

STUDY ON EXPRESSION ENHANCING OF MIRACULIN IN VIETNAM TOMATO CULTIVAR

La Viet Hong^{1,2}, Bui Phuong Thao¹, Pham Bich Ngoc¹, Chu Hoang Ha^{1*}

¹Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

²Hanoi Pedagogical University 2

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/8/2021	Miraculin is a natural sweet-tasting protein and has the ability to convert sour taste into sweet taste even though its property is not sweet. In this study, the genetic code of miraculin was optimized. In addition, to enhance the expression of miraculin in transgenic tomato, the fruit-specific <i>E8</i> promoter from tomato and the <i>HSP</i> terminator from <i>A.thaliana</i> were also used to control the activity of synthetic miraculin. Applying PCR analysis, the results showed that there were 16 transgenic lines carrying <i>E8</i> -pro:Mir:HSP-ter and were 11 transgenic tomato lines carrying transferred miraculin gene, the transgenic efficiency were 42.11% and 52.38%, respectively. Among them, five of these 27 transgenic tomato lines contained a single copy of the targeted gene (T.E8.4, T.E8.7, T.E8.8, T.35S.2, T.35S8). The content of recombinant miraculin tomato lines carrying <i>E8</i> promoter and terminator <i>HSP</i> 18.2 was higher than the content of miraculin in tomato lines carrying 35S promoter and terminator <i>NOS</i> . The content of recombinant miraculin was highest in the T.E8.8 line, reached 118.0 ng/μg of total soluble protein (equivalent to 11.8% of total soluble protein) and was 4 times higher than that of the T.35S.2, T.35S8.
Revised: 30/10/2021	
Published: 30/10/2021	
KEYWORDS	
Cultivar	
Expression	
Enhancing	
Miraculin	
Promoter	
Recombination	

NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN CỦA MIRACULIN TRONG CÂY CÀ CHUA VIỆT NAM

La Việt Hồng^{1,2}, Bùi Phương Thảo¹, Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà^{1*}

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

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/8/2021	Miraculin là một protein tự nhiên có khả năng chuyển vị chua thành vị ngọt mặc dù đặc tính của nó không ngọt. Trong nghiên cứu này, mã di truyền của miraculin được tối ưu. Ngoài ra, nhằm tăng cường sự biểu hiện của miraculin trong cây cà chua chuyển gen, promoter <i>E8</i> đặc hiệu ở quả từ cây cà chua và terminator <i>HSP</i> từ cây <i>A.thaliana</i> cũng được sử dụng để điều khiển hoạt động của gen miraculin tổng hợp. Kết quả phân tích bằng PCR cho thấy có 16 dòng cà chua mang cấu trúc <i>E8</i> -pro:Mir:HSP-ter và 11 dòng cà chua được chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter, hiệu suất chuyển gen tương ứng là 42,11% và 52,38%. Trong số đó, năm dòng mang bản đơn copy của gen chuyển (T.E8.4, T.E8.7, T.E8.8, T.35S.2, T.35S8). Hàm lượng ở quả của các dòng được chuyển promoter biểu hiện đặc hiệu <i>E8</i> và terminator <i>HSP</i> 18.2 đều cao hơn so với hàm lượng miraculin ở các dòng được chuyển promoter 35S và terminator <i>NOS</i> . Hàm lượng miraculin tái tổ hợp cao nhất ở dòng T.E8.8, đạt 118,0 ng/μg protein tan tổng số (tương đương 11,8% protein tan tổng số), cao hơn 4 lần so với các dòng T.35S.2, T.35S8.
Ngày hoàn thiện: 30/10/2021	
Ngày đăng: 30/10/2021	
TỪ KHÓA	
Giống	
Biểu hiện	
Tăng cường	
Miraculin	
Promoter	
Tái tổ hợp	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4923>

