

## PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ ĐOẠN ĐIỀU KHIỂN CỦA GEN TỔNG HỢP ĐƯỜNG (RSUC1-PROMOTER) TỪ CÁC GIỐNG LÚA VIỆT NAM

Lê Thị Thu Hiền<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hải Hà<sup>1</sup>, Đào Thị Thu Hà<sup>1</sup>, Vũ Hải Chi<sup>1</sup>, Nguyễn Việt Cường<sup>1</sup>, Nông Văn Hải<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học

<sup>2</sup>Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia, Hà Nội

### TÓM TẮT

Promoter của gen mã hóa sucrose synthase 1 của cây lúa (Rsucl-promoter) đã được chứng minh là một promoter điều khiển biểu hiện gen đặc hiệu bó mạch. Nhằm mục đích tìm hiểu tính đa dạng của promoter này cũng như tiến tới sử dụng chúng trong việc thiết kế các cấu trúc biểu hiện gen kháng côn trùng và sâu hại để chuyển vào giống lúa Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành phân lập và xác định trình tự Rsucl-promoter từ hai giống lúa Tám Xoan Hải Hậu và Dự Thơm. Kết quả so sánh trình tự Rsucl-promoter của 2 giống lúa này với 2 giống lúa Nhật Bản đã công bố cho thấy vùng trình tự này có thêm 1 đoạn lặp lại dài 13 nucleotide. So với giống C71 của Việt Nam đã nghiên cứu trước đây, trình tự Rsucl-promoter của Tám Xoan Hải Hậu có 8 vị trí khác biệt trong khi của Dự Thơm có 18 vị trí. Ngoài các yếu tố điều khiển không đặc hiệu của promoter thực vật, Rsucl-promoter của cả hai giống lúa nghiên cứu đều có các yếu tố điều khiển gen biểu hiện gen đặc hiệu bó mạch như các hộp ASL, II và GATA. Do vậy, đoạn promoter này của cả hai giống lúa có thể sử dụng cho mục đích tạo các cấu trúc biểu hiện gen đặc hiệu bó mạch ở cây lúa và các cây nông nghiệp khác. Trình tự Rsucl-promoter của giống lúa Tám Xoan Hải Hậu và Dự Thơm đã được đăng ký trên các ngân hàng gen quốc tế EMBL/GenBank/DDBJ với mã số EF633717 và EF633718.

**Từ khóa:** Biểu hiện đặc hiệu mô, Dự Thơm, Rsucl-promoter, Tám Xoan Hải Hậu, *Oryza sativa* L.

### MỞ ĐẦU

Trong nghiên cứu chuyển gen thực vật, bên cạnh các gen có giá trị mã hóa cho các tính trạng mong muốn, các promoter cần thiết cho sự biểu hiện của các gen đó cũng nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà công nghệ gen. Thông thường, các gen quan tâm thường được điều khiển bởi các promoter không đặc hiệu như CaMV 35S-promoter, actin promoter, ubiquitin promoter... dẫn đến sản phẩm của gen được biểu hiện ở hầu hết 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 và trong các giai đoạn phát triển nhất định của cây hoặc cảm ứng với các tác nhân ngoại cảnh bất lợi. Vì vậy, việc tìm kiếm, phân lập và nghiên cứu sự điều khiển biểu hiện gen của các promoter đặc hiệu là một trong các mục tiêu hàng đầu của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và ở Việt Nam.

Promoter của gen mã hóa sucrose synthase của cây lúa (Rsucl-promoter) là một promoter đặc hiệu bó mạch, đã được sử dụng để điều khiển biểu hiện gen mã hóa lectin từ cây hoa diêm tuyết trong cây lúa cho hiệu quả diệt côn trùng rất cao (Wang *et al.*,

1992; Huang *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1998). Trong một công trình công bố trước đây, chúng tôi đã phân lập và tách dòng promoter này từ giống lúa C71 (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2000). Trình tự của đoạn promoter này có một số điểm khác biệt so với các trình tự Rsucl promoter đã được công bố trên ngân hàng gen thế giới. Trong nghiên cứu này, nhằm mục đích tìm hiểu tính đa dạng của promoter này cũng như tiến tới sử dụng chúng trong việc thiết kế các cấu trúc biểu hiện gen kháng sâu đục thân, kháng côn trùng hút nhựa thân lúa để chuyển vào giống lúa Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành phân lập và xác định trình tự Rsucl-promoter từ hai giống lúa Tám Xoan Hải Hậu và Dự Thơm của Việt Nam.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Hạt của 2 giống lúa Tám Xoan Hải Hậu (TX) và Dự Thơm (DT) do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Trong đó, giống lúa TX thuộc *japonica*, giống lúa DT thuộc *indica*.

