

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *OsHSBP1* LIÊN QUAN TỚI ĐÁP ỨNG CHỐNG CHỊU HẠN VÀ NÓNG Ở LÚA (*Oryza sativa* L.)

Cao Lệ Quyên, Phùng Thị Thu Hương, Đàm Quang Hiếu, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương*

Viện Di truyền Nông nghiệp

*Tác giả liên hệ: phuongnd.bio@gmail.com

Ngày nhận bài: 20.03.2024

Ngày chấp nhận đăng: 28.11.2024

TÓM TẮT

Protein sốc nhiệt HSP (Heat Shock Protein) có vai trò quan trọng trong các phản ứng chống chịu stress liên quan tới nhiệt độ và oxy hóa, giúp bảo vệ tế bào và các đại phân tử khỏi các tác động bất lợi. Ở một số loài thực vật, quá trình điều hòa hoạt động của HSP có sự tham gia của protein HSBP (Heat Shock Factor Binding Protein). Để phục vụ nghiên cứu hoạt động chức năng và làm sáng tỏ cơ chế điều hòa đáp ứng stress của *OsHSBP1* ở lúa, chúng tôi đã phân tích mô hình biểu hiện trong điều kiện stress hạn và nóng và trình tự của gen này ở hai giống lúa chủ lực BC15 và OM54541. *OsHSBP1* tăng cường biểu hiện ở một số thời điểm của quá trình xử lý stress hạn và nóng nhân tạo. Trình tự mã hóa *OsHSBP1* của hai giống lúa này đã được phân lập và giải trình tự nucleotide hoàn chỉnh. Đoạn gen phân lập được dài 237bp, mã hóa cho một chuỗi polypeptide dài 78 gốc axit amin, có chứa một chuỗi xoắn α , giống 59,8-97,4% so với các protein HSBP tương đồng đã được nghiên cứu. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu vai trò chức năng của *OsHSBP1* và cải tiến khả năng chống chịu stress hạn và nóng của các chất lượng giống lúa phổ biến trong sản xuất như BC15 và OM5451 bằng công nghệ gen.

Từ khóa: Biểu hiện gen, *OsHSBP1*, stress hạn, stress nóng.

Investigating *OsHSBP1* Gene Expression in Relation to Drought and Heat Responses in Rice (*Oryza sativa* L.)

ABSTRACT

The production of rice is significantly affected by adverse environmental conditions such as drought and heat. Heat shock proteins (HSPs) play a crucial role in mitigating stress tolerance responses associated with temperature and oxidation, thereby safeguarding cells and macromolecules from detrimental effects. The regulatory mechanism of HSP activity in some plant species involves the involvement of Heat Shock Factor Binding Protein (HSBP). This study aimed to investigate the functional activities and elucidate the stress response regulation mechanism of *OsHSBP1* in rice. The expression pattern of this gene was analyzed under drought and heat stress conditions in two rice varieties, BC15 and OM54541. The *OsHSBP1* expression increased at various time points during artificial heat and drought stress. The coding sequences of *OsHSBP1* from these rice varieties were isolated and fully sequenced, revealing a gene segment of 237 base pairs in length. This segment encodes a polypeptide chain comprising 78 amino acids, including an α helix, exhibiting a similarity ranging from 59.8% to 97.4% homologous to HSBP proteins studied previously. These findings provide a foundation for exploring the functional role of *OsHSBP1* to improve the drought and heat stress resistance of the major rice varieties such as BC15 and OM5451 through genetic engineering.

Keywords: Gene expression, drought stress, heat stress, *OsHSBP1*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản xuất lúa gạo bị ảnh hưởng rất lớn bởi các yếu tố phi sinh học, trong đó bao gồm cả hạn hán và nóng. Khi gặp điều kiện môi trường bất

lợi (stress) như hạn hán và nóng, cây lúa có hàng loạt các đáp ứng sinh lý và hóa sinh, bao gồm những thay đổi trong quá trình quang hợp, hô hấp, thoát hơi nước, tính ổn định màng tế bào và điều hòa áp suất thẩm thấu... để tự bảo

vệ. Cơ chế phân tử của các đáp ứng stress phi sinh học ở thực vật rất phức tạp, được điều hòa ở nhiều cấp độ khác nhau, bao gồm cả quá trình phiên mã, sau phiên mã, dịch mã, sau dịch mã... Các quá trình này có sự tham gia của nhiều thành phần và con đường truyền tín hiệu khác nhau, cuối cùng hoạt hóa các protein chức năng có vai trò bảo vệ, sửa chữa... giúp tế bào vượt qua giai đoạn stress (Jewell & cs., 2010).

