

PHÂN LẬP SUSI PROMOTER TỪ CÂY NGŨ VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN MÃ HÓA *CRYIA(C)* DƯỚI SỰ ĐIỀU KHIỂN CỦA SUSI PROMOTER

Huyền Thị Thu Huệ¹, Lê Thị Nguyên Bình¹, Nguyễn Thị Tinh², Bùi Thị Tuyết¹, Lê Thị Thu Hiền¹, Nông Văn Hải¹

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

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Hiện nay, trong công nghệ gen thực vật, các promoter đặc hiệu được sử dụng rộng rãi để điều khiển biểu hiện gen ngoại lai trong các cây trồng chuyển gen. Promoter của gen mã hóa sucrose synthase1 (*Sus1*) của ngô đã được chứng minh trên cây thuốc lá chuyển gen là một promoter đặc hiệu ở tế bào phloem và có thể sử dụng trong các nghiên cứu chuyển gen nhằm biểu hiện các tính trạng ở phloem. Ở Việt Nam, *Sus1* promoter đã được nghiên cứu và phân lập từ cây lúa. Đồng thời, gen *cryIA(c)* đã được sử dụng khá nhiều trong các nghiên cứu phục vụ mục đích chuyển gen kháng sâu và cho thấy có hiệu quả cao trong việc làm tăng tính kháng sâu cho cây trồng. Trong nghiên cứu này, với mục đích phân lập một promoter đặc hiệu phloem phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen kháng sâu cho cây ngô, chúng tôi đã phân lập *Sus1* promoter từ cây ngô và thiết kế vector biểu hiện thực vật chứa *Sus1* promoter và gen *cryIA(c)*. *Sus1* promoter được phân lập có độ dài 1116 bp, với các hộp TATA ở vị trí - 55 và hộp CCAAT ở vị trí - 136 so với vị trí khởi đầu dịch mã và có độ tương đồng là 100% so với trình tự đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số L 29418.1. Trên cơ sở vector pRTRA7/3 đã được thiết kế chứa 35S promoter và gen *cryIA(c)*, chúng tôi đã tiến hành thay thế 35S promoter bằng *Sus1* promoter. Sau đó, kết cấu vector biểu hiện bao gồm *Sus1* promoter, đoạn mã hóa signal peptide, gen *cryIA(c)* nối với trình tự mã hóa codon peptide emyc-KDEL và vùng terminator đã được cắt ra từ vector pRTRA7/3 và chuyển vào Ti-plasmid pCB301 để tạo vector chuyển gen pCB301+*Sus1*+*cryIA(c)*. Vector này đã được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) và sử dụng như nguồn nguyên liệu có giá trị cho nghiên cứu chuyển gen vào ngô cũng như các cây trồng khác.

Từ khóa: *Sus1* promoter, gen *cryIA(c)*, cây ngô (*Zea mays* L.), thiết kế vector, chuyển gen thực vật

MỞ ĐẦU

Trong nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen thực vật, ngoài việc tìm kiếm phân lập các gen quy định cho các tính trạng có giá trị thì việc tìm kiếm phân lập các promoter cũng rất cần thiết để tăng cường mức độ biểu hiện đặc hiệu của gen. Trước đây, các gen quan tâm thường được điều khiển bởi các promoter cơ định như: CaMV 35S-promoter, Actin promoter, NOS promoter, Ubiquitin promoter... dẫn đến sản phẩm gen được biểu hiện hầu hết ở các mô và cơ quan. Xu hướng hiện nay là sử dụng các promoter đặc hiệu để điều khiển gen ở những mô mong muốn hoặc trong các giai đoạn phát triển nhất định của cây. Promoter của gen mã hóa sucrose synthase1 (*Sus1*) của ngô đã được chứng minh trên cây thuốc lá chuyển gen là một promoter đặc hiệu ở tế bào phloem. Vì vậy, *Sus1* promoter của ngô có thể sử dụng trong các nghiên cứu chuyển gen nhằm biểu hiện các tính trạng ở phloem (Yang *et al.*, 1990). Ở Việt Nam, promoter của gen mã hóa sucrose

synthase1 đã được phân lập ở hai giống lúa Tám xoan và Dẻ thơm nhằm mục đích làm nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyển gen cho lúa (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2007).