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu này

như: Enzyme hạn chế, *Taq* DNA polymerase, T4 ligase, thang DNA chuẩn, dNTP, GeneJET™ PCR Cloning Kit, agarose, BigDye Terminator v3.1, ampicillin (Amp), chloroform, isoamyl alcohol, Tris, acetic acid, EDTA, EtOH được đặt mua từ các hãng MBI Fermentas (Mỹ), Gibco (Mỹ), Applied Biosciences (Mỹ), Serva (Đức), Merck (Đức). Cặp mồi đặc hiệu để nhân đoạn *R*suc1-promoter do chúng tôi thiết kế được đặt tổng hợp tại hãng GENSET (Singapore Biotech Pte, Ltd.) có trình tự như sau:

SUC-S: 5'-GGAGCTCGGTCTGGTAATCA AATCACC-3';

SUC-B: 5'-GCCATGGATCCCATGACTCAATTC CAGGAAGTGC-3'.

### Phương pháp

Hạt lúa khô còn nguyên phôi đã bóc vỏ và khử trùng được cấy lên môi trường MS cơ bản, nuôi ngoài sáng trong vòng 1 tuần đến giai đoạn mạ ba lá sẽ tiến hành thu phần lá và thân. DNA tổng số được tách chiết từ lá và thân lúa theo phương pháp của Becker và đồng tác giả (1995). Nồng độ và độ sạch của DNA được xác định bằng điện di và phổ hấp thụ trên máy quang phổ (Hewlett Parkard, Mỹ).

Phản ứng dây chuyền polymerase (PCR) được tiến hành với tổng thể tích 25 µl bao gồm các thành phần: 1X PCR buffer, 0,5 pmol mỗi loại, 0,5 unit *Taq* polymerase, 1 mM dNTPs mix, ~ 100 ng DNA tổng số. Chu trình nhiệt như sau: 95°C: 30''; 35 chu kỳ bao gồm (95°C: 1', 54°C: 1', 72°C: 1'20''), lặp lại; 72°C: 8'; giữ ở 4°C.

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 DNA trên gel agarose... được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001).

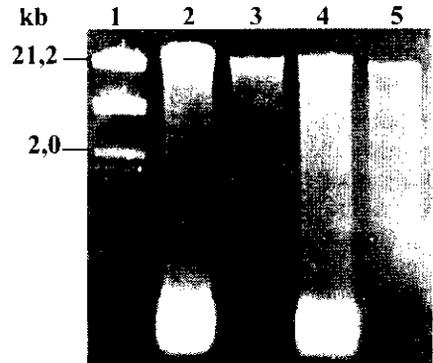
Trình tự đoạn *R*suc1-promoter được xác định theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977) trên máy phân tích trình tự DNA tự động ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM® 3100 Data Collection v2.0 và DNA Sequencing Analysis v5.1, SeqScope v2.5, và BioEdit v7.0.5.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Tách chiết DNA tổng số

Như đã mô tả ở trên, chúng tôi đã tách chiết

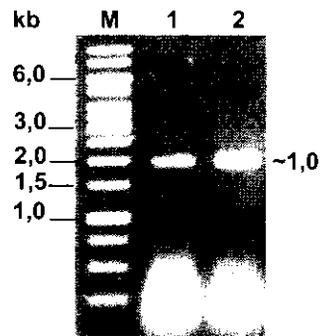
được DNA tổng số của hai mẫu TX và DT. DNA tổng số được kiểm tra độ sạch bằng phổ hấp thụ từ ngoại và điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả cho thấy, hai mẫu DNA chiết được đều sạch ( $A_{260/280}$  từ 1,67 - 1,91), ít bị phân hủy, không lẫn RNA và có thể sử dụng để nhân *R*suc1-promoter (Hình 1).