Protein sốc nhiệt HSP là một trong những yếu tố quan trọng tham gia vào đáp ứng chống chịu yếu tố môi trường bất lợi phi sinh học liên quan tới nhiệt độ của thực vật. Protein này được hoạt hóa khi tế bào bị kích thích nhiều loại stress khác nhau như oxy hóa, nóng, lạnh... (Firmansyah & Argosubekti, 2020). Các protein HSP hoạt động như những chaperon, bảo vệ protein và tế bào khỏi những tổn thương, giúp tế bào sống sót trong quá trình tiếp xúc với điều kiện stress phi sinh học và hỗ trợ phục hồi sau giai đoạn stress (Hu & cs., 2022; Mohamed & Al-Whaibi, 2011; Morimoto & Santoro, 1998).

Protein HSF (Heat stress factor) là yếu tố đóng vai trò trung tâm trong con đường điều hòa hoạt động của protein HSP. HSF là thành phần cuối cùng của chuỗi truyền tín hiệu stress liên quan tới nhiệt độ và oxy hóa và là trung gian cho sự biểu hiện các gen mã hóa protein đáp ứng stress, bao gồm cả HSP. Hoạt động của HSF được điều hòa âm tính bởi protein HSBP, là một protein có kích thước nhỏ (< 10kDa), mang 2 chuỗi bảo thủ (> 60%) chứa 7 motif lặp kị nước (Rana & cs., 2012). Ở *Arabidopsis*, sau giai đoạn stress, HSBP được tổng hợp và liên kết với HSF để tạo thành phức hệ phân giải chính cấu trúc homotrimer dạng hoạt tính của HSF (Rana & cs., 2012; Qu & cs., 2013). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy dường như HSBP đóng vai trò nhất định trong đáp ứng yếu tố stress liên quan tới nhiệt độ ở một số loài thực vật như ngô, *Arabidopsis*... (Rana & cs., 2012). Ở lúa, *HSBP* có hai bản sao, được đặt tên là *OsHSBP1* và *OsHSBP2*; biểu hiện liên tục ở tất cả các mô trong điều kiện không có stress (Rana & cs., 2012). Tuy nhiên, hoạt động chức năng của *OsHSBP* trong các đáp ứng yếu tố stress phi sinh học ở lúa vẫn chưa được nghiên cứu cụ thể.

BC15 và OM5451 là hai giống lúa chủ lực, được canh tác phổ biến ở lần lượt miền Bắc và miền Nam Việt Nam. Mặc dù có năng suất rất cao, việc canh tác hai giống lúa này chịu ảnh hưởng khá nhiều bởi các điều kiện môi trường bất lợi như hạn hán và nóng. Trong khi các phương pháp chọn giống lúa truyền thống có những những hạn chế nhất định, việc ứng dụng các công nghệ chọn giống tiên tiến như chỉnh sửa gen đã cho thấy tiềm năng rất lớn để cải tạo những tính trạng nông sinh học do nhiều gen quy định, bao gồm cả tính trạng chịu hạn và nóng (Razzaq & cs., 2019; Cardi & cs., 2023). Tuy nhiên, để có thể ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen vào cải tiến đặc tính các giống lúa, hiểu biết đầy đủ về đặc điểm cấu trúc và hoạt động chức năng của các gen mục tiêu là điều kiện không thể thiếu trong các chương trình chọn giống. Chính vì vậy, với mục đích xác định mối liên quan của *OsHSBP1* với các đáp ứng yếu tố stress hạn hán và nóng ở hai giống lúa BC15 và OM5451 và tạo cơ sở cho các nghiên cứu chức năng gen mục tiêu sau này, nghiên cứu này đã thực hiện phân tích mô hình biểu hiện trong điều kiện stress nhân tạo và phân tích trình tự vùng mã hóa của *OsHSBP1*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống lúa BC15 và OM5451 được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên thực vật. Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α được mua từ hãng Thermo Scientifics (Hoa Kỳ). Vector pJET1.2/blunt mạch thẳng được đóng gói cùng với bộ kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientifics, Hoa Kỳ). Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế dựa trên những trình tự đã công bố trên GenBank và đặt mua từ hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý mẫu thực vật

