

Tạp chí Công nghệ Sinh học **15**(3): 489-495, 2017

## THIẾT KẾ CẤU TRÚC NHẪM TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PEROXIDASE Ở CÂY DỪA CẠN (*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON) CHUYỂN GEN

Bùi Thị Hà<sup>1</sup>, Đào Thị Nhâm<sup>2</sup>, Hoàng Ngọc Anh<sup>2</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>3</sup>, Lê Văn Sơn<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Tâm<sup>2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>2, ✉</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Trường Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: [chuoangmau@tnu.edu.vn](mailto:chuoangmau@tnu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 24.3.2017

Ngày nhận đăng: 20.9.2017

### TÓM TẮT

Dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là loài cây dược liệu quý có khả năng sản xuất alkaloid có giá trị dược liệu cao, trong đó vinblastine và vincristine có tác dụng điều trị ung thư máu, tuy nhiên hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn rất thấp. Peroxidase là enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp các terpenoid alkaloid indole (TIA) ở cây dừa cạn, có chức năng xúc tác trong phản ứng tạo tiền chất cho sự tổng hợp vinblastine và vincristine. Nghiên cứu biểu hiện mạnh gen mã hóa peroxidase (*CrPrx*) để tăng cường hoạt động của peroxidase nhằm cải thiện hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn được chúng tôi quan tâm. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen chứa cấu trúc mang gen *CrPrx* phân lập từ cây dừa cạn. Vector chuyển gen pBI121-*CrPrx* được thiết kế từ kỹ thuật thu nhận gen *CrPrx* từ vector tái tổ hợp pBT-*CrPrx*, tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3-*CrPrx*, thu nhận cấu trúc *CrPrx*-*myc*-KDEL, ghép nối tạo vector chuyển gen pBI121-*CrPrx*. Vector chuyển gen pBI121-*CrPrx* được dòng hóa trong *A. tumefaciens* và lây nhiễm vào dừa cạn qua nách lá mầm. Trong 666 mẫu biến nạp có 197 mẫu tạo chồi, 65 mẫu có chồi kéo dài trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh kanamycin, thu được 15 cây T0 phát triển trên giá thể và 7 cây dừa cạn chuyển gen ở thể hệ T0 cho kết quả PCR nhân bản đoạn promoter 35S. Kết quả thiết kế cấu trúc mang gen chuyển hoàn chỉnh (cassette) và tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa sẽ quyết định sự thành công của kỹ thuật tạo cây dừa cạn biến đổi gen có hàm lượng alkaloid cao.

**Từ khóa:** *CaMV35S*, *Catharanthus roseus*, gen *CrPrx*, vector chuyển gen, vinblastine, vincristine.

### MỞ ĐẦU

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong những cây có khả năng sản xuất các indol alkaloid với dược tính quan trọng trong bào chế các loại thuốc chống ung thư, đặc biệt là ung thư máu (Johnson *et al.*, 1963; Noble, 1990; Graf *et al.*, 1996). Trong các indol alkaloid có mặt trong cây dừa cạn, vinblastine và vincristine được sử dụng nhiều nhất, nhưng lại có hàm lượng rất thấp (Noble, 1990; Zhu *et al.*, 2015). Các hợp chất này không thể tổng hợp bằng con đường hóa học do có cấu trúc rất phức tạp. Do vậy, nâng cao hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn theo hướng công nghệ gen là một hướng nghiên cứu được quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới.

