

THIẾT KẾ VECTOR CHUYÊN GEN *LSI2* GÓP PHẦN NÂNG CAO KHẢ NĂNG VẬN CHUYỂN VÀ TÍCH LŨY ASEIN TRONG THỰC VẬT

Bùi Phương Thảo^{*}, Hoàng Thu Hằng, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà

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

TÓM TẮT

Vấn đề ô nhiễm asen (As) trong đất ngày càng được quan tâm do ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người và cây trồng. Bên cạnh các phương pháp truyền thống, việc sử dụng thực vật để xử lý đất nhiễm As (phytoremediation) là công nghệ đang được áp dụng rộng rãi do tính hiệu quả cao cũng như tiết kiệm chi phí. Tuy nhiên, các loài thực vật "sâu tích tụ" phát hiện ngoài tự nhiên thường có sinh khối thấp. Để khắc phục điều này đòi hỏi phải tạo ra các loài thực vật biến đổi gen theo chiều hướng vừa có khả năng tích tụ As, vừa tạo ra sinh khối lớn. Silicon efflux transporter (*Lsi2*) là một protein quan trọng trong quá trình vận chuyển As từ rễ lên thân thông qua các mô xylem ở thực vật. Việc tăng cường biểu hiện gen mã hóa protein *Lsi2* trong cây chuyển gen sẽ làm tăng sự vận chuyển As từ rễ lên thân và qua đó tăng cường sự tích lũy As trong cây. Trong bài báo này, chúng tôi đã phân lập được gen *Lsi2* từ cây lúa non (*Oryza sativa*) và ghép nối thành công vào vector chuyển gen pCB301. Cấu trúc pCB301/*Lsi2* đã được biến nạp vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và bước đầu đã thu được các dòng cây dương tính với phản ứng PCR. Đây là cơ sở khoa học cho việc tạo ra các dòng cây thân gỗ chuyển gen có khả năng vận chuyển và tích lũy As nhằm góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường đất.

Từ khóa: *Agrobacterium*, *Lsi2*, thuốc lá, vận chuyển asen, vector chuyển gen

MỞ ĐẦU

Kim loại nặng nói chung và asen (As) nói riêng rất độc với con người và môi trường cho dù ở nồng độ thấp. Chúng góp phần làm ô nhiễm nặng nề đất, nước ngầm, tác động xấu tới chất lượng hệ thống công nhân; ảnh hưởng xấu tới quá trình xử lý sinh học; độc hại đối với hệ động, thực vật và ảnh hưởng xấu tới sức khỏe con người thông qua chuỗi dinh dưỡng. Việc loại bỏ, giảm bớt các kim loại nặng, làm sạch đất ô nhiễm là một quá trình cấp thiết, bảo vệ nguồn tài nguyên và sức khỏe con người. Để xử lý đất ô nhiễm người ta thường sử dụng các phương pháp truyền thống như: rửa đất; cố định các chất ô nhiễm bằng hoá học hoặc vật lý; xử lý nhiệt; trao đổi ion, ôxi hoá hoặc khử các chất ô nhiễm; đào đất bị ô nhiễm để chuyển đi đến những nơi chôn lấp thích hợp. Các phương pháp này thường rất tốn kém về kinh phí, giới hạn về kỹ thuật và hạn chế về diện tích. Gần đây, nhờ những hiểu biết về cơ chế hấp thụ, chuyển hoá, chống chịu và loại bỏ kim loại nặng của một số loài thực vật, người ta đã bắt đầu chú ý đến khả năng sử dụng thực vật để xử lý môi trường như một công nghệ môi trường đặc biệt (phytoremediation) (Ali et al., 2013).

