

PHÂN LẬP PROMOTER SPORAMIN TỪ CÂY KHOAI LANG (*IPOMOEA BATATAS* L.) VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ SỰ HOẠT ĐỘNG CỦA PROMOTER SPORAMIN TRONG CÂY THUỐC LÁ CHUYÊN GEN

Lê Thu Ngọc¹, Phạm Kiều Giang², Phạm Bích Ngọc¹, Lê Trần Bình¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Promoter là một trong những yếu tố quan trọng tham gia vào quá trình điều hòa hoạt động của gen. Việc đi sâu nghiên cứu cấu trúc, chức năng và các yếu tố liên quan của promoter đã mở ra khả năng thay đổi sự biểu hiện của gen quan tâm trong sinh vật cũng như sử dụng trong kỹ thuật DNA tái tổ hợp để kiểm soát quá trình biểu hiện của gen quan tâm trong các sinh vật khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và đánh giá khả năng hoạt động của promoter điều khiển gen mã hóa sporamin – protein diệt trừ nấm phân lớn trong củ khoai lang. Đoạn promoter sporamin đầy đủ (S_{po}) và hai đoạn promoter ngắn hơn (S_{po}-305 và S_{po}-305-SF) có kích thước tương ứng là 1185 bp, 305 bp và 432 bp đã được khuếch đại thành công từ DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá giống khoai lang Tự Nhiên nhờ phản ứng PCR. Kết quả phân tích và so sánh cho thấy trình tự 3 đoạn promoter S_{po}, S_{po}-305 và S_{po}-305-SF phân lập được có độ tương đồng 97%, 91% và 96%, theo thứ tự tương ứng, với trình tự DNA vùng biên đầu 5' của gen SPO-A1 mã hóa protein sporamin A (mã số X13509.1). Đồng thời các đoạn promoter này cũng chứa đầy đủ các trình tự chức năng điển hình của promoter sporamin như hộp TATA box, CAAT box, G-C box cũng như các trình tự cảm ứng sucrose CMSREs và trình tự cảm ứng vết thương. Tiến hành các nghiên cứu sâu hơn, chúng tôi đã tạo cây thuốc lá chuyển gen biểu hiện gen *GUS* dưới sự điều khiển của các đoạn promoter sporamin đã phân lập. Kết quả quan sát cho thấy các đoạn promoter này đều có khả năng khởi động quá trình phiên mã của gen, trong đó đoạn promoter S_{po}-305-SF và promoter đầy đủ S_{po} hoạt động mạnh hơn đoạn promoter S_{po}-305.

Từ khóa: *GUS*, khoai lang, promoter sporamin, thuốc lá chuyển gen

MỞ ĐẦU

Promoter là một thành phần quan trọng trong cấu trúc của các gen và đóng vai trò then chốt trong việc biểu hiện gen. Promoter thông thường bao gồm vùng trình tự nucleotide nằm phía đầu 5' trước điểm khởi đầu phiên mã, điều khiển hoạt động phiên mã của gen nhờ có các trình tự nhận biết và vị trí gắn của các nhân tố phiên mã (transcription factor-TF) và RNA polymerase. Về cơ bản, cấu trúc của một promoter thường gồm 4 thành phần: (1) Tầm promoter gồm các hộp TATA có vị trí từ -35 đến -25 bp giúp RNA polymerase nhóm II nhận biết và gắn chính xác vào vị trí khởi đầu phiên mã; (2) Trình tự UP (upstream element) ở vị trí trước hộp TATA khoảng 25 bp, có chứa nhiều cặp G-C (hộp G-C) và trình tự CCAAT (hộp CAT) là vị trí tiếp xúc đầu tiên của RNA polymerase; (3) Trình tự DE (downstream element) ở vị trí khoảng 27 đến 34 bp sau hộp TATA và (4) Trình tự khởi đầu (initiator- Inr) nằm giữa hộp TATA và trình tự DE. Việc phân loại promoter phụ thuộc vào từng đối tượng, từng gen cụ thể, nhưng có thể chia promoter thành hai nhóm chính là nhóm promoter cơ định điều khiển hoạt động của gen ở tất cả các loại mô khác nhau trong tất cả hay hầu như mọi giai đoạn phát triển của sinh vật và nhóm promoter đặc hiệu điều khiển biểu hiện các sản phẩm của gen giới hạn ở một hoặc một vài mô nhất định hoặc ở một giai đoạn phát triển nhất định của sinh vật (Lê Thị Thu Hiền et al., 2007).

