

Tạo dòng phân tử cDNA của gen mã hóa Gibberellin 20-oxidase từ cây *arabidopsis thaliana*

Hồ Văn Giảng, Hà Văn Huân*, Lê Thị Huyền, Bùi Văn Thắng, Ngô Văn Thanh

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Lâm nghiệp, Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 8 tháng 10 năm 2009

Tóm tắt. cDNA sợi đơn của gen GA20 mã hóa cho enzym Gibberellin 20-oxidase tổng hợp từ mARN tổng số tách chiết từ cây *Arabidopsis thaliana* được dùng làm khuôn để nhân gen GA20 nhờ cặp mồi đặc hiệu thiết kế dựa theo trình tự nucleotide của gen GA20 công bố trên Ngân hàng gen (mã số AK221496). Sản phẩm PCR nhân gen được gắn vào vector tách dòng pBT-TA và biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E.coli* TOP10. Các dòng tế bào mang gen quan tâm được sàng lọc bằng các kỹ thuật: nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, tách chiết plasmid và cắt kiểm tra plasmid bằng enzym giới hạn, giải trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide của gen GA20 được phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana* trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng cao (98-99,6%) so với các trình tự nucleotide của gen GA20 công bố trên Ngân hàng gen.

Từ khóa: *Arabidopsis thaliana*, gen GA20, Gibberellin 20-oxidase, sinh trưởng nhanh, tạo dòng cDNA

1. Giới thiệu

Gen GA20 mã hóa cho GA 20-oxidase là một enzym chìa khoá có vai trò quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp Gibberellin (GA) ở thực vật [1]. Enzym GA 20-oxidase có hoạt tính xúc tác cho 3 phản ứng oxy hóa liên tiếp, đó là: phản ứng chuyển hóa GA12/GA53 thành GA15/GA44, sau đó tiếp tục chuyển hóa GA15/GA44 thành GA24/GA19 và cuối cùng là chuyển hóa GA24/GA19 thành GA9/GA20. Trong đó, GA9/GA20 là dạng tiền chất trực tiếp để chuyển hóa thành dạng GA có hoạt tính sinh học (GA4 và GA1) nhờ sự xúc tác của enzym 3 β -hydroxylase [2,3]. GA dạng hoạt động có

tác dụng điều khiển quá trình phát triển ở thực vật, như: kích thích hạt nảy mầm, ra hoa, tạo quả, tăng diện tích lá, kéo dài thân làm cho cây thân gỗ tăng trưởng về chiều cao và đường kính [2,3]. Gen GA20 đã được phân lập, biểu hiện và chuyển thành công vào nhiều đối tượng thực vật khác nhau, như: Thuốc lá, Dương lai, Táo [4] và đã chứng minh được cây chuyển gen sinh trưởng nhanh hơn, có đường kính thân to hơn, sinh khối lớn hơn so với cây đối chứng không chuyển gen [5]

Với mục tiêu tạo nguồn vật liệu phục vụ cho tạo giống cây trồng biến đổi gen sinh trưởng nhanh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo dòng gen GA20 mã hóa GA 20-oxidase từ mARN thông qua cDNA ở cây *Arabidopsis thaliana*. Toàn bộ chiều dài phân tử cDNA của gen GA20 ở cây *Arabidopsis thaliana* gồm

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-33724823.
E-mail: hyhuanbiotech@gmail.com

1134 nucleotide, mã hóa cho enzyme GA 20-oxidase gồm 377 axit amin với khối lượng phân tử khoảng 43,4 kDa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Cây *Arabidopsis thaliana* *in vitro* và vector tách dòng pBT-TA do phòng Công nghệ Tế bào Thực vật-Viện Công nghệ Sinh học-Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Tế bào vi khuẩn *E.coli* TOP10, các loại Kít và hóa chất cho tạo dòng gen do các hãng Invitrogen (Mỹ), Reseachorganics (Mỹ), Fermentas (Đức) và Wako (Nhật) cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách mARN và tổng hợp cDNA: Tách mARN tổng số và tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của các bộ Kit như: PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen – Mỹ), mRNA magnetic bead kit micro (Invitrogen – Mỹ) và Superscript III 1st strand (Invitrogen – Mỹ).

