

CONSTRUCTION OF A EXPRESSION VECTOR CONTAINING THE *GmAP2* GENE FROM SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.]

Nguyen Thu Giang¹, Vitchonneny Leuangvanh², Nguyen Thi Hai Yen², Nguyen Huu Quan³,
 Nguyen Thi Ngoc Lan³, Vu Thi Thu Thuy³, Chu Hoang Mau^{3*}

¹TNU- University of Medicine and Pharmacy, ²TNU - University of Sciences

³TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 26/8/2024	Soybean is a drought and salinity-sensitive crop, so to increase soybean yield, it is necessary to research and develop drought and salinity-tolerant cultivars. One solution of interest is to overexpress key genes involved in synthesising drought/salt tolerance proteins. AP2 is a large protein family of plant-specific transcription factors, and some AP2 genes are inducible to abiotic stress and increase expression under dehydration and high salinity conditions. Therefore, the gene encoding a protein belonging to the AP2 transcription factor family was chosen as the target to determine gene function and propose potential candidate genes in the strategy to improve drought and salinity tolerance of soybeans. This paper reports the results of designing an expression vector carrying the <i>GmAP2</i> gene structure and expressing them in tobacco plants. The result is an expression vector (pFGC_ <i>GmRAP2-4_syn</i>) carrying the soybean <i>GmRAP2-4</i> gene that was successfully designed. The designed <i>GmRAP2-4_syn</i> gene has a length of 1015 nucleotides encoding 311 amino acids, including the amino acid coding region, the cmcy antigen coding sequence and KDEL. In addition, at both ends of the gene, there is a segment containing the cutting sites of the restriction enzymes <i>AscI</i> and <i>BamHI</i> . The pFGC_ <i>GmRAP2-4_syn</i> construct was successfully transformed into tobacco plants and 35 <i>GmRAP2-4_syn</i> transgenic tobacco lines were obtained. Random testing of 3 transgenic tobacco lines gave positive PCR results with specific primer pairs.
Revised: 17/10/2024	
Published: 18/10/2024	
KEYWORDS	
AP2	
Expression vector	
<i>Glycine max</i> (L.) Merr	
Gene Transfer	
Vector construction	

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN MANG GENE *GmAP2* TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG [*Glycine max* (L.) Merr.]

Nguyễn Thu Giang¹, Vitchonneny Leuangvanh², Nguyễn Thị Hải Yến², Nguyễn Hữu Quân³,
 Nguyễn Thị Ngọc Lan³, Vũ Thị Thu Thủy³, Chu Hoàng Mậu^{3*}

¹Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

³Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 26/8/2024	Đậu tương là loại cây trồng nhạy cảm với hạn và mặn, do vậy để tăng cường năng suất đậu tương cần nghiên cứu phát triển các giống có khả năng chịu hạn và mặn. Một giải pháp được quan tâm là biểu hiện mạnh các gene chìa khóa liên quan đến tổng hợp protein kháng hạn/mặn. AP2 là một họ protein lớn gồm các nhân tố phiên mã đặc trưng ở thực vật, một số gene AP2 cảm ứng với stress phi sinh học và tăng cường biểu hiện trong điều kiện mất nước và độ mặn cao. Chính vì vậy, gene mã hóa protein thuộc họ nhân tố phiên mã AP2 được lựa chọn làm gene mục tiêu xác định chức năng và đề xuất gene ứng cử viên tiềm năng trong chiến lược cải thiện khả năng kháng hạn và mặn của cây đậu tương. Bài báo này công bố kết quả thiết kế vector biểu hiện mang cấu trúc gen <i>GmAP2</i> và biểu hiện chúng trong cây thuốc lá. Kết quả thu được vector biểu hiện (pFGC_ <i>GmRAP2-4_syn</i>) mang gene <i>GmRAP2-4</i> của đậu tương đã được thiết kế thành công. Gene <i>GmRAP2-4_syn</i> thiết kế có kích thước 1015 nucleotide mã hoá 311 amino acid gồm vùng mã hoá amino acid, trình tự mã hoá kháng nguyên cmcy và KDEL. Ngoài ra ở hai đầu của gene có đoạn chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn <i>AscI</i> và <i>BamHI</i> . Cấu trúc pFGC_ <i>GmRAP2-4_syn</i> đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá và thu được 35 dòng cây thuốc lá chuyển gene <i>GmRAP2-4_syn</i> . Kiểm tra ngẫu nhiên 3 dòng cây thuốc lá chuyển gene đều cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu.
Ngày hoàn thiện: 17/10/2024	
Ngày đăng: 18/10/2024	
TỪ KHÓA	
AP2	
Vector biểu hiện	
Đậu tương	
Chuyển gene	
Thiết kế vector	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10997>

* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Hiện nay, với sự biến đổi khí hậu toàn cầu ngày một gia tăng, các vùng đất canh tác trở nên khô hạn, mặn và nghèo nàn dinh dưỡng. Để đảm bảo an toàn bền vững cho cây trồng là vấn đề không dễ giải quyết, nó đòi hỏi phải có chiến lược đúng đắn và dài lâu trên toàn cầu. Việc tìm kiếm các giống cây trồng có khả năng tồn tại dưới tác động của các yếu tố bất lợi khác nhau phụ thuộc phần lớn vào việc bảo vệ và phát triển những giống hiện có. Trong số các cây trồng chủ lực trên thế giới, đậu tương là cây trồng có giá trị kinh tế và cây cải tạo đất, tuy nhiên lại là cây trồng được xếp vào nhóm mẫn cảm với hạn và mặn [1], [2], do đó để phát triển các giống đậu tương năng suất cao cần chú ý khắc phục đặc điểm này.

Họ gene mã hoá nhân tố phiên mã AP2/ERF thuộc nhóm gene điều hòa, là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã ở thực vật, như AP2 (APETALA 2), RAV (Related to ABI3/VP1), ERF (Ethylene-responsive element binding factor) và DREB (Dehydration responsive element binding) [3]. Phân họ AP2 bao gồm các gene mã hóa các nhân tố phiên mã có miền AP2 đặc trưng và lần đầu tiên được tìm thấy ở *Arabidopsis* (APETALA 2) có khả năng phản ứng đối với các tín hiệu stress phi sinh học từ ngoại cảnh. Một số nghiên cứu đã xác định số lượng gene thuộc phân họ AP2 của đậu tương từ cơ sở dữ liệu NCBI với các dạng phổ biến của miền AP2 [4]. Nhân tố phiên mã thuộc họ AP2 chứa yếu tố có tác động trans liên kết với trình tự cis của promoter để kích hoạt sự biểu hiện của các gene mục tiêu ở phía hạ lưu (downstream) khi có tín hiệu stress ở thực vật [5]. Các gene thuộc phân họ AP2 chứa miền chức năng AP2 là nhân tố phiên mã hứa hẹn nhiều ứng dụng trong việc cải thiện tính kháng hạn và mặn của thực vật bằng kỹ thuật chuyển gene.

Gene *GmRAP2-4* trong hệ gene đậu tương nằm trên nhiễm sắc thể số 13, mã hoá protein - nhân tố phiên mã, có kí hiệu gene LOC100802961, được mô tả là gene mã hoá ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 và được vào locus GLYMA_13G088100v4 [6], [7]. Gene *GmRAP2-4* thuộc nhóm gene chưa rõ chức năng, nhưng được dự đoán là điều hoà các gene mà sản phẩm liên quan trực tiếp đến khả năng kháng hạn, kháng mặn của cây đậu tương [8]. Xuất phát từ mục đích nghiên cứu chức năng gen thuộc phân họ AP2 của cây đậu tương, chúng tôi tiến hành thiết kế vector biểu hiện mang gene *GmRAP2-4* từ cây đậu tương [*Glycine max* (L.) Merr.] và kiểm chứng gene chuyển *GmRAP2-4* hiện diện trên cây mô hình thuốc lá K326. Kết quả nghiên cứu góp phần làm tiền đề cho việc ứng dụng kỹ thuật chuyển gene trong cải thiện khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi của ngoại cảnh trong thực tiễn chọn giống cây trồng ở Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu thực vật

Hạt thuốc lá K326 (*Nicotiana tabacum* K326) do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Hạt thuốc lá được khử trùng, nảy mầm, hình thành cây trong môi trường nuôi cấy *in vitro* và được lưu giữ trong phòng cấy. Mô lá thuốc lá được sử dụng làm nguyên liệu tiếp nhận gene trong kỹ thuật biến nạp di truyền.

Vector và chủng vi khuẩn

Vector tách dòng pTWIST, vector biểu hiện pFGC5941 chứa promoter 35S, vi khuẩn *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 được sử dụng trong nghiên cứu 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.

