



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002322

(51)⁷ **C12N 15/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00420

(22) 22/12/2017

(45) 25/06/2020 387

(43) 26/03/2018 360A

(73) Viện Nghiên cứu hệ gen (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Huỳnh Thị Thu Huệ (VN); Hà Hồng Hạnh (VN); Lê Thị Thu Hiền (VN); Lưu Hàn Ly (VN); Nguyễn Thùy Linh (VN); Phạm Thị Hằng (VN); Nông Văn Hải (VN); Nguyễn Huy Hoàng (VN).

(54) **CẤU TRÚC ADN BIỂU HIỆN MANG GEN ZMLEA14A VÀ VI KHUẨN
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CHỨA CẤU TRÚC ADN BIỂU HIỆN NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến cấu trúc ADN biểu hiện gen ở thực vật, trong đó cấu trúc này mang gen *ZmLEA14A* có trình tự SEQ ID NO:1 được phân lập từ cây ngô Tẻ vàng 1 của Việt Nam và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc ADN biểu hiện gen này. Trong đó, gen *ZmLEA14A* được gắn với đoạn polynucleotit mã hóa cho peptit cmycKDEL và nằm trong một catxet biểu hiện có trình tự khởi động 35S và trình tự kết thúc 35S. Cấu trúc mang gen *ZmLEA14A* này đã được thiết kế nằm trong vector biểu hiện thực vật. Ngoài ra, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc biểu hiện này cũng được tạo ra bằng phương pháp xung điện nhằm mục đích chuyển gen vào thực vật. cấu trúc này giúp tăng cường khả năng biểu hiện của gen *ZmLEA14A* ở thực vật chuyển gen, nhờ đó những dòng chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn những dòng không chuyển gen.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, đề cập đến cấu trúc ADN dùng cho biểu hiện gen ở thực vật, mang gen *ZmLEA14A* phân lập từ cây ngô Tẻ vàng 1 của Việt Nam. Cấu trúc này có khả năng biểu hiện ở cây chuyển gen nhằm cải thiện khả năng chịu hạn cho cây. Ngoài ra, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc này trong tế bào của nó và có khả năng sử dụng để chuyển gen vào cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Họ protein LEA (late-embryogenesis abundant) là một họ protein quan trọng trong tế bào thực vật có chức năng cảm ứng với bất lợi (Umezawa *et al.*, 2006). Vai trò bảo vệ của nhóm protein này bao gồm chống lạnh, chống bất lợi thẩm thấu để làm ổn định màng và các protein khác. Protein nhóm LEA có khả năng ưa nước cao, những đoạn lặp axit amin ngắn thường được tìm thấy trong nhóm protein này. Protein LEA cũng được chú ý trong điều kiện bị stress do thiếu nước (Goyal *et al.*, 2005). Bên cạnh dữ liệu phong phú về cấu trúc và sự biểu hiện của protein này, ngày càng nhiều các công trình đề cập đến việc sử dụng các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng (Grelet *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2000). Ví dụ, gen *HVA1* mã hóa nhóm protein LEA3 của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.). Người ta đã chuyển nạp gen này thành công vào cây ngô để tăng cường tính chống chịu khô hạn và chống chịu mặn trong điều kiện ở nhà lưới (Nguyễn *et al.*, 2013). Một ADN có trình tự bổ sung với ARN thông tin mã cho *OsLEA3-1* chứa toàn bộ gen *LEA*- nhạy cảm với stress do mặn đã thể hiện tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng, nhờ trình tự khởi động (promoter) *HVA1*-like và cấu trúc trình tự khởi động *CaMV35S* (Xiao *et al.*, 2000). Nghiên cứu của Li và Cao (2016) đã thực hiện phân tích so sánh hệ gen ở ngô bao gồm quan hệ phát sinh chủng loại, vị trí trên nhiễm sắc thể, sự lặp gen, cấu trúc gen và thiết lập hồ sơ biểu hiện của họ gen *LEA*. Tổng cộng 32 gen *LEA* đã được xác định ở ngô. Dựa trên các thành phần cấu trúc khác nhau, protein LEA được chia thành chín nhóm. Tổ chức gen và thành phần cấu trúc của các thành viên *LEA* bảo thủ cao trong mỗi nhóm, gen *LEA* phân bố đều

trên 10 nhiễm sắc thể của ngô và hiện tượng chuyển vị, lặp đoạn hay lặp đoạn nối tiếp đã góp phần mở rộng họ gen *LEA* (Li và Cao, 2016).

Vị trí protein được tích lũy và thực hiện chức năng là một trong các yếu tố quyết định hiệu quả của protein được biểu hiện. Các bào quan chứa protein có thể ảnh hưởng mạnh mẽ đến các quá trình liên quan như cuộn gấp, lắp ráp và các quá trình biến đổi sau dịch mã của nó. Đồng thời, việc biểu hiện một protein tham gia vào quá trình chuyển hóa cần phải đưa protein đó vào nơi có cơ chất. Chính vì vậy, để có được tính trạng mong muốn ở cây chuyển gen cũng cần chú ý đến đích của protein được tạo ra. Ở thực vật, protein sẽ được đưa vào mạng lưới nội chất nếu mang một trình tự tín hiệu gồm 20 axit amin, thông thường nằm ở đầu N của protein. Nếu không có các tín hiệu định hướng khác, protein sẽ được đưa vào con đường tiết. Đích đến mặc định của con đường tiết là khoảng gian bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào (Denecke *et al.*, 1990). Cơ chế để protein được đưa vào lưới nội chất được nghiên cứu khá tỉ mỉ và cho thấy có sự bảo toàn trong tiến hóa ở động vật và thực vật. Motif gồm 4 axit amin như KDEL, HDEL, nằm ở vùng đầu C của protein là cần thiết để đưa protein vào lưới nội chất hoặc ít nhất được quay lại lưới nội chất. Nhiều protein được hướng đích đến lưới nội chất bằng việc gắn thêm trình tự KDEL hoặc HDEL đã được công bố và cho thấy nồng độ tích lũy tương đối cao (Schouten *et al.*, 1996).

Việc thiết kế một cấu trúc biểu hiện thích hợp vào vector chuyển gen là cần thiết để đảm bảo tạo ra được hiệu quả chuyển gen và độ chính xác cao, cũng như khả năng biểu hiện của các gen được chuyển trong cây biến đổi gen. Đã có những cấu trúc biểu hiện ở thực vật nhằm mục đích chuyển gen vào cây trồng nhưng chưa có cấu trúc mang gen *ZmLEA14A* phân lập từ dòng ngô Tẻ vàng 1 của Việt Nam. Các cấu trúc đã có liên quan đến gen chịu hạn không có phần polynucleotit mã hóa đoạn peptit cmycKDEL lai với phần polynucleotit của gen đích như trong cấu trúc chứa gen *ZmLEA14A* đã phân lập từ ngô Tẻ vàng 1 của Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là tạo được một cấu trúc ADN biểu hiện ở thực vật mang gen *ZmLEA14A* được phân lập từ ngô Tẻ vàng 1, thích hợp trong việc biểu hiện gen ở cây chuyển gen. Nhằm đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đã đề xuất cấu trúc ADN biểu hiện của gen *ZmLEA14A*, trong đó cấu trúc này chứa đoạn gen

ZmLEA14A có trình tự SEQ ID NO:1 được phân lập từ cây ngô Tế vàng 1 của Việt Nam được gắn với đoạn polynucleotit mã hóa trình tự peptit cmycKDEL, trình tự khởi động (promoter) 35S và trình tự kết thúc phiên mã (terminator) 35S. Đoạn gen lai này sẽ biểu hiện ra một protein lai nhằm dễ dàng phát hiện được sự biểu hiện protein và hướng đích ở lưới nội chất trong tế bào thực vật. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề xuất chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc ADN biểu hiện nêu trên.

