

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TĂNG CƯỜNG TÍCH LŨY TINH BỘT Ở CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN *AGPS* VÀ *AGPL* MÃ HÓA ENZYME *AGPASE* Ở CÂY SẴN

Nguyễn Văn Đoàn¹, Nguyễn Minh Hồng², Lê Thu Ngọc¹, Nguyễn Thị Thơm¹, Nguyễn Đình Trọng¹, Vũ Huyền Trang¹, Nguyễn Thị Thuý Hương¹, Phạm Thị Vân¹, Phạm Bích Ngọc¹

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

²Trường Đại học Hồng Đức, Thanh Hoá

Ngày nhận bài: 03.4.2016

Ngày nhận đăng: 30.6.2016

TÓM TẮT

Enzyme *AGPase* là một trong những enzyme quan trọng, xúc tác cho bước đầu tiên trong quá trình tổng hợp tinh bột và đã được chứng minh là enzyme điều hòa, điều chỉnh tốc độ phản ứng của toàn bộ chu trình sinh tổng hợp glycogen ở vi khuẩn và tinh bột ở thực vật. Ở thực vật bậc cao, *AGPase* được xác định là enzyme dị lập thể, được cấu tạo bởi hai tiểu phần lớn (*AGPL*) và hai tiểu phần nhỏ (*AGPS*) do hai gen tương ứng mã hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập hai gen mã hóa cho tiểu phần lớn và tiểu phần nhỏ của *AGPase* từ giống sắn KM140. Hai gen được nối với nhau bằng trình tự *P2a* và được biểu hiện đồng thời trên một khung đọc mở dưới sự điều khiển của promoter *CaMV* 35S. Cấu trúc này được chèn vào vector pBI121 và được biến nạp vào cây thuốc lá bằng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*. Cây chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR, Western blot và định lượng hàm lượng tinh bột bằng phương pháp Anthrone. Kết quả đã cho thấy hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá cây chuyển gen cao hơn các cây đối chứng từ 13-116% trong cùng điều kiện nuôi dưỡng. Nghiên cứu của chúng tôi tạo ra thêm một hướng tiếp cận trong việc tạo cây trồng biến đổi gen tăng cường khả năng tích lũy tinh bột.

Từ khóa: *AGPase*, *AGPS*, *AGPL*, chuyển gen, *P2a*, tinh bột, thuốc lá, sắn

GIỚI THIỆU

Tinh bột là một glucan không tan, được cấu thành từ hai chuỗi polymer bao gồm các tiểu phần là glucose, amylopectin và amylose. Ở thực vật bậc cao, tinh bột được tổng hợp trong plastid (thể lạp) của cả tế bào quang hợp và không quang hợp. Là carbohydrate dự trữ chủ yếu, tinh bột đóng vai trò quan trọng trong suốt chu kỳ sống của thực vật. Trong lá, một phần nhỏ carbon đồng hóa thông qua quang hợp được giữ lại trong các lục lạp ở dạng tinh bột chứ không được chuyển đổi thành sucrose để vận chuyển đến các bộ phận khác. Dạng tinh bột tạm thời này sẽ được phân hủy vào ban đêm để cung cấp cơ chất cho quá trình hô hấp ở lá và tiếp tục tổng hợp sucrose cho việc phát triển khác của cây. Trong các cơ quan không diễn ra quá trình quang hợp như thân, rễ, củ và hạt, sucrose có thể được chuyển đổi thành tinh bột dự trữ trong một loại plastid chuyên biệt gọi là amyloplast. Tinh bột lưu trữ được tái sử dụng để hỗ trợ giai đoạn phát triển

khác của cây (Martin, Smith, 1995).

Quá trình tổng hợp tinh bột α -1,4 glucan bao gồm ba bước quan trọng xảy ra trong lục lạp và thể vô sắc. Bước đầu tiên là sự tổng hợp ADPG từ Glc-1-P và ATP được xúc tác bởi ADP-glucose pyrophosphorylase (*AGPase*). Một khi được hoạt hóa, enzyme tổng hợp tinh bột (starch synthase - SS) chuyển ADPG tới đầu không khử của α -1,4 glucan để tạo thành các sợi α -1,4 glucan. Tiếp theo, các sợi α -1,4 glucan được dùng như là các cơ chất cho các enzyme phân nhánh của tinh bột (BE hoặc Q-enzyme) tạo ra các liên kết sợi α -1,6 là amylopectin. Cuối cùng amylopectin được tinh thể hóa tạo thành tinh bột dưới tác động của các enzyme phân rã (DPE), phosphorylase (P-enzyme) và glucanotransferase (D-enzyme). Ngoài ra, UDP-glucose: protein glucosyltransferase hoặc amylogenin (có kích thước 38 hoặc 45 kDa) cũng được dự đoán tham gia vào bước đầu tiên trong quá trình tổng hợp tinh bột (Zeeman, 2010).