Trong cây dừa cạn, peroxidase là enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp các terpenoid alkaloid indole (TIA) ở cây dừa cạn, có chức năng xúc tác trong phản ứng tạo tiền chất cho sự tổng hợp vinblastine và vincristine, trong đó vinblastine và vincristine được tạo ra từ sự kết hợp của catharanthine và vindoline (Aerts *et al.*, 1992; Sottomayor *et al.*, 2004). Nghiên cứu tác động làm tăng hoạt độ của peroxidase để cải thiện được hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn được các nhà khoa học quan tâm. Tiếp cận tăng cường biểu hiện gen mã hóa peroxidase (*CrPrx*) trong cây dừa cạn bằng kỹ thuật chuyển gen là mục tiêu của nghiên cứu này. Tiếp theo kết quả phân lập gen *CrPrx* từ mRNA của cây dừa cạn (Bùi Thị Hà *et al.*, 2014; Bui *et al.*, 2015), bài báo này trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen phục vụ chuyển gen

*CrPrx* vào cây dừa cạn trong mục đích nâng cao hàm lượng vinblastine và vincristine.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vector tái tổ hợp pBT-*CrPrx* do Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên cung cấp. Vector pTRA7/3, vector pBI121, các chủng khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  và *A. tumefaciens* EHA105 mang gen *GUS* do Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Sử dụng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CrPrx*-*NcoI/CrPrx*-*NotI* (Bảng 1) để kiểm tra gen chuyển trong vector và trong vi khuẩn; cặp mồi 35S-F/35S-R (Bảng 1) sử dụng cho PCR kiểm tra cấu trúc mang gen chuyển trên cây dừa cạn chuyển gen. Chu trình nhiệt của PCR là 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ: (94°C/1 phút, 58°C/1 phút và 72°C/1 phút 30 giây); 72°C/7 phút và 4°C:  $\infty$ . Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Vector chuyển gen *CrPrx* được thiết kế theo các

bước sau: (1) Thu nhận gen *CrPrx* từ vector tái tổ hợp pBT-*CrPrx*; (2) Cắt mở vòng vector pRTRA7/3 và ghép nối gen *CrPrx* tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3-*CrPrx*; (3) Thu nhận cấu trúc *CrPrx*-*cmcy*-*KDEL* từ vector tái tổ hợp pRTRA7/3-*CrPrx*; (4) Mở vòng vector chuyển gen pBI121 và ghép nối cấu trúc *CrPrx*-*cmcy*-*KDEL* vào pBI121 tạo vector chuyển gen chứa cấu trúc 35S-*CrPrx*-*cmcy*-*KDEL*; (5) Biến nạp pBI121-*CrPrx* vào *A. tumefaciens* EHA105 và chọn dòng *A. tumefaciens* EHA105 tái tổ hợp bằng colony-PCR.

Chuyển cấu trúc pBI121-*CrPrx* qua nách lá mầm dừa cạn nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành quy trình đã công bố (Bùi Thị Hà *et al.*, 2016). Hạt dừa cạn nảy mầm 10-15 ngày tuổi tiến hành thu lá mầm sử dụng làm vật liệu nhận gen, nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp ở OD<sub>600nm</sub> = 0,8 vào lá mầm đã gây tổn thương trong thời gian 30 phút, nồng độ acetosyringone là 100 $\mu$ M. Tái sinh cây dừa cạn chuyển gen trong môi trường chọn lọc bởi kanamycin ở nồng độ 50 mg/l. Kiểm tra sự có mặt của cấu trúc mang gen chuyển trong cây dừa cạn chuyển gen bằng PCR với cặp mồi 35S-F/35S-R.

**Bảng 1.** Trình tự nucleotide của các cặp mồi.

Cặp mồi	Trình tự nucleotide 5' → 3'	Kích thước đoạn DNA (bp)
<i>CrPrx</i> - <i>NcoI/CrPrx</i> - <i>NotI</i>	CATGCCATGGTAGGCTTCCAAAACCTCTCTTCT ATTTGCGGCCATGTAAGTATTAGCTACATTA	993
35S-F/35S-R	CACGACACACTTGTCTAC TCACATCAATCCACTTGCT	314

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Thu nhận gen *CrPrx* từ vector tách dòng pBT và tạo vector tái tổ hợp chứa cấu trúc 35S-*CrPrx*-*cmcy*-*KDEL*

Vector tách dòng pBT-*CrPrx* được cắt bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* (Hình 1A), kết quả tạo ra hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1 kb và 2,7 kb, trong đó phân đoạn DNA 1 kb chính là gen *CrPrx* cần thu nhận (Hình 1B). Ở giếng số 1 khi chưa cắt chỉ có 1 băng duy nhất kích thước khoảng 3,7 kb. Sau đó, tiến hành tinh sạch băng DNA có kích thước 1,0 kb và điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1% cùng marker. Kết quả thu được 1 băng điện di duy nhất 1 kb đúng với kích thước của gen *CrPrx* (Hình 1C).