Để tạo ra được cấu trúc ADN biểu hiện nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất phương án thực hiện phân lập gen *ZmLEA14A* từ hệ gen cây ngô và dùng công nghệ ADN tái tổ hợp để ghép gen *ZmLEA14A* với các đoạn ADN là trình tự khởi động 35S và đoạn polynucleotit mã hóa cho peptit cmycKDEL cùng với trình tự kết thúc phiên mã 35S trong các hệ vector thích hợp. Đồng thời, giải pháp hữu ích cũng đề xuất phương án đưa cấu trúc biểu hiện gen *ZmLEA14A* ở trên vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện. Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp này được sử dụng với mục đích chuyển gen vào thực vật (như thuốc lá, ngô, v.v.) để tạo ra thực vật chứa gen *ZmLEA14A* có khả năng tăng cường sức chống chịu với điều kiện hạn.

Mô tả chi tiết các hình vẽ

Hình 1 thể hiện bản đồ cấu trúc vector chuyển gen pCAMBIA1300/*ZmLEA14A*. LB, Vùng biên trái của T-ADN (left T-ADN border); RB, Vùng biên phải của T-ADN (right T-ADN border); HygR, gen kháng hygromycin; CaMV35S pro, trình tự khởi động phiên mã 35S của Virus khảm Súp lơ (Cauliflower mosaic virus); polyA, vị trí kết thúc phiên mã gen; 35S ter, trình tự kết thúc phiên mã 35S; *ZmLEA14A*, gen mã cho yếu tố phiên mã *ZmLEA14A*; vị trí các điểm cắt giới hạn của enzym *NcoI*, *NotI* và *HindIII*.

Hình 2 thể hiện ảnh chụp kết quả điện di sản phẩm ADN. Đường chạy 1: sản phẩm cắt kiểm tra vector pRTRA/*ZmLEA14A* bằng enzym cắt giới hạn *NcoI* và *NotI*; Đường chạy 2: sản phẩm cắt kiểm tra vector pCAMBIA1300/*ZmLEA14A* bằng enzym cắt giới hạn *HindIII*.

Hình 3 thể hiện ảnh chụp quy trình tạo cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Hình (A) là hình ảnh mảnh lá sau lây nhiễm đặt trên môi trường chọn lọc, hình (B) là hình ảnh chồi tái sinh ở mép lá, hình (C) là các chồi khỏe mạnh trên môi trường ra rễ, hình (D) là hình ảnh tái sinh thành cây hoàn chỉnh và hình (E) là hình ảnh cây chuyển gen trồng ra đất.

Hình 4 thể hiện ảnh chụp quy trình tạo cây ngô chuyển gen *ZmLEA14A* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Hình (A) là hình ảnh phôi ngô sau lây nhiễm đặt trên môi trường đồng nuôi cấy, hình (B) là hình ảnh phôi ngô phát triển trên môi trường phục hồi, hình (C) là hình ảnh mô sẹo hình thành trên môi trường chọn lọc, hình (D) là hình ảnh các chồi phát sinh từ mô sẹo trên môi trường tái sinh, hình (E) là hình ảnh thân và lá tái sinh, hình (F) là hình ảnh tái sinh thành cây hoàn chỉnh và hình (G) là hình ảnh cây chuyển gen trồng trong nhà lưới.

Hình 5 thể hiện ảnh chụp kết quả kiểm tra cây chuyển gen *ZmLEA14A* ổn định bằng phương pháp PCR và RT-PCR. Hình (A): Đường chạy 1: điện di sản phẩm PCR cây thuốc lá chuyển gen, đường chạy 2: điện di sản phẩm PCR cây ngô chuyển gen; WT: sản phẩm PCR cây không chuyển gen, (+): đối chứng dương là plasmid pCAMBIA1300/*ZmLEA14A*; (-): đối chứng âm là nước khử trùng; và M: thang ADN chuẩn 1kb (Fermentas). Hình (B): Đường chạy 1: điện di sản phẩm RT-PCR cây thuốc lá chuyển gen, đường chạy 2: điện di sản phẩm RT-PCR cây ngô chuyển gen; WT: sản phẩm RT-PCR cây không chuyển gen; (+): đối chứng dương là plasmid pCAMBIA1300/*ZmLEA14A*; và M: thang ADN chuẩn 1kb (Fermentas).

Hình 6 thể hiện ảnh chụp kết quả Western blot kiểm tra sự biểu hiện của protein *ZmLEA14A* trong dòng cây chuyển gen tạm thời và chuyển gen ổn định. Đường chạy 1: dòng cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* tạm thời; đường chạy 2: dòng cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* ổn định, đường chạy 3: dòng cây ngô chuyển gen *ZmLEA14A* ổn định; WT: dòng cây không chuyển gen; và M: thang protein chuẩn. Mũi tên chỉ vị trí băng sản phẩm protein *ZmLEA14A* lai có kích thước khoảng 46kDa.

Hình 7 thể hiện ảnh chụp kết quả đánh giá tính chịu hạn của các dòng cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*. Hình thái cây WT (cây không chuyển gen) và cây chuyển gen được so sánh trong ba giai đoạn Hàng (A): hình thái cây ở giai đoạn trước chịu hạn, hàng (B): hình thái cây tại thời điểm 15 ngày chịu hạn và hàng (C): hình thái cây tại thời điểm sau giai đoạn chịu hạn và 3 ngày tưới nước trở lại.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các loài thực vật khác nhau sẽ có khả năng chống chịu khác nhau với các yếu tố cực đoan của môi trường phụ thuộc vào bản chất di truyền (hệ gen) của chúng. Vì vậy, khi đối mặt trực tiếp với các yếu tố bất lợi của môi trường, có loài cây có thể chống chịu

được đề tồn tại, sinh trưởng và phát triển, có loài cây sẽ bị chết. Ngay trong cùng một loài, các cá thể khác nhau cũng có mức độ phản ứng khác nhau với yếu tố cực đoan của môi trường (Buchanan, 2000). Một trong những khả năng chống chịu của thực vật với những điều kiện bất lợi là biểu hiện các gen mà các sản phẩm của chúng có chức năng đáp ứng phù hợp dưới các điều kiện bất lợi. Các gen tham gia trong việc điều khiển sự đáp ứng với môi trường khắc nghiệt ở thực vật được biết cho đến nay bao gồm ba nhóm chính: i) các gen liên quan đến yếu tố điều khiển phiên mã (transcription factor – TF) như các họ HSF, CBF/DREB, ABF/ABAE hoặc các enzym MyC, MAP kinaza và SOS kinaza; ii) các gen liên quan đến chức năng bảo vệ trực tiếp lên màng tế bào và protein như các heat shock protein (Hsps), chaperoline, LEA protein; iii) các gen liên quan đến con đường vận chuyển nước và các ion như gen mã hóa các protein tham gia kênh vận chuyển hoặc các chất vận chuyển ion.

Gen *ZmLEA14A* trong giải pháp hữu ích được phân lập từ ngô (*Zea mays* L.) giống Tẻ vàng 1 của Việt Nam, biểu hiện không đặc hiệu mô và cơ quan trong ngô và trình tự của nó được thể hiện ở SEQ ID NO:1. Gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 8. Đoạn ADN phân lập có kích thước 693bp (bp = base pair, cặp bazơ). So sánh với trình tự gen *ZmLEA14A* tham khảo công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank), mã số NM_001159174, trình tự phân lập tương ứng với nucleotit từ 38 đến 731 của trình tự tham khảo. Sự khác biệt xảy ra trong trình tự phân lập tại hai vị trí 347 từ G → A, 422 từ C → T, lần lượt tương ứng với vị trí 381 và 456 trong trình tự tham khảo. Vùng mã hóa dài 459bp, từ nucleotit 105 đến 563 (nucleotit 139 đến 597 của trình tự tham khảo). Gen *ZmLEA14A* phân lập trong giải pháp hữu ích không chứa intron trong trình tự.

