

## THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN *modiCspB* VÀ CHUYỂN GEN NÀY VÀO CÂY NGŨ

Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Trường<sup>2</sup>, Bùi Mạnh Minh<sup>1</sup>, Đoàn Thị Bích Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Xuân Thăng<sup>2</sup>, Nông Văn Hải<sup>1</sup>, Bùi Mạnh Cường<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 20.01.2014

Ngày nhận đăng: 09.3.2014

### TÓM TẮT

Gen *CspB* có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*, mã hóa cho protein RNA chaperone có chức năng giúp cho các sợi mRNA tồn tại bền vững ở dạng sợi đơn trong điều kiện môi trường khắc nghiệt. Chính vì vậy, khi chuyển gen *CspB* vào thực vật, các protein *CspB* được biểu hiện sẽ làm tăng khả năng chống chịu của cây trồng trong các điều kiện stress như lạnh, nóng và thiếu nước. Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen vi khuẩn trong thực vật đôi khi không thực sự hiệu quả do có sự khác biệt về mã bộ ba. Trong nghiên cứu này, đoạn gen *modiCspB* được thiết kế và tổng hợp có chứa các nucleotide đã được cải biến để phù hợp hơn với sự biểu hiện gen trong thực vật, với 45 điểm thay đổi từ A/T thành G/C. Gen *modiCspB* được gắn với CAMV35S promoter và CAMV35S terminator để tạo cấu trúc 35S pro::*modiCspB*::35S ter, nhằm mục tiêu chuyển gen vào thực vật. Gen *modiCspB* sẽ được điều khiển biểu hiện toàn phần trên cây. Cấu trúc 35S pro::*modiCspB*::35S ter được đưa vào hệ vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300 và được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*. Các thí nghiệm chuyển gen được thực hiện trên 3 dòng ngô Việt Nam V152N, C436 và C7N là những dòng có khả năng tái sinh cao thông qua nuôi cấy phôi non. Kết quả cho thấy, số cây chuyển gen sống sót khi trồng ra đất là 68 cây và đạt tỷ lệ sống sót trung bình 62,02%, dòng có tỷ lệ cây sống cao nhất là dòng V152N (70,37%) và dòng C436 có tỷ lệ cây sống thấp nhất (47,83%). Qua kết phân tích PCR và đánh giá khả năng hữu thụ của cây chuyển gen cho thấy đã chuyển thành công gen chịu hạn *modiCspB* với tần số chuyển gen vào các nguồn vật liệu đại tỷ lệ trung bình là 0,56%.

**Từ khóa:** *CspB*, *modiCspB*, pCAMBIA1300, thiết kế vector, chuyển gen ngô

### MỞ ĐẦU

Các gen *Csp* mã hóa cho protein CSPs (cold shock proteins) là họ protein phổ biến ở cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Các protein của nhóm này thường có khối lượng phân tử nhỏ (~ 7,5 kD) và có tính acid (Jones et al, 1987, Graumann et al, 1997). *CspB* là một protein điển hình thuộc nhóm CSP lần đầu được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* vào năm 1992 bởi Willimsky và cộng sự. Gen *CspB* có kích thước 201bp mã hóa cho protein có khối lượng phân tử là 7.365 kDa (Willimsky et al, 1992). Với trình tự dài 67 amino acid, vùng CSD (cold shock domain) của *CspB* có cấu trúc bảo thủ cao với 5 chuỗi  $\beta$  cuộn gấp cùng các vùng domain có khả năng nhận biết gắn với các trình tự ATTGG- và CCAAT hay còn gọi là Y-factor trên các sợi ssDNA/RNA (Graumann và Marahiel, 1994). Khi nhiệt độ môi trường giảm mạnh, *CspB* có chức năng như một RNA chaperone, được tích lũy nhanh chóng trong tế bào giúp cho các sợi mRNA có thể tồn tại ở

dạng sợi đơn từ đó đảm bảo quá trình dịch mã của tế bào được diễn ra liên tục (Graumann và Marahiel, 1998)

