

SỰ DUY TRÌ ỔN ĐỊNH MỘT ĐOẠN ADN LỤC LẠP CỦA *S. NIGRUM* TRONG CÂY THUỐC LÁ *N. PLUMBAGINIFOLIA* BIẾN NẠP QUA CÁC THỂ HỆ R_1, R_2

NGHIÊM NGỌC MINH, NGUYỄN ĐỨC THÀNH, LÊ THỊ MUỘI
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

I. MỞ ĐẦU

Thành công đầu tiên về chuyển gen ổn định vào lục lạp được thông báo bởi Svab và các cộng sự, tuy nhiên tần số chuyển gen còn thấp [8]. Bằng kỹ thuật chuyển gen trực tiếp vào protoplast nhờ xử lý PEG, một số tác giả cũng đã nhận được những kết quả chuyển gen vào lục lạp ổn định [3, 6]. Một số phương pháp khác (chuyển gián tiếp thông qua *Agrobacterium* hoặc phương pháp vi tiêm) cũng đã được sử dụng để chuyển gen vào lục lạp nhưng không nhận được sự chuyển gen lục lạp ổn định [10, 11]. Tuy nhiên hầu hết các công trình đã công bố này chỉ tập trung vào việc nghiên cứu khả năng chuyển gen lục lạp ổn định ở thể hệ R_0 . Một vấn đề đặt ra là liệu các gen ngoại lai đã được biến nạp có được tồn tại và biểu hiện ổn định trong các cây biến nạp qua các thế hệ ($R_1, R_2...$) hay không thì còn rất ít được quan tâm nghiên cứu.

Trong bài báo trước, chúng tôi đã công bố kết quả nhận được những cây thuốc lá *Nicotiana plumbaginifolia* (*N. plumbaginifolia*) biến nạp mang 2 gen lục lạp là *rsp12* (qui định tính kháng streptomycin) và gen 16S ARN ribosom (16S rRNA) qui định tính kháng spectinomycin của cây *Solanum nigrum* (*S. nigrum*) ở thế hệ R_0 [1]. Trong bài báo này chúng tôi thông báo một số kết quả về sự duy trì tính kháng streptomycin và spectinomycin cũng như bằng chứng về sự có mặt ổn định của một đoạn ADN lục lạp ở *S. nigrum* trong các cây biến nạp ở thế hệ R_1, R_2 (đoạn AND lục lạp này nằm giữa 2 gen *rps12* và 16S rRNA trong plasmid pSSH1 dùng cho biến nạp).

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

- Lá của các cây *N. plumbaginifolia* biến nạp và không biến nạp (thế hệ R_1, R_2) cũng như lá của cây *S. nigrum* nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* được sử dụng để tách AND lục lạp.

- Hạt của các cây *N. plumbaginifolia* biến nạp và không biến nạp (thế hệ R_1, R_2) được sử dụng để kiểm tra tính kháng streptomycin và spectinomycin của chúng.

2. Phương pháp

2.1. Thử tính kháng dựa trên khả năng nảy mầm của hạt (seedling test)

Hạt của các cây nhận được từ chuyển gen và cây đối chứng được vô trùng bằng cồn 70% và dung dịch 5% nước ven rồi xử lý trong nước có chứa 1mg/l gibberellin trong khoảng 1 giờ. Sau đó những hạt này được gieo trên môi trường cơ bản MS có chứa 500 mg/l spectinomycin và 500 mg/l streptomycin. Kết quả được đánh giá sau 3-4 tuần nuôi cấy.

2.2. Tách AND lục lạp

Lục lạp được tách từ những cây vô khuẩn nuôi cấy *in vitro* trong dung dịch có nồng độ các ion cao [2]. Tách và làm sạch AND lục lạp được tiến hành theo qui trình chuẩn của Sambrook và cộng sự (1989) [7].

2.3. Phản ứng PCR

Hai đoạn môi (primer), trong đó một môi có kí hiệu là:

SSP (5'-ACACTTCACCACGGAAC-3') đặc thù cho nghiên cứu ADN lục lạp của *S. nigrum*

CMP (5'-GGACCAATTTAGTCACG-3') được sử dụng như là môi ngược.

Cặp môi này có khả năng nhận một đoạn cpDNA (khoảng 800 bp) của *S. nigrum*.