* Corresponding author. Email: chuhoangha@ibt.ac.vn

1. Giới thiệu

Miraculin được thu nhận từ quả cây thần kỳ (*Richadella dulcifica*) là một loại cây gỗ nhỏ ở vùng Tây Phi, miraculin có bản chất là một glycoprotein tạo cảm giác ngọt và ít sinh năng lượng [1]. Bản chất của miraculin là không ngọt nhưng có khả năng thay đổi vị chua thành vị ngọt. Đây là một chất làm ngọt tiềm năng, dùng để cải thiện chế độ ăn của các bệnh nhân béo phì và tiểu đường [2], [3]. Trong tự nhiên, cây thần kỳ sống ở vùng nhiệt đới, không chịu được lạnh, khi nhiệt độ môi trường thấp hơn 7°C, cây không thể sống sót. Đây cũng là loại cây có thời gian sinh trưởng khá dài, cần đến 3-4 năm để có thể ra hoa nhưng một phần nhỏ số hoa đó mới được thụ phấn. Ngoài ra, miraculin tự nhiên thường bị mất hoạt tính trong khoảng 2-3 giờ sau khi thu hoạch và bảo quản ở nhiệt độ phòng [4]. Vì vậy, nguồn miraculin tự nhiên bị hạn chế.

Miraculin tái tổ hợp dạng dimer đã được biểu hiện thành công trong *E.coli*, nhưng hoạt tính thấp, chỉ bằng khoảng 1/6 so với hoạt tính của miraculin tự nhiên [5]. Miraculin tái tổ hợp cũng đã được biểu hiện trong *A.oryzae* [6]. Ở tế bào nấm men, miraculin tái tổ hợp được tạo ra sau khi đã tối ưu codon và trình tự tín hiệu, hoạt tính chỉ được phát hiện khi các chuỗi đường đã bị loại bỏ [7]. Miraculin đã được biểu hiện thành công ở trong cây xà lách [3], cây dâu tây [8] và cây cà chua [9]. Các nghiên cứu cho rằng, thực vật là hệ thống biểu hiện miraculin hoạt tính phù hợp nhất, có thể là do ở thực vật có quá trình cải biến sau dịch mã (glycosyl hóa) tương tự như ở cây thần kỳ. Tuy nhiên, mỗi hệ thống biểu hiện đều có những ưu nhược điểm khác nhau như ở cây xà lách, dù miraculin tái tổ hợp tạo ra có vị ngọt tương đương với miraculin tự nhiên xong xảy ra hiện tượng “câm lặng” của gen ở các thế hệ con cháu [3]; còn ở cây dâu tây, miraculin tạo ra ổn định qua các thế hệ nhưng hàm lượng rất thấp [8]. Theo Yano và cộng sự (2010), cây cà chua là hệ thống biểu hiện thích hợp nhất do miraculin tạo ra có hoạt tính tương đương với miraculin tự nhiên và nó được tích lũy ổn định từ thế hệ cây chuyển gen thứ nhất (T1) đến thế hệ chuyển gen thứ năm (T5) [9]. Ngoài ra, hiệu suất chuyển gen vào cây cà chua cao, có thể đạt 40% thông qua *Agrobacterium* [10].

Tuy nhiên, một hạn chế lớn gặp phải, hầu hết các thực vật khi được sử dụng làm hệ thống biểu hiện đó là protein tái tổ hợp tích lũy thấp, hạn chế khả năng mở rộng sản xuất protein tái tổ hợp ở quy mô công nghiệp [11]. Để vượt qua hạn chế này, có nhiều chiến lược khác nhau để tăng cường mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp như cải biến promoter và terminator trong cassette biểu hiện, tối ưu mã di truyền cho phù hợp với hệ thống biểu hiện hoặc biểu hiện đặc hiệu [12].

Trong nghiên cứu này, gen miraculin đã được tối ưu mã di truyền, thiết kế vector biểu hiện gen miraculin ở giống cà chua PT18 của Việt Nam, sự biểu hiện của miraculin tái tổ hợp được điều khiển bởi promoter *E8* đặc hiệu ở quả được phân lập từ cây cà chua và terminator 18.2 được phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana*. Cấu trúc biểu hiện được sử dụng làm đối chứng là promoter 35S và NOS terminator, ngoài ra protein tái tổ hợp ở giai đoạn quả chín cũng được phân tích đánh giá biểu hiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gen miraculin được tổng hợp nhân tạo bởi hãng Epoch Life Science (Mỹ). Giống cà chua PT 18 (Viện Rau quả Trung ương) được dùng làm hệ thống biểu hiện. Vector biểu hiện gen pBI121 ở thực vật, chủng *E. coli* DH5 α dùng để nhân dòng gen, chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 dùng để chuyển gen. Thí nghiệm sử dụng các hóa chất nuôi cấy vi sinh vật, nuôi cấy mô tế bào thực vật và các hoá chất khác phục vụ chuyển gen do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

