

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CÁC YẾU TỐ ĐIỀU KHIỂN BIỂU HIỆN GEN ĐẶC HIỆU TỪ BÈO TẮM *SPIRODELA POLYRRHIZA* DB2

Trần Thị Phương Liên¹, Hà Hồng Hạnh¹, Lê Huy Hàm²

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

²Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu phân lập và sử dụng các đoạn điều khiển biểu hiện gen đặc hiệu từ cây trồng là hướng nghiên cứu được đặc biệt chú ý đến trong công nghệ gen thực vật, nhằm nâng cao khả năng biểu hiện các gen tái tổ hợp. Bèo tấm là thực vật một lá mầm, đối tượng nghiên cứu tương đối mới, có hàm lượng protein và polysaccharide cao, vì vậy việc hoàn thiện quy trình tách chiết DNA được tiến hành sử dụng một số phương pháp khác nhau với một số cải tiến nhỏ. Kết quả cho thấy, các phương pháp sử dụng kết hợp CTAB và PVP, CTAB và PEG hoặc SDS và PVP có sản phẩm DNA sạch và chất lượng tốt. Đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện bao gồm promoter, 5'UTR (untranslated region) và intron 1 của gen mã hóa cho ubiquitin (SpUBipin) được nhân lên bằng PCR sử dụng DNA genome của giống bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* DB2. Sản phẩm PCR được tách dòng vào vector pJET1.2, kiểm tra bằng các enzyme cắt hạn chế và đọc trình tự. Như vậy, đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện bao gồm promoter, 5'UTR và intron 1 có độ dài 2013 bp, còn đoạn promoter và 5'UTR có độ dài 1033. Phân lập cả 2 đoạn: đoạn promoter và đoạn bao gồm cả promoter và intron 1 nhằm mục đích nghiên cứu ảnh hưởng của intron 1 đến khả năng biểu hiện gen. So với trình tự này của giống đã được công bố, vùng promoter có 4 vị trí thay đổi, vùng intron 1 có 2 vị trí thay đổi. Khả năng sử dụng các đoạn promoter này để biểu hiện các gen trong bèo tấm như thế nào là vấn đề cần nghiên cứu tiếp.

Từ khóa: Bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*, biểu hiện gen, intron, promoter, ubiquitin

MỞ ĐẦU

Promoter là thành phần quan trọng trong cấu trúc của tất cả các gen, khởi đầu cho sự phiên mã, đóng vai trò then chốt trong việc biểu hiện gen. Trong công nghệ gen thực vật, vấn đề phân lập các promoter biểu hiện gen hữu hiệu trên cây trồng, đặc biệt là promoter đặc hiệu cho từng loại cây, biểu hiện trong các loại mô tế bào khác nhau ngày càng được quan tâm đến. Nhiều promoter từ các gen ở thực vật được phân lập trong số đó phải kể đến promoter ubiquitin gen ngô, promoter gen *rbcS* (ribulose - 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit), promoter của gen mã hóa sucrose synthase... (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2007). Ubiquitin - protein sốc nhiệt (heat shock protein - HSP) với phân tử lượng nhỏ, có mặt trong mọi tế bào ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng, protein này tham gia vào quá trình phân giải polypeptide trong tế bào chết, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào và chuyển hóa các chất trong tế bào. Promoter của ubiquitin gen từ cây ngô được sử dụng rộng rãi trong công nghệ gen thực vật (Christensen *et al.*, 1992; Sivamani, Qu, 2006; Lu *et al.*, 2008). Bèo tấm là cây một lá mầm nhỏ nhất, có hàm lượng protein và polysaccharide cao. Với đặc thù cấu trúc và quá trình

