

Thiết kế các hệ vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF liên quan đến tính chịu hạn của lúa

Nguyễn Duy Phương¹, Najaren Tuteja², Phạm Xuân Hội^{1,*}

¹*Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

²*Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật di truyền và Công nghệ sinh học New Delhi, Ấn Độ (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India)*

Nhận ngày 12 tháng 9 năm 2012

Chỉnh sửa ngày 27 tháng 9 năm 2012; chấp nhận đăng ngày 22 tháng 2 năm 2013

Tóm tắt. Nhân tố phiên mã NLI-IF (Nuclear LIM interactor-interacting factor) đã được chúng tôi phân lập trong nghiên cứu trước đây và xác định cảm ứng với các điều kiện stress như hạn, mặn, nhiệt độ cao, mất nước. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế các vector tái tổ hợp biểu hiện trong tế bào thực vật mang trình tự mã hóa NLI-IF, được điều khiển bởi các promoter 35S, Lip9 và Ubiquitin. Trình tự mã hóa NLI-IF được tách dòng từ vector nhân dòng pGEMT/NLI-IF và lắp ghép vào 2 hệ vector biểu hiện pCAMBIA1301 và pBI101. Các vector tái tổ hợp pC1301/35S-NLI-sense, pC1301/35S-NLI-antisense, pB101/Lip9-NLI và pB101/Ubi-NLI sẽ được sử dụng cho nghiên cứu chuyển gen vào cây mô hình thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Từ khóa: Chịu hạn, chuyển gen, NLI-IF, nhân tố phiên mã, promoter Lip9, Ubiquitin.

1. Mở đầu

Sản xuất lương thực nói chung và sản xuất lúa gạo nói riêng ở Việt Nam đang phải đối mặt với những thách thức rất lớn do điều kiện bất lợi của môi trường (hạn, mặn, lạnh...) gây nên. Hướng nghiên cứu tạo giống cây trồng chuyển gen là một hướng đi mới, đang được rất nhiều nhà khoa học nông nghiệp Việt Nam tiếp cận. Các gen liên quan đến tính chống chịu của thực vật được chia thành 2 nhóm chính: (1) nhóm gen chức năng mã hóa cho các protein chức năng trực tiếp tham gia vào các quá trình sửa

chữa, bảo vệ... của tế bào và (2) nhóm gen điều khiển mã hóa các protein tham gia điều hòa hoạt động của các gen chức năng liên quan đến quá trình chống chịu stress của thực vật. Các nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là họ gen lớn [1]. Gần đây, rất nhiều nghiên cứu về nhân tố phiên mã được thực hiện trên cây mô hình *Arabidopsis* và các loài thực vật khác đã chứng minh vai trò quan trọng của chúng trong quá trình điều hòa phản ứng của thực vật trong các điều kiện bất lợi môi trường. Thực nghiệm đã chứng minh, sự biểu hiện của các nhân tố phiên mã kích hoạt sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng, do đó làm tăng cường khả năng chịu hạn ở thực vật. Vì vậy, các nghiên cứu về các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-37481321.
E-mail: xuanhoi.pham@gmail.com

tính chịu hạn đang trở thành định hướng nghiên cứu đầy tiềm năng trong việc chọn tạo giống chịu hạn.

Đặc điểm đặc trưng của các protein điều khiển (nhân tố phiên mã) là có hai vùng hoạt động (domain): (1) vùng hoạt hoá các protein chức năng (activation domain) và (2) vùng liên kết (binding domain) với các trật tự ADN đặc hiệu (cis-acting element) trên vùng điều khiển của gen (promoter). Dựa vào đặc tính bám ADN, kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men được hình thành để phân lập các nhân tố phiên mã. Nhân tố phiên mã đầu tiên (OLF-1) được phân lập bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men [2] và ngay lập tức trở thành phương pháp đầy tiềm năng trong việc phân lập các gen mã hóa các protein có khả năng bám ADN. Rất nhiều các nghiên cứu tương tự sau đó đã được thực hiện để phân lập và xác định các nhân tố phiên mã có liên quan đến khả năng chống chịu của thực vật như AREB/ABF, AP2/ERF, AtMYC, AtMYB, NAC, DREB, ZFHDRS. Các nghiên cứu trên cây mô hình được chuyển gen mã hóa các nhân tố phiên mã này đều chứng minh vai trò tăng cường khả năng chống chịu của thực vật đối với stress [3-13].