Các gen *cry* được phân lập từ các chủng *Bacillus thuringiensis* (Bt). Có khoảng 150 gen mã hóa cho các protein tinh thể độc có tác dụng với một số loại sâu. Trong các độc tố *Cry*, *CryIA(c)* là một trong những protein được nghiên cứu kỹ, nổi bật với độc tính kháng sâu mạnh, chống lại côn trùng bộ cánh vẩy. Trên thế giới, việc thiết kế vector chuyển gen thực vật mã hóa protein gây độc cho côn trùng có nguồn gốc từ Bt được bắt đầu từ những năm đầu của thập kỷ 20. Đến năm 2002, cây trồng chuyển gen có khả năng sinh ra các độc tố kháng sâu có nguồn gốc Bt đã được trồng trên 62 triệu hecta trên toàn thế giới (Tabashnik *et al.*, 2003). Gen *cry* đã chuyển vào nhiều cây trồng như: *cryIA(b)* vào cây thuốc lá, gen *cryIA(c)* vào cà chua, đậu tương, lúa, bông (Cheng *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 2002, Ranjekar *et al.*, 2003). Ở Việt Nam, việc nghiên cứu

thiết kế vector chứa gen kháng sâu được tiến hành khá nhiều. Gen *cryIA(c)* đã được chuyển vào vector chuyển gen thế hệ mới dưới sự điều khiển của Ubiquitin promoter phục vụ nghiên cứu chuyển gen vào lúa (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2004) và được thiết kế trong vector pCB301 dưới sự điều khiển của 35S promoter để kiểm tra biểu hiện trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* nhằm phục vụ nghiên cứu chuyển gen cho cây lâm nghiệp (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2008). Tuy nhiên, với từng loại cây trồng thì việc thiết kế vector chuyển gen vẫn cần được thực hiện để tối ưu cho phù hợp với đặc điểm của mỗi loài. Đồng thời, khả năng kháng sâu ở cây chuyển gen cũng cần phải có tính đặc hiệu cho phù hợp với tình trạng sâu bệnh ở mỗi loại cây trồng.

Vì vậy, trong nghiên cứu này, với mục đích phân lập một promoter đặc hiệu phloem phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen kháng sâu cho cây ngô, chúng tôi đã phân lập *Sus1* promoter từ cây ngô và thiết kế vector biểu hiện thực vật chứa *Sus1* promoter và gen *cryIA(c)*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đòng ngô Q411 do Viện Nghiên cứu Ngô cung cấp, được gieo trong phòng thí nghiệm để lấy mầm làm nguyên liệu tách DNA tổng số. Vector tái tổ hợp pRTRA7/3 mang gen *cryIA(c)* dưới sự điều khiển của 35S promoter do Phòng Công nghệ ADN Ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học thiết kế. Vector tách dòng pJET1.2/blunt được mua từ hãng Fermentas. Các chủng vi khuẩn được sử dụng là: *E. coli* DH5 α

và *A. tumefaciens* C58 (pGV2260).

Các cặp primer để nhân đoạn *Sus1* promoter từ ngô được thiết kế với trình tự trong bảng 1.

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu: Các enzyme hạn chế, Taq DNA polymerase, DNA ligase, thang DNA chuẩn, dNTP, GeneJET™ PCR cloning kit, agarose, BigDye Terminator, ampicilin (Amp), chloroform, isoamyl alcohol, tris, acetic acid EDTA, còn được đặt mua từ các hãng Fermentas (Mỹ), Gibco (Mỹ), Merck (Đức).

Phương pháp

DNA tổng số từ mầm ngô được tách chiết theo phương pháp sử dụng protease K của Becker và đồng tác giả (1995). 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).

PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 μ l bao gồm các thành phần sau: H₂O: 14,7 μ l, 1X PCR buffer; primer: 0,5 pmol mỗi loại, 0,3 μ l Taq polymerase; 1 mM dNTP: 2,5 μ l; 1 μ l DNA tổng số; Chu trình nhiệt như sau: 94°C: 30"; 30 chu kỳ bao gồm (94°C: 1"; 55°C: 45"; 72°C: 1'15") lặp lại 72°C ở 10"; giữ ở 4°C

Trình tự đoạn *Sus1* promoter được xác định theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977) trên máy ABI 3100 avant.

