

BIỂU HIỆN TẠM THỜI GEN MÃ HÓA GA20 OXIDASE CỦA CÂY KEO TAI TƯỢNG (*ACACIA MANGIUM*) TRÊN LÁ CÂY THUỐC LÀ *NICOTIANA TABACUM* L.

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

Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

GA20 oxidase là enzyme quan trọng tham gia vào con đường tổng hợp nên các Gibberellin (GA) có hoạt tính hormone thực vật. Mỗi gen mã hóa cho GA20 oxidase được biểu hiện đặc hiệu ở những cơ quan và giai đoạn phát triển nhất định của cây. Trên thế giới, gen GA20 oxidase đã được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu chuyển gen thực vật. Trong công bố trước, chúng tôi đã phân lập và xác định được trình tự đoạn GA20 promoter và gen mã hóa GA20 oxidase từ cây Keo tai tượng (*A. mangium*) ở Việt Nam, gen GA20 oxidase cũng đã được phân lập từ cây *Arabidopsis* để phục vụ nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra kết quả thiết kế hai vector biểu hiện thực vật chứa gen GA20 oxidase và kết quả biểu hiện tạm thời gen GA20 oxidase trên lá cây thuốc lá *N. tabacum*. Cấu trúc thứ nhất, pCB301-35Sp-GA20, mang 35S promoter và gen GA20 oxidase chứa trình tự peptide tín hiệu hướng protein vào lưới nội chất. Cấu trúc thứ hai, pCB301-GA20p-GA20, chứa toàn bộ đoạn GA20 promoter và gen GA20 oxidase. Gen GA20 oxidase trong hai cấu trúc đã được biểu hiện ở mức phiên mã và dịch mã trên lá cây thuốc lá *N. tabacum*. Nhờ có gắn đoạn nucleotide mã hóa chuỗi peptide c-myc với đoạn gen GA20 oxidase nên dễ dàng kiểm tra sự biểu hiện protein trong hai cấu trúc bằng lai Western Blot. Việc biểu hiện protein trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời trên lá cây thuốc lá *N. tabacum* cho thấy các vector đã thiết kế hoạt động tốt trên cây mô hình và đáp ứng yêu cầu cho việc chuyển gen ổn định.

Từ khóa: Biểu hiện tạm thời, Keo tai tượng, GA20 promoter, GA20 oxidase, thiết kế vector

MỞ ĐẦU

Ở thực vật, GA20 oxidase là enzyme quan trọng trong con đường tổng hợp Gibberellin (GA), các chất có hoạt tính hormone. GA20 oxidase còn là enzyme đa chức năng tham gia xúc tác cho một vài phản ứng chuyển hóa cần thiết khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy, thực vật có một số gen mã hóa cho GA20 oxidase, được điều hòa biểu hiện từng phần hoặc đồng thời trong quá trình phát triển (Hedden, Kamyia, 1997).

Ở cây *Arabidopsis* và lúa, GA20 oxidase là những enzyme hòa tan trong tế bào chất và được mã hóa bởi họ gen, bao gồm các gen như *OsGA20ox1*, *OsGA20ox2*, *OsGA20ox3*, *OsGA20ox4*, riêng *Arabidopsis* còn có *OsGA20ox5*. Mỗi gen này được biểu hiện đặc hiệu ở những cơ quan và giai đoạn phát triển cụ thể của cây, trong đó *OsGA20ox1* của lúa được biểu hiện ở tất cả các cơ quan phát triển sinh dưỡng (Sakamoto *et al.*, 2004; Yamaguchi, 2006).

Trên thế giới, gen mã hóa GA20 oxidase được phân lập từ các loài khác nhau đã được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu chuyển gen thực vật đều

làm tăng sự sinh trưởng phát triển của cây chuyển gen (Biemelt *et al.*, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2010). Cây cam chuyển gen *CcGA20ox1* có kiểu hình cao hơn bình thường và chuyển antisense của gen *CcGA20ox1* thì thấp hơn bình thường (Fagoaga *et al.*, 2007). Như vậy, có sự biến đổi rõ rệt về khả năng tăng trưởng về chiều cao cây khi có các biến đổi di truyền liên quan đến gen mã hóa GA20 oxidase. Ở nước ta, trong một nghiên cứu của Đỗ Xuân Đồng và các đồng tác giả, gen GA20 oxidase phân lập từ cây *Arabidopsis* đã được chuyển vào cây Xoan ta và kết quả cây chuyển gen có sự phát triển chiều cao gấp 2,5 lần so với cây không chuyển gen (Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2011).

