

KHẢ NĂNG LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI TRÌNH TỰ DRE CỦA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ OSDREB1A ĐIỀU KHIỂN TÍNH CHỊU HẠN Ở LÚA

Phạm Xuân Hội¹, Nguyễn Duy Phương¹

TÓM TẮT

Hạn, mặn là những nhân tố phi sinh học quan trọng nhất làm giảm năng suất cây trồng. Đặc biệt, trong bối cảnh thay đổi khí hậu toàn cầu hạn, mặn đang là thách thức cho sản xuất nông nghiệp và là nguyên nhân chính dẫn đến tình trạng mất an ninh lương thực. Các nhân tố phiên mã đáp ứng hạn DREB/CBF bao gồm DREB1s và DREB2s tương tác đặc hiệu với nhân tố hoạt hóa *cis* đáp ứng hạn (DRE dehydration responsive element/CRT – C repeat responsive element) và điều hòa biểu hiện của rất nhiều gen chức năng cảm ứng với điều kiện hạn, mặn và lạnh ở *Arabidopsis*. Trong nghiên cứu này, vùng mã hóa gen OsDREB1A được gắn vào vector biểu hiện pGEX-4T để tạo ra plasmid tái tổ hợp pGEX-4T- OsDREB1A. Protein dung hợp GST-OsDREB1A được biểu hiện trong *E. coli*, chủng *DE3* (Rossetta) bởi chất cảm ứng IPTG ở nồng độ 1 mM và mức độ biểu hiện cao nhất được quan sát sau hai giờ cảm ứng. Protein dung hợp được tinh sạch bởi cột sắc ký ái lực theo hệ thống dung hợp gen GST. Sử dụng kỹ thuật băng dịch chuyển, đã chứng minh được protein OsDREB1A tái tổ hợp liên kết đặc hiệu với nhân tố *cis* đáp ứng hạn DRE nằm trong vùng khởi động gen của gen chức năng sinh ra trong điều kiện bất lợi môi trường, JRC2606 (Glutamate dehydrogenase-like proteins).

Từ khóa: Liên kết đặc hiệu, nhân tố *cis* đáp ứng hạn DRE/CRT, nhân tố phiên mã, OsDREB1A, protein tái tổ hợp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đặc điểm đặc trưng của các protein điều khiển (nhân tố phiên mã) là có hai vùng hoạt động (domain): (1) vùng hoạt hoá các protein chức năng (activation domain) và (2) vùng liên kết (binding domain) với các trật tự ADN đặc hiệu (*cis*-acting element) trên vùng khởi động gen (promoter). Vùng liên kết với trật tự ADN đặc hiệu của các nhân tố phiên mã tương tác với yếu tố *cis* trong vùng khởi động gen của hàng loạt các gen chức năng liên quan đến stress, từ đó hoạt hoá biểu hiện của các gen này, giúp thực vật tăng cường sức chống chịu với điều kiện bất lợi môi trường (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Nakashima *et al.*, 2009). Chỉ riêng trong hệ gen của *Arabidopsis* đã khoảng 1500 gen mã hoá nhân tố phiên mã được phát hiện là có liên quan đến sự biểu hiện của các gen chức năng đáp ứng hạn (Riechmann, Ratcliffe, 2000).

Các nghiên cứu ở mức độ phân tử đã chứng minh vai trò trung gian của yếu tố *cis* trong cơ chế hoạt hoá gen chức năng dưới điều kiện môi trường stress. Yếu tố đáp ứng hạn DRE có trình tự lõi bảo thủ gồm 9 nucleotit (5'-TACCGACAT-3') được phát hiện lần đầu tiên trong vùng promoter của gen

rd29A (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994). Bằng kỹ thuật Band shift assay, Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki (1994) đã phát hiện các protein có trong dịch chiết nhân tế bào cây *Arabidopsis* xử lý trong điều kiện mặn liên kết đặc hiệu với trình tự DRE và đặt tên protein này là "nhân tố liên kết DRE 1" (DREB-1). Các protein dạng này sau đó được xếp chung vào một nhóm, gọi là nhân tố phiên mã DREB. Sau đó, rất nhiều nghiên cứu tiếp theo đã chứng minh trình tự DRE có liên quan đến phản ứng đáp ứng stress của thực vật, theo cả hai con đường phụ thuộc và không phụ thuộc ABA (Liu *et al.*, 1998; Dubouzet *et al.*, 2003). Yếu tố *cis* này có vai trò rất quan trọng đối với sự biểu hiện của gen *rd29A* trong điều kiện stress như hạn, mặn và lạnh (Saleh *et al.*, 2005).