Trong nghiên cứu công bố trước đây, chúng tôi đã phân lập và xác định được một nhân tố phiên mã mới, đặt tên là OsNLI-IF (Nuclear LIM interactor-interacting factor) có khả năng liên kết với trình tự ADN lõi nằm trong 2 promoter JRC0332 và JRC0528 cảm ứng với điều kiện hạn và mặn [14, 15]. Các nghiên cứu ban đầu ở cây lúa đại (wide type) cho thấy *OsNLI-IF* tăng cường biểu hiện trong các điều kiện stress như hạn, mặn, lạnh và mất nước. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo kết quả thiết kế các vector chuyển gen mang trình tự mã hóa của nhân tố phiên mã NLI-IF, đặt dưới sự điều khiển của các loại promoter 35S, Lip9 và

Ubiquitin. Các kết quả nghiên cứu này là tiền đề để nghiên cứu chức năng của NLI-IF, từ đó hướng tới mục tiêu tạo giống lúa chuyển gen có khả năng chống chịu cao với các điều kiện bất lợi của môi trường.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF đã được tách dòng giữ trong vector pGEMT do phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Hệ vector chuyển gen pCAM1301, pRT101 do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp. Hệ vector chuyển gen pBI101 và vector mang promoter Ubiquitin và Lip9 (pUC19-Ubi-NosT và pUC19-Lip9-NosT) do Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Nông nghiệp Quốc tế (Nhật Bản) cung cấp.

2.2. Phương pháp

Thiết kế hệ thống vector biểu hiện pCAMBIA 1301 mang trình tự mã hóa NLI-IF

Vector tách dòng pGEMT/NLI và “vector cho” pRT101 được xử lý đồng thời bằng *EcoRI*. Trình tự mã hóa NLI-IF được ghép nối vào “vector cho” pRT101 để tạo cấu trúc biểu hiện gen 35S-NLI-NosT. Cấu trúc 35S-NLI-NosT được chèn vào vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *HindIII* của vector chuyển gen pCAMBIA 1301.

Thiết kế hệ thống vector biểu hiện pBI101 mang trình tự mã hóa NLI-IF

Trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF được tách dòng từ vector nhân dòng pGMET/

NLI, sử dụng cặp mồi đặc hiệu của *NLI-IF* đã được thiết kế vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *SmaI*. Gen *NLI-IF* được ghép nối vào vector biểu hiện pB101/Lip9 và pB101/Ubi tại vị trí nhận biết của *SmaI* nhờ enzyme T4 Ligase (Invitrogen).