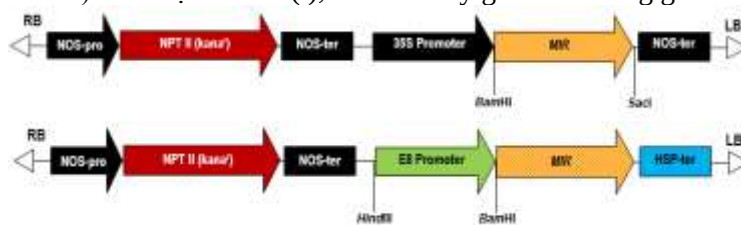
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập, tối ưu hóa mã di truyền và thiết kế cặp môi của gen miraculin nhân tạo

Nghiên cứu thực hiện dựa trên trình tự nucleotide của gen miraculin (D38598.1 và AB512278.1) từ ngân hàng GenBank. Mã di truyền của miraculin được tối ưu cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở cây cà chua bằng chương trình Codon Usage Database [13] và Codon Optimization 2.0 của Invitrogen. Để thuận lợi cho quá trình phân tích, đánh giá gen chuyển, các trình tự mã hóa cho c-myc tag và epitope His-tag được gắn vào đầu 3' của đoạn gen tổng hợp. Ngoài ra, vị trí nhận biết của enzyme *Bam*HI và *Sac*I cũng được thêm vào đầu 5' và 3' của gen miraculin. Kích thước gen miraculin nhân tạo là 762 bp.

2.2.2. Thiết kế vector biểu hiện protein tái tổ hợp miraculin

Trong nghiên cứu này, các vector biểu hiện gen miraculin gồm (i) pBI₁₂₁/E8-pro:Mir:HSP-ter và (ii) pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter được thiết kế dựa trên vector pBI₁₂₁. Cụ thể từ vector pBI₁₂₁ chứa gen chỉ thị *GUS* được kiểm soát bởi promoter 35S và NOS-terminator, gen *GUS* được thay bằng gen miraculin thu được vector (ii), từ vector này, promoter 35S được thay bằng promoter *E8* có kích thước 2203 bp được phân lập trước đó từ cây cà chua PT 18 (KJ561284), sau đó terminator được thay bằng terminator *HSP 18.2* có kích thước 262 bp được phân lập trước đó từ *A. thaliana* (KP008108) thu được vector (i), sau khi thay gen *GUS* bằng gen miraculin (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ cassette biểu hiện 35S-pro:Mir:HSP-ter và E8-pro:Mir:HSP-ter

2.2.3. Phương pháp chuyển thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Gen miraculin tổng hợp được chuyển vào giống cà chua PT 18 thông qua *Agrobacterium* theo phương pháp của Đỗ Xuân Đồng (2007) [14].

2.2.4. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR

Thu 0,5 gam lá non của các dòng cà chua tái sinh, chọn lọc đã thích nghi ngoài nhà lưới để tách chiết DNA bằng CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), DNA này được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR bằng mỗi đặc hiệu Sản phẩm PCR được phân tách bằng điện di trên gel agarose 0,8% (w/v).

2.2.5. Phân tích sự biểu hiện ở mức phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR

RNA tổng số từ lá của dòng cà chua chuyển gen được tách chiết theo bộ kit Trizol Reagent (Invitrogen) và được sử dụng để làm khuôn của kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) theo kit RevertAidT^{MH} Minus First Strand cDNA Synthesis của Fermentas.