Các nghiên cứu sau này đã phát hiện thêm yếu tố đáp ứng lặp lại C – CRT (C-repeat responsive element) với trình tự lõi 5'-CCGAC-3', nằm trong vùng điều khiển gen của các gen cảm ứng điều kiện hạn ở *Arabidopsis* (Saleh *et al.*, 2005). Trình tự này tương tự yếu tố DRE, tham gia quá trình khởi động hàng loạt gen chức năng liên quan đến điều kiện lạnh. Trình tự CRT và yếu tố đáp ứng nhiệt độ thấp LTRE (low-temperature responsive element) đã được phát hiện nằm trên vùng điều khiển gen của một số gen cảm ứng với điều kiện lạnh của *Arabidopsis* như

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

kin1, *kin2* và *rab18*, ngoài ra còn phát hiện tham gia vào quá trình điều hoà hoạt động của gen *BN115* và *WCS120* của *Brassica napus* và lúa mì (Baker, 1994; Ouellet *et al.*, 1998). Các yếu tố *cis* này tham gia vào con đường điều hoà hoạt động gen không phụ thuộc ABA trong điều kiện lạnh và hạn ở *Arabidopsis*. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cũng đã chứng minh yếu tố DRE/CRT có tham gia vào con đường điều hoà hoạt động gen phụ thuộc ABA (Haake *et al.*, 2002). Ví dụ, yếu tố DRE2 nằm trong promoter *rab17* có liên quan đến các đáp ứng với stress phụ thuộc ABA của ngô có trình tự lõi đặc trưng 5'-ACCGAC-3', được phát hiện tế bào phôi và lá (Busk *et al.*, 1997). Yếu tố *cis* DRE1 (5'-ACCGAG-3') cũng được xác định có mặt trong promoter *rab17* và tham gia vào con đường điều hoà hoạt động gen đáp ứng stress phụ thuộc ABA ở tế bào phôi, nhưng không có ở tế bào sinh dưỡng (Busk *et al.*, 1997; Busk, Pages, 1998).

Trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập được gen *OsDREB1A* từ thư viện AcDN của giống lúa Mộc Tuyền bằng kỹ thuật PCR sử dụng thư viện AcDN chịu hạn và cấp mỗi đặc hiệu. *OsDREB1A* là một nhân tố phiên mã tham gia điều hoà hoạt động của các gen chức năng biểu hiện trong điều kiện hạn, mặn và lạnh ở lúa và đã được chứng minh có vai trò làm tăng cường khả năng kháng hạn trong cây lúa chuyển gen. Trong nghiên cứu này, đã tiếp tục tiến hành nghiên cứu khả năng liên kết đặc hiệu của protein tái tổ hợp *OsDREB1A* với trật tự DRE (CGGCCGAC) nằm trong vùng khởi động gen của gen chức năng sinh ra trong điều kiện bất lợi môi trường, JRC2606 (Glutamate dehydrogenase-like proteins).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Nguồn gen *OsDREB1A* được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu thuộc Phòng Bệnh học Phân tử Thực vật Viện Di truyền Nông nghiệp. Các thí nghiệm nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp *OsDREB1A* được tiến hành tại Bộ môn Bệnh học Phân tử Thực vật; các thí nghiệm đánh dấu phóng xạ và băng dịch chuyển được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử Thực vật – Trung tâm Kỹ thuật Gen và Công nghệ Sinh học Quốc tế. Các cặp oligo mang trật tự DRE và các hoá chất sử dụng trong biểu hiện, tinh sạch protein tái tổ hợp và xác định điểm bám đặc hiệu của nhân tố

phiên mã *OsDREB1A* tái tổ hợp được đặt mua của các hãng: Sigma, Pharmacia, Promega, Clontech...