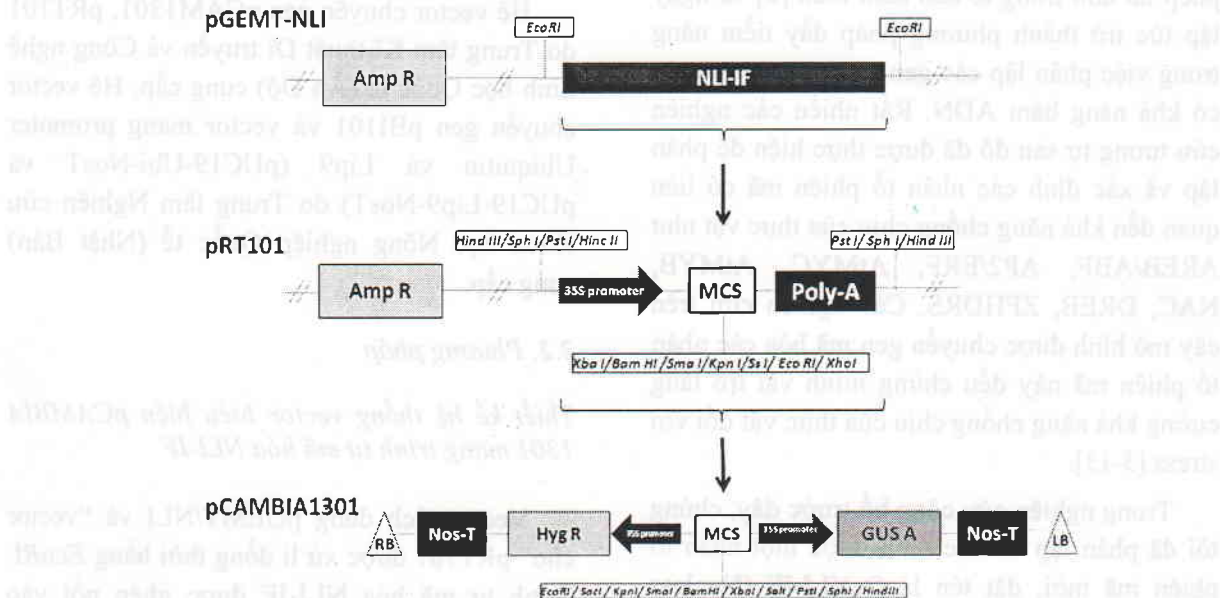
Giải và phân tích trình tự gen

Vector tái tổ hợp pBI-Ubi/NLI và pBI-Lip9/NLI được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự (1977) [16] và đọc bằng hệ thống máy giải trình tự ABI 3100. Kết quả giải trình tự được phân tích trên phần mềm Genetyx 4.0.

3. Kết quả

Thiết kế vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang gen *NLI-IF* được điều khiển bởi promoter 35S.

Để tạo hệ vector biểu hiện được điều khiển bởi promoter 35S, chúng tôi sử dụng 2 hệ thống vector: “vector cho” pRT101 mang trình tự khởi động quá trình phiên mã 35S và trình tự kết thúc phiên mã NosT; “vector nhận” pCAMBIA1301 mang gen chọn lọc kháng chất kháng sinh Hygromycin và gen chỉ thị GUS-A. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang gen *NLI-IF* được tóm tắt trong hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pCAM-35S mang gen *NLI-IF*.

Vector nhân dòng pGEMT/NLI-IF và vector pRT101 được đồng thời xử lý với enzyme cắt giới hạn *EcoRI* (hình 2A). Sản phẩm cắt giới hạn sau khi được tinh sạch từ gel agarose bằng bộ kit tinh sạch ADN (Fermentas), được ghép nối với nhau, sử dụng enzyme T4 Ligase và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5 α . Kết quả kiểm tra các thể biến nạp bằng PCR với 2 cặp mồi 35S-Fw/NLI-Rv

và 35S-Fw/NLI-Fw cho thấy chúng tôi đã thu được các thể biến nạp mang 2 loại vector tái tổ hợp: vector mang trình tự mã hóa *NLI-IF* xuôi chiều (có nghĩa) pRT101/35S-NLI-sense-NosT (pR101/NLI-S) và vector mang trình tự mã hóa *NLI-IF* ngược chiều (đôi nghĩa) pRT101/35S-NLI-antisense-NosT (pR101/NLI-AS). Để khẳng định sự có mặt của gen *NLI-IF* trong vector tái tổ hợp, chúng tôi đã tinh sạch plasmid

từ các thể biến nạp dương tính và kiểm tra bằng tí PCR và cắt giới hạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy, với cặp mồi NLI-Fw/NLI-Rv, cả 2 vector tái tổ hợp đều cho băng ADN khoảng 1,3 kb, tương ứng với kích thước của gen NLI-IF (hình 2B, giếng 1 và 4). Với cặp mồi 35S-Fw/NLI-Rv, chỉ có sản phẩm PCR từ vector pR101/NLI-S cho kết quả dương

nh (hình 2B, giếng 3). Ngược lại, với cặp mồi 35S-Fw/NLI-Fw, chỉ có sản phẩm PCR từ vector pR101/NLI-AS cho kết quả dương tính (hình 2B, giếng 5). Cả hai vector tái tổ hợp này được chúng tôi sử dụng cho thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện mang trình tự có nghĩa (NLI-sense) và đối nghĩa (NLI-antisense) của *NLI-IF*.