2.2.6. Xác định số bản copy của gen chuyển bằng kỹ thuật Southern

Sử dụng enzym giới hạn (*Bam*HI & *Sac*I) cho mỗi µg mẫu DNA tổng số. Cắt qua đêm ở 37°C, sau đó tinh sạch và điện di trên gel agarose 1% ở điện thế thấp trong khoảng 6-12 tiếng. Bản gel được chuyển lên màng nylon, các bước hiện màng được thực hiện bằng bộ kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Scientific).

2.2.7. Phân tích sự tích lũy protein tái tổ hợp bằng kỹ thuật ELISA

Miraculin tái tổ hợp được định lượng gián tiếp bằng ELISA thông qua định lượng protein c-myc theo phương pháp của Sun và cộng sự (2006a) với một số cải biến [3]. Dịch chiết protein tổng số của các mẫu chứa miraculin được pha loãng đến nồng độ 200 µg/ml, 100 µl mẫu được tra

vào các đĩa trên đĩa microplate, mỗi mẫu lặp lại 3 lần; Ủ qua đêm ở 4°C; Rửa đĩa 2 lần bằng PBS-T (Tween 0,05%); Blocking bằng sữa tách béo 5% trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng; Rửa đĩa 2 lần; Ủ màng với kháng thể 1-anti c-myc (180µg/ml) pha loãng 1:100 trong 2 giờ; Rửa đĩa 3 lần; Ủ với kháng thể 2 là kháng thể kháng dê IgG cộng hợp HRP (Thermo scientific Pierce) pha loãng 1:10.000 trong 1 giờ và cơ chất hiện màu là TMB; Dùng HCl 1 N để dừng phản ứng màu; Đo màu ở bước sóng 630 nm. Nồng độ miraculin tái tổ hợp được tính toán từ phương trình đường chuẩn protein scFv gắn đuôi c-myc.

2.2.8. Phân tích và xử lý số liệu

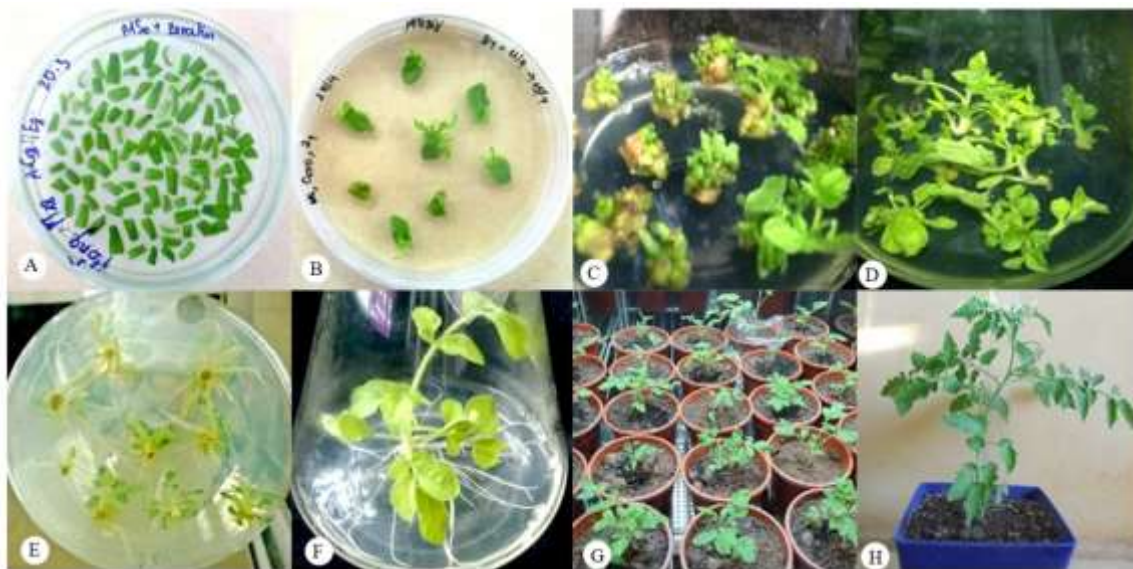
Các dữ liệu định lượng được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel theo các tham số như giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (σ), sử dụng phương pháp giới hạn sai khác nhỏ nhất $LSD_{0,05}$ để kiểm tra sự sai khác giữa các giá trị trung bình [15]. Các chỉ tiêu được phân tích thống kê gồm khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều dài rễ, hàm lượng miraculin tái tổ hợp.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo dòng cà chua mang gen chuyển