trao đổi chất, bèo tấm được sử dụng trong công nghệ gen thực vật như nhà máy sản xuất protein tái tổ hợp. Một số promoter bèo tấm đã được phân lập như các promoter các gen SSU5A, SSU5B, promoter của gen NPR1 (negatively phytochrome regulated1)... có phản ứng với điều kiện chiếu sáng hoặc cảm ứng ABA trong các nghiên cứu về quá trình quang hợp ở cây (Buzby *et al.*, 1990; Weatherwax *et al.*, 1998). Để tăng cường hiệu quả chuyển gen, ngoài sử dụng promoter truyền thống như promoter 35S CAMV, promoter ubiquitin từ loài bèo tấm *Lemna minor* đã phân lập, nghiên cứu và hoàn thiện ở Mỹ, đã được đánh giá có hiệu quả cao hơn và đăng ký thành patent (Dickey *et al.*, 2007). Ở Việt Nam, có 3 loài bèo tấm được phát hiện thấy là *Lemna aequinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza* và *Wolffia globosa*. Trong bài này, chúng tôi thông báo các kết quả nghiên cứu hoàn thiện các phương pháp tách chiết DNA từ bèo tấm và phân lập promoter ubiquitin từ loài bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các giống bèo tấm (*Lemna aequinoctialis* DB1.

Spirodela polyrrhiza DB2) được Viện Di truyền nông nghiệp lưu giữ. Đây là các giống bào tằm được thu thập tại địa bàn Hà Nội và được định dạng tên loài tại Cộng hòa Liên bang Đức.

Hóa chất được mua của các hãng Sigma, Fermentas, Merck. Bộ kit tách chiết DNA tổng số được mua từ hãng Fermentas.

Phương pháp

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng CTAB và PVP theo Stewart và Vie (1993). Bào tằm nghiền trong nitrogen lỏng. Khoảng 1 g mẫu thực vật được chiết trong 5 ml dung dịch đệm có chứa Tris-HCl (pH = 8) 0,1 M; NaCl 1,4 M; EDTA (pH = 8) 10 mM; 0,1% β -mercaptoethanol, 2% CTAB, 1% PVP và 5 mM ascorbic acid, ủ ở 65°C trong ít nhất 1 giờ. Mẫu được xử lý bằng phenol-chloroform và cuối cùng bằng chloroform. Lớp trên cùng tách ra rửa bằng một phần mười thể tích CH_3COO 3 M và ba thể tích cồn ở -20°C trong 2 h. Sau đó, rửa lại 2 lần bằng cồn 70%. Cặn thu được làm khô ở điều kiện chân không và hòa vào 300 ml TE. Loại RNA bằng RNase

Phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng SDS và PVP theo Angelaes và đồng tác giả (2005) có sự thay đổi trong thành phần dung dịch đệm chiết như sau: NaCl 2 M; Tris-HCl (pH = 8) 0,2 M; EDTA (pH = 8) 0,07 mM; β -mercaptoethanol 0,2 M. Sau đó, cho thêm 0,2 ml 20% SDS đối với 1 g mẫu thực vật và ủ ở 65°C trong ít nhất 1 h.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng CTAB và PEG theo Zuccarello và đồng tác giả (2006): thành phần dung dịch đệm chiết có chứa Tris-HCl (pH = 8) 0,1 M; NaCl 1,4 M; EDTA (pH = 8) 0,02 mM; 0,1% β -mercaptoethanol, 4% CTAB và 1% PEG 6000,

Phương pháp PCR

PCR được tiến hành sử dụng các cặp mồi đặc hiệu sử dụng DNA tổng số. Hóa chất mua của hãng Fermentas: *Pfu*-polymerase với các dung dịch đệm tương ứng. Chu trình nhiệt của phản ứng trong thể tích 25 μ l như sau: 95°C - 4 phút; 30 chu kỳ: 95°C - 1 phút, 50 - 58°C - 1 phút, 72°C - 1 - 2 phút, sau đó, 72°C - 10 phút.

Các phương pháp tách dòng theo Sambrook và Russel (2001), đọc trình tự trên máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Mỹ) kết hợp sử dụng bộ kit Big Dye.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoàn thiện phương pháp tách chiết DNA từ bào tằm

Các phương pháp sử dụng để tách chiết DNA từ đầu tương và ngô sử dụng proteinase K và SDS theo Becker và đồng tác giả (1995), sử dụng CTAB theo Keim và đồng tác giả (1989) đều không cho hiệu quả cao đối với việc tách chiết DNA từ bào tằm. Tách DNA từ bào tằm bằng Kit của hãng Fermentas cho hiệu suất thấp và không sạch hết RNA theo như dự kiến. Bào tằm là đối tượng thực vật tương đối đặc biệt, có cấu trúc thích nghi với môi trường sống trên mặt nước. Chúng chứa nhiều protein và polysaccharide (Golovchenko *et al.*, 2002).