Nhân gen GA20 từ cDNA: Cặp mỗi dùng để nhân gen GA20 được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen GA20 ở cây *Arabidopsis thaliana* công bố trên Ngân hàng gen NCBI (mã số AK221496). Mỗi xuôi (AraGA20F) có trình tự nucleotide:

5' gccgaattcaaaatggccgtaagtctcg 3', có chèn trình tự cắt của enzym giới hạn *EcoRI* (gaattc) ở đầu 5'; Mỗi ngược (AraGA20R) có trình tự nucleotide: 5' ggggtctagattcttagatgggtttggtgag 3', có chèn trình tự cắt của enzym giới hạn *XbaI* (tctaga) ở đầu 5'. cDNA sợi đơn được dùng làm khuôn để nhân gen GA20 bằng kỹ thuật PCR. Phản ứng nhân gen được thực hiện trong tổng thể tích 50μl với các thành phần: DEPC treated water: 38μl; 10X PCR buffer minus Mg2+: 5μl;

50mM MgCl2: 1,5μl; 10mM dNTP mix : 1μl; 10pM mỗi xuôi AraGA20F: 1μl; 10pM mỗi ngược AraGA20R: 1μl; dịch cDNA: 1μl; *Taq* DNA polymerase (5U/μl): 0,5μl. Phản ứng được thực hiện theo chương trình: 94°C trong 3 phút; (94°C trong 45 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây, lặp lại 40 chu kỳ); ủ ở 72°C trong 8 phút; sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C.

Sàng lọc và phân tích trình tự nucleotide của gen GA20: Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pBT-TA nhờ enzym nối T4 DNA ligase, sau đó được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E.coli* chủng TOP10. Sau khi biến nạp, tế bào vi khuẩn được cấy trải và nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung X-gal và kháng sinh Ampicillin (100μg/ml) để chọn lọc các dòng tế bào mang vector tách dòng tái tổ hợp. Các dòng vi khuẩn được nhân lên với số lượng lớn trong môi trường LB lỏng để tách chiết plasmid cho các nghiên cứu tiếp theo. Các dòng plasmid được cắt kiểm tra bằng cặp enzym giới hạn *E.coRI* và *XbaI* và điện di trên gel agarose 1%. Trình tự nucleotide của gen GA20 được xác định bằng phương pháp xác định trình tự tự động trên máy ABI PRISMR 3100 – Avant Genetic Analyzer (ABI, Mỹ) tại phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen-Viện Công nghệ Sinh học-Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3. Kết quả và thảo luận

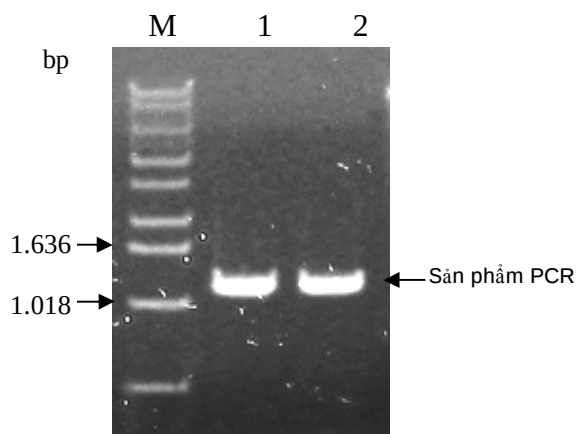
3.1. Tách chiết ARN

Kết quả tách chiết ARN tổng số (không đưa ảnh) cho thấy, sử dụng bộ hoá chất chuẩn “PureLink™ Plant RNA Reagent” của hãng Invitrogen để tách chiết ARN tổng số từ cây *Arabidopsis thaliana* đạt hiệu quả rất cao. ARN tổng số thu được không bị đứt gãy, đảm bảo các tiêu chuẩn kỹ thuật để tiến hành các nghiên cứu

tiếp theo. Vì mRNA chỉ chiếm một hàm lượng rất nhỏ (khoảng từ 1-3%) trong ARN tổng số và trong đó còn chứa khá nhiều các hợp chất thứ sinh có thể gây ảnh hưởng đến kết quả tổng hợp cDNA, nên nếu sử dụng trực tiếp ARN tổng số để tổng hợp cDNA thường gặp nhiều khó khăn. Để nâng cao hiệu quả tổng hợp cDNA, cần tiến hành tinh sạch mRNA. mRNA được tinh sạch từ dịch ARN tổng số bằng Kít "mRNA magnetic bead kit micro" của hãng Invitrogen cho chất lượng tốt để tổng hợp cDNA.