Miraculin tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên cà chua Moneymaker [9], Micro-Tom [16], là các giống cà chua được sử dụng như là cây mô hình. Trong nghiên cứu này, miraculin đã được chuyển vào biểu hiện trên giống cà chua PT18, một giống cà chua lai của Việt Nam, có khả năng kháng bệnh héo xanh rũ vi khuẩn tốt, chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường, có tiềm năng tăng năng suất miraculin tái tổ hợp thông qua mở rộng hệ thống nông nghiệp.

Kết quả đánh giá khả năng tái sinh và chọn lọc chồi chuyển gen miraculin được thống kê trên bảng 1 và hình 2 cho thấy số cụm chồi được tách ra từ các mảnh lá cây chuyển cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter và 35S-pro:Mir:NOS-ter lần lượt đạt 112 và 135. Số chồi được tách ra lần lượt là 38 và 21.



Hình 2. Quá trình tạo dòng cà chua mang gen chuyển miraculin

(A). Đồng nuôi cây lá mầm với vi khuẩn *A. tumefaciens*; (B), (C). Tái sinh cụm chồi; (D), (E), (F). Chọn lọc chồi; (G). Cây cà chua trong buồng sinh trưởng; (H). Cây cà chua trồng ngoài tự nhiên

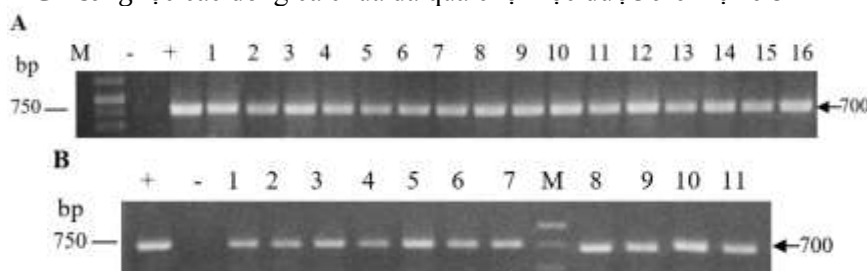
Bảng 1. Kết quả tạo dòng cà chua mang gen chuyển miraculin

Cấu trúc chuyển	Lô thí nghiệm	Số mẫu	Số mẫu cảm ứng tạo chồi		Chọn lọc chồi		
			Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số chồi tách	Số chồi sống sót và ra rễ	Tỷ lệ (%)
E8-pro: Mir:HSP-ter	1	300	18	6,00	40	12	30,00
	2	300	27	9,00	39	15	38,46
	3	400	30	7,50	33	11	33,33
	Tổng số	1000	75	7,50	112	38	33,93
35S-pro: Mir:NOS-ter	1	300	15	5,00	46	9	19,57
	2	300	18	6,00	52	7	13,46
	3	400	26	6,50	37	5	13,51
	Tổng số	1000	59	5,90	135	21	15,56
Đối chứng	1*	30	16	53,33	0	-	-
	2*	30	14	46,67	102	89	87,25

Chú thích: 1* và 2* các chồi được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và không chứa kháng sinh

3.2. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển miraculin

Trong phân tích sàng lọc cây chuyển gen, PCR là kỹ thuật được sử dụng phổ biến do tính chính xác cao, thao tác đơn giản và tiết kiệm thời gian [17]. DNA tổng số thu từ lá cà chua trồng ngoài tự nhiên được sử dụng cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Nếu có gen chuyển chồi tái sinh, kết quả phản ứng PCR sẽ cho ra băng DNA có kích thước khoảng 700 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR sàng lọc các dòng cà chua đã qua chọn lọc được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Hình ảnh điện di kiểm tra dòng cà chua sau chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh trên gel agarose 0,8% (w/v). 1-16: các dòng cà chua chuyển cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter; (B): 1-11: các dòng cà chua chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter; (+), (-). Đối chứng dương và đối chứng âm; (M). Thang DNA chuẩn 1 Kb

Kết quả sàng lọc cho thấy, trong tổng số 38 dòng cà chua được phân tích, có 16 dòng mang gen chuyển miraculin trong cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter có, đạt tỷ lệ 42,11%. Ở các dòng chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter, phân tích 21 dòng cho thấy, có 11 dòng mang cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter, đạt tỷ lệ 52,38%.