Thí nghiệm xử lý stress giả định đối với cây lúa non được thực hiện theo mô tả trước đây (Qin & cs., 2007). Hạt lúa được ủ trong nước ở 37°C trong 2 ngày; hạt nảy mầm được chuyển

sang trồng trong dung dịch MS ở điều kiện 28°C trong 2 tuần. Để xử lý stress hạn nhân tạo, rễ cây lúa non được nhúng vào dung dịch MS có chứa PEG 20% và giữ ở 28°C. Để xử lý stress nóng, cây lúa non được giữ trong điều kiện 42°C. Sau mỗi khoảng thời gian khảo sát (0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12 và 24 giờ), mẫu lúa (mẫu lá và rễ đối với thí nghiệm xử lý hạn; toàn bộ cây đối với thí nghiệm xử lý nóng) được thu và bảo quản trong N₂ lỏng tới khi tách chiết RNA. Thí nghiệm xử lý stress nhân tạo được thực hiện trong tủ vi khí hậu (RUMED) với điều kiện chiếu sáng hoàn toàn, độ ẩm 80%. Đối với thí nghiệm đối chứng, cây lúa được trồng trong tủ vi khí hậu (RUMED) trong dung dịch MS ở điều kiện chiếu sáng hoàn toàn, độ ẩm 80%, nhiệt độ 28°C.

2.2.2. Đánh giá biểu hiện *OsHSBP1*

RNA tổng số được tách chiết lần lượt từ mô rễ và thân (100mg) bằng trizol theo quy trình hướng dẫn của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) và sử dụng cho thí nghiệm qPCR. Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện bằng bộ kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình hướng dẫn của hãng, sử dụng mỗi oligo dT. Hỗn hợp phản ứng (20µl) bao gồm: 1,0µg mẫu RNA tinh sạch; 1,0µl dNTP 100mM; 1,0µl oligo dT 0,5 µg/µl; 4,0µl đệm 5X và 1µl Reverse Transcriptase 5 U/µl; H₂O. Ống phản ứng được ủ ở 42°C trong 60 phút để phản ứng tổng hợp cDNA xảy ra.

Thí nghiệm qPCR thực hiện với cặp mỗi qPCR-HSBP1-F/qPCR-HSBP1-R. Thành phần của phản ứng bao gồm: 5,0µl hỗn hợp PCR

SYBR Green Master Mix 2X; 0,25µl mỗi loại mỗi (10 pmol); 1,0µl cDNA khuôn; 0,15µl chất nội chuẩn tín hiệu huỳnh quang ROX; 3,35µl H₂O. Phản ứng này được thực hiện với chu trình nhiệt: (94°C - 30 giây, 60°C - 20 giây, 72°C - 30 giây) × 35 chu kỳ bằng hệ thống máy Real-Time PCR System 7500 của hãng Life Technologies. *OsActin* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mức độ biểu hiện tương quan giữa gen đích trong các mẫu lúa xử lý stress với mẫu lúa không xử lý stress được tính toán theo công thức $\Delta\Delta Ct$ của Jain & cs. (2006). Mỗi thí nghiệm xử lý stress sử dụng 3 cây lúa/điều kiện stress/thời điểm; thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích bằng thống kê bằng kiểm định t-test ($\alpha = 0,05$).

2.2.3. Phân lập và giải trình tự *OsHSBP1*

Khung đọc mở của *OsHSBP1* của lúa BC15 và TBR225 được phân lập từ mẫu cDNA xử lý stress nóng (24h) bằng kỹ thuật PCR bằng cặp mỗi HSBP1-F/HSBP1-R. Hỗn hợp PCR bao gồm: 0,5µl DNA khuôn mẫu, 0,6µl mỗi mỗi 10 pmol/ml; 1,5µl dNTP 2mM và 1,5µl đệm *Taq* DNA polymerase 10X; 0,5µl *Taq* DNA polymerase, 9,8µl nước cất khử ion. PCR được thực hiện 35 chu kỳ: 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây.

Sản phẩm PCR nhân bản *OsHSBP1* được nhân dòng bằng bộ kit *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Vector tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α ; thể biến nạp được sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mỗi pJET-F/pJET-R.