Trong phòng thí nghiệm của chúng tôi, DNA từ bào tằm đã được tách chiết thử nghiệm theo ba phương pháp khác nhau:

i/ Phương pháp của Stewart và Vie (1993). Theo phương pháp này, bào tằm được chiết trong dung dịch đệm có chứa Tris-HCl (pH = 8) 0,1 M; NaCl 1,4 M; EDTA (pH = 8) 10 mM; 0,1% β -mercaptoethanol, 2% CTAB, 1% PVP và 5 mM ascorbic acid. Đây là phương pháp hữu hiệu dùng để tách chiết DNA từ nhiều loài thực vật đặc biệt là các cây thân gỗ như cây sồi, nhưng chưa thật hữu hiệu đối với bào tằm. Chúng tôi đã nâng nồng độ của PVP lên 2% để đạt được hiệu quả tốt.

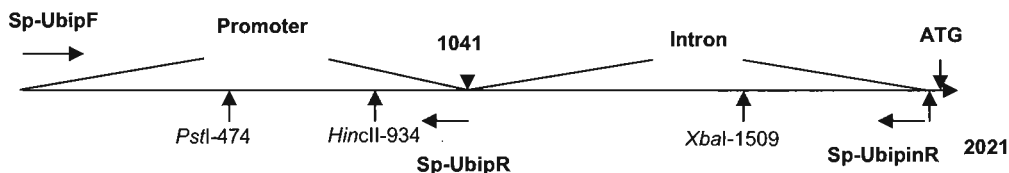
ii/ Phương pháp của Angelaes và đồng tác giả (2005). Bào tằm được chiết trong dung dịch đệm có chứa NaCl 2 M; Tris-HCl (pH = 8) 0,2 M; EDTA (pH = 8) 0,07 mM; β -mercaptoethanol 0,2 M. Sau đó, cho thêm một lượng thích hợp 20% SDS. Đây là phương pháp tách chiết DNA từ cây dừa, cây chứa nhiều polysaccharide và chất béo. Phương pháp này cho kết quả tốt đối với bào tằm

iii/. Phương pháp Zuccarello và đồng tác giả (2006). Bào tằm được chiết trong dung dịch đệm có chứa Tris-HCl (pH = 8) 0,1 M; NaCl 1,4 M; EDTA (pH = 8) 0,02 mM; 0,1% β -mercaptoethanol, 2% CTAB và 1% PEG 6000. Đây là phương pháp tách chiết DNA từ *Kappaphysus* và *Eucheuma*. Tuy nhiên trong điều kiện phòng thí nghiệm, phương pháp này chưa cho hiệu quả tốt với bào tằm. Chúng tôi đã cho tăng CTAB lên 4% và PEG lên 2% và nhận được kết quả khả quan cho bào tằm. Trong nghiên cứu phân lập gen từ thực vật, một trong những điều kiện tiên quyết là chất lượng DNA. DNA còn nguyên vẹn, không bị gãy đứt, không có các tạp chất như protein, lipide, polysaccharide, các hợp chất có chứa nhân

phenol và các hợp chất thứ cấp khác... Nhiều phương pháp tách chiết DNA từ thực vật được tiến hành nghiên cứu và hoàn thiện trên các đối tượng thực vật khác nhau (Muray, Thompson, 1980; Keim *et al.*, 1988, Stewart, Vie, 1993, Becker *et al.*, 1995; Angelaes *et al.*, 2005; Zuccarello *et al.*, 2006) sử dụng proteinase K, SDS, CTAB, PEG, PVP... Công nghệ gen, mà trọng tâm của nó chính là phân lập, nghiên cứu cấu trúc chứa năng của gen để sử dụng với mục đích phục vụ nhân loại, đều bắt đầu từ những kỹ thuật tương chừng như đơn giản nhất - tách chiết DNA genome. Tất cả các kỹ thuật hiện đại từ PCR, lập thư viện gen... đều phụ thuộc vào chất lượng DNA tách chiết được. Nó giải nghĩa tại sao cho đến nay vẫn luôn có những công trình nghiên cứu hoàn thiện các phương pháp tách chiết DNA genome được đặc biệt quan tâm.