3.3. Đánh giá sự biểu hiện gen ở mức mRNA

Để đánh giá bước đầu hoạt động của gen chuyển trong các dòng cà chua, 11 dòng cà chua mang cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter được dùng để đánh giá sự biểu hiện ở mức phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của gen chuyển miraculin trong các dòng cà chua 35S-pro:Mir:NOS-ter. (+), (-). Lần lượt là đối chứng dương và đối chứng âm; (M). Thang DNA chuẩn 1 kb.

Phân tích thể hiện ở cả 11 dòng cà chua chuyển gen 35S-pro:Mir:NOS-ter, miraculin được biểu hiện ở mức phiên mã (mRNA), như vậy có thể khẳng định gen miraculin chuyển vào giống cà chua PT18 đã hoạt động. Đối với các dòng cà chua được chuyển cấu trúc E8-pro:Mir/HSP-ter, về mặt lý thuyết gen chuyển miraculin chỉ phiên mã khi promoter E8 được kích hoạt bởi ethylen ở giai đoạn quả chín, do vậy các dòng này không được phân tích ở thí nghiệm này.

3.4. Xác định số bản copy của gen chuyển miraculin

Nghiên cứu trước đây khẳng định dòng chuyển gen chứa một bản đơn copy có xu hướng ổn định hơn về mặt di truyền so với các dòng chuyển gen mang nhiều bản copy cùng lúc [18]. Trong nghiên cứu này, 27 dòng cà chua gồm 16 dòng cà chua được chuyển cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter và 11 dòng cà chua chuyển gen 35S-pro:Mir:NOS-ter được phân tích, kết quả cho thấy 3 dòng cà chua được chuyển cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter (dòng 4, 7 và 8) và 2 dòng cà chua được chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter (dòng 2 và 8) mang một bản đơn copy của gen chuyển miraculin (Hình 5).

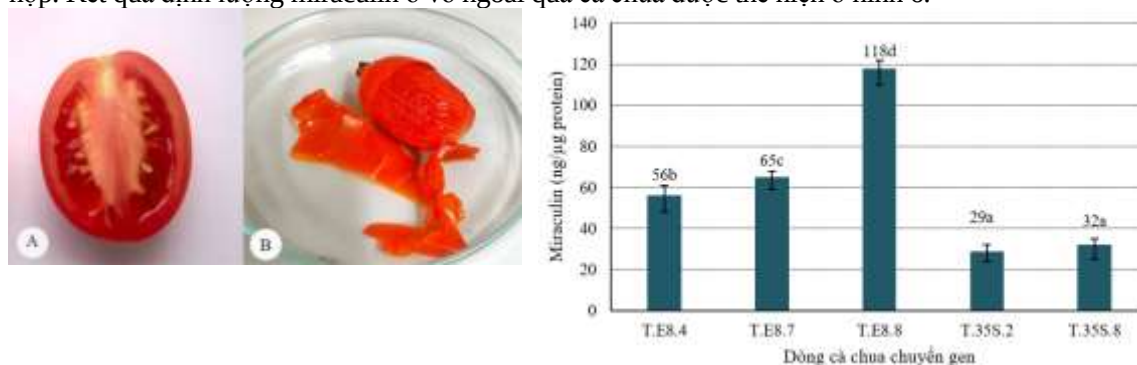


Hình 5. Hình ảnh xác định số bản copy trong các dòng cà chua chuyển gen. (A). Dòng cà chua chuyển cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter; (B). Các dòng cà chua chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter; (M). Thang DNA chuẩn 1 Kb; (+). Đối chứng dương; Mũi tên đánh dấu các dòng mang 1 bản copy.