Hình 1. Điện di DNA tổng số trên gel agarose 0,8%. 1: Thang DNA chuẩn (DNA  $\lambda$ HindIII+EcoRI); 2: DNA tổng số mẫu TX (chưa loại RNA); 3: DNA tổng số mẫu TX (đã loại RNA); 4: DNA tổng số mẫu DT (chưa loại RNA); 5: DNA tổng số mẫu DT (đã loại RNA).

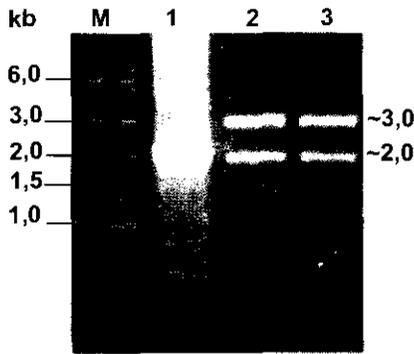
#### Phân lập *R*suc1-promoter của 2 giống lúa TX, DT

Chúng tôi tiến hành PCR từ DNA tổng số của 2 giống lúa TX, DT sử dụng cặp mồi SUC-S, SUC-B. Sản phẩm PCR của 2 giống lúa là 1 băng chính có kích thước tương ứng với vạch 2,0 kb trên thang DNA chuẩn và phù hợp với kích thước đoạn *R*suc1-promoter cần nhân (Hình 2).



Hình 2. Sản phẩm PCR của *R*suc1-promoter từ 2 giống lúa TX, DT. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1: mẫu TX; 2: mẫu DT.

**Tách dòng R<sub>sv</sub>c1-promoter của hai giống lúa TX và DT**



**Hình 3.** Phân tích DNA plasmid tái tổ hợp bằng 2 enzyme *Xho*I và *Xba*I. M: Thang DNA chuẩn 1 kb. 1: Sản phẩm PCR giống lúa D<sub>ự</sub> Thơm; 2: Sản phẩm xử lý enzyme hạn chế của pJET1/R<sub>sv</sub>c1-promoter-TX; 3: Sản phẩm xử lý enzyme hạn chế của pJET1/R<sub>sv</sub>c1-promoter-DT.

Sản phẩm PCR được nối ghép vào vector pJET1. Vector này có chứa điểm nhận biết của enzyme *Xho*I và *Xba*I ở gần 2 phía của vị trí ghép nối gen. Mặt khác, bản đồ xử lý enzyme hạn chế của đoạn R<sub>sv</sub>c1-promoter đã công bố bởi Wang và đồng tác giả (1992) không có điểm nhận biết của hai enzyme này.

Do vậy, khi cắt plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen R<sub>sv</sub>c1-promoter (pJET1/R<sub>sv</sub>c1-promoter-TX và pJET1/R<sub>sv</sub>c1-promoter-DT) bằng *Xho*I và *Xba*I sẽ thu được hai băng DNA. Một băng kích thước 3,1 kb của vector và băng còn lại từ sản phẩm PCR có kích thước khoảng 2 kb tương ứng với kích thước của đoạn R<sub>sv</sub>c1-promoter.

Kết quả nhận được cho thấy các plasmid tái tổ hợp được chọn để kiểm tra đã bị cắt thành 2 băng đúng như tính toán lý thuyết (Hình 3). Từ đó, chúng tôi khẳng định đã tách dòng được R<sub>sv</sub>c1-promoter từ giống hai giống lúa TX và DT. Chúng tôi đã tiến hành tinh chế các plasmid này để xác định trình tự nucleotide.

**Xác định và phân tích trình tự**

Trình tự R<sub>sv</sub>c1-promoter của hai giống lúa TX và DT có độ dài 1955 bp đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế EMBL/ GENBANK/ DDBJ với mã số EF633717 và EF633718, tương ứng.

Các trình tự này đã được so sánh với các trình tự R<sub>sv</sub>c1-promoter của giống lúa C71 Việt Nam và hai giống lúa khác của Nhật Bản công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (Mã số tương ứng AJ 401233, L39940 và X64770). Kết quả so sánh được trình bày trên hình 4.