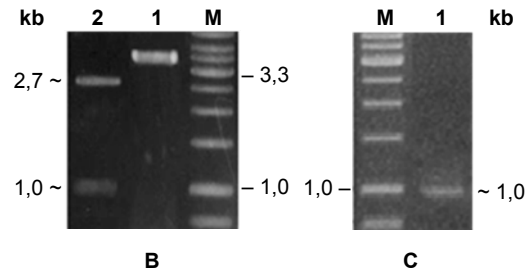
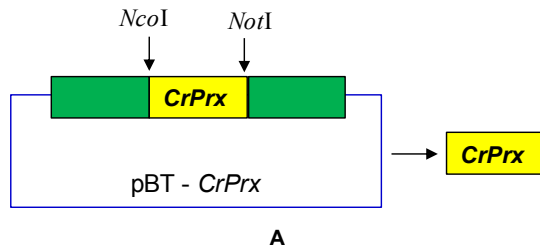
Sản phẩm tinh sạch được giải trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *CrPrx* phân lập từ mRNA

cây dừa cạn hoa hồng tím, kết quả cho thấy sản phẩm PCR có số lượng nucleotide là 993 và là đoạn gen *CrPrx* của dừa cạn được chúng tôi đã phân lập từ mRNA và công bố tại Ngân hàng Gen mang mã số LN809932 (Bui *et al.*, 2015).

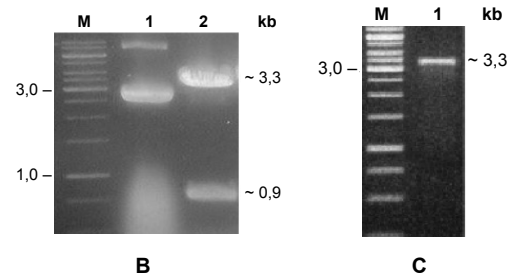
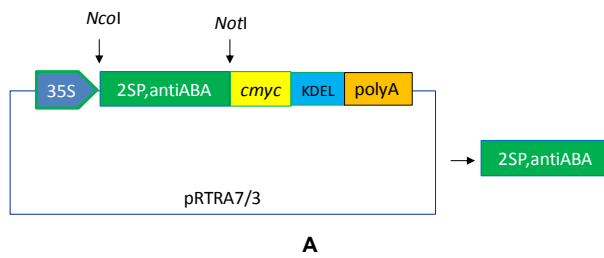
Vector pRTRA7/3 có hai điểm cắt của enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI* và theo tính toán khi sử dụng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* cắt vector pRTRA7/3 sẽ thu được hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 0,9 kb (là đoạn 2SP và antiABA) và 3,3 kb (kích thước của vector pRTRA7/3) (Hình 2A). Trong đó, phân đoạn 3,3 kb chính là đoạn pRTRA7/3 đã mở vòng. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt ở hình 2B đúng như dự đoán. Phân đoạn có kích thước 3,3 kb được tinh sạch để thu nhận cấu trúc mở vòng của pRTRA7/3 (Hình 2C). Thí nghiệm gắn gen *CrPrx* vào pRTRA7/3 tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3-*CrPrx* chứa cấu trúc 35S-*CrPrx*-*cmcy*-*KDEL* (Hình 3A).

