

STUDY ON CREATING *Agrobacterium tumefaciens* STRAINS HARBORING PKO2-PR1 VECTOR FOR PR1 GENE DELETION IN *Verticillium dahliae*

Nguyen Thi Huong¹, Dinh Thi Lan¹, Ha Van Hieu², Duong Thi Thanh², Bui Tri Thuc^{2*}

¹TNU - University of Science

²TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 17/4/2023	<i>Verticillium dahliae</i> is a noxious fungal pathogen that affects plants. It can cause wilting and premature senescence in many crops, seriously affecting crop productivity. The <i>PR1</i> gene has been mentioned in many previous studies, which may be related to the initial stage of the host infection process. To serve research on the role of the <i>PR1</i> gene in <i>V. dahliae</i> , a strain of <i>A. tumefaciens</i> bacteria containing the pKO2- <i>PR1</i> vector was created. The vector pKO2- <i>PR1</i> design model was successfully created using Snapgen Viewer software. The pKO2- <i>PR1</i> vector contains two segments of sequence before and after the <i>PR1</i> gene (1.8 kb). These segments were amplified by PCR and cloned into a recombination vector. The resulting recombinant vector was verified by using the <i>XhoI</i> restriction enzyme. The sequence of the pKO2- <i>PR1</i> vector was fully consistent with the initial design model. The pKO2- <i>PR1</i> vector was successfully transferred into <i>A. tumefaciens</i> bacteria. The <i>A. tumefaciens</i> strain carrying the pKO2- <i>PR1</i> vector is an important tool for gene deletion and functional study of the <i>PR1</i> gene in <i>V. dahliae</i> .
Revised: 19/6/2023	
Published: 19/6/2023	
KEYWORDS	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
pKO2- <i>PR1</i>	
<i>PR1</i>	
Gene deletion vector	
<i>Verticillium dahliae</i>	

TẠO CHỦNG VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens* MANG VECTOR PKO2-PR1 PHỤC VỤ CÔNG TÁC XÓA GENE PR1 Ở NẤM *Verticillium dahliae*

Nguyễn Thị Hương¹, Đinh Thị Lan¹, Hà Văn Hiếu², Dương Thị Thanh², Bùi Tri Thức^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐHTH Thái Nguyên

²Trường Đại học Nông Lâm - ĐHTH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 17/4/2023	<i>Verticillium dahliae</i> là một loại nấm gây bệnh nguy hại ở thực vật. Chúng là nguyên nhân chính gây lên bệnh héo và già sớm ở nhiều loại cây trồng, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây trồng. Gene <i>PR1</i> được nhắc đến trong nhiều nghiên cứu trước đó, nó có thể liên quan đến giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm vào vật chủ. Để phục vụ công tác nghiên cứu về vai trò của gene <i>PR1</i> ở nấm <i>V. dahliae</i> , chủng vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> có chứa vector xóa gene pKO2- <i>PR1</i> đã được thiết kế. Mô hình thiết kế vector pKO2- <i>PR1</i> đã được tạo thành công bằng phần mềm Snapgen Viewer. Vector pKO2- <i>PR1</i> chứa hai đoạn rình tự phía trước và phía sau gene <i>PR1</i> (1,8 kb). Hai đoạn này đã được nhân lên bằng phương pháp PCR và được gắn vào vector tái tổ hợp. Kết quả gắn nối vector tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn <i>XhoI</i> . Kết quả giải trình tự vector pKO2- <i>PR1</i> hoàn toàn phù hợp với mô hình vector đã được xây dựng ban đầu. Vector pKO2- <i>PR1</i> chủng số 2 đã được chuyển thành công vào vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> . Chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang vector pKO2- <i>PR1</i> đã tạo ra là công cụ quan trọng trong nghiên cứu chức năng của gene <i>PR1</i> trên nấm <i>V. dahliae</i> .
Ngày hoàn thiện: 19/6/2023	
Ngày đăng: 19/6/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
pKO2- <i>PR1</i>	
<i>PR1</i>	
Vector xóa gen	
<i>Verticillium dahliae</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7765>