Sporamin là protein dự trữ chiếm khoảng 60% đến 80% tổng số protein hòa tan trong củ khoai lang, là một nguồn dinh dưỡng cho rễ củ nảy mầm (Hattori T et al., 1989). Ngoài ra, sporamin còn là một chất ức chế mạnh trypsin (một loại proteinase), nhờ đó mà cây khoai lang có khả năng chống được một số tác hại của các côn trùng và động vật khác (Ding et al., 1998; Yeh et al., 1997). Đến nay, ít nhất mười gen sporamin khoai lang đã được phân lập và xác định trình tự. Những gen này cũng thuộc một họ đa gen được chia thành các phân họ A và B. Có trên 90% nucleotide tương đồng giữa các gen trong cùng một phân họ, và khoảng 80% nucleotide tương đồng giữa các gen thuộc hai phân họ khác nhau (Wang et al., 1995).

Sự hoạt động của gen mã hóa protein sporamin được đặt dưới sự điều khiển của một promoter đặc hiệu- promoter sporamin. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về cấu trúc và hoạt động của promoter này. Hai nhóm tác giả Hattori (1989) và Ohta (1991) đã phân lập được đoạn promoter sporamin có kích thước 0,98 kb và thiết kế vào vector chuyển gen điều khiển biểu hiện gen *GUS* để đánh giá hoạt động của promoter này. Cả hai nhóm nghiên cứu đều nhận thấy việc tăng nồng độ đường sucrose trong môi trường nuôi cấy đã làm tăng sự biểu hiện của gen *GUS* trong cây thuốc lá chuyển gen. Thêm vào đó, sự biểu hiện của *GUS* được quan sát chủ yếu trong thân cây và biểu hiện mạnh trong mạch libe và các tế bào nhu mô. Nghiên cứu sâu hơn về trình tự và cấu trúc của promoter sporamin, Monikami và đồng tác giả (2004) đã xác định được 2 yếu tố cis liên quan đến sự cảm ứng hoạt động của protein sporamin nhờ sucrose là CMSRE-1 và CMSRE-2 (carbohydrat metabolite signal responsive element) với lõi là trình tự TGGACGG tại vùng giữa vị trí -282 và -165 trên promoter sporamin A. Ngoài ra các nghiên cứu khác cũng đã xác định được một số yếu tố như trình tự CGAAATACCTT (-770 đến -781) có độ tương đồng 83% với trình tự cảm ứng vết thương trên promoter điều khiển sinh tổng hợp proteinase inhibitor II (PII) của khoai tây (Palm et al., 1990), trình tự GTAAATACGTA (-1084 đến -1094) tương đồng 82% với yếu tố cảm ứng vết thương Z của promoter nopaline synthase (nos) ở *Agrobacterium tumefaciens* (An et al., 1990); G-box CACCTG (-1114 đến -1119) giống với vùng bảo thủ cảm ứng methyl jasmonate (Williams et al., 1992; Mason et al., 1993).

Trong nghiên cứu này, nhằm mục tiêu điều khiển quá trình sinh tổng hợp một số protein tái tổ hợp trong rễ củ hoặc củ, chúng tôi đã tiến hành phân lập promoter sporamin từ cây khoai lang và bước đầu đánh giá sự hoạt động của promoter này trong cây thuốc lá chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Thực vật giống khoai lang Tự Nhiên được thu thập tại Trung tâm nghiên cứu cây có củ - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Giống thuốc là *Nicotiana tabacum* K326 đang được nuôi cấy *in vitro* do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

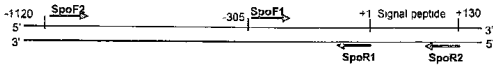
Chủng vi sinh vật: *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) được sử dụng cho mục đích tách dòng; *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV 2260 (Viện Dược học và Sinh học phân tử, Trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức) được sử dụng để chuyển gen vào thực vật