2. Phương pháp

a. Thiết kế và đánh dấu phóng xạ P^{32} cho trình tự ADN đích

Trình tự ADN đích là hai cặp oligo có chiều dài 50 nucleotit chứa và không chứa trật tự DRE trên vùng khởi động gen JRC2606 được đánh dấu bởi chất đồng vị phóng xạ photpho 32 sử dụng Klenow fragment ADN polymeraza để phục vụ cho thí nghiệm xác định khả năng liên kết đặc hiệu của protein tái tổ hợp. Phản ứng đánh dấu phóng xạ được thực hiện theo bộ kit và quy trình của Hãng Promega.

b. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp *OsDREB1A*

Phần trình tự ADN mã hóa gen *OsDREB1A* được gắn vào vector biểu hiện pGEX-4T thông qua vị trí enzym giới hạn *Bam*H I bởi enzym T4 ligaza. Sản phẩm phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng *DE3* (Rossetta) khả biến và cấy trên môi trường chọn lọc có bổ sung chất kháng sinh ampicilin (100 µg/ml). Kỹ thuật colony PCR sử dụng cặp mồi T3/T7 và giải trình tự được tiến hành để xác định sự gắn xuôi chiều của trình tự mã hóa gen trong vector biểu hiện. Một khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy lác qua đêm trong môi trường LB có bổ sung 100 µg/ml ampicilin và nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp được tiến hành bằng chất cảm ứng IPTG với các nồng độ 0,5 mM và 1 mM; biểu hiện trong 1, 2 giờ, ở 37°C. Protein tái tổ hợp GST-*OsDREB1A* được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Glutathione Sepharose 4B theo quy trình của Hãng Pharmacia (GST Gene Fusion System).

c. Kỹ thuật phân tích băng dịch chuyển (BAND shift assay)

Kỹ thuật phân tích băng dịch chuyển được tiến hành theo sổ tay phòng thí nghiệm (Sambrook, Russell, 2001). Về nguyên tắc, tốc độ di chuyển của ADN sợi đôi trong điện trường phụ thuộc vào kích thước, cấu trúc phân tử và hiệu điện thế. Trong thí nghiệm xác định khả năng liên kết đặc hiệu của protein tái tổ hợp với trình tự ADN đích, mẫu protein được ủ với ADN trước khi được điện di trên gel polyacrylamit. Nếu ADN liên kết với protein, tốc độ di chuyển trên gel sẽ chậm hơn so với tốc độ di chuyển bình thường. Dựa vào sự thay đổi vị trí của

bằng ADN trên gel để xác định khả năng liên kết với ADN của protein tái tổ hợp.

Dung dịch protein tái tổ hợp tinh sạch được ủ trong đệm BS (promega) ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó bổ sung 1 μ l ADN đã đánh dấu phóng xạ 32 P và tiếp tục ủ 20 phút. 1 μ l loading dye được bổ sung vào hỗn hợp trước khi điện di trên gel polyacrylamit không biến tính 10% trong đệm TBE. Bản gel sau khi điện di được phơi nhiễm trên film X-quang trong 1 h, sau đó phân tích kết quả bằng hệ thống máy chụp ảnh phóng xạ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thiết kế và đánh dấu phóng xạ trình tự ADN đích của nhóm nhân tố phiên mã DREB

Tiến hành sinh tổng hợp hai cặp oligo có trình tự bổ sung tương ứng với hai đoạn ADN có chiều dài 50 nucleotit trên vùng khởi động gen của gen chức