* Corresponding author. Email: buitrithuc@tuaf.edu.vn

1. Giới thiệu

Verticillium thuộc một chi nấm trong bộ Ascomycota, là loại nấm bệnh điển hình ở thực vật. Chúng là nguyên nhân chính gây lên bệnh héo và già sớm ở nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế cao như cà chua, khoai tây, cải bắp, súp lơ, ớt chuông... [1]. Có ba chủng khác nhau của nấm *Verticillium* bao gồm Nấm *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* và nấm *Verticillium longisporum* [1]. Mỗi chủng có sự đa dạng khác nhau về ký chủ. Chủng *Verticillium longisporum* có ký chủ rộng hơn so với hai dòng còn lại. *Verticillium dahliae* tấn công vào cây trồng từ giai đoạn rất sớm thông qua rễ và gây nên các triệu chứng héo ở cây bị bệnh [1], [2]. Nấm *V. dahliae* thường cư trú trong đất dưới dạng thể nghỉ như microsclerotia, khi phát hiện ra vật chủ phù hợp nó xâm nhiễm vào cây thông qua rễ, sau đó phát triển theo hệ thống mô mạch của cây rồi phát tán ra toàn bộ cây trồng. Thể nghỉ của nấm *V. dahliae* thường có màu đen do chất melanin có được tạo ra bên trong tế bào thể nghỉ. Chất melanin này giúp tế bào nấm *V. dahliae* có thể tồn tại trong đất lên đến 15 năm và có thể sống sau khi đi qua hệ tiêu hóa của động vật [3]. Chính vì vậy, phòng chống bệnh do nấm *Verticillium* gây ra gặp nhiều khó khăn. Biện pháp không chế tác hại của nấm *Verticillium dahliae* lên cây trồng đã và đang được nghiên cứu tại nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa tìm được loại thuốc đặc trị nấm bệnh này một cách hiệu quả, mà chủ yếu hiện nay vẫn sử dụng hóa chất để diệt nấm. Các loại hóa chất này thường gây ảnh hưởng tới cân bằng sinh thái, vật nuôi và con người. Nhằm phát triển phương pháp trị nấm mang lại hiệu quả cao, ít độc hại cho con người và vật nuôi, gần đây các nhà khoa học đưa ra giả thuyết về không chế nấm bệnh một cách hiệu quả bằng cách ngăn chặn quá trình xâm nhiễm của nấm vào rễ thông qua ngăn chặn biểu hiện của các gene quan trọng liên quan đến bước đầu quá trình xâm nhiễm vào cây trồng [4]-[6]. Việc nghiên cứu vai trò của các gene liên quan đến bước đầu xâm nhiễm góp phần làm rõ hơn cơ chế của quá trình xâm nhiễm và gây bệnh ở nấm *V. dahliae* [7]; từ đó, có cơ chế tác động nhằm ngăn chặn sự xâm nhập của nấm *Verticillium* vào vật chủ. Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu về nấm *V. dahliae* ở Việt Nam. Nhằm tạo ra công cụ để xóa gene *PR1* trên nấm *V. dahliae*, nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector xóa gene *pKO2-PR1* đã được thực hiện.

Gene *PR1* được biết đến như một nhân tố liên quan đến quá trình gây bệnh ở một số loài nấm bệnh [2], [4]. Trong nghiên cứu về tương tác giữa cây trồng với nấm *V. dahliae*, nó tăng cường biểu hiện khi tương tác với tế bào vật chủ [8]. Trong nghiên cứu về nhân tố phiên mã *Som1* và *Vta3*, gen này giảm biểu hiện mạnh trên các thể đột biến *SOM1* và *VTA3* [2]. Việc tìm ra vai trò của gene này trong quá trình xâm nhiễm sớm có thể đưa ra những gợi ý hữu ích trong các nghiên cứu về các chế phẩm không chế nấm gây bệnh *V. dahliae*. Để nghiên cứu về chức năng của gene này chúng ta cần có công cụ hữu hiệu, đặc biệt là công cụ trong xóa gene tạo thể đột biến mất gene *PR1*. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector xóa gene *pKO2-PR1* đã được tạo ra, đây là một công cụ quan trọng để phục vụ công tác xóa gene và nghiên cứu chức năng của gene *PR1* trên nấm *V. dahliae*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH5 α , vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng AGL1 và nấm *V. dahliae* được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và di truyền, Đại Học Goettingen, Cộng hòa Liên Bang Đức. Vi khuẩn *E. coli* được nuôi cấy ở 37°C, trong khi vi khuẩn *A. tumefaciens* và nấm *V. dahliae* được nuôi ở nhiệt độ 25°C. Kít Phusion DNA polymerase được cung cấp bởi hãng Thermo Scientific. Các cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi Công ty Trách nhiệm hữu hạn một thành viên Sinh hóa Phù Sa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA từ sợi nấm *V. dahliae*