Cặp mồi PCR sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật PCR được sử dụng để phân tích sự có mặt của gene chuyển *GmRAP2-4_{syn}* trong khuẩn lạc *E. coli*, *A. tumefaciens* và cây thuốc lá chuyển gene, trình tự cụ thể như sau:

GmRAP2-4_F 3'-TCAGAGGAGAACTCATGGAAG-5'

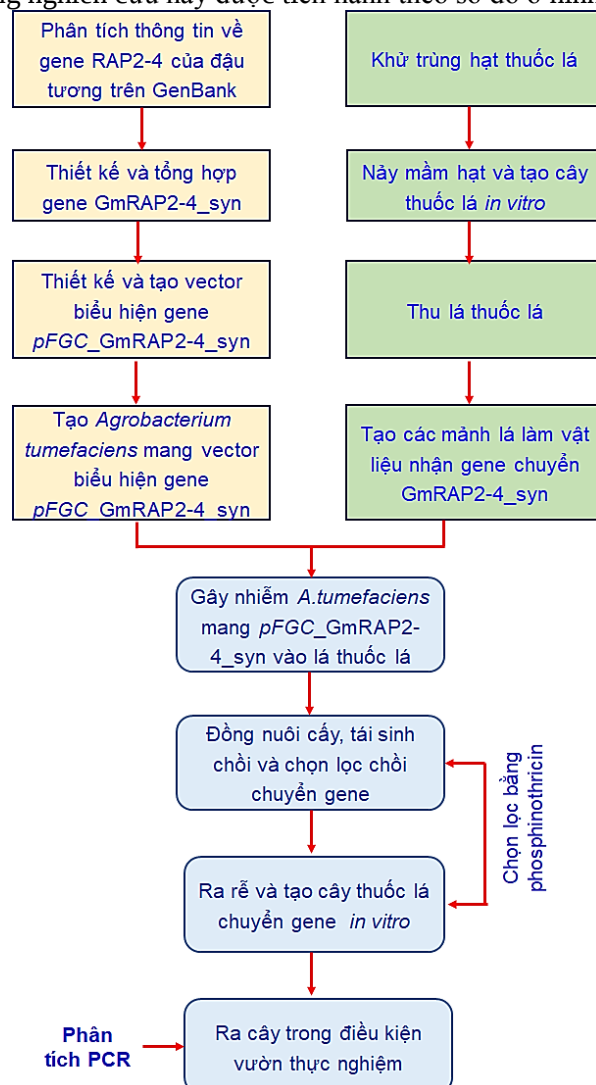
MYC-KDEL_R 3'-TCACAGCTCGTCCTTCAGATCC-5'

BAR3-F 3'-CAGCAGGTGGGTGTAGAGCG-5'

BAR1-R 3'-TACCATGAGCCCAGAACGACGCCC-5'

2.2. Phương pháp

Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được tiến hành theo sơ đồ ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tiến hành các thí nghiệm thiết kế vector và biến nạp di truyền

2.2.1. Thiết kế vector biểu hiện gene và tạo dòng *A. tumefaciens* mang vector biểu hiện chứa gene *GmRAP2-4_syn*

Tổng hợp gene *GmRAP2-4*: Phân tích thông tin của gene *RAP2-4* của đậu tương trên GenBank, chọn vùng mã hóa, thêm các trình tự chứa điểm cắt của enzyme giới hạn và trình tự mã hóa kháng nguyên, sau đó đem tổng hợp tại công ty TWIST.

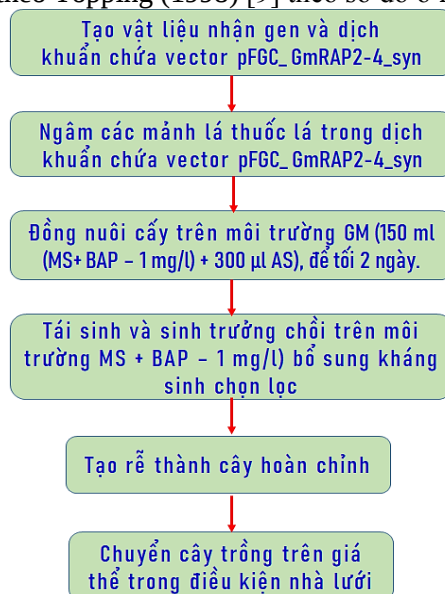
Tạo vector biểu hiện gene *GmRAP2-4_syn* được tiến hành theo các bước: (1) Nhân dòng vector *ptwist_GmRAP2-4_syn* trong *E.coli*; (2) Mở vòng vector *pFGC5941* và *ptwist_GmRAP2-4_syn* thu đoạn gene *GmRAP2* bằng *AscI* và *BamHI* (thành phần phản ứng cắt: Buffer 10x 3 µL; *AscI* (10 u) 1 µL; *BamHI* (10 u) 1 µL; Plasmid 1 µg; H₂O 30 µL); (3) Nối gene chuyển *GmRAP2-4_syn* vào vector biểu hiện *pFGC5941* bằng T4 ligase tạo vector biểu hiện *pFGC_GmRAP2-4_syn*. Kiểm tra vector bằng cặp enzyme giới hạn *AscI/BamHI* (Thành phần phản ứng nối: T4 buffer 2 µL; T4 ligase 1 µL; *pFGC5941* 30 ng; *GmRAP2-4_syn* 10 ng; H₂O 20 µL); (4) Nhân