Vector: Vector tách dòng pBT và vector chuyển gen pBI101 do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế các cặp mỗi đặc hiệu để khuếch đại promoter của gen mã hoá protein sporamin

Trên cơ sở trình tự nucleotide của gen gSPO. A1 mã hóa cho sporamin A của cây khoai lang (*Ipomoea batatas* L.) được phân lập và đăng kí trên Ngân hàng gen NCBI với mã số X13509.1, GI 58369 (Ohta *et al.*, 1991) và bằng sáng chế mã số US7.411.115B2 (Murashige *et al.*, 1962), với mục đích định hướng biểu hiện protein tái tổ hợp vào tế bào chất và mạng lưới nội chất, chúng tôi đã thiết kế các cặp mỗi đặc hiệu để khuếch đại các đoạn promoter sporamin theo sơ đồ Hình 1. Đầu 5' của các môi nuôi và mỗi ngược được gắn thêm trình tự nhận biết của enzyme hạn chế *Hind*III và *Bam*HI (được in đậm) tạo thuận lợi cho quá trình nối ghép gen sau này.



Hình 1. Sơ đồ các đoạn promoter mục tiêu cần phân lập

Bảng 1. Trình tự và kích thước các cặp mỗi sử dụng để phân lập promoter sporamin

Tên môi	Trình tự môi	Kích thước
SpoF1	5' GGGAAAGCTTCATAGACTTCACCTATAGTA 3'	29 bp
SpoF2	5' CCCAAGCTTTCGCCAACAGAGCCTAAATC 3'	29 bp
SpoR1	5' CCACCCGGGATCCGGGCTCTCATAGTCTCATGCA 3'	35 bp
SpoR2	5' CCACCCGGGATCCGGGCTGGATTGGGCAGGAGAT 3'	35 bp

Phân lập các đoạn promoter sporamin

DNA tổng số của khoai lang giống Tự nhiên tách chiết từ mẫu lá và pha loãng tới nồng độ 50 ng/ μ l được sử dụng làm khuôn để khuếch đại 3 đoạn promoter sporamin trong phản ứng PCR sử dụng các cặp mỗi SpoF1/SpoR1, SpoF1/SpoR2 và SpoF2/SpoR2. Chu kỳ nhiệt bao gồm các bước: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ (94°C/1 phút, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút) và 72°C/10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra, tinh sạch bằng Kit QiAquick Spin của Qiagen và được nhân dòng trong vector pBT trước khi xác định trình tự bằng máy Megabace Sequencer 1000 (GE Healthcare Life Sciences).

Thiết kế các cấu trúc promoter sporamin-GUS sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời

Ba đoạn promoter sporamin đã phân lập được nối ghép vào pBI101 tạo thành các vector chuyển gen mang cấu trúc promoter sporamin-GUS. Trong thí nghiệm này, hai enzyme hạn chế *Hind*III và *Bam*HI được sử dụng để tạo đầu cắt solo cho các đoạn promoter sporamin và mở vòng vector pBI101 làm nguyên liệu cho phản ứng ghép nối gen nhờ sự xúc tác của T4-DNA ligase. Các vector chuyển gen tái tổ hợp tạo thành sau khi kiểm tra bằng cách cắt enzyme hạn chế được biến nạp vào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

Phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Quy trình chuyển gen vào giống thuốc là *N. tabacum* K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/pGV 2260 được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) có cải tiến. Các bước chính như sau:

Tạo dịch huyền phù *Agrobacterium*: Cây trả *A. tumefaciens* C58/pGV 2260 mang cấu trúc promoter sporamin-GUS lên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung rifamycin 50 mg/l và kanamycin 50 mg/l, nuôi ở 28°C trong 36-48 giờ. Sau đó lấy một khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung các kháng sinh như trên và lắc ở 220 vòng/phút, 28°C. Sau 16-18 giờ, tiếp tục chuyển 5 ml dịch vi khuẩn trên sang bình to hơn, bổ sung 45 ml LB lỏng, tiếp tục nuôi lắc ở 220 vòng/phút, 28°C trong 3-5 giờ. Ly tâm dịch khuẩn 4500-5000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi và hòa tan cặn trong môi trường 1/8 MS, pha loãng tới OD₆₀₀ = 0,5-0,8. Dịch huyền phù vi khuẩn này có thể được sử dụng để biến nạp ngay hay có thể giữ ở 4°C trong 1-2 giờ.