Phân lập đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện từ bào tằm

Trình tự primer được thiết kế dựa trên trình tự các yếu tố điều khiển biểu hiện gen ubiquitin loài bào tằm *Spirodela polyrrhiza* đã được công bố (Dickey *et al.*, 2007). Các gen ubiquitin đều có cấu trúc bao gồm promoter, 5'UTR, intron sau đó là trình tự mang mã di truyền được bắt đầu từ ATG (mã của Methionin). Như vậy, trong vùng 5' trước vị trí khởi đầu dịch mã có đoạn promoter, 5'UTR và đoạn intron, đoạn intron này được xem như có chức năng tăng cường khả năng biểu hiện của gen. Sơ đồ và trình tự mỗi được thiết kế nhằm phân lập đoạn promoter (SpUbip) và đoạn bao gồm cả promoter và intron (SpUbipin) được trình bày sau đây:



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện gen ubiquitin của loài bào tằm *Spirodela polyrrhiza* (Mỹ) và vị trí các mồi.

Trình tự các cặp mồi như sau:

Sp-UbipF: 5' GGC GGA GAT GGA CAG ATA
ATG AGA TG 3';

Sp-Ubip-RL: 5' ACT TGG GAG AGA CGA CGC
GCT TCC TC 3';

Sp-Ubipin-R: 5' GCT GAT GGA ACA TAT GAC
GAC TGA AAG G 3'.

PCR sử dụng cặp mồi Sp-UbipF và Sp-UbipinR trên khuôn mẫu DNA tổng số của giống bào tằm DB2 (*Spirodela polyrrhiza*DB2) cho đoạn khoảng 2 kb hình 2A (SpUbipin). Sản phẩm PCR được sử dụng để tiến hành PCR nhân đoạn promoter với cặp mồi Sp-UbipF và Sp-UbipR. Kết quả đã nhận được đoạn khoảng 1 kb (SpUbip). Cả hai loại sản phẩm PCR đều được tinh sạch bằng Wizard kit, gắn vào vector pJET2.1 và biến nạp vào chủng *E. coli* DH5a. Một số dòng đã được chọn lọc, tách chiết DNA plasmid. Các dòng này phải xử lý bằng các enzyme hạn chế *HindIII* và *NotI* để kiểm tra đoạn gắn mà không dùng *XhoI* và *XbaI* theo cách thông thường đối với pJET2.1 vì trong trình tự của đoạn promoter

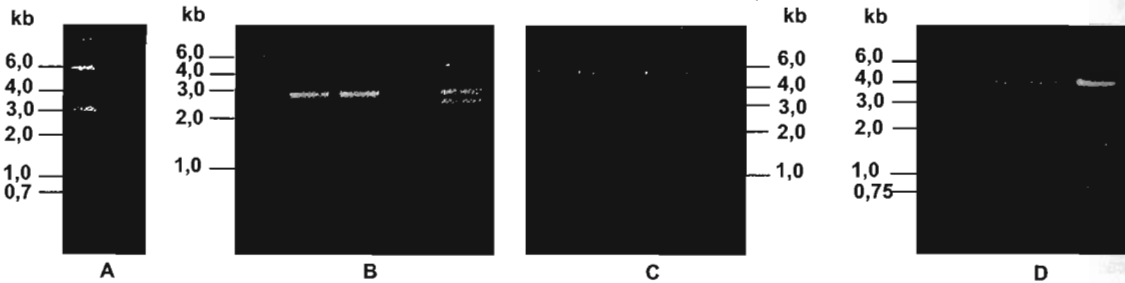
có các điểm nhận biết các enzyme hạn chế này. Qua đó, chúng tôi đã chọn được 3 dòng pJETSpUbip với đoạn cắt kiểm tra bằng khoảng 1,3 kb và 3 dòng pJETSpUbipin với đoạn cắt kiểm tra bằng khoảng 2,3 kb (Hình 2B). Các dòng này lại được tiếp tục kiểm tra bằng các enzyme hạn chế *HincII* và *PstI*. Bên trong đoạn này. Các dòng pJETSpUbip, pJETSpUbipin đều có một điểm cắt của *HincII* tạo thành băng tương ứng khoảng 4 và 5 kb. Hai điểm cắt của *PstI* (pJET1.2 có điểm cắt ở vị trí 158) ở các dòng pJETSpUbip đều cho hai băng 3,3 và 0,8 kb, còn pJETSpUbipin cho hai băng khoảng 4,2 kb và 0,8 kb. Như vậy, kết quả kiểm tra các vị trí của enzyme cắt hạn chế có thể dự đoán về đoạn gắn chính là đoán chúng tôi cần tìm.

