

Tách dòng, thiết kế vector và chuyển gen *GmEXPI* vào cây thuốc lá *Nicotinana tabacum*

Lò Thanh Sơn¹, Hồ Mạnh Tường², Lê Văn Sơn²,
Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu^{3,*}

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Đại học Thái Nguyên

Nhận ngày 08 tháng 8 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 8 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 05 tháng 9 năm 2013

Tóm tắt: Expansin có vai trò quan trọng trong pha giãn thành tế bào ở miền sinh trưởng của hệ rễ cây đậu tương. Hai vùng chức năng (DPBB và Pollen allerg) xác định cho protein expansin có khả năng tác động phá vỡ liên kết phi hoá trị giữa polysaccharide với vi sợi cellulose giúp thành tế bào dễ dàng giãn nở (cả chiều ngang và chiều dọc) dưới tác động của sức trương nước. Hoạt động của gen *GmEXPI* (xác định protein expansin) liên quan đến sự kéo dài rễ cây đậu tương, làm tăng cường khả năng chịu hạn của cây đậu tương. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả của việc thiết kế vector mang cấu trúc gen *GmEXPI* được lai với một đoạn mã hoá peptide c-myc và KDEL, dưới sự điều khiển của CaMV35S promoter; chuyển cấu trúc trên vào cây thuốc lá mô hình (*Nicotinana tabacum*) nhờ *A.tumefaciens*. Phân tích sự có mặt của gen trong 44 dòng cây thuốc lá tái sinh lựa chọn ngẫu nhiên bằng PCR cho thấy 32/44 dòng thuốc lá được chuyển có mang gen *GmEXPI*, như vậy cấu trúc này có thể được sử dụng để chuyển gen vào các cây trồng quan tâm.

Từ khoá: Expansin, *Glycine max*, *GmEXPI*, kéo dài rễ, giãn thành tế bào.

1. Mở đầu

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) có vai trò quan trọng đối với con người trong nhiều lĩnh vực như: cung cấp dinh dưỡng, làm thực phẩm cho con người, làm thức ăn cho gia súc, cải tạo và sử dụng bền lâu nguồn tài nguyên đất. Cây đậu tương là một trong số các cây trồng có giá trị kinh tế cao và phù hợp với nhiều

địa phương. Cùng với sự tăng trưởng của các loại cây lương thực chính như ngô, lúa, khoai, sắn và các cây đậu đỗ khác thì đậu tương cũng là cây trồng đa và đang được chú trọng phát triển.

Đậu tương là cây trồng tương đối miễn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Sự biến đổi khí hậu, tình trạng hạn hán xảy ra liên tục và kéo dài là một khó khăn lớn cho sản xuất đậu tương ở nhiều địa phương, đặc biệt là những nơi có địa hình đất canh tác dốc, đòi hỏi phải cải thiện tính di truyền

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-913383289.
E-mail: chuhoangmau@tnu.edu.vn

thích nghi với hạn hán để tạo giống năng suất cao và ổn định phù hợp với từng vùng miền. Vì vậy, công tác tuyển chọn giống đậu tương có kiểu gen chịu hạn ngày càng được quan tâm nghiên cứu [1].

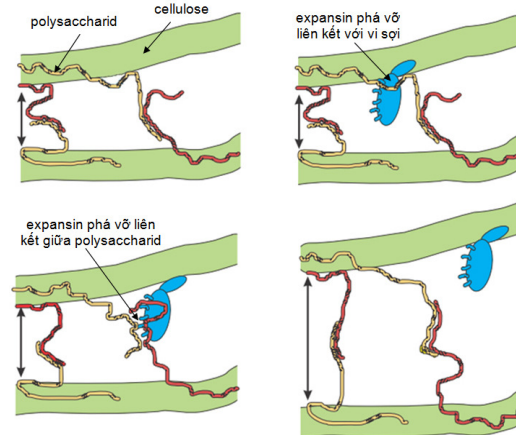
Hai cơ chế chủ yếu liên quan đến khả năng chịu hạn của thực vật là sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu và sự phát triển mạnh của bộ rễ. Bộ rễ là một trong những bộ phận quan trọng của cây thực hiện nhiệm vụ lấy nước cung cấp cho các hoạt động sống và phát triển của cơ thể thực vật. Cơ chế chịu hạn liên quan mật thiết với sự phát triển của bộ rễ. Cơ thể thực vật thích ứng với hạn bằng cách phát triển rễ cọc theo chiều dài vươn tới các lớp đất sâu hơn để hút nước dễ dàng hơn, đồng thời hệ thống rễ con phát triển mở rộng theo bề ngang có thể thích ứng tốt với việc tìm kiếm dinh dưỡng khoáng và nước trong lòng đất [2].

