

PROMOTER 4CL1 TỪ CÂY BẠCH ĐÀN TRẮNG (*EUCALYPTUS CAMADULENSIS*) VÀ SỰ ĐIỀU KHIỂN BIỂU HIỆN GEN *GUS* ĐẶC HIỆU THÂN

Huỳnh Thị Thu Huệ, Dương Thị Thu Hà, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Promoter là một trong những yếu tố cần thiết quan trọng nhất cho sự biểu hiện của gen. Sự đóng mở, sự đặc hiệu theo cơ quan, mô, tế bào hoặc theo một đáp ứng đặc hiệu với môi trường xung quanh của gen được điều khiển bởi promoter. Trong lĩnh vực chuyển gen thực vật, promoter đã được nghiên cứu và sử dụng để điều khiển sự biểu hiện đặc hiệu của gen trong cây chuyển gen. Gen 4CL1 là một trong số các gen mã hóa cho sự tổng hợp enzyme phenylpropanoid 4-coumarate:CoA ligase, một enzyme quan trọng trong con đường trao đổi chất của các hợp chất phenylpropanoid. Một vài nghiên cứu đã chứng minh được sự đặc hiệu của promoter gen 4CL1 là ở thân cây và cụ thể hơn là ở các mô xylem thứ cấp hoặc phần cuống già. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp genome walking chúng tôi đã phân lập và xác định trình tự promoter của gen 4CL1 có kích thước 1127bp từ cây Bạch đàn trắng, đây là một promoter hoàn toàn mới. Các vùng chức năng trên promoter được dự đoán như sau: TATA box ở vị trí -29 đến -35 và hai CCAAT box ở vị trí -263 đến -267 và -285 đến -289, vùng giàu AC ở vị trí -332 đến -342. Bốn cấu trúc Ti-plasmid pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8, pBIHu9 chứa đoạn 4CL1 promoter và gen *gus* được thiết kế dựa trên vector gốc là pBI101 đã được chuyển gen vào cây thuốc lá. Sự biểu hiện của gen *gus* trong các cây thuốc lá chuyển gen được phân tích bằng phương pháp nhuộm hóa mô tế bào với Xgluc. Kết quả cho thấy cả bốn loại đoạn 4CL1 promoter trong bốn cấu trúc đã thiết kế đều điều khiển sự hoạt động của gen *gus*. Ở các cây thuốc lá chuyển gen sự biểu hiện của gen *gus* phân lớn ở thân cây điều này chứng tỏ promoter 4CL1 từ cây Bạch đàn trắng đã điều khiển biểu hiện gen đặc hiệu thân.

Từ khóa: 4-coumarate:CoA ligase, biểu hiện gen, *Eucalyptus camadulensis*, gen *gus*, promoter

MỞ ĐẦU

Sự tổng hợp lignin là một trong những quá trình quan trọng đối với thực vật. Đây là một quá trình cần có sự tham gia của nhiều loại enzyme, trong đó các enzyme phenylpropanoid 4-coumarate:CoA ligase (4CL) là một nhóm các enzyme xúc tác cho quá trình chuyển hóa các dẫn xuất acid cinnamic (các acid coumaric, acid ferrulic, acid cafeic, acid sinapic...) thành các hợp chất phenylpropanoid như flavonoid, coumarin và lignin (Lee, Douglas 1996) Đây là những hợp chất thứ cấp có vai trò quan trọng cho quá trình sinh trưởng phát triển và sống sót của thực vật. Các enzyme 4-Coumarate:CoA ligase (4CL) đóng vai trò chìa khóa trong việc liên kết nhánh trung tâm của quá trình sinh tổng hợp phenylpropanoid với các nhánh riêng tổng hợp các phenolic cụ thể (Chen *et al.*, 2006).

