

BIỂU HIỆN VÀ TÍNH SẠCH PROTEIN TÁI TỔ HỢP NLI-IF TỪ TẾ BÀO *Escherichia coli*

Nguyễn Duy Phương, Najaren Tuteja, Lê Huy Hàm, Phạm Xuân Hội*

Viện Di truyền nông nghiệp, (*)xuanhoi.pham@gmail.com

TÓM TẮT: Để phục vụ mục đích nghiên cứu mức độ biểu hiện trong cây chuyển gen của gen mã nhân tố phiên mã NLI-IF (Nuclear LIM Interactor-Interacting Factor) liên quan tới khả năng đáp ứng hạn ở lúa cũng như nghiên cứu khả năng bám đặc hiệu với ADN *in vitro* của NLI-IF, chúng tôi đã biểu hiện và tinh sạch protein NLI-IF tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli* chủng DE3. Trình tự mã hóa NLI-IF có kích thước 1,3 kb trong vector nhân dòng pGEMT/NLI-IF được cắt ra và đưa vào vector biểu hiện pET28a tại vị trí *EcoRI* và *XhoI*. Vector tái tổ hợp pET28a/NLI-IF được biến nạp vào tế bào *Escherichia coli* Rossetta. Protein có NLI-IF kích thước 52 kDa được biểu hiện tối ưu ở điều kiện nuôi cấy tế bào 20°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,1 mM trong thời gian 5h. Sử dụng cột sắc ký ái lực Ni-NTA có khả năng tạo liên kết giữa phức hợp Nickel và đuôi His-Tag của protein dung hợp, chúng tôi đã tinh sạch được NLI-IF tái tổ hợp từ dịch chiết tế bào. Protein tinh sạch liên kết đặc hiệu với kháng thể anti-His-tag trong thí nghiệm lai tách miễn dịch (Western Blot).

Từ khóa: *Escherichia coli*, chịu hạn, nhân tố phiên mã, NLI, protein tái tổ hợp, vector biểu hiện.

MỞ ĐẦU

Hướng nghiên cứu về stress thực vật trên thế giới hiện nay đang tập trung vào việc phân lập và nghiên cứu đặc tính một tập hợp đầy đủ các gen liên quan đến bất lợi môi trường và mối liên hệ giữa các bất lợi mặn, hạn và nhiệt độ. Hàng trăm gen được cảm ứng trong các điều kiện bất lợi khác nhau và sản phẩm của các gen cảm ứng với điều kiện bất lợi được chia làm hai nhóm: (1) nhóm các protein chức năng giúp thực vật chống lại bất lợi của môi trường và (2) nhóm các protein điều khiển làm nhiệm vụ điều hòa biểu hiện gen và truyền tin hiệu trong quá trình đáp ứng điều kiện bất lợi. Các nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là họ gen lớn [10]. Gần đây, rất nhiều nghiên cứu về nhân tố phiên mã được thực hiện trên cây mô hình *Arabidopsis* và các loài thực vật khác đã chứng minh vai trò quan trọng của chúng trong quá trình điều hòa phản ứng của thực vật trong các điều kiện bất lợi môi trường. Thực nghiệm đã chứng minh, sự biểu hiện của các nhân tố phiên mã kích hoạt sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng, điều này làm tăng cường khả năng chịu hạn ở thực vật. Vì vậy, các nghiên cứu về các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến tính chịu hạn đang trở thành định hướng nghiên cứu đầy tiềm năng trong việc chọn tạo giống chịu hạn.

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 điều khiển của gen (promoter). Dựa vào đặc tính bám ADN, kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men được hình thành để phân lập các nhân tố phiên mã. Nhân tố phiên mã đầu tiên (OLF-1) được phân lập bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men [15] và ngay lập tức trở thành phương pháp đầy tiềm năng trong việc phân lập các gen mã hóa các protein có khả năng bám ADN [16].