Kaspar *et al.* khi đánh giá 105 giống đậu tương trong điều kiện khô hạn đã nhận thấy, cây đậu tương không được tưới nước thì bộ rễ có chiều dài hơn hẳn cây đậu tương được tưới nước, ngoài ra các nhà khoa học cũng nhận thấy mối tương quan chặt chẽ đối với nhiều tính trạng rễ như trọng lượng khô, chiều dài tổng số, cấu trúc và số lượng rễ con ở các giống chịu hạn. Các tính trạng này thường được dùng như các chỉ tiêu quan trọng để đánh giá và nhận dạng các giống đậu tương có tính chịu hạn [3].

Expansin là một họ protein tác động trong việc kéo giãn của thành tế bào thực vật và được coi là một protein chủ yếu ảnh hưởng đến sự mở rộng của tế bào thực vật.

Hầu hết các thực nghiệm cho thấy rằng, tại mô chứa tế bào đang sinh trưởng, expansins biến đổi tính chất vật lý của vách tế bào bằng cách nới lỏng các liên kết hydro, nới lỏng các liên kết phi hoá trị giữa các vi sợi cellulose và làm lỏng lẻo mạng lưới polymer [4]. Vi sợi

cellulose được kết nối với nhau bởi polysaccharide. Những polysaccharide này thực hiện liên kết vào bề mặt vi sợi cellulose và liên kết với nhau. Protein expansin có thể phá vỡ các liên kết của polysaccharide bề mặt vi sợi hoặc phá vỡ các liên kết giữa các polysaccharide. Dưới áp lực cơ học phát sinh từ sức trương nước, khoảng cách giữa các vi sợi thành tế bào dễ dàng được đẩy giãn khoảng cách theo cả chiều ngang và chiều dọc (Hình 1.). Expansin có thể di chuyển dễ dàng giữa các vi sợi cellulose của thành tế bào và tiếp xúc với các điểm kết dính polymer. Điều này tạo thuận lợi cho pha giãn (tăng trưởng) của tế bào dễ dàng thực hiện [5].



Hình 1. Mô tả hoạt động của protein expansin tác động giãn thành tế bào thực vật.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, sản phẩm phiên mã của gen GmEXPI có nhiều trong các tế bào biểu bì và các lớp tế bào miền sinh trưởng của cả rễ cọc và rễ bên, rất hiếm ở vùng trưởng thành [6]. Qua đó có thể thấy vai trò quan trọng của expansin trong việc phát triển kéo dài của hệ rễ đậu tương.

Expansin được chia thành ba phân họ α , β và γ -expansin dựa trên mối quan hệ nguồn gốc của chúng [4, 7]. Lee và dtg (2003) đã nghiên

cứu phân lập gen expansin (EXP1) từ mRNA của cây đậu tương với kích thước 1089bp [8]. Năm 2011, Lee và đtg cũng đã nghiên cứu biểu hiện của gen expansin liên quan đến việc kéo dài rễ của cây đậu tương. Khi phân tích RNA bằng Northern blot cho thấy rằng gen *GmEXP1* được biểu hiện mạnh ở rễ, đặc biệt khi quá trình hình thành các rễ chính và rễ phụ, mức độ biểu hiện của gen *GmEXP1* rất mạnh trong khoảng thời gian hạt nảy mầm từ 1 ngày đến 5 ngày tuổi và giai đoạn kéo dài của rễ. Biểu hiện của gen *GmEXP1* làm tăng sự phát triển cả rễ chính, cả rễ bên [8]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy gen *GmEXP1* đóng một vai trò quan trọng trong việc phát triển rễ của nhiều thực vật như đậu tương, cà chua, *Arabidopsis*...[5].