Trong một công bố trước, với mục đích tìm kiếm nguồn nguyên liệu cho thiết kế các vector biểu hiện thực vật phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen nhằm tăng cường sinh trưởng cho cây làm nông nghiệp, chúng tôi đã phân lập và xác định được trình tự đoạn GA20 promoter và gen GA20 oxidase từ cây Keo tai tượng (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2009). Trong công bố này, chúng tôi thiết kế hai vector biểu hiện thực vật chứa GA20 promoter và gen GA20 oxidase dựa trên vector gốc pCB301 và biểu hiện tạm thời gen GA20 oxidase trên lá cây thuốc lá *N. tabacum*

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vector pRTRA7/3 có chứa kết cấu bao gồm 35S promoter, peptide tín hiệu, và đuôi myc-KDEL; vector pCB301-Kan (Floss *et al.*, 2008) (dựa trên vector pCB301 của Xiang *et al.*, 1999) là vector biểu hiện thực vật chứa chi thị chọn lọc vi khuẩn và thực vật là kanamycin. Hai vector trên được cung cấp bởi PGS. TS Udo Conrad, Viện Di truyền thực vật và Nghiên cứu cây trồng, Gatersleben, CHLB Đức. Các chủng vi khuẩn được sử dụng bao gồm *E. coli* DH5 α và *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pGV2260). Cây mô hình lá thuốc là *Nicotiana tabacum*. Các cặp mồi




Bảng 1. Trình tự mồi

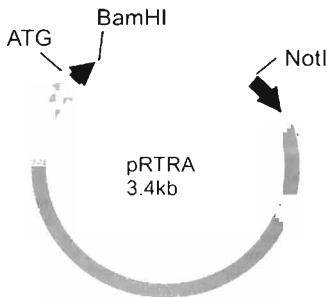
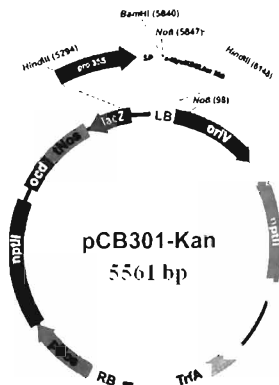
2 4 K F HindIII	5' TTC TTG AAG CTT GAG AAT TCT GTA TCA 3'
1 3 K F BamHI	5' AAA GCA GGATCC GTT GTT GAG TGC ATA AC 3'
K R NotI	5' AGA TTT GCGGCCGC GGA CTT GTT TCG TTG 3'
C-myc KDEL	5' TAT CGA CGG ATC GGG CTA GAG TTC G 3'

nhân đoạn DNA 1.3 kb và 2.4 kb chứa gen GA20 oxidase được chúng tôi thiết kế như sau:

Phương pháp

Các kỹ thuật sinh học phân tử để tạo DNA tái tổ hợp như: Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid; xử lý DNA plasmid bằng enzyme hạn chế; gắn nối các đoạn DNA vào vector; điện di trên gel agarose; biến nạp vector vào tế bào *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt; biến nạp vector vào tế bào *A. tumefaciens* theo phương pháp xung điện được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001). Phương pháp biểu hiện tạm thời gen trên lá cây thuốc là *N. tabacum* được tiến hành theo Horsch và đồng tác giả (1985).

-  35S promoter
-  Signal peptide
-  MycKDEL terminator

Sơ đồ pRTRA7/3 đã mở vòng với *Bam*HI và *Not*I

Sơ đồ pCB301-Kan

KẾT QUẢ

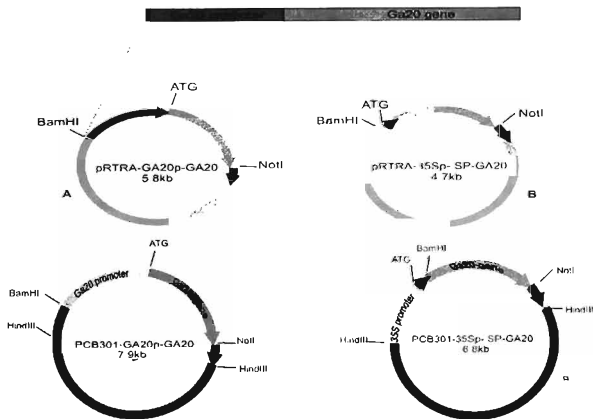
Tạo các vector biểu hiện thực vật pCB301-Kan mang gen GA20 oxidase dưới sự điều khiển của 35S promoter và GA20 promoter