Nhiều gen liên quan tới sinh tổng hợp tinh bột ở sắn đã được phân lập (Munyikwa *et al.*, 1997). Có thể kể đến gen mã hóa enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase, làm nhiệm vụ xúc tác quá trình tổng hợp ADP - glucose và gen *GBSS II* (granule-bound synthetase), tham gia tổng hợp tinh bột bằng cách chuyển hóa ADP glucose thành amylose. Các gen trên đã được phân lập dựa vào trình tự gen đã được công bố ở khoai tây. Ngoài ra, các gen liên quan tới sinh tổng hợp tinh bột như BE với vai trò tổng hợp amylopectin cũng đã được nghiên cứu.

Ở thực vật bậc cao, AGPase là một trong những enzyme xúc tác cho các bước đầu tiên trong quá trình tổng hợp tinh bột và đã được chứng minh là enzyme điều hòa quan trọng, điều chỉnh tốc độ phản ứng của toàn bộ chu trình sinh tổng hợp glycogen ở vi khuẩn và tinh bột ở thực vật. AGPase được biết xúc tác cho phản ứng biến đổi glucose-1-P và ATP thành ADP-glucose và pyrophosphate (Hannah, 2005) và là enzyme dị lập thể, được cấu tạo bởi hai tiểu phần lớn (AGPL) và hai tiểu phần nhỏ (AGPS) do hai gen tương tự mã hóa (Copeland, Preiss, 1991). Gen mã hóa AGPase ở sắn cũng đã được phân lập và giải trình tự thành công (Munyikwa *et al.*, 2001).

Các nghiên cứu trước đây, khi biểu hiện đồng thời hai gen mã hóa *AGPS* và *AGPL* thường sử dụng hai khung đọc mở. Hạn chế của việc này là làm tăng kích thước vùng T-DNA (hai lần promoter và terminator), hơn nữa, mức độ tổng hợp của protein của cả hai gen có thể không đều nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chuyển gen mã hóa đồng thời hai tiểu phần *AGPS* và *AGPL* (phân lập từ cây sắn) trên cùng một khung đọc mở, dưới sự điều khiển của promoter 35S vào cây thuốc lá nhằm nghiên cứu khả năng tăng cường tích lũy tinh bột trong cây chuyển gen. Để tạo hai tiểu phần riêng biệt, đoạn trình tự DNA mã hóa cho P2a được chèn vào giữa hai vùng mã hóa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống sắn KM140 được sử dụng để phân lập gen *AGPS* và *AGPL*.

Cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 *in vitro* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Phân lập gen *AGPS* và *AGPL* từ cây sắn

RNA tổng số được tách từ lá của giống sắn KM140 bằng TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) và được sử dụng để tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của bộ kit RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Tiếp đó, hai gen *AGPS* và *AGPL* được nhân dòng bằng phản ứng PCR sử dụng cDNA tổng số với cặp môi AGPScnds_F (5'-CTAATGGCGAGTATGGCGGC-3') và AGPScnds_R (5'-CATCTAGATCACGGTTC CGCT-3') cho *AGPS*; AGPLcnds_F (5'-TGGAATG GATTCTTGCTGTGTG-3') và AGPLcnds_R (5'-CAACCAGTCCTTGAACATGC-3') cho *AGPL*. Phản ứng được thực hiện với enzyme Pfu DNA polymerase và chu trình nhiệt như sau: 94°C/4 phút, 30 chu kỳ (94°C/20 giây, 55°C/20 giây, 72°C/1 phút 20 giây) và 70°C/4 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch, tách dòng trong vector pBT và giải trình tự sử dụng cặp môi M13F/R.