Vector pRTRA7/3-CrPrx được nhân dòng trong *E. coli* DH5 $\alpha$  và được kiểm tra bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu CrPrx-NcoI/CrPrx-NotI, kết quả cho thấy 4/5 dòng khuẩn lạc xuất hiện băng DNA đặc hiệu

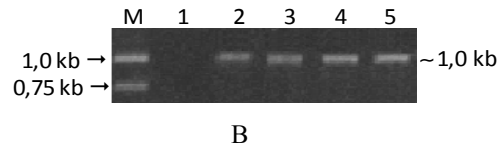
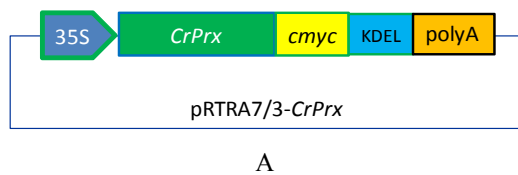
khoảng 1,0 kb tương ứng với kích thước của gen CrPrx (Hình 3B). Các dòng khuẩn lạc dương tính với colony-PCR được chọn lọc và tách plasmid tái tổ hợp để thu nhận cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL.



**Hình 1.** A- Sơ đồ thu nhận gen CrPrx từ vector tái tổ hợp pBT-CrPrx. B- Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt vector pBT-CrPrx bằng NcoI/NotI (1- Plasmid pBT-CrPrx không xử lý bằng enzyme; 2- Plasmid pBT-CrPrx sau khi xử lý bằng enzyme NcoI/NotI). C- Sản phẩm tinh sạch gen CrPrx (1- gen CrPrx tinh sạch; M: thang DNA 1kb).



**Hình 2.** A- Sơ đồ cắt vector pRTRA7/3 bằng cặp enzyme NcoI/NotI. B- Sản phẩm điện di kiểm tra sản phẩm cắt vector pRTRA7/3 bằng NcoI/NotI: 1- Plasmid pRTRA7/3 không xử lý bằng enzyme; 2- Plasmid pRTRA7/3 sau khi xử lý bằng cặp enzyme NcoI/NotI; C- Sản phẩm tinh sạch vector pRTRA7/3: M- Thang DNA 1kb; 1- Vector pRTRA7/3 tinh sạch.



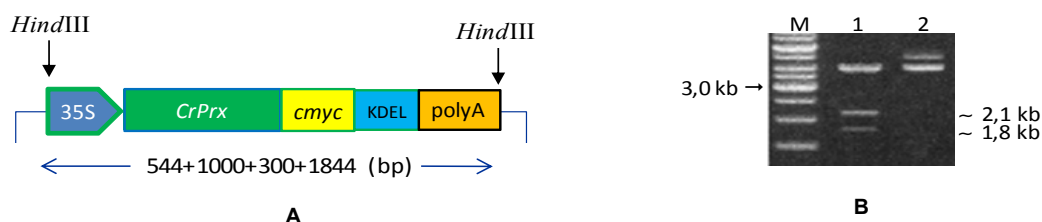
**Hình 3.** Sơ đồ cấu trúc vector pRTRA7/3-CrPrx (A) và kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng khuẩn lạc chứa pRTRA7/3-CrPrx (B). M: thang DNA 1kb; 1 - 5: Các dòng khuẩn lạc.

### Thu nhận cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL-polyA và cắt mở vòng pBI121

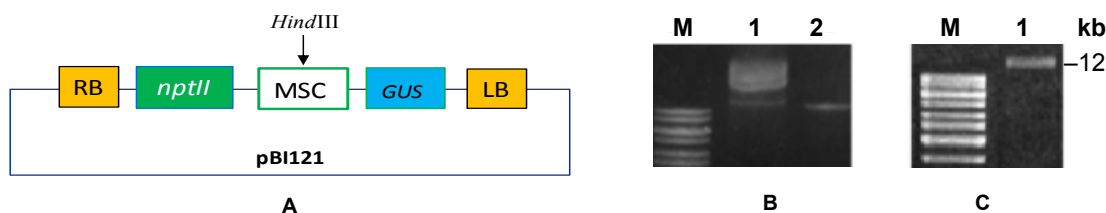
Xử lý vector pRTRA7/3-CrPrx bằng HindIII thu nhận được cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL-polyA có kích thước 1844 bp và phần còn lại của vector pRTRA7/3 có kích thước 2156 bp. Điện di kiểm tra sản phẩm cắt trên agarose (Hình 4B) nhận được 3 băng DNA trong đó 2 băng có kích thước khoảng 1,8 và 2,2 kb tương ứng với kích thước tính toán. Băng

DNA trên cùng có kích thước khoảng 4,0 kb tương ứng với kích thước của pRTRA7/3-CrPrx. Băng có kích thước khoảng 1,8 kb được tinh sạch để thu nhận cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL-polyA.

