tiếp đó là 30 chu kỳ trong đó có 94°C (15giây), 58°C (15giây), 72°C (90giây); cuối cùng là 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên agarose.

Lắp ráp đoạn promoter vào vector biểu hiện *pBIH* (Yoshiba *et al.* Unpublished data).

Phản ứng nối ghép ở đây được thực hiện theo Gene JETtm PCL Cloning Kit của hãng Fermentas và đưa vào tế bào vi khuẩn *E.coli*.

Biến nạp vào tế bào *E.coli* bằng phương pháp sốc nhiệt.

Chuẩn bị tế bào khả biến: Nuôi khuẩn vào dung dịch LB, lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ thích hợp (28°C với *A.tumefaciens* và 37°C với *E.coli*), cho tới khi nồng độ vi khuẩn đạt OD=0.6-0.8 thì chuyển sang ống ly tâm lạnh. Ly tâm 6000 vòng/phút, 10 phút, thu cặn. Hòa tan nhẹ nhàng trong

CaCl₂ 0,1M. Chia vào các ống eppendorf, bổ sung glycerol 60%, làm lạnh nhanh bằng nitơ lỏng và giữ ở -80°C tới khi làm biến nạp.

Quy trình: Thực hiện biến nạp vào *E.coli* bằng phương pháp sốc nhiệt và vào tế bào *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp điện xung.

Phương pháp tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn:

ADN plasmid được tách theo phương pháp của Sambrook & cs. Kiểm tra ADN trên gel agarose 0.8%.

Phương pháp cắt ADN bằng enzyme hạn chế.

Sử dụng 2 enzyme *HinIII* và *BamHI* để cắt đoạn ADN. Điện di sản phẩm ADN cắt trên gel agarose 1% để kiểm tra.

Phương pháp giải trình tự ADN:

Trình tự ADN xác định trình tự trên máy CEQ-8000 của hãng Beckman Coulter tại Viện vi sinh vật và công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội.

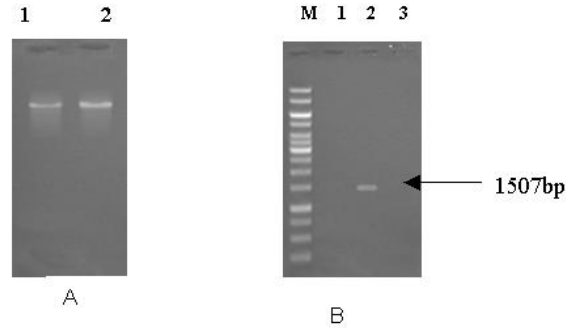
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách chiết ADN tổng số từ các dòng lúa Việt Nam

Các giống lúa Việt Nam sau khi trồng 1 tuần được gây hạn nhân tạo, sau đó tách ADN bằng phương pháp của IRRI. Các mẫu ADN được đo nồng độ ADN bằng máy quang phổ NanoDrop (bảng 1), và chạy điện di trên gel agarose 0.8% (hình 1.a).

Bảng 1. Kết quả đo hàm lượng ADN tổng số các mẫu thực vật

STT	Mẫu	Hàm lượng ng/ μ l	A260 nm	A280nm	260/280
1	Lúa CH số 1	495.48	9.91	5.194	1.91
2	Lúa CH số 2	99.36	1.987	1.089	1.82



Hình 1. Hình ảnh điện di các sản phẩm

A. Kết quả chạy điện di ADN tổng số, 1: lúa CH1; 2: lúa CH2
 B. Kết quả điện di sản phẩm PCR, M: marker; 1: mẫu CH1; 2: mẫu CH2; 3: mẫu âm tính (H20)

PCR tách, phân lập đoạn promoter *OsNAC6*: Các mẫu ADN số 1 và 2 theo thứ tự bảng 1 được sử dụng làm khuôn được chạy với cặp mồi *OsNAC6* Pro-F1 và *OsNAC6* Pro - R1. Kết quả chạy điện di trên gel cho thấy thu được băng có kích thước khoảng 1,5kb tại mẫu lúa CH2 (hình 1.b). Kích thước này cũng đúng so với tính toán lý thuyết, tương tự như nghiên cứu của Nakashima (2007). Cắt băng thu được và chuyển vào plasmid pSK và tiến hành nhân dòng.