Mặc dù, trong trình tự gen phân lập từ ngô giống Tẻ vàng 1 có hai vị trí sai khác với trình tự tham khảo nhưng khung đọc mở không bị thay đổi, mã hóa cho một protein có kích thước 152 axit amin và trình tự của protein này thể hiện ở SEQ ID NO:2. Protein suy diễn từ khung đọc mở nêu trên có phân tử lượng khoảng 16kDa và điểm đẳng điện (pI) dự đoán là 5,6 đến 5,9. Protein này thuộc nhóm 3 họ các protein LEA, có chức năng bảo vệ tế bào trong điều kiện thiếu nước. Chúng được nhận diện nhờ motif lặp lại và một vùng bảo thủ ở đầu N để tạo thành cấu trúc xoắn α lưỡng cực (Zhang, Zao, 2003).

Để thu được gen trong giải pháp hữu ích, trước hết cặp môi có trình tự thể hiện trong SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4 dựa trên trình tự tham khảo được thiết kế. Đoạn

ADN dài 693bp chứa trình tự mã hóa gen *ZmLEA14A* thu được bằng phản ứng PCR thông thường (PCR-polymerase chain reaction, phản ứng chuỗi trùng hợp) sử dụng cặp mồi trên với khuôn là ADN tổng số tách chiết từ lá ngô Tẻ vàng 1. Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 0,8%. Sản phẩm có kích thước đúng như mong muốn được tinh sạch và tách dòng trong vector pJET1.2. Vector pJET1.2 tái tổ hợp được đưa vào tế bào khả biến *E. coli* DH10 β theo phương pháp sốc nhiệt. Chọn dòng chứa gen chuyển bằng cách chọn ngẫu nhiên một số dòng khuẩn lạc trên đĩa cấy trải chứa kháng sinh thích hợp để tách plasmid và tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen chuyển thông qua phản ứng PCR với mồi đặc hiệu và cắt kiểm tra bằng enzym cắt giới hạn *Bgl*III. Ngoài ra, đoạn ADN chuyển được giải trình tự theo phương pháp Sanger và so sánh với trình tự ADN tham khảo.

Để gen có thể được biểu hiện trong tế bào thực vật, tiến hành thiết kế tạo cấu trúc biểu hiện gồm gen *ZmLEA14A* nằm giữa trình tự khởi động và trình tự kết thúc phiên mã thích hợp. Trình tự khởi động là yếu tố quan trọng nhất trong việc điều hòa biểu hiện gen. Các trình tự khởi động có thể được chia thành ba nhóm gồm: trình tự khởi động liên ứng, trình tự khởi động đặc hiệu mô và trình tự khởi động cảm ứng. Trình tự khởi động liên ứng khiến gen biểu hiện liên tục ở tất cả các mô và trong tất cả các giai đoạn phát triển. Trình tự khởi động đặc hiệu mô sẽ biểu hiện gen chỉ ở loại mô đặc hiệu nhất định. Trình tự khởi động cảm ứng chỉ biểu hiện gen dưới một điều kiện nhất định như ánh sáng, nhiệt độ, nồng độ dinh dưỡng hoặc khi đáp ứng với việc sử dụng một chất hóa học nào đó. Trình tự khởi động được sử dụng nhiều nhất là CaMV35S từ Virus khảm Súp lơ (Cauliflower Mosaic Virus) với các cải biến khác nhau để tăng cường hoạt động của trình tự khởi động trong cây một lá mầm (Vain *et al.*, 1996; Frame *et al.*, 2002). Cho đến nay, trình tự khởi động CaMV35S (hay còn gọi là trình tự khởi động 35S) vẫn là một trình tự khởi động mạnh, thường được sử dụng. Do đó, trong giải pháp hữu ích chúng tôi lựa chọn sử dụng trình tự khởi động này. Trước hết, vùng mã hóa gen được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi mới được thiết kế để tạo trình tự nhận biết enzym giới hạn *Nco*I và *Not*I lần lượt vào đầu 5' và 3' của gen. Sản phẩm dự kiến có kích thước 463bp. Trình tự cặp mồi sử dụng thể hiện ở SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:6. Sản phẩm của phản ứng cũng được kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Sản phẩm có kích thước mong muốn (463bp) được thu nhận, tinh sạch và lai ghép vào vector pRTRA. Vector pRTRA được sử dụng làm vector trung gian để tạo cấu trúc biểu hiện 35S

promoter::ZmLEA14A::35S terminator, đồng thời gắn thêm trình tự cmvKDEL. Cấu trúc này giúp gen chuyển được biểu hiện mạnh mẽ trong tế bào thực vật, đồng thời, trình tự KDEL nằm ở vùng đầu C của protein sau phiên mã giúp định hướng đưa protein vào lưới nội chất và cmv nằm ở vùng đầu C giúp dễ dàng nhận diện protein chuyển trong các phép lai phân tử. Protein lai ZmLEA14A-cmvKDEL có khối lượng phân tử là 18,2kDa. Vector tái tổ hợp pRTRA/ZmLEA14A được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmit được thu nhận và cắt kiểm tra bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *NotI*. Trên cơ sở có nguyên liệu là cấu trúc 35S promoter::ZmLEA14A::35S terminator nằm trong vector tái tổ hợp pRTRA, chúng tôi tiến hành thiết kế vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300 mang gen *ZmLEA14A*. Cấu trúc biểu hiện (kích thước khoảng 1200bp) được thu nhận bằng phản ứng cắt enzym giới hạn *HindIII* sau đó ghép nối vào vector pCAMBIA1300. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmit được thu nhận và kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 0,8% và tiếp tục được cắt kiểm tra bằng enzym giới hạn *HindIII*. Như vậy, vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300 tái tổ hợp ngoài catxet biểu hiện thứ nhất là 35S promoter::ZmLEA14A::35S terminator biểu hiện gen chuyển còn chứa các catxet biểu hiện chứa gen chọn lọc là kháng hygromycin (*hygR*) và gen kháng kanamycin (*kanr*) cho phép sàng lọc các thể biến nạp.