Ở Bạch đàn (*Eucalyptus*), gen mã hóa cho các enzyme tham gia trong con đường tổng hợp lignin đã được nghiên cứu bao gồm PAL (phenylalanine amonia- lyase), C4H (cinnamate 4 hydroxylase), HCT (hydroxycinnamoyl- CoA:shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase), C3H (p-coumarate 3-

hydroxylase), 4CL (phenylpropanoid 4-Coumarate:CoA ligase)... Trong nghiên cứu EST library Bạch đàn cho thấy có 3 cluster mã hóa cho các gen 4CL, một cluster mã hóa cho 4CL nhóm 1 enzyme 4CL1 thuộc nhóm này và hai cluster mã hóa cho 4CL nhóm 2. Các protein này được dự đoán là hướng đích ở màng lưới nội chất (Haracava 2005). Các thí nghiệm lai southern, northern, western với gen 4CL1 cho thấy ở Bạch đàn trắng 4CL1 biểu hiện mạnh ở các mô xylem thứ cấp và chứng tỏ 4CL1 liên quan chặt chẽ với con đường tổng hợp lignin (Chen *et al.*, 2006). Hai gen 4CL1 và 4CL2 phân lập ở cây Dương *Populous tomentosa* được chứng minh là có sự biểu hiện đặc hiệu khác nhau, 4CL1 đặc hiệu cho sự tổng hợp lignin trong các mô xylem và 4CL2 liên quan tới sự tổng hợp flavonoids trong tế bào biểu mô của thân và lá (Hu *et al.*, 1998).

Promoter điều khiển gen 4CL1 đã được xác định trình tự ở cây mùi tây. Promoter 4CL1 này được đưa vào vector pRT99-GUS-JD/Kozak, sau đó cấu trúc được biến nạp vào cây thuốc lá, các thí nghiệm nhuộm hóa mô tế bào cây chuyển gen với X-gluc cho thấy promoter này điều khiển gen *gus* biểu hiện đặc hiệu trên các mô xylem sơ cấp và gân

lá (Hauffe *et al.*, 1991).

Cây thuốc lá chuyển gen 4CL1 với promoter 4CL1 - được phân lập từ *Populus tometosa* - đã biểu hiện hoạt tính của enzyme 4CL1 tăng lên gấp đôi ở thân, nhưng không tăng lên ở lá và hàm lượng lignin tăng lên 25% ở thân và cũng không tăng ở lá khi so sánh với cây không chuyển gen. Các thí nghiệm cho thấy 4CL1 promoter là yếu tố điều hòa quan trọng liên quan đến hiệu quả biểu hiện của gen 4CL1 (Lu *et al.*, 2004).

Cho đến nay, vẫn chưa có công bố nào trong ngân hàng gen quốc tế về promoter 4CL1 của Bạch đàn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập, xác định trình tự đoạn 4CL1 promoter ở cây Bạch đàn trắng và thiết kế vector pBI101 chứa promoter này để kiểm tra khả năng điều khiển gen *gus* của promoter trên các cây thuốc lá chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

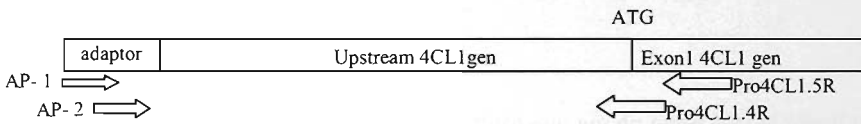
Tách DNA từ lá cây Bạch đàn trắng

Lá cây Bạch đàn trắng (5 g) được nghiền trong Nitor lỏng và bổ sung 250 mg PVPP tiếp tục nghiền.

Bột lá được chuyển vào ống có chứa sẵn dịch chiết với thành phần là 2M NaCl, 0.2M TrisHCl pH8, 0.07 M β mecaptoethanol đã được làm ấm 65°C. Hỗn hợp dịch chiết và bột lá được bổ sung 0,5 ml SDS 20% và ủ 65°C trong 1 giờ. Các bước tiếp theo bao gồm ly tâm 14 000 v/phút, 4°C từ 25 đến 30 phút và chiết với phenol, chloroform, isoamylalcohol, lặp lại nhiều lần các bước này. DNA được tủa lại bằng ethanol và hòa tan trong nước. DNA tổng số được đo nồng độ và điện di kiểm tra trên gel agarose.