Bảng 1. Trình tự mỗi thiết kế

STT	Tên primer	Trình tự nucleotide
1	Suc F2	5'- GGGGCATACCGCAAACACCG -3'
	Suc R	5'- CAAGGAAACGCAACGCAGTG -3'
2	Zsuc-PstII F	5'- GCGCGCCTGCAGGGGCATACCGCAAACACCG -3' PstI
	Zsuc-NcoI R	5'- GCGCGCCCATGGTCCAAGGAAACGCAACGCAGTG- 3' NcoI

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

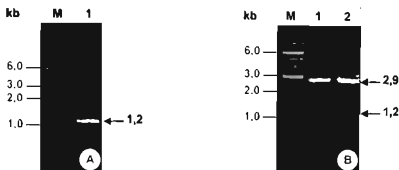
Phân lập *Sus1* promoter từ cây ngô

DNA tổng số sau khi được tách chiết và tinh sạch được sử dụng làm khuôn trong PCR như đã mô

tả ở phương pháp. Cặp primer SucF2 và SucR đã được thiết kế dựa trên trình tự đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế với mã số L 29418.1. Theo tính toán lý thuyết, với cặp primer này sẽ nhân được đoạn promoter có kích thước 1,2 kb. Kết quả trên

hình 1A cho thấy, sản phẩm PCR đặc hiệu khoảng 1,2 kb đúng với tính toán lý thuyết về kích thước của đoạn promoter cần nhận. Tiếp sau, để tách dòng đoạn Sus1 promoter, chúng tôi đã tiến hành gắn sản phẩm PCR vào vector pJet1.2/blunt và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Sau đó, 16 khuẩn lạc đơn được chọn để nuôi cấy và tách chiết DNA plasmid. Kết quả tách plasmid đã chọn được một dòng có kích thước cao hơn đôi chủng. Hình 1B thể hiện kết quả cắt plasmid với enzyme *Nco*I và *Xba*I, hai enzyme có

vị trí nhận biết trong vùng MCS, được lựa chọn để kiểm tra kết quả tách dòng gen trong vector pJet1.2/blunt. Kết quả đã cho thấy có đoạn 1,2 kb trong vector tái tổ hợp này. Như vậy, có thể thấy rằng sản phẩm PCR nhận đoạn Sus1 promoter đã được tách dòng trong vector pJet1.2/blunt. Sau đó, vector tái tổ hợp được sử dụng trong thí nghiệm xác định trình tự sử dụng cặp primer pJet1.2 forward sequencing primer và pJet1.2 reverse sequencing primer.



Hình 1. Phân lập Sus1 promoter từ dòng ngô Q411. A: M: Marker 1 kb, 1: sản phẩm PCR, B: M: Marker 1 kb, ĐC: pJet1.2/blunt mở vòng với *Nco*I và *Xba*I, 1: pJet1.2 chứa đoạn Sus1 promoter cắt với *Nco*I và *Xba*I.

Trình tự Sus1 promoter

Kết quả xác định và phân tích trình tự từ vector pJet1.2/blunt tái tổ hợp đã cho thấy đoạn chèn vào có kích thước 1116 bp, với các hộp TATA ở vị trí -55 và hộp CCAAT ở vị trí -136 so với vị trí khởi đầu dịch mã và có độ tương đồng là 100% so với trình tự đã công bố. Như vậy, từ kết quả phân tích trình tự có thể khẳng định Sus1 promoter đã được phân lập thành công từ dòng ngô Q411.

Thiết kế vector biểu hiện thực vật pCB301 chứa Sus1 promoter và gen *cryIA(c)*

Trên cơ sở vector trung gian pRTRA7/3 đã được thiết kế chứa gen *cryIA(c)*, đoạn Sus1 promoter được phân lập trong nghiên cứu này được chuyển vào để thay thế 35S promoter. Trong vector trung gian đã có mang kết cấu biểu hiện thực vật các vùng trình tự như 35S promoter, signal peptide hướng protein vào lưới nội chất, gen *cryIA(c)*, vùng mã hóa cho chuỗi peptide myc-KDEL liên kết với vùng terminator (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2008).

Chúng tôi đã thiết kế thêm một cặp primer có treo các điểm cắt của enzyme *Pst*I và *Nco*I là Zsuc-*Pst*IF và Zsuc-*Nco*IR thích hợp cho việc chuyển promoter vào vector trung gian pRTRA7/3 đã được