Hỗn hợp phản ứng PCR với tổng số là 25 μ l bao gồm 1 μ M môi (mỗi loại), 0,5 μ l enzym polymeraza Taq, 2,5 μ l dung dịch đệm 10 lần (PCR buffer x10), 1,5 mM $MgCl_2$, 5 μ M dNTP mỗi loại và 50 ng AND lục lạp. Phản

ứng được thực hiện trên máy PCR (MJ Research Inc, USA) với 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 1 phút ở 94°C, 1 phút ở 55°C, 1 phút ở 72°C. Cuối cùng giữ 8 phút ở 72°C để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau khi kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarosa 1%, hiệu điện thế 80V trong thời gian 60 phút. Sau đó gel được nhuộm với ethidium bromide và xem điện di nhờ ánh sáng của đèn cực tím.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kiểm tra khả năng nảy mầm của hạt trên môi trường chọn lọc

Để kiểm tra tính kháng đồng thời cả streptomycin và spectinomycin (được quy định bởi 2 gen lục lạp rps12 và 16S rRNA của *S. nigrum*) có được duy trì ổn định trong các cây *N. plumbaginifolia* biến nạp qua một vài thế hệ hay không, chúng tôi đã gieo hạt của 4 dòng *N. plumbaginifolia* biến nạp (CT6-3.1.1, CT6-3.5.3, CT6-3.5.6 và CT6-3.6.2) ở thế hệ R₁ và hạt của cây *N. plumbaginifolia* không biến nạp trên môi trường MS [5] có bổ sung cả hai loại streptomycin và spectinomycin với nồng độ 0,5g/lit mỗi loại. Kết quả cho thấy, sau khoảng 4 tuần nuôi cấy, hạt của cây R₁ nảy mầm có màu xanh, trái lại hạt của cây đối chứng có nảy mầm nhưng bị bạch tạng hoàn toàn (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả kiểm tra khả năng nảy mầm của hạt trên môi trường chọn lọc (chứa 0,5 g/l streptomycin và 0,5 g/l spectinomycin)

Tên dòng	Tổng số hạt kiểm tra	Số hạt nảy mầm màu xanh	Số hạt nảy mầm bị bạch tạng	Số hạt không nảy mầm
Hạt R₁				
<i>N. plumbaginifolia</i> (không chuyển gen)	500	0 (0%)	481 (96,2%)	19 (3,8%)
CT ₆ -3.1.1	500	485 (97%)	0 (0%)	15 (3%)
CT ₆ -3.5.3	500	472 (94,4%)	0 (0%)	28 (5,6%)
CT ₆ -3.5.6	500	479 (95,8%)	0 (0%)	21 (4,2%)
CT ₆ -3.6.2	500	467 (93,4%)	0 (0%)	33 (6,6%)
Hạt R₂				
<i>N. plumbaginifolia</i> (không chuyển gen)	500	0 (0%)	487 (97,4%)	13 (2,6%)
CT ₆ -3.1.1	500	489 (97,8%)	0 (0%)	11 (2,2%)
CT ₆ -3.5.3	500	468 (93,6%)	0 (0%)	32 (6,4%)
CT ₆ -3.5.6	500	482 (96,4%)	0 (0%)	18 (3,6%)
CT ₆ -3.6.2	500	474 (94,8%)	0 (0%)	26 (5,2%)

Số liệu ở bảng 1 còn cho thấy hầu hết hạt của cả cây biến nạp và không biến nạp đều nảy mầm với tỷ lệ khá cao. Tuy nhiên có một số hạt không nảy mầm, điều này theo chúng tôi có thể những hạt này bị lép hoặc chưa đủ già nên không có khả năng nảy mầm được.

Tương tự như vậy, những hạt nhận được từ 4 dòng *N. plumbaginifolia* biến nạp (CT6-3.1.1, CT6-3.5.3, CT6-3.5.6 và CT6-3.6.2) ở thế hệ R₂ và hạt của cây *N. plumbaginifolia* không biến nạp cũng đã được đưa lên môi trường MS có bổ sung cả hai loại streptomycin và spectinomycin với nồng độ 0,5g/lit mỗi loại để kiểm tra khả năng kháng cả 2 loại kháng sinh này. Kết quả nhận được cũng tương tự với trường hợp khi thử với hạt của thế hệ R₀ và R₁, tức là hạt của những dòng biến nạp nảy mầm có màu xanh còn hạt của cây đối chứng nảy mầm bị bạch tạng (bảng 1).

Hai loại kháng sinh streptomycin và spectinomycin có khả năng ức chế quá trình tổng hợp protein ở lục lạp, làm cho cây mất khả năng lục hóa, vì vậy nhiều tác giả đã sử dụng những đột biến kháng kháng sinh như là những đặc điểm chỉ thị lục lạp để chọn lọc các thể lai lục lạp trong các thí nghiệm dung hợp hoặc chuyển gen lục lạp [4,9,6].

Như vậy từ những kết quả nhận được trong thí nghiệm của chúng tôi đã chứng tỏ tính kháng hai loại kháng sinh trên (được quy định bởi 2 gen lục lạp của *S. nigrum*) đã được biểu hiện khá ổn định tới thế hệ R₂ trong các cây thuốc lá biến nạp gen lục lạp.