Phân lập đoạn promoter 4CL1 từ cây Bạch đàn trắng

Việc phân lập đoạn promoter 4CL1 được tiến hành theo phương pháp Genome walking (Rishi *et al.*, 2004). Thư viện DNA genome của Bạch đàn trắng được thực hiện theo cách cắt DNA tổng số với enzyme giới hạn *DraI* và *PvuII* như hướng dẫn của bộ kit Genome walker™ Universal (Clontech). Phản ứng PCR khởi đầu sử dụng cặp primer adaptor (AP-1) và một primer đặc hiệu 4CL1 gen (Pro4CL1.5R). Phản ứng PCR lần 2 sử dụng nested adaptor (AP-2) và nested primer đặc hiệu 4CL1 gen (Pro4CL1.4R) (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ vị trí primer nhân 4CL1 promoter.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các primer.

Primer	Trình tự (5'- 3')
Primer nhân đoạn promoter 4CL1 từ thư viện DNA	
Pro4CL1.4R	GGT GGC CCC GTT GAT GAC GC
Pro4CL1.5R	ACC GGA AGA TGA ACT CGC GG
Primer nhân các đoạn promoter 4CL1 từ vector pJet1.2 tái tổ hợp	
Pro4CL1-Bam-R	GCG GGA TCC GAG AAT CGA GAG ACA
Pro4CL1-Bam-R2	GCG GGA TCC GAA GCC CTC CAT TGT
Pro4CL1-Hind-1.1F	CGT AAG CTT TTA TTC GGT TCC GAG
Pro4CL1-Hind-0.8 F	CGT AAG CTT GTG TAG ATA AGG

PCR được tiến hành như sau: Hỗn hợp phản ứng gồm 14.6 μ l H₂O, 2.5 μ l Buffer Taq (Fermentas), 2 μ l dNTP (10 mM), 1.5 μ l MgCl₂ (25 mM), 1.0 μ l mỗi xuôi (10 pmol), 1.0 μ l mỗi ngược (10 pmol), 2 μ l sản

phẩm lai, 0.4 μ l Taq DNA polymerase. Chương trình PCR: 94°C: 25'', 32 chu kỳ lặp lại (94°C: 25'', 65°C: 1', 72°C: 45'') 72°C: 1', sau khi kết thúc phản ứng sản phẩm được giữ

trong 4°C.

Sản phẩm PCR lần 2 được chọn dòng trong vector pJet 1.2 của hãng Fermentas và được xác định trình tự theo nguyên lý của Sanger trên máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer.

Các phương pháp sinh học phân tử cắt và ghép các đoạn DNA vào vector pBI101, biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn... thực hiện theo sách Cẩm nang phòng thí nghiệm chọn dòng phân tử (Sambrook, Russell 2001).

Chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* thực hiện theo phương pháp mảnh lá (Walden 1988).

Phương pháp nhuộm hóa mô cây thuốc lá với X-gluc

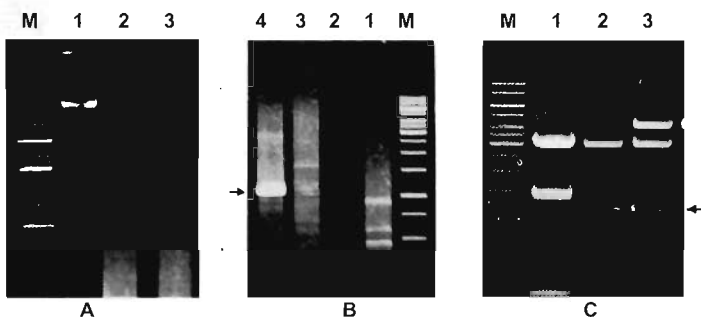
Nhúng toàn bộ phần mô thực vật trong dung dịch X-gluc nồng độ 0.05% được pha trong đệm có pH7 chứa 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄ và 0,1% Triton X100, hút chân không khoảng 5 phút, mẫu được để trong tối ở 37° C trong 24 - 48 h. Tây diệp lục bằng 70% ethanol một vài lần đến khi nhận

rõ màu được nhuộm (Jefferson *et al.*, 1987).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo thư viện từ DNA tổng số của Bạch đàn trắng

