

## PHÂN TÍCH HOẠT TÍNH CỦA MỘT SỐ PROMOTER TRONG CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN

Nguyễn Hoàng Lộc

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế  
Tae-Jin Kang, Mi-Ok Jang, Moon-Sik Yang  
Trường Đại học quốc gia Chonbuk, Hàn Quốc

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Mức độ biểu hiện các gen ngoại lai trong thực vật phụ thuộc chủ yếu vào việc chọn các promoter để sử dụng. Các promoter ảnh hưởng đến sự phiên mã về cả chất lượng lẫn số lượng. Promoter được dùng rộng rãi nhất là promoter 35S của virus khảm ở cây súp lơ (CaMV 35S), cho mức độ biểu hiện gen cao ở hầu hết các thực vật chuyển gen. Một số promoter khác cũng đã được phân lập và biểu hiện khá mạnh ở thực vật chuyển gen, chẳng hạn promoter ubiquitin ở ngô và thuốc lá, promoter actin 1 ở lúa ...

Hầu hết các promoter có cấu trúc và chức năng tương đối khác nhau, do đó thường có các mức độ hoạt tính khác nhau đối với biểu hiện của gen. Điều này có thể là do sự khác nhau trong nền tảng di truyền của vật chủ và sự tương tác của các nhân tố promoter với các yếu tố chưa được biết trong các loài khác nhau. Sự hiểu biết về chức năng của các promoter được thay đổi trong cây chủ là cần thiết để cải thiện hiệu quả của sự biểu hiện ở thực vật chuyển gen.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi so sánh hoạt tính của một số promoter được kiểm tra trong cây thuốc lá bằng biểu hiện gen *cat*. Các promoter này là ubiquitin và actin 1 ở thuốc lá trong mối tương quan với promoter CaMV 35S.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu thực vật

Sử dụng cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana) *in vitro* cho các thí nghiệm chuyển gen và phân tích biểu hiện gen.

#### Cấu trúc các vector mang promoter-*cat*

Các kỹ thuật DNA được tiến hành theo Sambrook và cs (1987). Các promoter (bảng 1) được khuếch đại bằng PCR với các cặp primers đặc trưng. PCR được thực hiện với enzyme Ex-Taq DNA polymerase (Takara). Các sản phẩm PCR được đưa vào vector biểu hiện thực vật, mang gen chỉ thị *cat* và gen chọn lọc *npt II*, nằm bên cạnh bờ trái của vùng T-DNA (hình 1).

#### Chuyển nạp gen và tái sinh cây

Các cấu trúc promoter::CAT được biến nạp từ *E. coli* (chủng TOP 10) vào *Agrobacterium tumefaciens* (chủng LBA4404). Nuôi cấy mảnh lá (1x1cm) của cây thuốc lá *in vitro*, được gây nhiễm *A. tumefaciens* mang cấu trúc promoter::CAT, trên môi trường chọn lọc (môi trường cơ bản Murashige-Skoog [MS] bổ sung 200mg/mL kanamycin và 300mg/mL cefotaxime) trong 3 tuần với 16h chiếu sáng/ngày để tạo chồi. Các chồi tái sinh được tạo ra trên môi trường MS có 100mg/mL kanamycin và 300mg/mL cefotaxime. Mảnh lá của cây tái sinh sau khi chuyển gen được dùng để phân tích PCR, Northern blot và CAT.

**Bảng 1. Các vector plasmid mang các promoter khác nhau với vùng mã hoá CAT**

Plasmid pMYK	Promoter	Vùng mã hoá
33	CaMV 35S	CAT
36	Act1	CAT
51	Ubi1 (intron + monomer)	CAT
52	Ubi1 (intron)	CAT



**Hình 1. Bản đồ vùng T-DNA ở các vector biểu hiện chứa gen *cat* với sự điều khiển của các promoters khác nhau.**

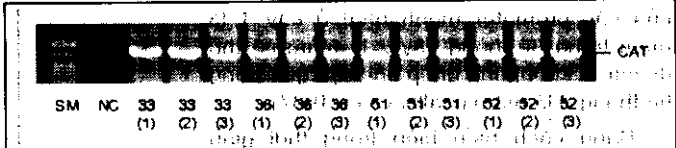
CaMV 35S: promoter (từ -419 đến +1) của thể phiên mã CaMV 35S, Act1: promoter (từ -835 đến +423) của gen actin 1 ở lúa, 5'Ubi.U4 (Intron+Monomer): promoter (từ -263 đến +754) của gen polyubiquitin ở thuốc lá, 5'Ubi.U4 (Intron): promoter (từ -263 đến +524) của gen polyubiquitin ở thuốc lá; NOS 3': vùng kết thúc phiên mã của nopaline synthase, RB: bờ phải, LB: bờ trái.