2. Nghiên cứu LpADN của những cây biến nạp

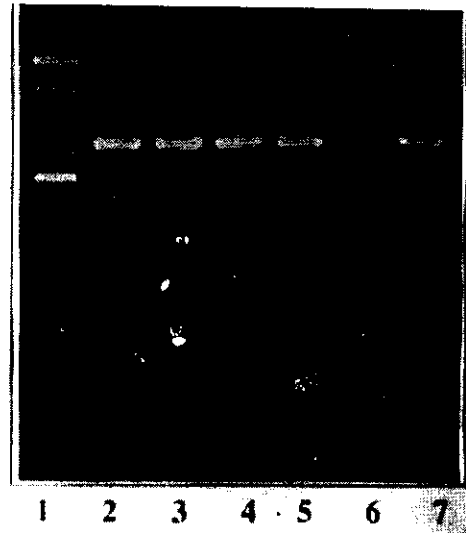
Để chứng minh sự có mặt của đoạn AND lục lạp của *S. nigrum* trong các cây *N. plumbaginifolia* biến nạp có được duy trì ổn định qua các thế hệ R₁ và R₂ hay không, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc thù cho *S. nigrum* trong phân tích AND lục lạp của 4 cây biến nạp ở thế hệ R₁ và R₂ (CT6-3.1.1, CT6-3.5.3, CT6-3.5.6, CT6-3.6.2), cây *N. plumbaginifolia* không biến nạp và cây *S. nigrum* mang gen đột biến kháng spectinomycin và streptomycin. Sau khi tiến hành phản ứng PCR với đoạn mồi đặc thù cho *S. nigrum* và phân tích các sản phẩm PCR trên gel agarosa, chúng tôi nhận thấy trên điện di đồ xuất hiện duy nhất những băng khoảng 800 cặp bazơ ở các mẫu AND lục lạp của cây *S. nigrum* và những dòng biến nạp. Trái lại ở cây *N. plumbaginifolia* đối chứng thì không thấy xuất hiện băng này (hình 1). Băng có chiều dài khoảng 800 cặp bazơ này nằm giữa đầu 3' của gen 12 rps (kháng streptomycin) và đầu 5' của gen 16S rRNA (kháng spectinomycin) trong đoạn ADN lục lạp của *S. nigrum*. Như vậy kết quả nhận được của chúng tôi đã cho thấy ở cả 4 dòng biến nạp được nghiên cứu đã mang đoạn AND lục lạp (khoảng 800 cặp bazơ) của cây *S. nigrum* ổn định tới thế hệ R₂, còn ở cây *N. plumbaginifolia* không biến nạp thì không mang đoạn ADN lục lạp này.

2072 bp

1500 bp

600 bp

100 bp



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN lục lạp tách từ *S. nigrum* (7), *N. plumbaginifolia* không biến nạp (6) và các cây *N. plumbaginifolia* biến nạp ở thế hệ R₂ (2,3,4,5). Chỉ thị phân tử ADN bậc 100 bp (1).

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nhận được qua thực nghiệm, chúng tôi rút ra một số nhận xét sau: Tính kháng hai loại kháng sinh streptomycin và spectinomycin (được quy định bởi 2 gen lục lạp rps12 và 16S rRNA của *S. nigrum*) đã được biểu hiện khá ổn định qua các thế hệ R₁, R₂ trong các cây thuốc lá biến nạp gen lục lạp. Đồng thời một đoạn AND lục lạp (khoảng 800 bp) nằm giữa 2 gen rps12 và 16S rRNA của *S. nigrum* cũng đã được duy trì ổn định tới thế hệ R₂ trong các cây thuốc lá biến nạp lục lạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Thành, Nghiêm Ngọc Minh, Lê Thị Muội, 1998. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học (Annual Report) 1997. Nhà xuất bản KHKT. Trang 239-245.
2. Bookns G., Stumman B.M., Henningsen K.W., 1984. Anal Biochem. 141, pp. 244-247.
3. Golds T., Maliga P., and Koop H.U., 1993. Bio/Technology 11, pp. 95-97.
4. Medgyesy P., Menczel L. and Maliga P., 1980. Mol. Gene. Genet. 179, pp. 639-698.
5. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, pp. 473-497.
6. O'Neil C., Horvath G.B., Horvath E., Dix P., Medgyesy P., 1993. The Plant Journal. 3(5), pp. 729-738.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor, New York.
8. Syab Z., Hajdukiewitz P., and Maliga P., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, pp. 8526-8530.
9. Thanh N.D., Páy A., Smith M.A., Medgyesy P., Márton L., 1988. Mol. Gen. Genet. 213, pp. 186-190.
10. Weber G., Monajemb S., Greulich K.O., and Wolfrum J., 1989. Eur. J. Cell 49, pp. 73-79.
11. Whifeld P.R., Bottomley W., 1983. Annü. Rev. Plant. Physiol. 34, pp. 279-310.