Nhiệm vi khuẩn với mảnh lá: lá bánh tẻ của các cây thuốc là K326 nuôi cấy *in vitro* được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 1 cm². Những mảnh lá này sau đó được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn khoảng 10-20 phút và được đặt lên môi trường tạo đa chồi MS+1 mg/l BAP. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, chuyển mảnh lá sang môi trường chọn lọc MS+1 mg/l BAP có bổ sung kháng sinh cefotaxime 500 mg/l và kanamycine 50 mg/l. Sau 5 - 6 tuần, các chồi phát triển tốt được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ MS + 0,1 mg/l NAA.

Bước đầu đánh giá hoạt động của các đoạn promoter sporamin trong cây thuốc lá chuyển gen thông qua sự biểu hiện của gen GUS

Hoạt động của các đoạn promoter sporamin được đánh giá thông qua sự biểu hiện của gen *GUS* mã hoá enzyme β -glucuronidase. Kỹ thuật nhuộm màu mô tế bào bằng X-glc do Richard Anthony Jefferson phát hiện năm 1987 dựa trên tác dụng xúc tác của enzyme β -glucuronidase chuyển hóa cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-glc) không màu thành 5,5'-dibromo-4, 4'-dichloro-indigo có màu xanh chàm. Các phần mô lá thuốc lá sau khi được đồng nuôi cấy với *Agrobacterium* sau 2 ngày và lá của cây chuyển gen sống sót trên môi trường chọn lọc được ngâm qua đệm với 500 μ l dung dịch X-glc (1 mM). Sau 24-48 giờ ở 37°C môi trường được tẩy hết dịch lục bằng Ethanol 70% và quan sát trên kính lúp soi nổi.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập, xác định trình tự các đoạn promoter sporamin

Ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu như đã trình bày ở mục phương pháp. Dựa trên cơ sở trình tự mô được thiết kế, theo tính toán lý thuyết, đoạn promoter thứ nhất được nhân với cặp mồi SpoF1/SpoR1 có kích thước 305 bp kí hiệu là Spo-305, đoạn promoter thứ hai dài gần 500 bp bao gồm thêm vùng 5'UTR và trình tự tín hiệu được nhân với cặp mồi SpoF1/SpoR2, kí hiệu là Spo-305-SP, còn cặp mồi SpoF2/SpoR2 sẽ khuếch đại đoạn promoter sporamin đầy đủ (kí hiệu là Spo) có kích thước hơn 1,1 kb. Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 2) cho thấy sản phẩm của phản ứng PCR là các băng đặc hiệu có kích thước đúng như dự đoán. Điều này chứng tỏ chúng tôi đã nhân thành công các đoạn promoter sporamin bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đã thiết kế và chu trình nhiệt phù hợp.

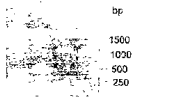
Các đoạn DNA sau khi khuếch đại thành công được tinh sạch và nối ghép vào vector tách dòng pBT nhờ tác dụng của enzyme T4-DNA ligase. Các vector tái tổ hợp tạo ra từ phản ứng lai được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5c bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả sàng lọc các thể biến nạp trên đĩa LB chứa kanamycin 50 mg/l bằng phương pháp PCR và cắt enzyme hạn chế cho phép khẳng định các đoạn promoter đã được đồng hóa thành công trong vector pBT (không công bố). Chúng tôi sử dụng các dòng này làm nguyên liệu để giải trình tự gen. Phân tích BLAST các trình tự thu được cho thấy 3 đoạn promoter sporamin Spo-305, Spo305-SP và Spo lần lượt có kích thước là 305, 432 và 1185 bp, đồng thời có độ tương đồng 98%, 91% và 97%, theo thứ tự tương ứng, với trình tự DNA vùng biến đầu 5' của gen SPO-A1 (mã số X13509.1). Trong khi đó, độ tương đồng giữa các đoạn promoter đã phân lập đạt khoảng 94% (Hình 3). Sự sai khác nhỏ xảy ra ngay giữa các đoạn promoter phân lập từ cùng một giống khoai lang Tự nhiên là minh chứng cho thấy protein sporamin được mã hóa bởi một họ gồm đa gen (Hattori et al., 1989).