**Phân tích PCR của cây chuyển gen**

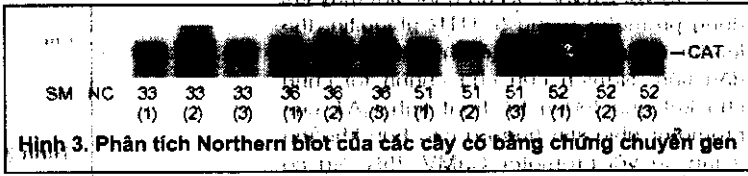
DNA tổng số (100ng) là cây chuyển gen được dùng làm khuôn mẫu với cặp primers đặc trưng của gen CAT: TGC-1 (primer-F) 5'-TAGGATCCAATGGASAAAAAATCACT-3' và TGC-3 (primer-R) 5'-CCGGGATCGCCCCCCTGC

CA-3'. Hỗn hợp PCR chứa 10pmol, primers/10mM Tris(pH 8,3)/1,5mM MgCl<sub>2</sub>/40mM KCl/0,5mM dNTP/2U Taq

Polymerase trong tổng dung tích 50µL. Khuếch đại PCR theo phương thức biến tính 94°C/5 phút tiếp theo 30 chu kỳ: 94°C/30s, 60°C/30s và 72°C/45s. Các sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 1%.



**Hình 2. Khuếch đại DNA tổng số của cây chuyển gen bằng PCR.** Mỗi dòng vector được chọn 3 cây (đánh số 1, 2 và 3) để phân tích. SM: 1-kb DNA ladder, NC: đối chứng không chuyển gen.



**Hình 3. Phân tích Northern blot của các cây cố bằng chứng chuyển gen.**

**Phân tích Northern blot**

RNA tổng số của lá cây chuyển gen được phân đoạn trên gel formaldehyde agarose, sau đó gắn lên màng Hybond-N+. Giai đoạn tiền lai được thực hiện ở 60°C/2h trong Church buffer (pH 7,4), tiếp đó lai với probe (gen *cat* đánh dấu P<sup>32</sup>) ở 60°C O/N trong cùng đệm. Màng lai được rửa 2 lần/20 phút ở 60°C với 2x SSC + 0,1% SDS, và 2 lần/20 phút ở 60°C với 2x SSC + 1% SDS. Tín hiệu lai được phát hiện bằng phóng xạ tự do.

**Phân tích hoạt tính CAT (chloramphenicol acetyl transferase)**

Hoạt tính của các promoters ở cây thuốc lá chuyển gen được xác định bằng phân tích CAT. Hoạt tính enzyme CAT đo theo phương pháp của Scott và cs (1988). Dịch chiết được bổ sung <sup>14</sup>C-chloramphenicol (5mM) và acetyl CoA. Phản ứng thực hiện ở 37°C/60 phút. Sắc ký lớp mỏng trên tấm silica gel để tách chloramphenicol tự nhiên khỏi các dạng bị acetyl hoá của nó trong chloroform-methanol (19:1, v/v).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Chuyển nạp gen ở cây thuốc lá và xác nhận bằng PCR**

Gen *cat* đã được đưa vào các vector biểu hiện mang các promoter khác nhau, sau đó biến nạp vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*. Các chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc được tạo ra để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Bằng chứng của sự biến nạp được xác định bằng phân tích PCR (Hình 2). Khuếch đại PCR không thực hiện trên khuôn mẫu DNA tổng số của cây thuốc lá không biến nạp.

**Phân tích Northern blot**

Hoạt động phiên mã của gen *cat* đã được kiểm tra bằng phân tích Northern blot. Các cây có bằng chứng chuyển gen từ các dòng vector khác nhau (Hình 2) cũng có tín hiệu lai khi tiến hành Northern blot (hình 3). Các cây cho tín hiệu lai mạnh nhất trong mỗi dòng vector sẽ được dùng để phân tích hoạt tính CAT.