Ở thực vật, trật tự ADN đặc hiệu ABRE (ABA responsive element - yếu tố đáp ứng ABA) có trình tự lõi là ACGTGGC lần đầu tiên được phát hiện trên vùng điều khiển gen *Em* ở lúa mì [4]. Hai nhóm protein điều khiển quá trình phiên mã AREB/ABF bám vào trật tự ADN đặc hiệu ABRE trên các vùng điều khiển gen và hoạt hóa sự biểu hiện các gen chức năng liên quan đến kháng hạn [3, 14]. Tiếp theo, trật tự ADN đặc hiệu DRE/CRT (Dehydration Responsive Element/C repeat - yếu tố/đoạn C lặp lại đặc ứng hạn) có trình tự lõi là A/GCCGAC, được phát hiện trên vùng điều khiển gen *RD29* ở *Arabidopsis* [16] và sau này

được phát hiện trên rất nhiều đoạn điều khiển gen của các gen chức năng biểu hiện trong điều kiện hạn, mặn, lạnh [2, 5, 12]. Các gen điều khiển quá trình phiên mã thuộc nhóm AP2 (APETALA2)/ethylene-responsive element-binding factor (ERF) bám vào trật tự ADN đặc hiệu DRE và được đặt tên là DREB1/CBF và DREB2 [6]. Trật tự ADN đặc hiệu MYC và MYB có trình tự lõi là CANNTG (MYC) và C/TAACNA/G (MYB), được phát hiện trên vùng khởi động gen RD22. Các nhân tố phiên mã AtMYC và AtMYB bám vào trật tự ADN đặc hiệu MYC và MYB và hoạt hoá biểu hiện gen chức năng liên quan đến chịu hạn [1]. Trật tự ADN đặc hiệu nhóm gen NAC có trình tự lõi là CATGTG, được phát hiện trên vùng khởi động gen *ERD1*. Ba nhân tố phiên mã họ NAC là *ANAC019*, *ANAC055* và *ANAC072* bám vào trật tự đặc hiệu nhóm NAC trên vùng khởi động gen chức năng và hoạt hoá biểu hiện các gen này [13]. Trong một nghiên cứu khác, Tran et al (2004) [12], đã phân lập được một gen mã hóa nhân tố phiên mã liên kết đặc hiệu với một trình tự đích tương đồng với trình tự 14 bp nằm trong promoter của gen *RPS1*, có tên là trình tự ZFHDRS (zinc finger homecodomain recognition sequence). Nhân tố phiên mã này hoạt hoá một số gen cảm ứng với điều kiện stress và làm tăng khả năng chống chịu stress của cây chuyển gen [14].

Gần đây, sử dụng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men với trình tự đích có chiều dài 50 nucleotid chứa trật tự DRE trên vùng khởi động gen *JRC2606*, chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã OsRap2.4B từ giống lúa Japonica [8]. Trong một nghiên cứu khác, chúng tôi thiết kế thư viện ADNc từ ARN tổng số của giống lúa Niponpare đã xử lý hạn và phân lập được gen *NLI-IF1* (Nuclear LIM interactor -interacting factor), mã hóa cho một protein trung gian nằm trong phức hợp liên kết protein-protein, thuộc họ nhân tố phiên mã LIM, tham gia điều hòa quá trình phiên mã bằng phương pháp sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men [7]. Kết quả phân tích cây lúa đại (wide type) bằng Northern blot và RT-PCR đã chứng tỏ gen *NLI-IF* tăng cường biểu hiện trong điều kiện stress (mặn, lạnh, mất nước và nhiệt độ cao). Các thí nghiệm lai phân

từ *in vivo* trong tế bào nấm men cũng cho thấy, protein NLI-IF có khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự ADN đích nằm trong trình tự của 2 promoter JRC0528 và JRC0332 (số liệu chưa công bố). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp NLI-IF trong tế bào vi khuẩn *E. coli* để sử dụng cho nghiên cứu xác định khả năng tương tác với trình tự ADN đích *in vitro* của NLI-IF, đồng thời phục vụ mục đích tạo kháng thể đa dòng kháng NLI-IF, dùng cho nghiên cứu biểu hiện của *NLI-IF* trong các thí nghiệm phân tích cây chuyển gen *NLI-IF*.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF đã được tách dòng giữ trong vector pGEMT.

Chúng vi khuẩn *E. coli* Rossetta do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp.