Thư viện DNA được tạo ra bằng cách cắt DNA tổng số với các enzyme giới hạn. Để đảm bảo cho kết quả cắt DNA tổng số được triệt để và có hàm lượng cao đủ để làm các thí nghiệm tiếp theo thì điểm quan trọng là DNA tổng số phải rất sạch và đậm đặc. Lá Bạch đàn trắng có đặc điểm khá cứng và nhiều tinh dầu nên trong quá trình tách chiết DNA gặp nhiều khó khăn. Tuy nhiên, với quy trình tách DNA đã lựa chọn như trên cùng với lặp lại việc chiết dung dịch chứa DNA với phenol và chloroform nhiều lần nên đã phù hợp với lá Bạch đàn, kết quả là DNA tổng số được tách chiết rất sạch và đậm đặc với nồng độ khoảng 1 µg/ µl. Sau đó, DNA được sử dụng trong phản ứng cắt với hai enzyme giới hạn là *DraI* và *PvuII*, phản ứng cắt được kéo dài qua đêm nên DNA đã được cắt rất tốt thể hiện ở vệt sáng kéo dài khi chạy điện di (Hình 2A).



Hình 2. Phân lập và chọn dòng promoter 4CL1 trong vector pJet1.2. M: Marker 1 kb. A. 1: DNA tổng số từ lá; 2, 3: DNA tổng số được cắt bằng *DraI*, *PvuII*; B. 1, 2: PCR khởi đầu từ library *PvuII* và *DraI*, 3, 4: PCR lần 2 với library *PvuII* và *DraI*; C. 1: vector pJet1.2 tái tổ hợp chứa đoạn chèn không đúng kích thước, 2,3: vector pJet1.2 tái tổ hợp chứa đoạn chèn 1.1 kb;

PCR, tách dòng và xác định trình tự promoter 4CL1

Mục tiêu của chúng tôi là phân lập đoạn promoter của gen 4CL1 với kích thước từ 0,7 - 2 kb. Đoạn phân lập được càng có kích thước lớn thì càng có nhiều khả năng chứa đầy đủ các yếu tố cần thiết của promoter.

Khi DNA tổng số được cắt ngẫu nhiên bằng enzyme giới hạn, về lý thuyết trong số các sản phẩm cắt này sẽ ngẫu nhiên có đoạn promoter 4CL1, nếu đoạn này một đầu chứa một phần exon1 của gen 4CL1 thì việc sử dụng reverse primer nằm trong

vùng exon 1 của gen sẽ có thể nhận được đoạn promoter. Bởi vị trí của một promoter là đoạn trình tự nằm ngay trước gen về phía đầu 5'. Các đoạn DNA cắt ra khi lai ngẫu nhiên với adaptor có treo điểm cắt của enzyme giới hạn tương ứng với enzyme đã dùng để cắt DNA tổng số như vậy vùng promoter 4CL1 sẽ bị giới hạn hai đầu là adaptor. Khi sử dụng cặp mồi như thiết kế trong hình 1 và mô tả ở bảng 1, chúng tôi đã nhận được đoạn promoter bằng PCR. Ở phản ứng có khuôn là sản phẩm cắt DNA tổng số với enzyme *DraI* và PCR lần 2 bằng cặp mồi Pro4CL1.4R và AP-2 đã cho sản phẩm PCR rất đậm và đặc hiệu với kích thước trên 1kb (Hình 2B giềng