Cho đến nay, rất nhiều loài thực vật đã được ghi nhận có khả năng hấp thụ và loại bỏ As trong đất và nước ô nhiễm như cây dương xỉ (*Pteris vittata*), cỏ vetiver (*Vetiveria zizanioides*), cây hoa dại Alpine pennycress (*Thlaspi caerulescens*) (McGrath, Zhao, 2003). Tuy nhiên, chúng đều là các cây bụi, có sinh khối hạn chế, sinh trưởng chậm, vì thế hạn chế khả năng xử lý As (Wei et al., 2006). Để khắc phục điều này đòi hỏi phải phát triển công nghệ sinh học để tạo ra các loài thực vật biến đổi gen theo hướng vừa có khả năng tích tụ, vừa tạo ra sinh khối lớn. Các loại cây gỗ với khả năng sinh trưởng nhanh, khối lượng lớn, có hệ rễ phát triển sâu và rộng, để dàng thu hoạch được xem như các đối tượng tiềm năng để nghiên cứu sử dụng trong xử lý ô nhiễm As.

Trong tự nhiên, As tồn tại chủ yếu dưới dạng ion arsenate ($As(V)$) và arsenite ($As(III)$). Thực vật hấp thụ chúng thông qua các kênh vận chuyển tương ứng là phosphate transporters và aquaglyceroporins (Meharg, Hartley-Whitaker, 2002; Meng et al., 2004). Sau khi được vận chuyển vào tế bào, $As(V)$ sẽ được khử thành $As(III)$ và tạo phức với glutathione (GSH) hoặc phytochelatin (PCs). $As(III)$ hoặc phức hợp của $As(III)$ sẽ được vận chuyển qua màng không bào và được tích lũy trong không bào, hoặc được vận chuyển từ rễ lên các mô thân và lá thông qua protein vận chuyển (Zhao et al., 2009; Zhu, Rosen, 2009).

Một trong những đặc tính quan trọng của cây có khả năng tích lũy As cao, cây dương xỉ (*P. vittata*) là khả năng vận chuyển hiệu quả As từ rễ lên thân (Xu et al., 2007) trong khi hầu hết các loại dương xỉ không có khả năng hấp thụ As khác thường có khả năng vận chuyển thấp hơn nhiều so với *P. vittata*. Bước quan trọng trong sự vận chuyển này là đưa As từ rễ lên các mô xylem gần đây. Ma và đồng tác giả (2002, 2006) xác định được một gen mã hóa protein *Lsi2*, có vai trò cho vận chuyển arsenite vào mô xylem, như arsenite là dạng tồn tại chính của As trong mô xylem. Ở cây lúa, đột biến mất gen *Lsi2* dẫn đến kết quả giảm gần 50% lượng As tích tụ trong thân. Như vậy, việc tăng cường biểu hiện *Lsi2* trong cây chuyển gen có khả năng sẽ làm tăng sự vận chuyển As từ rễ lên thân và qua đó tăng cường sự tích lũy As trong cây.

Trong bài báo này, chúng tôi đã phân lập được gen *Lsi2* từ cây lúa, ghép nối vào vector chuyển gen và biến nạp thành công vào cây thuốc lá. Đây là cơ sở khoa học cho việc tạo ra các dòng cây thân gỗ chuyển gen có khả năng vận chuyển và tích lũy As nhằm góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường đất.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cây lúa non (*Oryza sativa*) 2 tuần tuổi do Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội cung cấp.

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 do Viện Kinh tế - Kỹ thuật Thuốc lá cung cấp và được nuôi cấy *in vitro* tại Phòng Công nghệ Tế bào Thực Vật (CNTBTV) - Viện Công nghệ sinh học (CNSH).

Vector tách dòng pBT, vector chuyển gen pCB301/PCS, các chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và *A. tumefaciens* EHA105 do phòng CNTBTV - Viện CNSH cung cấp

Phương pháp

Phân lập gen *Lsi2*

Gen *Lsi2* được phân lập từ lá của cây lúa non 2 tuần tuổi. RNA tổng số từ lá lúa được tách chiết theo hướng dẫn sử dụng hóa chất Trizol Reagents (Invitrogen, Mỹ). Lá lúa được nghiền trong nitrogen lỏng thành bột mịn. Bổ sung Trizol, đảo nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, bổ sung 200 ml hỗn hợp Chloroform : isoamyl (24.1), đảo nhẹ và ly tâm 10.000 vòng trong 10 phút. Hút dịch nổi, kết tủa RNA bằng Isopropanol. Ly tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút, bổ dịch nổi, thu tủa và pha loãng RNA trong nước khử DEPC 0,01%.