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện pET28a/NLI-IF

Vector tái tổ hợp pGEMT/NLI-IF và vector biểu hiện pET28a được xử lý đồng thời với *EcoRI* và *XhoI*. Trình tự mã hóa NLI-IF và được ghép nối vào vector biểu hiện nhờ enzyme T4 Ligase.

Biểu hiện và tinh sạch protein NLI-IF

Vector tái tổ hợp pET28a/NLI-IF được biến nạp vào tế bào *E. coli* Rossetta bằng phương pháp sốc nhiệt, chọn lọc trên môi trường chứa kanamycin 50 µg/ml, chloramphenicol 34 µg/ml. *NLI-IF* được biểu hiện với điều kiện nuôi cấy tế bào ở 28°C và 37°C, trong thời gian 3 h và 5 h, có bổ sung chất cảm ứng IPTG nồng độ 0,5 mM và 1,0 mM. Protein tái tổ hợp NLI-IF được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA (Invitrogen), sử dụng đệm chảy cột chứa Imidazol nồng độ 20 mM, 100 mM, 200 mM và 500 mM. Protein tinh sạch sau khi thẩm tách loại muối bằng màng cellulose được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thẩm tách miễn dịch (Western blot)

Protein sau khi điện di trên gel SDS-PAGE

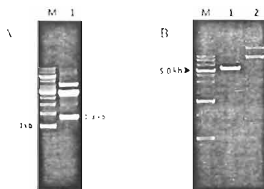
được điện chuyển lên màng nitroxelluloza theo phương pháp của Sambrook et al. (1989) [8] và cố định bằng dung dịch BSA 1%. Màng nitroxelluloza được ủ với kháng thể anti-His-tag có gắn enzyme AP (Invitrogen) để tạo liên kết protein-protein, sau đó hiện màu bằng dung dịch cơ chất p-nitro blue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (NBT/BCIP).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

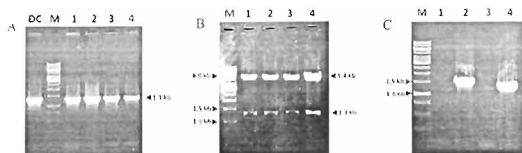
Thiết kế vector biểu hiện pET28a/NLI-IF

Khi phân lập trình tự mã hóa NLI-IF có kích thước 1320 bp từ thư viện ADNc, chúng tôi đã sử dụng cặp mồi được thiết kế mang 2 vị trí nhận biết của *EcoRI* và *XhoI*. Do đó, để đưa trình tự gen *NLI-IF* vào vector biểu hiện pET28a, chúng tôi đã xử lý đồng thời 2 vector, pGEMT/NLI-IF và pET28a với *EcoRI* và *XhoI* (hình 1). Sau khi tinh sạch sản phẩm cắt giới hạn từ gel agarose bằng bộ kit Gel Extraction

Kit (Fermentas), trình tự mã hóa NLI-IF được chèn vào vị trí đa điểm cắt của vector biểu hiện pET28a dưới tác dụng của enzyme T4 ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α . Kết quả kiểm tra khuẩn lạc bằng PCR (hình 2A, giếng 1-4) cho thấy chúng tôi đã thu được một số thể biến nạp mang vector tái tổ hợp pET28a/NLI-IF. Kiểm tra plasmid tinh sạch từ các thể biến nạp này bằng phản ứng cắt giới hạn với *EcoRI* và *XhoI*, chúng tôi thu được 2 băng ADN có kích thước 1,3 kb (tương ứng với trình tự mã hóa NLI-IF) và 5,3 kb (tương ứng với khung vector pET28a) (hình 2B, giếng 1-4). PCR kiểm tra plasmid này với cặp mồi T7-Fw/NLI-Rv và cặp mồi đặc hiệu gen NLI-Fw/NLI-Rv chúng tôi đã thu được sản phẩm có kích thước tương ứng là 1,5 kb (hình 2C, giếng 2) và 1,3 kb (hình 2C, giếng 4) đúng với tính toán lý thuyết. Các kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã gắn thành công trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF vào vector biểu hiện pET28a



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pGEMT/NLI-IF (A) và pET28a (B) bằng *EcoRI/XhoI*



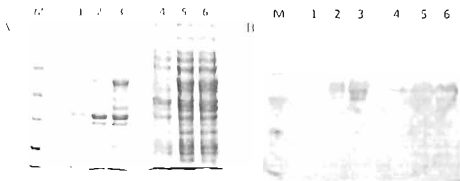
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc (A), cắt giới hạn plasmid pET28a/NLI-IF bằng *EcoRI/XhoI* (B) và PCR plasmid pET28a/NLI-IF (C).

A. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc 1-4, với cặp mồi đặc hiệu NLI-Fw/NLI-Rv; B. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn plasmid tinh sạch từ khuẩn lạc 1-4 bằng *EcoRI/XhoI*; C. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là pET28a/NLI-IF, sử dụng cặp mồi T7-Fw/NLI-Rv (giếng 1 và 2) và cặp mồi NLI-Fw/NLI-Rv (giếng 3 và 4).

Biểu hiện protein tái tổ hợp NLI-IF trong tế bào *E. coli* Rossetta

Chủng vi khuẩn *E. coli* là chủng vi khuẩn được thiết kế mang gen khử tính độc của promoter T7 sử dụng trong hệ thống vector biểu hiện pET, do đó chúng tôi đã sử dụng chủng vi khuẩn này để biểu hiện gen *NLI-IF* được điều khiển bởi promoter T7. Tế bào Rossetta sau khi được biến nạp vector tái tổ hợp pET28a/NLI-IF, được chúng tôi nuôi biểu hiện protein bằng môi trường LB lỏng, ở các điều kiện nhiệt độ 16, 20, 28 và 37°C, có bổ sung chất cảm ứng IPTG

nồng độ 0,1 mM, 0,5 mM và 1,0 mM, với thời gian cảm ứng khác nhau. Kết quả chúng tôi thu được đã cho thấy điều kiện cảm ứng IPTG 0,1 mM, ở 20°C trong thời gian 5 h là điều kiện tốt nhất để biểu hiện *NLI-IF*. Qua kết quả điện di SDS-PAGE (hình 3A) cho thấy phân đoạn protein thu được ở điều kiện thích hợp có kích thước khoảng 52 kDa, phân đoạn này không xuất hiện ở mẫu đối chứng không cảm ứng bằng IPTG. Kết quả này cũng chỉ ra protein tái tổ hợp *NLI-IF* nằm trong cả 2 pha, pha cặn và pha dịch của dịch chiết tế bào *E. coli*.



Hình 3 Kết quả điện di SDS-PAGE (A) và Western blot (B) dịch chiết tế bào *E. coli* Rossetta biểu hiện gen *NLI-IF* ở 20°C, cảm ứng IPTG nồng độ 0,1 mM, trong thời gian 3 h và 5 h

Kết quả điện di pha cặn (giếng 1-3) và pha dịch (giếng 4-6) của dịch chiết tế bào; giếng 1, 4: không cảm ứng IPTG; giếng 2, 5: cảm ứng IPTG 0,1 mM trong 3 h; giếng 3, 6: cảm ứng IPTG 0,1 mM trong 5 h.

Tinh sạch protein tái tổ hợp NLI-IF

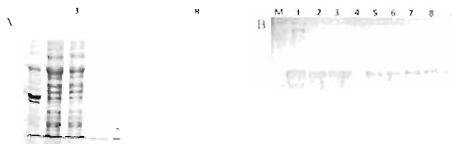
Do protein *NLI-IF* được biểu hiện ra chủ yếu nằm trong pha dịch, vì vậy, sau khi siêu âm phá màng tế bào để thu dịch chiết, chúng tôi đã ly tâm loại bỏ toàn bộ phần xác tế bào và cho pha dịch trực tiếp đi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA. Do *NLI-IF* được biểu hiện bằng hệ thống vector biểu hiện pET28a nên protein tạo ra sẽ được dung hợp với 1 trình tự gồm 6 amino axit histidine. Trình tự His-tag này sẽ giúp protein tái tổ hợp kết bám vào cột sắc ký, trong khi các protein khác sẽ bị loại bỏ bằng dung dịch rửa chứa Imidazol 30 mM. Sau khi đã rửa sạch các protein tạo liên kết không đặc hiệu với cột sắc ký, protein *NLI-IF* được đẩy phân đoạn bằng dung dịch đệm chứa Imidazol 250 mM. Kết quả thu được trên bản điện di SDS-PAGE cho thấy protein *NLI-IF* tái tổ hợp đã được thu lại ở dạng tinh sạch, có kích thước 52 kDa, tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết.

