

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GENE Ở THỰC VẬT TỪ NHÂN DÒNG PROMOTER VÀ TERMINATOR Ở CÂY *ARABIDOPSIS THALIANA*

Nguyễn Huy Hoàng*, Phạm Bích Ngọc**,
Chu Hoàng Hà**, Lê Văn Sơn**

TÓM TẮT

Title: Construction of the Gene Expression Vector in Plant for Cloning Promoter and Terminator from *Arabidopsis thaliana*

Từ khóa: *Arabidopsis*, biểu hiện, protein tái tổ hợp, promoter, terminator

Keywords: *Arabidopsis*, expression, recombinant, promoter, terminator

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 06/10/2017;

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 10/01/2017;

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/01/2017.

Tác giả:

* ThS., Trường ĐH Y Dược Thái Nguyên

** Viện Công nghệ Sinh học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

nguyen@huyhoang.info

Hoạt động của protein sốc nhiệt Heat Shock Protein (HSP) ở cây *Arabidopsis thaliana* được cảm ứng bởi nhiệt độ và được điều hoà hoạt động bởi promoter HSP và terminator HSP. Bài báo này trình bày các kết quả nhân dòng promoter và terminator HSP từ *Arabidopsis thaliana*. Promoter HSP phân lập được có chiều dài 720 bp và mang đầy đủ các yếu tố điều hòa cis của promoter điển hình: sáu vùng cảm ứng với nhiệt độ: Vị trí 482 - 495, 492 - 505, 502 - 515, 549 - 562, 559 - 572 và 600 - 613, hộp CAAT (vị trí 39-42), 2 hộp GATA (vị trí 73 - 76 và 406 - 409) và hộp TATA (vị trí 643 - 649). Terminator HSP có chiều dài 250 bp, vị trí đuôi poly A là ở nucleotide 158. Các trình tự này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm thiết kế vector biểu hiện gene ở thực vật có hiệu suất biểu hiện protein tái tổ hợp cao.

ABSTRACT

In *Arabidopsis*, promoter and terminator HSP regulated expression of heat shock protein gene which were induced by high environmental temperature. This study presents results of HSP promoter and terminator cloning and sequencing from the *Arabidopsis thaliana* for construction of vector to express target gene in plant. The data obtained showed that HSP promoter has 720bp in length that carries a full range of cis-acting elements similar to a typical promoter such as CAAT box (39 to 42), two GATA boxes (73 to 76 and 406 to 409) and TATA box (643 to 649). Furthermore, This promoter contains six heat shock elements: 482 to 495, 492 to 505, 502 to 515, 549 to 562, 559 to 572 and 600 to 613. HSP 18.2 terminator has 250 bp in length and poly A site of HSP terminator was identified at 158 nucleotide position. These sequences will contribute a fundamental basis for further researches in order to construct high expression vector carrying HSP promoter and terminator in transgenic plants.

1. Mở đầu

Thực vật được xem là hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp với nhiều ưu điểm so với hệ thống biểu hiện vi khuẩn, dòng tế bào động vật có vú, động vật chuyển gen... thể hiện ở chi phí sản xuất thấp, khả năng mở rộng quy mô sản xuất cao, các hợp chất được tạo ra có mức độ an toàn cao, không bị ô nhiễm, ở thực vật có quá trình cải biến sau dịch mã cần thiết cho hoạt tính của nhiều hợp chất (Desai PN & Shrivastava N &

Padh H, 2010, tr. 427-435). Sử dụng thực vật như nhà máy sinh học để sản xuất các hợp chất cần thiết cho con người là một xu hướng phát triển tiềm năng của công nghệ sinh học. Các hợp chất được sản xuất trong thực vật như protein tái tổ hợp, vaccine, các hợp chất thứ cấp, enzyme, hormone v.v... (Sharma AK & Sharma MK, 2009, tr. 811-832). Tuy nhiên, hệ thống biểu hiện thực vật có một nhược điểm là mức độ biểu hiện của

gene thấp, mức độ tích lũy của sản phẩm đích không cao, do vậy các nghiên cứu hiện nay phải tập chung làm tăng mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp (Streatfield SJ, 2007, tr. 2-15).