Nấm *V. dahliae* được nuôi trong môi trường potatoes dextro broth (PDB), được thu bằng cách lọc với màng lọc miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Germany) và nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng. Bột nấm này sẽ được sử dụng để tách DNA. Phương pháp tách chiết được cải tiến từ phương pháp của Kolar và cộng sự [9]. Khoảng 1,0 g bột nấm nói trên được cho vào ống eppendorf (2ml); sau đó, bổ sung vào ống chứa bột nấm 1 ml dung dịch tách DNA (50 mM Tris pH 7,2, 50 mM EDTA, 3% SDS và 1% 2-Mercaptoethanol) đã được làm nóng ở 65°C, trộn đều và ủ ở 65°C trong 1 giờ. Hỗn hợp trên được ly tâm với tốc độ tối đa trong 5 phút. Tiếp đó, 800 µl dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf mới để trộn với 800 µl dung dịch phenol:chloroform (24:1). Hỗn hợp này được ly tâm trong vòng 20 phút ở 13000 vòng/phút. 400 µl dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới có chứa 600 µl dung dịch isopropanol. Hỗn hợp này được đảo đều trước khi ly tâm với tốc độ tối đa trong vòng 10 phút. Cặn DNA thu được sẽ được làm khô ở 37°C trong vòng 30 phút, sau đó được hòa tan với 50 µl dung dịch TE. RNA trong mẫu DNA thu được sẽ được loại bỏ bằng cách bổ sung 4 µl dung dịch RNase (10 mg/ml) và ủ trong 65°C trong 30 phút. Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.2. Phương pháp thiết kế cặp mồi đặc hiệu

Các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự DNA của gene *PR1* của nấm *V. dahliae* được lấy từ cơ sở dữ liệu của nấm *V. dahliae* JR2 trên trang Ensembl fungi. Trình tự DNA 2000 bp phía trước và 2000 bp phía sau của gene *PR1* lần lượt được đưa vào chương trình Primer 3 plus để thiết kế mồi [10]. Các mồi được thiết kế dựa trên một số tiêu chuẩn sau: kích thước mồi từ 18-22 bp, tỷ lệ GC từ 40-60%, nhiệt độ gắn mồi từ 63-65°C, kích thước sản phẩm PCR dao động từ 1.700-1.900 bp, sự khác nhau giữa mồi xuôi và mồi ngược không quá 5°C. Cặp mồi thu được từ chương trình sẽ được sử dụng để bổ sung đầu treo phù hợp cho quá trình gắn nối bằng enzyme T4 DNA polymerase. Đầu treo của các mồi gồm 17 nucleotide lần lượt có trình tự bổ sung với đoạn DNA liền kề trên plasmid gốc. Đoạn nucleotide được gạch chân trong trình tự mồi là 17 nucleotide bổ sung với trình tự trên plasmid gốc.

2.2.3. Phương pháp nhân đoạn trình tự DNA bằng phản ứng PCR

Khoảng 100 ng DNA thu được ở trên sẽ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng chuỗi trùng hợp Polymerase chain reaction (PCR). Đoạn trình tự phía trước và phía sau gene *PR1* lần lượt được nhân lên bằng enzyme Phusion DNA polymerase trong môi trường đệm HF (HF buffer) với cặp mồi đặc hiệu. Theo đó, đoạn PR1F1 được nhân lên với cặp mồi

PR1F1-F: TACGAATTCTTAATTACCAACGACATGTTGATGACTGCG

PR1F1-R: CTAGTGAGCTCGATATCCAAGGTTGCTGAGGAACAGGACA

và đoạn PR1F2 được nhân lên với cặp mồi

PR1F2-F: TCCGAGAGGCCTTCTAGATGTGCAACGGGTCTGATTAACTTGT

PR1F2-R: CACAGTACACGAGGACTTGGCACGCCTTATATGTCCTGTAAAT.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được bắt đầu bằng quá trình biến tính ở 98°C trong 1 phút, tiếp sau đó là 40 chu kỳ gồm 03 giai đoạn: biến tính ở 98°C trong 10 giây; gắn mồi ở 65°C trong 15 giây; kéo dài ở 72°C và phản ứng PCR được kết thúc sau giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm của phản ứng được giữ ở 8°C cho đến khi sử dụng. Sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Đoạn DNA tương ứng với kích thước đoạn trình tự DNA PR1F1 (1.810 bp) và PR1F2 (1.846) được tách ra khỏi gel agarose bằng bộ kit QIAquick Gel Extraction theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.4. Phương pháp tạo vector tái tổ hợp nhờ enzyme T4 DNA polymerase