dòng vector pFGC_ GmRAP2-4_syn trong *E.coli*, tách plasmid tái tổ hợp pFGC_ GmRAP2-4. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pFGC_ GmRAP2-4 bằng colony-PCR với cặp mồi GmRAP2-4_F/MYC-KDEL_R. (Thành phần phản ứng: Master mix 2X 7,5 μ L; Primer F (10 pM) 0,5 μ L; Primer R (10 pM) 0,5 μ L; H₂O 15 μ L; Chu kì nhiệt: 94°C trong 3 phút; lặp lại 27 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 55°C – 30 giây và 72°C – 1 phút. Kết thúc ở 72°C – 5 phút); (5) Kiểm tra vector biểu hiện bằng giải trình tự đoạn gene *GmRAP2-4_syn* trong vector pFGC_ GmRAP2-4_syn với mồi MYC-KDEL_R; (6) Biến nạp vector pFGC_ GmRAP2-4_syn vào *A. tumefaciens* AGL1, tạo dòng *A. tumefaciens* mang vector biểu hiện chứa gene *GmRAP2-4_syn*. Clony-PCR kiểm tra khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 bằng colony-PCR với mồi GmRAP2-4_F/MYC-KDEL_R.

Dữ liệu gene *GmRAP2-4_syn* được phân tích bằng phần mềm tin sinh học.

2.2.2. Phương pháp biến nạp gene *GmRAP2-4_syn* và mô lá thuốc lá và tạo cây chuyển gene thông qua *A. tumefaciens*

Kỹ thuật biến nạp vector chứa cấu trúc mang gene *GmRAP2-4_syn* vào thuốc lá qua trung gian *A. tumefaciens* được thực hiện theo Topping (1998) [9] theo sơ đồ ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ thí nghiệm biến nạp gene chuyển *GmRAP2-4_syn* vào mô lá thuốc lá và tạo cây thuốc lá chuyển gene

Phân tích sự có mặt của gene chuyển *GmRAP2-4_syn* bằng kỹ thuật PCR.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo vector biểu hiện pFCG_ GmRAP2-4_syn và vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp

Gene *GmRAP2-4_syn* được thiết kế dựa trên thông tin gene RAP2-4 của đậu tương mang mã số XM_003542406.5 trên GenBank. Gene RAP2-4 của đậu tương có 936 nucleotide mã hóa 311 amino acid. Để tạo gene chuyển *GmRAP2-4_syn*, ở đầu 5' của gene đã được bổ sung 19 nucleotide (ACCCCGGGTgggcgcgccc) chứa vị trí cắt của enzyme *AscI* và ở đầu 3' thêm 18 nucleotide (ggatcctagggCGAGCTCGAA) chứa vị trí cắt của enzyme *BamHI*. Thêm một đoạn trình tự khoảng 30 nucleotide mã hóa đuôi cmcy (GAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTG) và 12 nucleotide mã hóa KDEL (AAGGACGAGCTG). Như vậy, gene chuyển *GmRAP2-4_syn* được thiết kế có kích thước 1015 nucleotide (Hình 3). Gene *GmRAP2-4_syn* được tổng hợp và gắn trong vector tách dòng pTwist (pTwist_ GmRAP2-4_syn).