năng sinh ra trong điều kiện bất lợi môi trường JRC2606 ở lúa làm trình tự đích cho thí nghiệm bằng dịch chuyển. Cặp thứ nhất chứa trình tự ADN đặc hiệu của nhóm gen DREB (CGGCCGAC), cặp thứ hai có trình tự như cặp thứ nhất nhưng trình tự ADN đặc hiệu của nhóm gen DREB đã được thay đổi. Cặp oligo thứ nhất được pha loãng và trộn đều đảm bảo mỗi oligo có nồng độ 10 pmol trong 50 μ l TE buffer. Dung dịch chứa 2 oligo có trình tự tương đồng được đun sôi 5 phút sau đó cho giảm nhiệt độ từ từ đến nhiệt độ phòng để hai oligo gắn kết lại với nhau theo nguyên tắc bổ sung tạo nên đoạn ADN có chiều dài 50 nucleotit chứa trật tự ADN đặc hiệu của nhóm gen DREB. Cặp oligo thứ hai cũng được tiến hành như cặp thứ nhất để tạo nên đoạn ADN có chiều dài 50 nucleotit nhưng không chứa trật tự ADN đặc hiệu của nhóm gen DREB, sử dụng như đối chứng âm (hình 1).

5'-AGCCAAACGCAG**CCGGCCGA**CTCTCTCCCGTGCCTTCCTCCTCGATCCCC-3'
3'-TCGGTTTGCGTC**GGCCGGCT**GGAGGAGGGCACGGAAGGAGGAGCTAGGGG-3'

(A)

5'-AGCCAAACGCAG**CTAATTAT**CTCTCTCCCGTGCCTTCCTCCTCGATCCCC-3'
3'-TCGGTTTGCGTC**GATTAATA**GGAGGAGGGCACGGAAGGAGGAGCTAGGGG-3'

(B)

Hình 1. Trình tự cặp oligo đích

A: Trình tự ADN đích chứa trình tự lõi DRE: **CCGGCCGA**
B: Trình tự ADN đích không chứa trình tự lõi DRE: **CTAATTAT**

Đánh dấu hai đoạn ADN sợi khuôn bởi chất đồng vị phóng xạ photpho 32 sử dụng Klenow fragment ADN polymeraza và được tiến hành như sau: sử dụng 100 ng mỗi đoạn ADN sợi khuôn trong 5 μ l TE buffer, ủ ở nhiệt độ 65 °C trong 5 phút rồi giảm nhiệt độ từ từ đến nhiệt độ phòng. Bổ sung 1 μ l 0,5 mM dATP, 1 μ l 0,5 mM dCTP, 1 μ l 0,5 mM dTTP, 7 μ l H₂O, 2 μ l 10x klenow buffer, 2 μ l 10x klenow buffer, 1 μ l klenow ADN polymeraza và 2 μ l { α - 32 P}dGTP. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 30 phút sau đó tiến hành loại bỏ α - 32 P dư thừa bằng cột lọc gel. Đoạn ADN được đánh dấu bởi α - 32 P được sử dụng như sợi khuôn trong phản ứng bằng dịch chuyển.

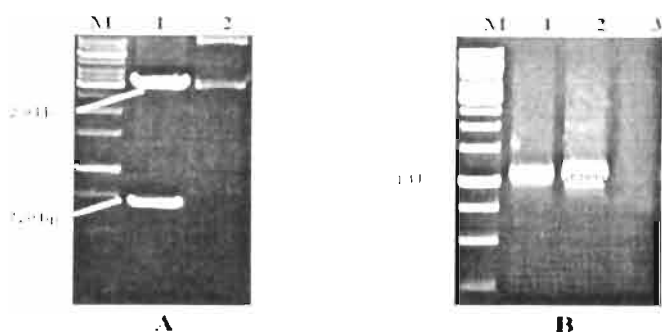
2. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp OsDREB1A

Vector tái tổ hợp *pUC19-OsDREB1A* mang trình tự mã hóa gen *OsDREB1A* giới hạn hai đầu bởi vị trí enzym giới hạn *Bam*H I cùng với vector biểu hiện

pGEX-4T được xử lý với enzym giới hạn *Bam*H I để tạo 2 đoạn ADN mạch thẳng chứa 2 đầu dính có vị trí nhận biết của *Bam*H I. Đoạn ADN mạch thẳng vector biểu hiện pGEX-4T được xử lý với CIAP theo quy trình của hãng Promega để khử gốc photphat ở đầu 5' của sợi ADN nhằm loại bỏ khả năng tự đóng vòng. Các sản phẩm cắt giới hạn sau đó được tinh sạch bằng cột *GieneluteTM Minus Etbr* của Hãng Sigma để loại bỏ các băng ADN không đặc hiệu và các thành phần phụ của phản ứng cắt giới hạn còn lẫn trong sản phẩm (hình 2A). Phản ứng ghép nối gen *OsDREB1A* vào vector biểu hiện được thực hiện nhờ enzym T4 Ligaze ở 16°C, qua đêm. Sản phẩm phản ứng được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng *DE3* (Rossetta) khả biến và cấy trên môi trường chọn lọc có bổ sung chất kháng sinh ampicilin (100 μ g/ ml).