3.5. Xác định hàm lượng và hoạt tính của miraculin tái tổ hợp

Xác định hàm lượng miraculin tái tổ hợp bằng kỹ thuật ELISA

Quả cà chua của các dòng chuyển gen được thu ở giai đoạn quả chín đỏ. Mô vỏ ngoài là nơi tích lũy hàm lượng lớn miraculin tái tổ hợp [19], [20] được tách ra để xác định hàm lượng miraculin tái tổ hợp. Kết quả định lượng miraculin ở vỏ ngoài quả cà chua được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Biểu đồ hàm lượng miraculin tái tổ hợp ở quả cà chua chuyển gen. Giá trị thể hiện là giá trị trung bình của 3 lần nhắc lại. Thanh bar chỉ độ lệch chuẩn (σ). Kí tự a, b, c giữa các cột số liệu thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$

Phân tích cho thấy, hàm lượng miraculin tái tổ hợp quả cà chua chín đỏ của các dòng được chuyển cấu trúc E8-Pro:Mir:HSP-ter đạt lần lượt là 56,0; 65,0 và 118,0 (ng/μg protein tan tổng số), hàm lượng cao nhất là ở dòng T.E8.8 (118,0 ng/μg protein tan tổng số, tương đương với 11,8%). Trong khi đó, các dòng cà chua chuyển gen T.35S2 và T.35S8 có hàm lượng miraculin tái tổ hợp tương ứng là 29,0 và 32,0 ng/μg protein tan tổng số. Theo nghiên cứu trước đây, sử

dùng terminator của miraculin từ cây thần kỳ làm tăng sự biểu hiện của miraculin tái tổ hợp trong cây cà chua lên 1,5 lần so với sử dụng terminator *NOS* [16], sử dụng *HSP* terminator trong cassette biểu hiện miraculin cũng làm tăng hàm lượng miraculin tích lũy trong quả cà chua lên gấp hơn 10 lần (miraculin tái tổ hợp tương đương 17,1% protein tan tổng số) [21]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng miraculin ở vỏ ngoài quả chín của các dòng được chuyển cấu trúc E8-Pro:Mir:HSP-ter cũng cao hơn và gấp 4,06 lần so với hàm lượng miraculin trong các dòng được chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter. Kết quả này là khá cao so với công bố trước đây.

4. Kết luận

Gen miraculin đã được tối ưu mã di truyền và tổng hợp nhân tạo, vector biểu hiện miraculin dưới sự điều khiển của promoter đặc hiệu ở quả *E8* từ cây cà chua và terminator *HSP* 18.2 từ cây *A. thaliana* cũng được thiết kế. Các cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter và 35S-pro:Mir:HSP-ter được chuyển vào lá mầm cây cà chua thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Thu được 16 dòng mang cấu trúc E8-pro:Mir:HSP-ter và 11 dòng mang cấu trúc 35S-pro:Mir:HSP-ter, tỷ lệ chuyển gen tương ứng 42,11% và 52,38%. Bằng phân tích Southern blot, đã xác định được 5 dòng mang bản đơn copy của gen chuyển (T.E8.4, T.E8.7, T.E8.8, T.35S.2, T.35S8). Miraculin trong quả chín của các dòng chuyển gen được điều khiển bởi promoter biểu hiện đặc hiệu và *HSP* terminator đều cao hơn so với các dòng được chuyển miraculin được điều khiển bởi promoter cấu trúc 35S. Trong đó, hàm lượng miraculin tái tổ hợp cao nhất ở dòng T.E8.8, đạt 118,0 ng/μg protein tan tổng số (tương đương 11,8% protein tan tổng số), hàm lượng này là cao hơn 4 lần so với hàm lượng miraculin ở các dòng T.35S.2, T.35S8.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ về thiết bị và hóa chất của đề tài: “Nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp trong cây cà chua chuyển gen”, mã số VAST02.01/13-14. Thực nghiệm được tiến hành tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Theerasilp and Y. Kurihara, "Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit," *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 11536-11539, 1988.
- [2] R. Kant, "Sweet proteins-potential replacement for artificial low calorie sweeteners," *Nutr J*, vol. 4, p. 5, 2005.
- [3] H. -J. Sun, M. Cui, B. Ma, and H. Ezura, "Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce," *FEBS Lett*, vol. 580, pp. 620-626, 2006a.
- [4] Y. Kurihara and S. Nirasawa, "Structures and activities of sweetness-inducing substances (miraculin, curculin, strogin) and the heat-stable sweet protein, mabinlin," *FFI J Jpn*, vol. 174, pp. 67-74, 1997.
- [5] T. Matsuyama, M. Satoh, R. Nakata, T. Aoyama, and H. Inoue, "Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*," *J Biochem*, vol. 145, pp. 445-450, 2009.
- [6] K. Ito, T. Asakura, Y. Morita, K. Nakajima, A. Koizumi, and A. Shimizu-Ibuka, "Microbial production of sensory-active miraculin," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 360, pp. 407-411, 2007.
- [7] K. Ito, T. Sugawara, A. Koizumi, K. Nakajima, A. Shimizu-Ibuka, and M. Shiroishi, "Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1800, pp. 986-992, 2010.
- [8] T. Sugaya, M. Yano, H. -J. Sun, T. Hirai, and H. Ezura, "Transgenic strawberry expressing a taste-modifying protein, miraculin," *Plant Biotechnol J*, vol. 25, pp. 329-333, 2008.
- [9] M. Yano, T. Hirai, K. Kato, K. Hiwasa-Tanase, N. Fukuda, and H. Ezura, "Tomato is a suitable material for producing recombinant miraculin protein in genetically stable manner," *Plant Sci*, vol. 178, pp. 469-473, 2010.
- [10] H. -J. Sun, S. Uchii, S. Watanabe, and H. Ezura, "A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics," *Plant Cell Physiol*, vol. 47, pp. 426-431, 2006b.
- [11] S. Streatfield, "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants," *Plant Biotechnol J*, vol. 5, pp. 2-15, 2007.