C71	TCTGATGGTC	GGTCTGGTAA	TCAAATCACC	GATCCTGAA	ATCCACCAAA	TCAAACCGTG	60
Du-thom	-----	.....	.....	.....	.....	.....	54
Tam-xoan	-----	.....	.....	.....	.....	.....	54
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	60
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	60
				-1921			
C71	AGATTTTTC	AGAGCAAAA	CAAGAAAAGC	ATCTGCTTTA	TTCTCTCTT	GCTTTCTTTT	120
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	114
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	114
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	120
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	120
		-1867			-1837		
C71	CATCCCAAC	CAGTCCTTTT	TTCTTCTGTT	TATTTGTAGA	AGTCTACCAC	CTGCAGTCTA	180
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	174
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	174
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
C71	TTATTCTACA	GAGAAAAGA	TTGAACTTT	TTTTCTCCAA	AGCTGACAAT	GGTGCCGGCA	240
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	234
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	234

L39940 ..... 240  
 X64770 ..... 240  
 -1736

C71 TATGCTAATA GGATACTCCC TTCGTCTAGT **CCCTTCCTCT** AGGAAAAAAC CAACCCACTA 300  
 Du-thom ..... 294  
 Tam-xoan ..... 294  
 L39940 ..... 287  
 X64770 ..... 287  
 -1610 -1622

C71 CAATTTTGAA TATATATTTA TTCAGATTGG TTATGCTTCC TACTCCTTCT **CAGTTATGGT** 360  
 Du-thom ..... 354  
 Tam-xoan ..... 354  
 L39940 ..... 347  
 X64770 ..... 347  
 -1598

C71 GAGATATTTTC ATAGTATAAT **AAATTTGAC** ATATATTTG **CCAAATTCAT** CGCATTATGA 420  
 Du-thom ..... 414  
 Tam-xoan ..... 414  
 L39940 ..... 407  
 X64770 ..... 407  
 -1571-1569-1565 -1552

C71 AATGTCTCGT TCGATCTA**AG** TTGTTATATT AT**AGACGGA** GA**AGTAGAT** TCGGTTATTT 480  
 Du-thom ..... 474  
 Tam-xoan ..... 474  
 L39940 ..... 466  
 X64770 ..... 466  
 -1513 -1499 -1489

C71 TTGGACAGAG AAAGTACTCG CCTGTGCTAG TGACATGATT AGTGACACCA TCAGATTAAA 540  
 Du-thom ..... 534  
 Tam-xoan ..... 534  
 L39940 ..... 526  
 X64770 ..... 526

C71 AAAA**CATAT** GTTTTGATTA AAAAAATGGG GAATTTGGGG GGAGCAATAA TTTGGGGTTA 599  
 Du-thom ..... 594  
 Tam-xoan ..... 594  
 L39940 ..... 585  
 X64770 ..... 585  
 -1407

Hộp CAAT

C71 TCCATGCTG TTTCATCATG TCAGC**GAAA** GGCCCTACCA CTAA**AGTCT** CTGTACTA 659  
 Du-thom ..... 654  
 Tam-xoan ..... 654  
 L39940 ..... 645  
 X64770 ..... 645  
 -1326 -1302

Hộp ASL

Hộp TATA

C71	TTCTACCACC	TATCAGAATT	CAGA			AC		GGTCCTTCTG	719
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	714
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	714
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	705
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	705

-1284

C71	GATCTCGGAG	AAACCCTCCA	TTCGTT	GCT	CGTCTCTGAC	CACCATTGGG	TATGTTGCTT	779
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	774
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	774
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	765
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	765

-1205

C71	CCATTGCCAA	ACTGTTCCCT	TTTAC	CATA	GGCTGATTGA	TCTTGGCTGT	GTGATTTTTT	839
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	834
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	834
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	825
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	825

-1146

C71	GCTTGGGTTT	TTGAGCTGAT	TCAGCGGCGC	TTGCAGCCTC	TTGATCGTGG	TCTTGGCTCG	899
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	894
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	894
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	885
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	885

C71	CCCATTCTT	GCGATTCTTT	GGTGGGTCGT	CAGCTGAATC	TTGCAGGAGT	TTTGTCTGAC	959
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	954
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	954
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	945
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	945