Vector pCAMBIA1300/ZmLEA14A có thể được đưa vào tế bào thực vật bằng một số phương pháp trực tiếp như sử dụng xung điện, vi tiêm, xử lý polyethylen glycol (PEG) và dùng súng bắn gen hoặc gián tiếp thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Các tế bào được biến nạp có thể là tế bào lá đã được biệt hóa, tế bào phôi hoặc loại tế bào bất kỳ khác. Trong giải pháp hữu ích này, chúng tôi lựa chọn phương pháp chuyển gen sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* và tế bào biến nạp là tế bào lá (đối với thuốc lá) hoặc phôi non (đối với ngô). Tuy nhiên, cần hiểu rằng các phương án lựa chọn này không làm giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích. Một hệ thống chuyển gen vào thực vật thông qua *A. tumefaciens* cần có chủng *Agrobacterium* đã có Ti-plasmit chứa gen quan tâm trong vùng T-ADN với các yếu tố điều hòa *cis* bao gồm vùng biên T-ADN, trình tự khởi động, trình tự kết thúc phiên mã và các gen thuộc vùng *vir* có thể trên cùng Ti-plasmit hoặc trên một Ti-plasmit khác. Hệ thống chuyển gen còn phải có chứa các gen làm chỉ thị chọn lọc: cho thực vật, gen chỉ thị nằm trong vùng T-ADN cho phép xác định những tế bào thực vật có sự sát

nhập gen quan tâm vào hệ gen nhân; cho vi khuẩn, gen chỉ thị nằm ở ngoài vùng T-ADN cho phép chọn được các vi khuẩn có mang Ti-plasmid chứa gen chỉ thị và gen quan tâm ví dụ chỉ thị là tính kháng hygromycin phosphotransferaza ở thực vật và kháng kanamycin ở vi khuẩn. Các phân tử ADN khi được thiết kế chứa các vùng cần thiết của Ti-plasmid tự nhiên như vậy được sử dụng cho mục đích chuyển gen vào thực vật được gọi là những vector. Các vector có thể dựa trên Ti-plasmid tự nhiên của *Agrobacterium* hoặc được biến đổi từ plasmid của một vi khuẩn nào đó. Các Ti-plasmid thường được sử dụng trong công nghệ gen thực vật là những vector đơn giản mang các đặc tính chính: (1) Có khả năng sao chép độc lập và tích cực trong tế bào chủ; (2) Có kích thước nhỏ, dễ nhận gen ngoại lai, dễ xâm nhập vào tế bào và dễ sao chép; (3) Mang chỉ thị chọn lọc/sàng lọc giúp dễ dàng phát hiện các tế bào tái tổ hợp chứa plasmid; (4) Tồn tại bền vững trong tế bào chủ; (5) Mang các cấu trúc gen có giá trị. Không giống các vector có nguồn gốc virus, hệ thống *Agrobacterium* có thể cho phép sử dụng các gen ngoại lai có kích thước dài (trên 2 kb). Hơn nữa, hệ thống sử dụng *Agrobacterium* có thể cho phép chuyển nhiều gen cùng một lúc vào tế bào thực vật. Vì vậy, nhiều protein tái tổ hợp có thể cùng được biểu hiện trong tế bào thực vật (Vaquero *et al.*, 1999). Theo phương pháp lựa chọn, vector tái tổ hợp pCAMBIA1300 mang gen *ZmLEA14A* được biến nạp vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 bằng xung điện. Tế bào sau biến nạp được cấy trên môi trường LB đặc có chứa kháng sinh thích hợp và nuôi qua đêm ở 28°C. Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* xuất hiện trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc sử dụng đoạn môi nhân gen đích SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 nhân cấu trúc biểu hiện *ZmLEA14A*.

Để chuẩn bị cho thí nghiệm chuyển gen ổn định vào tế bào thực vật, vi khuẩn *A. tumefaciens* được nuôi trong môi trường LB lỏng chứa kháng sinh thích hợp. Dịch khuẩn thu được sau đó sử dụng để ủ với vật liệu chuyển gen (lá thuốc lá hoặc phôi ngô) từ 15-30 phút. Tiếp theo, vật liệu chuyển gen đồng nuôi cấy với vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường thích hợp ở điều kiện tối trong 3 ngày. Khi vật liệu chuyển gen đã có khả năng bị vi khuẩn xâm nhập, chúng được chuyển sang môi trường nuôi cấy thích hợp để tạo mô sẹo. Các mô sẹo tái sinh tiếp tục trải qua quá trình sàng lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc thích hợp và nuôi cấy đến khi thu được các cây con. Cây con hoàn chỉnh được chuyển sang giá thể cát : trấu hun (1:1) và chuyển ra trồng trong nhà lưới. Thành phần môi trường cũng như điều kiện nuôi cấy cụ thể tùy thuộc loại vật liệu chuyển gen sẽ được nêu chi tiết ở phần ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích dưới đây. Sự có mặt

của gen chuyển trong cây con được kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 khuếch đại cấu trúc biểu hiện gen *ZmLEA14A* với khuôn là ADN tổng số tách chiết từ lá cây chuyển gen. Ngoài ra, sự biểu hiện gen ở mức độ ARN cũng được kiểm tra bằng phương pháp PCR phiên mã ngược (RT-PCR) với sự kết hợp của cặp mồi SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:8. Đối với thí nghiệm đánh giá biểu hiện tạm thời của gen chuyển, dịch khuẩn *A. tumefaciens* được bơm nhẹ nhàng vào lá cây thuốc lá *N. benthamiana* 4-6 tuần tuổi, giai đoạn 4-6 lá. Cây tiếp tục được trồng trong điều kiện 24°C, 16 giờ sáng/ 8 giờ tối, độ ẩm 80%. Biểu hiện của protein ZmLEA14A trong chuyển gen tạm thời và ổn định được kiểm tra bằng kỹ thuật Western blot. Protein tổng số tách chiết từ các mẫu lá cây chuyển gen được phân tách bằng điện di SDS-PAGE 12% rồi chuyển lên màng nitroxenluloza bằng máy chuyển màng. Sau khi phong bế bằng sữa tách béo 5%, màng được ủ với kháng thể kháng cmyc do protein ZmLEA14A đã được thiết kế gắn thêm đuôi cmyc. Sự có mặt của protein ZmLEA14A được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu NBT/BCIP.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ thực hiện, nhưng không nên hiểu là chúng giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Phân lập gen *ZmLEA14A* từ giống ngô Tẻ vàng 1

Gen theo giải pháp hữu ích được phân lập từ giống ngô Tẻ vàng 1 nhờ phản ứng PCR thông thường với khuôn là ADN tổng số của giống ngô Tẻ vàng 1. Dựa trên trình tự gen *ZmLEA14A* công bố trên ngân hàng gen Quốc tế (GenBank), mã số NM_001159174, chúng tôi thiết kế cặp mồi có trình tự như sau:

SEQ ID NO:3 5' TCACTTCTCTTCCAGCGAGTAC 3'

SEQ ID NO:4 5' TCTCGTACTACTCAAGCAGCAC 3'

Sử dụng cặp mồi trên, chúng tôi thu được đoạn ADN chứa gen với kích thước là 693bp (bp = base pair, cặp bazơ). Trong đó, đoạn chứa vùng mã hóa gen (ORF = Open Reading Frame, khung đọc mở) dài 459bp, mã cho một protein có kích thước 152 axit amin. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agaroza 0,8%. Phân đoạn có kích thước tương ứng sản phẩm mong muốn được thu nhận và tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR từ gel agaroza của hãng Fermentas.