Vector pBI121 chứa vùng MCS có một điểm cắt của enzyme HindIII (Hình 5A), kết quả cắt mở vòng pBI121 thu được một băng DNA khoảng 12,0 kb (Hình 5B). Plasmid pBI121 được tinh sạch phục vụ tạo vector chuyển gen (Hình 5C).



**Hình 4.** Sơ đồ cắt plasmid pRTRA7/3-CrPrx bằng *HindIII* (A) và điện di kiểm tra sản phẩm cắt thu nhận cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL-polyA (B). M: thang DNA 1 kb; 1: sản phẩm cắt bởi *HindIII*; 2: plasmid không cắt bởi *HindIII*

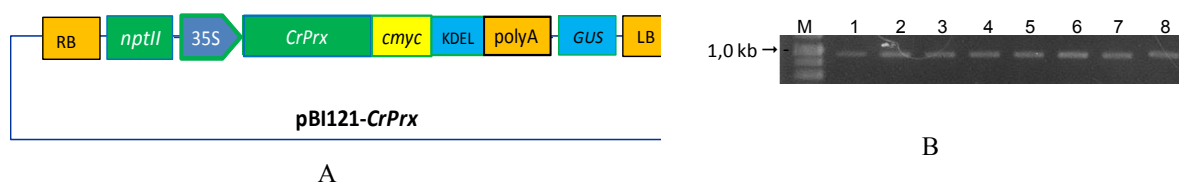


**Hình 5.** A- Sơ đồ vector pBI121 (A); B- Điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid vector pBI121 bằng *HindIII*. 1- Plasmid pBI121 không xử lý bằng enzyme (đối chứng); 2- Plasmid pBI121 sau khi xử lý bằng enzyme *HindIII*. C- Điện di kiểm tra sản phẩm tinh sạch vector pBI121. M: thang DNA 1kb, 1: Vector pBI121 tinh sạch

**Tạo vector chuyển gen pBI121-CrPrx và chọn dòng *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen *CrPrx***

Ghép nối cấu trúc 35S-CrPrx-cmyc-KDEL-polyA vào vector pBI121 bằng cách sử dụng T4 ligase tạo vector chuyển gen pBI121-CrPrx (Hình 6A). Sản phẩm tái tổ hợp được biến nạp vào *E.coli* DH5α và được chọn dòng bằng colony-PCR với cặp

mồi *Prx-NcoI/Prx-NotI* để chọn dòng khuẩn lạc tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp mang gen *CrPrx* tách từ sinh khối vi khuẩn *E.coli* DH5α được biến nạp vào *A. tumefaciens* EHA105 bằng kỹ thuật xung điện. Chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-CrPrx bằng colony-PCR thu được cả 8 dòng khuẩn lạc cho kết quả có một băng điện di DNA kích thước khoảng 1,0 kb, ứng với kích thước của gen *CrPrx* (Hình 6B).



**Hình 6.** A. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121-CrPrx. LB: bờ trái của T-DNA;RB: bờ phải của T-DNA; nptII: gen kháng kanamycin;35S: promoter CaMV35S. B- Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens*. M: thang DNA 1 kb; 1-8 các dòng khuẩn lạc.