Chúng tôi tiến hành đọc trình tự tất cả 6 dòng này, mỗi trình tự lặp lại 3 lần. Đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện gen ubiquitin (SpUbipin) có chiều dài 2013 bp, còn đoạn promoter và 5'UTR (SpUbip) có chiều dài là 1033 bp. Trong đó, có 4 vị trí thay đổi so với loài này của Mỹ. Đó là các vị trí C→T (599); A→G (729); C→T (741) và T→C (859) trên vùng promoter và 2 vị trí G→A (1910) và A→C (1976)

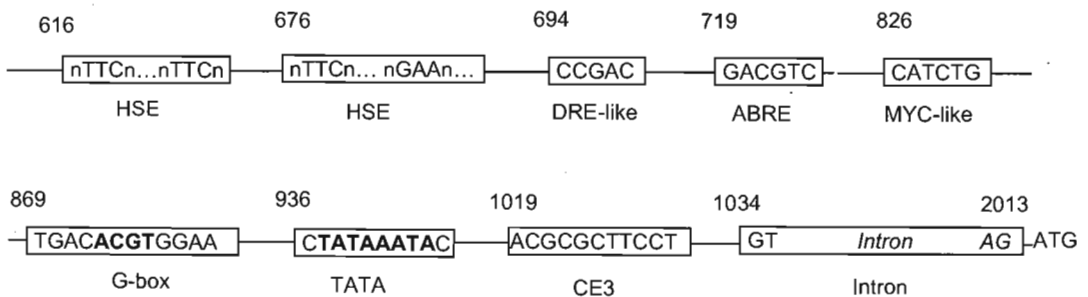
trên vùng intron 1. Sử dụng phần mềm chuyên dụng dự đoán chức năng trình tự http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, <http://www.softberry.ru/cgi-bin/programs/promoter> cho thấy đây là đoạn có những vùng chức năng của promoter (Hình 3). Hộp TATA ở vị trí 936 và điểm khởi đầu phiên mã dự đoán là vị trí 986. Ngoài ra, còn có các trình tự đặc trưng cho G-box, CE3, ABRE-CE3, MYC-like... Đây là các yếu tố điều hòa trên promoter của các gen cảm ứng với ánh sáng, abscisic acid, điều kiện mất nước... Vùng có trình tự nGAAn và các trình tự ngược chiều nTTCn được dự đoán là các yếu tố sốc nhiệt (heat shock element-HSE) trên promoter của các gen mã hóa cho các HSP. Trình tự các yếu tố điều khiển biểu hiện gen ubiquitin này được đăng ký trên ngân hàng trình tự

gen quốc tế, mã số: FM995610.

Ubiquitin là một trong các HSP nhỏ. Cấu trúc của các gen polyubiquitin của ngô, lúa đều có vùng promoter, 5'UTR, intron và exon. Đoạn intron được dự đoán có chức năng tăng cường khả năng biểu hiện gen này. Vì vậy, để biểu hiện gen trong thực vật, người ta đã sử dụng không chỉ có đoạn promoter mà cả đoạn promoter và intron của gen ubiquitin (Christensen *et al.*, 1992; Sivamani, Qu, 2006, Lu *et al.*, 2008). Promoter chúng tôi phân lập được có cấu trúc giống như các promoter của các gen ubiquitin các loài thực vật khác. Khả năng sử dụng đoạn promoter và đoạn bao gồm cả promoter và intron 1 này như thế nào là vấn đề cần được nghiên cứu tiếp.



Hình 3. A. Sản phẩm PCR đoạn promoter và intron (SpUbipin). B. Plasmid pJETSpUbipin cắt bằng *HindIII* và *NcoI*. C. Plasmid pJETSpUbipin cắt bằng *HincII*. D. Plasmid pJETSpUbipin cắt bằng *PstI*.