Để xác định protein, chúng tôi biểu hiện và tinh sạch được là protein dung hợp *NLI-IF*/His-tag, chúng tôi đã tiến hành kỹ thuật thẩm tách miễn dịch (western blot), sử dụng kháng thể kháng trình tự His-tag với nồng độ pha loãng 1:25000. Kết quả cho thấy, trong dịch chiết tế bào, chúng tôi đã thu được bằng protein có kích thước khoảng 52 kDa, tương ứng với kích thước lý thuyết của *NLI-IF* (hình 3B), chứng tỏ *NLI-IF* đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rossetta. Kết quả này cũng chỉ ra việc sử dụng cột sắc ký ái lực Ni-NTA đã cho phép chúng tôi tinh sạch được protein tái tổ hợp *NLI-IF* (hình 4B).

Nhằm khẳng định chính xác hơn protein tái tổ hợp tinh sạch được là *NLI-IF*, chúng tôi xử lý dung dịch protein đã tinh sạch bằng cột sắc ký Ni-NTA với Thrombin (Promega) để loại đuôi His-tag, sau đó tiếp tục cho qua hệ thống cột sắc ký Ni-NTA mắc nối tiếp với Heparin-Sepharose

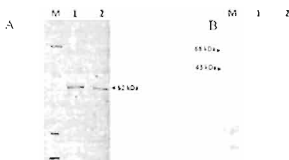
(BioVision). Trong một công trình nghiên cứu trước đây, sử dụng phép lai phân tử trong tế bào nấm men (Yeast One Hybrid), chúng tôi đã xác định được NLI-IF là một nhân tố phiên mã có khả năng liên kết với trình tự ADN đích [7], vì vậy sẽ gắn với cột Heparin-Sepharose. Do đó, khi sử dụng hệ thống cột sắc ký mắc nối tiếp, các phân tử NLI-IF dung hợp vẫn còn đuôi His-tag sẽ bị giữ lại trong cột Ni-NTA, trong khi NLI-IF đã bị loại đuôi His-tag sẽ gắn với cột Heparin-Sepharose và sẽ được đẩy ra bằng đệm chiết chứa NaCl 500 mM. Protein tinh sạch sau đó được điện di SDS-PAGE và chuyển lên

màng để ủ với kháng thể anti-His-tag. Kết quả cho thấy, chỉ có protein trước khi xử lý với thrombin có khả năng liên kết với kháng thể anti-His-tag, trong khi protein sau khi xử lý và tinh sạch lại qua hệ thống cột sắc ký Ni-NTA mắc nối tiếp Heparin-Sepharose không có khả năng này (hình 5). Điều này chứng tỏ chúng tôi đã thu được protein NLI-IF tái tổ hợp hoàn toàn tinh sạch. Việc tinh sạch được NLI-IF bằng cột sắc ký Heparin-Sepharose cũng củng cố thêm cho nghiên cứu trước đây của chúng tôi về khả năng liên kết với ADN của NLI-IF.



Hình 4. Kết quả kiểm tra NLI-IF tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA

A. Kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch NLI-IF, B. Kết quả thâm tách miễn dịch (Western blot) với kháng thể anti-His-tag (pha loãng tỉ lệ 1:25000). Giếng 1: pha cặn; giếng 2: pha dịch chứa tinh sạch qua cột Ni-NTA; giếng 3: dịch qua cột; giếng 4: phân đoạn rửa cột với imidazol 30 mM; giếng 5-10: các phân đoạn đẩy cột bằng imidazol 250 mM



Hình 5. Kết quả kiểm tra NLI-IF tinh sạch trước và sau khi xử lý với Thrombin.

A. Kết quả điện di SDS-PAGE NLI-IF tinh sạch, B. Kết quả thâm tách miễn dịch (Western blot) với kháng thể anti - His-tag (pha loãng tỉ lệ 1:25000) Giếng M: thang chuẩn protein; giếng 1: NLI-IF tinh sạch qua cột Ni-NTA; giếng 2: NLI-IF tinh sạch đã xử lý bằng thrombin và tinh sạch lại qua hệ thống cột Ni-NTA mắc nối tiếp Heparin-Sepharose.