Thiết kế vector chuyển gen

Vùng CDS của gen *AGPL* và *AGPS* được tách dòng bằng phản ứng PCR từ vector tách dòng. Trong đó, *AGPS* được bổ sung điểm cắt của enzyme giới hạn *XbaI* và *XmaI* ở hai đầu bằng cặp môi *XbaI*-AGPS_F (5'-AAATCTAGAATGGCGGCCATCG GA-3') và AGPS-*XmaI*_R (5'-AAACCCGGGGA TCACGGTCCGCTG-3'); và vùng CDS của *AGPL* được bổ sung trình tự *P2A* (2A peptide từ porcine teschovirus-1 polyprotein: ATNFSLLKQAGDVEE NPGP) và *C-myc* (EQKLISEEDL) cùng vị trí cắt của enzyme *SmaI* và *SacI* bằng các môi *XmaI*-P2A_F (5'- AACCCGGGCGCCACGAACCTTCTCT GTTAAAGCAA -3'), P2A_R (5'- GGGTTTTCTT CCACGTCTCCTGCTTGCTTTAACAG -3'), P2A-AGPL_F (5'- GGAAGAAAACCCCGGTCCTATG GATTCTTGCTGTG -3'), AGPL-CMYC_R (5'- TC TGGATGAGTTTCTGTTCTATTACTGTGCCATC -3') và *Cmyc-sacI*_R2 (5'- CGAGCTTCACAGAT CCTTCTGAGATGAGTT -3'). Vector pBI121 được xử lý với enzyme *XbaI* và *SacI* để loại bỏ gen *GUS*. Cuối cùng các phân đoạn *AGPS*, *P2a-AGPL-Cmyc* được ghép nối vào vector pBI121 đã được xử lý bằng phản ứng cắt với các enzyme *XbaI*, *SmaI* và *SacI* bằng enzyme T4 ligase để tạo vector chuyển gen pBI121/35S/AGPSL/NOST.

Vector pBI121/35S/AGPSL/NOST được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để phục vụ chuyển gen vào thuốc lá.

Chuyển gen

Lá thuốc lá được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 1 cm² và được tiên nuôi cấy trong môi trường GM (MS + 1 mg/l BAP + 30 g/l sucrose) trong 2 ngày. Mảnh lá được ngâm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0,7 mang cấu trúc biến nạp *AGPSL*) khoảng 10 đến 15 phút ở nhiệt độ phòng và được đặt lên môi trường đồng nuôi cây GM (MS + 1mg/l BAP + 30g/l sucrose + 8g/l agar, pH=5,8) trong 2 ngày. Tiếp theo, các mảnh lá được chuyển sang môi trường GM có bổ sung kháng sinh chọn lọc (500 mg/l cefotaxime, 50 mg/l kanamycin) để tái sinh chồi. Sau 4 đến 5 tuần các chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc đạt chiều cao từ 2-3 cm được cắt chuyển sang môi trường ra rễ RM (MS + 0,1mg/l IBA + 30g/l sucrose + 8g/l agar + 500 mg/l cefotaxime, 50 mg/l kanamycin, pH 5,8). Sau 3 đến 4 tuần cây phát triển hoàn chỉnh, ra rễ và có từ 3 đến 4 lá thật được chuyển ra bầu có trộn trấu và cát với tỉ lệ 1:1. Cây phát triển với 4 đến 5 lá thật thì chuyển ra trồng trong bầu đất chứa giá thể TN1 (Viện nông hóa thổ nhưỡng) ở điều kiện nhà kính.

Kiểm tra các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp PCR

Các cây thuốc lá 1 tháng tuổi, tái sinh trên môi trường chọn lọc được kiểm tra sự có mặt của gen *AGPL* và *AGPS* bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu XbaI-*AGPS_F* và P2A_*R* theo chu kì nhiệt 94^oC/3 phút; 30 chu kỳ [94^oC/20 giây; 56^oC/20 giây; 72^oC/1 phút 20 giây]; 72^oC/4 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Các dòng thuốc lá dương tính với phản ứng PCR nếu xuất hiện băng kích thước ~1622bp tương đương đối chứng dương.

Phân tích các dòng cây chuyển gen bằng Western blot

Protein tổng số được tách từ lá các cây chuyển gen được phân tách trên bản điện di SDS-PAGE 12% theo phương pháp của Laemmli (1970) và được chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermo Scientific Pierce) ở 25V, 1,3A trong 20 phút. Màng nitrocellulose được phủ bằng sữa tách béo 5% trong đệm phosphate tween (PBST = PBS + 0,05% Tween 20) trong 5 giờ, sau đó màng được ủ qua đêm với kháng thể anti-cmyc pha loãng trong PBST chứa 5% sữa tách béo với tỉ lệ 1:100. Tiếp theo, màng được rửa sạch 2 lần, 5 phút/lần và ủ với kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP pha trong PBST với tỉ lệ 1:2500 trong 2 giờ. Sự có mặt của protein tái tổ hợp trong mẫu

được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất TMB (3,3'; 5,5'-Tetramethylbenzidine).