C71	ATGTTCTTGG	GTTTACTGCT	TTGCGTAAAT	CTGAACCAAG	GGGGGGTTT	CTGCTGCAGT	1019
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1014
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1014
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1005
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1005

-951

C71	TTAGTGGGTT	TACTATGAGC	GGATTGCGGG	TTTCGAGGAA	AACCGGCAAA	AAACCTCAAA	1079
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1074
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1074
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1065
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1065

**Hộp II**

C71	TCCTCGACCT	TTAGTTTTGC	TG			GTT	CTTTTTGCC	1139
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1134

Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1134
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1125
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1125
<b>C71</b>	CCAAATTTTT	TTTACTTGG	TGCAGTAAGA	ATCGCGCCTC	AGTGATTTTC	TCGACTCGTA	1199
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1194
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1194
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1185
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1185
<b>C71</b>	GTCCGTTGAT	ACTGTGTCTT	GCTTATCACT	TGTTCTGCTT	AATCTTTTTT	GCTTCCTGAG	1259
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1254
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1254
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1245
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1245
<b>C71</b>	GAATGTCTTG	GTGCCTGTCG	GTGGATGGCG	A <del>CC</del> AAAAAT	GAAGGGTTTT	TTTTTTTTGA	1319
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1314
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1314
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1305
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1305
				-660			
<b>C71</b>	ACTGAGAAAA	ATCTTTGGGT	TTTTGGTTGG	ATTCTTTCAT	GGAGTCGCGA	CCTTCCGTAT	1379
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1374
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1374
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1365
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1365
<b>C71</b>	TCTTCTCTTT	G <del>T</del> TCTCCCCG	CTTGCGGATT	CATAATAT <del>C</del>	GGA <del>A</del> CTTCAT	GTTGGCTCTG	1439
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1434
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1434
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1425
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1425
		-560		-533			
<b>C71</b>	CTTAATCTGT	AGCCAAATCT	TCATATCTCC	AGGGATCTTT	CGCTCTGTCC	TATCGGATTT	1499
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1494
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1494
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1485
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1485
<b>C71</b>	AGGAATTAGG	G <del>T</del> TCTAACTGG	TGCTAATACT	AAAGGGTAAT	TTGGAACCAT	GCCATTATAA	1559
Du-thom	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1554
Tam-xoan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1554
L39940	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1545
X64770	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1545
		-441					



**Bảng 1.** Các vị trí nucleotide khác biệt giữa R<sub>suc1</sub> promoter của 5 giống lúa.

STT	Vị trí (Tính từ vị trí khởi đầu của R <sub>suc1</sub> promoter)	R <sub>suc1</sub> promoter				
		C71	Dự Thơm	Tám Xoan Hải Hậu	L39940	X64770
1	-21	T	T	C	T	T
2	-79	T	A	T	T	T
3	-211	T	C	T	T	T
4	-282	C	T	T	T	T
5	-441	G	A	A	A	A
6	-533	C	C	C	T	T
7	-560	A	T	A	A	A
8	-660	A	G	A	A	A
9	-951	A	G	A	A	A
10	-1146	C	T	C	C	C
11	-1205	T	C	T	T	T
12	-1284	A	G	A	A	A
13	-1302	T	C	T	T	T
14	-1326	T	C	T	T	T
15	-1407	-	A	A	-	-
16	-1489	G	G	G	T	T
17	-1499	G	G	G	-	-
18	-1513	G	G	G	T	T
19	-1552	C	T	T	T	T
20	-1565	C	G	G	G	G
21	-1569	C	A	A	A	A
22	-1571	G	A	A	G	G
23	-1598	T	T	T	G	G
24	-1610	T	T	T	-	-
25	-1611	C	C	C	-	-
26	-1612	C	C	C	-	-
27	-1613	C	C	C	-	-
28	-1614	T	T	T	-	-
29	-1615	T	T	T	-	-
30	-1616	C	C	C	-	-
31	-1617	G	G	G	-	-

32	-1618	T	T	T	-	-
33	-1619	C	C	C	-	-
34	-1620	T	T	T	-	-
35	-1621	A	A	A	-	-
36	-1622	G	G	G	-	-
37	-1736	C	C	C	G	G
38	-1837	C	C	C	T	T
39	-1867	A	G	G	G	G