Trong số các giống đậu tương thu thập được ở Sơn La, so sánh bằng thực nghiệm chúng tôi đã phân nhóm và lựa chọn được giống đậu tương Sơn La 1 (SL1) có hệ rễ phát triển mạnh. Gen *GmEXP1* được phân lập từ SL1 bằng cách phiên mã ngược tạo cDNA với khuôn mẫu là mRNA tương ứng. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc *GmEXP1* lai với một đoạn mã hoá peptide c-myc và KDEL dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S. Cấu trúc được thiết kế có chứa trình tự mã hoá đoạn peptide c-myc là dấu hiệu để phát hiện protein bằng Western blot với kháng thể kháng c-myc nhằm phân tích sự biểu hiện gen *GmEXP1* trên cây chuyển gen

phục vụ mục đích cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương.

2. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Giống đậu tương địa phương Sơn La 1 (SL1) có hệ rễ phát triển tốt được sử dụng làm vật liệu phân lập gen *GmEXP1*.

Vector pRTRA 7/3, vector pCB301, chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58, cây thuốc lá *N. tabacum* K326 do phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam cung cấp.

Các nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam.

Phương pháp

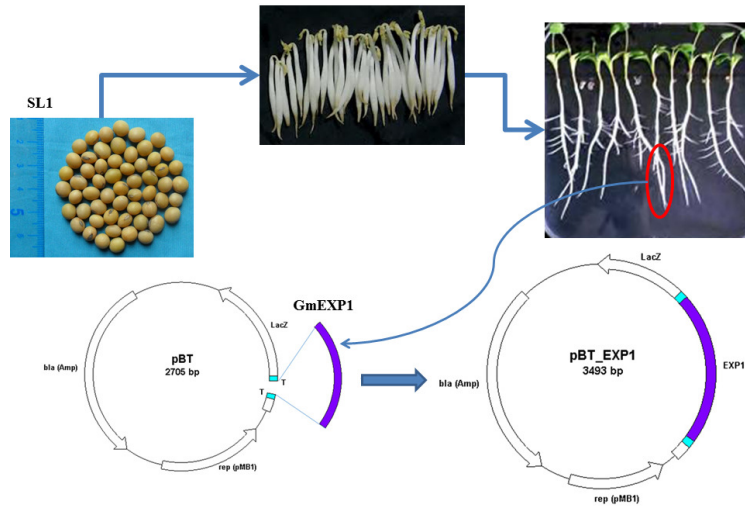
Từ những thông tin về trình tự gen *GmEXP1* của đậu tương đã công bố tại Ngân hàng gen Quốc tế có mã số AF516879, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để phân lập đoạn mã hoá protein của gen *GmEXP1* với kích thước ước tính khoảng 768 bp. Trình tự nucleotide cặp mồi đặc hiệu như sau:

Bảng 1. Trình tự cặp mồi đặc hiệu nhân gen *GmEXP1*

Ký hiệu	Trình tự mồi (5' - 3')
SoyExp_F	CATGCCATGGATGGCAAATCATGCTTGT
SoyExp_R	ATTTGCGGCCGCTTAGAACTGAACTGGGCTAGA

Gen *GmEXP1* được phân lập từ miền sinh trưởng rễ đậu tương theo sơ đồ Hình 2: RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent KIT; cDNA được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cDNA Synthesis KIT; gen *GmEXP1* được khuếch đại bằng kỹ thuật