Kiểm tra khả năng tích lũy tinh bột của cây thuốc lá chuyển gen

Các dòng chuyển gen và không chuyển gen sau khi đã thích nghi với môi trường bên ngoài được đặt vào buồng sinh trưởng ở nhiệt độ ở 27^oC, độ ẩm 70% và điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Lá cùng độ tuổi ở các dòng thuốc lá chuyển gen và dòng không chuyển gen được thu ở cùng thời điểm trong ngày. Hàm lượng tinh bột trong lá được định lượng bằng phương pháp Anthrone (Yemm, Willis, 1954). Trong phương pháp này, các mẫu lá được sấy khô và loại bỏ diệp lục bằng acetone 100%. Đường tự do trong mẫu được khử với cồn 80^o. Tinh bột trong mẫu được thủy phân với acid HCl để tạo ra các phân tử đường glucose. Hàm lượng tinh bột được đo thông qua phản ứng màu ở độ hấp thụ tại bước sóng 630 nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập gen *AGPS* và *AGPL* từ cây sản

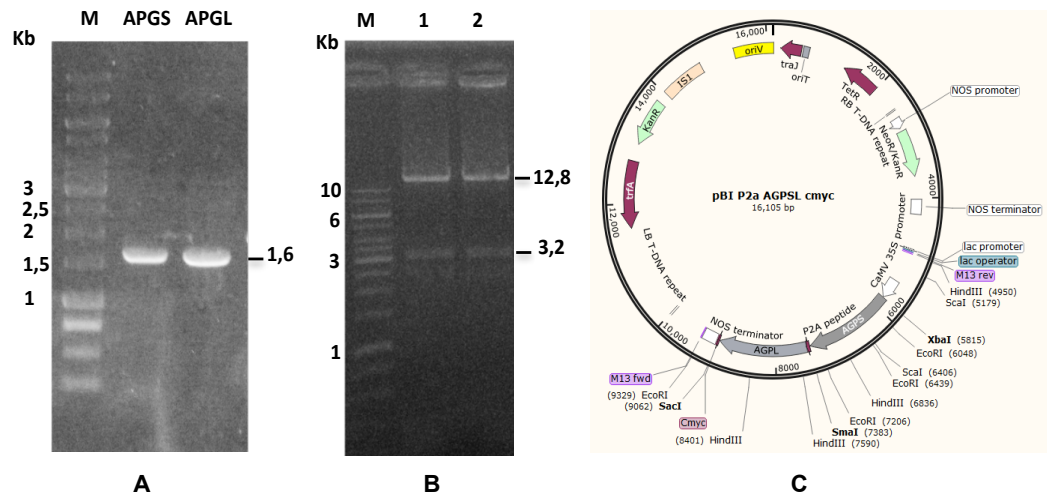
Để tách dòng và đọc trình tự vùng CDS của hai gen *AGPS* và *AGPL*, chúng tôi sử dụng hai cặp mồi được thiết kế nhân toàn bộ CDS và vùng trình tự không mã hóa trên mRNA. Trên ảnh điện di cho thấy, *AGPS* và *AGPL* đã được nhân dòng với kích thước đúng như tính toán (1578 bp với *AGPS* và 1619 bp với *AGPL*) (Hình 1.A). Các trình tự này đã được đăng ký trên ngân hàng gen NCBI với mã số KU243124 (*AGPS*) và KU243122 (*AGPL*).

Thiết kế vector chuyển gen pBI121/35S/AGPSL/NOST

AGPase cấu thành bởi hai tiểu phần AGPS và AGPL, nên để biểu hiện hiệu quả enzyme này trong cây chuyển gen cần phải biểu hiện đồng thời cả hai gen trên với hiệu suất tương đương. Xuất phát từ lý do này, chúng tôi đã thiết kế hai gen trên cùng một khung đọc mở, được điều khiển bởi promoter *CaMV* 35S. *P2a* được thiết kế giữa hai vùng mã hóa giúp phân cắt hai tiểu phần trong quá trình dịch mã. *P2a* là đoạn oligopeptide (~20 amino acid) hoạt động như một hệ thống độc lập và là công cụ quan trọng để biểu hiện nhiều protein trên cùng một khung đọc mở (Ryan *et al.*, 1991). Trình tự *c-myc* được thêm vào ở cuối *AGPL* nhằm kiểm tra sự hoạt động của gen ở mức độ dịch mã cũng như kiểm tra hoạt động của *P2a*. Dựa vào trình tự hai gen đã phân lập, chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen

pBI121/35S/AGPSL/NOST mang cả hai gen *AGPS* và *AGPL* (Hình 1B). Vector sau khi thiết kế được cắt bằng hai enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI*, trên ảnh điện di thu được băng 12,8 kb tương ứng với kích

thước của plasmid và 3,2 kb tương ứng với vùng mã hóa *AGPS/L*. Kết quả này đúng như tính toán lý thuyết (Hình 1C) và vector thu được có thể sử dụng để chuyển gen vào cây thông qua *A. tumefaciens*.