Tạo cấu trúc vector mang chứa gene *GmRAP2-4_syn*: Tiến hành nhân dòng vector pTwist_GmRAP2-4_syn trong *E.coli* và chọn dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp bằng colony-PCR với cặp mồi GmRAP2-4_F/MYC-KDEL_R. Kết quả phân tích colony-PCR ở hình 4A thu được đoạn DNA có kích thước khoảng 1 kb đúng với kích thước của gene chuyển *GmRAP2-4_syn*. Kết quả ở hình 4B thu được đoạn DNA khoảng 300 bp tương ứng với kích thước của trình tự Bar trong vector. Như vậy, vector tách dòng pTwist_GmRAP2-4_syn đã được xâm nhập và được khuếch đại trong *E.coli*.

```

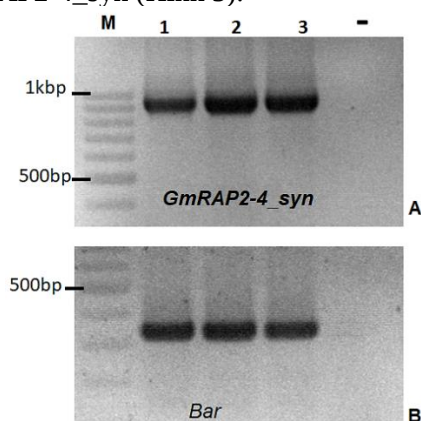
ACCCCGGGTg ggcgcgcc ATGGCAGCTACGATGAATTTCTACAACGAAACATCACAACAAGTTTCAGT
CAGATCCATTCAGAGGAGAGCTCATGGAAGTTCTAGAACCTTTTATGAAAAC TTGTCCTTCCCTCAACT
CCCTCTATTCTCTCCTCAGATTCACCATCACCTTCCTCTTACTCTCCTTTACTACCTCCACACCCCGAG
TTTCTCCACATACACCCCTCTGCCTACTTATTCCAAAACCAACAACCTTAATAGGCTTTGAGCAAC
AACCAAGTTCCCTTCTCGGGCTCAACCACCTAAGCACGTCTCAGATTTCCCAGATCCAAGCCCAAGCC
CAAGCCCAGAACTCGCTCTCTCTTAATTTCTTGGGCCCAAGCCCGTTCCTATGAAGCACGTTGGTGG
GCCGGCGAAGCCACGAAGCTGTACCGGGCGTGAGGCAGAGGCATTGGGGGAAGTGGGTGGCGGAGA
TAAGGCTACCGAAGAACC GAACAGGCTTTGGCTCGGAACCTTCGACACAGCCGAGGAAGCCGCTTGG
CTTACGACAAAAGCCGCTACAGGCTCCGAGGCGACTTGGCGAGGCTTAACCTCCACCTGAAAGGCTC
GTGCCCCGCGCAGGAGTACAAGCCTATGCAGGCTGCGGTGGACGCTAAGCTCGACGCAATCTGCGCGA
ACTTGGCGGAAATGCAGAAGCAAGGAAGAACGAGAAGGGTGCCAGGTCGGGGAAGAAGTCGAAGCAA
GGTCCGAACCTGGAGGCGAAGCCCGAACCTGAAGCTTCGGGTTCGGGTGCTGCTGCTCTGTCTCCTGA
AAGTGAGGGTTCTGCGGATTCCTCTGCTTTGTCTGATCTTACCTTTGATGTAACCGAGCCGCAATGGG
AGGATGCTTCAGCACATTTTAATTTGCAAAAGTTTCCTTCTTATGAGATCGATTGGGATTCTCTC GAA
CAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAGGACGAGCTG TGA ggatc cctagg gCGAGCTCGAA

```

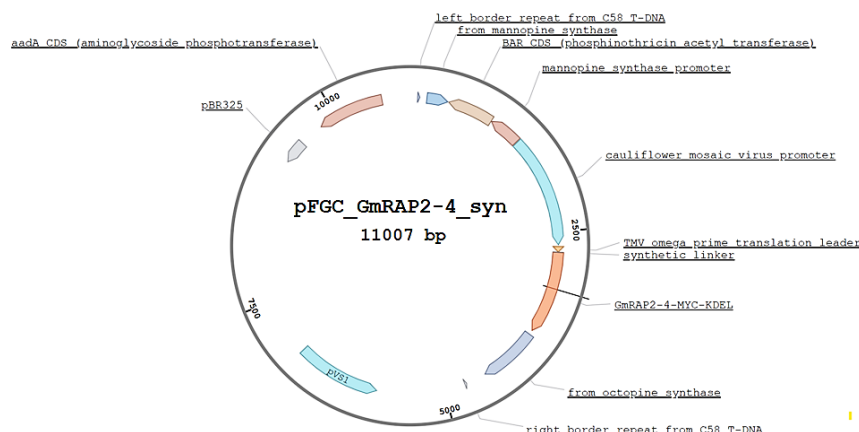
- **GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG**: EQKLISEEDL (c-MYC)
- **AAGGACGAGCTG**: KDEL
- **ggatcc** : điểm cắt của *BamHI*
- **ggcgcgcc** : điểm cắt của *AscI*

Hình 3. Trình tự nucleotide của gene chuyển *GmRAP2-4_syn* chứa điểm cắt của enzyme giới hạn *AscI* và *BamHI*; trình tự mã hoá *cmyc* và KDEL

Plasmid pTwist_GmRAP2-4_syn được tách chiết và tinh sạch. Sử dụng cặp enzyme *AscI/BamHI* trong thí nghiệm mở vòng vector pTwist_GmRAP2-4_syn ở vị trí cắt của enzyme như đã thiết kế và kết quả thu được trình tự gene *GmRAP2-4_syn*. Tiếp tục với thí nghiệm cắt vector pFGC5941 bằng hai enzyme *AscI* và *BamHI* để loại bỏ đoạn “CHSA intron” và nối trình tự gene *GmRAP2-4_syn* vào vector pFGC5941 với sự tham gia của enzyme T4 ligase tạo thành vector biểu hiện pFGC_GmRAP2-4_syn (Hình 5).