Gen *CspB* phân lập từ vi khuẩn *B. subtilis* đã được nghiên cứu chức năng và được sử dụng trong chuyển gen thực vật từ nhiều năm trước. Thực vật được chuyển gen *CspB* đã được chứng minh là tăng sức chống chịu trong các điều kiện stress như lạnh, nóng và thiếu nước. Đặc biệt trong điều kiện thiếu nước, các dòng ngô chuyển gen *CspB* đã có tốc độ sinh trưởng cao hơn 12-24% so với dòng không chuyển gen, đồng thời các dòng lúa gạo được chuyển gen *CspB* cũng có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn các dòng đối chứng (Castiglioni et al., 2008).

Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn trong thực vật đôi khi không thực sự hiệu quả do có sự khác biệt về mã bộ ba. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tổng hợp gen *modiCspB* có các nucleotide đã được cải biến để phù

hợp hơn với sự biểu hiện trong thực vật và thiết kế các vector chuyển gen và tiến hành chuyển gen cho cây ngô.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các vector được sử dụng gồm: Vector pIDT-smart-Kan mang gen *modiCspB* được tổng hợp từ hãng Genscript, vector tách dòng trung gian pRTRA7/3 mang CaMV35S promoter, vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300, chủng *Agrobacterium* LBA 4404.

Các dòng ngô đã được đánh giá có khả năng tái sinh cao thông qua nuôi cấy phôi non là V152N, C436 và C7N của Viện Nghiên cứu Ngô.

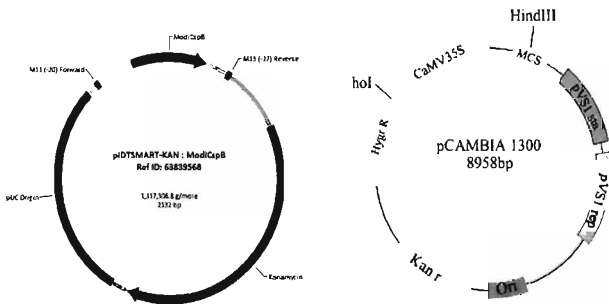
### Phương pháp

Các phương pháp sinh học phân tử như PCR, xử lý DNA plasmid với enzyme hạn chế, ghép nối gen

với vector, biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001).

Phản ứng PCR để nhân đoạn *modiCspB* có treo các điểm cắt của enzyme hạn chế được tiến hành gồm các thành phần sau: 1  $\mu$ l khuôn mẫu là pIDTsmart-Kan; 2,5  $\mu$ l 10X DreamTaq Buffer; 1  $\mu$ l dNTP 10pM; 1  $\mu$ l mỗi loại mỗi; 0,2  $\mu$ l DreamTaq; bổ sung H<sub>2</sub>O đến thể tích cuối là 25  $\mu$ l. Chu trình nhiệt dùng để nhân bản: 94°C: 4 phút; 30 chu kỳ như sau: 94°C: 30 giây, 56°C: 30 giây, 72°C: 1 phút; và sau đó 72°C: 7 phút.

Sản phẩm PCR được tiến hành xử lý bằng 2 enzyme cắt giới hạn là *Bam*HI và *Nor*I sau đó đưa vào vector tách dòng trung gian pRTRA 7/3 để gen *modiCspB* được điều khiển bởi CaMV35S Promoter. Vector tách dòng trung gian được xử lý bằng enzyme giới hạn *Hind*III nhằm thu được cấu trúc CaMV35S Pro :: *modiCspB* :: 35S Ter, sau đó toàn bộ cấu trúc được gắn vào vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300 (Hình 1).