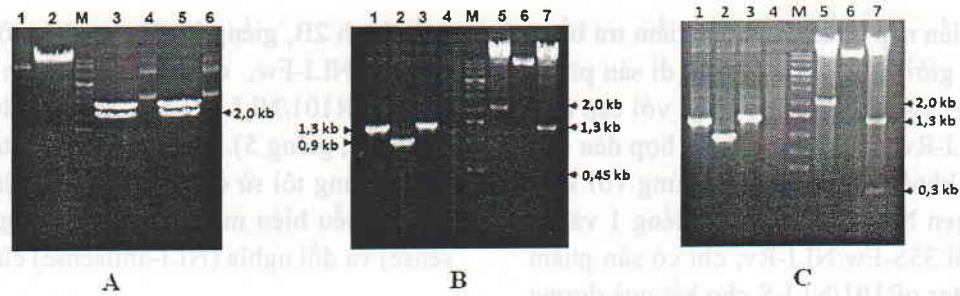


Hình 2. Kết quả ghép nối gen NLI-IF vào “vector cho” pR101.

Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pGEMT/NLI-IF (giếng 1, 2) và pR101 (giếng 3, 4) bằng *EcoRI*; giếng 1, 3: cắt giới hạn với *EcoRI*; giếng 2, 4: vector nguyên bản. B. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là pRT/NLI-S (giếng 1-3) và pRT/NLI-AS (giếng 4-6); giếng 1, 4: PCR với cặp mồi NLI-Fw/NLI-Rv; giếng 2, 5: PCR với cặp mồi 35S-Fw/NLI-Rv; giếng 3, 6: PCR với cặp mồi 35S-Fw/NLI-Fw (giếng 3 và 6). C. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pRT/NLI-S (giếng 1, 2) và pRT/NLI-AS (giếng 3, 4); giếng 1, 3: vector đã xử lí với *EcoRI*; giếng 2, 4: vector nguyên bản.

Chúng tôi đã xử lí đồng thời các vector pR101/NLI-S, pR101/NLI-AS và pCAMBIA 1301 với enzyme *HindIII* (hình 4) để ghép nối lần lượt các trình tự 35S-*NLI*-sense-*NosT* và 35S-*NLI*-antisense-*NosT* vào vị trí nhận biết của *HindIII* trong vector pCAMBIA1301. Hỗn hợp phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh Kanamycin (100 μ g/ml). Kết quả kiểm tra các thể biến nạp bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen (NLI-Fw/NLI-Rv) cho thấy chúng tôi đã thu được các thể biến nạp dương tính. Để khẳng định kết quả thu được, chúng tôi đã tinh sạch plasmid từ các khuẩn lạc dương tính và kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau và xử lí với enzyme cắt giới hạn *HindIII* và *EcoRI*. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen (NLI-Fw/NLI-Rv) và cặp mồi đặc hiệu của vector (35S-Fw/GUS-Rv) và cặp mồi đặc hiệu gen-

vector, chúng tôi đã thu được băng ADN có kích thước lần lượt 1,3 kb, 0,9 kb và 1,4 kb, tương ứng với các kích thước tính toán lý thuyết (hình 3B-C, giếng 1-3). Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn bằng enzyme *HindIII* cho băng ADN có kích thước 2,0 kb đúng theo tính toán lý thuyết (hình 3B-C, giếng 5). Kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện pCAM1301 mang 2 trình tự có nghĩa (sense) và đối nghĩa (antisense) của gen *NLI*, đặt dưới sự điều khiển của promoter 35S. Kết quả này càng được khẳng định khi chúng tôi xử lí vector tái tổ hợp với enzyme *EcoRI*, sản phẩm cắt giới hạn khi được điện di trên gel agarose 1% cho 3 băng ADN: bộ khung vector pCAMBIA1301 12 kb, gen NLI-IF 1,3 kb và promoter 0,45 kb (đối với vector pCAM-NLI-S) hoặc vùng kết thúc phiên mã 0,3 kb (đối với vector pCAM-NLI-AS) (hình 3B-C, giếng 7)



