

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TÓM TẮT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC

Tên đề tài
TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENZYME DEACETYL VINDOLINE 4-O-ACETYLTRANSFERASE (DAT) THAM GIA TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

Mã số: ĐH2016 – TN05-04

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Bùi Thị Hà

THÁI NGUYÊN, 2018

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC**

**BÁO CÁO TÓM TẮT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC**

Tên đề tài
**TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENZYME DEACETYL VINDOLINE 4-
O-ACETYLTRANSFERASE (DAT) THAM GIA TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY
DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)**

Mã số: ĐH2016 – TN05-04

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Bùi Thị Hà

Tổ chức chủ trì

Chủ nhiệm

Bùi Thị Hà

THÁI NGUYÊN, 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: “*Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa enzyme DAT tham gia tổng hợp alkaloid ở cây dứa cạn (Catharanthus roseus (L.) G. Don)*”.
- Mã số: ĐH2016 – TN05-04
- Chủ nhiệm đề tài: ThS. Bùi Thị Hà
- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: Từ tháng 01 năm 2016 đến tháng 12 năm 2017

2. Mục tiêu:

Xác định đặc điểm và biểu hiện được gen mã hóa deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (*CrDAT*) phân lập từ cây dứa cạn. Tạo được cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT*.

3. Tính mới và sáng tạo:

Kết quả nghiên cứu trong đề tài góp phần làm sáng tỏ đặc điểm cấu trúc của gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cạn màu hoa hồng tím và màu hoa trắng thu thập tại Thái Nguyên. Cơ sở khoa học và hiệu quả của kỹ thuật tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa trong chuỗi chuyển hóa tổng hợp alkaloid nhằm nâng cao hàm lượng alkaloid của cây dứa cạn.

4. Kết quả nghiên cứu:

1.1. Gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cạn đã được tách dòng phân tử và xác định trình tự nucleotide. Gen *CrDAT* (cDNA) có kích thước 1320 bp, mã hóa cho 439 amino acid.

1.2. Vector chuyển gen thực vật pBI121-*CrDAT* đã được thiết kế và chuyển vào hệ gen của cây thuốc lá và cây dứa cạn chuyển gen đã biểu hiện được protein tái tổ hợp CrDAT có kích thước khoảng 51 kDa.

1.3. Môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/l; agar 10 g/l; BAP 1,0 mg/l và IBA 0,6 mg/l; nước dứa 100 ml/l; pH = 5,8 thích hợp cho sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên. Môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/l; agar 10 g/l; BAP 0,5 mg/l và IBA 0,4 mg/l; nước dứa 100 ml/l; pH = 5,8, thích hợp cho sự phát sinh chồi và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm.

5. Sản phẩm:

5.1. Sản phẩm khoa học

- Số bài báo đăng trên Tạp chí quốc tế trong hệ thống ISI (SCI-E): 01 bài

1. Bui Thi Ha, Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Tam, Le van Son, Chu Hoang Mau (2018), “Expression of the gene encoding deacetylvindoline 4-o-acetyl transferase (CrDAT)

from *Catharanthus roseus* in transgenic tobacco plant”, *Tạp chí Australian Journal of Crop Science*, AJCS 12 (07), pp. 1139 – 1143. doi: 10.21475/ajcs.18.12.07.PNE1077.

- Số bài báo đăng trên Tạp chí quốc gia: 02 bài

1. Bùi Thị Hà, Đỗ Huy Hoàng, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2016), “ Nghiên cứu quy trình chuyển gen ở cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 157 (12/1), tr. 71-76.

2. Bùi Thị Hà, Đào thị Nhâm, Hoàng Ngọc Anh, Hồ Mạnh Tường, Lê văn Sơn, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2017), “Thiết kế cấu trúc nhằm tăng cường biểu hiện gen mã hóa peroxidase ở cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) chuyển gen”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15 (3), tr. 489 – 495.

5.2. Sản phẩm đào tạo

- Là một phần số liệu của đề tài NCS:

Bùi Thị Hà, (2018), *Nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme DAT tham gia tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn (Catharanthus roseus (L.) G.Don)*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên.

- Đào tạo 02 học viên cao học: Là một phần của đề tài

+ Đào Thị Nhâm (2016), *Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc gen CrPrx phân lập từ cây dừa cạn (Catharanthus roseus (L.) G.Don)*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên.

+ Đỗ Huy Hoàng (2016), *Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen ở cây dừa cạn (Catharanthus roseus (L.) G. Don)*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

- Đề tài có thể được sử dụng làm tài liệu tham khảo trong học tập, giảng dạy phần sinh học.

- Sản phẩm của đề tài được sử dụng làm cơ sở ứng dụng nâng cao hàm lượng alkaloid trong cây dừa cạn bằng kỹ thuật chuyển gen phục vụ cho y dược học.

Ngày 13 tháng 5 năm 2019

Tổ chức chủ trì

(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)

Bùi Thị Hà

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: CLONING AND EXPRESSION OF *DAT* GENE INVOLVED IN ALKALOID SYNTHESIS IN PERIWINKLE PLANTS (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Code number: DH2016 - TN05 - 04

Coordinator: MS. Bui Thi Ha

Implementing institution: Thai Nguyen University of Medicine and Pharmaceine

Duration: from 01-2016 to 12- 2017

2. Objective(s)

Determine the characteristics and express the gene coding for deacetylindoline-4-O-acetyltransferase (CrDAT) isolated from the periwinkle.

3. Creativeness and innovativeness:

The results of the dissertation contribute to the clarification of the structural characteristics of CrDAT genes isolated from the purple and white flowered periwinkle plants collected in Thai Nguyen. The scientific basis and effectiveness of the techniques enhancing the expression of the genes coding for the key enzymes in the chain of alkaloid synthesis have improved the alkaloid content in periwinkle plants.

4. Research results:

4.1. Study and collect data on CrDAT gene; design pairs of PCR primers cloning CrDAT genes; amplify, split and identify CrDAT sequencing.

4.2. Design a plant transgenic vector containing the CrDAT gene and evaluate the activity of the transgenic vector on tobacco plants.

4.3. Study the regeneration system and develop a procedure for gene transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in periwinkle plants.

5. Products:

5.1. Science

1. Bui Thi Ha, Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Tam, Le van Son, Chu Hoang Mau (2018), "Expression of the gene encoding deacetylindoline 4-o-acetyl transferase (CrDAT) from *Catharanthus roseus* in transgenic tobacco plant", *Australian Journal of Crop Science*, AJCS 12 (07), pp. 1139 – 1143. doi: 10.21475/ajcs.18.12.07.PNE1077.

2. Bui Thi Ha, Do Huy Hoang, Nguyen Thi Tam, Chu Hoang Mau (2016), “The transgenic process performed in periwinkle”, (2016), *Journal of Science and Technology - TNU*, 157 (12/1), pp. 71-76.

3. Bui Thi Ha, Dao Thi Nham, Hoang Ngoc Anh, Ho Manh Tuong, Le Van Son, Nguyen Thi Tam, Chu Hoang Mau (2017), “Designing structure to overexpress gene encodes peroxidase in transgenic periwinkle plants (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)”, (2017), *Journal of Biotechnology*, 15(3), pp. 489 - 495.

5.2. Educase

- Is part of the data of the PhD:

Bui Thi Ha (2018), *The study on the overexpression of DAT gene involved in alkaloid synthesis in periwinkle plants (Catharanthus roseus (L.) G. Don*, Doctoral dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University

- Graduate training 02 masters:

+ Dao Thi Nham (2016), *Designing gene transgenic vector peroxidase isolated in periwinkle plants (Catharanthus roseus (L.) G. Don)*, Master dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University.

+ Do Huy Hoang (2016), *The transgenic process performed in periwinkle (Catharanthus roseus (L.) G. Don)*, Master dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University.

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results

- The topic can be used as a reference in learning, taught biology.