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện gen ubiquitin của loài bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* với dự đoán các vùng chức năng promoter.

KẾT LUẬN

Đã hoàn thiện được phương pháp tách chiết DNA từ các loài bèo tấm khác nhau sử dụng kết hợp CTAB và PVP, CTAB và PEG hoặc SDS và PVP.

Đã phân lập được đoạn các yếu tố điều khiển biểu hiện của gen mã hóa cho ubiquitin ở loài bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* DT1. Promoter có độ dài 1033 bp, đoạn bao gồm promoter và intron có độ dài 2013 bp, trong đó có 4 vị trí nucleotide khác với promoter

và 2 vị trí khác với intron được phân lập từ loài này ở Mỹ.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: Nghiên cứu tạo giống bèo tấm mang gen kháng nguyên H5N1 phòng chống bệnh cúm ở gia cầm thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp 2007 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Angeles JGC, Laurena AC, Tecson-Mendoza EM (2005) Extraction of genomic DNA from the lipid-polysaccharide, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Mol Biol Rep* 23: 297a-297i.

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: 456-462.

Buzby JS, Yamada T, Tobin EM (1990) A light - regulated DNA - binding activity interacts with a conserved region of a *Lemna gibba* rbcS promoter. *Plant Cell* 2: 805-814.

Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18(4): 675-689

Dickey LF, Cox KM, Peele CG (2007) Expression control elements from the lemnaceae family. *US Patent Appl* 20070180583.

Golovchenko VV, Ovodova RG, Shashkov AS, Ovodov YS (2002) Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L. *Phytochemistry* 60(1): 89-97.

Keim P, Olson TC, Shoemaker RC (1988) A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet Newsl* 15: 150-152.

Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải (2007) Promoter và ứng dụng trong công nghệ gen thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 1-18.

Lu J, Sivamani E, Li X, Qu R (2008) Activity of the 5' regulatory regions of the rice polyubiquitin *rub13* gene in transgenic rice plants as analyzed by both *GUS* and *GFP* reporter genes. *Plant Cell Rep* 27: 1587-1600.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8(19): 4321-4325.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.

Sivamani E, Qu R (2006) Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. *Plant Mol Biol* 60(2): 225-239.

Stewart CN Jr, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14: 748-751.

Weatherwax SC, Williams SA, Tingay S, Tobin EM (1998) The phytochrome response of the *Lemna gibba* NPR1 gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels. *Plant Physiol* 116: 1299-1305.

Zuccarello GC, Critchley AT, Smith J, Sieber V, Lhonneur GB, West JA (2006) Systematics and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 2006, DOI:10.1007/s 10811-006-9066-2.

CLONING OF SPECIFIC GENE EXPRESSION CONTROL ELEMENTS FROM DUCKWEED *SPIRODELA POLYRRHIZA* DB2

Tran Thi Phuong Lien^{1,*}, Ha Hong Hanh¹, Le Huy Ham²

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Agricultural Genetics, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

SUMMARY

Cloning and utilization of specific gene expression control element of plants in order to increase the expression ability of recombinant genes are vital research area in plant biotechnology. Research of Duckweeds, monocotyledonous plants with a high content of proteins and polysaccharides, is a new initiative in our laboratory. We have carried out optimization method of DNA isolation. Good quality DNA was obtained by the isolation methods CTAB and PVP, CTAB and PEG, and SDS and PVP. A PCR amplification of the total

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562934; E-mail: tplien@ibt.ac.vn

genomic DNA revealed, the full-length *Spirodela polyrrhiza* DB2 ubiquitin expression control element, the promoter plus 5'UTR and intron, was 2 kb in length, and the promoter plus 5' UTR section 1 kb. The PCR products were cloned into pJET2.1, checked by restriction enzymes and sequenced. The full-length *Spirodela polyrrhiza* DB2 ubiquitin expression control element, the promoter plus 5'UTR and intron was exactly 2013 bp, and the promoter plus 5' UTR region was 1033 bp. Compared with the sequence reported, there were four substitution positions in the promoter region, and two in the intron region. Utilization of this isolated promoter and full-length gene expression control element requires further investigation.

Keywords: Duckweed *Spirodela polyrrhiza*, gene expression, intron, promoter, ubiquitin