Như mô tả ở sơ đồ hình 1, cấu trúc pRTRA-35Sp-SP-GA20 được thiết kế chứa đoạn gen GA20 oxidase dài 1.3 kb, đoạn gen này nằm trong kết cấu biểu hiện có kích thước 2.1 kb được điều khiển bởi 35S promoter và có peptide tín hiệu hướng protein vào lưới nội chất. Cấu trúc pRTRA-GA20p-GA20 được thiết kế chứa đoạn DNA dài 2.4 kb gồm cả promoter và vùng mang mã của gen GA20 oxidase, đoạn gen GA20 oxidase nằm trong kết cấu biểu hiện có kích thước 3.2 kb được điều khiển bởi chính GA20 promoter. Trong cả hai cấu trúc này, đoạn gen GA20 oxidase được nối với một đoạn nucleotide mã hóa cho peptide c-myc KDEL giúp dễ dàng phát hiện protein lại thông qua phản ứng lai Western Blot

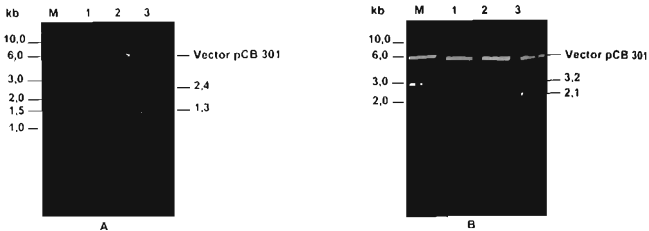
Sau đó, hai kết cấu biểu hiện chứa gen GA20 oxidase được gắn với 35S promoter và GA20 promoter trong vector pRTRA/7/3 tái tổ hợp được cắt

ra bằng *Hind*III và lai với Ti-plasmid pCB301 cũng được mở vòng bằng *Hind*III nhằm tạo nên các Ti-plasmid pCB301-Kan tái tổ hợp (theo sơ đồ hình 1). Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và tách plasmid để chọn lọc plasmid tái tổ hợp.

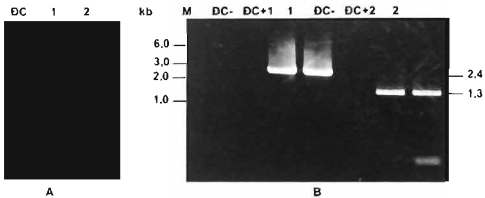
Các Ti-plasmid pCB301-Kan tái tổ hợp được chọn lọc dựa trên kết quả xử lý với enzyme. Trước tiên, các Ti-plasmid được cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Not*I (hình 2A) từ cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20 đã xuất hiện bằng DNA 1.3 kb (giếng 3) là đoạn gen GA20 oxidase đã được chèn vào vector và cấu trúc pCB301-GA20p-GA20 đã xuất hiện bằng DNA 2.4 kb (giếng 2) là đoạn promoter và vùng mang mã của gen GA20 oxidase đã được chèn vào vector. Hình 2B đã thể hiện kết quả cắt với enzyme *Hind*III, sản phẩm cắt từ cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20 đã xuất hiện bằng DNA kích thước khoảng 2.1 kb (giếng 3) và từ cấu trúc pCB301-GA20p-GA20 xuất hiện bằng DNA kích thước khoảng 3.2 kb (giếng 2). Các kết quả này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Do vậy, có thể khẳng định sự có mặt của các kết cấu biểu hiện trong pCB301-Kan.



Hình 1 Sơ đồ thiết kế các vector mang gen GA20 oxidase



Hình 2 Kiểm tra kết cấu biểu hiện trong pCB301-Kan. A Xử lý với *Bam*HI và *Nco*II. M. Marker 1 kb, 1 Vector pCB301-Kan mở vòng, 2 pCB301-GA20p-GA20, 3 pCB301-35Sp-SP-GA20. B Xử lý với *Hind*III. M. Marker 1kb, 1 Vector pCB301-Kan mở vòng, 2 pCB301-GA20p-GA20, 3 pCB301-35Sp-SP-GA20



Hình 3 Kiểm tra sự có mặt pCB301 tái tổ hợp trong tế bào *A. tumefaciens*. A Tách T1-plasmid từ tế bào *A. tumefaciens* DC pCB301 gốc, 1 pCB301-GA20p-GA20, 2 pCB301-35Sp-SP-GA20. B Sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen GA20 oxidase trong *A. tumefaciens*: M Marker 1kb, DC- từ pCB301 gốc, DC+1 từ plasmid pCB301-GA20p-GA20 trong *E. coli*, 1 từ plasmid pCB301-GA20p-GA20 trong *A. tumefaciens*; DC+2 từ plasmid pCB301-35Sp-SP-GA20 trong *E. coli*; 2 từ plasmid pCB301-35Sp-SP-GA20 trong *A. tumefaciens*.