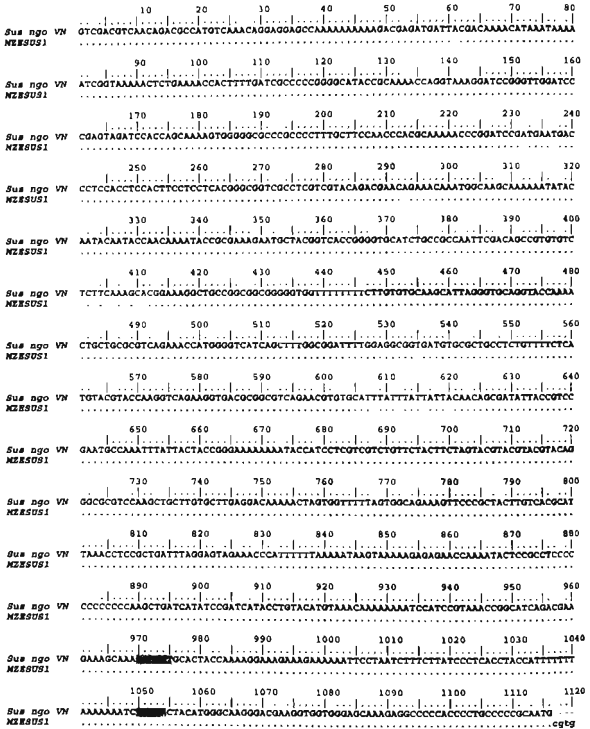
thiết kế chứa gen *cryIA(c)* và thay thế 35S promoter. Các bước tiến hành thí nghiệm được thực hiện theo sơ đồ thiết kế ở hình 3.

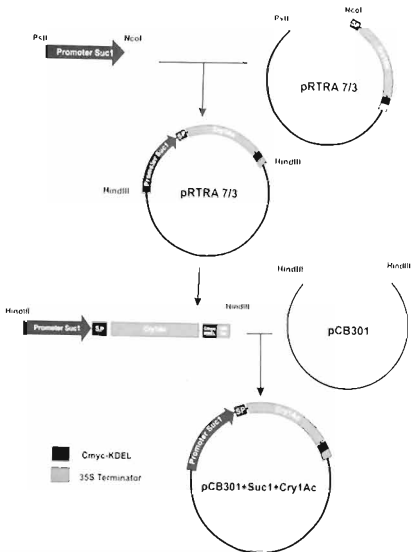
Trước tiên, đoạn Sus1 promoter được PCR lại với cặp mồi Zsuc-*Pst*IF và Zsuc-*Nco*IR từ khuôn là vector pJet1.2 tái tổ hợp. Sản phẩm PCR và vector pRTRA7/3 chứa gen *cryIA(c)* được cắt bằng *Pst*I và *Nco*I và tinh sạch qua cột. Sau đó, hai sản phẩm cắt này được ghép nối với nhau trong phản ứng lại dưới sự xúc tác của T4 DNA ligase. Bước này nhằm mục đích loại bỏ đoạn 35S promoter và gắn đoạn Sus1 vào vector pRTRA7/3 chứa gen *cryIA(c)*.

Sản phẩm lai này được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và tiến hành chọn dòng. Kết quả, chúng tôi đã chọn được một dòng plasmid pRTRA7/3 tái tổ hợp có kích thước cao hơn so với đôi chủng. Để kiểm tra kích thước đoạn chèn, plasmid này được cắt bằng *Pst*I và *Nco*I. Hình 4B đường chạy số 1 cho thấy đoạn DNA 1,1 kb đã được tạo ra từ việc cắt với enzyme đã dùng để ghép nối đoạn Sus1 promoter vào vector pRTRA7/3 tái tổ hợp, đoạn DNA có kích thước 4,7 kb là phần còn lại của vector. Điều này chứng tỏ đoạn Sus1 promoter đã được chuyển vào vector pRTRA7/3 chứa gen *cryIA(c)*. Như vậy, trong cấu trúc này đã có chứa Sus1 promoter và gen

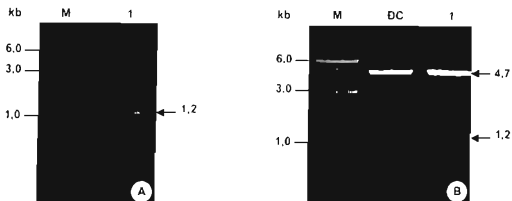
cryIAc trong kết cấu biểu hiện thể hiện ở sơ đồ thiết kế hình 3. Theo tính toán, đoạn kết cấu biểu hiện có kích thước khoảng 3.3 kb bao gồm *SusI* promoter, đoạn signal peptide, gen *cryIA(c)* nối với đoạn mã hóa cho peptide myc-KDEL và vùng terminator (ký hiệu pRTR+*SusI*+*cryIAc*). Dòng plasmid trên đã

được xác định trình tự nucleotide toàn bộ vùng kết cấu biểu hiện. Kết quả, *SusI* promoter và trình tự gen *cryIA(c)* nằm đúng theo khung đọc và các điểm kết nối vẫn được giữ nguyên nên chúng tôi tiến hành chuyển đoạn kết cấu biểu hiện đó vào vector pCB301.