Phương pháp nhân gene và gắn nối: Hai đoạn DNA PR1F1 và PR1F2 được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng có chứa đầu treo là 17 nucleotit bổ sung với trình tự của đoạn DNA liền kề trong vector pKO2 [11]. Hai đoạn DNA này sẽ được tự động gắn vào vector dựa trên phản ứng tự cắt và nối của enzyme T4 DNA polymerase. Để thực hiện được điều đó,

trước tiên vector pKO2 được cắt làm 3 phần nhờ 2 phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn. Phản ứng thứ nhất với 2 enzym *PacI* và *EcoRV* trong đệm *Cfr9I* của hãng Thermo scientific. Phản ứng thứ hai với hai enzyme *XbaI* và *SbfI*. Sau hai phản ứng cắt, vector được chia làm 2 phần có kích thước lần lượt là 986 bp và 6.738 bp. Hai đoạn DNA này cùng với hai đoạn DNA *PR1F1* và *PR1F2* được trộn với nhau theo tỷ lệ 1 phần từ vector và 2 phần từ sản phẩm PCR cần chèn vào vector. 5 μ l hỗn hợp này được trộn với dung dịch đệm BSA 1 μ l; NEB.2 1 μ l và thêm enzym T4 DNA polymerase 0,2 μ l. Hỗn hợp này được đặt trên đá trong 1 phút; sau đó chuyển lên bể ổn nhiệt 50°C 30 giây và cuối cùng cho lên đá 10 phút trước khi được chuyển vào tế bào khả biến *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt [12].

2.2.5. Phương pháp kiểm tra vector tái tổ hợp

Khuẩn lạc có khả năng mọc trên môi trường LB có chứa kháng sinh kanamycin được chọn lọc và nuôi riêng rẽ trong môi trường LB có chứa 100 μ g kanamycin/l. Các khuẩn lạc thu được sẽ được kiểm tra với enzyme cắt giới hạn *XhoI*. Khi đó, vector tái tổ hợp sẽ cho 02 băng DNA trên agarose gel với kích thước dự kiến lần lượt là 2,5 kb và 8,8 kb. Trong khi đó, vector tự đóng vòng sẽ cho 01 băng DNA có kích thước là 7,7 kb. Một chủng *E. coli* dương tính có khả năng sinh trưởng tốt sẽ được chọn lọc để gửi đi xác định trình tự nucleotit. Trình tự của vùng trước gene và sau gene *PR1* được xác định bởi hãng Cosmogenetech với cặp mồi *PR1F1-F/PR1F2-F* nêu trên. Trình tự nucleotide thu được sẽ được so sánh với trình tự phía trước và phía sau gene *PR1* của nấm *V. dahliae* trên ngân hàng gen.

2.2.6. Phương pháp biến nạp gene vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

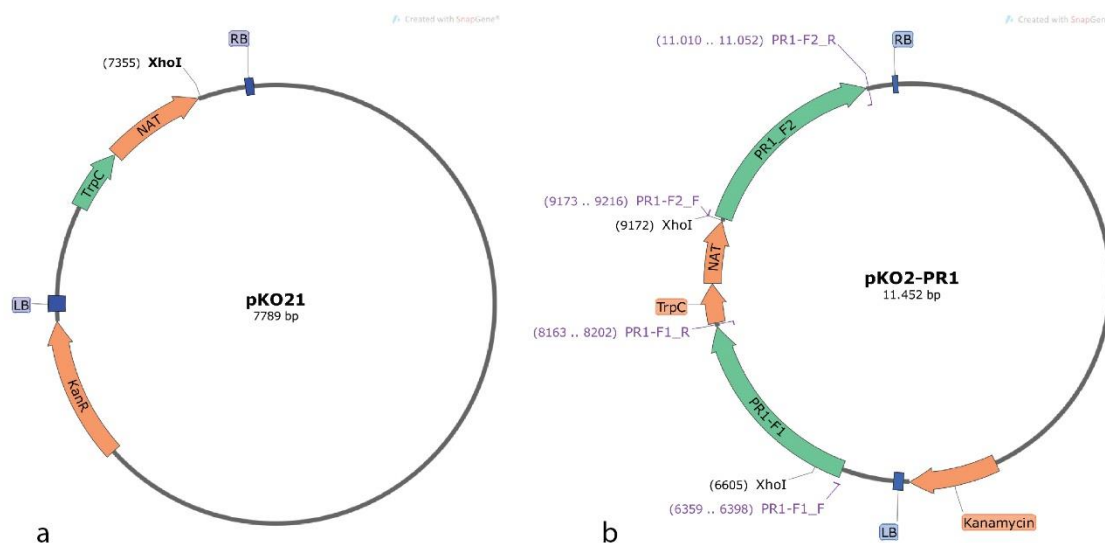
Phương pháp biến nạp gene vào vi khuẩn *A. tumefaciens* được cải tiến từ phương pháp của Jyothishwaran và cộng sự [13], 1000 ng plasmid tái tổ hợp được trộn với 200 μ l tế bào khả biến *A. tumefaciens* trong ống eppendorf 1,5 ml. Ống chứa hỗn hợp trên được đặt trên đá trong 10 phút, chuyển vào nitơ lỏng 10 phút và sốc nhiệt ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, 600 μ l dung dịch Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) được bổ sung vào ống chứa hỗn hợp tế bào khả biến. Hỗn hợp này được nuôi ở 28°C trên máy lắc trong vòng 90 phút. Cặn tế bào được thu bằng cách ly tâm dịch nuôi ở 10.000 vòng/phút sẽ được cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin. Đĩa môi trường này được nuôi ở 25°C trong 3 ngày. Chủng vi khuẩn thu được được kiểm tra lại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *PR1F1-F/PR1F1-R*.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp bằng phần mềm SnapGen Viewer