- The product of the topic is used as a basis for application overexpress alkaloid in periwinkle by genetic engineering for medicine.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, loài người trên thế giới đang phải đối mặt với rất nhiều căn bệnh nguy hiểm: ung thư, AIDS, tiểu đường, thoái hóa khớp, viêm gan B, C. Ung thư là căn bệnh gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới. Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO) tỉ lệ người mắc ung thư năm 2012 là 14 triệu người, đến năm 2015 đã có hơn 90 triệu người mắc ung thư và hàng năm có hơn 8 triệu người chết vì ung thư. Bệnh ung thư đang gia tăng ở trẻ em. Tại Mỹ, năm 2016 có hơn 10 nghìn trẻ mắc ung thư từ sơ sinh đến 14 tuổi và có khoảng hơn một nghìn trẻ sẽ chết vì căn bệnh này. Vì vậy, việc tìm kiếm và phát triển thuốc chữa các bệnh ung thư là vấn đề cấp bách hiện nay.

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong những loại cây dược liệu quý. Cây dừa cạn có khả năng sản xuất các indole alkaloid có dược tính quan trọng và ứng dụng trong sản xuất các loại thuốc chống ung thư, đặc biệt là ung thư máu. Ngoài ra, cây dừa cạn còn được chỉ dẫn trong điều trị bệnh bạch cầu lympho cấp và một số bệnh ung thư khác. Trong dân gian, dừa cạn được sử dụng trị cao huyết áp, bệnh tiểu đường, điều hòa kinh nguyệt, chữa tiêu hóa kém và chữa li, lợi tiểu khá mạnh, chữa bệnh đi tiểu đỏ và ít, tẩy giun, chữa sốt cao.

Trong tất cả các alkaloid thực vật, terpenoid indole alkaloid (TIA) là một nhóm quan trọng chứa hơn 3000 loại hợp chất có cấu trúc đa dạng và được tìm thấy ở 8 họ thực vật. Trong đó, các loài cây có nguồn gốc từ họ mã tiền (Loganiaceae), họ trúc đào (Apocynaceae) và họ cà phê (Rubiaceae) chứa hàm lượng alkaloid cao. Dừa cạn có chứa 2 loại alkaloid là vinblastine và vincristine được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh ung thư. Vinblastine và vincristine là những chất ức chế mạnh sự phân chia tế bào và do vậy ngăn cản sự tăng số lượng tế bào. Ngoài ra, một số TIA khác như ajmalicine và serpentine được sử dụng để điều trị rối loạn tuần hoàn. Quá trình chuyển hóa tổng hợp các TIA ở cây dừa cạn là một quá trình phức tạp, trải qua nhiều phản ứng với sự tham gia của nhiều enzyme, các chất điều hòa và các chất vận chuyển.

Hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn hoang dại rất thấp. Vì vậy, định hướng nghiên cứu nhằm tăng hàm lượng alkaloid ở cây dừa cạn được quan tâm với việc sử dụng kỹ thuật hiện đại, trong đó xác định và tăng cường biểu hiện enzyme chìa khóa là khâu nghiên cứu rất quan trọng. Deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (DAT) là một enzyme chìa khóa trong chuỗi chuyển hóa tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn. Biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme DAT sẽ làm tăng các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp và hàm lượng vinblastine và vincristine trong dừa cạn được nâng cao.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi đã thực hiện đề tài: **“Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa enzyme deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (DAT) tham gia tổng hợp alkaloid từ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)”**.

2. Mục tiêu đề tài

Phân lập và tách dòng được gen *DAT* từ cây dừa cạn thu thập tại Thái Nguyên.

Thiết kế được vector chuyển gen mang gen *DAT* và biểu hiện thành công enzyme tái tổ hợp *DAT* trên cây thuốc lá.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Thu thập các mẫu dừa cạn tại Thái Nguyên, phân lập cDNA DAT từ giống dừa cạn hoa hồng tím và giống dừa cạn hoa trắng.

- Thu thập mẫu dừa cạn hoa hồng tím và hoa trắng tại một số địa phương Thái Nguyên;
- Nghiên cứu thông tin về gen DAT , thiết kế cặp mồi nhân gen DAT. Tách chiết RNA tổng số, tạo cDNA và khuếch đại cDNA DAT từ hai mẫu dừa cạn hoa hồng tím và hoa trắng;
- Nghiên cứu dòng hóa cDNA DAT và xác định trình tự gen DAT. So sánh trình tự cDNA DAT giữa giống dừa cạn hoa hồng tím và hoa trắng.

Nội dung 2: Thiết kế vector chuyển gen mang gen *CrDAT* phân lập từ cây dừa cạn.

- Tạo cấu trúc vector chứa promoter biểu hiện trên lá, thân, rễ thực vật, gen *CrDAT* và một số cấu trúc khác.
- Tạo vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen *CrDAT*

Nội dung 3: Nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp rDAT trên cây thuốc lá

- Lây nhiễm *Agrobacterium* mang vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen *CrDAT* vào mô thuốc lá;
- Tái sinh cây thuốc lá chuyển gen;
- Phân tích các dòng cây thuốc lá chuyển gen bằng PCR, lai Western blot.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Đề tài đã tham khảo 3 tài liệu tiếng việt và 59 tài liệu tiếng anh để tổng kết các nội dung liên quan đến đề tài.

Dừa cạn là nguồn giàu alkaloid thuộc chủng loại terpenoid indole alkaloid (TIA) được tách chiết từ ba giống, đó là *roseus* có cánh hoa màu hồng tím, *albus* có cánh hoa màu trắng vàng và *ocellatus* có cánh hoa màu trắng đỏ. Trong đó dừa cạn hoa màu hồng tím có hàm lượng vincristine và vinblastine cao nhất.

Trong cây dừa cạn có khoảng 130 loại alkaloid, trong đó vinblastine và vincristine là hai hợp chất quan trọng nhất. Alkaloid có nhân indol được tìm thấy trong tất cả các bộ phận của cây, nhiều nhất trong lá và rễ. Alkaloid toàn phần có ở lá dừa cạn với hàm lượng 0,37% - 1,15%, thân 0,40%, rễ chính 0,7% - 2,4%, rễ phụ 0,9% - 3,7%, hoa 0,14% - 0,84%, vỏ quả 1,14%, hạt 0,18%. Trong các loại alkaloid đã được chiết từ cây dừa cạn, người ta đặc biệt chú ý 20 nhóm alkaloid có hoạt tính chống ung thư bao gồm vincristine và vinblastine.

DAT là enzyme chìa khóa xúc tác cho phản ứng cuối cùng trong chuỗi tổng hợp vindoline từ deacetylvindoline ở cây dừa cạn. Trong nghiên cứu của Benoit và cs (1998), sự hoạt động của enzyme DAT được xác định ở những cơ quan khác nhau của cây dừa cạn. Enzyme DAT hoạt động cao nhất ở lá non, giảm xuống 76% ở lá già, ở thân là 5%, hoa khoảng 11% và ở rễ không đáng kể. Mối quan hệ giữa hoạt động của enzyme và sự tích lũy protein DAT được xác định bằng kết quả phân tích Western blot.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Hạt của giống dưa cạn màu hoa hồng tím (TN1) và màu hoa trắng (TN2) thu thập tại tỉnh Thái Nguyên. Giống thuốc lá *Nicotinana tabacum* K326 có nguồn gốc từ Viện kinh tế kỹ thuật thuốc lá, do Phòng tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Các chủng vi khuẩn *E. Coli* (DH5 α), chủng *A. tumefaciens* CV58 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.

2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Hóa chất

Hóa chất tinh khiết sử dụng trong phân tích sinh học phân tử có nguồn gốc từ các hãng Fermentas, Bio-Neer, Invitrogen, như Trizol Reagents, kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis, kit GenJET PCR Purification, kit Plasmid Extraction, *taq*-polymerase, buffer PCR, EDTA, Tris, agarose, enzyme giới hạn như *Bam*HI, *Not*I, *Nco*I, *Hind*III, T4 ligase, kháng sinh kanamycine, rifamycine, cefotaxime, carbenicillin và một số hóa chất khác có nguồn gốc từ các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số hãng khác.