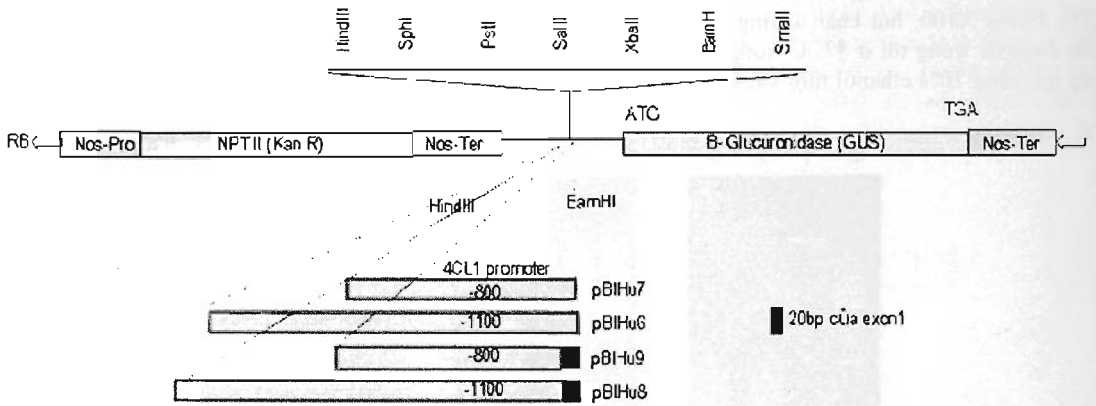
4). Sản phẩm PCR này được chọn dòng trong vector pJet1.2 (Hình 2C giêng 2, 3), toàn bộ trình tự nucleotide của đoạn 1kb đã được xác định bằng cặp mỗi pJet1.2 forward sequencing primer và pJet1.2 reverse sequencing primer.

Đoạn trình tự nucleotide được xác định có kích thước 1127 bp. Qua so sánh trình tự vào ngân hàng gen bằng phần mềm Blast cho thấy đoạn trình tự này trùng hợp hoàn toàn 14 nucleotide phân dịch mã và 104 nucleotide phân không dịch mã với trình tự cDNA của gen 4CL1 của cây Bạch đàn trắng (trình tự mã số DQ147001) trong đó chứa toàn bộ trình tự bổ sung với trình tự đoạn mỗi Pro4CL1.4 R như đã thiết kế. Vì vậy, đoạn DNA đã phân lập và xác định trình tự là vùng 5' của gen 4CL1 cây Bạch đàn trắng. Khi phân tích chi tiết hơn trình tự này, các vùng chức năng của promoter được dự đoán là: TATA box ở vị trí -29 và hai CCAAT box ở vị trí

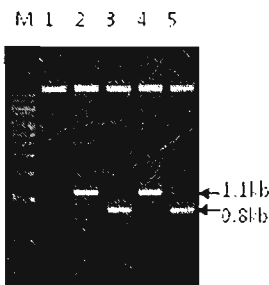
-263 và -285, vùng giàu AC ở vị trí -332 so với điểm khởi đầu phiên mã. Đây là đoạn promoter hoàn toàn mới, vì cho đến nay chưa có công bố nào trong ngân hàng trình tự gen quốc tế về trình tự nucleotide của promoter 4CL1 ở Bạch đàn trắng.

Thiết kế vector pBI101 chứa 4CL1 promoter

Sau khi tách dòng và xác định trình tự của đoạn promoter 4CL1. Chúng tôi tiến hành nhân bốn loại đoạn khác nhau từ vector pJet1.2 tái tổ hợp bằng các cặp mỗi đã mô tả trong bảng 1. Những đoạn được nhân lên sẽ có kích thước 0.8 kb và 1.1 kb được chia làm 2 loại là đoạn có chứa 20bp trong vùng exon1 và đoạn không chứa 20bp trong vùng exon 1 của gen 4CL1. Với các cặp mỗi đã thiết kế thì những sản phẩm PCR được nhân lên có chứa điểm nhận biết của enzyme giới hạn *HindIII* và *BamHI* ở hai đầu và có kích thước đúng như tính toán.