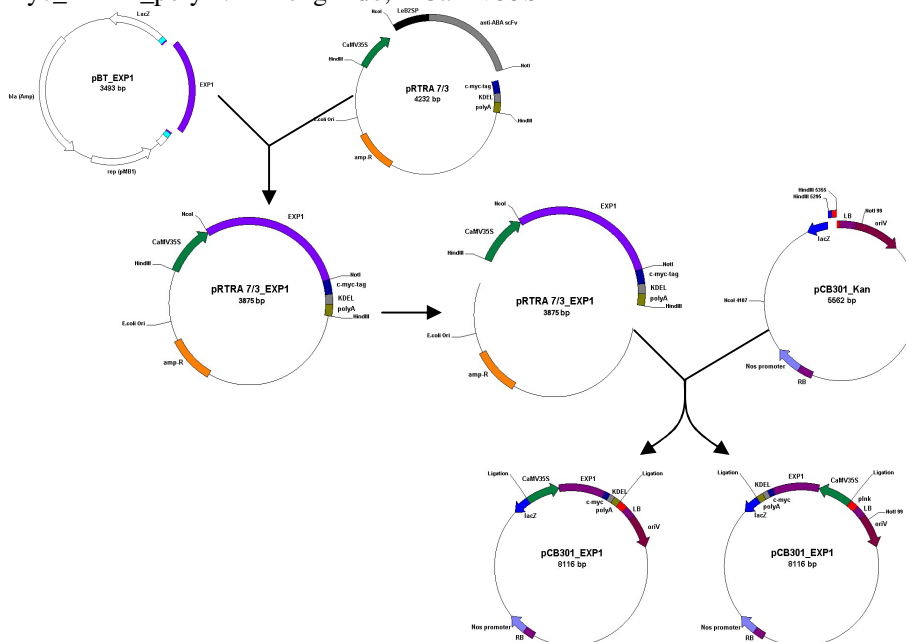
PCR với cặp mồi đặc hiệu theo chu kỳ nhiệt: 94°C/4 phút - (94°C/45 giây - 56°C/30 giây - 72°C/60 giây)³⁰ - 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0.8%; thổi gel theo Gene JET™ Gel Extraction KIT; gắn gen đích vào vector bằng T4 ligase;



Hình 2. Phân lập gen *GmEXP1* từ giống đậu tương địa phương SL1.

Để chuyển gen *GmEXP1* vào thực vật và có thể kiểm tra biểu hiện sản phẩm protein, chúng tôi thiết kế vector tái tổ hợp pCB301 mang promoter CaMV35S và cấu trúc gen đích gồm có các thành phần như sau: *GmEXP1_c-myc_KDEL_polyA*. Trong đó, CaMV35S

(promoter từ virus khảm súp lơ - hoạt động ở tất cả các mô tế bào thực vật), c-myc, KDEL và polyA nhận được từ vector trung gian pRTRA7/3. Dưới đây là sơ đồ thiết kế vector tái tổ hợp trên:



Hình 3. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *GmEXP1*.

Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng sốc nhiệt (42 $^{\circ}$ C trong 1 phút 30 giây). Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường kháng sinh chọn lọc (carbenicilin, kanamycin). Các dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc bằng colony-PCR, được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp để thu sinh khối. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử [9].

Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 bằng phương pháp xung điện (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω). Những vi khuẩn mang cấu trúc gen tái tổ hợp được nhân lên trong môi trường có kháng sinh chọn lọc kanamycin với sinh khối lớn dùng để nhiễm và cấy thuốc lá mô hình (phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *A. tumefaciens*).

Nuôi cấy chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trong môi trường kháng sinh chọn lọc kanamycin và rifamycin trong 48 tiếng, sau đó nuôi phục hồi trong môi trường không kháng sinh cho đến khi đo OD_{600nm} = 0.7. Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn, hoà tan trong môi trường 1/2MS bổ sung Acetosyringon (AS) để chuẩn bị biến nạp.

Các mảnh lá thuốc lá *N.tabacum* kích thước 1 \times 1cm được ngâm trong dịch huyền phù tế bào vi khuẩn trên trong 10 phút, sau đó được tái sinh trên môi trường đa chồi MS bổ sung BAP. Những chồi phát triển tốt (2 - 3cm) được cắt chuyển sang môi trường ra rễ RM. Khi cây hoàn thiện về hình thái được chuyển ra giá thể, trồng trong nhà lưới.