Thiết bị

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transilluminator, Bio-Rad, Mỹ), máy chụp ảnh (Amersham Pharmacia Biotech, Thụy Điển), máy Vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy hút chân không Speed-Vac 110A (Savant, Mỹ), máy ly tâm, máy xung điện Gen Pulser,... cùng một số các thiết bị khác phục vụ cho nghiên cứu.

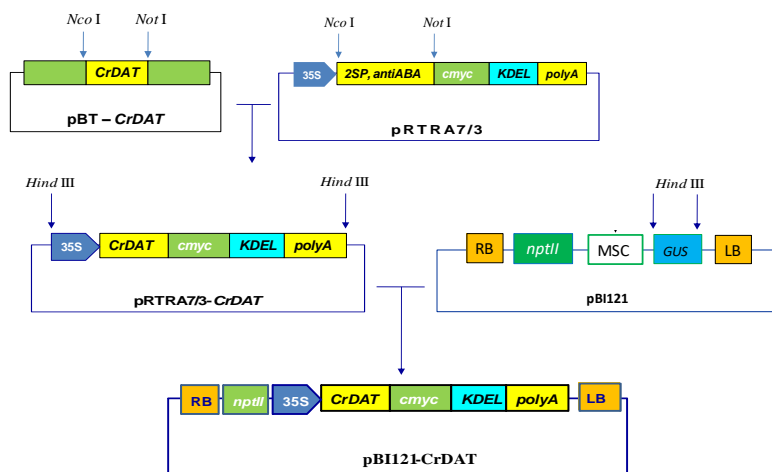
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Các phương pháp sinh học phân tử

Phân lập gen *CrDAT* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế DAT-*Nco*I-F/DAT-*Not*I-R. RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent Kit. cDNA được tổng hợp theo quy trình của nhà sản xuất. Tách dòng và giải trình tự gen qua các bước: i) Tinh sạch sản phẩm PCR, ii) Ghép nối đoạn gen vào vector tách dòng pBT; iii) Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α ; iv) Chọn dòng khuẩn lạc bằng colony PCR; v) Tách chiết plasmid và cắt kiểm tra bằng *Bam*HI; vi) Xác định và phân tích trình tự nucleotide. Kết quả nghiên cứu về các trình tự gen, amino acid được xử lý bằng phần mềm BioEdit,

2.3.2. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen *CrDAT*

Vector chuyển gen mang gen *CrDAT* được thiết kế theo hai bước cơ bản (1) Thiết kế cấu trúc độc lập mang gen chuyển *CrDAT*; (2) Gắn cấu trúc chứa gen *CrDAT* vào vector chuyển gen thực vật pBI121 (Hình 2.2).



Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen pBI121-CrDAT

2.3.3. Chuyển cấu trúc mang gen *CrDAT* vào cây thuốc lá: Phương pháp chuyển cấu trúc chứa gen *CrDAT* vào cây thuốc lá trong môi trường tái sinh *in vitro* được thực hiện theo Topping (1998).

2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen

Xác định sự có mặt và sự hợp nhất gen chuyển *CrDAT* vào hệ gen tế bào chủ của cây thuốc lá và cây dừa cạn chuyển gen bằng PCR và Southern blot. Các cây chuyển gen dương tính với kết quả lai Southern được sử dụng cho phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp *CrDAT* bằng Western blot. Định lượng protein tái tổ hợp r*CrDAT* được tiến hành theo phương pháp của Sun và cs (2006).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

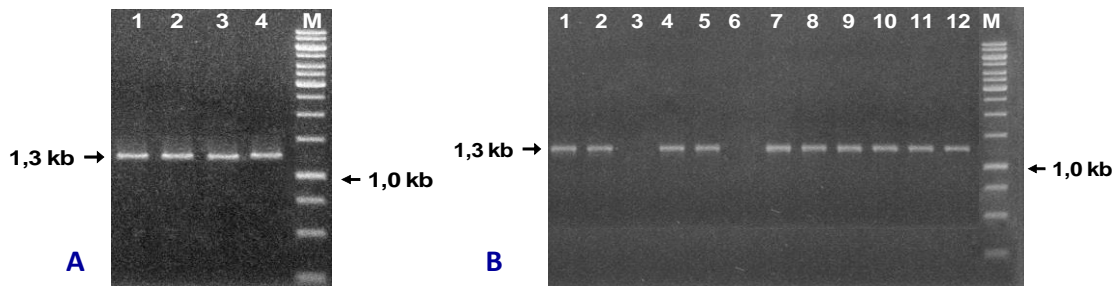
3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *CrDAT* PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN

3.1.1. Kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *CrDAT*

3.1.1.1. Kết quả khuếch đại và tách dòng cDNA

Dựa trên những thông tin về trình tự gen *DAT* của cây dừa cạn đã công bố trên Ngân hàng gen mang mã số AF053307, cặp mồi PCR *DAT-NcoI-F/DATR-NotI-R* (có trình tự nucleotide thể hiện ở bảng 2.1) được thiết kế để nhân bản gen *CrDAT* từ mRNA, dự kiến kích thước cDNA được khuếch đại là 1320 bp.

RNA tổng số được tách chiết từ lá cây dừa cạn hoa hồng tím (TN1), dừa cạn hoa trắng (TN2) và cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng phản ứng phiên mã ngược. Phản ứng PCR khuếch đại cDNA của gen *CrDAT* với cặp mồi đã thiết kế *DAT-NcoI-F/DAT-NotI-R*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% cùng với thang DNA 1 kb được thể hiện ở hình 3.1.



Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *CrDAT*. A: Sản phẩm PCR nhân gen *CrDAT* (cDNA) từ hai mẫu dứa cận TN1 và TN2. M: thang DNA 1 kb; 1,2: gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN1; 3,4: gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN2). B: Sản phẩm colony-PCR từ 12 dòng khuẩn lạc. 1-6: đoạn gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của mẫu TN2; 7-12: đoạn gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của mẫu TN1.

Kết quả thu được ở hình 3.1A cho thấy, mẫu dứa cận TN1 và TN2 cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 1,3 kb. Các băng đều sáng, rõ nét và không có sản phẩm phụ. Kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen *CrDAT* ở dứa cận mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm PCR thu được là gen *CrDAT* của cây dứa cận chúng tôi đã tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *DAT* của dứa cận mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen quốc tế.

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector tách dòng pBT, tạo vector tái tổ hợp pBT-*CrDAT* và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α . Tiến hành chọn dòng các khuẩn lạc màu trắng và chọn ngẫu nhiên 12 dòng khuẩn lạc trắng cho phản ứng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI-F/DAT-NotI-R*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.1B cho thấy, băng DNA có kích thước khoảng 1,3 kb xuất hiện ở tất cả các lần điện di 7, 8, 9, 10, 11, 12 của các dòng khuẩn lạc chứa đoạn gen *CrDAT* từ mẫu TN1; băng DNA xuất hiện ở các lần điện di số 1, 2, 4, 5 đối với các dòng khuẩn lạc chứa đoạn gen *CrDAT* từ mẫu TN2; Kích thước của đoạn DNA tương ứng kích thước của gen *DAT* của cây dứa cận theo tính toán lý thuyết.

Các khuẩn lạc màu trắng dương tính với phản ứng với colony-PCR được sử dụng tách chiết plasmid và các plasmid tái tổ hợp được đem giải trình tự nucleotide.

3.1.1.2. Xác định trình tự gen *CrDAT*

Kết quả giải trình tự nucleotide của đoạn cDNA phân lập từ hai mẫu dứa cận TN1 và TN2 đều cho kích thước 1320 bp (Hình 3.2). Phân tích bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự nucleotide của đoạn cDNA phân lập từ hai mẫu dứa cận TN1 và TN2 là đoạn gen *DAT* của cây dứa cận. Trình tự gen *CrDAT* của hai mẫu dứa cận TN1, TN2 thu được so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen NCBI cho thấy, đoạn mã hóa của gen *CrDAT* có độ tương đồng cao. Gen *CrDAT* phân lập từ hai mẫu dứa cận TN1 và TN2 có độ tương đồng so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 là 99,5% và 99%. Như vậy có thể kết luận rằng, gen *CrDAT* phân lập từ mẫu dứa cận TN1 và TN2 đã được tách dòng thành công. Trình tự nucleotide của gen *CrDAT* phân lập từ hai mẫu dứa

cạn TN1, TN2 đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen quốc tế với mã số LN809930 và LN809931.