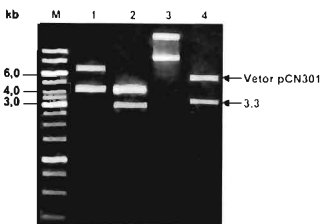
Hình 3. Sơ đồ thiết kế vector pCB301 mang gen *cryIac* và *Suc1* promoter



Hình 4. PCR nhận *Suc1* promoter và cắt vector pTRTA7/3 tái tổ hợp với enzyme *PstI* và *NcoI*. A: M Marker 1 kb, 1: PCR *Suc1* promoter từ pJet1.2/blunt sử dụng cặp primer *Zsuc-PstIF* và *Zsuc-NcoIR*; B: M: Marker 1 kb; DC: vector pTRTA7/3 cắt bằng *PstI* và *NcoI*; 1: vector pTRTA7/3 chứa *Suc1* promoter và gen *cryIac* cắt bằng *PstI* và *NcoI*

Để chuyển kết cấu biểu hiện này vào vector biểu hiện thực vật pCB301 thì toàn bộ kết cấu biểu hiện được cắt ra từ vector pRTRA+Sus1+*cryIAc* bằng *HindIII* và thu bằng DNA có kích thước 3,3 kb. Đồng thời, vector pCB301 cũng được cắt mở vòng với *HindIII*. Sản phẩm lai giữa đoạn 3,3 kb sau khi được tinh sạch qua cột với pCB301 đã mở vòng được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α và tiến hành chọn dòng. Kết quả kiểm tra bằng *HindIII* ở trên hai vector pRTRA+Sus1+*cryIAc* và pCB301+Sus1+*cryIAc* đều thu được một băng có kích thước 3,3 kb trùng với các tính toán lý thuyết và cho thấy đoạn 3,3 kb đã được chuyển vào vector pCB301 (Hình 5).

Như vậy, chúng tôi đã chọn được một dòng pCB301 mang kết cấu biểu hiện chứa Sus1 promoter, đoạn mã hóa signal peptide, gen *cryIAc* nối với đoạn mã hóa cho peptide cmyc-KDEL và vùng terminator (ký hiệu pCB301+Sus1+*cryIAc*).



Hình 5. Kiểm tra Sus1 promoter và gen *cryIAc* trong vector pCB301 bằng *HindIII*. M: Marker 1 kb; 1: vector pRTRA7/3 tái tổ hợp không cắt; 2 pRTRA7/3 cắt với enzyme *HindIII*; 3 vector pCB301 tái tổ hợp tái tổ hợp không cắt; 4: vector pCB301 chứa Sus1 promoter và gen *cryIAc* cắt với *HindIII*.

Với việc phân lập được đoạn Sus1 promoter từ dòng ngô Q411 của Việt Nam, chúng tôi đã chủ động được nguồn nguyên liệu về promoter cần thiết cho các nghiên cứu chuyển gen sau này, đặc biệt khi có nhu cầu cần biểu hiện tính trạng mong muốn ở các tế bào phloem. Việc biểu hiện gen ngoại lai trong cây trồng sẽ được thuận lợi hơn khi gen đó được điều khiển bởi chính promoter có cùng nguồn gốc với cây được chuyển gen. Vì vậy, cấu trúc pCB301+Sus1+*cryIAc* được tạo ra có Sus1