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide dùng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự	Gen/Vector đích (Mã số)	Mục đích thí nghiệm	Kích thước (bp)
qPCR-HSBP1-F	ACAAAACCTCCTAACCCAGA	<i>OsHSBP1</i> (XP_025876053.1)	Đánh giá biểu hiện gen	143
qPCR-HSBP1-R	GCACATCAGTACCCATCTCA			
Actin-F	TGATGGTGTGAGCCCACT	<i>OsActin</i> (KX302608.1)	Đánh giá biểu hiện gen	249
Actin-R	TGGTCTTGGCAGTCTCCATT			
HSBP1-F	ATGGACTCAGAGCCCTCATC	<i>OsHSBP1</i> (XP_025876053.1)	Phân lập gen	237
HSBP1-R	TTATGTGGAGTCGGCAGGCT			
pJET-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	<i>pJET1.2</i> (EF694056.1)	Giải trình tự gen	101
pJET-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG			

Plasmid được tách chiết từ khuẩn lạc dương tính và kiểm tra bằng PCR với cặp môi pJET-F/pJET-R và HSBP1-F/HSBP1-R và enzyme giới hạn *BgIII*. Đoạn gen nhân dòng được giải trình tự bởi công ty VNDAT (Việt Nam), sử dụng lần lượt 2 môi pJET-F và pJET-R. Trình tự nucleotide của gen phân lập được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0 và so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank bằng công cụ BLAST. Cấu trúc protein được phân tích bằng công cụ SWISS-MODEL (Waterhouse & cs., 2018).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biểu hiện của *OsHSBP1* trong điều kiện stress hạn

Kết quả phân tích hàm lượng mRNA *OsHSBP1* trong các mẫu lúa BC15 (gọi tắt là *OsHSBP1-BC15*) bằng qPCR (Hình 1A) cho thấy gen đích tăng biểu hiện rất sớm trong mô rễ, đạt đỉnh (tăng 5 lần) sau 30 phút xử lý stress. Số lượng bản sao mRNA của *OsHSBP1-BC15* trong mô lá thay đổi chậm hơn, đạt đỉnh (tăng 4,8 lần) sau 3 giờ. Tương tự, mức độ biểu hiện gen *OsHSBP1* trong các mẫu lúa OM5451 (gọi tắt là *OsHSBP1-OM5451*) cũng thay đổi ở cả mô lá và mô rễ khi cây tiếp xúc với điều kiện stress hạn giả định (Hình 1B). Sự biểu hiện của *OsHSBP1-OM5451* tăng rất sớm trong mô rễ (sau 30 phút xử lý stress) và đạt đỉnh sau 1 giờ (tăng 5,6 lần). Sự tăng tích lũy mRNA *OsHSBP1-OM5451* trong mô rễ được duy trì khá ổn định đến 24 giờ sau xử lý stress hạn (tăng ~3 lần). Ngược lại, sự thay đổi mức độ phiên mã của *OsHSBP1-OM5451* trong mô lá chỉ quan sát được ở thời điểm 3 giờ (tăng 3,6). Các kết quả này cho thấy *OsHSBP1* dường như có liên quan tới các phản ứng đáp ứng chống chịu stress hạn trên hai giống lúa BC15 và OM5451.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã xác định *HSBP* có thể được biểu hiện ở hầu hết các mô/cơ quan khác nhau của thực vật (Hsu & cs., 2010; Rana & cs., 2012; Muthusamy & cs., 2023). Cho đến nay, hầu như chưa có tác giả nào công bố về mô hình biểu hiện *HSBP* trong điều kiện stress hạn. Tuy nhiên, nghiên cứu ở *Brassica rapa* đã chứng minh *BrHSBP* thay đổi biểu hiện khi cây được xử lý với các gốc oxy hoạt tính như H_2O_2 hay

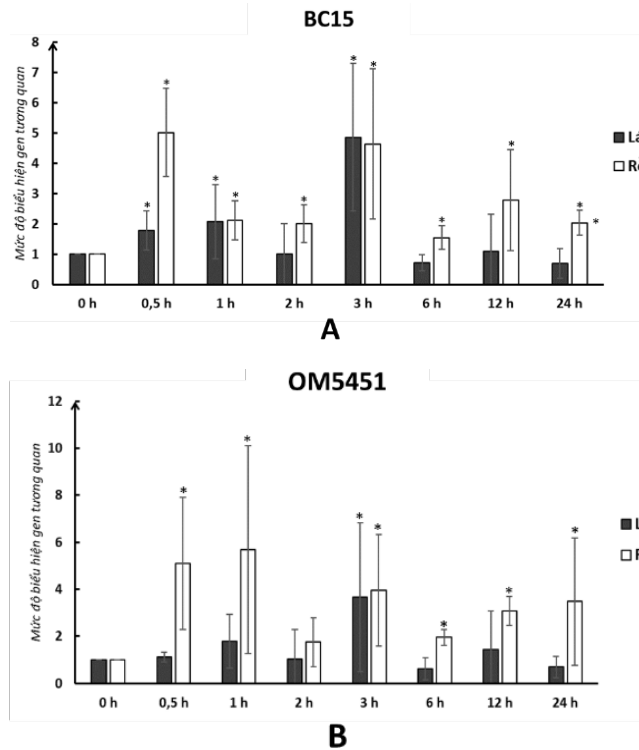
axit abscisic, axit jasmonic và axit salicylic (Muthusamy & cs., 2023). Hơn nữa, một số nghiên cứu cũng đã cho thấy *HSBP* có tham gia vào điều hòa quá trình sinh tổng hợp raffinose (Gu & cs., 2019; Muthusamy & cs., 2023). Đây là những hợp chất được tích lũy nhiều trong các đáp ứng chống chịu stress phi sinh học, bao gồm cả hạn hán, ở thực vật (Li & cs., 2020). Kết quả phân tích biểu hiện của *OsHSBP1* trong nghiên cứu này đã cho thấy gen này có thể liên quan tới đáp ứng chống chịu hạn ở cả hai giống lúa BC15 và OM5451.