3.1.2. So sánh trình tự nucleotide của gen *CrDAT*

Trình tự nucleotide của mẫu dừa cạn TN1 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 6 vị trí nucleotide (1281, 1282, 1283, 1284, 1286, 1287). Gen *CrDAT* của mẫu dừa cạn TN2 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 7 vị trí nucleotide (482, 493, 500, 503, 505, 519, 566). Trình tự nucleotide của gen *CrDAT* ở hai mẫu dừa cạn TN1 và TN2 khác nhau ở 13 nucleotide (Bảng 3.1).

Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide của hai mẫu dừa cạn TN1, TN2 với protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *CrDAT* mang mã số AF053307), kết quả được thể hiện ở hình 3.3.

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của protein DAT ở hai mẫu dừa cạn TN1, TN2 và protein DAT mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *CrDAT* mang mã số AF053307) (Hình 3.3) cho thấy protein DAT gồm 439 amino acid và có độ tương đồng cao. So với protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng gen thì trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1 có độ tương đồng 99,3 %, của mẫu TN2 có độ tương đồng 99,4 %. Trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu TN1 và TN2 tương đồng là 97,7 %. Tuy nhiên, các trình tự amino acid của protein DAT cũng có sự khác nhau ở 10 vị trí amino acid (Bảng 3.2).

Deacetylindoline 4-O-acetyltransferase là enzyme thành viên của họ transferase có chức năng xúc tác ở khâu cuối cùng trong sinh tổng hợp vindoline. Motif HXXXD có thể là một phần trong vị trí hoạt động của enzyme này. Vùng transferase của DAT có 427 amino acid, từ amino acid thứ 8 đến 434. Cây dừa cạn gồm ba giống khác nhau, giống dừa cạn hoa hồng tím, dừa cạn hoa trắng và dừa cạn hoa trắng đỏ. Marfori và Alejar (1993), đã phân tích sự thay đổi hàm lượng alkaloid trong mô sẹo có nguồn gốc từ lá, rễ và hoa của mẫu dừa cạn hoa hồng tím và mẫu hoa trắng đưa ra nhận xét rằng, hàm lượng alkaloid phụ thuộc vào nguồn gốc mô sẹo từ lá, rễ hay hoa và hàm lượng alkaloid ở mô sẹo có nguồn gốc từ rễ của mẫu dừa cạn hoa hồng tím cao hơn ở mẫu hoa trắng. Protein DAT của mẫu dừa cạn TN1 và TN2 khác nhau ở 10 amino acid trong vùng transferase, sự khác nhau này có liên quan gì đến tổng hợp alkaloid và sự khác nhau về hàm lượng alkaloid giữa mẫu hoa hồng tím và mẫu hoa trắng là vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu để làm sáng tỏ.

3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN *CrDAT*

3.2.1. Tạo vector mang cấu trúc chứa gen đích *CrDAT*

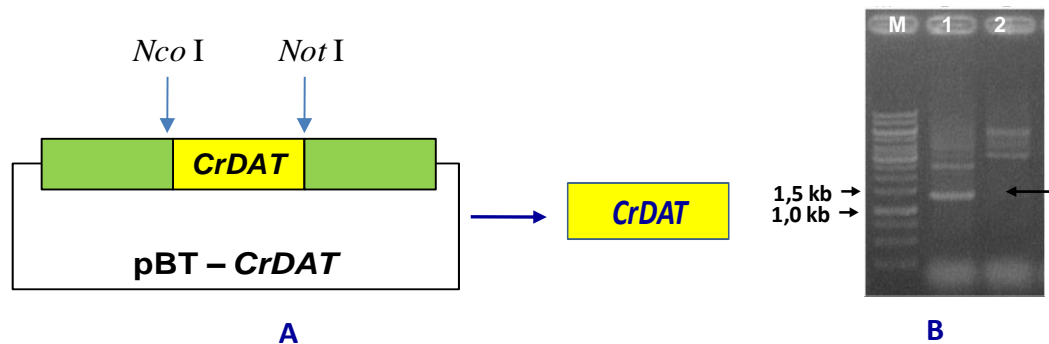
Thu nhận gen CrDAT từ vector tách dòng tái tổ hợp pBT-CrDAT

Gen *CrDAT* của cây dừa cạn màu hoa hồng tím đã được tách dòng trong vector pBT (pBT-*CrDAT*) được cắt bằng cặp enzyme giới hạn là *NcoI/NotI*. Kết quả tạo hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1,3 kb và 2,7 kb. Trong đó phân đoạn DNA 1,3 kb chính là gen *CrDAT* cần thu nhận. Hình 3.4 thể hiện sản phẩm DNA tinh sạch có kích thước khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước gen *CrDAT* sau khi cắt vector pBT tái tổ hợp bởi cặp enzyme giới hạn là *NcoI/NotI*. Đoạn DNA này được dùng để phát triển vector chuyển gen ở các bước tiếp theo.

Tạo vector tái tổ hợp chứa cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc-KDEL

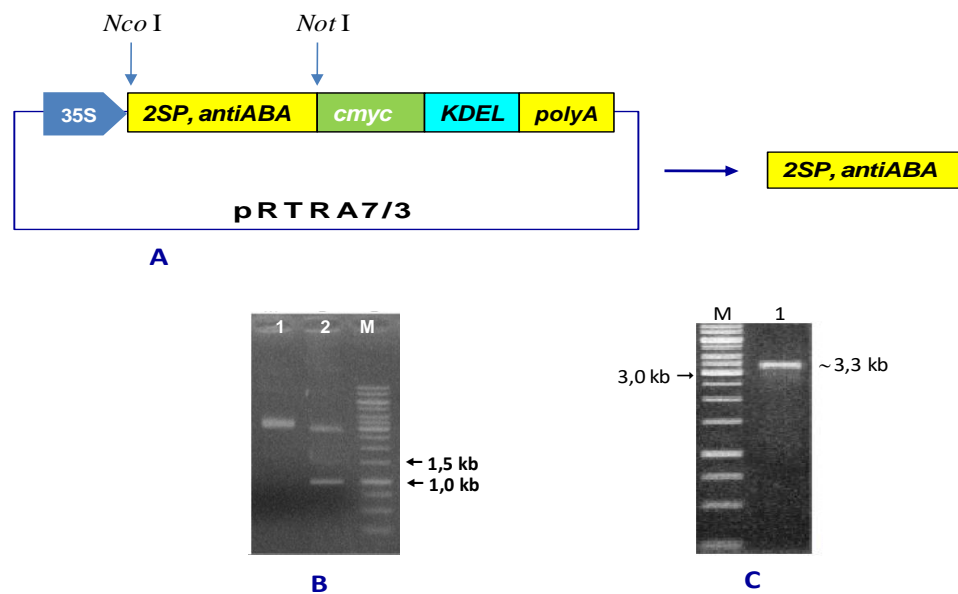
Vector trung gian pRTRA7/3 được dùng để cung cấp các thành phần cần thiết cho việc biểu hiện và kiểm tra hoạt động của gen đích *CrDAT* trong tế bào thực vật như: CaMV35S là promotor mạnh phân lập từ virus gây khảm súp lơ, có thể khởi động phiên mã gen chuyền ở tất cả các tế bào và mô trên cơ thể thực vật. Vector pRTRA 7/3 còn cung cấp trình tự chuỗi peptit kháng nguyên cmyc để có thể dễ dàng xác định sự có mặt của sản phẩm protein đích khi dùng kháng thể tương ứng bằng Western blot hoặc ELISA.