RNA tổng số thu được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp cDNA và phản ứng RT-PCR theo hướng dẫn của bộ kit Fermentas với cặp mồi đặc hiệu *Lsi2*-F (5'-ACTAGTATGAGTGAGCTTGCCTCGGC-3') và *Lsi2*-R (5'-TCTAGATCAGATCTTCCCATGAGGG-3'). Sản phẩm RT-PCR được điện di trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Gen *Lsi2* sau khi tinh sạch sẽ được ghép nối vào vector tách dòng pBT nhờ sự xúc tác của enzyme *T4-DNA ligase* theo phương pháp của Sambrook (2001). Vector tái tổ hợp tạo thành được đặt tên là pBT/*Lsi2* và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt (Cohen, 1972). Chọn dòng tế bào, kiểm tra plasmid thu được bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và xác định trình tự được thu được bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer dựa trên nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Thiết kế vector chuyển gen thực vật

Để chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105, vector pCB301/PCS được thiết kế tại phòng CNTBTV có mang gen PCS và đoạn trình tự c-myc-KDEL ở cuối gen đã được lựa chọn làm vector chuyển gen. Vector pCB301/PCS và vector tách dòng pBT/*Lsi2* cùng được cắt bởi cặp enzyme giới hạn *Spe*I và *Xba*I. Sản phẩm cắt được ghép nối với nhau nhờ enzyme *T4-DNA ligase* nhằm thay thế gen PCS trong vector pCB301/PCS bằng gen *Lsi2* và tạo nên vector tái tổ hợp pCB301/*Lsi2*. Vector tái tổ hợp này được đồng hóa thông qua việc biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và vào tế bào *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp xung điện. Các dòng tế bào thu được được kiểm tra sự có mặt của cấu trúc cần chuyển bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony PCR) với cặp mồi đặc hiệu *Lsi2*-F/*Lsi2*-R theo chu kỳ nhiệt: 01 chu kỳ 94°C/4 phút; 30 chu kỳ (94°C/40 giây, 55°C/ 30 giây, 72°C/1 phút); 01 chu kỳ 72°C/10 phút và giữ ở 4°C/30 phút; và bằng phản ứng cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp với cặp enzyme giới hạn *Spe*I/*Xba*I. Sản phẩm colony PCR và sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1% và so sánh với thang DNA chuẩn 1kb để kiểm tra kích thước.