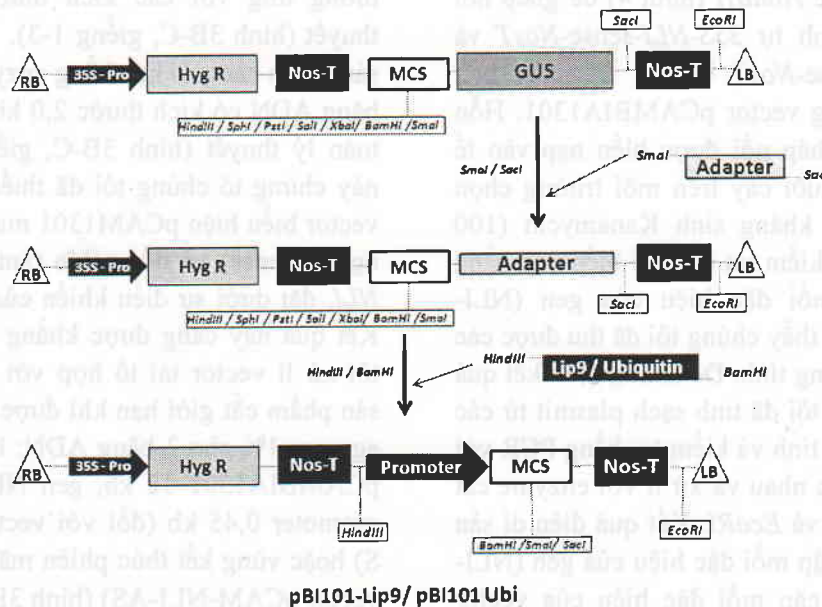
Hình 3. Kết quả ghép nối trình tự biểu hiện nhân tố phiên mã NLI-IF vào vector pCambia1301.

Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pCambia1301 (giếng 1, 2), pRT/NLI-S (giếng 3, 4) và pRT/NLI-AS (giếng 5, 6) bằng *EcoRI*; giếng 1, 4, 6: vector nguyên bản; giếng 2, 3, 5; cắt giới hạn với *EcoRI*. B-C. Kết quả điện di sản phẩm PCR và cắt giới hạn kiểm tra kiểm tra vector pCAM/NLI-S (B) và pCAM/NLI-AS (C): giếng 1: PCR với cặp mồi NLI-Fw/NLI-Rv, giếng 2: PCR với cặp mồi 35S-Fw/GUS-Rv, giếng 3: PCR với và cặp mồi 35S-Fw/NLI-Fw, giếng 4: đối chứng âm, giếng 5: cắt giới hạn bằng *HindIII*, giếng 6: vector nguyên bản, giếng 7: cắt giới hạn bằng *EcoRI*.

Thiết kế vector biểu hiện pBI101 mang gen NLI-IF điều khiển bởi promoter Lip9 và Ubiquitin.

Để phục vụ nghiên cứu chuyển gen NLI-IF vào lúa, chúng tôi đã thiết kế hai hệ vector chuyển gen pBI101 mang gen NLI-IF: một vector điều khiển bởi promoter Ubiquitin được phân lập từ ngô – là promoter biểu hiện liên tục được sử dụng rất phổ biến trong các nghiên cứu chuyển gen vào cây lương thực; một vector

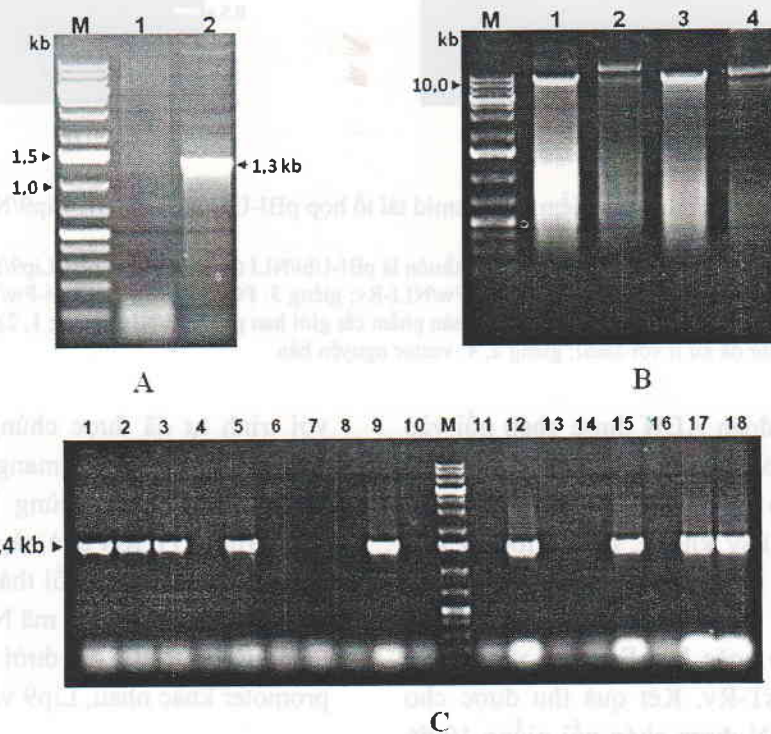
điều khiển bởi promoter Lip9 được phân lập từ lúa – là promoter chỉ cảm ứng với điều kiện stress. Vector chuyển gen pBI101 nguyên bản đã được chúng tôi xử lý với enzyme giới hạn *Sma I / Sac I* để loại bỏ gen GUS và thay thế bằng một adapter trước khi ghép nối trình tự mang promoter (Ubiquitin/ Lip9) và vùng kết thúc phiên mã (NosT) vào để tạo thành vector pBI101-Lip9-NosT (pBI-Lip9) và pBI101-Ubi-NosT (pBI-Ubi) (hình 4).