Việc thiết kế sơ đồ vector mô phỏng sự lắp ghép của các đoạn gene với nhau trong vector tái tổ hợp có vai trò như một bản vẽ kỹ thuật, nó góp phần làm cho người nghiên cứu biết rõ và chính xác về cái mình làm và hạn chế những sai sót khi làm thực tế. Từ đó, sơ đồ vector này hỗ trợ người làm thí nghiệm thiết kế cặp mồi nhân những đoạn trình tự cần thiết và lựa chọn phương pháp kiểm tra kết quả của phản ứng gắn nối một cách dễ dàng. Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp pKO2-*PR1* trên phần mềm SnapGen Viewer 3.2.1 được thể hiện trong Hình 1.

Trình tự phía trước (1,8 kb) của gene *PR1* được gắn vào trước cấu trúc biểu hiện của gene chọn lọc CroNAT trên vector pKO2 giữa hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *PacI* và *EcoRV* [7]. Trong khi đó, đoạn trình tự 1,8 kb phía sau gene được chèn vào phía sau cấu trúc gene sàng lọc CroNAT và nằm giữa hai enzyme cắt giới hạn *XbaI* và *SbfI*. Khi được chuyển vào cơ thể của nấm *V. dahliae*, cấu trúc này sẽ giúp cho việc thay thế gene *PR1* bằng cấu trúc của gene sàng lọc CroNAT theo cơ chế trao đổi chéo. Từ đó, cơ thể nấm *V. dahliae* đột biến có khả năng kháng kháng sinh CroNAT. Để tiến hành gắn được trình tự phía trước và phía sau của gene *PR1* vào vector xóa gen, trước tiên các trình tự này cần phải được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

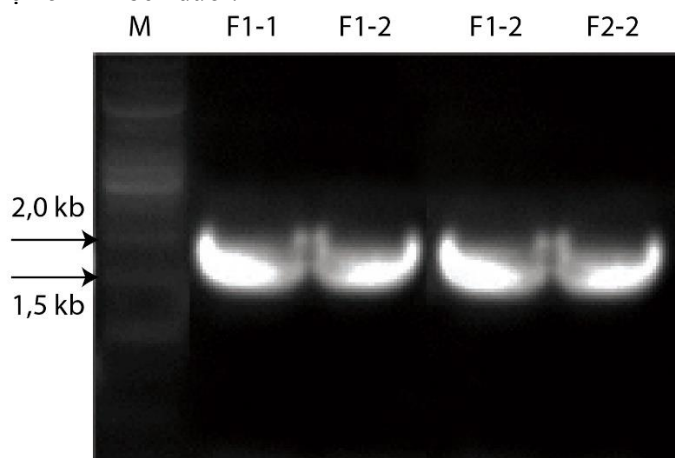


Hình 1. Kết quả thiết kế vector xóa gene PR1

a - vector pKO2 gốc; b - vector pKO2-PR1 tái tổ hợp

3.2. Kết quả nhân dòng đoạn trình tự phía trước (PR1F1) và đoạn trình tự phía sau gene (PR1F2) bằng phản ứng PCR

Kết quả PCR đoạn trình tự phía trước (PR1F1) và phía sau gene PR1 (PR1F2) với cặp mồi đặc hiệu được thể hiện ở hình bên dưới.



Hình 2. Kết quả nhân dòng trình tự phía trước và phía sau gene PR1.