Protein tái tổ hợp sau khi được tinh sạch sẽ được sử dụng để nghiên cứu khả năng liên kết ADN đặc hiệu của NLI-IF và tạo kháng thể kháng NLI-IF dùng cho mục đích phân tích biểu hiện của NLI-IF trong cây chuyển gen.

KẾT LUẬN

Trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF kích thước 1,3 kb phân lập từ giống lúa Japonica đã được thiết kế vào hệ thống vector

biểu hiện protein pET28a. Protein dung hợp đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* Rossetta ở điều kiện nuôi cấy 20°C, chất cảm ứng IPTG 0,1 mM, trong thời gian 5 h.

Protein NLI-IF tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực Ni-NTA với nồng độ imidazol trong đệm đẩy cột là 250 mM. Sản phẩm protein sau khi xử lí với thrombin để loại đuôi His-tag và tinh sạch lại bằng hệ thống cột Ni-NTA mắc nối tiếp Heparin-Sepharose có độ tinh khiết cao, đảm bảo chất lượng để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện theo chương trình hợp tác giữa Phòng Bệnh học Phần tử Thực vật (Viện Di truyền nông nghiệp) và Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ sinh học (New Delhi, Ấn Độ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.
2. Baker S. 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: 701-713.
3. Choi H, Hong J. H., Ha J., Kang J. Y., Kim S. Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element-binding factor. *J. Biol. Chem.*, 275: 1723-1730.
4. Guiltinan M. J., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250: 267-271.
5. Jiang C., Lu B. and Singh J., 1996. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus. *Plant Mol. Biol.*, 30: 679-684
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 signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406.
7. Nguyen Duy Phuong, Tran Tuan Tu, Pham Xuan Hoi, 2012. Construction of rice drought cDNA library and identification of NLI-IF1 using Yeast One Hybrid screening. *J. Biol.*, 34(1):114-122.
8. Pham X. H., Tran T. T., 2009. Identification and sequence analysis of a DREB subfamily transcription factor involved in drought stress tolerance from rice. *J. Biol.*, 31(4): 74-81.
9. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18.60-18.61.
10. Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 58: 221-227.
11. Thomashow M. F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 571-599.
12. Tran L. S., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S. D., Fujita Y., Maruyama K., Fujita M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9): 2481-98.
13. Tran L. S., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 104: 20623-20628.
14. Uno Y., Furihata T, Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.,

2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 97: 11632-11637.
15. Wang M. M. and Reed R. R., 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. Nature, 364: 121-126.
16. 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, 6: 251-264.
17. Clontech. Yeast Protocols Handbook. http://www.clontech.com/xxelt_jbcGetAttachement.jsp?clntemId=17602

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEIN NLI-IF FROM *Escherichia coli*

Nguyen Duy Phuong, Najaren Tuteja, Le Huy Ham, Pham Xuan Hoi
Agricultural Genetic Institute

SUMMARY

In order to investigate the expression level of NLI-IF (Nuclear LIM Interactor-Interacting Factor) transcription factor - encoding gene which involved in drought tolerance in rice and identified *in vitro* DNA - binding ability of NLI-IF, we expressed and purified recombinant protein NLI-IF from *E. coli* Rossetta. 1,3 kb NLI-IF - encoding sequence was cut from pGEMT/NLI-IF and inserted into *EcoRI/XhoI* site in MCS of expression vector pET28a. pET28a/NLI-IF was transformed into *E. coli* Rossetta. 52 kDa recombinant protein NLI-IF was expressed optimally in *E. coli* using 0.1 mM IPTG as an inducer, at 20°C, for 5 h. We were successful in purification of recombinant protein NLI-IF using Ni-NTA affinity chromatography system. Purified protein has an ability of binding, specifically, to anti-His-tag antibody in Western blot assay.

Keywords: *E. coli*, Drought tolerance, expression vector, recombinant protein, transcription factor, NLI.

Ngày nhận bài: 9-5-2012