**Tạo cây dừa cạn chuyển gen mang cấu trúc pBI121-CrPrx**

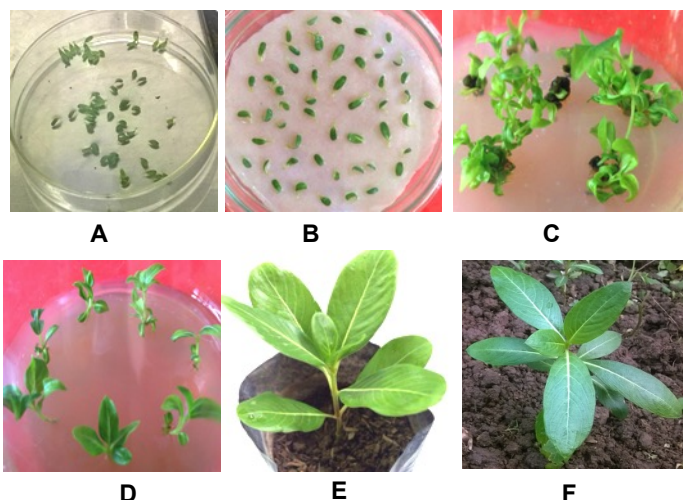
Tiến hành chuyển cấu trúc pBI121-CrPrx vào dừa cạn qua nách lá mầm (Bùi Thị Hà *et al.*, 2016), kết quả trình bày ở hình 7 và bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, ở lô thí nghiệm với 666 mẫu

biến nạp đã thu được 197 mẫu tạo chồi, 65 mẫu có chồi kéo dài trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh kanamycin, 40 chồi ra rễ khỏe mạnh và thu được 15 cây T0 phát triển trên giá thể. Trong khi đó ở lô ĐC0, lá mầm dừa cạn không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh bổ sung kháng sinh chọn lọc, các lá mầm đều bị chết bởi kháng sinh và ở lô

ĐC1, lá mầm dừa cạn không chuyển gen cây trên môi trường tái sinh không có kháng sinh chọn lọc thu được 5 cây tái sinh không chuyển gen sử dụng làm đối chứng. Các cây dừa cạn chuyển gen ở T0 được chuyển ra trồng, chăm sóc ngoài môi trường tự nhiên và khi được 4 tuần thì tiến hành thu mẫu lá để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *CrPrx* trong cây

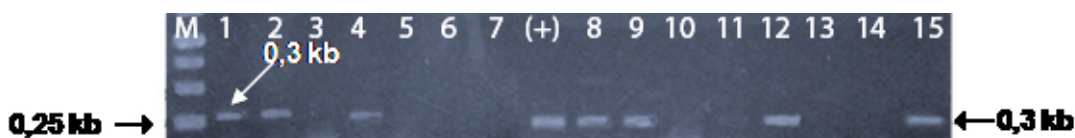
chuyển gen. Gen *CrPrx* của dừa cạn là gen có cấu trúc liên tục, không có intron, do vậy để kiểm tra cấu trúc mang gen chuyển *CrPrx* trong cây dừa cạn chuyển gen, PCR với cặp mồi 35S-F/35S-R được sử dụng nhân bản đoạn promoter 35S ở 15 cây dừa cạn chuyển gen, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,0 % được thể hiện ở hình 8.



**Hình 7.** Biến nạp cấu trúc pBI121-*CrPrx* qua nách lá mầm hạt dừa cạn và tạo cây dừa cạn chuyển gen *CrPrx*. A: Ngâm mảnh lá mầm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens*; B: Mảnh lá mầm nhiễm khuẩn trên môi trường đồng nuôi cấy CCM; C: Đa chồi từ nách lá mầm; D: Kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc kanamycin; E: Cây dừa cạn chuyển gen trồng trên giá thể; F: Cây chuyển gen trồng trong vườn thí nghiệm.