3.2. Biểu hiện của *OsHSBP1* trong điều kiện stress nóng

Trong thí nghiệm xử lý stress nóng (42°C) (Hình 2A), hàm lượng mRNA *OsHSBP1-BC15* tăng ngay sau khi cây tiếp xúc với stress và đạt đỉnh ở thời điểm 0,5 giờ (tăng ~4 lần). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của gen đích sau đó giảm về gần mức cân bằng và chỉ tăng trở lại ở thời điểm 2 giờ sau xử lý (~3 lần). Tại thời điểm 24 giờ sau khi tiếp xúc với stress nóng, *OsHSBP1-BC15* có dấu hiệu tăng biểu hiện trở lại.

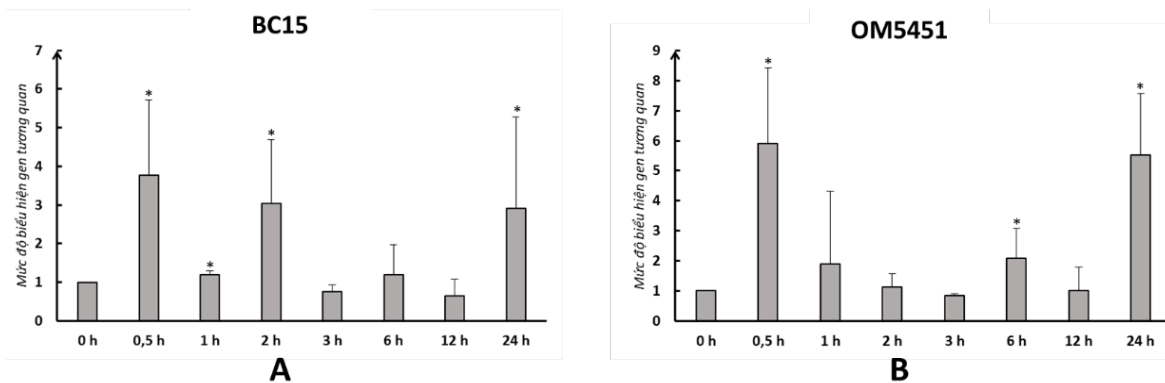
Ở giống lúa OM5451, gen đích cũng tăng cường biểu hiện và đạt đỉnh ngay sau khi cây tiếp xúc với stress ở thời điểm 0,5 giờ (tăng ~6 lần). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của gen đích sau đó giảm dần và duy trì (tăng từ 1-2 lần) đến sau thời điểm 12 giờ. Tại thời điểm 24 giờ sau khi tiếp xúc với stress nóng, mức độ tích lũy hàm lượng mRNA *OsHSBP1-OM5451* cũng tăng trở lại (~5,5 lần), tương tự như đã quan sát được ở giống lúa BC15.

Sự tăng cường biểu hiện của *OsHSBP1* ở 2 giống lúa BC15 và OM5451 trong nghiên cứu này đã cho thấy mối liên hệ giữa *OsHSBP1* với quá trình đáp ứng stress nóng ở lúa. Ở *Arabidopsis*, *AtHSBP* được tăng cường biểu hiện ở giai đoạn phục hồi sau giai đoạn stress sốc nhiệt (Hsu & cs., 2010). Tương tự, *ZmHSBP* ở ngô cũng cảm ứng biểu hiện với yếu tố stress nóng (Gu & cs., 2019). Ngược lại, *BrHSBP* lại giảm mức độ biểu hiện trong điều kiện nóng; trong khi tăng biểu hiện khi cây được xử lý với điều kiện nhiệt độ thấp (Muthusamy & cs., 2023). Sự khác biệt này cho thấy vai trò đa dạng của *HSBP* trong điều hòa đáp ứng chống chịu stress nóng ở thực vật.