Để kiểm tra sự có mặt của gen *OsDREB1A* trong thể biến nạp, một số khuẩn lạc được chọn ngẫu

nhiên và kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mỗi vector T3/T7. Theo lý thuyết, nếu đoạn gen *OsDREB1A* gắn vào vị trí *Bam*H I trên vector biểu hiện pGEX-4T thì sản phẩm PCR thu được sẽ là một đoạn ADN có kích thước 1020 bp, bao gồm cả đoạn gen *OsDREB1A* (720 bp). Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1% cho thấy sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc 1 và 2 cho một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 1020 bp, đúng với kích thước tính toán lý thuyết, chứng tỏ phần mã hóa gen *OsDREB1A* đã được gắn vào vector pGEX-4T tạo plasmit tái tổ hợp pGEX-4T-*OsDREB1A* (hình 2B).

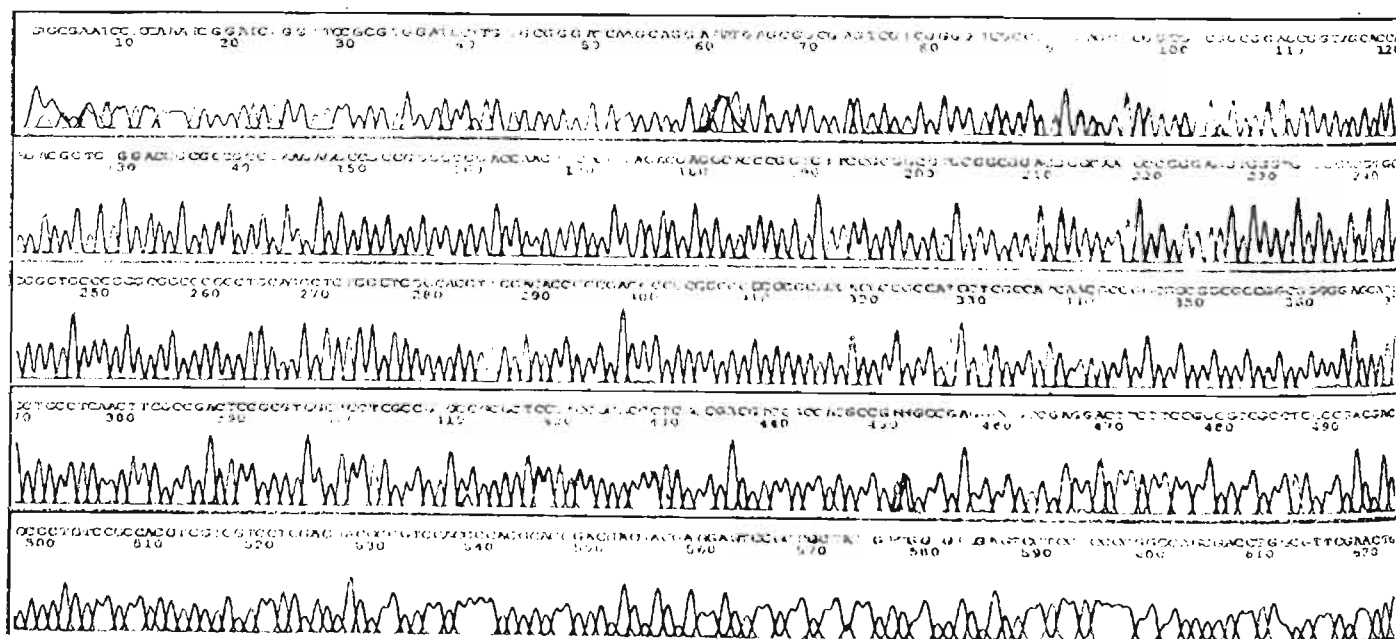


Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm cắt giới hạn và sản phẩm PCR khuẩn lạc mang gen OsDREB1A

A. Giếng M: Thang ADN chuẩn 1 kb; giếng 1: pUC19-OsDREBLA cắt BamH I; giếng 2: : pUC19-OsDREBLA nguyên bản; giếng M: Thang ADN chuẩn 1kb; giếng 1 - 3: sản phẩm PCR từ khuẩn lạc số 1 - 3.