Hình 1. Thiết kế vector chuyển gen pBI121/35S/AGPSL/NOST. A) Ảnh điện di sản phẩm RT-PCR nhân dòng gen *AGPS* và *AGPL*; B) Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt vector pBI121/35S/AGPSL/NOST với enzyme *XbaI* và *SacI*; C) Sơ đồ vector pBI121/35S/AGPSL/NOST. M: Thang DNA 1kb (Fermentas); 1,2: tên các dòng khuẩn lạc.

Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc 35S/AGPSL/NOST

Trong chuyển gen thực vật, cây thuốc lá được xem như là loại cây mô hình phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá chức năng gen bởi vì hệ thống tái sinh và tiếp nhận gen ngoại lai của cây thuốc lá rất hiệu quả, thời gian phân hóa từ mô đến tạo cây hoàn chỉnh khá ngắn. Mặt khác cây thuốc lá là cây ngắn ngày, dễ trồng và chăm sóc nên dễ dàng thu được hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Vì thế, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn cây thuốc lá làm cây mô hình để đánh giá các cấu trúc vector chuyển gen tăng cường sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột đã thiết kế được.

Kết quả cho thấy sau 2 thí nghiệm chuyển cấu trúc gen 35S/AGPSL/NOST vào 100 mảnh lá thuốc lá chúng tôi đã thu được 64 cây tái sinh trên môi trường chọn lọc. Ngược lại, mảnh lá thuốc lá không được chuyển gen cây chuyển lên môi trường chọn lọc có 50 mg/l kanamycin (làm đối chứng), 100% mẫu bị chết và không tái sinh chồi. Điều này cho thấy các dòng thuốc lá tái sinh và ra rễ trên môi

trường chọn lọc có tiềm năng là các dòng đã được chuyển gen (Hình 2A).

PCR là kỹ thuật phổ biến và đơn giản nhất để bước đầu sàng lọc các dòng cây chuyển gen. Kết quả phân tích sản phẩm PCR cho phép khẳng định sự có mặt hay không của gen chuyển trong cây kiểm tra. Trong nghiên cứu này, lá của các dòng thuốc lá chuyển gen giả định mang cấu trúc gen 35S/AGPSL/NOST được thu để phân tích PCR với các cặp mồi đặc hiệu *XbaI-AGPS_F* và *P2A_R*. Kết quả phản ứng PCR cho thấy chúng tôi đã thu 31 dòng thuốc lá có mang cấu trúc gen pBI121/AGPSL. Các dòng này cho kết quả PCR dương tính với sản phẩm là đoạn DNA có kích thước 1622 bp tương ứng với chiều dài gen *AGPS* và đoạn *P2A* (Hình 2C). Do sử dụng mồi *XbaI-AGPS_F* gắn ở đầu gen *AGPS* và mồi *P2A-R* gắn với đoạn *P2A:AGPS* nên cây chuyển gen chứa cả *AGPS* và *AGPL* cho kết quả dương tính với phản ứng PCR.