Sự biểu hiện của gene đích trong hệ thống thực vật phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố trong đó có hai yếu tố quang trọng là promoter (gene khởi động) và terminator (yếu tố kết thúc). Promoter là một trình tự nucleotide phía đầu 5' của điểm khởi đầu phiên mã, đóng vai trò then chốt trong việc biểu hiện gen đích, giúp xác định về thời gian, vị trí và mức độ biểu hiện của gen đích (Desai PN & Shrivastava N & Padh H, 2010, tr. 427 - 435). Promoter có cấu trúc rất phức tạp và chứa nhiều yếu tố đặc trưng tham gia điều hòa sự biểu hiện gen ở mức phiên mã (Lê Thị Thu Hiền & Trần Thị Phương Liên & Nông Văn Hải, 2007, tr.1-18). Các yếu tố cis quan trọng nhất của promoter gồm hộp TATA, GAGA và CCAAT đảm bảo cho quá trình phiên mã diễn ra chuẩn xác. Promoter sốc nhiệt HSP khởi động phiên mã của gene HSP ở cây *Arabidopsis*, hoạt động của promoter này được cảm ứng bởi nhiệt độ. Theo nghiên cứu của các tác giả Lee KT và cs (2007, tr.1047 - 1053), Moriwaki M và cs (1999, tr.92 - 95) đã sử dụng promoter này để “nghiên cứu phản ứng sốc nhiệt trên cây thuốc lá chuyển gen cho thấy hoạt động của gen β -glucuronidase được tăng cường khi cây gặp điều kiện sốc nhiệt”. Sự biểu hiện của gene đích cũng phụ thuộc vào trình tự đầu 3' không dịch mã và terminator. Theo các tác giả Carswell S và cs (1989, tr.4248 - 4258), Ingelbrecht IL và cs (1989, tr.671 - 680) thì “các terminator khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến mức độ biểu hiện của gene”. Các thể đột biến gene của nhiều loài

thực vật và virus cho thấy terminator của thực vật gồm ba yếu tố chính: Yếu tố ngược dòng xa (FUEs-Far Upstream Element), yếu tố ngược dòng gần (NUEs-Near Upstream Elements) và vị trí polyadenyl hóa.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nhân dòng promoter và terminator HSP từ cây *Arabidopsis* nhằm tạo nguồn nguyên liệu thiết kế các vector tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp trong thực vật.

2. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Cây *Arabidopsis thaliana* kiểu dại (Col 0), vector nhân dòng pBT, chủng vi khuẩn nhân dòng E.coli DH5 α , hóa chất, thiết bị sử dụng trong phân tích sinh học phân tử do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Phương pháp

Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu để phân lập promoter và terminator HSP.

Sử dụng phần mềm Bioedit (Hall TA, 1999, tr. 95-98) và các trình tự nucleotide trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho phân đoạn gen quan tâm. Để thuận lợi cho việc thiết kế vector chuyển gen sau này, chúng tôi gắn thêm vị trí cắt của enzyme giới hạn HindIII trên mồi xuôi và BamHI trên mồi ngược ở đầu 5' của cặp mồi nhân phân đoạn promoter HSP (pHSP). Tương tự, vị trí cắt của enzyme giới hạn SacI và EcoRI được gắn vào mồi xuôi và mồi ngược ở đầu 5' của cặp mồi nhân phân đoạn terminator HSP (tHSP) (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự nucleotide dùng để thiết kế cặp mồi, trình tự nucleotide của cặp mồi và kích thước lý thuyết đoạn gene promoter và terminator HSP sẽ thu được

Đoạn gene	Kí hiệu	Trình tự nucleotide sử dụng	Trình tự cặp mồi đặc hiệu	Kích thước gene (bp)
Promoter HSP	pHSP_F	CP002688.1, AB006705.2, X17295.1	5'aagcttATGGTCATTTCT TCTGGTTCAAG 3'	732 bp (*)
	pHSP_R		5'cctaggTGTTTCGTTGCTT TTCGGGGAGACT 3'	
Terminator HSP	tHSP_F	Theo trình tự của Nagaya S et al (2009)	5'gagctcATATGAAGATG AAGATGAAA 3'	262 bp (*)
	tHSP_R		5'gaattcCTTATCTTTAAT CATATTCC 3'	

(*). Kích thước bao gồm cả trình tự nucleotide của enzyme cắt giới hạn. Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ lá *Arabidopsis*

DNA genome tách từ các mẫu lá *Arabidopsis* theo phương pháp CTAB. Xác định độ tinh sạch và nồng độ DNA tổng số bằng máy Nanodrop lite (Thermo scientific).