Dựa vào phân tích promoter SPO-A1 của nhóm tác giả Morikami (2005), chúng tôi nhận thấy trình tự của các đoạn promoter sporamin Spo-305, Spo-305-SP và Spo đều đã phân lập có đầy đủ các vùng chức năng của một promoter như hộp TATA box, CAAT box, các trình tự cảm ứng sucrose CMSRE1 và CMSRE2 (Hình 3). Như vậy chúng tôi đã thành công trong việc phân lập, xác định trình tự của 3 đoạn promoter Spo-305, Spo-305-SP, Spo và khẳng định trình lý thuyết khả năng hoạt động của các đoạn promoter này.

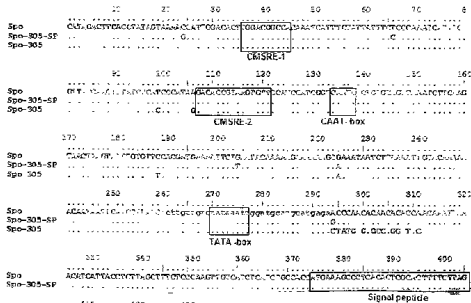
Thiết kế vector chuyển gen mang các cấu trúc promoter sporamin-GUS

Vector chuyển gen pBI101 được sử dụng rất phổ biến

hiện nay trong các nghiên cứu về hoạt động promoter ở thực vật biến đổi gen (Nguyễn Thị Thuý Hương, 2011). Trong nghiên cứu này, các đoạn promoter sporamin và pBI101 được xử lý bằng cặp enzyme *HindIII/BamHI*. Sản phẩm của phản ứng cắt sau khi tinh sạch được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép gen dưới sự xúc tác của enzyme T4-DNA ligase tạo thành các vector pSpo-305/GUS, pSpo-305-SP/GUS, pSpo/GUS và được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5c. Các plasmid tái tổ hợp này được xác định bằng cách cắt kiểm tra tại chính vị trí của các enzyme nói trên. Kết quả điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 0,8% (Hình 4) cho thấy các phân đoạn gen thu được có kích thước đúng với tính toán lý thuyết. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen mang các cấu trúc promoter

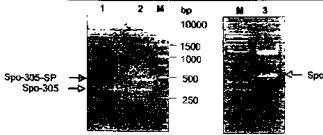


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn promoter sporamin Spo-305 (1), Spo-305-SP (2) và Spo (3) (M: thang DNA chuẩn 1kb, Fermentas)



Hình 3. Kết quả phân tích trình tự của các đoạn Spo-305, Spo-305-SP và một phần trình tự của promoter sporamin Spo.

sporamin-GUS. Những cấu trúc này sau đó được biến nạp vào *A. tumefaciens* C58/pGV 2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

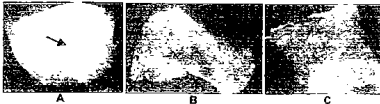


Hình 4. Kết quả cắt kiểm tra các vector pSPO-305/GUS (1), pSPO-305-SP/GUS (2) và pSPO/GUS (3) bằng enzyme hạn chế *Hind*III và *Bam*HI

Chuyển gen vào thuốc lá thông qua *Agrobacterium* và bước đầu đánh giá sự hoạt động của các đoạn promoter đã phân lập

Theo cách thiết kế các vector chuyển gen nêu trên, gen *GUS* được đặt dưới sự điều khiển của các đoạn promoter sporamin đã phân lập. Do vậy, sau khi tiến hành chuyển gen vào chủng thuốc lá K36 thông qua *Agrobacterium* như đã nêu trong phần phương pháp, hoạt động của các đoạn promoter sporamin có thể được phân tích thông qua sự biểu hiện của gen thông báo *GUS*.