3. Kết quả và thảo luận

Phân lập gen GmEXPI từ giống đậu tương địa phương SL1

Từ giống đậu tương SL1, chúng tôi tách chiết RNA tổng số từ miền sinh trưởng của rễ;

tổng hợp cDNA với môi ngẫu nhiên (random hexamer primer). Gen *GmEXPI* được phân lập bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1.). Sản phẩm thổi gel của gen này được gắn vào vector tách dòng pBT_2705bp rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α để nhân dòng gen phục vụ cho thiết kế vector chuyển gen.

Tạo cấu trúc chứa gen đích GmEXPI

Cắt gen đích từ vector tách dòng pBT

Gen *GmEXPI* từ vector tách dòng pBT được cắt bằng hai loại enzyme hạn chế là NotI và NcoI sẽ cho hai phân đoạn DNA có kích cỡ khoảng 0.77 kb và 2.7kb. Trong đó, phân đoạn DNA 0.77kb chính là đoạn gen đích (*GmEXPI*) cần thu nhận. Việc sử dụng cặp enzyme hạn chế như trên sẽ đảm bảo cho gen đích gắn thuận chiều với promoter trên vector tái tổ hợp.

Điện di sản phẩm cắt hạn chế trên gel agrose, băng có kích thước khoảng 0.77kb được thổi gel để thu nhận gen *GmEXPI* phục vụ cho thiết kế vector tái tổ hợp.

Cắt mở vòng vector pRTRA 7/3

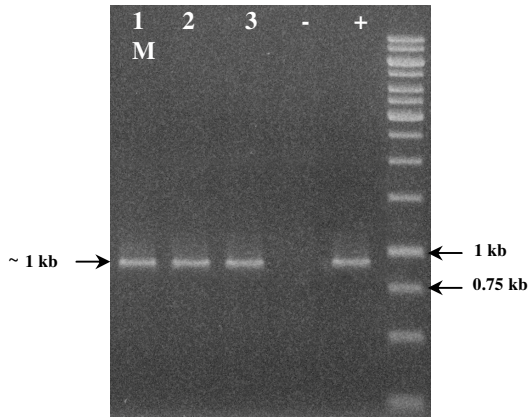
Vector pRTRA 7/3 chứa các đoạn tín hiệu cần thiết cho việc biểu hiện và kiểm tra gen đích (*GmEXPI*) trong tế bào thực vật gồm: promoter CaMV35S khởi động phiên mã ở tất cả các tế bào và mô trên cơ thể thực vật; trình tự oligonucleotide xác định chuỗi peptide c-myc để phục vụ phản ứng western blot; đoạn KDEL và polyA ổn định cấu trúc phân tử mRNA được tạo ra trong tế bào. Sử dụng cặp enzyme NcoI và NotI cắt vector pRTRA 7/3 thu được hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 0.9kb và 3.3kb. Trong đó phân đoạn 3.3kb chính là đoạn mang các trình tự cần thu nhận để thiết kế vector tái tổ hợp.

Điện di sản phẩm cắt hạn chế trên gel agrose, băng có kích thước khoảng 3.3kb được

thời gel để thu nhận plasmid mở vòng mang các trình tự cần thiết phục vụ cho thiết kế vector tái tổ hợp.

Gắn gen GmEXPI vào vector mở vòng pRTRA 7/3

Sản phẩm thời gel Gen *GmEXPI* được gắn vào vector pRTRA 7/3 mở vòng nhờ phản ứng ligation dưới xúc tác của enzyme T4 ligase tạo cấu trúc vector tái tổ hợp mang gen chuyển. Vector tái tổ hợp này được biến nạp bằng sốc nhiệt vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α để nhân dòng gen trong môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc carbenicilin. Năm khuẩn lạc được chọn đưa vào môi trường nuôi cấy LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc carbenicilin để thu sinh khối, tách plasmid.



Hình 4. Kết quả PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp mang gen *GmEXPI* trên agrose 0.8%.

Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu SoyEXP1F/SoyEXP1R để kiểm tra sự có mặt của gen *GmEXPI* trong plasmid của các dòng vi khuẩn. Kết quả

Hình 4. cho thấy, cả ba dòng vi khuẩn đều mang plasmid tái tổ hợp chứa gen chuyển (pRTRA_ *GmEXPI*). Vector tái tổ hợp này được dùng để thu nhận cấu trúc mang gen đích thiết kế vector chuyển gen vào thực vật.

Chuyển cấu trúc mang gen GmEXPI vào vector pCB301

Thu nhận cấu trúc mang gen GmEXPI

Sử dụng enzyme cắt hạn chế HindIII xử lý vector tái tổ hợp pRTRA_ *GmEXPI* thu được hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1.6kb và 2.3kb. Trong đó phân đoạn 1.6kb chính là cấu trúc chứa gen đích (*GmEXPI*) cần thu nhận gồm:

CaMV35S_ *GmEXPI*_c-myc_KDEL_polyA

Điện di sản phẩm cắt hạn chế trên gel agrose thu được hai băng như tính toán lý thuyết. Băng có kích thước khoảng 1.6kb được thời gel để thu nhận cassette chứa gen *GmEXPI* phục vụ cho việc thiết kế vector tái tổ hợp.

Cắt mở vòng vector chuyển gen pCB301

Sử dụng enzyme HindIII xử lý đối với vector chuyển gen pCB301 có thể nhận được hai phân đoạn DNA với kích thước 5.502bp và 60bp, trong đó phân đoạn thứ nhất là phân đoạn đích cần thu nhận bằng thời gel để thiết kế vector tái tổ hợp.

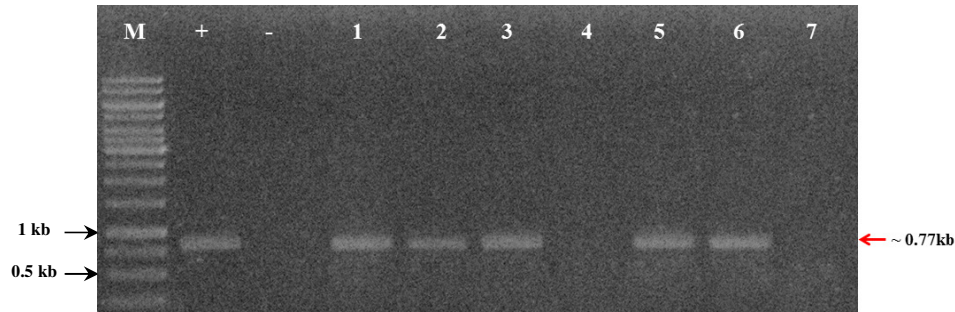
Tạo vector tái tổ hợp mang cấu trúc mang gen đích

Sử dụng T4 ligase để gắn cấu trúc có trình tự CaMV35S_ *GmEXPI*_c-myc_KDEL_polyA vào plasmid pCB301 mở vòng. Do hai cấu trúc trên đều được xử lý bằng một loại enzyme giới hạn (HindIII) tạo các đầu dính giống nhau nên việc gắn của đoạn nạp vào vector mở vòng có thể xảy ra hai khả năng là gắn xuôi và gắn ngược. Tuy nhiên, ở cả hai cấu trúc xuôi và ngược, gen *GmEXPI* đều được khởi động phiên mã bởi CaMV35S và có khả năng tạo sản phẩm phiên mã mang theo sau là trình tự c-myc_KDEL_polyA.

Vector tái tổ hợp trên được biến nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E.coli* DH5α bằng sốc

nhệt để nhân dòng. Vi khuẩn sau biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin. Thực hiện PCR-colony các khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu

(SoyEXP1F/SoyEXP1R) để tìm dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp, kết quả thể hiện ở Hình 5..