**Phân tích hoạt tính CAT**

Để xác định hoạt tính của các promoter CaMV 35S, ubiquitin và actin 1, gen chỉ thị *cat* đã được gắn với các vùng promoter của các plasmid pMYK 33, 36, 51 và 52. Hoạt tính CAT được xác định sau 6 tuần tái sinh của cây chuyển gen. Các số liệu ban đầu thu được với cấu trúc chỉ thị CAT chỉ ra rằng hoạt tính CAT được biểu hiện bởi promoter ubiquitin (intron) là mạnh nhất so với các promoter khác. Promoter ubiquitin (intron) cho thấy hoạt tính mạnh xấp xỉ 3 lần hoạt tính của promoter CaMV 35S và 2 lần của promoter ubiquitin (monomer). Mức độ biểu hiện của gen *cat* được sắp xếp như sau: Ubi.U4 (intron) > Ubi.U4 (monomer) > CaMV35S > Act 1. (hình 4). Cường độ của các tín hiệu bị acetyl hóa được xác định bằng cách dùng chương trình TOTAL LAB để đếm với 3 lần lặp lại trên một thí nghiệm. Các số liệu trình bày ở hình 4 là giá trị trung bình cộng và sai số chuẩn của 3 thí nghiệm độc lập.

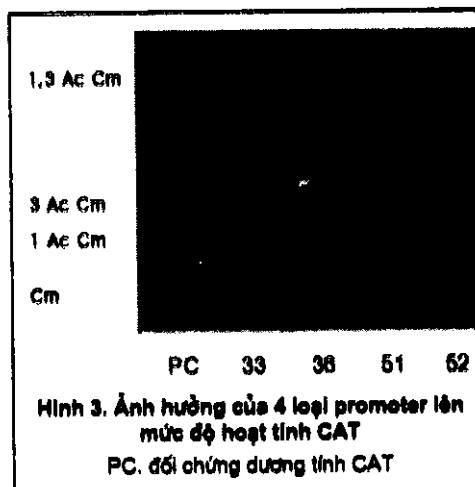
Promoter Act1 ở lúa là một trong những promoter có hoạt tính cao được dùng để xây dựng các phương thức biến nạp và biểu hiện các gen ngoại lai ở lúa (Sentoku và cs 2000, Zhang và cs 1991) và ở các cây một lá mầm khác (Zhang và cs 1991). Hoạt tính thấp hơn của các promoter đặc trưng cây 1 lá mầm trong cây 2 lá mầm cũng đã được thông báo (Callis và cs 1987). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nhận định này: mức độ biểu hiện thấp nhất của gen *cat* với promoter Act1 so với các promoter khác. Hoạt tính yếu

của các promoter mạnh nhất ở cây 1 là mầm trong hệ thống cây 2 là mầm có thể do intron không thể ghép nối hiệu quả trong hệ thống 2 là mầm (Callis và cs 1987).

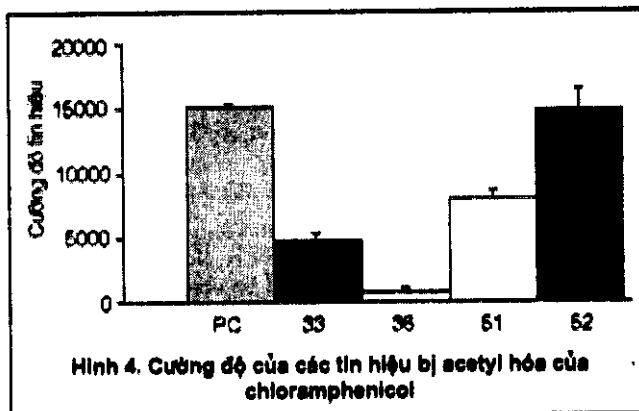
Bằng cách biểu hiện trong thời gian ngắn ở protoplast thuốc lá với gen chỉ thị GUS, Plesse và cs (2001) đã chứng minh rằng mức độ biểu hiện cao hơn nhiều của GUS so với CaMV 35S đã được tìm thấy khi dùng promoter mang 5'-UTR ubiquitin, the leader intron và trình tự mã hoá monomer đầu tiên. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự: hoạt tính CAT của promoter ubiquitin (intron) cao hơn khoảng 3 lần so với promoter CaMV 35S. Sự có mặt của leader intron là một phương thức chung cho các gen polyubiquitin (Binet và cs 1991, Genschik và cs 1994, Rollfinke và cs 1998). Loại bỏ leader intron đã giảm hiệu quả biểu hiện một cách sâu sắc (hơn 40 lần) được quan sát trong mô lá của cây thuốc lá chuyển gen ổn định (Rollfinke và cs 1998). Bằng cách biểu hiện trong thời gian ngắn ở protoplast thuốc lá với gen GUS, Genschik và cs (1994) có thể chứng minh -263 bp ở vùng 5'-UTR, the leader intron và trình tự mã hoá ubiquitin monomer đầu tiên cho phép tăng hoạt tính GUS lên 7 lần so với promoter CaMV 35S. Để nghiên cứu promoter ubiquitin chúng tôi đã tạo dòng 5'-UTR của đoạn *Ubi.U4*, leader intron, và với hoặc không ubiquitin monomer đầu tiên ở phía trước của gen *cat*.