3.2. Tổng hợp cDNA và nhân gen GA20

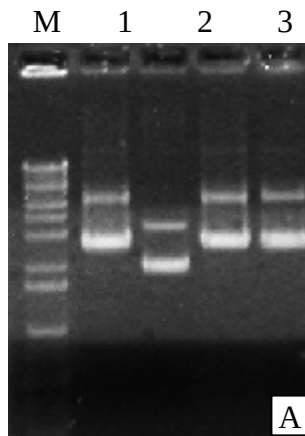
cDNA sợi đơn tổng hợp từ mRNA bằng Kít "Superscript III 1st strand" được dùng làm khuôn để nhân gen GA20 bằng kỹ thuật PCR nhờ cặp mồi đặc hiệu AraGA20F và AraGA20R. Kết quả nhân gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1). Trên điện di đồ chỉ thấy một vạch duy nhất, có kích thước khoảng 1,15 kb tương đương với kích thước của gen GA20 theo lý thuyết. Như vậy, bước đầu có thể sơ bộ kết luận: đã nhân được gen GA20 và cặp mồi dùng để nhân gen GA20 từ khuôn cDNA sợi đơn là rất đặc hiệu.



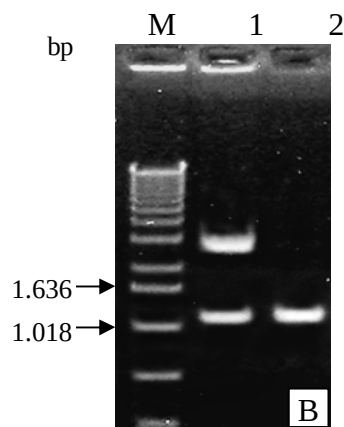
Hình 1. Kết quả nhân gen GA20 từ cDNA sợi đơn
M. thang ADN chuẩn 1kb; giếng 1-2: sản phẩm nhân gen GA20 từ cDNA

3.3. Sàng lọc gen GA20

Chọn lọc những dòng vi khuẩn sinh trưởng trên môi trường có kháng sinh chọn lọc, vì chúng chính là các dòng mang plasmid chứa gen kháng kháng sinh. Tuy nhiên, không phải tất cả các khuẩn lạc trắng đều mang plasmid có gen quan tâm, mà do chúng có thể là những khuẩn lạc chứa vector mang gen LacZ mất khả năng tổng hợp enzym β -galactosidase phân giải cơ chất X-gal thành sản phẩm có màu xanh. Nhưng việc lựa chọn các khuẩn lạc trắng để tiến hành tách chiết plasmid cũng đã loại bỏ được phần lớn các trường hợp không mong muốn. Tiến hành lấy 4 khuẩn lạc trắng (kí hiệu từ GA1 – GA4) cấy vào 4 lọ (dung tích 10ml), mỗi lọ chứa 3 ml môi trường LB bổ sung Ampicillin (100 μ g/ml), nuôi ở 37°C qua đêm. ADN plasmid được tách ra khỏi các dòng tế bào vi khuẩn để kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả thu được (hình 2A) cho thấy các dòng plasmid GA1, GA3 và GA4 đều có kích thước lớn hơn kích thước dòng GA2 (tương đương với kích thước của vector pBT-TA), nghĩa là các dòng plasmid này đã được chèn thêm đoạn ADN ngoại lai (có thể là gen quan tâm). Để có cơ sở kết luận các dòng GA1, GA3 và GA4 mang gen quan tâm, tiến hành chọn dòng GA1 làm đại diện để cắt kiểm tra bằng cặp enzym giới hạn *E.co*RI và *Xba*I. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid dòng GA1 (giếng 1) trên hình 2B cho thấy, cùng với vạch ADN tương đương với kích thước của vector pBT-TA, xuất hiện vạch ADN có kích thước khoảng 1,15 kb, tương đương với kích thước của gen GA20 theo lý thuyết và với kích thước của sản phẩm PCR nhân gen GA20 (giếng 2). Như vậy, bước đầu có thể kết luận dòng plasmid tái tổ hợp GA1 mang gen quan tâm GA20.



Hình 2A. Plasmid tách từ các thể biến nạp
M. Thang ADN chuẩn 1 kb
Giếng 1-4: plasmid các dòng GA1-GA4.