Hình 3. Sơ đồ vector pBI101 chèn các đoạn promoter 4CL1.



Hình 4. Chọn dòng các đoạn promoter 4CL1 trong vector pBI101. M: Marker 1 kb, giêng 1: vector pBI101 mở vòng bằng *BamHI* và *HindIII*, giêng 2, 3: vector pBI101 chứa đoạn 1.1 kb và đoạn 0.8 kb không có 20 bp của exon1, giêng 4, 5: vector pBI101 chứa đoạn 1,1 kb và đoạn 0,8 kb có 20 bp của exon1.

Cả bốn loại đoạn promoter như trên được cắt bằng hai enzyme *HindIII* và *BamHI* rồi chèn vào vector pBI101 đã được cắt bằng enzyme tương ứng. Vector pBI101 là Ti plasmid đã có chứa đoạn gen chỉ thị *gus* - kích thước 1,85 kb - nhưng thiếu promoter và chứa nos-ter có kích thước 206 bp. Toàn bộ sơ đồ cấu trúc vector pBI101 và các đoạn promoter chèn được mô tả trong hình 3, được đặt tên tương ứng là pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8 và pBIHu9. Để khẳng định kết quả chọn dòng các đoạn promoter trong vector pBI101 thì các vector chứa đoạn chèn đã được cắt chính bằng hai enzyme giới hạn *HindIII* và *BamHI* (Hình 4). Kết quả cho thấy các dòng pBI101 được lựa chọn đã chứa đoạn promoter có kích thước như mong muốn. Các cấu trúc pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8 và pBIHu9 đều được biến nạp vào vi khuẩn

A. tumefaciens theo phương pháp xung điện để phục vụ cho thí nghiệm chuyển gen vào cây thuốc lá.

Chuyển gen vào cây thuốc lá và nhuộm hóa mô tế bào với X-gluc

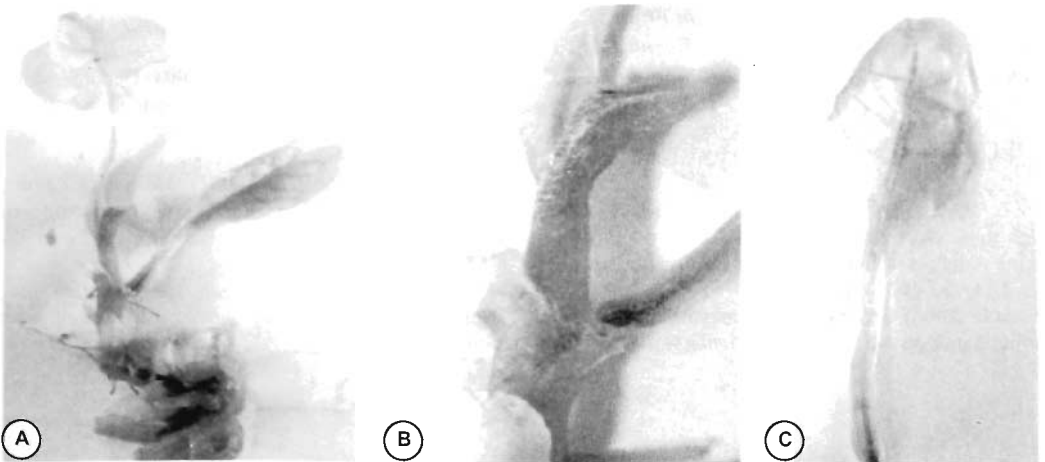
Bốn cấu trúc đã được chuyển vào cây thuốc lá theo phương pháp mảnh lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Lô thí nghiệm 1, 2, 3, 4 tương ứng với việc chuyển cấu trúc pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8, pBIHu9 vào cây thuốc lá. Đặc điểm của vector pBI101 là có chứa gen NPTII quy định tính kháng kanamycin do vậy sau khi đồng nuôi cây *A. tumefaciens* và các mảnh lá trên môi trường có kanamycin, nếu có sự chuyển gen vào thuốc lá thì các cây được tái sinh từ mảnh lá sẽ có tính kháng kanamycin. Kết quả ở bảng 1 cho thấy ở cả 4 lô thí nghiệm số lượng các cây chuyển gen được tái sinh và duy trì được trên môi trường có kanamycin khá nhiều chứng tỏ hiệu quả chuyển gen tốt.