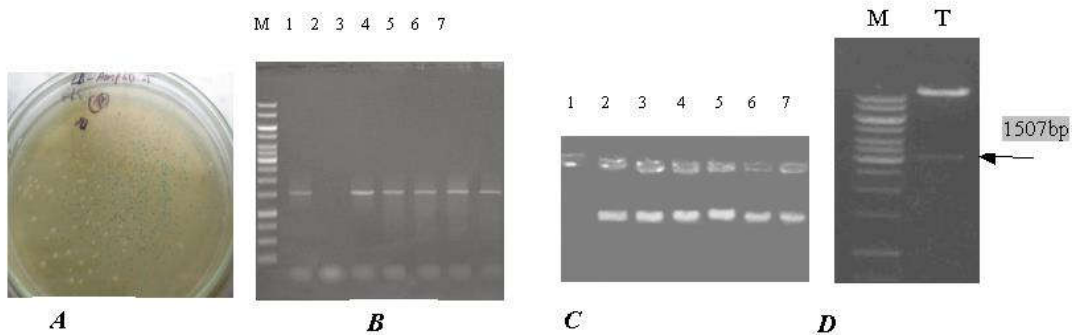
2. Lắp ráp đoạn *OsNAC6* promoter vào vector pSK và nhân dòng trong *E.coli*

Đoạn ADN thu được từ PCR được gắn vào vector pSK bằng bộ kit ligation (Kit 1423 - Fermentas). Sau đó, plasmid được nhân dòng trong *E. coli* strain DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và chọn lọc xanh trắng (hình 2.a). Khuẩn lạc dương tính được tách ADN plasmid, kiểm tra với PCR đoạn gen *Gus*, *Hpt* và đoạn ADN Promoter *OsNAC6* kích thước 1507bp (Hình 2.b). Các khuẩn lạc cho kết quả dương tính với PCR được tiến hành nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (Amp 50mg/l) để tách ADN plasmid phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo. ADN plasmid sau khi tách được tiến hành đo bằng máy Nano Drop và chạy

điện di trên gel Agarose 0.8% (hình 2.c). ADN plasmid tinh sạch được cắt với enzyme giới hạn (*Hind*III và *Bam*HI) và quả thu được ADN plasmid cắt cho band có kích thước bằng với đoạn promoter *OsNAC6* (1507 bp) (Hình 2.d). Mẫu ADN plasmid sau khi tinh sạch được tiến hành giải trình tự kiểm tra. Chúng tôi tiến hành so sánh với trình tự gốc của đoạn promoter *OsNAC6* được cung cấp bởi GS. Nakashima. Kết quả cho thấy trình tự của đoạn promoter tách từ giống CH2 của Việt Nam tương đồng 99,996% (chỉ sai khác 6 nucleotide), và đặc biệt các trình tự tại vị trí có chức năng quan trọng (Nakashima, 2007) thì tương đồng 100%. Các mẫu ADN giải trình tự cho kết quả tốt được sử dụng để cắt, chuyển đoạn ADN chứa promoter *OsNAC6* vào vector biểu hiện pBIH.

3. Lắp ráp đoạn *OsNAC6* Promoter vào vector biểu hiện pBIH

Đoạn ADN chứa promoter *OsNAC6* mang gen *Gus* được cắt và chuyển vào vector *pBIH* và biến nạp vào các chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp điện xung. Tiến hành chọn lọc và phân tích các khuẩn lạc dương tính bằng kháng sinh và PCR các đoạn gen *Gus*, *Hpt* và *OsNAC6* promoter.



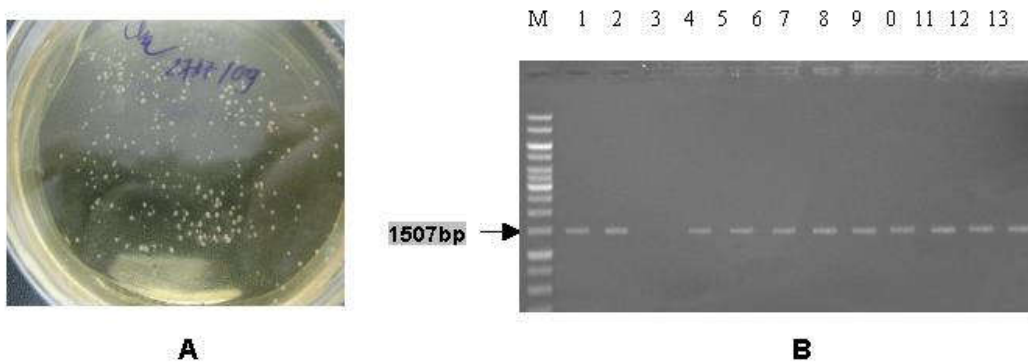
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm tách ADN plasmid và sản phẩm cắt ADN plasmid