Hình 2B. Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid dòng GA1
bằng enzym *E.coRI* và *XbaI*
M. Thang ADN chuẩn 1 kb
Giếng 1: plasmid dòng GA1 cắt bằng *E.coRI* và *XbaI*
Giếng 2: sản phẩm PCR nhân gen GA20.

3.4. Xác định trình tự nucleotide của gen GA20

Để khẳng định chắc chắn dòng plasmid GA1 mang gen GA20, tiến hành xác định trình tự nucleotide của đoạn ADN chèn trong vector tách dòng pBT-GA20 (dòng GA1) (hình 3). Trình tự nucleotide của đoạn ADN chèn được so sánh với các trình tự nucleotide của gen GA20 ở cây *Arabidopsis thaliana* đã được công bố trên Ngân hàng gen (bảng 1).

```

GCCGAATTCAAAATGGCCGTAAGTTTCGTAACAACATCTCCTGAGGAAGAAGACAAACCGAAGCTAGGCCTTGAAACATTCA
AACTCCGTTAATCTTCTACCTTCAATGCTTAACCTTCAAGCCAATATCCCAAACCAATTCATCTGGCCTGACGACGAAAAACCTT
CCATCAACGTTCTCGAGCTTGATGTTCTCTCATCGACCTTCAAACCTTCTCTCTGATCCATCCTCCACTTTAGATGCTTCGAGA
CAGATCTCTGAGGCCTGTAAGAAGCAGCGTTTCTTCTCGTGGTCAATCACGGCATCAGCGAGGAGCTTATTTAGACGCTCATGA
ATACACGAGCCGCTTCTTTGATATGCCTCTCTCCGAAAAACAGAGGGTTCTTAGAAAATCCGGTGAGAGTGTGGCTACGCAAGCA
GTTTCACCGGACGCTTCTCCACCAAGCTTCCATGGAAGGAGACCTTTCTTCCGGTTTTGCGACGACATGAGCCGCTCAAAATCC
GTTCAAGATTACTTCTGCGATGCGTTGGGACATGGGTTTCAGCCATTTGGGAAGGTGTATCAAGAGTATTGTGAAGCAATGAGTTC
TCTATCACTGAAGATCATGGAGCTTCTGGGGCTAAGTTTAGGCGTAAAACGGGACTACTTTAGAGAGTTTTTCGGAGAAAACGATT
CAATAATGAGACTGAATTACTACCTCCATGTATAAAACAGATCTCACACTAGGAACAGGACCTCATTGTGATCCAACATCTCTT
ACCATCCTTCACCAAGACCATGTTAATGGCCTTCAAGTCTTTGTGGAAAATCAATGGCGCTCCATTCGTCCCAACCCCAAGGCCTT
TGTGGTCAATATCGGCGATACTTTTCATGGCTCTATCGAACGATAGATACAAGAGCTGCTTGACACAGGCGGTGGTGAACAGCGAGA
GCGAGAGGAAATCACTTGCACTTCTTGTGTCCGAAAAAGACAGAGTAGTGACGCCACCGAGAGAGCTTTTGACAGCATCACA
TCAAGAAGATACCCTGACTTCACATGGTCTACGTTCTTGAGTTCACTCAGAAACATTATAGAGCAGACATGAACACTCTCCAAGC
CTTTTCAGATTGGCTCACCAACCCATCTAAGAATCTAGACCC
    
```

Hình 3. Trình tự của nucleotide gen GA20 (dòng GA1) phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana*.

Bảng 1. Kết quả Blast trình tự nucleotide gen GA20 (dòng GA1) với các trình tự nucleotide của gen GA20 ở cây *Arabidopsis thaliana* đã được công bố trên Ngân hàng gen

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AK221496.1	Arabidopsis thaliana mRNA for gibberellin 20-oxidase - Arabidopsis	2067	2067	100%	0.0	99%
NM_118674.4	Arabidopsis thaliana GA20OX1; gibberellin 20-oxidase (GA20OX1) r	2061	2061	100%	0.0	99%
X83379.1	A.thaliana mRNA for qibberellin 20-oxidase (1259 bp)	2034	2034	100%	0.0	99%
BX826588.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clon	2006	2006	100%	0.0	98%
AL161563.2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 63	1003	2071	100%	0.0	99%
AL079350.1	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T30C3 (ESSA I	1003	2071	100%	0.0	99%
U20901.1	Arabidopsis thaliana truncated gibberellin 20-oxidase (GA5) gene, c	998	2032	100%	0.0	99%
U20872.1	Arabidopsis thaliana Landsberg erecta gibberellin 20-oxidase (GA5)	998	2038	100%	0.0	99%
BX827770.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clon	970	2032	100%	0.0	99%
U20873.1	Arabidopsis thaliana Columbia gibberellin 20-oxidase (GA5) gene, c	931	1988	100%	0.0	99%