Sau khi cắt mở vòng được vector pRTRA7/3 bằng sử dụng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* thu được hai phân đoạn DNA với kích thước tính toán khoảng 0,9 kb (là đoạn 2SP và antiABA) và 3,3 kb (kích thước của vector pRTRA7/3), trong đó phân đoạn 3,3 kb chính là của pRTRA7/3 đã mở vòng.



Hình 3.4. Kết quả cắt vector tách dòng tái tổ hợp pBT-*CrDAT* với cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI*. A: Sơ đồ mô tả cắt vector tách dòng tái tổ hợp pBT-*CrDAT* tạo gen *CrDAT*; B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt pBT-*CrDAT*; M: DNA 1 kb; 1: pBT-*CrDAT* đã cắt; 2: pBT-*CrDAT* chưa cắt.

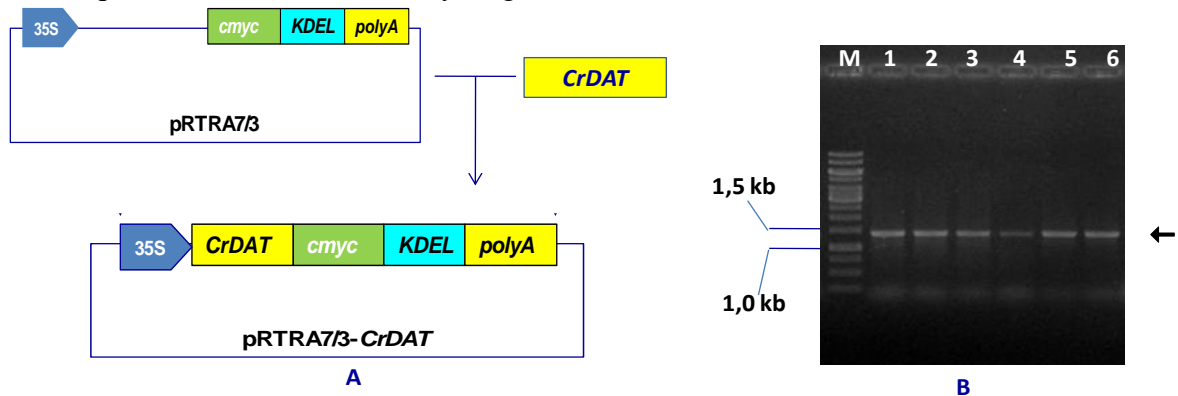
Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt ở hình 3.5 đúng như tính toán. Phân đoạn có kích thước 3,3 kb được tinh sạch để thu nhận cấu trúc mở vòng của pRTRA7/3 (Hình 3.5).



Hình 3.5. Kết quả cắt mở vòng vector pRTRA7/3. A. Sơ đồ cắt vector pRTRA7/3 bằng cặp enzyme *NotI/NcoI*. B: Kết quả cắt pRTRA7/3; M: DNA 1 kb; 1: pRTRA7/3 chưa cắt;

2: pRTRA7/3 đã cắt) C- Sản phẩm tinh sạch vector pRTRA7/3: M- Thang DNA 1kb; 1- Vector pRTRA7/3 tinh sạch.

Tiến hành phản ứng gắn gen *CrDAT* vào vector pRTRA7/3 đã mở vòng nhờ DNA T4 ligase tạo ra cấu trúc tái tổ hợp pRTRA7/3 – *CrDAT* chứa cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-*KDEL* (Hình 3.6A). Vector pRTRA7/3 – *CrDAT* được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α và chọn dòng bằng phản ứng colony – PCR với cặp mồi đặc hiệu *CrDAT*-*NcoI*/*CrDAT*-*NotI*. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, cả 5 dòng khuẩn lạc xuất hiện một băng DNA đặc hiệu khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước của gen *CrDAT* (Hình 3.6B). Như vậy cả 6 dòng vi khuẩn chọn lọc đều mang plasmid tái tổ hợp chứa gen *CrDAT*. Plasmid tái tổ hợp pRTRA7/3-DAT được sử dụng để thu nhận cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-*KDEL* phục vụ thiết kế vector chuyển gen thực vật.



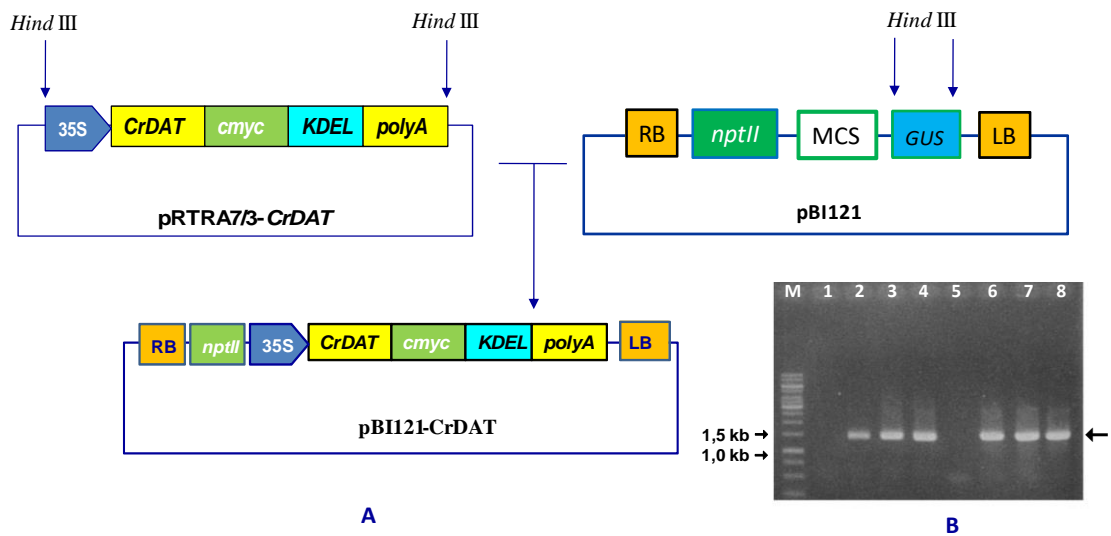
Hình 3.6. Kết quả tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3-*CrDAT*. A: Sơ đồ tạo vector pRTRA7/3-*CrDAT*. B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm clony-PCR các dòng khuẩn lạc chứa pRTRA7/3-*CrDAT*. M: thang DNA 1kb; 1-6: Các dòng khuẩn lạc.

Thu nhận cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc-KDEL-polyA, cắt mở vòng pBI121 và tạo vector chuyển gen pBI121-CrDAT

Sau khi tạo được cấu trúc gen *CrDAT* đầy đủ các thành phần cần thiết cho biểu hiện và kiểm tra hoạt động của gen trong vector trung gian pRTRA7/3-*CrDAT*. Sử dụng enzyme giới hạn *HindIII* xử lý vector pRTRA7/3-*CrDAT* để thu nhận cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-*KDEL*-*polyA*.

3.2.2. Tạo vector chuyển gen và chọn dòng *A.tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*

Sử dụng enzyme giới hạn *HindIII* mở vòng vector chuyển gen pBI121. Gắn cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-*KDEL*-*polyA* vào vector chuyển gen pBI121 bằng DNA T4 ligase tạo vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen chuyển *CrDAT* (pBI121-*CrDAT*) (Hình 3.7A). Sản phẩm tái tổ hợp pBI121-*CrDAT* được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Vi khuẩn sau khi biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc Km (mg/l).