promoter được phân lập từ ngô sẽ rất có giá trị cho việc biểu hiện gen *cryIAc* ở cây ngô chuyển gen. Ngoài ra, cấu trúc này vẫn có thể sử dụng được trong các nghiên cứu chuyển gen nhằm tăng cường khả năng kháng sâu cho các cây trồng khác. Như đã đề cập, đoạn gen *cryIAc* trong nghiên cứu có gắn với tinh tự mã hóa cho đoạn peptide cmyc-KDEL nên rất thuận lợi cho việc kiểm tra sự điều khiển của Sus1 promoter đối với sự biểu hiện của gen *cryIAc* trong cây chuyển gen bằng lai western với kháng thể kháng cmyc. Như vậy, việc phân lập được Sus1 promoter từ cây ngô và thiết kế được vector pCB301+Sus1+*cryIAc* đã tạo được nguồn nguyên liệu có giá trị cho các nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được Sus1 promoter từ dòng ngô Q411 của Việt Nam và xác định được trình tự của Sus1 promoter với kích thước 1116 bp. Đã thiết kế được vector tái tổ hợp pCB301+Sus1+*cryIAc* mang Sus1 promoter, gen *cryIAc* và đoạn mã hóa peptide cmyc-KDEL để thuận lợi cho xác định cây chuyển gen. Đã tạo được chủng *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) mang vector pCB301+Sus1+*cryIAc*+cmyc-KDEL phục vụ cho việc chuyển gen kháng sâu vào ngô và một số cây trồng khác ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí đề tài mã số CNSH.ĐT.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 trọng điểm Công nghệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker C, Shutov AD, Nong Van Hai, Senyuk VI, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen NC, Muntz K (1995) Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B - an asparagine - specific endopeptidase. *Eur J Biochem* 228: 456-463.
- Cheng X, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I (1998) *Agrobacterium* - transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2767-2772.

Huỳnh Thu Huệ, Trần Thị Ngọc Diệp, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải (2008) Thiết kế vector và kiểm tra biểu hiện của gen *CryIA(c)* trên cây thuốc lá *Nicotiana Benthamiana*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4): 1-6.

Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hải Hà, Đào Thị Thu Hà, Vũ Hải Chi, Nguyễn Việt Cường, Nông Văn Hải (2007) Phân lập và xác định trình tự đoạn điều khiển của gen tổng hợp đường (*Rsuc1* – promoter) từ các giống lúa Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 57-67.

Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thùy Dương, Đào Thị Thu Hà, Huỳnh Thị Thu Huệ, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải (2004) Thiết kế vector thể hệ mới mang gen kháng côn trùng *cryIA(c)* để chuyển vào cây trồng. *Tạp chí Công nghệ Sinh*

học 2(1): 85-92

Ranjekar PK, Patankar A, Gupta V, Bhatnagar R, Bentur J, Kumar PA (2003) Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Curr Sci* 84(3): 321-329.

Tabashnik BE, Carriere Y, Dennehy TJ, Morin S, Sisteropn MS, Roush RT, Shelton AM, Shelton AM, Zhao JZ (2003) Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. *Econ Entomol* 96 (4): 1031-1038.

Yang NS, Russell D (1990) Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of *gus* gene in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4144-4148.

ISOLATION OF SUS1 PROMOTER FROM MAIZE AND CONSTRUCTION OF A PLANT TRANSFORMATION VECTOR CONTAINING SUS1 PROMOTER AND *CryIA(C)* GENE

Huỳnh Thị Thu Huệ¹, Lê Thị Nguyễn Bình¹, Nguyễn Thị Tinh², Bùi Thị Tuyet¹, Lê Thị Thu Hiền¹, Nông Văn Hải^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

SUMMARY

In the field of plant gene technology, specific promoters are widely used for the expression of exogenous genes in transgenic plants. Promoter of the gene encoding sucrose synthase 1 (*Sus1*) from maize is a phloem-specific as demonstrated in transgenic tobacco plants and can be used in plant transgenic studies to express desired proteins in phloem. Previously, we have isolated *Sus1* promoter from rice and constructed expression vectors containing target genes placed under the control of this promoter. One of the genes of interest, *cryIA(c)*, was transferred into many plants for the purpose of improving its insect resistance. In this study, we aimed at isolating *Sus1* promoter from maize and construction of plant expression vector harboring this promoter and *cryIA(c)* gene for use in maize transformation studies. *Sus1* promoter isolated was 1116 bp in length, with the TATA and CCAAT boxes at positions - 55 and - 136 from the initiation codon, respectively. This sequence was 100% identical with that of the published sequence L29418.1. Using pRTRA7/3 expression vector containing 35S promoter and the *cryIA(c)* gene, we firstly replaced 35S promoter with *Sus1* promoter and then cut the cassette containing *Sus1* promoter, the signal peptide encoding part, and *cryIA(c)* gene from pRTRA7/3 to fuse with the coding sequence of the *cmv* – KDEL peptide and terminator region of the pCB301 Ti-plasmid. The new created recombinant Ti-plasmid pCB301+*Sus1*+*CryIA(c)* was transformed into *A. tumefaciens* strain C58 (pGV2260), and could be used as a valuable material in genetic engineering applications on maize and other crops.

Keywords: *cryIA(c)* gene, maize (*Zea mays L.*), plant transformation, *Sus1* promoter, vector construction

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-8363222; E-mail yhnong@ibt.ac.vn