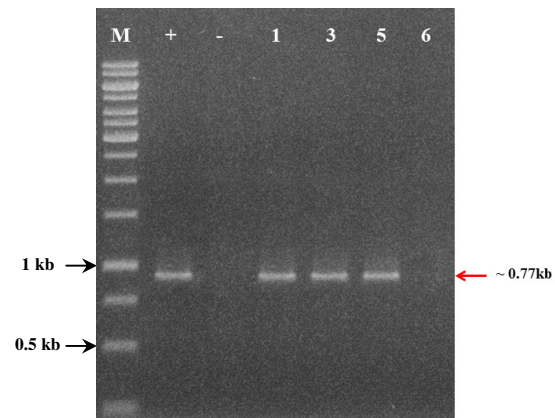


Hình 5. Kiểm tra kết quả Colony gen *GmEXP1* các dòng vi khuẩn trên agrose 0.8%.

Các dòng vi khuẩn dương tính (dòng 1, 2, 3, 5, và 6) được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin thu sinh khối tách plasmid tái tổ hợp. Đây chính là cấu trúc vector cần thiết kể: pCB301_CaMV35S_GmEXP1_c-myc_KDEL_polyA để chuyển gen và biểu hiện ở tế bào thực vật.

Biến nạp vector tái tổ hợp mang gen chuyển vào Agrobacterium tumefaciens CV58

Cấu trúc vector đã thiết kế được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 bằng kỹ thuật điện xung. Vi khuẩn *A.tumefaciens* sau khi biến nạp được nuôi cấy trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin. Lựa chọn những khuẩn lạc tốt, phát triển đồng đều chuyển sang môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh kanamycin nuôi cấy để thu sinh khối, tách plasmid. Tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen *GmEXP1* trên plasmid của các dòng vi khuẩn tương ứng bằng PCR với cặp mồi SoyEXP1F/SoyEXP1R. Kết quả kiểm tra (Hình 6.) cho thấy, các dòng khuẩn lạc 1, 3, 5 là dương tính, nghĩa là mang gen đích *GmEXP1*.



Hình 6. Kiểm tra kết quả PCR phát hiện plasmid mang gen *GmEXP1* trên agrose 0.8%.

Các dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* có plasmid tái tổ hợp chứa gen *GmEXP1* được giữ chủng, sử dụng để biến nạp vào thực vật.

Sơ bộ phân tích cây chuyển gen

Chuyển gen vào cây thuốc lá mô hình (N. tabacum K326)

Kết quả chuyển gen vào cây thuốc lá mô hình *N. tabacum* thể hiện ở Bảng 2..

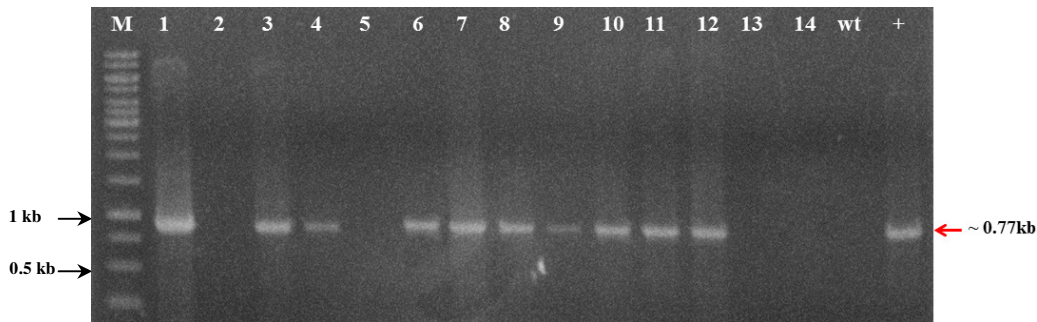
Bảng 2. Thống kê số lượng các mẫu chuyển gen vào cây thuốc lá mô hình *N. tabacum*

Stt	Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi trên môi trường ra rễ	Số cây ra giá thể
1	30	30	88	74
2	30	29	87	75
3	40	38	102	93
Tổng	100	97	277	242

Phân tích cây thuốc lá chuyển gen

Tiến hành thu mẫu 44 cây thuốc lá tái sinh, tách chiết và tinh sạch DNA, thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (SoyEXP1F/SoyEXP1R) để kiểm tra sự có mặt của gen *GmEXP1*. Kết quả kiểm tra cho thấy có

32/44 cây tái sinh dương tính với phản ứng PCR. Như vậy có thể thấy, quá trình chuyển gen đã thực hiện thành công khi đưa cấu trúc *GmEXP1* vào cây thuốc lá mô hình nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*.