OsNAC6 promoter với enzyme giới hạn

- A. Kết quả chọn lọc xanh trắng của *OsNAC6* Promoter trong DH5 α
 B. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi *OsNAC6* promoter
M marker; 1 ADN plasmid *OsNAC6* promoter; 2 H₂O (mẫu âm tính; 3-6 khuẩn lạc DH5 α
 C. Kết quả điện di sản phẩm tách ADN plasmid
 1: Mẫu DH5 α không biến nạp (mẫu âm tính) 2 – 6: Mẫu ADN plasmid DH5 α
 D. Kết quả điện di sản phẩm cắt ADN plasmid *OsNAC6* promoter với enzyme giới hạn:
M: Marker 1k *T*: Mẫu ADN

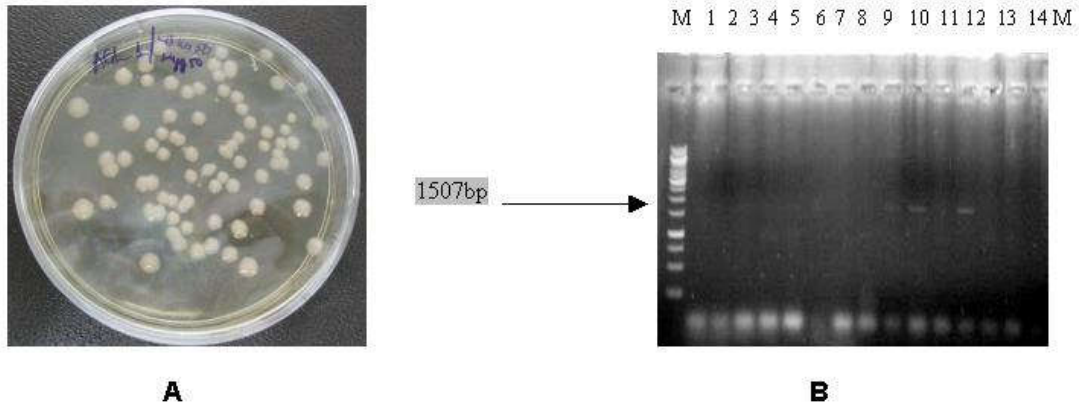
Tiến hành biến nạp và đã tạo được chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, AGL1 mang vector biểu hiện pBIH-*OsNAC6* - promoter. Plasmid pBIH chứa promoter *OsNAC6* mang gen chỉ thị *Gus* và

Hygromycin được chuyển vào các chủng *Agrobacterium* (gồm EHA105, AGL1) theo phương pháp của Joseph Sambrook và David William Russell.



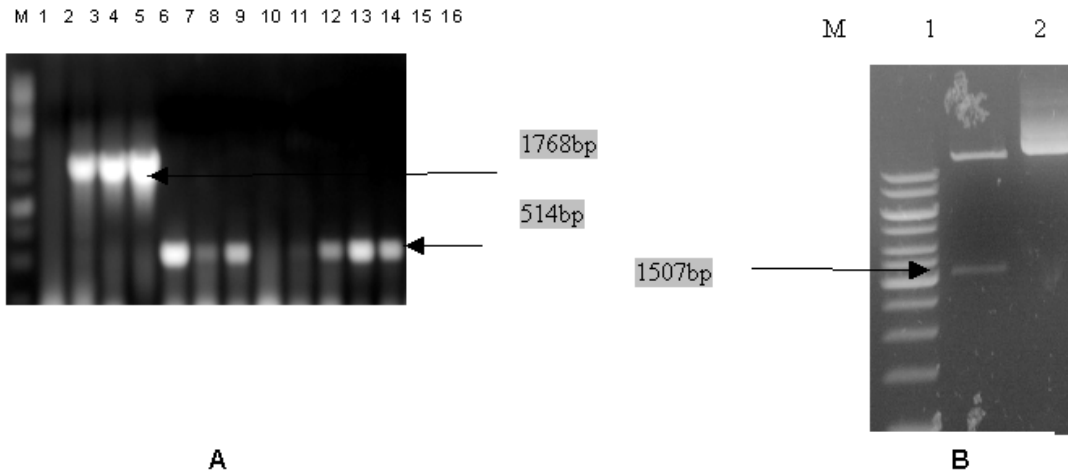
Hình 3

- A. Mẫu biến nạp plasmid pBIH-OSNAC-Pro với chủng EHA105
 B. Kết quả chạy điện di PCR khuẩn lạc đoạn promoter *OsNAC6* với chủng EHA105; *M*: Marker 1kb
 1 : ADN plasmid chứa *OsNAC6* (mẫu dương tính)
 2: Vi khuẩn *E.coli* DH5 α chứa *OsNAC6* (mẫu dương tính) 3 : H₂O (mẫu âm tính)
 4 - 13: Chủng EHA105 được biến nạp



