

KẾT QUẢ CHUYỂN GEN *GUS* VÀO CÂY LÚA VỚI SỰ ĐIỀU KHIỂN CỦA CÁC PROMOTER KHÁC NHAU

Đoàn Thu Thủy¹, Trương Quốc Căn¹, N Baiskh², O Normal², SW Datta²

¹Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam(VAAS)

²Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI), Philippines

TÓM TẮT

Việc nghiên cứu và đánh giá sự hoạt động của các promoter để chọn ra một promoter thích hợp cho quá trình chuyển một gen nhất định vào trong cây lúa sẽ góp phần làm tăng giá trị của cây lúa chuyển gen. Hoạt động của 4 promoter (Rd29A, Gt1, RCg2 và CaMV35S) trong việc điều khiển quá trình tổng hợp của các gen chuyển trong cây lúa đã được nghiên cứu thông qua sự biểu hiện của gen *gus* (*beta-glucuronidase*). Kết quả cho thấy, các promoter khác nhau không có ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành callus và khả năng tái sinh cây. Sự biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở phôi non của lúa sau khi bắn gen cũng không phụ thuộc vào promoter được chuyển. Màu xanh đặc trưng của *gus* được thể hiện trên phôi non mới được chuyển gen ở tất cả các công thức. Trong khi đó, sự biểu hiện bền vững của *gus* chỉ quan sát được ở cây lúa chuyển gen với sự điều khiển của promoter RCg2. Trong số các cây lúa chuyển gen thu được ở thế hệ T₀, 11 cây có biểu hiện sự hoạt động của gen *gus* với sự điều khiển của promoter RCg2. Kết quả phân tích ở mức độ phân tử thông qua kỹ thuật PCR và lai Southern blot đối với những cây thế hệ T₀ này cũng đều thấy sự có mặt của gen *gus* tại 1,1 kb và gen *hph* tại 0,76 kb, trong khi ở cây đối chứng là không có.

Từ khóa: Cây lúa chuyển gen, gen *gus*, promoter, súng bắn gen

MỞ ĐẦU

Công nghệ chuyển gen là một trong những thành công mới của công nghệ sinh học và đã tạo ra một cuộc cách mạng mới trong công tác chọn tạo giống cây trồng, vật nuôi. Có nhiều phương pháp chuyển gen vào cây trồng như sử dụng súng bắn gen, thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* hoặc chuyển gen thông qua tế bào trần... (Potrykus, 1990; Datta, 1998). Đối với lúa, phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen vẫn là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất và là phương pháp cho tỷ lệ cây chuyển gen thành công cao nhất hiện nay.

Đối với các gen được chuyển, bên cạnh tính chất mà gen đó quy định thì sự thể hiện của gen đó ở vị trí nào trong cây được chuyển cũng rất quan trọng. Trong cây chuyển gen, sự thể hiện của các gen được chuyển chịu sự điều khiển trực tiếp của promoter, vì thế việc sử dụng promoter phù hợp có vai trò quyết định thành công của việc chuyển gen mong đợi cũng như khả năng sử dụng của cây chuyển gen đó; và việc thiết kế, lựa chọn promoter sao cho sự thể hiện của gen được phù hợp với mục đích mà nhà tạo giống mong đợi là phần không thể thiếu được trong quá trình chuyển gen. Vì promoter sẽ điều khiển quá trình tổng hợp DNA của các đoạn gen ngoại lai, do

đó mà thông qua sự biểu hiện của các gen được chuyển trong cây có thể so sánh sự khác nhau của các promoter một cách trực tiếp (Lu *et al.*, 1998). Phương pháp phổ biến nhất để đánh giá sự điều khiển của promoter là thông qua việc sử dụng gen chỉ thị (Jefferson *et al.*, 1987), trong đó gen *gus* là một trong những gen chỉ thị được sử dụng rộng rãi nhất. Với mục đích đánh giá sự điều khiển của các promoter khác nhau, hoạt động của 4 promoter (Rd29A, Gt1, RCg2, và CaMV35S) trong việc điều khiển quá trình tổng hợp của các gen chuyển trong cây lúa đã được nghiên cứu thông qua sự biểu hiện của gen *gus* (*beta-glucuronidase*), dưới đây là một số kết quả bước đầu đã đạt được sau khi tiến hành thí nghiệm

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Giống lúa được sử dụng là IR68144 thuộc loài phụ *Indica* có năng suất cao và chứa hàm lượng sắt cao được chọn tạo và đang được lưu giữ tại Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI), Philippines.