Đã lựa chọn khuẩn lạc dương tính số 2, tiến hành tách chiết plasmit và giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự bằng máy đọc trình tự tự động ABI 3100 để khẳng định sự có mặt và gắn xuôi chiều của gen *OsDREB1A* trong vector tái tổ hợp. Kết quả giải trình tự cho thấy gen *OsDREB1A* đã được gắn xuôi chiều vào vector biểu hiện tái tổ hợp pGEX-4T *OsDREB1A* (hình 3).

Tế bào mang vector tái tổ hợp được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB có bổ sung chất kháng sinh và biểu hiện protein tái tổ hợp bằng chất cảm ứng IPTG với các nồng độ 0,5 mM và 1 mM, biểu hiện trong 1, 2 giờ, ở 37°C. Tế bào được siêu âm để phá màng và dịch chiết được thu lại để kiểm tra mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp OsDREB1A-GST trong dịch chiết tế bào bằng điện di trên gel polyacrylamit biến tính (SDS-PAGE). Gen OsDREB1A (mã hóa 240 axit amin, tương đương với 27 kDa) sau khi được đưa vào vector biểu hiện pGEX-4T sẽ nằm nối tiếp với trình tự mã hóa cho protein GST (25 kDa), vì vậy khi biểu hiện trong tế bào vi khuẩn sẽ biểu hiện thành một protein dung hợp có khối lượng khoảng 52 kDa.

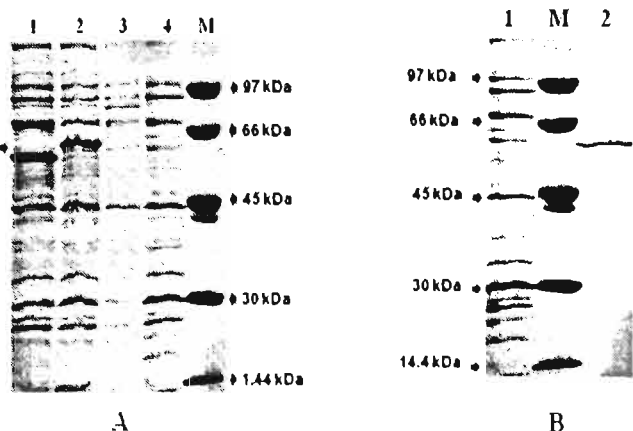


Hình 3. Kết quả giải trình tự gen OsDREBB1A trong vector biểu hiện pGEX-4T

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp OsDREB1A-GST trong dịch chiết tế bào bằng điện di trên gel polyacrylamit biến tính (hình 4A) cho thấy dịch nuôi cấy có bổ sung 1 mM IPTG và ủ trong 2 giờ có mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp rõ nhất

(hình 4A, giếng 2). Khi sử dụng dịch chiết tế bào này, đã tiến hành tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Glutathione Sepharose 4B. Dung dịch thu được sau tinh sạch được xử lý qua bước thẩm tách để loại bỏ các thành phần muối lẫn còn dư và điện di

kiểm tra trên gel polyacrylamit biến tính. Kết quả thu được cho thấy đã thu được một băng protein duy nhất có kích thước khoảng 52 kDa đúng với kích thước tính toán lí thuyết (hình 4B).



Hình 4. Ảnh điện di trên gel SDS-PAGE protein tái tổ hợp OsDREB1A-GST

A. Giếng M: Thang protein chuẩn; giếng 1-4: dịch chiết tế bào; giếng 1, 2: cảm ứng với IPTG 1 mM trong 1 giờ, 2 giờ; giếng 3, 4: cảm ứng IPTG 0,5 mM trong 1 giờ, 2 giờ.