Chuyển gen vào cây thuốc lá

Vector pCB301/*Lsi2* được chuyển vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105 theo phương pháp của Topping có cải tiến (Topping, 1998). Các mảnh lá được cắt từ cây thuốc lá tái sinh *in vitro* với kích thước khoảng 1 cm² và được cảm ứng 2 ngày trên môi trường tái sinh GM (MS(I-V) + 1 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH = 5,8). Một ngày trước khi biến nạp, lấy một khuẩn lạc tròn đều, dùng riêng biệt phát triển tốt trên đĩa nuôi cấy vào 10 ml LB lỏng có bổ sung 50 mg/l kanamycin, 25 mg/l chloramphenicol và 50 mg/l rifamicine. Nuôi lắc 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C qua đêm (14 – 16h). Lấy 5 ml dịch khuẩn chuyển sang 50 ml LB lỏng không bổ sung kháng sinh nuôi phục hồi khuẩn trong 5 giờ. Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C thu cần khuẩn và hòa tan khuẩn trong môi trường 1/2MS lỏng. Sử dụng vi khuẩn *A.tumefaciens* có mật độ đạt OD₆₀₀=0,6 - 1 để biến nạp. Các mảnh lá sau 2 ngày nuôi cảm ứng môi trường GM sẽ được ngâm với dịch huyền phù vi khuẩn có chứa vector chuyển gen mang gen quan tâm. Sau 10 phút, các mảnh lá sẽ được chuyển lên giấy thấm đã khử trùng, thấm khô và đồng nuôi cấy với vi khuẩn trên môi trường GM 2 ngày trong điều kiện tối. Sau đó, các mảnh lá tiếp tục được chuyển lên môi trường GM có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxime 500 mg/l và kháng sinh chọn lọc kanamycin 30 mg/l để tái sinh. Sau 2-3 tuần các cụm chồi hình thành tiếp tục được cắt chuyển sang môi trường GM mới chứa kanamycin 50 mg/l. Sau 3-4 tuần, các chồi phát triển cao khoảng 2-3 cm thì được cắt và chuyển sang môi trường ra rễ RM (MS(I-V) + 0,1 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH = 5,8) có bổ sung cefotaxime 500 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Các cây con ra rễ trên RM và phát triển khỏe chính với 3-4 lá thật sẽ được trồng trong các bầu chứa khí TN1 (Viện Thổ những nông hóa). Sau 15 ngày, các cây cũng cấp, khỏe mạnh sẽ được chuyển ra trồng trong nhà lưới.

Cây thuốc lá chuyển gen 6 tuần tuổi tinh từ lúc ra cây sẽ được lấy lá để tách DNA và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *Lsi2*-F/*Lsi2*-R.

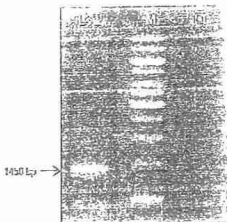
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen mã hóa protein *Lsi2* từ cây lúa non

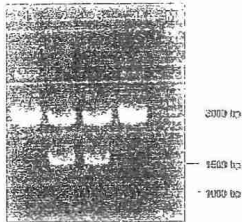
Gen mã hóa protein *Lsi2* được phân lập từ lá của cây lúa non 2 tuần tuổi. RNA tổng số tách chiết được dùng để thực hiện phản ứng RT-PCR nhân dòng gen *Lsi2* bằng cặp mồi đặc hiệu *Lsi2*-F/*Lsi2*-R. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 1% được thể hiện ở Hình 1.

Tại giếng "Lsi2" xuất hiện băng DNA đặc hiệu với kích thước tương đương kích thước mong muốn của đoạn gen *Lsi2* khi thiết kế cặp mồi (khoảng 1450 bp). Như vậy chúng tôi đã khuếch đại được gen *Lsi2* từ lúa *Oryza sativa*.

Tiếp đó chúng tôi tiến hành thời gel, ghép nối sản phẩm DNA tinh sạch vào vector tách dòng pBT và dòng hóa vector tái tổ hợp pBT/Lsi2 vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Các dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được lựa chọn bằng cách tách plasmid và kiểm tra bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI. Kết quả điện di cho thấy sự xuất hiện của băng DNA với kích thước xấp xỉ 1,5 kb tương ứng với kích thước của gen *Lsi2* tại giếng số 2 và 3, chứng tỏ rằng đã thu được dòng khuẩn lạc *E. coli* mang vector pBT/Lsi2 (Hình 2). Một trong hai dòng khuẩn lạc này đã được lựa chọn để đem xác định trình tự và phân tích kết quả.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR với cặp mồi Lsi2-F/Lsi2-R. M: thang DNA chuẩn 1 kb; (-): đối chứng âm; Lsi2: đoạn gen *Lsi2*



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pBT/Lsi2 tái tổ hợp bằng enzyme *Bam*HI. M: thang DNA chuẩn 1 kb; 1-4: Các dòng khuẩn lạc *E. coli*