Các Promoter: CaMV35S- *Cauliflower mosaic*

virus (Kozziel *et al.*, 1993) điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển ở tất cả các bộ phận của cây, được sử dụng rộng rãi trong chuyển gen vào cây trồng. Promoter Rd29A điều khiển sự biểu hiện khả năng chống chịu của cây (Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Promoter Gt1 điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển ở nội nhũ hạt (Okita *et al.*, 1989). Promoter RCg2 điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển ở rễ (Yong Xu *et al.*, 1995).

Cấu trúc plasmid

ProB5 + PGH1 (CaMV35S) 35SP/gus/NosT/35ST/hph/35SP/.

ProB5 29A210 (Rd29)/Rd29P/gus/3'OCST/35ST/hph/35SP/.

ProB5 Glugus (Gt1)/GluP/gus/NosT/35ST/hph/35SP/.

ProB5 pVXa98 (RCg2)/RCg2P/gus/3' ocsT/35ST/hph/35SP/.

Phương pháp

Chuyển gen bằng súng bắn gen và tái sinh cây

Súng bắn gen Bio-Rad 1000/He được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần đối với từng promoter. Phôi non của hạt lúa sau khi thụ phấn 8 - 10 ngày được tách ra và sử dụng cho bắn gen. 100 - 120 phôi non được xếp trên môi trường MS (3% saccharose, 2 mg/l 2,4D, 100 mg/l cefatoxime) theo vòng tròn bán kính khoảng 1 cm. Phôi non sau khi bắn gen được chuyển sang môi trường chọn lọc có chứa 50 mg/l hygromycin B và để trong phòng tối. Mô sẹo hình thành được chuyển sang môi trường tái sinh cây MS (Murashige, Skoog, 1962). Cây chuyển gen thế hệ T₀ được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR sẽ chuyển đến trồng ở nhà lưới.

Xác định sự biểu hiện của gen gus bằng phương pháp thử với cơ chất sinh màu

Năm phôi lúa non được chọn ngẫu nhiên trên mỗi đĩa petri sau khi chuyển gen bằng súng bắn gen, sau đó ngâm trong dung dịch X-gluc, ủ ở 37°C trong 24 h và đếm số phôi thể hiện màu xanh và số chấm màu xanh trên phôi non đó.

Mô (lá, thân, rễ, hạt) cây lúa thế hệ T₀ được cắt nhỏ thành từng đoạn và được ngâm trong dung dịch X-gluc rồi ủ ở 37°C trong 24 h. Đếm số cây lúa có

mô biểu hiện màu xanh và chuyển những cây này ra trồng ở nhà lưới.

Xác định gen chuyển bằng phương pháp phân tử

Tách DNA tổng số: DNA được tách theo quy trình của Dellporta và đồng tác giả (1983)

Kỹ thuật PCR: 10 ng DNA mẫu, 50 ng cho một primer, 0,16 mM dNTPs, PCR buffer (10 mM Tris, pH = 8,4, 50 mM KCl và 15 mM MgCl₂), 1 đơn vị Taq polymerase, lên thể tích 25 ml với nước cất. Chu kỳ phản ứng 36 vòng ở 4°C: Bước 1: 94°C trong 5 phút; Bước 2: 94°C trong 30 giây; Bước 3: 55°C trong 30 giây; Bước 4: 72°C trong 1 phút. Bước 5: 4°C. ∞