Từ kết quả so sánh trên, chúng tôi đã quan sát thấy so với trình tự *Rsuc1*- promoter của hai giống lúa Nhật Bản, thì ba giống lúa Việt Nam có một số điểm khác biệt được thống kê trên bảng 1. Cả ba giống lúa C71, TX và DT đều có thêm một đoạn trình tự lặp lại dài 13 nucleotide nằm khá xa vùng promoter trung tâm (vị trí từ -1610 đến -1622). Cho đến nay, chức năng của các trình tự lặp lại này trên promoter thực vật vẫn chưa rõ ràng. Nhưng đoạn trình tự lặp lại này có thể là điểm khác biệt đặc trưng của các giống lúa Việt Nam so với các giống lúa của Nhật Bản.

So sánh giữa 3 giống lúa Việt Nam, giống DT có số điểm nucleotide khác biệt nhiều hơn hẳn so với hai giống còn lại. Cụ thể giống DT có 18 vị trí nucleotide khác biệt so với C71 trong khi giống TX chỉ có 8 vị trí. Các vị trí khác biệt này được thống kê trên bảng 1. Trong số các vị trí nucleotide khác biệt kể trên, nucleotide C tại vị trí -1304 trên *Rsuc1*- promoter của giống lúa DT được thay bằng nucleotide T trên *Rsuc1*- promoter giống C71. Vị trí thay đổi này nằm trong hộp CCAAT của promoter. Điều này hoàn toàn phù hợp với ý kiến cho rằng hộp CCAAT, mặc dù bảo thủ, nhưng có thể có trình tự khác nhau.

Trong đoạn *Rsuc1*- promoter ở cả hai giống lúa TX và DT trên đây đều có đầy đủ các yếu tố khởi động không đặc hiệu và đặc hiệu. Các yếu tố khởi động không đặc hiệu như các hộp CCAAT và TATA, thường có mặt ở hầu hết các đoạn promoter thực vật và đóng vai trò quyết định cho sự khởi đầu phiên mã của các gen cấu trúc. Nếu như CCAAT có chức năng cung cấp vị trí gắn cho RNA polymerase thì TATA lại có vai trò quan trọng trong quá trình gắn RNA polymerase chính xác vào vị trí khởi đầu phiên mã. Các yếu tố khởi động đặc hiệu có mặt trên *Rsuc1*- promoter như các hộp ASL, II và GATA đã được

chứng minh là có liên quan đến biểu hiện gen đặc hiệu bó mạch (Brears *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 1997; Hedley *et al.*, 2000). Với các đặc điểm trên, đoạn *Rsuc1* promoter ở hai giống lúa TX và DT mà chúng tôi đã phân lập được có thể sử dụng cho mục đích chuyển gen nhằm tăng cường mức độ biểu hiện của các gen nội sinh và ngoại sinh trong mô bó mạch. Ngoài ra, những trình tự này có thể hữu ích trong việc tạo ra các protein độc có khả năng kháng côn trùng, sâu hại không chỉ ở cây lúa mà cho cả các cây nông nghiệp có giá trị khác.

## KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã nhân được đoạn *Rsuc1*- promoter có kích thước khoảng 2 kb của 2 giống lúa Tám Xoan Hải Hậu và Dự Thơm, đã tách dòng phân tử các sản phẩm PCR trong vector pJET1/blunt.

Đã xác định trình tự nucleotide của toàn bộ đoạn *Rsuc1*- promoter chiều dài 1955 nucleotide ở cả hai giống lúa. Kết quả so sánh trình tự *Rsuc1*- promoter của 2 giống lúa này với trình tự của 2 giống lúa Nhật Bản đã công bố cho thấy *Rsuc1*- promoter của các giống lúa Việt Nam có thêm 1 đoạn trình tự lặp lại dài 13 nucleotide. So với giống lúa C71 của Việt Nam đã nghiên cứu trước đây, *Rsuc1*- promoter của Tám Xoan Hải Hậu có 8 vị trí khác biệt trong khi của Dự Thơm có 18 vị trí. Ngoài các yếu tố điều khiển không đặc hiệu của promoter thực vật, *Rsuc1*- promoter của cả hai giống lúa nghiên cứu đều có các yếu tố điều khiển gen biểu hiện gen đặc hiệu bó mạch như các hộp ASL, II và GATA. Các trình tự này có thể sử dụng để tạo các cấu trúc gen biểu hiện đặc hiệu bó mạch phục vụ cho các nghiên cứu chuyển gen vào cây lúa và các cây nông nghiệp có giá trị khác.