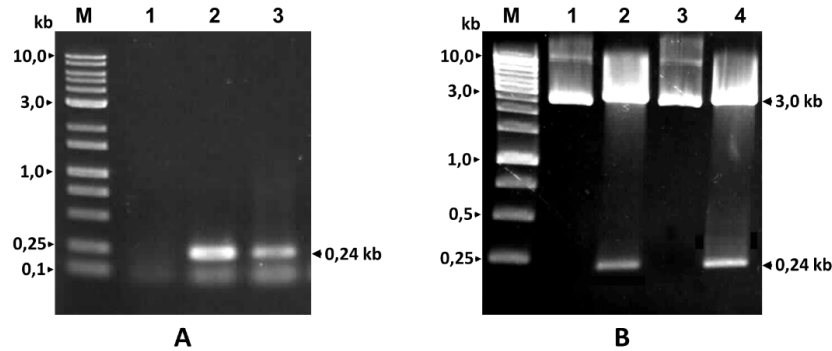
Ghi chú: Đồ thị so sánh tương quan mức độ biểu hiện *OsHSBP1* của giống lúa BC15 (A) và OM5451 (B) được xử lý stress hạn nhân tạo (PEG 20%) trong thời gian 0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 6h; 12h và 24h. *OsActin* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Mức độ biểu hiện gen của mẫu lúa không xử lý stress (0 h) có giá trị bằng 1,0. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả RT-qPCR trung bình của 3 lần thí nghiệm. Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn của các thí nghiệm. Dấu sao (*) thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu xử lý stress (0,5h; 1h; 2h; 3h; 6h; 12h và 24h) so với mẫu đối chứng (0 h) (*t*-test, $\alpha = 0,05$).

Hình 1. Mức độ biểu hiện của *OsHSBP1* trong điều kiện hạn



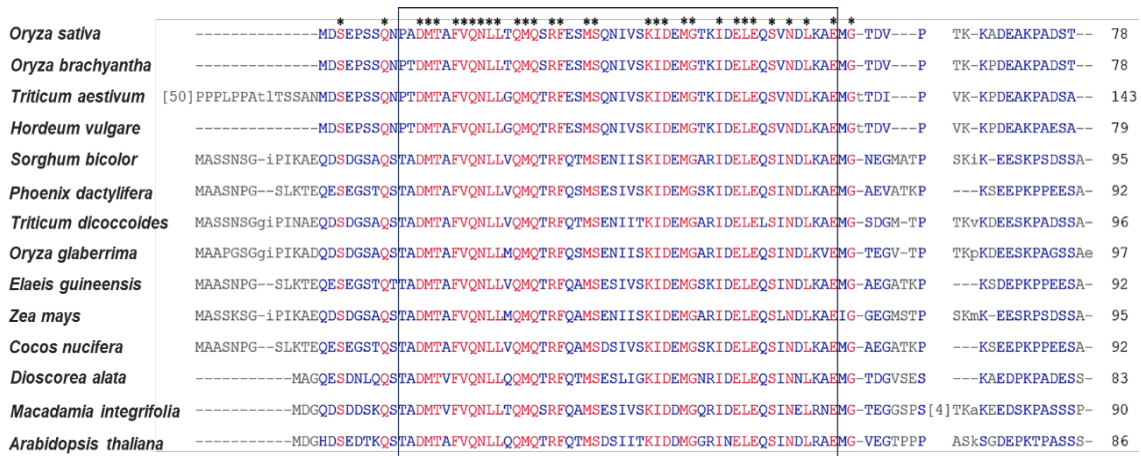
Ghi chú: Đồ thị so sánh tương quan mức độ biểu hiện *OsHSBP1* của giống lúa BC15 (A) và OM5451 (B) được xử lý stress nóng nhân tạo (42°C) trong thời gian 0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 6h; 12h và 24h. *OsActin* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Mức độ biểu hiện gen của mẫu lúa không xử lý stress (0 h) có giá trị bằng 1,0. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả RT-qPCR trung bình của 3 lần thí nghiệm. Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn của các thí nghiệm. Dấu sao (*) thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu xử lý stress (0,5h; 1h; 2h; 3h; 6h; 12h và 24h) so với mẫu đối chứng (0 h) (*t*-test, $\alpha = 0,05$).