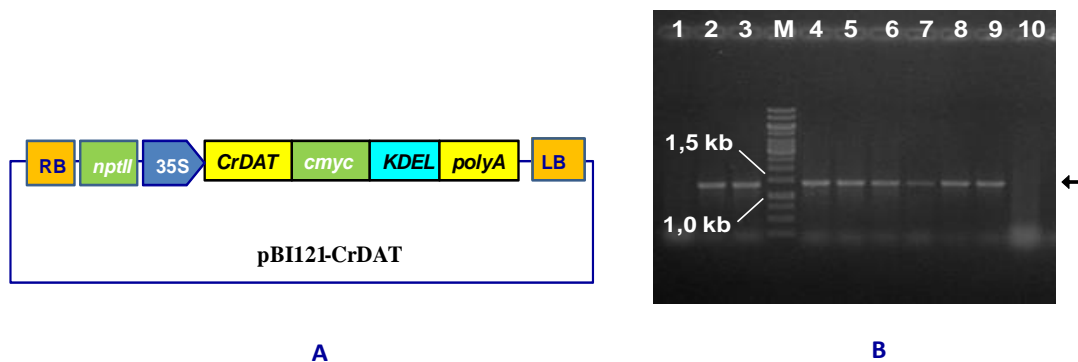


Hình 3.7. Kết quả tạo vector chuyển gen pBI121- *CrDAT*. A- Sơ đồ tạo cấu trúc vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*. LB: bờ trái của T-DNA; RB: bờ phải của T-DNA; *nptII*: gen kháng Km; 35S: promoter CaMV35S. B- Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng khuẩn lạc *E.coli* DH5 α . M: thang DNA 1 kb; 1-8: kết quả điện di sản phẩm colony-PCR từ 8 dòng khuẩn lạc.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony - PCR ở hình 3.7B cho thấy 2 dòng khuẩn lạc (lần điện di số 1,5) âm tính, không xuất hiện băng đặc hiệu, có thể do chứa plasmid pBI121 tự đóng vòng, kháng được Km nhưng không mang cấu trúc gen *CrDAT*. Các dòng dương tính với colony - PCR (lần điện di số 2, 3, 4, 6, 7, 8) xuất hiện băng đặc hiệu khoảng 1,3 kb, chứa plasmid tái tổ hợp mang cấu trúc gen *CrDAT*. Những dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi trong LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc Km để nhân dòng vector tái tổ hợp.

Chọn dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*

Plasmid tái tổ hợp pBI121-35S-*CrDAT*-*cmyc*-KDEL được tách chiết, kiểm tra và biến nạp vào *A. tumefaciens*. Cấu trúc vector chuyển gen pBI121 - *CrDAT* bao gồm các thành phần chính được thể hiện ở hình 3.8A. Các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-35S-DAT-*cmyc* được kiểm tra bằng colony - PCR và kết quả phân tích ngẫu nhiên 10 dòng khuẩn lạc thu được 8 dòng dương tính với colony-PCR (Hình 3.8B). Các dòng *A.tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-*CrDAT* được lưu giữ và sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.

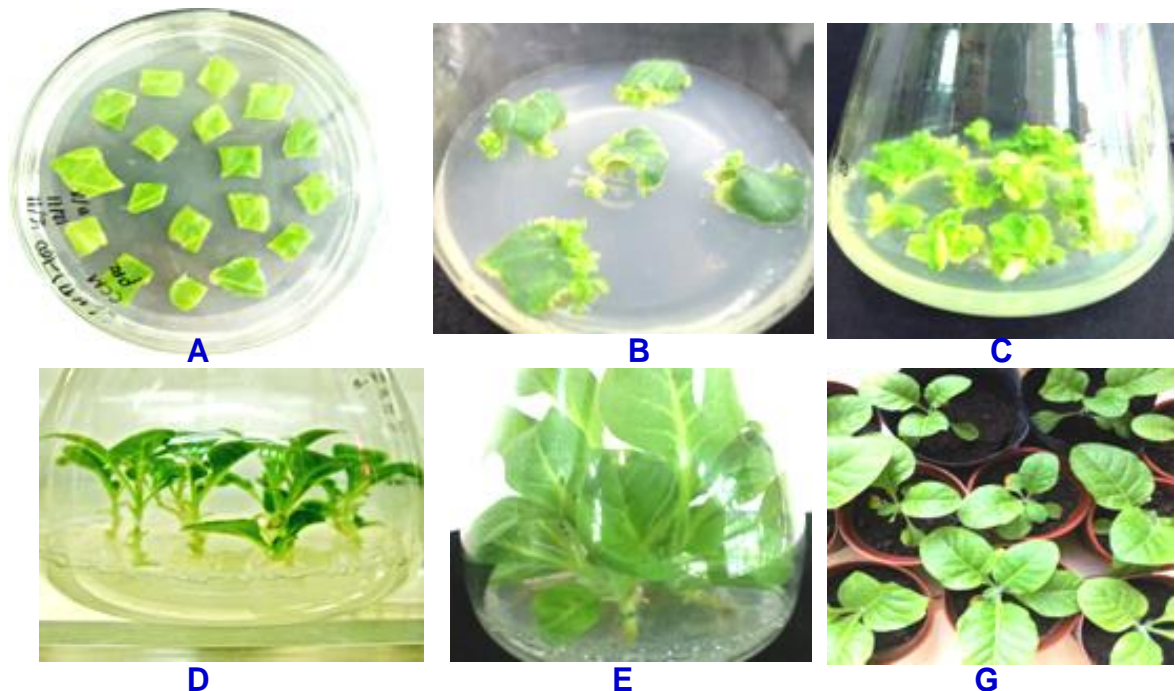


Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121-CrDAT và kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR. A: Cấu trúc vector chuyển gen pBI121-CrDAT. LB: bờ trái của T-DNA; RB: bờ phải của T-DNA; *nptII*: gen kháng kanamycine; 35S: promoter CaMV35S. B: Kết quả kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen pBI121-CrDAT.

3.3. Phân tích biểu hiện gen CrDAT trên cây thuốc lá chuyển gen

3.3.1. Biến nạp cấu trúc chứa gen CrDAT và tạo cây thuốc lá chuyển gen nhờ *A.tumefaciens*

Các mảnh lá cây thuốc lá giống K326 có kích thước khoảng 1cm² được sử dụng làm vật liệu nhận gen. Thí nghiệm chuyển gen CrDAT vào thuốc lá được trình bày ở hình 3.9.



Hình 3.9. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp, chọn lọc và tái sinh tạo cây thuốc lá chuyển gen. A: Mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy trên môi trường chọn lọc; B, C: Tái sinh đa chồi; D: Kéo dài chồi; E: Tạo rễ; G: Ra cây trong bầu ở điều kiện nhà lưới.

Sau khi ngâm mảnh lá trong dung dịch chứa khuẩn *A. tumefaciens* CV58 tái tổ hợp mang cấu trúc chứa gen CrDAT trong 30 phút, thấm khô mảnh lá và nuôi tiếp trên môi trường MS. Sau ba ngày đồng nuôi cấy trong tối trên môi trường MS, rửa khuẩn bằng kháng sinh cefotaxim và được chuyển sang môi trường MS có bổ sung kháng sinh cefotaxim, Km và BAP 1 mg/l (Hình 3.9A). Sau 2-3 tuần từ các mảnh lá xuất hiện các chồi nhỏ (Hình 3.9B,C). Các chồi nhỏ được tách từ các mảnh lá và cấy lên môi trường MS bổ sung kháng sinh (Hình 3.9D), các chồi được cấy chuyển sang môi trường MS để cho ra rễ (Hình 3.9E). Các cây thuốc lá sau khi ra rễ trên môi trường có kháng sinh chọn lọc được chuyển trực tiếp ra bầu chứa giá thể ra cây trong nhà lưới (Hình 3.9G). Kết quả biến nạp gen và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *CrDAT* vào cây thuốc lá

Đôi chứng và thí nghiệm		Tổng số mảnh lá	Số mảnh lá sống sót sau 4 tuần	Số mảnh lá cảm ứng tạo chồi	Số cây ra rễ trên môi trường chọn lọc	Số cây ra bầu	Số cây trồng trong nhà lưới
ĐC0*		30	0	0	0	0	0
ĐC1*		30	30	40	25	15	15
Thí nghiệm	Lần 1	82	79	68	55	34	22
	Lần 2	90	86	74	61	44	25
	Lần 3	77	70	63	52	35	18
<i>Tổng</i>		<i>249</i>	<i>235</i>	<i>205</i>	<i>186</i>	<i>113</i>	<i>65</i>

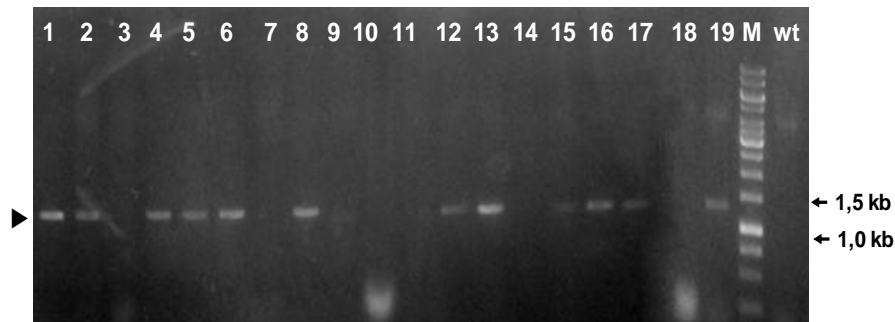
Ghi chú: ĐC0*: các mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1*: các mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh.