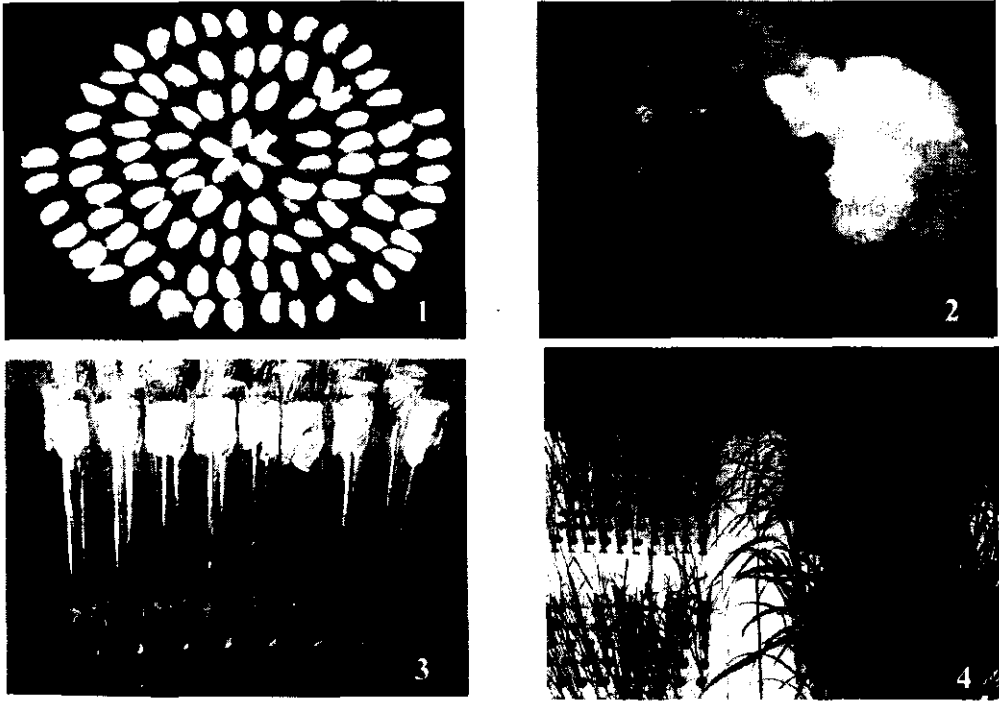
Phản ứng Southern blot: 10 µg DNA được cắt bằng các enzyme hạn chế. Các DNA sau khi cắt được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel agarose ở 20V trong 1X TAE (12 h). DNA sau đó được chuyển đến màng nylon HybondN⁺. Màng này được lai với mẫu dò đã được đánh dấu phóng xạ. Các mẫu dò này được chuẩn bị theo phương pháp dùng môi ngẫu nhiên, với đồng vị α [³²P] d CTP và hệ thống đánh dấu Rediprime (Amersham). Sau khi lai, màng này được rửa hai lần trong dung dịch 2 X SSC, 0,1% SDS trong vòng 10 phút, rửa lại một lần trong dung dịch 0,2 X SSC, 0,1% SDS trong 15 phút, và một lần trong dung dịch 0,1X SSC, 0,1% SDS trong vòng 15 phút. Sau đó, màng được chiếu bằng phim X-ray.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tái sinh cây lúa

Việc nuôi cấy các phôi lúa non sau khi chuyển gen là một yêu cầu bắt buộc, đặc biệt là đối với các giống thuộc loài phụ indica (Datta *et al.*, 1998). Phôi non sau khi bắn gen được đặt trên môi trường tạo callus có chứa 50 mg/l hygromycin B nhằm sàng lọc và tái sinh cây con (hình 1).

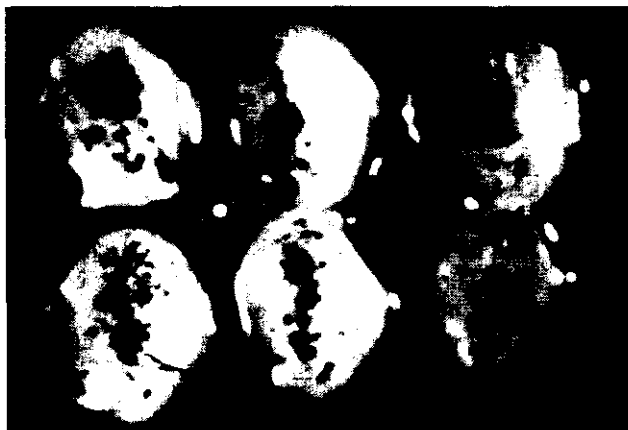
Trong số liệu ở bảng 1, số lượng cây con tái sinh từ các phôi non được chuyển gen với các plasmid 29A210, Glugus, pVXa98 lần lượt là 20, 25 và 30 trong khi số lượng cây con được tái sinh ở công thức với CAMV35S là 15. Như vậy, cả 3 plasmid được đánh giá đều cho số lượng cây con tái sinh nhiều hơn so với sử dụng plasmid CAMV35S. Trong tất cả các công thức, cây lúa tái sinh đều phát triển bình thường.