Hình 7. Kết quả PCR phát hiện một số dòng thuốc lá mang gen *GmEXP1* trên agrose 0.8%.

Các cây thuốc lá dương tính với phản ứng PCR được tiếp tục chăm sóc để kiểm tra sự biểu hiện gen *GmEXP1* bằng Western Blot và phân tích thể hệ sau của chúng để có thể kết luận về sự di truyền cấu trúc gen chuyển.

4. Kết luận

Thiết kế thành công vector tái tổ hợp pCB301 mang promoter CaMV35S và cấu trúc chứa gen đích (*GmEXP1_c-myc_KDEL_polyA*) xác định protein expansin kéo giãn thành tế bào. Thực hiện chuyển thành công cấu trúc trên vào mô thuốc lá *N. tabacum*

K326, tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trên cây thuốc lá tái sinh cho thấy 32/44 dòng mang gen *GmEXP1*. Qua đó có thể thấy, gen *GmEXP1* trong vector tái tổ hợp đã thiết kế có thể được sử dụng để chuyển vào các cây trồng quan tâm nhằm cải thiện khả năng chịu hạn bằng sự phát triển mạnh của hệ rễ.

Tài liệu tham khảo

[1] Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thuý Hương, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Hà (2011). Gen và đặc tính chịu hạn của cây đậu tương. Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.

- [2] Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, and Tran LS (2011). Genom-Wide Expression Proling of Soybean Root and Shoot Tissues under Dehydration Stress. *DNA Research* 18: 17 - 29.
- [3] Kaspar TC, Taylor HM and Shibles RM (1984). Taproot elongation rates of Soybean cultivars in the glasshouse and their relation to field rooting depth. *Crop Sci* 24: 916 - 920.
- [4] Brummall DA, Harpester MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, and Dunsmuir P (1999). Modification of Expansin Protein Abundance in Tomato Fruit Alters Softening and Cell Wall Polymer Metabolism during Ripening. *Plant Cell* 11: 2203 - 2216.
- [5] Cosgrove DJ (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321 - 326.
- [6] Lucca P, Ye X, Potrykus I (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol Breed* 7: 43- 49.
- [7] Li Y, Catherine P. Darley, Veronica Ongaro, Andrew Fleming, Ori Schipper, Sandra L. Baldauf, and Simon J. McQueen-Mason (2002). Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origine. *Plant Physiol* 128: 854 - 864.
- [8] Lee DK, Ahn JH, Song SK, Choi YD, Lee JS (2003). Expression of an Expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol* 131: 985 - 977.
- [9] Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Cloning, Designing Vector and Transgenic *GmEXPI* Structure in to *Nicotinana Tabacum*

Lò Thanh Sơn¹, Hồ Mạnh Tường², Lê Văn Sơn²,
Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu³

¹*Taybac University*

²*Institute of Biotechnology (IBT)- Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

³*Thainguyen University*

Abstract: Expansin have an important role in the relaxation phase of cell growth in the domain of soybean root systems. Two functional regions (DPBB and Pollen allerg) determined as a protein expansin likely impact break the link between non - chemotherapy with micro fiber polysaccharides cellulose cell walls easily help dilation (both horizontally and vertically) under health impacts of water policy. *GmEXPI* activity of genes (identified expansin protein) related to the prolonged soybean roots, enhances drought tolerance of soybean plants. In this paper, we present the results of the design vector carrying the gene structure *GmEXPI* was crossed with a snippet of C- myc and KDEL peptide, under the control of CaMV35S promoter; tranfered into plant leaf pieces (*Nicotinana tabacum*) throughout *A.tumefaciens*. The results have showed that the presence of gene in 44 tobacco lines were test by PCR . The PCR showed that 32/44 tobacco lines carrying gene transferred *GmEXPI*, so this structure can be used to transfer gene into interes crops.

Keywords: Expansin, *Glycine max*, *GmEXPI*, prolonged root cell walls stretch.