**Bảng 2.** Thống kê số lượng các mẫu chuyển gen vào cây dừa cạn.

	Số mảnh lá	Số mẫu tạo chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây sống trên giá thể
Lô thí nghiệm	666	197	65	40	15
ĐC0 <sup>+</sup>	30	0	0	0	0
ĐC1 <sup>+</sup>	30	18	13	10	5



**Hình 8.** Sản phẩm PCR xác định sự có mặt của đoạn promoter 35S của cấu trúc mang gen chuyển *crPrx* trong các cây dừa cạn chuyển gen. M: thang DNA 1kb; 1-7, 8-15: sản phẩm PCR các cây chuyển gen; (+): sản phẩm PCR 35S promoter.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn 35S trên hình 8 cho thấy băng DNA có kích thước khoảng 0,3 bp xuất hiện ở lần chạy số 1, 2, 4, 8, 9, 12, 15 tương ứng kích thước của đoạn promoter 35S và xuất hiện ngang với vị trí của băng DNA ở lần điện di đối chứng dương (sản phẩm PCR đoạn promoter 35S). Kết quả PCR nhân bản đoạn promoter 35S đã chỉ ra rằng cấu trúc mang gen chuyển *CrPrx* trong vector tái tổ hợp pBI121-*CrPrx* đã được chuyển

thành công vào cây dừa cạn và tạo được 7 dòng cây dừa cạn chuyển gen ở thế hệ T0. Các dòng dừa cạn chuyển gen *CrPrx* được ký hiệu là DT01, DT02, DT04, DT08, DT09, DT012, DT015. Hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn này đạt  $7/666 = 1,05\%$ .

Vector pBI121-*CrPrx* mà chúng tôi thiết kế chứa cấu trúc 35S-*CrPrx*-cmyc-KDEL-polyA, gen *nptII* kháng kanamycin 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. 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 tất cả 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 *CrPrx* nhằm tăng cường sinh tổng hợp peroxidase. 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 Real-time RT-PCR, Western blot. Promoter *CaMV35S* trong vector chuyển gen pCB301-*GmEXPI* đã tăng cường 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2015). Theo hướng tạo cây chuyển gen kháng virus theo cơ chế RNAi, Thu *et al.* (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-*CrPrx* chứa promoter *CaMV35S* mà chúng tôi đã thiết kế trong mục đích tăng cường biểu hiện gen *CrPrx* phân lập từ cây dứa cạn sẽ được chứng minh trong các thí nghiệm chuyển gen ở cây dứa cạn.

## KẾT LUẬN

Vector chuyển gen pBI121-*CrPrx* được thiết kế từ kỹ thuật thu nhận gen *CrPrx* từ vector tái tổ hợp pBT-*CrPrx*, tạo vector tái tổ hợp pRTA7/3-*CrPrx*, thu nhận cấu trúc *CrPrx*-cmv-KDEL, ghép nối tạo vector chuyển gen pBI121-*CrPrx*. Vector chuyển gen pBI121-*CrPrx* được dòng hóa trong *A. tumefaciens* và lây nhiễm vào dứa cạn qua nách lá mầm. Trong 666 mẫu biến nạp có 197 mẫu tạo chồi,

65 mẫu có chồi kéo dài trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh kanamycin, thu được 15 cây T0 phát triển trên giá thể và 7 cây dứa cạn chuyển gen ở thế hệ T0 cho kết quả PCR nhận bản đoạn promoter 35S. Kết quả thiết kế cấu trúc mang gen chuyển hoàn chỉnh và tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa sẽ quyết định sự thành công của kỹ thuật tạo cây dứa cạn biến đổi gen có hàm lượng alkaloid cao.

## LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện bằng một phần kinh phí đề tài cán bộ hướng dẫn và kinh phí đào tạo của Bộ GD&ĐT dành cho nghiên cứu sinh. Quá trình thực nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm khoa sinh học, trường đại học sư phạm Thái Nguyên và Phòng ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aerts RJ, Stoker A, Beishuizen M, van de Heuvel M, van der Meijden E, Verpoorte R (1992) Detrimental effects of Cinchona leaf alkaloids on larvae of the polyphagous insect *Spodoptera exigua*. *J Chem Ecol*. 18: 1955–1964.
- Bùi Thị Hà, Lương Thanh Huyền, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2014) Tách dòng phân tử gen mã hóa peroxidase từ hai giống dứa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) tại Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 129(15): 103-108.
- Bùi Thị Hà, Đỗ Huy Hoàng, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2016) Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen ở cây dứa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 157(12/1): 71-75.
- Bùi HT, Lương HT, Nguyễn TT, Chu MH (2015) *Catharanthus roseus* mRNA for peroxidase (prx gene), isolate TN1 (Pink-purple flower). *GenBank* LN809932.
- Dao Xuan Tan, Ho Manh Tuong, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son, and Chu Hoang Mau (2015) Cloning and overexpression of *GmDREB2* gene from a Vietnamese drought-resistant soybean variety. *Braz Arch Biol Technol* 58(5): 651–657.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP (1963) The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Research* 23: 1390–1427.
- Graf WD, Chance PF, Lensch MW, Eng LJ, Lipe HP, Bird TD (1996) Severe Vincristine Neuropathy in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Cancer* 77(7): 1356–1362.
- Lo Thi Mai Thu, Vi Thi Xuan Thuy, Le Hoang Duc, Le Van Son, Chu Hoang Ha, Chu Hoang Mau (2016) RNAi-mediated resistance to SMV and BYMV in transgenic

tobacco. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 213–218.

Noble RL (1990) The discovery of the vinca alkaloids - chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol* 68(12): 1344–51.

Sottomayor M, Lopes Cardoso I, Pereira LG, Ros Barcelo A (2004) Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem Rev* 3: 159–171.

Thanh Son LO, Hoang Duc LE, Vu Thanh Thanh NGUYEN, Hoang Ha CHU, Van Son LE, Hoang Mau CHU (2015) Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco. *Turk J Bot* 39: 988–995.

Zhu JH, Wang MX, Wen W, Yu RM (2015) Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Pharmacogn Rev* 9(17): 24–28.

## DESIGNING STRUCTURE TO OVEREXPRESS GENE ENCODING PEROXIDASE IN TRANSGENIC PERIWINKLE PLANT (*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON)

**Bui Thi Ha<sup>1</sup>, Dao Thi Nham<sup>2</sup>, Hoang Ngoc Anh<sup>2</sup>, Ho Manh Tuong<sup>3</sup>, Le Van Son<sup>3</sup>, Nguyen Thi Tam<sup>2</sup>, Chu Hoang Mau<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen University*

<sup>2</sup>*Thai Nguyen University of Education, Thai Nguyen University*

<sup>3</sup>*Institute of Biotechnology, Viet Nam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) is a precious medicinal plant which produces alkaloid of high medicinal importance. Two substances, vinblastine and vincristine, have effective treatment for blood cancer, however, their content in this plant is very low. Peroxidase is a key enzyme involving the pathways of biosynthesis of terpenoid indole alkaloids (TIAs) in periwinkle and has catalytic function in the reaction to form precursors to vinblastine and vincristine synthesis. Research on overexpression of gene encoding peroxidase (*CrPrx*) to enhance the activity of peroxidase to improve vinblastine and vincristine content in periwinkle was our interest. In this paper we present results of design of the transgenic vector carrying *CrPrx* transgene structure isolated from periwinkle plants. Transgenic vector pBI121-*CrPrx* was designed from the *CrPrx* gene which was received from the pBT-*CrPrx* recombinant vector, created pRTRA7/3-*CrPrx* recombinant vector. Structure *CrPrx*-myc-KDEL received from pRTRA7/3-*CrPrx*, created pBI121-*CrPrx* transgenic vector. pBI121-*CrPrx* transgenic vector was cloned in *A. tumefaciens* and infection through the cotyledonary node by *Agrobacterium*. Of the 666 transformed samples, there were 197 samples generated bud and 65 specimens with prolonged buds on selective media with kanamycin and obtained 15 transgenic plants in T0 generation, and 7 transgenic plants in T0 generation obtained amplified results of 35S promoter segment by PCR. Results of complete transgenic cassette design and the overexpression of genes encoding for key enzymes will determine the success of the technique to create transgenic periwinkle plants with high alkaloid content.

**Keywords:** *CaMV35S, Catharanthus roseus, CrPrx gene, transgenic vector, vinblastine and vincristine*