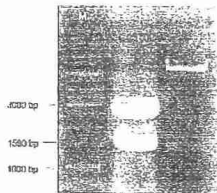
Kết quả đọc trình tự bằng cặp mồi Lsi2-F/Lsi2-R cho thấy chúng tôi đã tách dòng được gen *Lsi2* từ lúa (mã số đăng ký trên GenBank là HE818088) với độ tương đồng ở mức độ nucleotide so với các trình tự tương ứng trên Genbank là 99%. Kiểm tra trình tự axit amin của gen thu được cho thấy gen *Lsi2* đảm bảo khả năng biểu hiện protein trong các giai đoạn tiếp theo. Như vậy, bước đầu chúng tôi đã tách dòng thành công gen *Lsi2*.

Thiết kế vector chuyển gen mang gen mã hóa protein Lsi2

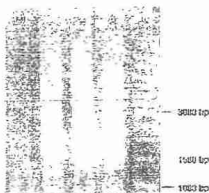
Gen *Lsi2* phân lập từ cây lúa 2 tuần tuổi đã được dòng hóa thành công vào vector tách dòng pBT. Với mục đích thiết kế vector chuyển gen mang đồng thời cả gen đích và đoạn trình tự c-myc-KDEL ở cuối gen để thuận lợi cho việc kiểm tra khả năng biểu hiện của gen bằng phương pháp lai Western blot (với kháng thể kháng c-myc) và để giúp cho việc nhận biết protein khi vận chuyển qua màng mạng lưới nội chất (nhờ peptide tín hiệu KDEL), vector chuyển gen pCB301/PCS (được thiết kế tại phòng CNTT) đã được sử dụng trong thí nghiệm này. Sơ đồ vector chuyển gen dự định thiết kế được minh họa ở Hình 3.



Hình 3. Cấu trúc gen chuyển trong vector pCB301



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm cắt các vector pBT/Lsi2 và pCB301/PCS bằng 2 enzyme *Spe*I và *Xba*I. M: thang DNA chuẩn 1 kb; 1: sản phẩm cắt của vector pBT/Lsi2; 2: sản phẩm cắt của vector pCB301/PCS



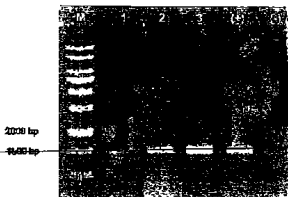
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm colony PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Lsi2* trong vector pCB301 với cặp mồi đặc hiệu Lsi2-F/Lsi2-R. M: thang DNA chuẩn 1 kb; (-) đối chứng âm (nước); 1-3: các dòng khuẩn lạc *E. coli*

Vector tách dòng pBT/Lsi2 được cắt bằng cặp enzyme giới hạn *SpeI* và *XbaI*. Đoạn gen *Lsi2* thu được có kích thước xấp xỉ 1,5 kb, đúng với kích thước dự đoán (giếng 1, Hình 4). Đồng thời vector chuyển gen pCB301/PCS có chứa promoter 35S và đoạn trình tự c-myc-KDEL cũng được cắt bởi hai enzyme tương ứng *SpeI/XbaI* nhằm loại bỏ đoạn gen PCS có kích thước khoảng 1,5 kb (giếng 2, Hình 4). Đoạn gen *Lsi2* và vector pCB301 mở vòng được ghép nối vào nhau bằng enzyme *T4-DNA ligase* và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Các dòng tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp được chọn lọc thông qua phản ứng colony PCR với cặp mồi đặc hiệu *Lsi2-F/Lsi2-R* và phân ứng cắt với enzyme giới hạn

Kết quả điện di sản phẩm colony PCR trên gel agarose (1%) cho thấy chúng tôi đã ghép nối thành công gen *Lsi2* (kích thước khoảng 1450 bp) vào vector chuyển gen pCB301 và chọn được dòng tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp mong muốn (Hình 5).