Hình 1. Vector tách dòng pIDTsmart-Kan mang đoạn gen *modiCspB* và Ti plasmid pCAMBIA 1300

### Chuyển gen vào cây ngô thông qua *Agrobacterium*:

Phôi non được tách trong điều kiện vô trùng có kích thước 1,5–2 mm cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo trong điều kiện tối. Sau khoảng 7–10 ngày nuôi cấy, các mô sẹo được sử dụng làm mô đích để lây nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium*.

**Gây nhiễm và nuôi ủ:** Mô sẹo 7 ngày sau cấy được sử dụng để gây nhiễm với dịch nuôi *Agrobacterium* khả biến (OD<sub>600</sub> = 0,7).

**Phục hồi và chọn lọc mô sẹo:** Sau 3 ngày nuôi ủ, cấy chuyển toàn bộ mô sẹo sang môi trường phục hồi, nuôi trong tối 7 ngày ở 27°C. Sau khi nuôi phục hồi, mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường chọn

lọc có chứa hygromycin và cấy chuyển 2 tuần một lần.

**Tái sinh cây:** Các mô sẹo màu sáng được cấy chuyển sang môi trường tái sinh và nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16h/ngày. Các cây hoàn chỉnh được tiến hành ra ngoài và trồng trong nhà lưới.

**Các chỉ tiêu theo dõi:**

Tỷ lệ mô sẹo kháng hygromycin(%) = (Số mô sẹo kháng hygromycin/số callus biến nạp) x 100

Tỷ lệ tái sinh cây (%) = (Số cây tái sinh/Số mô sẹo kháng hygromycin) x 100

Tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh (%) = (Số cây hoàn chỉnh/Số cây tái sinh) x 100

Tỷ lệ cây sống khi trồng ra đất (%) = (Số cây sống khi trồng ra đất/Số cây hoàn chỉnh) x 100

Tỷ lệ cây mang gen (%) = (Số cây dương tính PCR/số cây sống khi trồng ra đất) x 100

Tỷ lệ cây mang gen hữu thụ (%) = (Số cây mang gen có hạt/số cây dương tính PCR) x 100

Hiệu suất chuyển gen (%) = (Số cây mang gen có hạt/số callus biến nạp) x 100

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

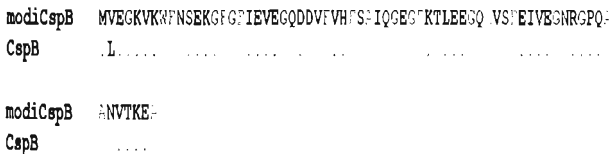
**Tổng hợp đoạn gen modiCspB**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế, tổng hợp đoạn gen modiCspB và cải biến một số nucleotide trên gen để phù hợp với sự biểu hiện

trong thực vật. Việc thiết kế dựa vào trình tự các gen CspB đã được công bố trên ngân hàng Genbank. Trong đó, gen modiCspB đã có 25 cặp bổ sung A-T được sửa thành G-C, 20 cặp bổ sung T-A được sửa thành C-G. Toàn bộ đoạn Gen modiCspB đã được tổng hợp nhân tạo và chuyển vào vector tách dòng pIDTsmart-Kan.

Trình tự đoạn gen modiCspB có kích thước 204bp bao gồm mã mở đầu ATG và mã kết thúc TGA, mã hóa cho đoạn protein gồm 67 amino acid. Trình tự gen modiCspB được so sánh với các trình tự gen CspB đã công bố trên GenBank. Các trình tự được chọn để so sánh là genCspB phân lập từ các chủng *Bacillus* ưa nhiệt *B.caldolyticus* mã số X73373; ưa nhiệt trung bình *B.subtilis* mã số X59715; *B.globigii* mã số X73463; và ưa lạnh *B.globisporus* mã số X73374. Kết quả so sánh cho thấy trình tự modiCspB tương đồng 75,9 % so với trình tự CspB của *B.subtilis*, 69,1% đối với CspB của *B.caldolyticus*, và lần lượt là 62,7% và 62,8% đối với CspB của *B.globigii* và *B.globisporus*.