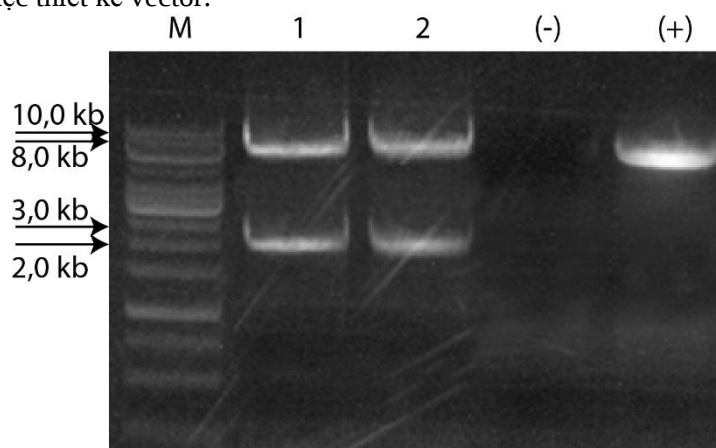
F1, F2 là trình tự phía trước và phía sau gen. M thang chuẩn DNA 1 kb

Từ kết quả hình 2 cho thấy, cả vùng trình tự phía trước và sau gene PR1 đã được nhân lên lần lượt bằng cặp mồi đặc hiệu PR1F1-F/PR1F1-R và PR1F2-F/PR1F2-R. Kết quả điện di cho một băng duy nhất kích thước khoảng 1,8 kb tương ứng với kích thước vùng được thiết kế để gắn vào vector xóa gen. Sau khi được nhân lên, các vùng trình tự trên sẽ được tinh sạch bằng bộ kit tách DNA từ gel. Sau đó, trình tự DNA này sẽ được gắn với hai đoạn của vector pKO2 đã được cắt mở vòng sẵn bởi enzym T4 DNA polymerase để tạo nên vector pKO2-PR1 sử dụng trong xóa gen. Các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB có chứa 100 mg kháng sinh kanamycin. Hai chủng *E. coli* sinh trưởng mạnh trên môi trường chọn lọc được tiến hành nuôi riêng trong môi trường LB lỏng qua đêm trước khi tách DNA plasmid để cắt kiểm tra.

3.3. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp pKO2-PR1 bằng phản ứng cắt giới hạn

Vector xóa gene pKO2-PR1 được cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *XhoI*. Kết quả cắt kiểm tra và điện di trên gel agarose được thể hiện trong hình 3.

Kết quả hình 3 cho thấy, vector tái tổ hợp số 1 và số 2 mang đi phân tích có 2 băng DNA tương ứng với kích thước lần lượt là 2,5 kb và 8,8 kb. Kích thước này phù hợp với lý thuyết nêu ra trong vector pKO2-PR1 có 2 vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XhoI*, trong khi vector pKO2 đối chứng chỉ có 01 vị trí nhận biết duy nhất tương ứng với 01 băng duy nhất (mục 3.1). Điều này chứng tỏ đã tạo được vector tái tổ hợp pKO2-PR1 mang hai đoạn trình tự PR1-F1 và PR1-F2 theo thiết kế ở Hình 1. Colony PCR là phương pháp để sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn mang gene đích. Phương pháp này rất hữu ích khi phải tìm ra những chủng vi khuẩn mang gen đích trong hàng trăm nghìn chủng vi khuẩn thu được [14]. Nghiên cứu này cho thấy rằng, hiệu quả gắn nối khi sử dụng enzyme T4 DNA polymerase rất cao. Chỉ chọn ngẫu nhiên 2 chủng vi khuẩn sinh trưởng tốt đem cắt kiểm tra cả hai chủng đều mang đoạn DNA được chèn vào theo đúng thiết kế. Đây là phương pháp tạo vector tái tổ hợp hiệu quả có thể góp phần giảm áp lực cho nhà khoa học trong việc thiết kế vector.



Hình 3. Kết quả kiểm tra vector xóa gene PR1 bằng enzyme cắt giới hạn *XhoI*.

M- thang chuẩn DNA 1 kb. (+) đối chứng dương cắt vector pKO2. (-) đối chứng âm không có DNA. 1-2 các dòng vector tái tổ hợp khác nhau

Để một lần nữa khẳng định kết quả nghiên cứu, plasmid tái tổ hợp được gửi đi xác định trình tự hai đoạn DNA được chèn vào.