Trước tiên, chúng tôi đánh giá sự biểu hiện tạm thời của gen *GUS* sau hai ngày đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Agrobacterium*. Kết quả nhuộm X-Gluc các mảnh lá thuốc lá chuyển gen cho thấy gen *GUS* dưới sự điều khiển của đoạn promoter Spo-305 hoạt động rất yếu, quan sát chỉ ghi nhận được một vài điểm xanh chấm nhỏ (mũi tên, Hình 5A). Trái lại, đoạn promoter Spo-305-SP mang trình tự tín hiệu và promoter sporamin đầy đủ hoạt động mạnh hơn, hầu hết các mảnh lá đều có điểm xanh đặc trưng, diện tích bề mặt lá được nhuộm xanh lên tới hơn 90% (Hình 5B, 5C). Kết quả này cho thấy các đoạn promoter đã phân lập đều có chức năng điều khiển quá trình sinh tổng hợp của gen, tuy nhiên, sự hoạt động tạm thời của promoter Spo-305 yếu hơn rất nhiều so với Spo-305-SP và Spo.



Hình 5. Kết quả nhuộm GUS các mảnh lá chuyển gen Spo-305/GUS (A), pSPO-305-SP/GUS (B) và pSPO/GUS (C) sau 2 ngày đồng nuôi cấy

Hình 6. Kết quả nhuộm GUS các mảnh lá chuyển gen Spo-305/GUS (A), pSPO-305-SP/GUS (B) và pSPO/GUS (C) sau 6 tuần nuôi cấy

Sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo đa chồi có kháng sinh chọn lọc, các chồi khỏe được tách ra cấy lên môi trường tạo rễ. Ở giai đoạn này, chúng tôi cũng chọn lá của 10 chồi sinh trưởng, phát triển tốt ở mỗi cấu trúc chuyển gen để tiến hành nhuộm với dung dịch X-gluc. Quan sát kết quả trên Hình 6 ta thấy: các mẫu lá của cây thuốc lá chuyển gen Spo-305/GUS có các phần màu xanh chấm ít và nhạt hơn mẫu chuyển gen Spo-305-SP/GUS và Spo/GUS, chứng tỏ các đoạn promoter Spo-305-SP và Spo hoạt động mạnh hơn Spo-305 trong giai đoạn sinh trưởng, phát triển đầu của cây thuốc lá chuyển gen. Các phần mô được nhuộm xanh tập trung chủ yếu ở phần cuống lá, gân lá và đầu lá cho thấy sự hoạt động của promoter sporamin được tăng cường ở các phần này. Khả năng hoạt động của đoạn promoter Spo-305-SP mạnh hơn Spo-305 có thể có liên quan đến đoạn peptide tín hiệu hoặc trình tự 64 nucleotide nằm trong vùng 5'UTR. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn hơn cần tiến hành thêm các phân tích và so sánh hoạt động của các đoạn promoter này ở các bộ phận khác nhau của cây như rễ và thân... Mặc dù vậy, bước đầu có khẳng định rằng Spo-305-SP với kích thước 432 bp là đoạn promoter đủ dài, đồng thời chưa đầy đủ các yếu tố điều hòa và yếu tố tăng cường cần thiết cho sự biểu hiện của gen ngoại lai trong hệ biểu hiện thực vật.

Ngoài ra, Morikami và đồng tác giả (2005) khi nghiên cứu các dòng thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc promoter sporamin/GUS được cảm ứng biểu hiện trên môi trường agar có bổ sung sucrose ở các nồng độ 30 mM – 300 mM thấy rằng: khi cảm ứng ở nồng độ 30 mM sucrose thì gen *GUS* biểu hiện rất thấp. Mức độ biểu hiện của gen *GUS* tăng dần khi tăng nồng độ sucrose trong môi trường nuôi cấy và biểu hiện mạnh nhất khi các dòng thuốc lá chuyển gen được cấy trên môi trường có chứa 300 mM sucrose. Điều này có thể giải thích được mức độ biểu hiện thấp của gen *GUS* trong

nghiên cứu của chúng tôi khi các dòng thuốc lá được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose tương đương 80 mM sucrose. Vì vậy cần tiếp tục khảo nghiệm trên môi trường với các nồng độ sucrose khác nhau