Mặc dù, có sự khác biệt về trình tự nucleotide của gen modiCspB với các trình tự gen CspB nhưng so sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen modiCspB với trình tự amino acid được mã hóa bởi gen CspB của *B.subtilis* cho thấy sự tương đồng là 99,89%. Trong đó, trình tự của protein suy diễn vẫn giữ nguyên vùng CDS từ amino acid thứ 4 đến 65 là vùng chứa các domain hoạt động của protein CspB (Hình 2). Điều này sẽ đảm bảo các cấu trúc chức năng của protein không thay đổi. Vì vậy, đoạn gen modiCspB được tổng hợp có đầy đủ đặc điểm mã hóa cho một protein CspB vì vậy chúng tôi đã sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



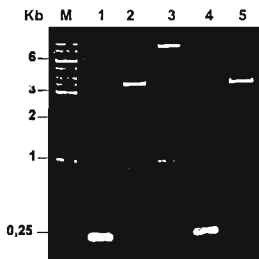
Hình 2. So sánh trình tự amino acid giữa 2 chuỗi peptide được mã hóa bởi modiCspB và CspB của *B subtilis*

### Thiết kế các vector trung gian mang gen *modiCspB*

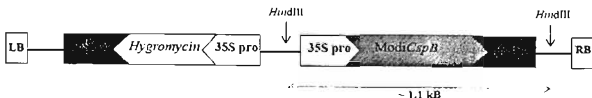
Phản ứng PCR nhân lại đoạn gen *modiCspB* sử dụng cặp primer *CspBF1*Bam và *CspBR1*NotI có treo điểm nhận biết của enzyme *Bam*HI và *Not*I, chúng tôi đã thu được sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước khoảng 200 bp phù hợp với mô tả lý thuyết của gen *modiCspB* (Hình 4 đường chạy 1). Sau đó, sản phẩm PCR đã được xử lý với hai enzyme là *Bam*HI và *Not*I để thích hợp với việc gắn vào vector trung gian pRTRA 7/3 cũng mở vòng bằng hai enzyme tương ứng (Hình 3 đường chạy 5), vector này đã có chứa promoter *CaMV35S* nằm trước điểm *Bam*HI,

terminator 35S nằm sau điểm *Not*I. Sau đó, sản phẩm lại được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10B khả biến.

Plasmid tái tổ hợp trong *E. coli* được tách chiết và được kiểm tra bằng phản ứng cắt với hai enzyme *Bam*HI và *Not*I. Từ các kết quả thu được (Hình 3 đường chạy 2) cho thấy có băng DNA khoảng 0.2kb được cắt ra, chúng tôi khẳng định đã thiết kế được vector trung gian pRTRA7/3 mang gen *modiCspB* và gen *modiCspB* đã được chèn vào giữa promoter *CaMV35S*, 35S terminator. Như vậy, gen *modiCspB* nằm trong cấu trúc biểu hiện được điều khiển bởi promoter *CaMV35S* (mô tả ở sơ đồ Hình 4).



Hình 3. Tách dòng gen *modiCspB* vào vector pRTRA7/3 và pCambia1300. 1. Sản phẩm PCR đoạn *modiCspB* từ vector pIDT-smartKan. 2. Vector pRTRA7/3 chứa đoạn chèn *modiCspB* cắt bằng *Bam*HI và *Not*I. 3. Vector pCambia1300 chứa cấu trúc 35S Pro., *modiCspB*:: Ter cắt bằng *Hind*III. 4. Sản phẩm PCR đoạn *modiCspB* từ vector pCambia1300 tái tổ hợp. 5. Vector pRTRA7/3 mở vòng bằng *Bam*HI và *Not*I.