Trong cả 2 cấu trúc, biểu hiện CAT cao hơn so với CaMV 35S promoter đã được tìm thấy. Trong 2 promoters được so sánh, mức độ biểu hiện của gen *cat* với promoter ubiquitin (intron) không có monomer cao hơn có monomer gần 2 lần. Điều này có thể là hiệu suất dịch mã tăng cao hơn sự tích lũy của bản phiên mã. Kết quả này chỉ ra rằng ubiquitin leader intron là một yếu tố quyết định định lượng của sự biểu hiện gen.

Tóm lại, chúng tôi sử dụng gen *cat* để nghiên cứu đặc điểm của một số promoter được thiết lập trong cây thuốc lá. Hoạt tính promoter và các kiểu biểu hiện gen ngoại lai đã được quan sát trong cây thuốc lá chuyển gen. Các số liệu này cung cấp các thông tin hữu ích liên quan đến việc sử dụng các promoter nói trên để hướng đến sự biểu hiện gen ngoại lai với hiệu suất tối đa trong cây thuốc lá, đồng thời chúng cũng giúp ích cho việc phát triển các cấu trúc promoter ubiquitin đã được cải thiện cho phép biểu hiện mạnh trong các loại mô thuốc lá.



Hình 3. Ảnh hưởng của 4 loại promoter lên mức độ hoạt tính CAT  
PC. đối chứng dương tính CAT



Hình 4. Cường độ của các tín hiệu bị acetyl hóa của chloramphenicol

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Binet MN, Well JH, Tessier LH, 1991. *Structure and expression of sunflower ubiquitin genes*. Plant Mol Biol 17(3): 395-407.
2. Callis J, Fromm M, Walbot V, 1987. *Introns increase gene expression in cultured maize cells*. Genes Dev 1(10):1183-1200.
3. Genschik P, Marbach J, Uze M, Feuerman M, Plesse B, Fleck J, 1994. *Structure and promoter activity of a stress and developmentally regulated polyubiquitin-encoding gene of Nicotiana tabacum*. Gene 148(2): 195-202.
4. Murashige T and Skoog F, 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol Plant 15:473-49
5. Plesse B, Criqui MC, Durr A, Parmentier Y, Fleck J, Genschik, 2001. *Effects of the polyubiquitin gene Ubi.U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in Nicotiana tabacum*. Plant Mol Biol 45(6): 655-667.
6. Rolfinke IK, Silber MV, Pfitzner UM, 1998. *Characterization and expression of a heptaubiquitin gene from tomato*. Gene 211(2): 267-276.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning (A laboratory manual)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Sentoku N, Sato Y, Matsuoka M, 2000. *Over expression of rice OSH genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants*. Dev Biol 220(2): 358-364
9. Zhang W, McElroy D, Wu R, 1991. *Analysis of rice Act1 5 region activity in transgenic rice plants*. Plant Cell 3: 1155-1165.

## SUMMARY

## ACTIVITY OF SOME PROMOTERS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANT

Nguyen Hoang Loc  
University of Sciences, Hue University  
Tae-Jin Kang, Mi-Ok Jang, Moon-Sik Yang  
Chonbuk National University, South Korea

The effectiveness of different promoters for use in tobacco transformation was compared using a reporter gene, chloramphenicol acetyl transferase (*cat*). Plasmids encoding the *cat* gene under the control of CaMV 35S, *Act1* from rice or *Ubi.U4* from tobacco promoters were delivered into tobacco plant by *Agrobacterium* leaf disk transformation. Expression patterns in transformed tobacco plants showed that the *Act1* promoter from rice, previously shown to be a strong promoter in rice and other monocots, failed to promote strong expression in tobacco. In contrast, *cat* gene expression was greatest from plasmid utilizing the constitutive promoters, *Ubi.U4* containing 5' UTR and leader intron devoid of ubiquitin monomer.