Hai trình tự này đã được công bố trên các ngân hàng gen quốc tế EMBL/GenBank/DBJ ngày 02/05/2007 với mã số EF633717 và EF633718.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được tài trợ từ Đề tài mang mã số QC.06.26, Đại học Quốc gia Hà Nội.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker C, Shutov AD, Nong VH, Senyuk VI, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen NC, Müntz K (1995) Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur J Biochem* 228: 456-462.
- Brears T, Walker EL, Coruzzi GM (1991) A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase GS3A gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. *Plant J* 1: 235-244.
- Huang JW, Chen JT, Yu WP, Shyur LF, Wang AY, Sung HY, Lee PD, Su JC (1996) Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 233-239.
- Hedley PE, Maddison AL, Davidson D, Machray GC (2000) Differential expression of invertase genes in internal and external phloem tissues of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J Exp Bot* 51(345): 817-821.
- Lê Thị Thu Hiền, Lê Trần Bình, Đinh Duy Kháng, Nông Văn Hải (2000) Phân tích trình tự đoạn điều khiển của gen tổng hợp đường (Rsucl-promoter) từ giống lúa C71. *Tạp chí Sinh học* 23(2): 45-50.
- Rao KV, Rathore KS, Hodges TK, Fu X, Stoger E, Sudhakar D, Williams S, Christou P, Bharathi M, Brown DP, Powell KS, Spence J, Gatehouse AMR, Gatehouse JA (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J* 15: 469-477.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Wang MB, Boulter D, Gatehouse JA (1992) A complete sequence of the rice sucrose synthase (RSs1) gene. *Plant Mol Biol* 19: 881-885.
- Yin Y, Chen L, Beachy R (1997) Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *Plant J* 12: 1179-1188.
- Yu WP, Wang AY, Juang RH, Sung HY, Su JC (1992) Isolation and sequences of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Plant Mol Biol* 18: 139-142.

## CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE SUCROSE SYNTHASE PROMOTER (RSUC1-PROMOTER) FROM VIETNAMESE RICE CULTIVARS

Le Thi Thu Hien<sup>1,2</sup>, Nguyen Hai Ha<sup>1</sup>, Dao Thi Thu Ha<sup>1</sup>, Vu Hai Chi<sup>1</sup>, Nguyen Viet Cuong<sup>1</sup>, Nong Van Hai<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology

<sup>2</sup>College of Technology, Hanoi National University

### SUMMARY

The promoter region of rice sucrose synthase 1 gene (Rsucl-promoter) was known as a phloem specific promoter. To study the diversity on these promoter regions from Vietnamese rice cultivars, Tam Xoan Hai Hau and Du Thom, Rsucl-promoters were amplified and cloned into pJET1 cloning vector. Nucleotide sequences analysis of the recombinant plasmids showed an additional fragment of 13 nucleotides from Vietnamese cultivars as compared to those of Japanese cultivars. Comparison of nucleotide diversity in two above cultivars and C71 cultivar revealed a much higher level of nucleotide substitutions in the Du Thom (18 positions) than that in Tam Xoan Hai Hau (8 positions). Besides constitutive regulatory elements, TATA and CCAAT boxes, these promoters contain also phloem specific regulatory elements such as ASL, II and GATA boxes. Therefore, these sequences can be used in transgenic plants to obtain high levels of expression of foreign and endogenous genes in phloem. In

\* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-8363222; E-mail: [yhnong@ibt.ac.vn](mailto:yhnong@ibt.ac.vn)

addition, these sequences may be useful for the production of genetically modified crops containing insect resistant genes which have agricultural values. The *Rsu*1-promoter sequences from Tam Xoan Hai Hau and Du Thom were submitted on 02-MAY-2007 to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (Accession numbers EF633717 and EF633718, respectively).

**Keywords:** *Du Thom rice cultivar, Oryza sativa L., phloem specific expression, Rsu1-promoter, Tam Xoan Hai Hau rice cultivar*