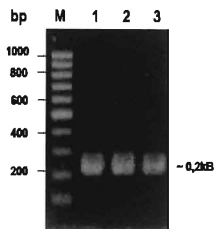
Hình 4. Sơ đồ cấu trúc biểu hiện mang gen *modiCspB*

Thiết kế vector biểu hiện trong thực vật pCambia 1300 mang gen *modiCspB* dưới sự điều khiển của promoter 35S

Vector tách dòng trung gian được xử lý với enzyme *Hind*III nhằm tinh sạch cấu trúc 35S

pro::*CspB*::35S ter có kích thước khoảng 1.1kb theo lý thuyết (Hình 4). Đoạn cấu trúc này sau khi tinh sạch được gắn với vector pCambia 1300 đã mở vòng bằng enzyme *Hind*III. Sản phẩm lại được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10B và chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin 50  $\mu$ g/ml. Một số

khuẩn lạc được chọn và vector tái tổ hợp được tách để kiểm tra sự có mặt của gen *modiCspB* bằng cách cắt plasmid bằng enzyme *HindIII*. Kết quả thể hiện như hình 3 đường chạy 3 cho thấy, chúng tôi đã chọn lọc được vector pCAMBIA 1300 mang đoạn DNA kích thước khoảng 1,1 kb. Đồng thời, phản ứng PCR với cặp mồi *CspBF1Bam* và *CspBR1Not* và khuôn DNA là vector pCAMBIA 1300 tái tổ hợp đã thu được đoạn DNA có kích thước 0,2kb tương ứng với đoạn gen *modiCspB* (Hình 3 đường chạy 4). Như vậy, đoạn casset dài 1.1kb chứa gen *modiCspB* đã được gắn vào vector pCAMBIA 1300.



Hình 5. Kiểm tra sự có mặt gen *modiCspB* trong tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*. M. Marker 100bp; 1-2. PCR từ plasmid tách từ *A. tumefaciens*

Các plasmid pCAMBIA 1300 tái tổ hợp đã được biến nạp vào *A. Tumefaciens* theo phương pháp xung điện. Kết quả biến nạp được kiểm tra bằng PCR nhằm nhân lên đoạn gen *modiCspB* với cặp primer *CspBF1Bam* và *CspBR1Not* và khuôn DNA là các plasmid tách từ tế bào *A. tumefaciens*. Hình 5 cho thấy đoạn DNA được nhân lên có kích thước khoảng 0,2kb tương ứng với kích thước của

gen *modiCspB*. Kết quả trên cho thấy đã biến nạp được các Ti plasmid pCAMBIA 1300 tái tổ hợp mang cấu trúc 35S pro:: *modiCspB*::35S ter vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*. Các dòng vi khuẩn này đã được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen vào cây ngô.

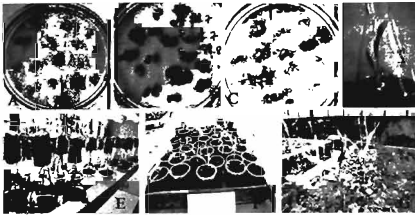
### Chuyển gen *modiCspB* vào các dòng ngô thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Thí nghiệm chuyển gen *modiCspB* vào 5.800 khối callus của 3 dòng ngô tiến hành trong vụ Hè Thu năm 2013, kết quả biến nạp (Bảng 1) cho thấy: Tỷ lệ mô sẹo kháng hygromycin đạt trung bình là 26%, dòng đạt cao nhất là V152N (27,9%). Tỷ lệ tái sinh cây từ khối mô sẹo biến nạp dao động từ 28,12% (dòng C436) đến 38,53% (dòng V152N) và đạt tỷ lệ trung bình là 33,02%. Các cây tái sinh thu được sau biến nạp được chuyển sang môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh của các dòng đạt trung bình là 20,18% và với số cây là 105. Các cây hoàn chỉnh này được ra ngôi trên giá thể và tưới bằng dung dịch 1/10 MS trước khi tiến hành trồng ra đất và chăm sóc trong nhà lưới. Số cây chuyển gen sống sót khi trồng ra đất là 68 cây và đạt tỷ lệ trung bình là 62,02%. Dòng có tỷ lệ cây sống cao nhất là dòng V152N (70,37%) và dòng C436 có tỷ lệ cây sống thấp nhất (47,83%). Kết quả tái sinh của các dòng nghiên cứu sau khi biến nạp phản ánh tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Bùi Mạnh Cường và cs (2013) khi đánh giá khả năng tái sinh của một số dòng ngô thông qua nuôi cấy phôi non, trong đó dòng V152N là dòng có khả năng tái sinh cao nhất.