Phân lập promoter và terminator HSP bằng kỹ thuật PCR

Promoter và terminator HSP được phân lập từ DNA tổng số tách từ lá *Arabidopsis* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Thành phần phản ứng bao gồm: Master Mix 2X: 12,5 μ l, mồi xuôi (50 ng/ μ l): 1 μ l; mồi ngược (50ng/ μ l): 1 μ l, DNA (50ng/ μ l): 1 μ l và nước deion vô trùng: 9,5 μ l. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Veriti 96 well thermal cycler (AB Applied Biosystems, Thermo scientific) với: 94 $^{\circ}$ C (3 phút); 30 chu kỳ: 94 $^{\circ}$ C (30 giây), 54 $^{\circ}$ C (1 phút), 72 $^{\circ}$ C (45 giây); 72 $^{\circ}$ C (10 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% (w/v).

Nhân dòng và xác định trình tự nucleotide của promoter và terminator HSP

Sản phẩm phản ứng PCR được tinh sạch bằng bộ kit AccuPrep[®] Gel Purification (Bioneer, Hàn Quốc). Sau đó, promoter và terminator HSP được ghép nối vào vector nhân dòng pBT. Vector nhân dòng pBT-pHSP hoặc pBT-tHSP được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt, sau đó cấy trái trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung kháng sinh carbenicillin 50mg/l, IPTG 100 μ M và X-gal 40mg/l. Sau đó nuôi qua đêm ở 37 $^{\circ}$ C. Các khuẩn lạc sống sót trên môi trường chọn lọc được nuôi lắc trong 4ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh qua đêm ở 37 $^{\circ}$ C. Tách chiết plasmid bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep và kiểm tra sự có mặt của promoter và terminator HSP trong vector bằng phản ứng cắt enzym giới hạn. Trình tự nucleotide của promoter và terminator HSP được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer tại phòng Thí nghiệm trọng điểm và Công nghệ gene, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

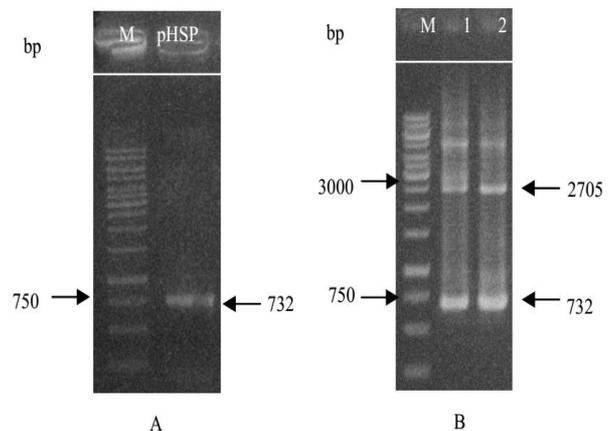
Phân tích trình tự nucleotide của promoter và terminator HSP

Phân tích mức độ tương đồng của promoter và terminator HSP nhân dòng được với trình tự nucleotide của promoter và terminator HSP đã công bố bằng chương trình BLAST của NCBI, xác định vùng tác động cis (hộp TATA, hộp CAAT, hộp GATA) của promoter HSP thông qua cơ sở dữ liệu phân tích chuyên dụng về promoter thực vật.