Hình 4

A. Mẫu biến nạp plasmid pBIH-OsNAC-Pro với chủng AGL1
 B. E. Kết quả chạy điện di PCR khuẩn lạc đoạn promoter *OsNAC6* với chủng AGL1
 M: Marker 1kb 1 – 14: Chủng AGL1 được biến nạp



Hình 5

A. Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR các khuẩn lạc với cặp mồi gus và hygromycin
 M: Marker 1kb 1: Mẫu âm tính (H₂O); 2- 4: Khuẩn lạc chạy với mồi Gus; 5: Mẫu dương tính Hygromycin
 (vi khuẩn DH5 α chứa gen Hpt); 6-16: Mẫu khuẩn lạc chạy với mồi Hygromycin
 B. Mẫu ADN plasmid cắt với BamHI và HindI: M: marker 1Kb: 1: Mẫu ADN plasmid cắt RE;
 2: Mẫu ADN plasmid tách từ vi khuẩn *A.tumefaciens*

Kết quả thu được tại chủng EHA105 và AGL1 (Hình 3.A và 4.A). Sản phẩm PCR gen *Gus* và *Hpt* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0.8% (hình 5.A). Các khuẩn lạc dương tính chủng EHA105 và AGL1 được sử dụng làm khuôn chạy PCR

với cặp mồi *OsNAC6*. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0.8% cho kết quả như hình 3.B và 4.B. Các khuẩn lạc cho kết quả dương tính trong phản ứng PCR được nuôi cấy và tách plasmid theo phương pháp của Joseph Sambrook và cs.

Mẫu ADN plasmid được tiến hành cắt với enzyme giới hạn để kiểm tra đoạn promoter gắn. Kết quả điện di sản phẩm ADN plasmid (hình 5.B).

IV. KẾT LUẬN

Đã là tách chiết được promoter *OsNAC6* từ các dòng lúa Việt Nam, đưa được vector nhân dòng pSK-*OsNAC6* chuyển vào *E.coli* và đã đưa thành công vào vector biểu hiện pBIH-*OsNAC6* mang gen *gus* và gen *hpt* vào các chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 và AGL1, sử dụng làm trung gian biến nạp để đưa promoter *OsNAC6* vào các cây trồng có tiềm năng. Kết quả này là tiền đề để tiếp tục hướng đến việc tạo ra các cây trồng chuyển gen như lúa, ngô, đậu tương có khả năng chống chịu điều kiện bất lợi tốt nhờ sự có mặt của các promoter cảm ứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K (1999). *Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-*

- inducible transcription factor*. Nature Biotechnology 17: 287-291.
2. Kasuga M., Miura S., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K (2004). *A combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible rd29A Promoter Improved Drought-and Low-Temperature Stress Tolerance in Tobacco by gen Transfer*. Plant Cell Physiol 45(3): 346-350.
3. Nakashima K., Lam-Son P., Dong V.N., Fujita M., Maryyama K., Todaka D., Ito Y., Hayashi N., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K (2007). *Functional analysis of a NaC-type transcription factor OsNAC6 involed in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice*. The plant Journal: 617-630.
4. Dey M.M., and Upadhyaya H.K (1996). *Yield loss due to drought, cold and submergence in Asia*. In R.E. Evenson, R.W. Herdt and M. Hossain eds., Rice Research in Asia: Progress and Priorities. CAB: 291-304.

Người phản biện:
GS. TSKH. Trần Duy Quý

HOẠT ĐỘNG CỦA PROMOTER *OsNAC6* TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU TRÊN DÒNG LÚA VIỆT NAM CHUYỂN GEN CH1

Nguyễn Văn Đồng

SUMMARY

***OsNAC6* promoter activity of enhancing resistance to the Vietnam transgenic rice lines CH1**

The drought, salt and cold are unfavourable factors of the environment in reduced productivity of rice. *OsNAC6* promoter activity of rice helps increase resistance to adverse conditions. *OsNAC6* promoter was transformed into rice calli from mature embryos of line CH1 through *Agrobacterium tumefaciens*. After two consecutive selection on culture medium added 50 mg/l hygromycin were screened for 13 plants survived. Conducted artificial stress to the T1 generation seedlings through gene expression of *Gus*. *Gus* staining results of the T1 stress rice plants showed promoter *OsNAC6* works well on rice, transformation experiments, regenerated rice made with this vector was successful.

Keyword: *Agrobacterium tumefaciens*, *OsNAC6*, rice.