Các cây chuyển gen sống khi trồng ra đất được chăm sóc và tiến hành thu mẫu lá phân tích và phân tích PCR để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển, đồng thời đánh giá khả năng hữu thụ của các cây (Hình 6)

Bảng 1. Kết quả tái sinh sau biến nạp gen *modiCspB* vào các dòng ngô vụ Hè Thu 2013

TT	Nguồn vật liệu	Số callus biến nạp	Mô sẹo kháng hygromycin		Tạo cây tái sinh		Tạo cây hoàn chỉnh		Cây sống khi trồng ra đất	
			Số mô	Tỷ lệ (%)	Số cây	Tỷ lệ (%)	Số cây	Tỷ lệ (%)	Số cây	Tỷ lệ (%)
1	V152N	2.000	558	27,9	215	38,53	54	25,12	38	70,37
2	C436	1.800	441	24,5	124	28,12	23	18,55	11	47,83
3	C7N	2.000	512	25,6	166	32,42	28	16,87	19	67,86
<b>Tổng/TB</b>		<b>5.800</b>	<b>1.511</b>	<b>26,0</b>	<b>505</b>	<b>33,02</b>	<b>105</b>	<b>20,18</b>	<b>68</b>	<b>62,02</b>



**Hình 6.** Tái sinh cây ngô chuyển gen *modiCspB* bằng phương pháp *Agrobacterium* Callus được chọn lọc trên môi trường chọn lọc (A, B), Phối hình thành trên môi trường chọn lọc (C), Cây tái sinh trên môi trường tạo rễ (D, E); Cây ra ngoài trên giá thể trong nhà lưới (F); Cây chuyển gen trồng ra đất trong nhà lưới (G)

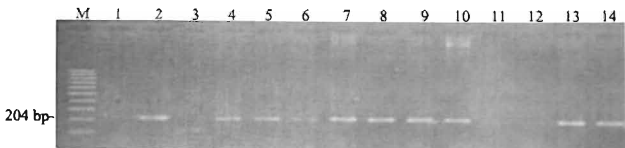
**Kiểm tra sự có mặt của gen *modiCspB* bằng PCR và đánh giá khả năng hữu thụ của các cây chuyển gen thế hệ T<sub>0</sub>**

Để xác định sự có mặt của gen đích đã được chuyển nạp vào hệ gen của các dòng ngô, chúng tôi lấy mẫu lá của các cây chuyển gen T<sub>0</sub> sống sót khi đưa ra đất và tiến hành tách chiết DNA tổng số, sau

đó sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với gen đích *modiCspB* và thực hiện phản ứng PCR, tiếp đó tiến hành điện di trên agarose 2% để xác định cây mang gen đích (có kết quả điện di dương tính). Kết quả phân tích PCR của các cây chuyển gen (Bảng 2) cho thấy số cây mang gen chuyển là 56 trên tổng số 68 cây sống sót và đạt tỷ lệ trung bình là 81,66% (Hình 7).

**Bảng 2.** Kết quả kiểm tra sự có mặt của các gen chuyển *modiCspB* và khả năng hữu thụ của các cây chuyển gen thế hệ T<sub>0</sub> vụ Hè Thu 2013.