Tạo chủng *Agrobacterium* mang vector pCB301/Lsi2

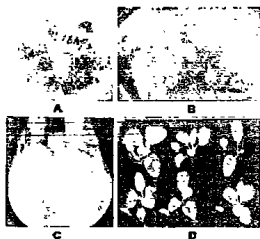
Một dòng tế bào *E. coli* mang vector pCB301/Lsi2 được lựa chọn để nuôi lỏng, tách plasmid và biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp xung điện. Các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh rifamicine, chloramphenicol và kanamycin và được kiểm tra bằng phản ứng colony PCR với mồi đặc hiệu. Kết quả Hình 6 cho thấy chúng tôi đã biến nạp thành công vector pCB301/Lsi2 vào *A. tumefaciens*



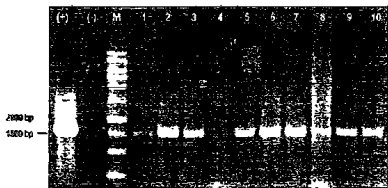
Hình 6. Kết quả điện di kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang plasmid pCB301/Lsi2 tái tổ hợp trong *A. tumefaciens* M thang DNA chuẩn 1 kb; (+): đối chứng dương; (-) đối chứng âm; 1-3: các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens*

Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang gen mã hóa protein *Lsi2*

Thuốc lá được xem là cây mô hình cho các thí nghiệm chuyển gen do có khả năng tái sinh cao, hệ số nhân chồi lớn, chu kỳ phát triển ngắn và đặc biệt là tỉ lệ chuyển gen tương đối cao và ổn định. Thông thường, chỉ cần từ 2,5 - 3 tháng là thuốc lá đã cho cây tái sinh hoàn chỉnh, có thể trồng ra bầu và phát triển ngoài nhà lưới. Vì vậy, chúng tôi chọn cây thuốc lá làm đối tượng để chuyển cấu trúc pCB301/Lsi2 đã thiết kế nhằm đánh giá nhanh ảnh hưởng của cấu trúc đến khả năng tái sinh và tỉ lệ chuyển gen của mẫu nuôi cấy cũng như mức độ biểu hiện của gen chuyển.



Hình 7. Kết quả chuyển gen vào cây thuốc lá. A. Mảnh lá trên môi trường cộng sinh sau 2 ngày; B: Cụm chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc; C: Cây thuốc lá trên môi trường ra rễ RM sau 2 tuần; D: Cây thuốc lá trồng trên giá thể



Hình 8. Kết quả điện di kiểm tra các dòng thuốc lá biến nạp cấu trúc pCB301/Lsi2 bằng PCR. M: thang DNA chuẩn 1 kb; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương; 1-10: các dòng cây chuyển gen

Cấu trúc pCB301/Lsi2 được biến nạp vào giống thuốc lá *N. tabacum* K326 tái sinh *in vitro* bằng *A. tumefaciens* thông qua lây nhiễm các mảnh lá (Hình 7A). Các chồi tái sinh sau khi ra rễ trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin nồng độ 50 mg/l đã được chọn ngẫu nhiên 10 dòng để trồng trên giá thể thích hợp. Cây trồng ra nhà lưới sau 6 tuần được tên