3.4. Kết quả xác định trình tự đoạn DNA được chèn vào vector tái tổ hợp

Bảng 1. Kết quả so sánh trình tự DNA thu được sau xác định trình tự với trình tự vector pKO2-PR1

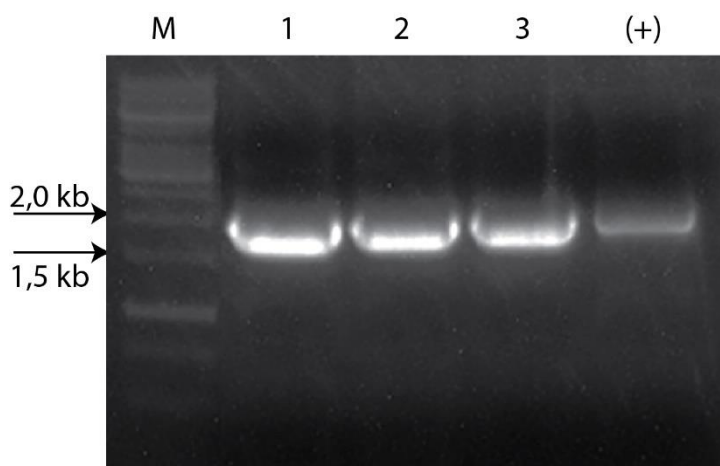
Tên mẫu	Điểm tối đa	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)	Chiều dài đoạn tương đồng
PR1 F2-F	1014	1014	4	100	549
PR1 F1-F	1009	1009	4	100	546

Số liệu so sánh trên bảng 1 cho thấy, trình tự DNA thu được với mẫu PR1F1-F cho kết quả 549 bp tương đồng 100% với trình tự PR1F1 từ vị trí 6446 đến 6991. Trình tự DNA được xác định với mẫu PR1F2-R có kết quả 546 bp tương đồng 100% so với trình tự PR1F2 từ vị trí 9329 đến 9877. Kết hợp kết quả cắt bằng enzyme giới hạn và kết quả xác định trình tự plasmid pKO2-PR1 khẳng định đã thành công trong thiết kế vector xóa gene pKO2-PR1 có chứa đoạn DNA trước và sau gene trên nền vector pKO2. Theo nghiên cứu của Bùi Tri Thức và cộng sự (2013), việc gắn các đoạn trình tự vào một vector sẽ phải tiến hành cắt mở vòng vector và gắn từng đoạn một. Việc làm này mất khá nhiều thời gian và tỷ lệ gắn chính xác đoạn cần chèn khá thấp [15]. Trong nghiên cứu này, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, việc kết hợp giữa thiết kế vector trên phần

mềm, tạo ra cặp môi chứa những đoạn trình tự bổ sung với đoạn trình tự DNA kế tiếp trong sơ đồ và sử dụng enzyme T4 DNA polymerase góp phần tăng hiệu quả của việc thiết kế vector tái tổ hợp, đồng thời tiết kiệm thời gian tạo vector từ 3-4 đoạn DNA khác nhau. Trong nghiên cứu này, một phản ứng gắn nối duy nhất được dùng để gắn 4 đoạn DNA với nhau thành một vector tái tổ hợp.

3.5. Kết quả biến nạp vector pKO2-PR1 vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

Vector pKO2-PR1 được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng phương pháp sốc nhiệt với 03 bước như sau: 100 ug plasmid được trộn với 200 μ l tế bào khả biến *A. tumefaciens*. Hỗn hợp trên được đặt trong đá 5 phút, sau đó chuyển vào nitơ lỏng trong 5 phút. Cuối cùng hỗn hợp này được đặt trong tủ 37°C trong 5 phút trước khi cấy trải lên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh kanamycin. Kết quả thu được 3 khuẩn lạc có khả năng sống trên môi trường có chứa kanamycin. Ba khuẩn lạc này được kiểm tra bằng phản ứng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp môi đặc hiệu PR1F1-F/PR1F1-R. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Kết quả kiểm tra ba khuẩn lạc *A. tumefaciens* bằng phản ứng PCR khuẩn lạc.
M- thang chuẩn DNA 1 kb. (+) đối chứng dương DNA plasmid pKO2-PR1. 1-3 các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* biến nạp