Phần thân các cây thuốc lá chuyển gen đã được nhuộm với X-gluc, ở cả bốn lô thí nghiệm chuyển gen đều có cây dương tính khi nhuộm (Bảng 1). Như vậy, bốn loại đoạn promoter đều điều khiển sự biểu hiện của gen *gus* trong các cây chuyển gen ở phần thân cây. Khi nhuộm đồng thời cả phần thân, lá, rễ của cây thuốc lá chuyển gen với X-gluc thì chỉ có phần thân, cuống lá và gốc lá là xuất hiện màu xanh đặc trưng, các phần khác như thịt lá và rễ hoàn toàn không có sự biểu hiện của gen *gus* (Hình 5). Nghiên

cứu của Hauffe và đồng tác giả (1991) đã chứng minh rằng yếu tố AC rich box trên promoter 4CL1 của cây mùi tây có liên quan đến tính điều khiển đặc hiệu mô xylem. Do vậy, với đoạn promoter 4CL1 đã phân lập được vẫn còn nguyên vẹn yếu tố AC rich box nên khả năng điều khiển gen *gus* đặc hiệu ở phần thân và những phần mô già ở cuống lá là phù hợp với các nghiên cứu đã có.

Tuy nhiên, không thấy sự khác biệt rõ rệt về số lượng cây có kết quả dương tính khi nhuộm X-gluc ở lô thí nghiệm 2 và 4 (pBIHu7 và pBIHu9 chèn đoạn 0.8kb) so với lô thí nghiệm 1 và 3 (pBIHu6 và pBIHu8 chèn đoạn 1,1 kb). Như vậy có thể kết luận sơ bộ không có khác biệt rõ rệt trong việc điều khiển gen *gus* của đoạn 0,8 kb và đoạn 1,1 kb, đồng thời có thể khẳng định với đoạn promoter 4CL1 có kích thước 0,8 kb là đủ để điều khiển sự hoạt động của gen *gus*. Điều này cũng phù hợp với phần dự đoán ở trên về các box quan trọng của promoter 4CL1 đó là TATA, CCAAT, AC rich box đều nằm trong vùng kích thước khoảng -500 bp so với phía điểm khởi đầu phiên mã.

Tuy nhiên, ở lô thí nghiệm 3 và 4 (pBIHu8 và pBIHu9) có tỷ lệ số cây dương tính khi nhuộm X-gluc thấp hơn hẳn so với lô thí nghiệm 1 và 2 (pBIHu6 và pBIHu7). Với kết quả này, cần có các thí nghiệm sâu hơn để đưa ra được nhận định về tính ưu việt của đoạn promoter có chứa 20 bp của exon1 và đoạn không chứa 20 bp của exon1.



Hình 5. Nhuộm cây thuốc lá chuyển gen bằng X-gluc. A: Nhuộm cả cây; B: Nhuộm thân cây; C: Nhuộm cuống lá và lá.

Bảng 2. Số lượng cây thuốc lá chuyển gen trong các thí nghiệm.

STT	Số cây được tái sinh trên môi trường có kanamicin	Số cây nhuộm X gluc	Số cây dương tính khi nhuộm Xgluc
Lô 1 (pBI Hu6)	71	36	21
Lô 2 (pBI Hu7)	93	36	17
Lô 3 (pBI Hu8)	175	31	7
Lô 4 (pBI Hu9)	73	35	7