Hình 4. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pBI-Lip9 và pBI-Ubi.

Gen *NLI-IF* được chúng tôi nhân bản bằng phản ứng PCR, sử dụng Pfu polymerase, với cặp mồi đặc hiệu của gen được thiết kế thêm trình tự nhận biết của enzyme *SmaI* và gắn thêm 1 nhóm $-PO_4$ ở đầu 5' (hình 5A). Nhờ có nhóm $-PO_4$ được gắn thêm, sản phẩm PCR sau khi tinh sạch có thể ghép nối trực tiếp với vector mạch thẳng pBI-Lip9 và pBI-Ubi đã

được xử lí trước đó với *SmaI* và khử gốc phosphate nhằm loại bỏ khả năng tự đóng vòng trong phản ứng ghép nối (hình 5B). Bằng phản ứng PCR, chúng tôi đã sàng lọc được một số thể biến nạp mang vector pBI-Lip9 và pBI-Ubi chứa trình tự có nghĩa (sense) của gen *NLI-IF* (hình 5C).



Hình 5. Kết quả ghép nối trình tự biểu hiện nhân tố phiên mã *NLI-IF* vào vector pBI101-Ubi và pBI101-Lip9.

Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi PO_4 -*SmaI*-*NLI-Fw*/ PO_4 -*SmaI*-*NLI-Rv*, giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: sản phẩm PCR với khuôn là pGEMT/*NLI-IF*. B. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn bằng *SmaI*; giếng 1, 2) và pBI101-Lip9 (giếng 3, 4); giếng 1, 3: sản phẩm cắt giới hạn bằng *SmaI*; giếng 2, 4: vector nguyên bản. C. Kết quả điện di sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc mang pBI-Ubi/*NLI* (giếng 1-10) và pBI-Lip9/*NLI* (giếng 11-18); giếng 1-5: PCR với cặp mồi Ubi-Fw/*NLI-Rv*; giếng 6-10: PCR với cặp mồi Ubi-Fw/*NLI-Fw*; giếng 11-14: PCR với cặp mồi Lip9-Fw/*NLI-Rv*; giếng 15-18: PCR với cặp mồi Lip9-Fw/*NLI-Rv*.

Để khẳng định sự có mặt của plasmid tái tổ hợp trong các thể biến nạp, chúng tôi đã tách chiết plasmid và kiểm tra bằng PCR và phản ứng cắt giới hạn. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen

(*NLI-Fw*/*NLI-Rv*) và cặp mồi vector (*Lip9-Fw*/*NosT-Rv* và *Ubi-Fw*/*NosT-Rv*) chúng tôi đã thu được các băng ADN đúng với kích thước lí thuyết, tương ứng là 1,3 kb và 1,4 kb (hình 6A). Khi xử lí plasmid tái tổ hợp với *SmaI*,

chúng tôi thu được 2 băng ADN có kích thước đúng với tính toán lí thuyết trên bản gel agarose 1% (hình 6B). Kết quả này cho phép chúng tôi

bước đầu khẳng định đã ghép nối thành công trình tự mã hóa của gen *NLI-IF* vào vector biểu hiện pBI101.