Kết quả phân tích Western blot

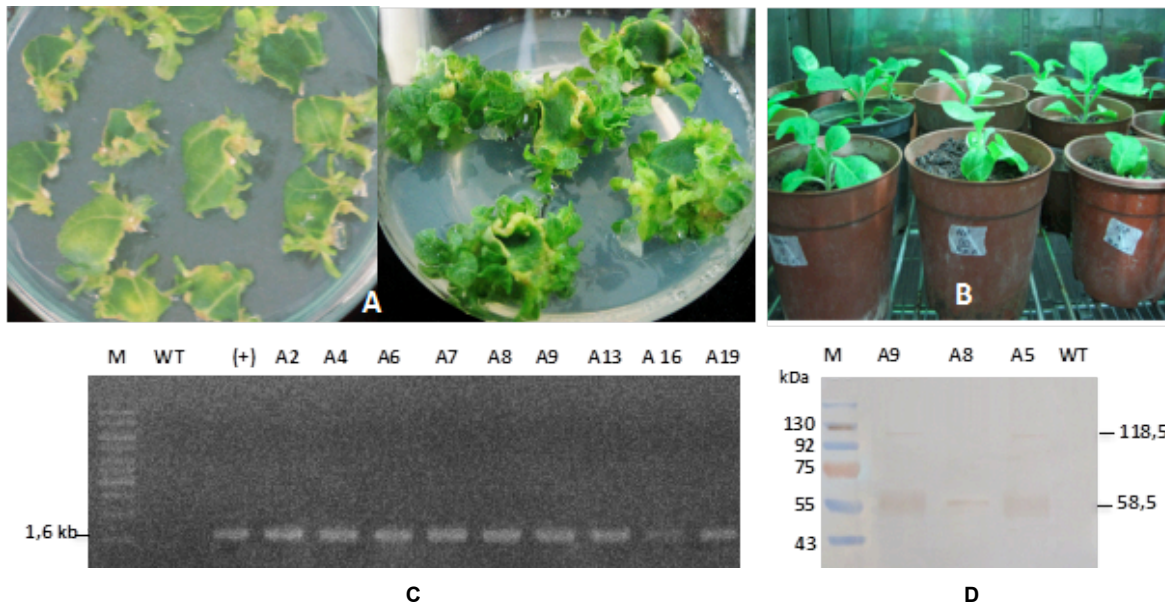
Do trong trình tự của gen *AGPS/L* chúng tôi đã thiết kế sẵn trình tự mã hóa cho đuôi c-myc ở cuối

gen nên để khẳng định một cách chắc chắn gen chuyển đã hoạt động và biểu hiện thành công, tạo thành protein AGPS/L trong các dòng thuốc lá chuyển gen chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot sử dụng kháng thể anti-cmyc.

Gen *AGPSL* có chiều dài là 3249 bp trong đó có *AGPS* và *AGPL* được ghép nối với nhau bởi trình tự P2a, nên theo tính toán lý thuyết, protein AGPS/L tái tổ hợp sau khi được tổng hợp có độ dài 1080 amino acid và có khối lượng phân tử khoảng 118 kDa. Mặt khác, do sự hoạt động của *P2A*, chuỗi polypeptide AGPS/L được tổng hợp ngắt quãng thành hai phân đoạn là AGPS-P2A và AGPL-Cmyc (~58,5 kDa). Như vậy, kết quả phân tích Western blot (Hình 2D) các cây chuyển gen AGPSL cho thấy, cả 3 dòng A5, A8, A9 được phân tích đều biểu hiện sự có mặt của băng có kích thước ~58,5 kDa tương ứng với phân đoạn AGPL-Cmyc. Tuy nhiên, sự xuất hiện băng 118,5 kDa ở hai mẫu A5 và A9 chứng tỏ P2a chưa phân tách hai tiểu

đơn vị hoàn toàn ở một số lần dịch mã. Mặc dù vậy, có thể quan sát được lượng protein kết hợp AGPSL nhỏ hơn đáng kể so với lượng các tiểu đơn vị được hình thành thông qua theo mức đậm nhạt của băng tạo thành, vì thế vẫn có thể kết luận hệ thống biểu hiện gen hoạt động hiệu quả. Ngoài ra, việc xuất hiện băng 118,5 kDa còn minh chứng cho việc gen *AGPS* đã được biểu hiện thành công giống như *AGPL*.

Kết quả phân tích lai Western blot còn có thể cho thấy có sự khác nhau về mức độ biểu hiện của gen chuyển ở các dòng thuốc lá khác nhau. Cụ thể, ở dòng A9 mức độ biểu hiện của các gen chuyển thấp hơn các dòng còn lại. Điều này có thể được giải thích do cấu trúc gen được chuyển đã chèn vào các vùng khác nhau của hệ gene cây thuốc lá và tạo ra các ảnh hưởng khác nhau đến hoạt động của các gen. Mặt khác cây đối chứng không chuyển gen cho kết quả âm tính. Kết quả này cho phép khẳng định các protein tái tổ hợp AGPS và AGPL đã được tổng hợp trong các dòng thuốc lá chuyển gen.