Hình 1. 1. Phôi non chuẩn bị bắn gen; 2. Callus phát triển trên môi trường chọn lọc; 3. Cây lúa tái sinh trong ống nghiệm; 4. Cây lúa trồng trong nhà lưới.

Bảng 1. Cây lúa tái sinh từ phôi lúa non sau khi chuyển gen bằng súng bắn gen.

Plasmid	Promoter/nơi thể hiện	Số lượng phôi non ban đầu	Số lượng callus hình thành	Số lượng cây tái sinh
PROB5 + PGH1 (Đ/C)	CAMV35S/Tất cả các mô	500	200	15
PROB5 + 29A210	RD29/Tất cả các mô	548	128	30
PROB5 + GLUGUS	GT1/Nội nhũ	570	65	20
PROB5 + PVXA98	RCG2/rễ	564	118	25



Hình 2. Phôi lúa non sau khi bắn gen được ngâm trong dung dịch X-gluc.

Kết quả đánh giá sự biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở trong phôi lúa non

Kết quả phép thử với cơ chất sinh màu cho thấy, ở tất cả các công thức đều có sự biểu hiện của gen *gus* trong phôi non sau khi chuyển thông qua sự xuất hiện màu xanh đặc trưng khi nhuộm màu với *X-gluc*. Điều này chứng tỏ các promoter khác nhau không ảnh hưởng đến sự biểu hiện tạm thời của *gus*. Tuy nhiên, số lượng của các chấm xanh trên phôi non ở các công thức là khác nhau (bảng 2). Số lượng trung bình các chấm màu xanh đạt cao nhất ở các phôi lúa non được chuyển gen với sự điều khiển của promoter Gt1 (5,9 chấm xanh/phôi) và thấp nhất ở promoter CAMV35S và RD29 (3,7 và 3,3 chấm xanh/phôi). Chúng tôi chỉ quan tâm đến

những phôi non có màu xanh (Hình 2) và được đánh giá là có mặt của gen *gus*.

Kết quả phân tích sự biểu hiện bền vững của gen *gus* trong cây lúa chuyển gen

Thân, lá, rễ của cây lúa thế hệ T₀ đã được ngâm trong dung dịch *X-gluc* và kết quả trình bày ở bảng 3. Sự chuyển màu của mô cây sang màu xanh đặc trưng chỉ quan sát được ở trong cây lúa chuyển gen dưới sự điều khiển của promoter RCg2 (11 cây). Có thể nói rằng, gen *gus* chỉ biểu hiện ở cây lúa (T₀) được tái sinh từ phôi lúa non được chuyển gen với sự điều khiển của promoter RCg2. Ở đây, mức độ biểu hiện màu xanh gen của *gus* là rất đậm chứng tỏ sự điều khiển hoạt động mạnh của promoter RCg2.

Bảng 2. Sự biểu hiện của gen *gus* trong phôi lúa non sau khi bắn gen.