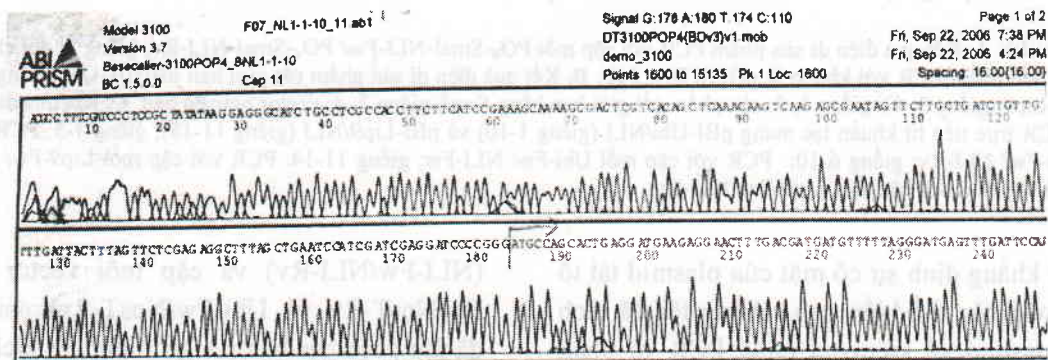


Hình 6. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp pBI-Ubi/NLI và pBI-Lip9/NLI.

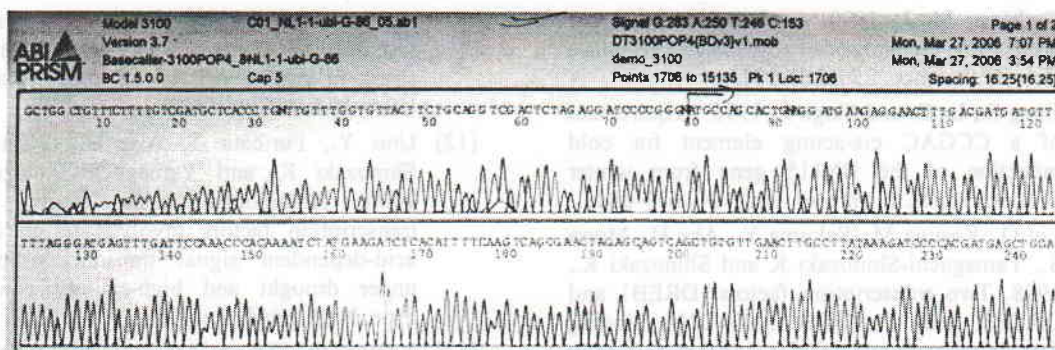
Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là pBI-Ubi/NLI (giếng 1-3) và pBI-Lip9/NLI (giếng 4-6); giếng 1, 4: đối chứng âm; giếng 2, 5: PCR với cặp mồi NLI-Fw/NLI-Rv; giếng 3: PCR với cặp mồi Ubi-Fw/ NosT-Rv; giếng 6: PCR với cặp mồi Lip9-Fw/ NosT-Rv. B. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pBI-Ubi/NLI (giếng 1, 2) và pBI-Lip9/NLI (giếng 3, 4); giếng 1, 3: vector đã xử lí với *SmaI*; giếng 2, 4: vector nguyên bản.

Để kiểm tra đoạn ADN được ghép nối vào vector pBI101 có đúng là trình tự mã hóa của gen *NLI-IF* và có bị đột biến (do quá trình nhân bản bằng PCR) hay không, chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gen bằng hệ thống máy ABI3100 với 2 loại mồi: Lip9-Fw (đối với vector pBI-Lip9) hoặc Ubi-Fw (đối với vector pBI-Ubi) và NosT-Rv. Kết quả thu được cho thấy trình tự ADN được ghép nối giống 100%

với trình tự đã được chúng tôi công bố [14]. Trình tự giải được mang đầy đủ promoter Ubiquitin/ Lip9 và vùng kết thúc phiên mã NosT (hình 7). Kết quả này cho phép chúng tôi khẳng định đã ghép nối thành công trình tự mã hóa cho nhân tố phiên mã *NLI-IF* vào hệ vector biểu hiện pBI101, đặt dưới sự điều khiển của 2 promoter khác nhau, Lip9 và Ubiquitin.