Sau đó, đoạn ADN được ghép nối vào vectơ tách dòng pJET1.2 theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong bộ kit đi kèm. Vectơ tái tổ hợp pJET1.2 mang đoạn ADN chèn được đưa vào tế bào khả biến *E. coli* DH10 β theo phương pháp sốc nhiệt: ống chứa tế bào khả biến từ tủ -80°C được rã đông trong đá 30 phút. Cho toàn bộ sản phẩm lai vào ống tế bào khả biến, trộn nhẹ và đặt trên đá 10 phút. Hỗn hợp được sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút sau đó đặt lại ngay trên đá trong vòng 5 phút. Bổ sung 300 μ l môi trường LB vào hỗn hợp, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 1 giờ để tế bào phục hồi. Vi khuẩn được cấy trải trên đĩa môi trường LB chọn lọc có bổ sung kháng sinh ampicillin 50mg/l và nuôi qua đêm ở 37°C. Chọn dòng chứa gen chuyển bằng cách chọn ngẫu nhiên một số dòng khuẩn lạc trên đĩa cấy trải dịch khuẩn sau biến nạp để tách plasmid và tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen chuyển thông qua phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu (trình tự mỗi nêu trên). Phản ứng tuân theo chu trình nhiệt: 95°C- 3 phút; 30 chu kỳ (95°C - 1 phút; 52°C - 1 phút; 72°C -1 phút); 72°C - 10 phút và kết thúc ở 4°C. Các dòng plasmid dương tính với kích thước phân đoạn ADN xấp xỉ 700bp tiếp tục được kiểm tra bằng enzym cắt giới hạn *Bgl*II. Những phản ứng cho kích thước sản phẩm cắt là khoảng 700bp (đoạn chuyển) và khoảng 2900bp (vectơ pJET1.2) được giữ lại để tiếp tục giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Sau đó, số liệu được xử lý bằng các phần mềm ABI PRISM 3100 Data Collection v2.0, ADN Sequencing Analysis v5.2, Seqscape v2.5, BioEdit v7.0.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotit và axit amin của gen *ZmLEA14A* phân lập được từ giống ngô Tẻ vàng 1 với trình tự đoạn gen đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế mã số NM_001159174. Từ kết quả so sánh trên, chúng tôi đã nhận thấy có hai vị trí thay đổi so với trình tự tham khảo: vị trí 347 từ G->A, 422 từ C->T, lần lượt tương ứng với vị trí 381 và 456 trong trình tự tham khảo. Tuy nhiên, các điểm khác biệt này không làm thay đổi trình tự axit amin của protein suy diễn. Vì vậy plasmid pJET1.2/*ZmLEA14A* được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ví dụ 2: Thiết kế vectơ biểu hiện thực vật mang gen *ZmLEA14A* có nguồn gốc từ giống ngô Tẻ vàng 1

Để gen có thể được biểu hiện trong tế bào thực vật, chúng tôi tiến hành thiết kế tạo cấu trúc ADN biểu hiện gồm gen *ZmLEA14A* nằm giữa trình tự khởi động và trình tự kết thúc phiên mã thích hợp. Chúng tôi lựa chọn trình tự khởi động và trình tự kết thúc phiên mã có nguồn gốc từ virus khảm Súp lơ (cauliflower mosaic virus - CaMV) là một

hệ điều khiển biểu hiện mạnh. Trước hết, vùng mã hóa gen được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi mới được thiết kế để tạo trình tự nhận biết enzym giới hạn *NcoI* và *NotI* lần lượt vào đầu 5' và 3' của gen. Sản phẩm dự kiến có kích thước 463bp. Cặp mồi sử dụng có trình tự như sau:

SEQ ID NO:5 5'ATTACCATGGCGCAGTTGGTG 3'

SEQ ID NO:6 5'ATTAGCGGCCGCGAAGATGCTGG 3'

Phản ứng PCR nhân vùng mã hóa gen *ZmLEA14A* sử dụng khuôn là plasmid pJET1.2/*ZmLEA14A* tái tổ hợp và cặp mồi nêu trên với chu trình nhiệt: 95°C - 3 phút; 30 chu kỳ (95°C - 1 phút; 56°C - 1 phút; 72°C - 1 phút); 72°C - 10 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng cũng được kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Sản phẩm có kích thước mong muốn (463bp) được thu nhận và tinh sạch. Vector pRTRA được sử dụng làm vector trung gian để tạo cấu trúc ADN biểu hiện 35S promoter::*ZmLEA14A*::35S terminator đồng thời gắn thêm một đoạn polynucleotit lai ở cuối gen mã hóa cho peptit cmycKDEL. Vector pRTRA và gen *ZmLEA14A* được xử lý với hai enzym giới hạn *NcoI* và *NotI* để tạo đầu so le, làm nguyên liệu cho phản ứng lai ghép. Phản ứng lai ghép được xúc tác bởi T4 ADN ligaza ở 16 °C qua đêm để tạo thành vector tái tổ hợp pRTRA/*ZmLEA14A*. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10β khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmid được thu nhận và cắt kiểm tra bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *NotI*. Dòng plasmid xuất hiện hai phân đoạn kích thước 463 bp (gen *ZmLEA14A*) và khoảng 3400 bp (vector pRTRA) là dòng plasmid pRTRA/*ZmLEA14A* tái tổ hợp.

Trên cơ sở có nguyên liệu là cấu trúc ADN biểu hiện 35S promoter::*ZmLEA14A*::35S terminator (kích thước khoảng 1200bp) nằm trong vector tái tổ hợp pRTRA, chúng tôi tiến hành thiết kế vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300 mang gen *ZmLEA14A*. Vector pCAMBIA1300 (kích thước phân tử 8958bp) và vector tái tổ hợp pRTRA/*ZmLEA14A* đều chứa vị trí cắt của enzym giới hạn *HindIII*. Do đó, sau khi cùng được xử lý với enzym *HindIII*, vector pCAMBIA1300 và cấu trúc 35S promoter::*ZmLEA14A*::35S terminator sẽ tạo đầu so le tương ứng và có khả năng ghép nối với nhau nhờ enzym T4 ADN ligaza. Phản ứng lai ghép diễn ra ở điều kiện 16°C qua đêm. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10β khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmid được thu nhận và kiểm tra sơ bộ bằng phương pháp điện di

trên gel agarosa 0,8%. Các dòng plasmid có kích thước lớn hơn vector pCAMBIA1300 trông sẽ tiếp tục được cắt kiểm tra bằng enzym giới hạn *HindIII*. Dòng plasmid pCAMBIA1300/ZmLEA14A tái tổ hợp là dòng xuất hiện hai phân đoạn kích thước khoảng 1200 bp (gen *ZmLEA14A*) và khoảng 9000 bp (vector pCAMBIA1300).

Ví dụ 3: Tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1300/ZmLEA14A

Trước hết, tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* khả biến được tạo ra như sau: Một khuẩn lạc đơn trên đĩa cấy trái chũm *A. tumefaciens* EHA 105 được nuôi lắc 200 vòng/phút ở trong môi trường LB lỏng qua đêm ở 28°C. Sau đó, bổ sung 100µl dịch khuẩn trên vào 100ml môi trường LB lỏng chứa glucoza 0,1% và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C tới khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt $OD_{600} = 1 - 1,5$. Dịch huyền phù được làm lạnh trên đá trong 15 phút. Tiếp theo, cặn tế bào được thu bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút. Rửa cặn ba lần bằng 10ml dung dịch HEPES 1mM, độ pH là 7,0 và một lần bằng 10ml glyxerol 10%. Cặn vi khuẩn được hòa tan lại trong 500µl glyxerol 10% và chia vào các ống ly tâm 1,5ml (50µl dịch vi khuẩn/ống), bảo quản ở -80 °C.

Plasmid pCAMBIA1300/ZmLEA14A tái tổ hợp được đưa vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* EHA 105 bằng phương pháp xung điện như sau: Bổ sung 1µl pCAMBIA1300/ZmLEA14A vào ống chứa 50µl dịch tế bào khả biến *A. tumefaciens* đã tạo như trên. Hỗn hợp vi khuẩn và plasmid được trộn đều và đặt trên đá. Chuyển hỗn hợp sang cuvet đã được làm lạnh và xử lý xung điện ở điều kiện 400W; 2,5kV; 8-10ms. Bổ sung ngay 1ml môi trường LB lỏng vào cuvet và đảo đều. Chuyển dịch khuẩn sang ống ly tâm 1,5ml vô trùng và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 1 giờ. Tế bào sau đó được cấy trái trên môi trường LB đặc có chứa kháng sinh kanamycin (50 mg/l), rifampicin (50 mg/l) nuôi qua đêm ở 28°C. Một số khuẩn lạc *A. tumefaciens* xuất hiện trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 nhân cấu trúc ADN biểu hiện ZmLEA14A. Phản ứng tuân theo chu trình nhiệt: 95°C - 3 phút; 30 chu kỳ (95°C – 45 giây; 54°C – 45 giây; 72°C - 1 phút); 72°C - 5 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Dòng khuẩn lạc có sản phẩm PCR dương tính với băng ADN kích thước 659 bp là dòng *A. tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1300/ZmLEA14A.