3. Kết quả và thảo luận

Phân lập và nhân dòng promoter HSP từ Arabidopsis

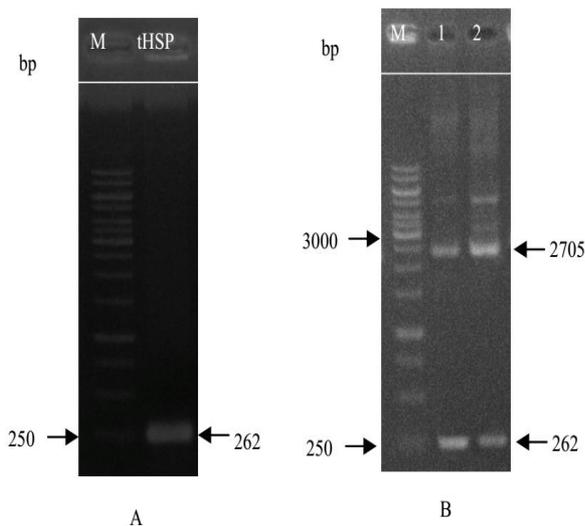
Kết quả phân lập promoter HSP từ DNA cây *Arabidopsis* bằng kỹ thuật PCR và phản ứng cắt kiểm tra sản phẩm plasmid tái tổ hợp mang gene được thể hiện ở Hình 1A và Hình 1B. Phân tích cho thấy, trên Hình 1A xuất hiện một băng đặc hiệu có kích thước khoảng 732 bp, tương đương với kích thước lý thuyết của phân đoạn promoter HSP theo thiết kế lý thuyết, trên Hình 1B, cả đường chạy số 1 và 2 đều gồm 2 băng rõ nét, có kích thước lần lượt là 732 bp và 2700 bp tương đương với kích thước lý thuyết của promoter HSP và vector tách dòng pBT.



Hình 1. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR phân đoạn gen pHSP bằng cặp mồi đặc hiệu từ cây *Arabidopsis* trên gel agarose 0,8% (w/v), **(B)** Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzym cắt giới hạn đoạn pHSP từ vector nhân dòng pBT trên gel agarose 0,8% (w/v), M: Thang DNA chuẩn DNA chuẩn 1 kb (Fermentas).

Phân lập và nhân dòng terminator HSP từ Arabidopsis

Kết quả phân lập terminator HSP từ DNA cây *Arabidopsis* bằng kỹ thuật PCR và phản ứng cắt kiểm tra sản phẩm plasmid tái tổ hợp mang phân đoạn gene được thể hiện ở Hình 2A và Hình 2B. Trên Hình 2A, xuất hiện một băng đặc hiệu có kích thước khoảng 262 bp, tương đương với kích thước của terminator HSP thiết kế lý thuyết. Trên Hình 2B, ở đường chạy số 1, 2 đều xuất hiện hai băng có kích thước lần lượt là 262bp và 2705bp, kích thước này tương ứng với kích thước của terminator HSP và kích thước của vector tách dòng pBT.



Hình 2. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR phân đoạn gen tHSP 18.2 bằng cặp mồi đặc hiệu từ cây *Arabidopsis* trên gel agarose 0,8% (w/v), **(B)** Kết quả di sản phẩm cắt bằng enzym cắt giới hạn phân đoạn tHSP từ vector nhân dòng pBT trên gel agarose 0,8% (w/v), M: Thang DNA chuẩn 1kb (Fermentas).

Từ các kết quả này, khẳng định chúng tôi đã phân lập và nhân dòng thành công promoter HSP và terminator HSP từ cây *Arabidopsis*. Để khẳng định chắc chắn promoter và terminator này, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự và xác định các yếu tố đặc trưng.