TT	Nguồn vật liệu	Số cây sống khi đưa ra đất	Cây mang gen chuyển		Cây mang gen hữu thụ		Hiệu suất chuyển gen (%)
			Số cây	Tỷ lệ (%)	Số cây	Tỷ lệ (%)	
1	V152N	38	32	84,21	18	56,25	0,90
2	C436	11	9	81,82	5	55,56	0,28
3	C7N	19	15	78,95	10	66,67	0,50
<b>Tổng/TB</b>		<b>68</b>	<b>56</b>	<b>81,66</b>	<b>33</b>	<b>59,49</b>	<b>0,56</b>

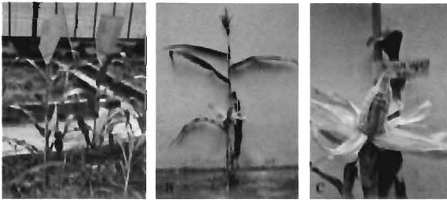


**Hình 7.** Sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen *modiCspB* của các cây chuyển gen T<sub>0</sub> dòng C436 (M: leader100bp, 1: H<sub>2</sub>O; 2: Plasmid, 3. WT, 4-14. các cây chuyển gen *CspB* thế hệ T<sub>0</sub>)

Khi đánh giá khả năng hữu thụ của các cây chuyển gen, hiện tượng thường gặp phải là các cây chuyển gen bị bất thụ do rối loạn về sự phân hoá cơ quan sinh sản của cây ngô hoặc do thời gian chênh lệch tung phấn-phun râu quá lớn dẫn đến cây chuyển gen không thu được hạt. Số cây chuyển gen hữu thụ trong thí nghiệm thu được hạt là 33 cây, đạt tỷ lệ trung bình là 59,49% (Hình 8). Như vậy, số cây sống khi trồng ra đất và số cây chuyển gen hữu thụ của các dòng thu được tương đối thấp, đây cũng là một

trở ngại lớn trong các nghiên cứu chuyển gen vào cây ngô (Nguyễn Văn Đồng và cs. 2013).

Như vậy, qua kết phân tích PCR và đánh giá khả năng hữu thụ của cây chuyển gen cho thấy chúng tôi đã chuyển thành công gen chịu hạn *modiCspB* vào 3 dòng ngô Việt Nam là V152N, C436 và C7N với tần số chuyển gen của các nguồn vật liệu đạt từ 0,28-0,90%, tỷ lệ trung bình đạt 0,56%. Hạt các cây chuyển gen To được bao quan sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 8. Đánh giá khả năng hữu thụ của các cây ngô chuyển gen CpB thế hệ To trong nhà lưới (Cây chuyển gen hữu thụ (A); Cây (B) và bắp (C) ngô chuyển gen thế hệ To).

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế và tổng hợp gen *modiCspB* mã hóa cho một protein liên quan đến shock nhiệt độ thấp, có chức năng của RNA chaperone. Gen *modiCspB* được cài biến 45 nucleotide từ A/T thành G/C, tuy nhiên không làm thay đổi các amino acid trong cấu trúc hoạt động của protein. Gen *modiCspB* đã được gắn với vector pCAMBIA1300 trong cấu trúc biểu hiện 35S pro::*modiCspB*::35S ter và được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* để chuyển gen vào cây ngô. Kết quả chuyển gen cho thấy, số cây chuyển gen sống sót khi trồng ra đất là 68 cây và đạt tỷ lệ sống sót trung bình 62,02%, dòng có tỷ lệ cây sống cao nhất là dòng V152N (70,37%) và dòng C436 có tỷ lệ cây sống thấp nhất (47,83%). Qua kết phân tích PCR và đánh giá khả năng hữu thụ của cây chuyển gen cho thấy đã chuyển thành công gen chịu hạn *modiCspB* vào 3 dòng ngô Việt Nam là V152N, C436 và C7N với tần số chuyển gen của các nguồn vật liệu đạt từ 0,28-0,90%, tỷ lệ trung bình đạt 0,56%.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với kinh phí của đề tài cấp Nhà nước "Nghiên cứu chuyển gen năng cao tính chịu hạn vào một số dòng ngô bản địa đang được áp dụng trong sản xuất" mã số KC04.02 do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý giai đoạn 2011 – 2015