Ví dụ 4: Tạo cây thuốc lá biểu hiện tạm thời protein ZmLEA14A

Gen *ZmLEA14A* được đưa vào cây thuốc lá *N. benthamiana* nhằm biểu hiện tạm thời để đánh giá khả năng biểu hiện. Một khuẩn lạc đơn chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105 có chứa plasmid pCAMBIA1300/ZmLEA14A được nuôi cấy trong môi trường LB chứa kháng sinh kanamycin (50mg/l), rifampicin (50mg/l) qua đêm ở 28°C. Sau khi ly tâm dịch khuẩn ở với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, cặn tế bào được hòa tan lại trong đệm chứa 10mM MES và 10mM MgSO₄. Dịch hòa tan được giữ trong đá 20 phút. Tiếp đó, dịch khuẩn được bơm nhẹ nhàng vào lá cây thuốc lá *N. benthamiana* 4-6 tuần tuổi, giai đoạn 4-6 lá. Cây tiếp tục được trồng trong điều kiện 24°C, 16 giờ chiếu sáng/ 8 giờ tối, độ ẩm 80%. Sau 3 ngày, mẫu lá tại các vị trí đã tiêm vi khuẩn *A. tumefaciens* được thu thập để tách chiết protein. Sự biểu hiện của protein ZmLEA14A được kiểm tra bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả Western blot đã cho thấy sự xuất hiện của băng protein có kích thước 46kDa tương ứng với protein ZmLEA14A giả thiết sau quá trình cải biến, chứng tỏ cấu trúc biểu hiện chúng tôi thiết kế đã có khả năng hoạt động.

Ví dụ 5: Tạo cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*

Vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 chứa vector pCAMBIA1300/ZmLEA14A nuôi trong môi trường LB lỏng chứa kháng sinh kanamycin (50 mg/l), rifampicin (50 mg/l) qua đêm ở 28°C. Ly tâm dịch khuẩn ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và thu tế bào khuẩn, hòa tan tế bào trong dung dịch ½ MS lỏng, độ pH là 5,8 để tạo huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* có mật độ OD₆₀₀ = 0,7 - 1,0. Thấm khô các mảnh lá trên giấy thấm khử trùng. Sau đó đặt vào bình chứa môi trường CT1 = MS+1mg/l BAP+30g/l glucoza+9g/l agar, độ pH là 5,8. Đồng nuôi cấy trong ba ngày ở điều kiện tối, tại 28°C. Sau ba ngày, chuyển các mảnh lá sang môi trường CT1 có bổ sung các kháng sinh 50mg/l kanamycin và 500mg/l cefotaxim. Các bình mẫu đặt trên giàn đèn với chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2000 lux và nhiệt độ 26 °C. Sau một tuần, chuyển các mảnh lá sang môi trường CT1 có bổ sung các kháng sinh 50mg/l kanamycin và 250mg/l cefotaxim, chu kỳ cấy chuyển 1 lần/tuần. Sau 3 - 4 tuần, các cụm chồi được tách ra và chuyển sang môi trường ra rễ CT2 = MS + 0,1mg/l NAA + 30g/l glucoza + 9g/l agar + 250mg/l cefotaxim, độ pH là 5,8. Cây con hoàn chỉnh được chuyển sang giá thể cát : trấu hun (1:1) và chuyển ra trồng trong nhà lưới. Kiểm tra tình trạng gen chuyển

mẫu cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* bằng phương pháp PCR, RT-PCR và Western blot đã cho thấy có thu được cây mang gen mong muốn.

Ví dụ 6: Tạo cây ngô chuyển gen *ZmLEA14A*

Vi khuẩn *A.tumefaciens* EHA105 chứa vector pCAMBIA1300/*ZmLEA14A* nuôi trong môi trường LB lỏng chứa kháng sinh kanamycin (50mg/l), rifampicin (50mg/l) qua đêm ở 28°C. Dịch huyền phù vi khuẩn thu được theo cách trên được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút, ở 4°C trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cặn vi khuẩn bằng môi trường lây nhiễm lỏng LN = MS + 1,5mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 68,4g/l sucroza + 36g/l glucoza + 100uM AS, độ pH là 5,5 tới khi đạt được mật độ vi khuẩn OD₆₀₀ = 0,5-1,0. Dịch huyền phù vi khuẩn được sử dụng để lây nhiễm với phôi non của ngô.

Bắp ngô non được thu từ các cây ngô mẹ trồng ngoài đồng ruộng sau khi được thụ phấn từ 10 đến 12 ngày. Trước hết, bắp được khử trùng bằng nước Javen 1% trong buồng cấy phòng thí nghiệm khoảng 20 phút, sau đó dùng dao và panh để tách lấy phôi từ trong hạt ngô. Tiếp theo, các phôi lấy ra được ngâm trong môi trường lây nhiễm LN = MS + 1,5mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 68,4g/l sucroza + 36g/l glucoza + 100uM AS, độ pH 5,5. Sau đó, hút bỏ môi trường này và bổ sung dịch khuẩn chuẩn bị như trên vào các ống chứa phôi, lây nhiễm trong 15 phút. Phôi sau khi lây nhiễm với vi khuẩn được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM = MS + 2mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 30g/l sucroza + 2,4g/l phytagel + 0,85mg/l AgNO₃ + 100uM AS, độ pH là 5,8 trong 3 ngày ở điều kiện tối và nhiệt độ 21°C. Các phôi sống sót trong môi trường CCM được chuyển sang môi trường phục hồi Re = MS + 2mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 30g/l sucroza + 0,5g/l MES + 2,4g/l phytagel + 100mg/l cefotaxim + 100mg/l vancomycin + 0,8 mg/l AgNO₃, độ pH là 5,8 trong 7 ngày ở điều kiện tối và nhiệt độ 28°C. Mô sẹo tạo thành từ phôi non được cấy chuyển từ môi trường Re sang môi trường chọn lọc 1 Se1 = MS + 1,5mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 0,5g/l MES + 30g/l sucroza + 2,4g/l phytagel + 100mg/l cefotaxim + 100mg/l vancomycin + 0,85mg/l AgNO₃ + 1,5mg/l hygromycin, độ pH là 5,8 trong 14 ngày ở điều kiện tối và nhiệt độ 28°C. Sau đó, các mô sẹo tiếp tục được chuyển sang môi trường chọn lọc 2 Se2 = MS + 1,5mg/l 2,4D + 0,7g/l L-prolin + 0,5g/l MES + 30g/l sucroza + 2,4g/l phytagel + 100mg/l cefotaxim + 100mg/l vancomycin + 0,85mg/l AgNO₃ + 3mg/l hygromycin, độ pH là 5,8 với điều kiện nuôi cấy tương tự. Các mô sẹo phôi hoá tạo thành trên môi trường SE2 được cấy chuyển sang môi trường tái sinh 1