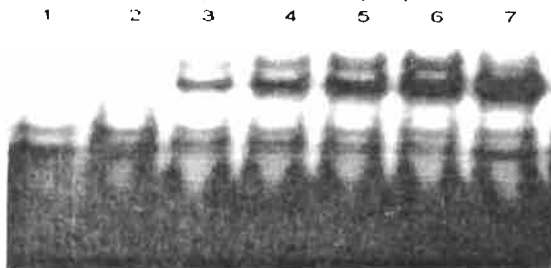
B. Giếng M: Thang protein chuẩn; giếng 1: dịch chiết tế bào; giếng 2: OsDREB1A tái tổ hợp tinh sạch qua cột Glutathione Sepharose 4B.

3. Đánh giá khả năng liên kết đặc hiệu của protein OsDREB1A tái tổ hợp với trình tự đích

Theo kết quả nghiên cứu đã công bố về nhóm nhân tố phiên mã DREB ở *Arabidopsis*, nhóm nhân tố phiên mã này liên kết đặc hiệu với một trình tự ADN đặc hiệu DRE nằm trên promoter của gen chức năng, có trình tự lõi là CGGCCGAC. Trong nghiên cứu này, đã sử dụng kĩ thuật băng dịch chuyển để chứng minh khả năng bám đặc hiệu của nhân tố phiên mã OsDREB1A ở lúa với trình tự đích. Dung dịch ADN đích đã đánh dấu phóng xạ phốt pho 32 được ủ với dung dịch protein tái tổ hợp trong đệm BS trong 20 phút để thực hiện phản ứng liên kết. Sản phẩm phản ứng sau đó được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamit không biến tính 12%. Theo tính toán lí thuyết, nếu protein tái tổ hợp liên kết với trình tự ADN đích, khi được điện di trên gel polyacrylamit, làm băng ADN sẽ dịch chuyển chậm hơn so với băng ADN không có protein bám vào.

Kết quả điện di thu được cho thấy khi có mặt protein OsDREB1A tái tổ hợp trong hỗn hợp, ADN đích di chuyển chậm hơn (hình 5, giếng 3 - 7) trên gel polyacrylamit 12% so với đối chứng âm là hỗn hợp không bổ sung protein OsDREB1A (hình 5, giếng 1). Kết quả này chứng tỏ OsDREB1A đã liên kết với

trình tự ADN đích và làm chậm tốc độ di chuyển của ADN trong điện trường. Trong khi đó, với hỗn hợp đã được ủ trước với protein tái tổ hợp OsDREB1A, nhưng sử dụng trình tự ADN đích đã thay thế trật tự lõi CGGCCGAC bằng TAATTATC (hình 5, giếng 2), băng ADN vẫn di chuyển nhanh như trong phản ứng đối chứng âm (hình 5, giếng 1), chứng tỏ nhân tố phiên mã OsDREB1A tái tổ hợp không liên kết với trình tự ADN thay thế. Các kết quả này chứng tỏ protein OsDREB1A tái tổ hợp có khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự ADN có trật tự lõi CGGCCGAC.



Hình 5. Điện di trên gel polyacrylamit 12% đánh giá khả năng bám của protein OsDREB1A lên vùng ADN đặc hiệu của nhóm gen DREB

Giếng 1: Đối chứng âm không có protein OsDREB1A (đối chứng âm); giếng 2: Hỗn hợp OsDREB1A và sợi khuôn ADN không chứa vùng ADN đặc hiệu; giếng 3 - 7: Hỗn hợp OsDREB1A và sợi khuôn ADN chứa vùng ADN đặc hiệu với các nồng độ tương ứng là 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng và 500 ng.