Hình 2. Mức độ biểu hiện của *OsHSBP1* trong điều kiện nóng



Ghi chú: (A) Phân lập *OsHSBP1* bằng PCR; giếng M: thang chuẩn DNA 1,0kb (Clever Scientific); giếng 1: mẫu trống (không có DNA khuôn); giếng 2 và 3: khuôn là cDNA của mẫu lúa BC15 và OM5452 xử lý nóng. (B) Kiểm tra sản phẩm vector nhân dòng *OsHSBP1* bằng enzyme cắt giới hạn *Bgl*III; giếng M: thang chuẩn DNA 1,0kb (Thermo Scientific); giếng 1 và 3: vector pJET1.2/*OsHSBP1*-BC15 và pJET1.2/*OsHSBP1*-OM5451 nguyên bản; giếng 2 và 4: sản phẩm cắt giới hạn pJET1.2/*OsHSBP1*-BC15 và pJET1.2/*OsHSBP1*-OM5451.

Hình 3. Phân lập và nhân dòng đoạn gen *OsHSBP1*



Ghi chú: Trình tự axit amin suy biến của *OsHSBP1* đã phân lập (*O. sativa*) được so sánh trình tự protein *HSBP* của lúa dại *O. brachyantha* (XP_015696858.1), lúa mì *T. aestivum* (XP_044381204.1), đại mạch *H. vulgare* (XP_044946504.1), cao lương *S. bicolor* (XP_002436852.1), chà là *P. dactylifera* (XP_008782055.1), lúa mì *T. dicoccoides* (XP_037466802.1), lúa châu Phi *O. glaberrima* (XP_052158029.1), cọ dầu *E. guineensis* (XP_010913595.1), ngô *Z. mays* (NP_001150088.1), dứa *C. nucifera* (KAG1326961.1), khoai mỡ *D. alata* (KAH7678721.1), mắc ca *M. integrifolia* (XP_042518414.1) và *A. thaliana* (NP_849392.4). Dấu sao (*) thể hiện vị trí gốc axit amin bảo thủ. Vị trí trình tự tạo cấu trúc xoắn α được đóng khung.

Hình 4. So sánh trình tự axit amin của *HSBP1*

3.3. Kết quả phân lập *OsHSBP1* của lúa BC15 và OM5451

Để phục vụ các nghiên cứu chức năng *OsHSBP1*, trong nghiên cứu này, vùng trình tự mã hóa của *OsHSBP1* đã được phân lập từ mẫu RNA tổng số xử lý stress nóng của 2 giống lúa.

Kết quả PCR đã thu một băng DNA duy nhất có kích thước tương ứng khoảng 0,24kb (Hình 3), tương tự với kích thước tính toán lý thuyết đoạn gen *OsHSBP1* được nhân bản (237bp).

Đoạn gen *OsHSBP1* của BC15 và OM5451 (gọi tắt là *OsHSBP1*-BC15 và *OsHSBP1*-OM5451) được nhân dòng vào vector pJET1.2.

Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *Bg*III (Hình 3B) và giải trình tự nucleotide. Kết quả phân tích trình tự nucleotide cho thấy đoạn DNA phân lập được dài 237bp, giống 100% so với trình tự tương đồng đã công bố trên GenBank (mã số XP_025876053.1), chứng tỏ đoạn gen *OsHSBP1* đã được phân lập thành công. Đoạn gen *OsHSBP1* mã hóa cho một protein dài 78aa, có khối lượng phân tử 8,58kDa, pI 3,97, có một cấu trúc xoắn α ở vị trí 10-53. Trình tự axit amin suy biến của gen phân lập được giống 59,8-97,4% so với một số protein HSBP tương đồng đã được nghiên cứu (Hình 4); trong đó vùng cấu trúc xoắn α giống 66,7-98,2%. Điều này cho thấy *OsHSBP1* có thể cũng có chức năng điều hòa âm tính hoạt tính phiên mã của HSF ở lúa như ở các loài thực vật khác (Rana & cs., 2012; Satyal & cs., 1998; Fu & cs., 2002; Hsu & cs., 2010).