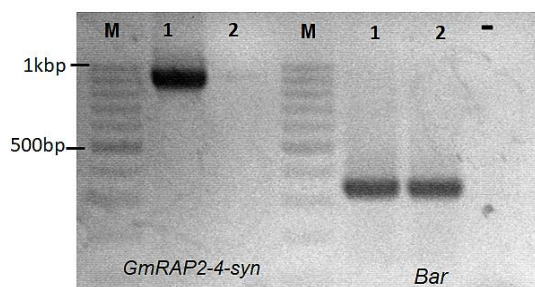
Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm colony_PCR khuếch đại trình tự gene *GmRAP2-4_syn* (A) và trình tự đoạn *Bar* (B). M: thang DNA; 1, 2, 3: Các dòng *E.coli* biến nạp; (-): Đối chứng âm: *E.coli* không biến nạp



Hình 5. Cấu trúc và một số thành phần chính của vector biểu hiện pFGC_GmRAP2-4_syn

Tiến hành giải trình tự vector pFGC_GmRAP2-4-syn từ dòng khuẩn lạc số 1 với mỗi R-MYC-KDEL, kết quả thu được (không biểu thị trong bài) cho thấy gene chuyển *GmRAP2-4-syn* đã được hợp nhất vào vector biểu hiện pFGC tạo thành vector tái tổ hợp pFGC_GmRAP2-4-syn.

Biến nạp vector biểu hiện pFGC_GmRAP2-4_syn vào *A. tumefaciens*, nhân dòng và kiểm tra vi khuẩn tái tổ hợp mang vector bằng colony-PCR. Kết quả điện di ở hình 6 cho thấy, dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* tái tổ hợp được chọn lọc có đoạn DNA khoảng 1kb ứng với gene *GmRAP2-4-syn*, còn dòng *A. tumefaciens* biến nạp vector FGC5941 không xuất hiện đoạn gene này. Ngoài ra, cả hai dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* khi phân tích colony-PCR đoạn Bar đều cho kết quả dương tính với kích thước khoảng 300bp đúng với lý thuyết. Kết quả phân tích ở hình 5 có thể nhận xét rằng, vector biểu hiện mang gene *GmRAP2-4-syn* đã được đưa thành công vào chủng *A. tumefaciens* và có thể sử dụng trong biến nạp di truyền để tạo cây chuyển gene.



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm clony-PCR trực tiếp từ khuẩn lạc *A. tumefaciens*. M: thang DNA 100; 1: Colony-PCR khuếch đại gene *GmRAP2-4_syn* từ khuẩn lạc *A. tumefaciens* chọn lọc; 2: Vector pFGC5941; (-): Đối chứng âm là dòng *A. tumefaciens* không biến nạp

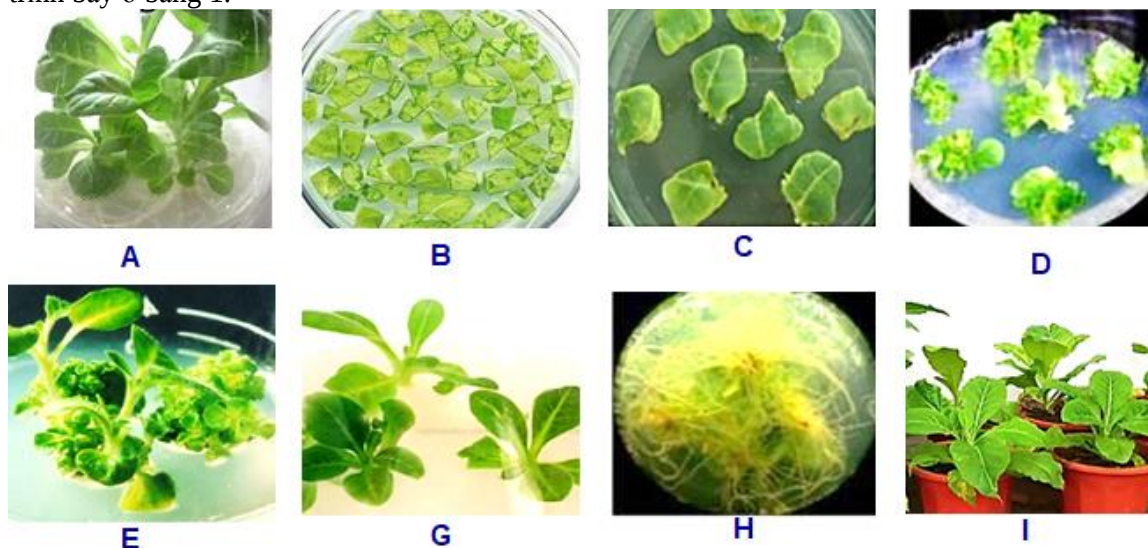
3.2. Chuyển cấu trúc pFGC_GmAP2-4_syn vào thuốc lá K326