Từ kết quả ở hình 4 cho thấy, cả ba chủng *A. tumefaciens* được kiểm tra đều xuất hiện một băng DNA duy nhất kích thước khoảng 1,8 kb tương ứng với kích thước vùng PR1-F1 và tương đương với băng DNA đối chứng. Các chủng *A. tumefaciens* thu được này được nuôi riêng rẽ và giữ trong glycerol ở -80°C để sử dụng khi cần. Chủng số 2 được sử dụng để biến nạp vào *V. dahliae* JR2 để tạo thể đột biến trong các nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* có chứa vector xóa gene pKO2-PR1 đã được tạo thành công. Mô hình vector xóa gene pKO2-PR1 có chứa đoạn phía trước và sau gene PR1 trên nền vector pKO2 đã được thiết kế bằng chương trình Snapgen Viewer. Đoạn trình tự phía trước và phía sau gene PR1 (1,8 kb) đã được nhân lên với cặp môi đặc hiệu bằng phương pháp PCR. Đồng thời, hai đoạn trình tự này đã được chèn vào vector pKO2, đoạn 1 (PR1F1) nằm phía trước gene *croNAT* và đoạn 2 (PR1F2) nằm sau gene *croNAT*. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp đồng thời bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn và phương pháp xác định trình tự chỉ ra rằng, vector xóa gene pKO2-PR1 đã được tạo thành công. Vector tái tổ hợp này đã được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* sẵn sàng cho công tác xóa gene và nghiên cứu chức năng của gene PR1 trên nấm *V. dahliae*.

Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo Dục và Đào Tạo và Đại học Thái Nguyên thông qua đề tài mã số B2020-TNA-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] I. Berlinger and M. L. Powelson, "Verticillium wilt," *The Plant Health Instructor*, 2005, doi: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01.
- [2] T. T. Bui, R. Harting, S. A. Braus-Stromeier, V. T. Tran, M. Leonard, A. Hofer, A. Abelmann, F. Bakti, O. Valerius, R. Schluter *et al.*, "Verticillium dahliae transcription factors Som1 and Vta3 control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonization to induce disease," *New Phytol*, vol. 221, no. 4, pp. 2138-2159, 2019.
- [3] Pegg and B. L. Brady, *Verticillium Wilts*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2002.
- [4] S. J. Klosterman, Z. K. Atallah, G. E. Vallad, and K. V. Subbarao, "Diversity, pathogenicity, and management of Verticillium species," *Annu Rev Phytopathol*, vol. 47, pp. 39-62, 2009.
- [5] Fichtner, L., F. Schulze, and G. H. Braus. "Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell-cell and cell-substrate adherence of S-cerevisiae S288c," *Molecular microbiology*, vol. 66, no.5, pp. 1276-1289, 2007.
- [6] M. J. Neumann and K. F. Dobinson, "Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen Verticillium dahliae," *Fungal Genet Biol*, vol. 38, no.1, pp. 54-62, 2003.
- [7] V. T. Tran, S. A. Braus-Stromeier, H. Kusch, M. Reusche, A. Kaever, A. Kuhn, O. Valerius, M. Landesfeind, K. Asshauer, M. Tech *et al.*, "Verticillium transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots," *New Phytol* vol. 202, no. 2, pp. 565-581, 2014.
- [8] S. S. Scholz, W. Schmidt-Heck, R. Guthke, A. Furch, M. Reichelt, J. Gershenzon, and R. Oelmüller, "Verticillium dahliae-Arabidopsis Interaction Causes Changes in Gene Expression Profiles and Jasmonate Levels on Different Time Scales," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018, Art. no. 217.
- [9] M. Kolar, P. J. Punt, C.A. van den Hondel, and H. Schwab, "Transformation of Penicillium chrysogenum using dominant selection markers and expression of an Escherichia coli lacZ fusion gene," *Elsevier*, vol. 62, no. 1, pp. 127-134, 1998.
- [10] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, and R. Geurts, "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3". *Nucleic Acids Res* 35:W71-W74," *Nucleic acids research*, vol. 35, pp. W71-W74, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm306.
- [11] N. I. Mohammad, W. L. Kyeong, Y. Hyung-Soon, H. L. Seong, C. J. Hae, L. Jung-Hyun, and J. Jae-Yeon, "Optimizing T4 DNA polymerase conditions enhances the efficiency of one-step sequence- and ligation-independent cloning," *Bio Techniques*, vol. 63, pp. 125-130, 2007.
- [12] A. Froger and E. H. Jamesm, "Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method," *J Vis Exp.*, vol. 6, 2017, Art. no. 253.
- [13] Jyothishwaran *et al.*, "A modified freeze-thaw method for efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens," *Current science*, vol. 93, no. 6, pp. 770-772, 2007.
- [14] M. Bergkessel and C. Guthrie, "Chapter Twenty Five - Colony PCR," *Methods in Enzymology*, vol. 529, pp. 299-309, 2013.
- [15] T. T. Bui, H. T. Nguyen, V. X. Nguyen, T. K. Khuat, and C. V. Duong, "Production of lycopene by metabolically engineered E. Coli," *Journal of Research in Microbes*, vol. 2, pp. 118-125, 2013.