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập thành công và đọc trình tự đoạn promoter của gen 4CL1 ở cây Bạch đàn trắng. Đoạn promoter 4CL1 là hoàn toàn mới vì đến nay chưa có một công bố nào trong ngân hàng trình tự gen quốc tế về promoter này. Chúng tôi đã hoàn thành việc thiết kế 4 cấu trúc Ti-plasmid pBI101 chứa đoạn promoter 4CL1 và gen *gus*: pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8 và pBIHu9. Bằng cách sử dụng các cấu trúc này trong thí nghiệm chuyển gen vào cây thuốc lá và nhuộm hóa mô tế bào thuốc lá với X-gluc đã chứng minh được sự điều khiển biểu hiện gen *gus* của promoter 4CL1 từ cây Bạch đàn trắng là đặc hiệu thân.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí đề tài mã số CNSH.ĐT.03/06-10 thuộc Chương trình trọng điểm “Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020” của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Công trình được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Chúng tôi chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, đã tạo điều kiện và giúp đỡ trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen ZZ, Chen YC, Chou YH, Lin Y (2006) cDNA cloning molecular characterization of 4 coumarate: coenzyme A ligase in *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 21(1): 87-100.
 Haracava R (2005) Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. *Genet Mol Biol* 28(3):

601-607.

Hauffe KD, Paszkowski U, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K, Dangl JL, Douglas CJ (1991) A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3(5): 435-443.

Hu WJ, Kawaoka A, Tsai CJ, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang VL (1998) Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci USA* 95(9): 5407-5412.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6(13): 3901-3907.

Lee D, Douglas CJ (1996) Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins. *Plant Physiol* 112(1): 193-205.

Lu H, Zhao YL, Jiang XN (2004) Stable and specific expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase gene (4CL1) driven by the xylem-specific Pto4CL1 promoter in the transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 26(14): 1147-1152.

Rishi AS, Nelson ND, Goyal A (2004) Genome walking of large fragments: an improved method. *J Biotechnol* 111(1): 9-15.

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

Walden R (1988) *Plant genetic transformation and gene expression, A Laboratory manual.* Blackwell scientific publications

***EUCALYPTUS CAMADULENSIS* 4CL1 PROMOTER AND THE STEM - SPECIFIC EXPRESSION REGULATION OF *GUS* GENE**

Huynh Thi Thu Hue, Duong Thi Thu Ha, Le Thi Thu Hien, Nong Van Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Promoters are the essential element for the expression levels of genes. The on/off switching activities, spatial/ temporal specific expression in tissues/ cells or response to stress of environment of gene are controlled by promoters. In the field of plant transformation, promoters are used to direct high levels of expression in transgenic plants. The 4CL1 gene is one of highly homologous genes encoding 4- coumarate: coenzyme A ligase, a key enzyme of general phenylpropanoid metabolism. The tissue-specific expression of gene driven by 4CL1 promoter has been shown in trunk of tree, in particular in the secondary xylem or older stems. Here, the promoter of 4CL1 gene was isolated and sequenced from *Eucalyptus camadulensis* by using genome walking method. This is a novel promoter which has 1127 bp in length. Some of the essential sequence elements in this promoter were predicted: TATA box from -29 to -35 position, two CCAAT boxes from -263 to -267 and -285 to -289, AC rich box from -332 to -342 upstream of the transcription start site, respectively. Four different Ti-plasmid vectors: pBIHu6, pBIHu7, pBIHu8 and pBIHu9 harbouring *gus* gene under 4CL1 promoter were constructed with original pBI101 vector and were introduced into tobacco plant. Stable expression of *gus* gene in transgenic tobacco plants was analyzed by histochemical staining with X-gluc chemical method. The results showed that all four different 4CL1 promoter regions in these constructs were able to direct the expression of *gus* gene. In transgenic tobacco lines, *gus* gene was expressed mostly in stem, suggesting that 4CL1 promoter from *Eucalytus camadulensis* directs the stem-specific gene expression.

Keywords: 4-Coumarate: CoA ligase, *Eucalyptus camadulensis*, gen expression, *gus* gene, promoter

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562934; Fax: 84-4-38363144; E-mail: vhnong@ibt.ac.vn