IV. KẾT LUẬN

Phần mã hóa gen OsDREB1A đã được gắn vào vector biểu hiện gen pGEX-4T theo đúng khung đọc mở tạo plasmit tái tổ hợp pGEX-4T-OsDREB1A và biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* chủng DE3 (Rossetta). Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp OsDREB1A-GST trong dịch chiết tế bào DE3 cho thấy dịch nuôi cấy được cảm ứng bởi 1 mM IPTG và nuôi trong 2 giờ có mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp cao nhất. Kết quả tinh sạch protein tái tổ hợp OsDREB1A-GST từ dịch chiết tế bào bằng cột sắc ký ái lực Glutathione Sepharose 4B cho thấy một băng protein duy nhất có kích thước khoảng 52 kDa - đúng với kích thước tính toán lí thuyết đã được tinh sạch.

Protein OsDREB1A tái tổ hợp có khả năng liên kết đặc hiệu với yếu tố đáp ứng hạn DRE có trật tự lõi CGGCCGAC nằm trong vùng khởi động gen của gen chức năng sinh ra trong điều kiện bất lợi môi trường, JRC2606 (Glutamate dehydrogenase-like proteins).

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với sự giúp đỡ tài chính của Viện hàn lâm Khoa học Thế giới thứ

3 (Academy of Sciences for the Developing world) thông qua đề tài nghiên cứu (RGA) No. 09-235 RG/Bio/A S_G – UNESCO FR: 3240230329.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker S., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting element that confer cold, drought and ABA regulated gene expression, Plant Mol. Biol. 24, pp. 701-713.
2. Busk P. K., Jensen A.B. and Pagès M., 1997. Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize. Plant J. 11(6), pp. 1285 - 1295.
3. Busk P. K. and Pagès M., 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant Mol. Biol. 37(3):425-35.
4. Dubouzet J. G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E. G., Miura S., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high salt and cold responsive gene expression. Plant Journal, 33, pp. 751-763.
5. Haake V., Cook D., Riechmann J. L., Pineda O., Thomashow M. F., Zhang J. Z., 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in arabidopsis. Plant physiology, 130, pp. 639-648.
6. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signaling transduction pathways in drought and low -temperature-responsive gene expression respectively, in Arabidopsis. Plant Cell, 10, pp. 1391-1406.
7. Nakashima K., Ito Y. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and Grasses. Plant Physiol. 149: 88-95.
8. Ouellet F., Vazquez-Tello A. and Sarhan F., 1998. The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. FEBS Lett., 423 (3): 324 - 328.
9. Riechmann J. L. and Ratcliffe O. J., 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. Curr. Opin. Plant Biol. 3 (5): 423 - 434.
10. Saleh A., Victoria L. and Pages M., 2005. Functional role of DRE-binding transcription factors in abiotic stress. www.dista.unibo.it/doublehelix/.../sec3.php?id=17.
11. Sambrook, J. and Russell, W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.).
12. Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58(2) 221-227.
13. Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell. Vol.6, 251-264.

SPECIFIC BINDING ACTIVITY TO DRE SEQUENCE OF TRANSCRIPTION FACTOR OSDREB1A INVOLVED IN DROUGHT TOLERANCE IN RICE

Pham Xuan Hoi, Nguyen Duy Phuong

Summary

Drought and salinity are among the most important abiotic stress factors limiting food production. In the context of climate change, drought & high-salt are challenges in agricultural production and the main reason for food insecurity. DREB/CBF (dehydration-responsive element-binding protein/C-repeat-binding factors (CBFs) transcription factors including DREB1s and DREB2s specifically interact with the DRE/CRT cis acting element and control the expression of many stress-inducible genes in *Arabidopsis*. In this study, coding sequence of OsDREB1A was cloned in expression vector pGEX-4T to get a recombinant plasmid pGEX-4T- OsDREB1A. Fusion protein GST-OsDREB1A was over-expressed in *E coli*, strain DE3 (Rossetta) by IPTG (1 mM) induction and maximum level of expression was observed after two hours of induction. Purified protein, GST- OsDREB1A was purified using Glutathione Sepharose 4B according to GST Gene Fusion System. Using band shift assay, we determine that purified recombinant protein OsDREB1A bound specifically to DRE sequence localised on promoter of stress inducible gene, JRC2606 (Glutamate dehydrogenase-like proteins).

Keywords: Specific binding activity, DRE/CRT, transcription factor, OsDREB1A, recombinant protein.

Người phản biện: PGS.TS. Ngô Xuân Bình