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen GA20 dòng GA1 (hình 3) cho thấy, toàn bộ chiều dài sợi cDNA (vùng khung đọc – ORF) gồm 1134 nucleotide mã hóa cho phân tử enzym Gibberellin 20-oxidase gồm 377 axit amin. Kết quả Blast trình tự nucleotide của gen GA20 với các trình tự nucleotide của gen GA20 ở cây *Arabidopsis thaliana* đã được công bố trên Ngân hàng gen cho thấy có tỷ lệ tương đồng rất cao (98-99,6%), đặc biệt với trình tự nucleotide của gen GA20 có mã số AK221496.1 (tương đồng 99,6%) là trình tự được sử dụng để thiết kế cặp mồi cho nhân gen GA20 trong nghiên cứu này.

4. Kết luận

Đã phân lập thành công gen GA20 từ mRNA của cây *Arabidopsis thaliana*, toàn bộ vùng khung đọc mang mã di truyền của gen GA20 gồm 1134 nucleotide mã hóa cho phân tử enzym Gibberellin 20-oxidase gồm 377 axit amin.

Lời cảm ơn

Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình trọng điểm Công nghệ Sinh học Nông nghiệp và Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và PTNT.

Tài liệu tham khảo

- [1] B. Victor, M. Richard, W.P. David, M. Caiping, B.R. Stewart, H.S. Steven, Activation Tagging of a Dominant Gibberellin Catabolism Gene (GA 2-oxidase) from Poplar That Regulates Tree Stature, *Plant Physiology* 132(2003) 1283.
- [2] L.P. Andrew, A.W. Dennis, U. Scott, E.J.A. Nigel, L. Theodor, K.H. Alison, C. Paul, E.C. Jan, H. Peter, Isolation and Expression of Three Gibberellin 20 Oxidase cDNA Clones from Arabidopsis, *Plant Physiol*, 108(1995) 1049.
- [3] X. Jianping, L. Theo, A. Fredy, Cloning and characterization of a cDNA encoding a multifunctional gibberellin 20-oxidase from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Plant Science* 163(2002) 147.
- [4] S. Kusaba, C. Honda, M.Y. Kano, Isolation and expression analysis of gibberellin 20-Oxidase homologous gene in apple, *Journal of Experimental Botany* 52 (2001) 375.
- [5] E.E. Maria, I. Maria, O. Olof, M. Thomas, Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length, *Nature Biotechnol* 18(2000) 784.

Molecular cloning of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from *Arabidopsis thaliana*

Ho Van Giang, Ha Van Huan, Le Thi Huyen, Bui Van Thang, Ngo Van Thanh

Biotechnology Center, Viet Nam Forestry University, Xuan Mai, Chuong My, Hanoi, Vietnam

The GA20 gene encodes gibberellin 20-oxidase. Gibberellin 20-oxidase is one of the dioxygenases which catalyzes the sequential oxidation and elimination of C-20. Gibberellins (GAs) are natural tetracyclic diterpenoid carboxylic acids. Certain GA's function is as plant growth regulators, controlling many aspects of plant development, including seed germination, stem elongation, flower formation and development, fruit setting and development. We report here the cloning and sequencing of a full-length cDNA encoding GA 20- oxidase from *Arabidopsis thaliana*. Total mRNA isolated from *Arabidopsis thaliana* seedlings was used for cDNA synthesis. First strand cDNA was reverse-transcribed by reverse transcriptase (Superscript III 1st strand Kit - Invitrogen – USA). The amplified PCR products from the first strand cDNA were cloned into a plasmid vector using a TA- Cloning kit and subsequently sequenced. The full-length cDNA of GA20 gene contains 1134 bp encoding 377 amino acid. In comparisons of nucleotide sequences of full-length cDNA and nucleotide sequences of GA20 on NCBI (Accession no. AK221496) shown similar degree of 99,6%.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, cDNA cloning, fast-growing, GA20 gene, gibberellin 20-oxidase.