Hình 2. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc 35S/AGPSL/NOST. (A) Cây sống sót trên môi trường chọn lọc sau 3-5 tuần; (B) Cây chuyển gen thế hệ T0 trong buồng sinh trưởng; (C) Kết quả kiểm tra cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR với mỗi XbaI-AGPS_F và AGPS-XmaI_R; (D) và lai western blot kiểm tra sự biểu hiện của gen AGPSL. ĐC(+): Sản phẩm PCR từ plasmid, WT: Cây không chuyển gen; A2, A4, A6, A7, A8, A9, A13, A16, A19: các dòng cây chuyển gen thế hệ T0.

Đánh giá khả năng tích lũy tinh bột của cây thuốc lá chuyển gen

Trong điều kiện *in vitro*, cây non được cung cấp đầy đủ dinh dưỡng (đường, muối khoáng, vitamin) và

ánh sáng, sự đánh giá sự tích lũy tinh bột ở lá là không phù hợp. Để có kết quả được chính xác nhất chúng tôi tiến hành trồng tất cả các cây trong buồng nuôi cây để đảm bảo thống nhất các điều kiện chiếu sáng (16/24h),

hiệt độ (27°C) và độ ẩm (70%) và tiến hành thu lá ở cùng độ tuổi ở các dòng chuyển gen và không chuyển gen. Hàm lượng tinh bột trong lá của các dòng thuốc lá phân tích được xác định bằng phương pháp Anthrone.

Kết quả cho thấy lá của các dòng thuốc lá chuyển gen mang gene *AGPSL* đều tích lũy hàm lượng tinh bột lớn hơn từ 13,82 đến 116,5% so với hàm lượng tinh bột trong lá cây đối chứng không

chuyển gen. Điều này có thể giải thích do biểu hiện của gen chuyển được tích hợp trong cây chủ khác nhau dẫn đến sự sai khác trong hoạt động của gen chuyển, ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột (Bảng 1). Kết quả này cho phép khẳng định các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPS/L* có mức độ tích lũy tinh bột trong lá cao hơn hẳn so với cây đối chứng không chuyển gen.

Bảng 1. Kết quả đo hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá thuốc lá ở các dòng chuyển gen.

Tên dòng	Giá trị OD ₆₃₀	Hàm lượng tinh bột trung bình (mg/ml)	Hàm lượng tinh bột/trọng lượng mẫu khô (mg/g)	Tỉ lệ tinh bột tăng so với đối chứng (%)
A5	0,467	0,322	32,238	109,335
A19	0,476	0,333	33,343	116,516
A13	0,401	0,247	24,676	60,236
A9	0,329	0,175	17,528	13,817
WT	0,305	0,154	15,400	0.000

Ghi chú: WT: cây chưa chuyển gen. A5, A9, A13, A19: các dòng chuyển gen *AGPS/L*.

Một số nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen các gen tham gia quá trình sinh tổng hợp tinh bột cũng đã thu nhận được các kết quả khả quan trong cải thiện hàm lượng tinh bột tích lũy ở thực vật. Gamez *et al.* (2011) thu nhận cây thuốc lá có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt hơn cũng như hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá cao hơn 30-40% so với cây đối chứng khi tăng cường biểu hiện gen *SSIV* (starch sythase IV). Bên cạnh đó, việc biểu hiện gen *SSIV* cho phép tăng cường đến 50% hàm lượng tinh bột trong lá vào thời điểm cuối ngày so với cây đối chứng. Carciofi *et al.* (2012) thu nhận dòng mô sẹo lúa mạch có hàm lượng tinh bột cao hơn 4% so với đối chứng khi tiến hành chuyển gen *GBSS*. Li *et al.* (2011) tiến hành chuyển gen mã hóa *AGPase* vào cây ngô đã thu được các dòng ngô chuyển gen có khối lượng trung bình hạt cao hơn 15% so với đối chứng cũng như hàm lượng tinh bột hơn 74% khối lượng so với 65 % ở cây đối chứng. Trong nghiên cứu này việc đồng biểu hiện tiểu phần lớn *AGPL* và tiểu phần nhỏ *AGPS* của enzyme *AGPase* trên cùng khung đọc mở đã tăng cường khả năng tích lũy tinh bột ở lá các dòng thuốc lá chuyển gen từ 13-116% so với dòng không chuyển gen. So sánh với kết quả của Lê Thu Ngọc và cộng sự (chưa công bố) khi chuyển gen nhân tạo đã tối ưu mã biểu hiện trong thực vật *AGPopt* có nguồn gốc từ gen *glgC* mã hóa cho enzyme *AGPase* của vi khuẩn *E. coli* đã làm tăng hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá từ 18%-56%.