3.2.1. Biến nạp gene *GmRAP2-4_syn* bằng gây nhiễm *A. tumefaciens* vào mô lá thuốc lá

Kết quả biến nạp vector pFGC_GmRAP2-4_syn vào mô lá thuốc lá được thể hiện ở hình 7 với 3 lô thí nghiệm lặp lại. Các mảnh lá bánh tẻ, kích thước 0,5 x 0,5 cm² thu từ cây thuốc lá trong bình nuôi cấy *in vitro* được đặt trên môi trường cảm ứng MS + BAP1 mg/L + 30 g/L glucose + 8 g/L agar ở điều kiện pH = 5,8, trong 48 h. Sau đó các mảnh lá được ngâm trong dịch huyền phù *Agrobacterium tumefaciens* chứa cấu trúc gene chuyển (OD600 = 0,8) trong 30 phút, thấm khô trên giấy thấm và chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy 50 mL (MS+ BAP – 1 mg/L) + 100 μl AS và để trong tối 48 h. Tiếp tục chuyển sang môi trường tái sinh chồi (MS + BAP – 1 mg/L) bổ sung kanamycin 50 mg/L, cefotaxim 400 mg/L.

Các cụm chồi được hình thành sau 2 tuần tuổi có kích thước khoảng 2 cm được tách nhỏ, các chồi sống sót qua chọn lọc kháng sinh được chuyển sang môi trường kéo dài chồi và chuyển sang môi trường tạo rễ. Sau 2-3 tuần các chồi ra rễ và phát triển bình thường, xanh và có nhiều lá. Các

cây thuốc lá *in vitro* sống sót qua chọn lọc được chuyển ra bầu đất và đem trồng tại nhà lưới. Kết quả biến nạp vector pFGC_GmRAP2-4_syn vào mô lá và tái sinh cây thuốc lá chuyển gene được trình bày ở bảng 1.



Hình 7. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp, tái sinh và tạo cây thuốc lá chuyển gene. A: Cây thuốc lá *in vitro*; B: nhiễm khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector biểu hiện pFGC_GmRAP2-4_syn; C: Đồng nuôi cấy; D, E: Tái sinh và sinh trưởng chồi; G, H: Chồi trên môi trường ra rễ; I: Cây thuốc lá chuyển gene trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới

Bảng 1. Kết quả chuyển cấu trúc pFGC_GmRAP2-4_syn vào thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng	Số mảnh lá biến nạp	Số mảnh lá sống sót	Số cụm chồi tạo thành	Số chồi sống sót qua chọn lọc	Số chồi trong môi trường sinh trưởng	Số cây ra rễ	Số cây ra bầu trong nhà lưới
Thí nghiệm	Lần 1	30	21	68	26	16	10
	Lần 2	30	19	48	19	15	15
	Lần 3	30	25	61	22	17	18
	Tổng	90	65	177	67	48	43
ĐC1	30	0	0	0	0	0	0
ĐC0	30	28	56	112	87	32	10

Ghi chú: * ĐC1: mảnh lá không biến nạp trên môi trường có kháng sinh; * ĐC0: mảnh lá không biến nạp trên môi trường không có kháng sinh

Trong bảng 1, thí nghiệm chuyển gene được thực hiện lặp lại 3 lần, mỗi lần sử dụng 30 mẫu biến nạp. Kết quả cho thấy, với 90 mảnh lá được biến nạp có 65 mẫu sống sót và tạo thành 177 cụm chồi. Qua chọn lọc nhận được 67 chồi sống sót và số chồi chuyển sang môi trường kéo dài là 48, trong đó 43 chồi chuyển sang môi trường ra rễ. Số cây sống sót chuyển trồng trên giá thể trong nhà lưới là 35.