A



B
 Hình 7. Một phần kết quả giải trình tự vector pBI-Lip9/NLI (A) và pBI-Ubi/NLI (B) bằng môi xuôi của vector (Lip9-Fw và Ubi-Fw).

4. Kết luận

Bằng các kĩ thuật sinh học phân tử cơ bản, chúng tôi đã thiết kế thành công hai hệ vector biểu hiện mang trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF liên quan đến tính chống chịu stress ở lúa: pCAMBIA1301 và pBI101. Đối với hệ vector pCAMBIA, chúng tôi đã thiết kế 2 cấu trúc biểu hiện mang trình tự mã hóa NLI-IF đặt dưới sự điều khiển của promoter 35S, một cấu trúc mang trình tự mã hóa xuôi chiều (pCAM/NLI-sense) và một cấu trúc mang trình tự mã hóa ngược chiều (pCAM/NLI-antisense). Đối với hệ vector pBI, chúng tôi đã thiết kế 2 cấu trúc biểu hiện mang trình tự mã hóa xuôi chiều của NLI-IF, đặt dưới sự điều khiển của hai promoter : promoter Lip9 cảm ứng với điều kiện hạn được phân lập từ lúa và promoter Ubiquitin biểu hiện liên tục được phân lập từ ngô. Bốn plasmid tái tổ hợp mang trình tự mã hóa NLI-IF này đã được chúng tôi tinh sạch, giải trình tự và bảo quản để sử dụng cho các nghiên cứu chuyển gen sau này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu chức năng của các gen mã hóa

nhân tố phiên mã biểu hiện trong điều kiện hạn, mặn ở lúa”, thuộc Chương trình Tài trợ Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên năm 2012 của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia. Nghiên cứu cũng nhận được sự hỗ trợ khoa học từ Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật di truyền và Công nghệ sinh học New Delhi, Ấn Độ (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India). Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *J. Exp. Bot.*, 58 (2007) 221.
- [2] Wang M.M. and Reed R. R., Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*, 364 (1993) 121.
- [3] Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.
- [4] Baker S. S., 1994. The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting element that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 24: 701-713.
- [5] Choi H, Hong J. H., Ha J., Kang J. Y., Kim S. Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element-binding factor. *J. Biol. Chem.*, 275: 1723-1730.

- [6] Gultinan M. J., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250: 267-271.
- [7] Jiang C., Lu B. and Singh J., 1996. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 30: 679-684
- [8] Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406.
- [9] Thomashow M. F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 571-599.
- [10] Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9): 2481-98.
- [11] Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 20623-20628.
- [12] Uno Y., Furihata T, Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11632-11637.
- [13] Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251-264.
- [14] Nguyen Duy Phuong, Tran Tuan Tu, Pham Xuan Hoi, 2012. Construction of rice drought cDNA library and identification of NLI-IF1 using Yeast One Hybrid screening. *J. Biol.*, 34(1):114-122.
- [15] Pham X. H., Tran T. T., 2009. Identification and sequence analysis of a DREB subfamily transcription factor involved in drought stress tolerance from rice. *J. Biol.*, 31(4): 74-81.
- [16] Sanger F., S. Micklen, and AR Coulson, 1977. DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.

Construction of expression vectors containing drought stress-involved transcription factor NLI-IF

Nguyễn Duy Phương¹, Najaren Tuteja², Phạm Xuân Hội¹

¹*Agricultural Genetic Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

²*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, Indian*

We isolated a transcription factor NLI-IF (Nuclear LIM interactor-interacting factor) and identified that it is induced by stress (water-deficit, dehydrated, hot and salinity) conditions. Here, we report the results of designing recombinant expression vectors containing NLI-IF-encoding sequence which is under the control of different promoters: 35S, Lip 9 and ubiquitin. NLI-IF-encoding sequence was excised/amplified from cloning vector pGEMT/NLI-IF and inserted into 2 expression vectors systems: pCAMBIA1301 and pBI101. The recombinant vectors pC1301/35S-NLI-sense, pC1301/35S-NLI-antisense, pBI101/Lip9-NLI and pBI101/Ubi-NLI will be transformed into plant using *Agrobacterium tumefaciens*.

Keywords: Drought tolerance, transgenic, NLI-IF, transcription factor, Lip 9, Ubiquitin.