Những bằng chứng này bước đầu cho thấy việc biểu hiện gen mã hóa *AGPase* là một chiến lược hiệu quả giúp tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở thực vật.

KẾT LUẬN

Đã phân lập và thiết kế thành công vector chuyển gen thực vật đồng biểu hiện 2 gen mã hoá tiểu phần lớn *AGPL* và tiểu phần nhỏ *AGPS* của enzyme *AGPase*. Hoạt động của các gen đã được đánh giá trên cây thuốc lá mô hình và chứng minh sự tích lũy tinh bột vượt trội từ 13-116% ở các dòng thuốc lá chuyển gen so với đối chứng. Kết quả này là tiền đề để phát triển các nghiên cứu ứng dụng tăng cường dự trữ tinh bột ở các cây trồng khác nhau như sắn, khoai tây và khoai lang.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện từ kinh phí của đề tài “Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sắn Việt Nam nhằm phát triển các giống sắn có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen” thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carciofi M, Blennow A, Nielsen MM, Holm PB, Hebelstrup KH (2012) Barley callus: a model system for bioengineering of starch in cereals. *Plant Methods* 8: 36.
- Copeland L, Preiss J (1991) Purification of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* 68: 996-1001.
- Gamez FMA, Jun L, Sandy R, Edurne BF, Francisco JM, Miroslav O, Paula R, Abdellatif B, Javier PR, Angel M (2011) Enhancing the expression of starch synthase class IV results in increased levels of both transitory and long-term storage starch. *Plant Biotechnol J* 9: 1049-1060.
- Hannah LC (2005) Starch synthesis in the maize endosperm. *Maydica* 50: 497-506.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li N, Zhang S, Zhao Y, Li B, Zhang J (2011) Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize. *Planta* 233: 241-50.
- Martin C, Smith AM (1995) Starch Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 971-985.
- Munyikwa TRI, Kreuze J, Fregene M, Suurs L, Jacobsen E, Visser RGF (2001) Isolation and characterisation of cDNAs encoding the large and small subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120: 71-83.
- Munyikwa TRI, Langeveld S, Jacobsen E, Visser RGF (1997) Cassava starch Biosynthesis: New avenues for modifying starch quantity and quality. *Euphytica* 96:65-75.
- Ryan MD, King AM, Thomas GP (1991) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 72 (Pt 11): 2727-2732.
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57:508-14.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:209-34.

CO-EXPRESSION OF *AGPS* AND *AGPL* GENES ENCODED FOR AGPASE FROM CASSAVA TO ENHANCE STARCH ACCUMULATION IN TRANSGENIC TOBACCO

Nguyen Van Doai¹, Nguyen Minh Hong², Le Thu Ngoc¹, Nguyen Thi Thom¹, Nguyen Dinh Trong¹, Vu Huyen Trang¹, Nguyen Thi Thuy Huong¹, Pham Thi Van¹, Pham Bich Ngoc^{1,✉}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Hong Duc University

SUMMARY

The AGPase (ADP-Glucose pyrophosphorylase) is one of the ubiquitous enzymes catalyzing the first step in starch biosynthesis. It plays an important role in regulation and adjusts the speed of the entire cycle of glycogen biosynthesis in bacteria and starch in plants. In higher plants, it is a heterotetramer and tetrameric enzyme consisting two large subunits (AGPL) and two small subunits (AGPS) and encoded by two genes. In this paper, both *AGPS* and *AGPL* genes were successfully isolated from cassava varieties KM140 and deposited in Genbank with accession numbers KU243124 (*AGPS*) and KU243122 (*AGPL*), these two genes were fused with *P2a* and inserted into plant expression vector pBI121 under the control of 35S promoter. The efficiency of this construct was tested in transgenic *N. tabacum*. The presence and expression of *AGPS* and *AGPL* in transgenic plants were confirmed by PCR and Western hybridization. The starch content was quantified by the Anthrone method. Transgenic plant analysis indicated that the two targeted genes were expressed simultaneously in several transgenic tobacco lines under the control of CaMV 35S promoter. The starch contents in 4 analyzed tobacco transgenic lines display an increase of 13-116% compared to WT plants. These results indicate that the co-expression of *AGPS* and *AGPL* is one of the effective strategies for enhanced starch production in plants. These results can provide a foundation for developing other genetically modified crops to increase starch accumulation capacity.

Keywords: *AGPase, AGPL, AGPS, cassava, P2a, starch, tobacco, transgenic*

✉ Author for correspondence: Tel: +84-912247887; E-mail: tranbanglinh@gmail.com