Thí nghiệm	CAMV35S		RD29		GT1		RCG2	
	Số chấm màu xanh	Số phôi non màu xanh	Số chấm màu xanh	Số phôi non màu xanh	Số chấm màu xanh	Số phôi non màu xanh	Số chấm màu xanh	Số phôi non màu xanh
1	-	-	86	30	170	23	22	7
2	22	6	150	37	1	1	93	18
3	-	-	6	6	60	15	-	-
Tổng số	22	6	<u>242</u>	73	<u>231</u>	39	<u>115</u>	25
Số chấm xanh trung bình/phôi non	3,7		3,3		5,9		4,6	

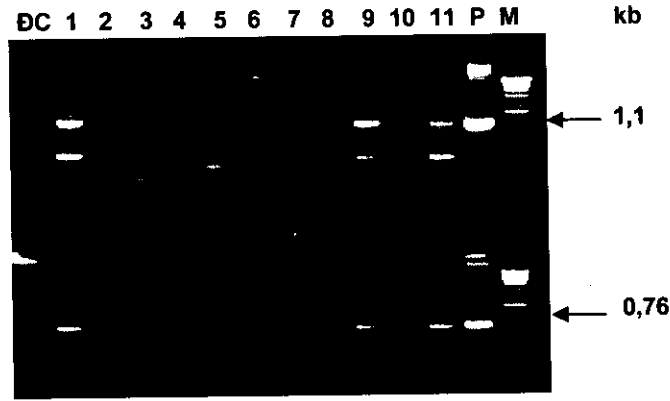
Bảng 3. Sự biểu hiện của gen *gus* ở cây lúa tái sinh (T₀) với dung dịch X-gluc.

Plasmid	Promoter	Số cây tái sinh	Số cây màu xanh
PROB5 + PGH1	CAMV35S	15	0
PROB5 + 29A210	RD29	30	0
PROB5 + GLUGUS	GT1	20	0
PROB5 + PVXA98	RCG2	25	11

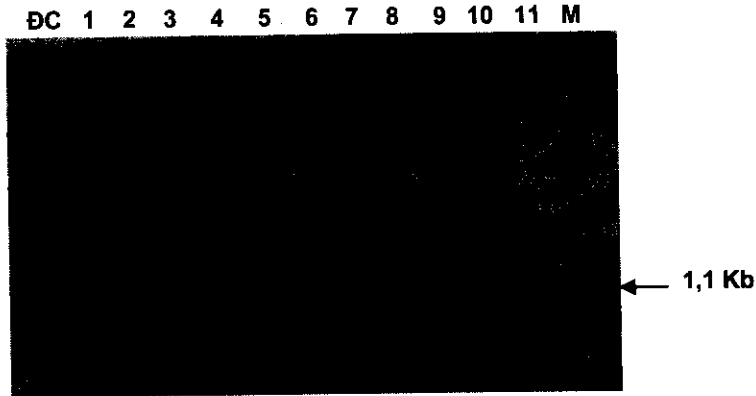
Đánh giá sự biểu hiện của gen *gus* ở mức độ phân tử

Lá của 11 cây lúa chuyển gen thế hệ T₀ (từ những cây có màu xanh sau khi ngâm trong dung dịch X-gluc) được sử dụng làm vật liệu tách chiết DNA để phân tích và đánh giá biểu hiện của gen *gus* và hygromicine (*hph*).

Kết quả PCR cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện vạch đặc trưng của gen chuyển *hph* ở vị trí 1,1 kb và gen chỉ thị *gus* ở vị trí 0,76 kb, trong khi đó ở những cây lúa đối chứng không có sự xuất hiện của các vạch băng DNA này (Hình 3). Như vậy ở mức độ phân tử có thể nhận thấy rằng, gen *gus* đã được chuyển thành công vào cây lúa.



Hình 3. Kết quả PCR về sự biểu hiện của gen *gus* (1,1 kb) và *hph* (0,76 kb).ĐC: Cây đối chứng; M: Marker; P: đối chứng dương; 1 - 11: DNA của cây lúa.



Hình 4. Kết quả lai Southern blot. ĐC: Cây chưa chuyển gen; 1 - 11: Cây lúa chuyển gen thế hệ T₀, M: Marker.

Kết quả lai Southern blot

Kết quả lai Southern (hình 4) đã khẳng định kết quả của PCR. Ở tất cả các cây lúa chuyển gen T₀ đều thấy xuất hiện vạch đặc trưng tại vị trí 1,1 kb chứng tỏ sự có mặt của gen *gus* trong cây lúa chuyển gen dưới sự điều khiển của promoter RCg2, trong khi ở cây đối chứng không quan sát được vạch này.