KẾT LUẬN

Đã thiết kế được các cặp mồi đặc hiệu và nhân thành công 3 đoạn promoter sporamin Spo-305, Spo-305-SP và Spo có kích thước tương ứng là 305 bp, 432 bp và 1185 bp. Kết quả phân tích trình tự cho thấy 3 đoạn promoter đã phân lập có độ tương đồng là 96%, 91% và 97%, theo thứ tự tương ứng, với trình tự DNA vùng biên đầu 5' của gen SPO-A1 mã hóa protein sporamin A (mã số X13509.1). Bước đầu kiểm tra hoạt động của các đoạn promoter sporamin ở lá cây thuốc lá chuyển gen có thể kết luận các đoạn promoter này đều có khả năng khởi động quá trình phiên mã của gen, trong đó đoạn promoter Spo-305-SP và promoter đầy đủ Spo hoạt động mạnh hơn đoạn promoter Spo-305.

Chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu, đánh giá thêm hoạt động của các đoạn promoter ở các bộ phận khác của cây như rễ, thân .. cũng như khảo nghiệm các yếu tố cảm ứng để thấy rõ khả năng hoạt động, tính đặc hiệu của các đoạn promoter đã phân lập.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hatton T, Nakagawa S, Nakamura K (1989). Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storage protein. *Plant Mol Biol* 13: 563-572.
- Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải (2007). Promoter và các ứng dụng trong công nghệ gen thực vật. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5: 1-4.
- Mason HS, DeWald DB and Mullet JE (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell* 5: 241-251
- Morikami A, Matsunaga R, Tanata Y, Suzuki, Mano S, Nakamura K (2005). Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Mol Gen Genomics* 272: 690-699
- Ohn S, Hatton T, Morikami A, Nakamura K (1991). High-level expression of a sweet potato sporamin gene promoter: beta-glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. *Mol Gen Genomics* 225: 369-78.
- Wang SJ, Lin CT, Ho KC, Chen YM and Yeh KW (1995). Nucleotide sequence of a sporamin gene in sweet potato. *Plant Physiol* 108: 829-830
- Williams ME, Foster R and Chua NH (1992). Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell* 4: 485-496.
- Yeh KW, Lin M, Tuan SJ, ChenYM, Lin CY and Kao SS (1997). Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep* 16: 696-699.

ISOLATION OF SPORAMIN PROMOTERS FROM SWEET POTATO (*IPOMOEA BATATAS* L.) AND INITIAL EVALUATION OF THEIR ACTIVITIES IN TRANSGENIC TOBACCO

Le Thu Ngoc^{1*}, Pham Kieu Giang², Pham Bích Ngọc¹, Lê Trần Bình¹

1. Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology
2. Vietnam Forestry University

SUMMARY

Promoters are one of the important factors involved in the regulation of gene activity. Deep studies on the structure, function and related elements of promoters has opened the possibility of changing the expression of target genes in the living things as well as using recombinant DNA techniques to control the the expression of interested genes in other organisms. In this study, we isolated and evaluated the activity of the promoter controlling the gene encoding sporamin - a tuberous storage protein of sweet potato. A full-length sporamin promoter (Spo) and two shorter promoter segments (Spo and Spo-305-305-SP) with corresponding size as 1185 bp, 305 bp and 432 bp were successfully amplified from total DNA extracted from sweet potato leaves by PCR. Results of analysis and comparison showed that the sequences of 3 promoter segments Spo, Spo-305 and Spo-305-SP have 97%, 91% and 96% similarity, respectively, with 5' flanking region of the *SPO-A1* gene encoding sporamin A (access number X13509.1). These sequences also contains all functional domains typical for the sporamin promoter such as TATA box, CAAT box, GC box as well as sucrose-response elements CMSREs and wound-inducible sequences. Performing further research, we created transgenic tobacco carrying the *GUS* reporter gene under the control of isolated sporamin promoter segments. Obvious results showed that all 3 promoter segments are capable of initiating transcription process. Among these, the full-length sporamin promoter Spo and Spo-305-SP segment are more active than Spo-305.

Keywords: *GUS*, sporamin promoter, sweet potato, transgenic tobacco

*Author for correspondence Email: le_thu_ngoc@yahoo.com