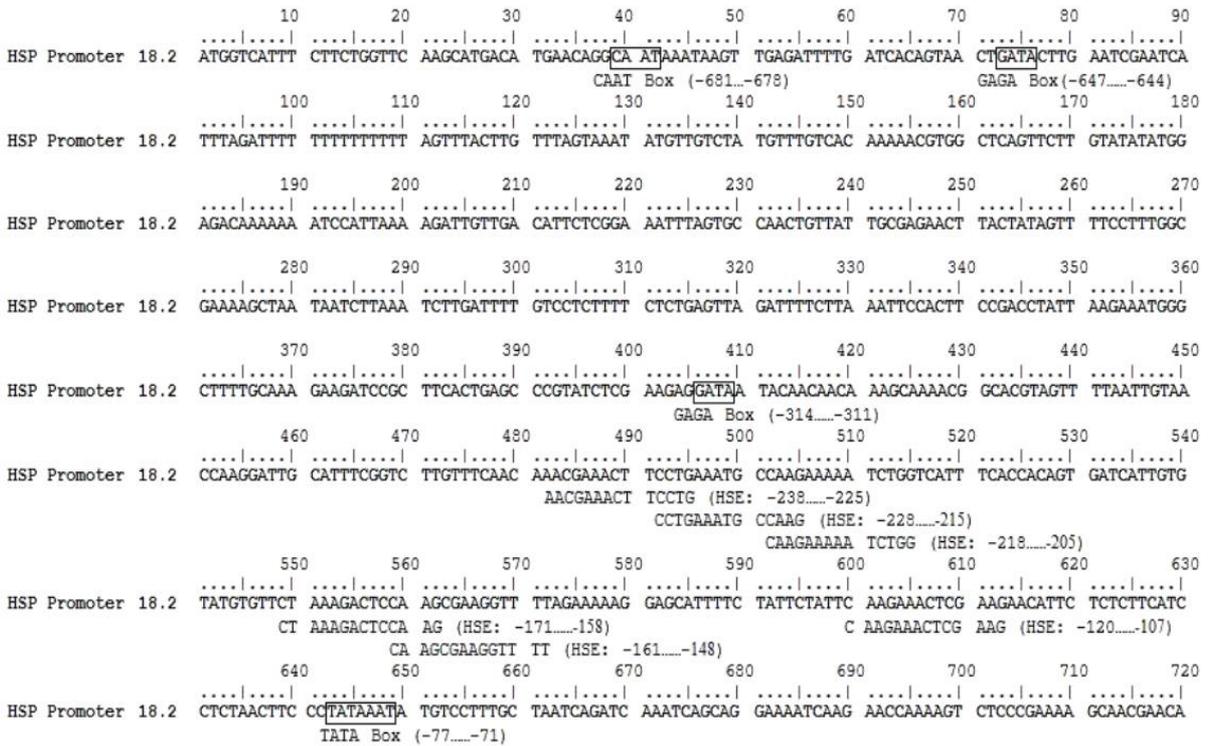
So sánh trình tự nucleotide và phân tích các yếu tố cis đặc trưng của promoter HSP

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, promoter HSP được nhân dòng từ *Arabidopsis* có kích thước tương ứng 720 bp (không tính trình tự của enzym cắt giới hạn là 12 nucleotide), tương ứng với kích thước dự tính khi thiết kế mồi. Ngoài ra, đầu 5' và 3' của đoạn promoter HSP đã phân lập có mang trình tự nhận biết của cặp enzyme HindIII (aagctt) và BamHI (ggatcc). So sánh trình tự nucleotide của promoter HSP 18.2 với các trình tự đã được công bố với các trình tự promoter HSP trên ngân hàng gen quốc tế bằng công cụ BLAST, chúng tôi thu được kết quả trình bày trên Bảng 2.

Bảng 2: Trình tự promoter HSP

Mã số	Tên gene đã công bố	Mức độ so sánh	Mức độ tương đồng
X1729 5.1	<i>Arabidopsis</i> HSP18.2 gene for 18.2kDa heat shock protein	100%	100%
AB006 705.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MTH12	100%	100%
CP002 688.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 5, complete sequence	100%	100%

Qua bảng 2 có thể thấy, trình tự promoter HSP được nhân dòng có mức độ tương đồng nucleotide với trình tự promoter HSP đã được công bố trên ngân hàng Gene. Tiếp tục phân tích các yếu tố điều hòa cis của promoter HSP phân lập được bằng cách dùng cơ sở dữ liệu phân tích chuyên dụng PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements). Kết quả phân tích được thể hiện ở Hình 3.



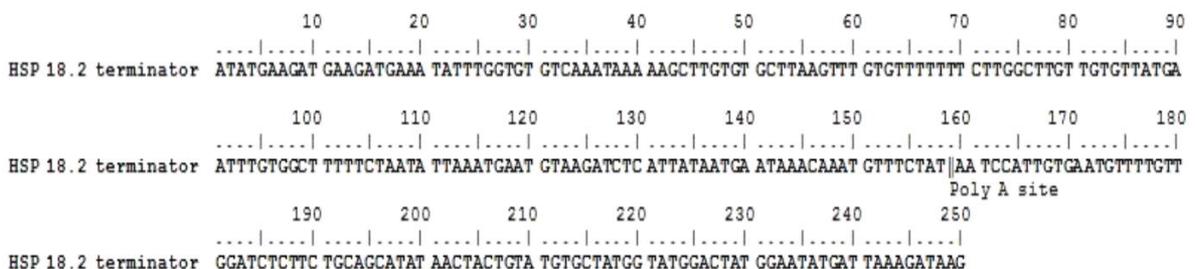
Hình 3. Phân tích trình tự nucleotide promoter HSP từ *Arabidopsis*