4. KẾT LUẬN

Mô hình biểu hiện của *OsHSBP1* ở 2 giống lúa BC15 và OM5451 trong điều kiện cây lúa tiếp xúc với yếu tố stress hạn hán và nóng (42°C) có sự tương đồng. Sự tăng biểu hiện của *OsHSBP1* cho thấy gen này có vai trò nhất định trong các đáp ứng stress hạn và nóng ở lúa. Đoạn gen chứa trình tự mã hóa dài 237bp của *OsHSBP1* được phân lập và nhân dòng thành công từ 2 giống lúa mục tiêu. Trình tự axit amin suy biến của *OsHSBP1-BC15* và *OsHSBP1-OM5451* giống nhau và giống 100% với trình tự tương đồng của lúa đã công bố trên GenBank (XP_025876053.1), được dự đoán có cấu trúc bậc II tương tự các protein HSBP điều hòa đáp ứng stress của nhiều loài thực vật khác. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho các nghiên cứu chức năng gen *OsHSBP1*, hướng tới cải tiến đặc tính chống chịu yếu tố stress hạn và nóng cho các giống lúa chủ lực bằng công nghệ gen sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được cung cấp kinh phí bởi Bộ Khoa học và Công nghệ, thuộc đề tài “Nghiên cứu ứng dụng phương pháp gây đột biến chính

xác nhằm nâng cao tính chịu hạn/nóng trên giống lúa Việt Nam bằng công nghệ CRISPR/Cas9” (ĐTĐL.CN-52/22). Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn!

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cardi T., Murovec J., Bakhsh A., Boniecka J., Bruegmann T., Bull S.E., Eeckhaut T., Fladung M., Galovic V., Linkiewicz A., Lukan T., Mafra I., Michalski K., Kavas M., Nicolai A., Nowakowska J., Sági L., Sarmiento C., Yýldýrym K., Zlatković M., Hensel G., Van Laere K. (2023). CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation. *Trends Plant Science*. 28(10): 1144-1165.
- Firmansyah & Argosubekti N. (2020). A review of heat stress signaling in plants”. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 484(1): 012041.
- Fu S., Meeley R. & Scanlon M.J. (2002). *Empty pericarp2* encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *The Plant Cell*. 14: 3119-3132.
- Gu L., Jiang T., Zhang C., Li X., Wang C., Zhang Y., Li T., Dirk L.M.A., Downie A.B., Zhao T. (2019). Maize *HSFA2* and *HSBP2* antagonistically modulate raffinose biosynthesis and heat tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*. 100(1): 128-142.
- Hsu S.F., Lai H.C. & Jinn T.L. (2010). Cytosol-localized heat shock factor binding protein, AtHSBP, functions as a negative regulator of heat shock response by translocation to the nucleus and is required for seed development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 153: 773-784.
- Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*. 3(3): e161.
- Jain M., Nijhawan A., Tyagi A.K. & Khurana J.P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research and Communications*. 345(2): 646-651.
- Jewell M.C., Campbell B.C & Godwin I.D. (2010). Transgenic plants for abiotic stress resistance. *Transgenic Crop Plants*, Springer, Berlin. 67-132.
- Li T., Zhang Y., Liu Y., Li X., Hao G., Han Q., Dirk L.M.A., Downie A.B., Ruan Y.L., Wang J., Wang G. & Zhao T. (2020). Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and *Arabidopsis*

- plants. *Journal of Biological Chemistry*. 295(23): 8064-8077.
- Mohamed H. & Al-Whaibi (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*. 23(2): 139-150.
- Morimoto R.I. & Santoro M.G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology*. 16(9): 833-8.
- Muthusamy M., Son S., Park S.R. & Lee S.I. (2023). Heat shock factor binding protein BrHSBP1 regulates seed and pod development in *Brassica rapa*. *Frontier in Plant Science*. 14:1232736. doi: 10.3389/fpls.2023.1232736
- Qin Q.L., Liu J.G., Zhang Z., Peng R.H., Xiong A.S., Yao Q.H. & Chen J.M. (2007). Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor RDREB1 in *Oryza sativa* L.", *Mol. Breed*. 19(4): 329-340.
- Qu A.L., Ding Y.F., Jiang Q. & Zhu C. (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem. Biophys. Research Communication*. 432(2): 203-207.
- Rana R.M., Dong S., Tang H., Ahmad F. & Zhang H. (2012). Functional analysis of *OsHSBP1* and *OsHSBP2* revealed their involvement in the heat shock response in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*. 63(16): 6003-6016.
- Razzaq A., Saleem F., Kanwa, M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H.M., Hameed M.K., Khan M.S. & Joyia F.A. (2019). Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the crispr/cas9 toolbox. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(16): 4045.
- Satyal S.H., Chen D., Fox S.G., Kramer J.M. & Morimoto R.I. (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes and Development*. 12: 1962–1974.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R. & Schwede T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 46(W1): W296-W303.