hành thu lá để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu Lsi2-F/Lsi2-R. Kết quả tái sinh và chuyển gen được thể hiện ở Hình 7 và 8 cho thấy bước đầu chúng tôi đã thu được cây thuốc lá mang cấu trúc quan tâm với tỉ lệ chuyển gen tương đối cao (09/10 dòng cây dương tính khi kiểm tra bằng PCR). Các dòng cây chuyển gen đều sinh trưởng, phát triển tốt trong nhà lưới. Đây sẽ là tiền đề quan trọng cho việc chuyển cấu trúc này vào các cây thân gỗ - đối tượng tiềm năng trong xử lý đất nhiễm As.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập được gen *Lsi2* từ cây lúa non (*Oriza sativa*) và ghép nối thành công vào vector chuyển gen pCB301 chứa đoạn trình tự c-myc-KDEL ở cuối gen. Cấu trúc pCB301/*Lsi2* đã được biến nạp vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và bước đầu đã thu được các dòng cây dương tính với phản ứng PCR. Đây là cơ sở khoa học cho việc tạo ra các dòng cây thân gỗ chuyển gen có khả năng vận chuyển và tích lũy As nhằm góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường đất.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài thuộc Nhiệm vụ nghiên cứu thường xuyên Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen - Viện Công nghệ sinh học "Nghiên cứu tăng cường khả năng hấp thụ và tích lũy arsen trên mô hình cây xoan (*Melu azedarach* Linn) bằng công nghệ gen" Các thí nghiệm được tiến hành có sự đồng trang thiết bị của Phòng Công nghệ Tế bào thực vật và Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen - Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alli H, Khan E, Sajad MA (2013) *Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications*. Chemosphere, 91: 869-881
- Cohen SM, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl. Acad. Sci USA, 69: 2110-2114
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF (2002) A rice mutant defective in Si uptake. Plant Physiol, 130: 2111-2117
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi K, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M (2006) A silicon transporter in rice. Nature, 440: 688-691
- McGrath SP, Zhao FJ (2003) *Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils*. Curr Opin Biotechnol, 14: 277-282.
- Meharg AA, Hartley-whitaker J (2002) *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species*. New Phytol, 154: 29-43.
- Meng YL, Liu Z, Rosen BP (2004) *As(III) and Sb(III) uptake by GfpF and efflux by ArsB in Escherichia coli*. J Biol Chem, 279: 18334-18341.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual* (third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Topping JF (1998) Tobacco transformation. In Foster GD and Taylor SC (ed.), *Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance*, vol. 81. Humana Press, Totowa, NJ: 365-485.
- Wei SH, Zhou QX, Kovl PV (2006) *Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator Solanum nigrum L. and their significance to phytoremediation*. Sci of the Total Env, 369, 441-446.
- Xu XY, McGrath SP, Zhao FJ (2007) *Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots*. New Phytol, 176:590-599.
- Zhou FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009) *Arsenic uptake and metabolism in plants*. New Phytol, 181: 777-794.
- Yao YG, Rosen BP (2009) *Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality*. Curr Opin Biotech, 20: 220-224

CONSTRUCTION OF BINARY VECTOR HARBORING *LSI2* GENE FOR INCREASING ASENIC TRANSPORT AND ACCUMULATION IN PLANTS

Bui Phuong Thao*, Hoang Thu Hang, Pham Bich Ngoc, Le Van Son, Chu Hoang Ha

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Arsenic (As) contamination in soils is increasingly concerned problem as its direct impact to human health and crops. Besides the traditional methods, the use of plants for As contaminated soil treatment (phytoremediation) is being widely applied technology by high efficiency as well as cost savings. However, the "hyper-accumulators" found in the nature usually have low biomass. In order to overcome this limitation, it is needed to generate genetically modified plants which are able to accumulate As and produce large biomass. Silicon efflux transporter (*Lsi2*) is an important protein in the transport process of As from the roots up to the shoots through xylem tissues in plants. Increased expression of *Lsi2* protein-coding gene in transgenic plants will increase the transport of As from roots to shoots and therefore enhance As accumulation in plants. In this paper, we isolated *Lsi2* gene from immature rice (*Oriza sativa*) and successfully ligated into binary vector pCB301. The pCB301/*Lsi2* construct was transformed into tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* and initially obtained transgenic lines positive with PCR reaction. This is the scientific basis for the generation of transgenic forest trees which have the ability in As transport and accumulation to contribute to solve the polluted soil problem.

Keywords: *Agrobacterium*, arsenic transport, binary vector, *Lsi2*, tobacco

* Author for correspondence: Tel. +84-4-37916003; Email: buithao.85@gmail.com