Đối với lô đối chứng, ở ĐC1 nuôi cấy 30 mẫu và tất cả đều chết, trong khi đó ở ĐC0 có 28/30 mảnh lá sống sót, tạo được 56 cụm chồi và 112 chồi sống sót. Chuyển 87 chồi sang môi trường sinh trưởng và chọn 32 chồi sinh trưởng tốt nhất chuyển sang môi trường ra rễ. Chọn 10 cây thuốc lá sinh trưởng tốt nhất đem trồng trên giá thể trong nhà lưới.

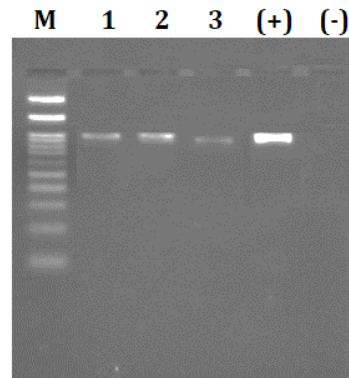
3.2.2. Kết quả xác nhận sự có mặt của gene chuyển GmRAP2-4_syn trong cây thuốc lá chuyển gene

Cây thuốc lá chuyển gene trong nhà lưới được 28 ngày tiến hành thu lá để tách DNA. Sự có mặt của gene chuyển GmRAP2-4_syn được phân tích bằng PCR với cặp mồi GmRAP2-4_F/MYC-KDEL_R, kết quả điện di được thể hiện ở hình 8.

Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản gene *GmRAP2-4_syn* ở hình 8 cho thấy, 3 cây thuốc lá chuyển gene đều dương tính với PCR. Như vậy, gene chuyển *GmRAP2-4_syn* đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*.

4. Kết luận

Vector biểu hiện (pFGC_GmRAP2-4_syn) mang gene *GmRAP2-4* của đậu tương đã được thiết kế thành công. Gene *GmRAP2-4_syn* được tổng hợp nhân tạo có kích thước 1015 nucleotide mã hoá 311 amino acid. Gene *GmRAP2-4_syn* gồm vùng mã hoá amino acid, trình tự mã hoá kháng nguyên cmcy và KDEL. Ngoài ra ở hai đầu của gene có đoạn chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn *AscI* và *BamHI*. Cấu trúc pFGC_GmRAP2-4_syn đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá và thu được 35 dòng cây thuốc lá chuyển gene *GmRAP2-4_syn*. Kiểm tra ngẫu nhiên 3 dòng cây thuốc lá chuyển gene đều cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 8. Hình ảnh điện di kiểm tra cây thuốc lá chuyển gene *GmRAP2-4_syn*. M: thang DNA; (+): plasmid pFGC_GmRAP2-4_syn; (-): Cây thuốc lá không biến nạp; 1, 2, 3: Các cây thuốc lá được biến nạp

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106.02-2023.05. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. M. Chu, T. T. H. Nguyen, V. T. T. Nguyen, and H. H. Chu, *Gene and resistance characteristics of soybean plants*. Vietnam National University Pres, Hanoi, 2011.
- [2] Y. Sakuma, Q. Liu, J. G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, "DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 290, pp. 998-1009, 2002.
- [3] T. N. L. Nguyen, P. Vaciata, T. C. Nguyen, H. Q. Nguyen, T. T. N. Pham, T. T. T. Vu, and H. M. Chu, "Characteristics and phylogeny of DREB gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Meril]," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 63, pp. 60-64, 2021.
- [4] C. Lata and M. Prasad, "Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants," *Journal of experimental botany*, vol. 62, pp. 4731-4748, 2011.
- [5] J. Schmutz, S. Cannon, J. Schlueter *et al.*, "Genome sequence of the palaeopolyploid soybean," *Nature*, vol. 463, pp. 178-183, 2010.
- [6] NCBI, "LOC100802961 ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 [*Glycine max* (soybean)]," Gene, 2023. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nucore_gene&from_uid=2027501841. [Accessed Jul. 21, 2024].
- [7] Z. Ma, L. Hu, W. Jiang, and G. Seidenfaden, "Understanding AP2/ERF Transcription Factor Responses and Tolerance to Various Abiotic Stresses in Plants: A Comprehensive Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, p. 893, 2024.
- [8] Z. Ma, Y. M. Jin, T. Wu, L. Hu, Y. Zhang, W. Jiang, and X. Du, "OsDREB2B, an AP2/ERF transcription factor, negatively regulates plant height by conferring GA metabolism in rice," *Front. Plant Sci.*, vol. 13, 2022, Art. no. 1007811.
- [9] J. F. Topping, "Tobacco transformation," In Foster GD, Taylor SC, *Plant Virology Protocol, from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press, Totowa, vol. 81, pp. 365-485, 1998.