Hai cấu trúc này được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) theo phương pháp ximig điện. Nếu những dòng *A. tumefaciens* mang pCB301-35Sp-SP-GA20 hoặc pCB301-GA20p-GA20 sẽ có khả năng mọc trên môi trường có chứa kháng sinh kanamycin vì vector pCB301-Kan có chứa chỉ thị vì khuẩn là kanamycin. Sau đó, để kiểm tra sự có mặt của các cấu trúc trong tế bào *A. tumefaciens*, các T1-plasmid tách từ tế bào *A. tumefaciens* được sử dụng làm khuôn trong PCR với các cặp mồi đã dùng để nhân các đoạn DNA 1,3 kb và 2,4 kb chứa gen GA20 oxidase. Kết quả PCR đều cho sản phẩm là băng DNA có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết (Hình 3B).

Do vậy, các dòng vì khuẩn *A. tumefaciens* chứa T1-plasmid tái tổ hợp được chúng tôi sử dụng cho thí

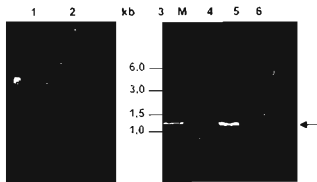
th nghiệm biểu hiện tạm thời trên lá thuốc *N. tabacum* để kiểm tra hoạt động của hai cấu trúc.

Biểu hiện tạm thời gen GA20 oxidase trên lá cây thuốc là *N. tabacum*

Cây thuốc là *N. tabacum* đã được tái sinh *in vitro* trong ống nghiệm khoảng 4-6 tuần và chuyển sang bầu đất đến khi có 4-5 lá thì được dùng cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời. Các dòng *A. tumefaciens* chứa các cấu trúc T1-plasmid trên được nuôi cấy trên môi trường LB khoảng 16 h đến khi OD600 của dịch nuôi đạt khoảng 1 là thích hợp cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời. Đến ngày thứ 5, sau khi nhiễm vì khuẩn trên lá, thì tiến hành chiết RNA tổng số để kiểm tra sự biểu hiện gen ở mức phiên mã và chiết protein tổng số để kiểm tra sự biểu hiện gen ở mức dịch mã.

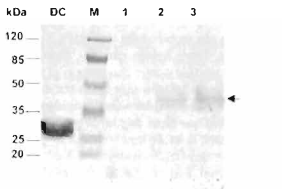
Kết quả tách RNA tổng số từ lá có nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20 và lá cây đối chứng không nhiễm vi khuẩn cho thấy RNA tổng số thu được có nồng độ rất đậm đặc (hình 4A). Sản phẩm RNA này được sử dụng để tổng hợp cDNA. Sau đó, RT-PCR được tiến hành trên các cặp mồi khác nhau như sau: 1.3 KF *Bam*HI / KR *Not*I; 1.3 KF *Bam*HI / c-myc KDEL (mồi đặc hiệu cho chuỗi peptide c-myc KDEL).

Sản phẩm RT-PCR với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI / KR *Not*I đã thể hiện một băng sắc nét trên điện di (hình 4; giếng 4) với kích thước bằng kích thước đoạn gen mà chúng tôi đã nhân lên ở Keo tai tượng (Hình 4 giếng 3). Chúng ta sản phẩm này có thể được nhân lên từ nguồn RNA của *A. tumefaciens* đã nhiễm vào và từ nguồn cây thuốc lá. Do gen GA20 oxidase mà chúng tôi sử dụng có nguồn gốc từ thực vật nên có thể có sự tương đồng với GA20 của cây thuốc lá. Nhưng với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI / c-myc KDEL đã thiết kế thì chỉ có RNA có nguồn gốc từ *A. tumefaciens* mang cấu trúc mà chúng tôi đã thiết kế mới cho phép nhân được sản phẩm PCR có kích thước tương đương với đoạn gen đã phân lập vì primer c-myc KDEL được thiết kế đặc hiệu cho đoạn peptide c-myc KDEL, mà đoạn c-myc KDEL chỉ có trong cấu trúc được thiết kế (Hình 4; giếng 5). Do vậy, sản phẩm RT-PCR với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI / c-myc KDEL từ lá đối chứng không nhiễm *A. tumefaciens* không xuất hiện băng DNA (Hình 4 giếng 6). Như vậy, đã có sự phiên mã ra RNA của gen GA20 oxidase trong cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20 trên lá cây thuốc lá.