Bảng 3.3 cho thấy, sau 3 lần biến nạp cấu trúc mang gen *CrDAT* vào các mảnh thuốc lá. Kết quả có 235/ 249 mảnh lá sống sót sau 4 tuần, phát sinh 205 chồi và thu được 186 cây con *in vitro* sống sót trên môi trường MS có bổ sung kháng sinh. Số cây ra bầu đất là 113 cây và có 65 cây trồng tại nhà lưới có biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Trong khi đó, ở ĐC0* trong 30 mảnh lá không có mẫu nào sống sót; còn ở ĐC1* thuốc lá không chuyển gen được cấy lên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh thu được 30 cây sống, số cây ra bầu đất là 15 cây và đem trồng ở nhà lưới.

3.3.2. Phân tích sự có mặt và sự hợp nhất của gen chuyển *CrDAT* trong hệ gen cây thuốc lá

Xác định sự có mặt của gen chuyển CrDAT trong hệ gen cây thuốc lá bằng PCR

Các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0 sau khi trồng trong nhà lưới được 4 tuần thì tiến hành thu lá để thực hiện phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *CrDAT*. Thu lá của 19 cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 có sự sinh trưởng và phát triển bình thường (ký hiệu từ T0-1 đến T0-19) đem tách chiết DNA tổng số và tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CrDATF-Xba/CrDATR-Sac*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được thể hiện ở hình 3.10.

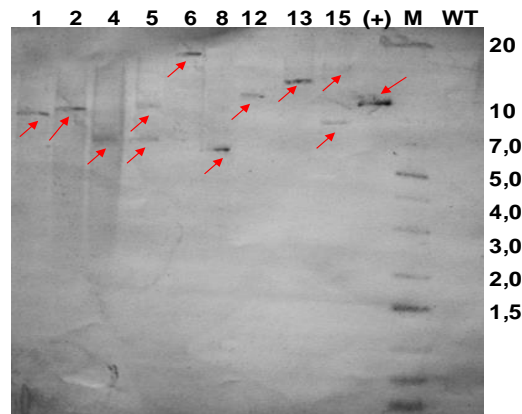


Hình 3.10. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen *CrDAT* trong các cây thuốc lá chuyển gen và đối chứng. Từ 1 đến 19: các dòng cây thuốc lá chuyển gen; M: thang DNA 1 kb; wt: cây thuốc lá không chuyển gen.

Hình 3.10 cho thấy, trong 19 dòng cây thuốc lá chuyển gen thì có 12 dòng cây thuốc lá chuyển gen dương tính với phản ứng PCR là các dòng T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15, T0-16, T0-17, T0-19 (các dòng ở làn điện di số 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 15, 16, 17, 19); còn 7 dòng T0-3, T0-7, T0-9, T0-10, T0-11, T0-14, T0-18 (các dòng ở làn điện di số 3, 7, 9, 10, 11, 14, 18) không xuất hiện băng DNA. Băng điện di sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,3 kb phù hợp với kích thước của gen chuyển *CrDAT*. Như vậy bước đầu có thể nhận xét rằng, cấu trúc mang gen chuyển *CrDAT* đã được chuyển vào cây thuốc lá giống K326 và tạo được các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0.

Xác định sự hợp nhất của gen chuyển CrDAT vào hệ gen cây thuốc lá bằng Southern blot

Để khẳng định gen chuyển *CrDAT* đã được hợp nhất vào hệ gen cây thuốc lá, DNA của 9 cây thuốc lá chuyển gen (T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15) cho kết quả PCR dương tính được lựa chọn ngẫu nhiên để sử dụng phân tích bằng Southern blot. Sử dụng enzyme giới hạn *SacI* cắt DNA tổng số của 9 dòng cây thuốc lá chuyển gen và kết quả phân tích Southern blot được thể hiện ở hình 3.11.

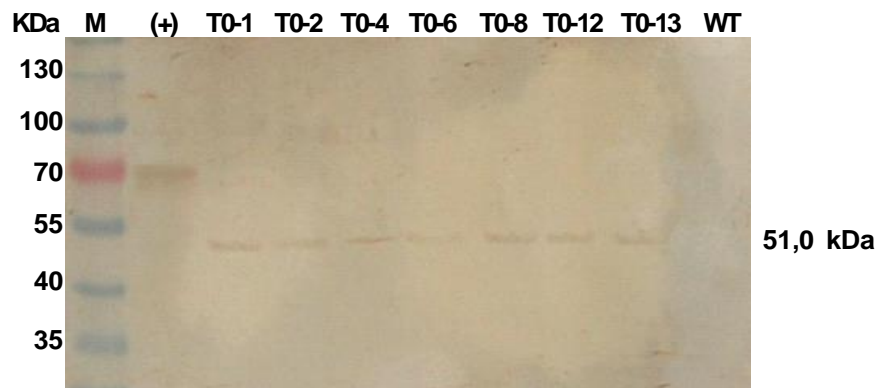


Hình 3.11. Kết quả phân tích Southern blot các dòng thuốc lá chuyển gen *CrDAT*. M: Marker 1kbplus, (+) Plasmid pBI121- *CrDAT* cắt bởi *SacI*, 1-15: các cây chuyển gen T0 (1: T0-1 ; 2 : T0-2 ; 4 : T0-4 ; 5 : T0-5 ; 6 : T0-6 ; 8 : T0-8 ; 12 : T0-12 ; 13 : T0-13; 15 : T0-15), WT: cây đối chứng không chuyển gen.

Hình 3.11 cho thấy, tất cả 9 dòng thuốc lá chuyển gen cho kết quả lai Southern (T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15), trong đó hai dòng T0-5 và T0-15 cho 2 băng DNA (2 bản copy), bảy dòng còn lại đều có một băng DNA ở các kích thước khác nhau. Bảy dòng thuốc lá chuyển gen (T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13) cho kết quả lai Southern có một bản copy được sử dụng phân tích Western blot.

3.3.3 Phân tích sự biểu hiện protein *CrDAT* tái tổ hợp trên cây thuốc lá chuyển gen

Protein tổng số của 7 dòng thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13 xuất hiện 1 băng DNA từ kết quả lai Southern được phân tích điện di SDS-PAGE và chuyển các phân đoạn protein lên màng nitrocellulose và thực hiện phản ứng lai Western. Protein *CrDAT* tái tổ hợp trong mẫu protein chiết từ các cây thuốc lá chuyển gen được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất TMB (3,3'; 5,5'-Tetramethylbenzidine). Kết quả phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp *CrDAT* ở 7 dòng cây thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13 có phản ứng dương tính với lai Southern bằng Western blot được thể hiện ở hình 3.12.



Hình 3.12. Kết quả phân tích Western blot các dòng cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT*. M: thang protein chuẩn ; (+) đối chứng dương ; T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13: các cây chuyển gen; WT: cây đối chứng không chuyển gen.