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Mạnh Cường, Nguyễn Xuân Thắng, Nguyễn Văn Trường, Đoàn Thị Bích Thu, Nguyễn Thị Thu Hoa, Tạ Thị Thủy Dung. (2013) Kết quả nghiên cứu bước đầu về chuyển gen chịu hạn HVA1 và ZmDREB2A vào một số dòng ngô Việt Nam. Báo cáo lần nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013, Quyển 2 Công nghệ sinh học. Vì sinh, Công nghệ sinh học Thực vật, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 715-719

Castiglioni P., Warner D., Bensen R. J., Anström D. C., Harrison J., Stoecker M., Abad M., Kumar G., Salvador S., D'Ordine R., Navarro S., Back S., Fernandes M., Targuelli J., Dasgupta S., Bonin C., Luehly M. H., Heard J. F. (2008) "Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize

under water-limited conditions". *Plant Physiol*, Vol 147(2): 446-455.

Nguyễn Văn Đông, Phạm Thị Lý Thu, Lê Thị Mai Hương, Lê Thị Lan, Nguyễn Chiến Hữu, Lê Huy Hàm, (2013). *Nghiên cứu tạo giống ngô chịu hạn bằng công nghệ gen. Báo cáo Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ nhất*. NXB Nông nghiệp: 402-408.

Graumann P., Marahiel M. (1994). "The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATGGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides". *FEBS Lett*, Vol 338: 157-160

Graumann P., Marahiel M. (1998). "A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain" *Trends Biochem Sci*. Vol 23(8):286-290.

Graumann P., Wendrich T. M., Weber M. H., Schroder K., Marahiel M. A. (1997). "A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures". *Mol Microbiol*, Vol 25(4): 741-756.

Jones P.G., Van Bogelen R.A., Neidhardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *JBacteriol*, Vol 169: 2092-2095.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Willmsky G., Bang H., Fischer G., Marahiel M. A. (1992). "Characterization of *CspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures". *J Bacteriol*, Vol 174(20): 6326-6335.

## CONSTRUCTION TI PLASMID HARBOURING *modiCSPB* GENE AND TRANSFORMING THE GENE INTO MAIZE PLANT

Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Trường<sup>2</sup>, Bùi Mạnh Minh<sup>1</sup>, Đoàn Thị Bích Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Xuân Thang<sup>2</sup>, Nông Văn Hải<sup>1</sup>, Bùi Mạnh Cường<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Maize Research Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

### SUMMARY

*Bacillus subtilis* derived gene *CspB*, coding for RNA chaperone functional protein enables mRNA stable as single-stranded in adverse conditions. Therefore, the expression *CspB* protein in transgenic plant could increase resistant ability of plants to environmental stresses such as cold, heat and drought. In order to optimize the expression of the bacterial gene in plants, an artificial-synthesis *CspB(modiCspB)* gene with 45 nucleotide modifications from A/T to G/C was obtained to achieve a more compatible expression gene in plant. *ModiCspB* gene was inserted in pCAMBIA1300 under the control of 35S promoter and transformed in to immature embryos of three maize inbred lines of Vietnam V152N, C436 and C7N by *Agrobacterium*-mediated method. The results of transformation obtained 68 regenerated plants survived in the green house, 62.02% of total regenerated plants. In which, the line V152N produced the highest (70.37%) of transgenic plants and the lowest was C463 (47.83%). The transformation efficiency was 0.56%. After fertility assessment and PCR analysis. As consequence, our research has provided the initial transgenic maize plants by improvement of the stress tolerance.

**Keywords:** *CspB*, *modiCspB*, pCAMBIA1300, vector construction, maize transformation

\* Author for correspondence: E-mail: [hthue@igr.ac.vn](mailto:hthue@igr.ac.vn)