Hình 4 Kiểm tra sự biểu hiện gen GA20 oxidase ở mức phiên mã trên lá cây *N. tabacum*. 1. RNA từ lá đối chứng. 2. RNA từ lá nhiễm vi khuẩn; 3. sản phẩm RT-PCR nhân GA20 oxidase từ Keo tai tượng; 4. RT-PCR trên lá nhiễm vi khuẩn với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI và 1.4 KR *Not*I. 5. RT-PCR trên lá nhiễm vi khuẩn với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI và c-myc KDEL. 6. RT-PCR trên lá đối chứng với cặp mồi 1.3 KF *Bam*HI và c-myc KDEL

Sau đó, các mẫu lá được nhiễm 2 loại vi khuẩn *A. tumefaciens* có chứa 2 cấu trúc trên được tách chiết protein tổng số để kiểm tra sự biểu hiện protein của gen trong cấu trúc. Khoảng 30 µg protein tổng số của lá được điện di trên SDS-PAGE 10% và protein được chuyển sang màng và nhuộm với kháng thể kháng c-myc.



Hình 5 Phát hiện protein lai GA20 oxidase + c-myc bằng lai Western Blot với kháng thể kháng c-myc. DC: Đối chứng; M: Marker; 1: Đối chứng - không nhiễm vi khuẩn; 2: sự biểu hiện của cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20; 3: sự biểu hiện của cấu trúc pCB301-GA20p-GA20

Do khi thiết kế đã nối đoạn trình tự gen GA20 oxidase cùng với đoạn trình tự mã hóa cho chuỗi peptide c-myc vì vậy nếu protein được biểu hiện sẽ có đoạn peptide c-myc. Theo tính toán lý thuyết, protein lai của GA20 oxidase trong cấu trúc chứa 35S promoter và SP sẽ có khối lượng phân tử 44,3 kDa và protein lai của GA20 oxidase trong cấu trúc chứa GA20 promoter sẽ có khối lượng phân tử 42,1 kDa. Khi thực hiện lai Western Blot nếu có protein lai thì sẽ có phản ứng giữa protein và kháng thể kháng c-myc

Kết quả lai Western Blot (Hình 5; giếng 2, 3) đã cho thấy có sự biểu hiện protein của 2 cấu trúc đã thiết kế. Như đã đề cập, enzyme GA20 oxidase là một loại hòa tan tồn tại ở cytosol không có đoạn peptide tín hiệu, do vậy khi GA20 oxidase lai được tổng hợp từ cấu trúc pCB301-GA20p-GA20 giữ nguyên kích thước 42,1 kDa, còn GA20 oxidase lai được tổng hợp từ cấu trúc pCB301-35Sp-SP-GA20 có kích thước khoảng 43 kDa nhưng sau khi tổng hợp đoạn SP sẽ bị cắt do vậy kích thước biểu hiện trên kết quả lai Western là hai băng kích thước bằng nhau, việc có phản ứng lai với kháng thể kháng c-myc chứng tỏ protein GA20 oxidase đã biểu hiện trong tế bào lá cây *N. tabacum*.