Phân tích Hình 3 cho thấy, promoter HSP thu được có mang đầy đủ trình tự cis của một promoter điển hình gồm: Hộp CAAT (vị trí 39→42), 2 hộp GATA (vị trí 73→76 và 406→409) và hộp TATA (vị trí 643→649 bp). Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự promoter HSP thu được với trình tự đã công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế, đã xác định được promoter HSP thu được có đủ sáu yếu tố cảm ứng với nhiệt độ (Heat shock elements: HSE): Từ vị trí 482→495, 492→505, 502→515, 549→562, 559→572 và 600→613 (tương ứng với các vị trí: -238→-225, -228→-215, -218→-205, -171→-158, -161→-148 và -120→-107 theo chiều 5'). Kết quả này khẳng định trình tự promoter HSP phân lập được chính là

promoter HSP từ cây *Arabidopsis*. Ngoài ra, đầu 5' và 3' của đoạn promoter HSP đã phân lập có mang trình tự nhận biết của cặp enzyme cắt giới hạn HindIII (aagctt) và BamHI (ggatcc).

So sánh trình tự nucleotide và phân tích các yếu tố đặc trưng của terminator HSP

Kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gene terminator HSP cho thấy đoạn gene này chứa 250bp, có độ tương đồng 100% với trình tự terminator HSP đã công bố của Nagaya S và cs (2010, tr.328 - 532). Trên trình tự terminator HSP này gồm toàn bộ đầu 3'UTR và poly A site, vị trí của poly A site là từ nucleodite 158 (Hình 4).



Hình 4. Phân tích trình tự nucleotide terminator HSP từ *Arabidopsis*

Ngoài ra, terminator HSP phân lập được còn chứa hai vị trí cắt của enzym cắt giới hạn là SacI (gaattc) và EcoRI (gaattc). Từ các kết quả trên, chúng tôi khẳng định đã phân lập thành công terminator HSP của cây *Arabidopsis*.

4. Kết luận

Đã nhân dòng thành công promoter và terminator HSP từ cây *Arabidopsis thaliana* với mức độ chính xác, độ tương đồng cao với các trình tự đã công bố trên ngân hàng Gen quốc tế. Promoter HSP thu được có kích thước 720

bp với đầy đủ các vùng tác động cis quan trọng của một promoter điển hình ở thực vật: Hộp TATA, CAAT và GATA, ngoài ra còn chứa 6 vùng cảm ứng với nhiệt độ. Tiếp theo là trình tự terminator HSP phân lập được có kích thước 250 bp, vị trí của poly (A) là ở nucleotide 158. Các trình tự này là nguyên liệu tốt cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm thiết kế vector chuyển gene biểu hiện hiệu quả protein tái tổ hợp ở thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carswell S, Alwine JC. (1989). Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. *Mol. Cell Biol*, 9, 4248 - 4258.
2. Desai PN, Shrivastava N, Padh H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv*, 28, 427 - 435.
3. Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*, 41, 95 - 98.
4. Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải. (2007). Tổng quan về promoter và ứng dụng trong công nghệ gen thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5(1), 1 - 18.
5. Lee KT, Chen SC, Chiang BL, Yamakawa T. (2007). Heat-inducible production of β -glucuronidase in tobacco hairy root cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 1047 - 1053. DOI10.1007/s00253 - 006 - 0576 - 2.
6. Moriwaki M, Yamakawa T, Vashino T, Kodama T, Igarashi Y. (1999b). Organ-specific expression of β -glucuronidase activity driven by the *Arabidopsis* heat shock promoter in heat stressed transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Rep*, 19, 92 - 95.
7. Moriwaki M, Yamakawa T, Washino T, Kodama T, Igarashi Y. (1999a). Delayed recovery of β -glucuronidase activity driven by an *Arabidopsis* heat shock promoter in heatstressed transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Rep*, 19, 96 - 100.
8. Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A, Kato K. (2010). The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol*, 51, 328 - 532. doi:10.1093/pcp/pcp188.
9. Sharma AK, Sharma MK. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv*, 27(6), 811 - 832.
10. Streatfield SJ. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J*, 5(1), 2 - 15.
11. Ingelbrecht IL, Herman LM, Dekeyser RA, Van Montagu MC, Depicker AG. (1989). Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*, 1, 671 - 680.