-
- [12] P. Desai, N. Shrivastava, and H. Padh, "Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression," *Biotechnol Adv*, vol. 28, pp. 427-435, 2010.
- [13] Y. Nakamura, T. Gojobori, and T. Ikemura, "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000," *Nucl. Acids Res*, vol. 28, p. 292, 2000. [Online]. Available: <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>. [Accessed Dec. 26, 2012].
- [14] X. D. Do, H. H. Chu, and T. B. Le, "Research on regeneration process and gene transfer system for some tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* L.) of Vietnam," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 5, pp. 217-223, 2007.
- [15] V. M. Chu, *Informatics in biotechnology*. Hanoi: Vietnam Education Publishing House, 2010.
- [16] K. Hiwasa-Tanase, M. Nyarubona, T. Hirai, K. Kato, T. Ichikawa, and H. Ezura, "High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator," *Plant Cell Rep*, vol. 30, pp. 113-124, 2011.
- [17] T. B. Le, V. C. Phan, V. H. Nong, N. H. Truong, Q. H. Le, *Application of molecular techniques in the study of biological resources in Vietnam*. Hanoi: Science and Technology Publishing House, 2003.
- [18] P. Meyer, "Repeat-induced gene silencing: common mechanisms in plants and fungi," *Biol Chem Hoppe Seyler*, vol. 377, pp. 87-95, 1996b.
- [19] Y. Kim, T. Hirai, K. Kato, K. Hiwasa-Tanase, and H. Ezura, "Gene dosage and genetic background affect miraculin accumulation in transgenic tomato fruits," *Plant Biotechnol*, vol. 27, pp. 333-338, 2010a.
- [20] Y. Kim, K. Kato, T. Hirai, K. Hiwasa-Tanase, and H. Ezura, "Spatial and developmental profiling of miraculin accumulation in transgenic tomato fruits expressing the miraculin gene constitutively," *J Agric Food Chem*, vol. 58, pp. 282-286, 2010b.
- [21] T. Hirai, N. Kurokawa, N. Duhita, K. Hiwasa-Tanase, K. Kato, and H. Ezura, "The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* induces extremely high-level accumulation of miraculin protein in transgenic tomato," *J Agric Food Chem*, vol. 59, pp. 9942-9949, 2011b.