RM1= MS + 100mg/l myo-inositol + 60g/l sucroza + 2,4g/l phytigel + 100mg/l cefotaxim + 100mg/lvancomycin + 3mg/l hygromycin, độ pH là 5,8 trong 7 ngày ở điều kiện tối và nhiệt độ 25°C. Các mô sẹo phôi hoá này tiếp đó được cấy chuyển sang môi trường tái sinh 2 RM2 =MS + 100mg/l myo-inositol + 30g/l sucroza + 400mg/l casein + 1mg/l kinetin + 150ml/l nước dừa + 2,4g/l phytigel, độ pH là 5,8 dưới cường độ ánh sáng 2000 lux và nhiệt độ 25°C. Liên tục chuyển môi trường RM2 cho đến khi các mô sẹo phôi hoá này tạo thành các chồi. Chồi tái sinh được cấy chuyển sang môi trường ra rễ RR = MS + 100mg/l myo-inositol + 30g/l sucroza + 100mg/l casein + 1mg/l NAA + 0,1mg/l IBA + 2,4 g/l phytigel, độ pH là 5,8 để tạo cây hoàn chỉnh với điều kiện như trên trong khoảng 10 - 20 ngày. Cây tái sinh trên môi trường tái sinh khi có khoảng 2 - 3 lá được chuyển sang giá thể cát:trấu hun (1:1) và chuyển ra trồng trong nhà lưới. Kiểm tra tình trạng gen chuyển trong các mẫu cây ngô chuyển gen *ZmLEA14A* bằng phương pháp PCR, RT-PCR và Western blot đã cho thấy có thu được cây mang gen mong muốn.

Ví dụ 7: Đánh giá cây chuyển gen ở các cấp độ phân tử

Sự có mặt của gen chuyển trong cây con được kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi có trình tự thể hiện trong SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 đặc hiệu nhân đoạn cấu trúc ADN biểu hiện *ZmLEA14A* từ trình tự khởi động 35S tới trình tự cmycKDEL với khuôn là ADN tổng số tách chiết từ lá cây chuyển gen. Kích thước của sản phẩm PCR chính xác là 659bp.

SEQ ID NO:7 5' CACTGACGTAAGGGATGACGC 3'

SEQ ID NO:8 5' TATCGACGGATCGGGCTAGAGTTCG 3'

Phản ứng tuân theo chu trình nhiệt: 95°C - 3 phút; 30 chu kỳ (95°C – 45 giây; 54°C – 45 giây; 72°C -1 phút); 72°C - 5 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Mẫu có sản phẩm PCR dương tính với băng ADN kích thước 659 bp là mẫu cây chứa cấu trúc biểu hiện gen *ZmLEA14A*.

Ngoài ra, sự biểu hiện gen ở mức độ ARN được kiểm tra bằng phương pháp PCR phiên mã ngược (RT-PCR). Trước tiên, ARN tổng số được tách chiết từ lá cây chuyển gen. Từ đó, sợi cADN đơn có trình tự bổ sung với ARN trên được tổng hợp bằng kit Affymetrix và được sử dụng cho phản ứng PCR thường với cặp mồi SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:8. Phản ứng tuân theo chu trình nhiệt: 95°C - 3 phút; 30 chu kỳ (95°C – 45 giây; 54°C – 45 giây; 72°C -1 phút); 72°C - 5 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR sau

đó được điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Mẫu có sản phẩm PCR dương tính với băng ADN kích thước 537 bp là mẫu đã chứa gen chuyển *ZmLEA14A* có khả năng tạo ra ARN tương ứng.

Sự biểu hiện của protein ZmLEA14A được đánh giá thông qua phản ứng lai phân tử Western blot. Trước hết, 1g mẫu lá cây chuyển gen được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng bằng chày cối sứ. Dung dịch đệm chiết 1X SDS - PAGE được bổ sung vào mẫu bột với tỷ lệ mẫu : đệm chiết = 1:1. Dung dịch trên tiếp tục được biến tính mẫu ở 95 °C trong 10 phút và ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút và thu dịch trên. Protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE 12%, chuyển lên màng nitroxenluloza bằng máy chuyển màng. Sau khi phong bế bằng sữa tách béo 5%, màng được ủ với kháng thể kháng cmyc do protein ZmLEA14A đã được thiết kế gắn thêm đuôi cmyc. Sự có mặt của ZmLEA14A được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu NBT/BCIP. Màng lai xuất hiện băng protein trong khoảng 46 kDa khá đậm ở mẫu cây chuyển gen *ZmLEA14A*. Kết quả lai cho thấy băng lai có kích thước lớn hơn kích thước dự đoán của protein ZmLEA14A khi thiết kế vào vectơ. Điều này được giải thích là do trong quá trình thiết kế chúng tôi đã gắn thêm đuôi polynucleotit mã hóa cho peptit cmycKDEL vào đoạn cuối của gen *ZmLEA14A* đã phân lập. Đây là một đoạn tín hiệu để dẫn đường protein sau khi tổng hợp thì được chuyển đến lưới nội chất. Trong thực vật, quá trình đường hóa hoặc quá trình cải biến sau dịch mã xảy ra trong lưới nội chất và điều này thường xảy ra đối với rất nhiều protein. Vì vậy, protein ZmLEA14A sau khi biểu hiện có thể đã có xảy ra quá trình cải biến sau dịch mã có gắn thêm đuôi ví dụ đường nên tạo nên kích thước protein lớn hơn dự đoán khi thiết kế.

Ví dụ 8: Đánh giá khả năng chịu hạn trên cây thuốc lá chuyển gen

Khả năng chịu hạn của cây chuyển gen *ZmLEA14A* được đánh giá theo phương pháp như sau: Các mẫu thí nghiệm bao gồm cây thuốc lá không chuyển gen và cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* ba tuần tuổi khỏe mạnh trồng trong nhà lưới được đưa vào ba giai đoạn điều kiện nước.

- Giai đoạn 1 – Chế độ nước đầy đủ: Các mẫu thí nghiệm được tưới nước đều đặn
- Giai đoạn 2 - Chịu hạn: Các mẫu thí nghiệm dừng tưới nước hoàn toàn trong 15 ngày

- Giai đoạn 3 - Tưới lại sau hạn: Các mẫu thí nghiệm được tưới lại dần dần trở về chế độ nước ban đầu

Trong mỗi giai đoạn, các mẫu thí nghiệm được quan sát và chụp ảnh ghi lại hình thái liên tục. Sau đó, xu hướng thay đổi hình thái của mẫu cây chuyển gen và cây không chuyển gen được so sánh với nhau. Kết quả cho thấy cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A* sau thời gian xử lý hạn có khả năng phục hồi nhanh hơn so với cây không được chuyển gen.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp tạo cấu trúc ADN biểu hiện của gen mã hóa protein ZmLEA14A được phân lập từ cây ngô Tê vàng 1 của Việt Nam và chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc biểu hiện đó để chuyển vào thực vật và tạo cây chuyển gen tăng cường khả năng chống chịu với điều kiện hạn. Đoạn gen *ZmLEA14A* nằm trong cấu trúc biểu hiện chứa trình tự khởi động 35S nên có cường độ biểu hiện cao và liên tục. Do đó, cây chuyển gen *ZmLEA14A* có khả năng chống chịu tốt hơn và phục hồi nhanh hơn khi gặp điều kiện hạn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc ADN biểu hiện của gen *ZmLEA14A*, trong đó cấu trúc này chứa đoạn gen *ZmLEA14A* có trình tự SEQ ID NO:1 được phân lập từ cây ngô Tẻ vàng 1 của Việt Nam được gắn với đoạn polynucleotit mã hóa trình tự peptit cmycKDEL, trình tự khởi động 35S và trình tự kết thúc phiên mã 35S, cấu trúc ADN biểu hiện này mã hóa cho protein ZmLEA14A lai với peptit cmycKDEL.

2. Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc ADN biểu hiện theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Nghiên cứu hệ Gen

<120> Cấu trúc ADN biểu hiện mang gen *ZmLEA14A* và vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa cấu trúc ADN biểu hiện này

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 693

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> 105..563

<400> 1

```
tcacttctct tccagcgagt acacacatca cacagcgaag ggcagcgcat cgtgctgcgg      60
cggccggagg tgatcgacaa gcacctctct aggaataata aata atg gcg cag ttg      116
gtg gac aag gcg aag ggg ttc gtc gcc gac aag ctg gcc aac atc cag      164
aag ccg gag gcg gag ctg gcc gac gtc acg gtg ggg cac gtg ggc cgc      212
gat ggc gcc acg ctg gcg ggg cgc gtg gac gtg cgc aac ccg tac tcg      260
cac gcc atc ccg gtg tgt gag gtg acc tac acg ctg cgg agc gcc ggg      308
cgg acg gtg gcg tca ggg acg gtg ccc gac ccg ggg tca ctc gcc ggc      356
gac ggg gct acc acg cgc ctc gac gtg ccc gtc aag gtg ccc tac gac      404
```

ttc ctg gtt agc ctc gct aag gac gcc ggc agg gac tgg gac atc gac 452
 tat gar atg cgt gtc ggg ctc acc gtt gac ctc ccc gtc gtc ggc aaa 500
 ctc acg ctg ccg ctc acc aag tcc ggc gag ctc aag ctc ccc acc ctc 548
 tcc agc aty ttc tga tcgacgacgac tgcgtgctgc tcgctcgacgac cgtaactgcg 603
 gccttgcgctg ttcatgactg atctgcctac tcgataatat gtaaaccgct ctcttgagtg 663
 ttgttggtgt gctgcttgag tagtacgaga 693

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2

Met	Ala	Gln	Leu	Val	Asp	Lys	Ala	Lys	Gly	Phe	Val	Ala	Asp	Lys	Leu
1				5					10					15	
Ala	Asn	Ile	Gln	Lys	Pro	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Asp	Val	Thr	Val	Gly
20				25					30						
His	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Gly	Arg	Val	Asp	Val	Arg
	35					40					45				
Asn	Pro	Tyr	Ser	His	Ala	Ile	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Leu
	50					55					60				
Arg	Ser	Ala	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Thr	Val	Pro	Asp	Pro	Gly
65				70					75					80	
Ser	Leu	Ala	Gly	Asp	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Leu	Asp	Val	Pro	Val	Lys
			85						90					95	
Val	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Ala	Gly	Arg	Asp
			100						105					110	
Trp	Asp	Ile	Asp	Tyr	Glu	Met	Arg	Val	Gly	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro
115					120					125					

2322

Val Val Gly Lys Leu Thr Leu Pro Leu Thr Lys Ser Gly Glu Leu Lys
130 135 140
Leu Pro Thr Leu Ser Ser Ile Phe
145 150

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 3

tcacttctct tccagcgagt ac
22

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 4

tctcgtacta ctcaagcagc ac
22

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 5

attaccatgg cgcagttggt g
21

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 6

attagcggcc gcgaagatgc tgg
23

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 7

cactgacgta agggatgacg c
21

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

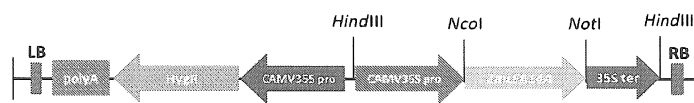
<220>

<223> oligonucleotit

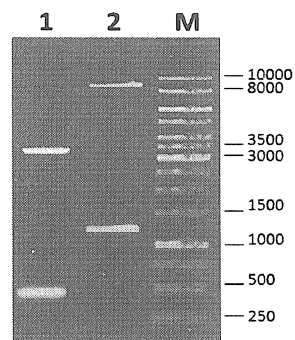
<400> 8

tatcgacgga tcgggctaga gttcg

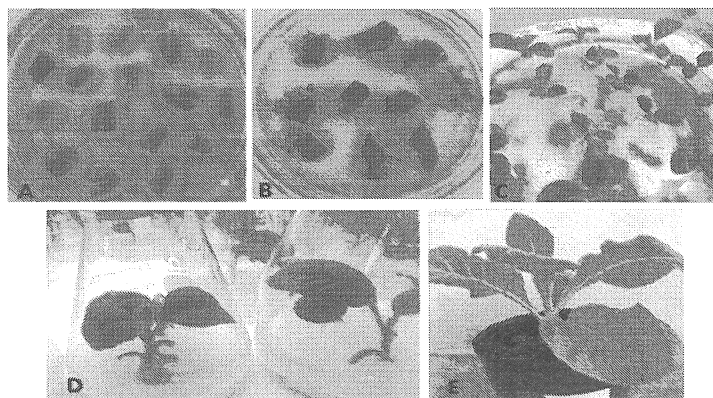
Hình 1



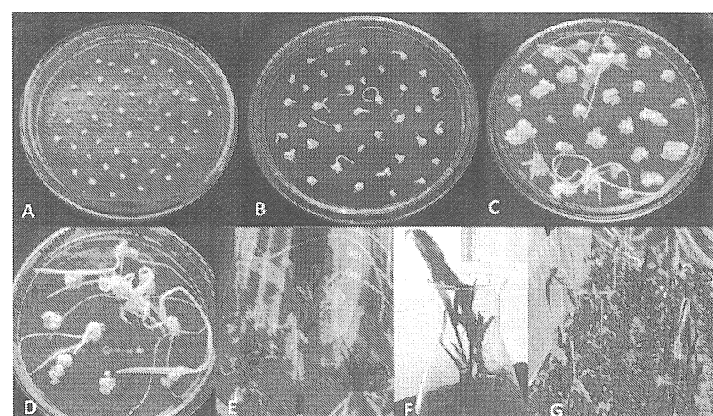
Hình 2



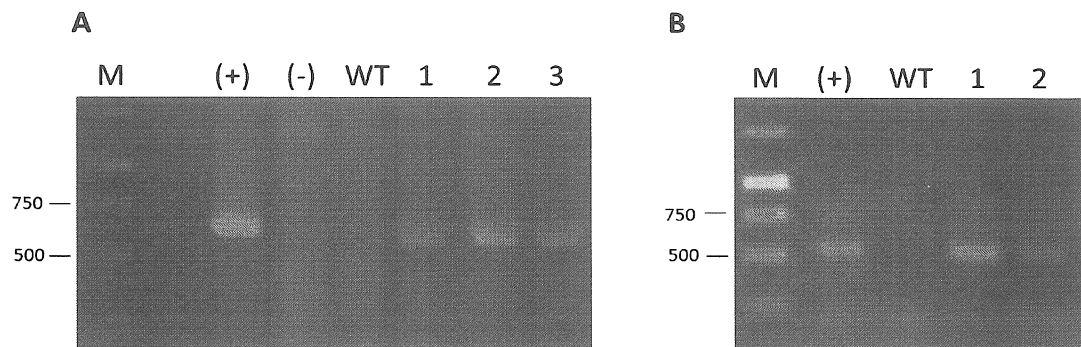
Hình 3



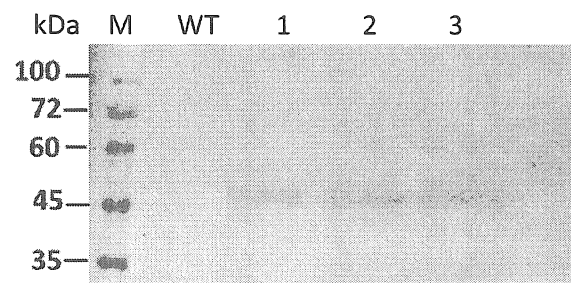
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7