Hình 3.12 cho thấy, trên màng lai nitrocellulose xuất hiện băng màu ở vị trí kích thước khoảng 51 kDa ở các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, còn cây thuốc lá không chuyển gen (WT) không xuất hiện băng protein. Kết quả cho thấy, 7 dòng cây thuốc lá chuyển gen đều có protein tái tổ hợp mang đuôi c-myc nên xảy ra phản ứng tạo màu của enzyme trên kháng thể với cơ chất. Làn chạy điện di protein của cây thuốc lá không chuyển gen do không có protein gắn đuôi c-myc nên không xảy ra phản ứng tạo màu. Như vậy có thể thấy gen *CrDAT* đã được biểu hiện và protein tái tổ hợp CrDAT được tổng hợp ở các dòng cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326.

Kết quả phân tích PCR, Southern blot và Western blot các dòng cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT* ở thế hệ T0 đã chứng minh gen chuyển *CrDAT* đã hợp nhất vào hệ gen của cây thuốc lá được chuyển gen và gen chuyển *CrDAT* hoạt động phiên mã và dịch mã cho kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT.

3.4. Thảo luận kết quả thiết kế và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*

Vector pBI121-*CrDAT* được thiết kế chứa cấu trúc 35S-*CrDAT*-cmyc-KDEL-polyA, gen *nptII* kháng Km và một số thành phần khác. Tập hợp các thành phần trong cấu trúc nằm giữa bờ trái (Left Border-LB) và bờ phải (Right Border-RB) của vector thiết kế bảo đảm cho gen đích hoạt động và dễ dàng sàng lọc thể tái tổ hợp được gọi là cấu trúc gen chuyển hoàn chỉnh (cassette). Promoter 35S, một promoter mạnh được phân lập từ virus gây bệnh khảm lá súp lơ (*Cauliflower Mosaic Virus - CaMV*). *CaMV35S* là promoter mạnh có thể khởi động phiên mã cho gen trong tất cả các loại mô bào thực vật ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển. Trong nghiên cứu này, khi thiết kế vector chuyển gen pBI121, promoter *CaMV35S* đã được sử dụng hướng đến việc khởi động phiên mã của gen chuyển *CrDAT* nhằm tăng cường sinh tổng hợp vindoline ở cây dừa cạn. Một số nghiên cứu gần đây về chuyển gen ở thực vật đã sử dụng promoter *CaMV35S* trong cấu trúc vector chuyển gen đã thu được kết quả biểu hiện gen chuyển khả quan thông qua phân tích Western blot và ELISA. Promoter *CaMV35S* trong vector chuyển gen pCB301-*GmEXPI* đã tăng cường sự biểu hiện của gen chuyển *GmEXPI* trên cây thuốc lá chuyển gen được xác nhận bằng kết quả phân tích Real-time RT-PCR và Western blot (Lo và cs, 2015). Sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB2* trong vector pBI121-*GmDREB2* chứa

promoter *CaMV35S* được minh chứng bằng kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp GmDREB2 và tác động tăng cường tổng hợp proline ở cây chuyển gen trong điều kiện gây hạn nhân tạo (Tan và cs, 2015). Theo hướng tạo cây chuyển gen kháng virus theo cơ chế RNAi, Lo Thi Mai Thu và cs (2016) đã sử dụng promoter *CaMV35S* trong vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi [pK7GW-CPi (SMV-BYMV)]. Kết quả phân tích các cây thuốc lá chuyển gen bằng Real-time RT-PCR đã chứng minh sự điều khiển phiên mã của *CaMV35S* đối với cấu trúc RNAi. Kế thừa kết quả của các nghiên cứu trước, vector chuyển gen pBI121-*CrDAT* chứa promoter *CaMV35S* được thiết kế trong mục đích biểu hiện mạnh gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cạn sẽ được chứng minh trong các thí nghiệm chuyển gen ở cây thuốc lá và cây dứa cạn.

Cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc chứa đoạn peptide cmyc đã được sử dụng làm kháng nguyên cho phản ứng Western blot để phát hiện protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen. Một số cặp kháng nguyên đã được thiết kế để sử dụng cho mục đích chọn cây biến đổi gen, nhưng đuôi cmyc đã được coi là một lựa chọn có hiệu quả và kinh tế cho nhiều nghiên cứu hiện tại. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, sự biểu hiện protein tái tổ hợp được phát hiện trong cây thuốc lá mô hình nhờ cấu trúc cmyc trong lai Western blot và hiệu quả sử dụng vector PBI121-*CrDAT* đã được thử nghiệm và đánh giá trên cây mô hình là nền tảng cơ bản cho việc sử dụng vector chuyển gen chứa gen *CrDAT* để biến nạp vào cây dứa cạn.

Khi kiểm tra hoạt động của gen *CrDAT* trên thuốc lá chuyển gen. Kết quả nghiên cứu của Magnotta và cs (2006,2007), cho thấy hoạt động của *CrDAT* ở cây thuốc lá chuyển gen ít hơn 10 lần so với enzyme được tìm thấy trong chiết xuất lá cây dứa cạn. Một nghiên cứu theo hướng sử dụng promoter DAT để đánh giá hoạt động của gen *CrDAT* với việc sử dụng các promoter DAT khác nhau (pDAT 812, pDAT 2.3, pDAT 2.3/DAT và pCAMBIA1305.1) thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* LB4404 vào lá cây thuốc lá để kiểm tra hiệu quả hoạt động của gen *CrDAT* làm cơ sở lựa chọn promoter điều khiển gen *CrDAT* biểu hiện mạnh, kết quả cho thấy vùng promoter DAT được xác định là có cảm ứng với ánh sáng. Nhận xét này cũng được chứng minh bằng thực nghiệm rằng sự biểu hiện gen *CrDAT* liên quan đến sự cảm ứng ánh sáng của promoter. Nghiên cứu của Magnotta và cs (2007) đã chứng minh gen *CrDAT* được biểu hiện ở hệ thống rễ dưới sự điều khiển của promoter 35S. Nghiên cứu của chúng tôi, promoter 35S được sử dụng điều khiển hoạt động của gen *CrDAT* trên cây thuốc lá K326 cho kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT với kích thước khoảng 51,5 kDa và được kiểm tra bằng Western blot. Từ các kết quả trên đã cung cấp thông tin rõ ràng về hoạt động của gen *CrDAT* liên quan đến các nhân tố phiên mã trans và yếu tố cis của promoter trong vai trò biểu hiện protein CrDAT ở mô hoặc tế bào cụ thể ở thực vật. Tuy nhiên, yếu tố cis và nhân tố trans có vai trò cụ thể như thế nào với sự biểu hiện của gen *CrDAT* trong thực vật chuyển gen cần tiếp được phân tích làm sáng tỏ.

Cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc đã được chuyển thành công vào mô thuốc lá *N. tabacum* K326 nhờ *A. tumefaciens*, tạo cây thuốc lá chuyển gen. Sự có mặt và hợp nhất của gen chuyển *CrDAT* vào hệ gen của cây thuốc lá được chuyển gen được kiểm tra bằng PCR và Southern blot. Protein tái tổ hợp CrDAT có trọng lượng phân tử khoảng 51 kDa được biểu hiện ở 7 dòng thuốc lá chuyển gen. Kết quả biến nạp và đánh giá hoạt động của cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc ở cây thuốc lá chuyển gen là cơ sở cho việc điều khiển biểu hiện mạnh gen *CrDAT* trong cây dứa cạn, tạo dòng dứa cạn chuyển gen có hàm lượng vincristine và vinblastine được cải thiện.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cựa đã được tách dòng phân tử và xác định trình tự nucleotide. Gen *CrDAT* (cDNA) có kích thước 1320 bp, mã hóa cho 439 amino acid.

1.2. Vector chuyển gen thực vật pBI121-*CrDAT* đã được thiết kế và chuyển vào hệ gen của cây thuốc lá và cây dứa cựa chuyển gen đã biểu hiện được protein tái tổ hợp *CrDAT* có kích thước khoảng 51 kDa.

2. Đề nghị

Tiếp tục chuyển gen *DAT* vào cây dứa cựa và phân tích cây dứa cựa chuyển gen nhằm tạo ra những cây ở thế hệ T2,T3 có hàm lượng alkaloid cao.