KẾT LUẬN

Với kết quả thu được trong thí nghiệm trên, chúng tôi có nhận xét như sau:

Trong quá trình chuyển gen vào cây trồng, promoter CaMV35S là một promoter hoạt động mạnh và được sử dụng phổ biến đối với cây hai lá

mầm, tuy nhiên trong nghiên cứu này CaMV35S tỏ ra không hiệu quả đối với cây lúa.

Kết quả của việc chuyển gen chỉ thu được cây lúa chuyển gen thế hệ T₀ dưới sự điều khiển của promoter RCg2 (11 cây). Việc biểu hiện của gen *gus* thông qua phản ứng hóa mô và các phương pháp phân tích phân tử (PCR, Southern blot) khẳng định sự có mặt của các gen được chuyển vào trong cây lúa (*gus* 1,1 kb, *hph* 0,67 kb) chứng tỏ sự điều khiển của promoter RCg2 trong cây lúa chuyển gen là mạnh.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ dự án Golden Rice của Viện Nghiên cứu Lúa Quốc Tế (IRRI), Philippines dưới sự hướng dẫn của Dr. SW Datta và Dr. N Baishk

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Datta K, Vasquez A, Tu J, Torrizo L, Alam MF, Oliva N, Abrigo E, Khush GS, Datta SK (1998) Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet* 97: 20-30.

Dellaporta SJ, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol Biol* 1: 19-21.

Jefferson RA, Kavanah TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.

Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Lauris K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wrights M, Evola ST (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

Physiol Plant 15: 473-497.

Okita TW, Hwang YS, Hnilo J, Kim WT, Aryan AP, Larson R, Krishnan HB (1989) Structure and expression of the rice glutelin multigene family. *Biol Chem* 264: 12573-12581,

Peter Lu H, Luying Xun, Suney Xie X (1998) Single-Molecular EnZymtic Dynamics. *Science* 4: 1877-1882.

Potrykus I (1990) Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535-542.

Takaiwa F, Oono K (1991) Genomic DNA sequences of 2 new gens for new storage protein glutelin in rice. *Jpn J Gent* 66: 161-171.

Yamaguchi-shiozaki K, Shinozaki K (1999) Improving drought, salt, and freezing stress tolerant using a single gene for a stress inducible transcription factor in transgenic plants. *Genetic Improvement of rice for the water-limited environments. Proceedings of the Workshop on Genetic Improvements of Rice for Water-limited Environments, 1-3 December 1998, Los Banos, Philippines. International Rice Research Institute: 353.*

Yong X (1995) Characterization of a rice gene family encoding root-specific protein. *Plant Mol Biol* 27: 237-248.

EXPRESSION OF *GUS* GENE IN INDICA RICE (*ORYZA SATIVA* SSP. INDICA) DRIVEN BY DIFFERENT PROMOTER

Doan Thu Thuy^{1*}, Truong Quoc Can¹, N Baikh², O Normal², SW Datta²

¹Vietnam Academy of Agricultural Science Institute (VAAS)

²International Rice Research Institute (IRRI), Philippines

SUMMARY

The expression of *gus* gene (the *UidA* gene of *Escherichia coli* that encodes enzyme β -glucuronidase) was studied to analyze the regulation of four promoters including *CaMV35S*, *Rd29A*, *G11* and *RCg2*. Results showed that different promoters gave no significant effect on the process of biolistics in terms of callus formation and plant regeneration. The temporary expression of *gus* gene in embryo was observed in all treatments. However, stable expression of *gus* gene was observed in transformed plants when controlled by *RCg2* promoter only. Among the transformed (T_0) plants, expression of *gus* gene under control of *RCg2* promoter was observed in 11 plants. Results from molecular analysis on these 11 plants using PCR and Southern blot confirmed the presence of *gus* gene at 1.1 kb and *hph* gene at 0.76 kb, which was not observed in non-transformed plants.

Keywords: Biolistic, gene transformastion, *gus* gene, promoter, transgenic rice

* Author for correspondence: Tel: 0982071507; E-mail: thuydtvasi@yahoo.com