Ở cây lúa và cây *Arabidopsis*, gen *GA20ox1*

được chứng minh là biểu hiện ở tất cả các cơ quan sinh dưỡng, cho thấy đoạn điều khiển của gen này có tính điều khiển đặc hiệu ở một số cơ quan sinh dưỡng. Đoạn gen *AmGA2ox1* của Keo tai tượng đã được công bố, chúng tôi chưa thấy mô tả về tính đặc hiệu của gen này. Tuy nhiên, việc có được đoạn GA20 promoter trong nghiên cứu này, mặc dù cần có nghiên cứu sâu hơn để khẳng định về tính đặc hiệu, cũng đã mở ra khả năng có thể sử dụng trong các nghiên cứu cần sự biểu hiện tinh trạng ở các cơ quan sinh dưỡng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nối thêm phần peptide c-myc cho protein GA20 oxidase vì vậy sẽ thuận lợi cho việc kiểm tra đánh giá cây chuyển gen sau này nhờ vào thí nghiệm phát hiện protein thông qua phản ứng lai Western. Vì vậy, hai cấu trúc được thiết kế dựa trên GA20 promoter và gen mã hóa cho GA20 oxidase của Keo tai tượng là nguồn nguyên liệu có giá trị cho các nghiên cứu chuyển gen ổn định.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế được hai vector biểu hiện thực vật mang gen GA20 oxidase, có nguồn gốc từ cây Keo tai tượng (*A. mangium*), dựa trên vector gốc pCB301-Kan. Gen GA20 oxidase trong cấu trúc thứ nhất được điều khiển bởi 35S promoter và có peptide tín hiệu hướng protein vào lưới nội chất, trong cấu trúc thứ hai gen GA20 oxidase được điều khiển bởi GA20 promoter. Sự biểu hiện của gen GA20 oxidase trong các cấu trúc đã được khẳng định trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời trên lá cây thuốc lá *N. tabacum*, điều đó chứng tỏ các vector được thiết kế đã hoạt động trên cây mô hình. Vì vậy, các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) tái tổ hợp mang các vector này là nguồn nguyên liệu có giá trị cho các nghiên cứu chuyển gen ổn định.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài mã số CNSII.DT.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 trong đêm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhattacharya A, Kourmpetli S, Davey MR (2010) Practical applications of manipulating plant architecture by

regulating gibberellin metabolism. *Plant Growth Regul* 29: 249-256

Bienelt S, Tschierch H, Sonnawald U (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* 135: 254-265.

Đỗ Xuân Dũng, Bùi Văn Thắng, Hồ Văn Giảng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2011) Nghiên cứu chuyển gen mã hóa gibberellin 20-oxidase vào cây Xoài ta (*Melia azedarach* L.) bằng *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9(2): 217-222.

Fagoaga C, Tadeo FR, Iglesias DJ, Huerta I., Lliso I, Vidal AD, Talon M, Navarro L, Garcia-Martinez, Pena L. (2007) Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of GA20 oxidase gene modifies plant architecture. *J. Exp. Bot* 58: 1407-1420

Floss DM, Sack M, Stadlmann J, Rademacher T, Scheller J, Steger E, Fischer R, Conrad U (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biol J* 6(4) 379-391.

Hedden P, Kamuya Y (1997) Gibberellin biosynthesis. Enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 431-460.

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Huỳnh Thị Thu Huệ, Bùi Thị Tuyết, Nông Văn Hai (2009) Phân lập và thiết kế vector mang promoter và gen GA20 oxidase từ cây Keo tai tượng (*Acacia mangium*). Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Thủ Nguyễn 26-27/11/2009, Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên: 169-172.

Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642-1653

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

Yanaguchi S (2006) Gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Phytochem Rev* 5: 39-47.

Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40(4): 711-717.

TRANSIENT EXPRESSION OF GA20 OXIDASE GENE ISOLATED FROM *ACACIA MANGIUM* IN LEAVES OF *NICOTIANA TABACUM* L.

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

Institute of Genome Research (IGR), Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

GA20 oxidases are important enzymes in the biosynthetic pathway of bioactive GA - phytohormones. Each gene encoding GA20 oxidase was expressed specifically in an organ or at different stages of plant development. GA20 oxidase gene was widely used in plant genetic transformation. Previously, we have showed the result of isolation and sequencing of GA20 promoter and GA20 oxidase gene from *A. mangium*. In Vietnam, the GA20 oxidase gene was also isolated and sequenced from *Arabidopsis* for the purpose of genetic engineering of plants. In this paper, we reported the construction of two new recombinant Ti-plasmid pCB301-Kan harbouring the GA20 promoter and GA20 oxidase gene. We carried out transient expression experiments of the GA20 oxidase gene in leaves of *N. tabacum*. The first vector, pCB301-35Sp-SP-GA20, contains sequences of 35S promoter, GA20 oxidase gene and signal peptide leading expressed protein into endoplasmic reticulum. The second vector, pCB301-GA20p-GA20, carries full-length sequence of GA20 promoter and the GA20 oxidase gene. The GA20 oxidase gene in two recombinant vectors has been expressed transiently in leaves of *N. tabacum* both at the levels of transcription and translation. By fusing a coding sequence of c-myc peptide with sequence of GA20 oxidase gene, it is convenient to check the expression of GA20 oxidase gene via Western blot. The fusion protein produced in transient expression experiments confirmed that the expression vectors functioned in the model plant cells. So these vectors can be used for stable transformation.

Keywords: *A. mangium*, GA20 promoter, GA20 oxidase, transient express, vector construction

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37562934; E-mail: vhnong@igr.ac.vn