

TẠO CHỦNG VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens* MANG VECTOR TÁI TỔ HỢP pGreen3-PR1

Nguyễn Thị Hương¹, Nguyễn Duy Linh¹, Dương Thị Thanh², Bùi Tri Thức^{2,*}

TÓM TẮT

Nấm *Verticillium* được biết là nguyên nhân gây bệnh héo và già sớm ở nhiều loại cây trồng, gây ảnh hưởng lớn đến năng suất cây trồng. Hiện nay, vẫn chưa có phương pháp đặc trị loại nấm này mà chỉ sử dụng hóa chất trị nấm thông thường. Sử dụng phương pháp sinh học phân tử nhằm ức chế sự xâm nhiễm của nấm vào ký chủ đang được quan tâm nghiên cứu. Gene *PR1* được biết là có liên quan đến giai đoạn đầu quá trình xâm nhiễm của nấm vào ký chủ. Để nghiên cứu chức năng gene *PR1* ở nấm *Verticillium*, đã tiến hành tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) mang vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*. Nghiên cứu này sử dụng phần mềm SnapGen Viewer và các kỹ thuật cải biến di truyền để tạo vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*, trong đó gene *PR1* được gắn với gene GFP thông qua 15 nucleotide mã hóa cho một đoạn protein liên kết. Sử dụng phần mềm SnapGen Viewer đã tạo được mô hình vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*. Trình tự gene *PR1* và promoter đã được nhân lên bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR tạo ra bằng 1,9 kb được gắn vào vector pGreen3 để tạo vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*. Vector tái tổ hợp tạo ra được cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *EcoRV* và giải trình tự bằng hai mồi PR1-P1 và GFP-R. Kết quả kiểm tra trình tự đoạn ADN gắn vào vector tái tổ hợp có sự tương đồng 100% với trình tự đoạn ADN đã chèn vào vector được thiết kế bằng phần mềm SnapGen Viewer. Sau đó, vector đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp sốc nhiệt. Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* tạo ra mang vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1* sẵn sàng cho nghiên cứu về vị trí, chức năng của gene *PR1* trên nấm *Verticillium*.

Từ khóa: Gene *PR1*, pGreen3, vector tái tổ hợp, *Verticillium*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Verticillium* thuộc một chi nấm trong bộ Ascomycota. Chúng là nấm gây bệnh ở thực vật, nguyên nhân chính gây lên bệnh héo và già sớm ở nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế cao như: Cà chua, cải dầu, khoai tây, cải bắp, súp lơ, ớt chuông... [1, 2, 3]. Nấm *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* (*V. dahliae*) và *Verticillium longisporum* là ba chủng thuộc nấm *Verticillium* được tìm thấy ở nhiều nơi trên thế giới. Các chủng nấm này có khả năng thích nghi trên 200 ký chủ khác nhau. Thời gian tồn tại của mầm bệnh tự do trong đất lên đến 15 năm nhờ khả năng tạo thể nghỉ. Thể nghỉ này thường có lớp melanin bảo vệ, nên có khả năng kháng điều kiện ngoại cảnh bất

thuận như tia UV của ánh sáng mặt trời, enzyme trong hệ tiêu hóa của động vật [1, 2]. *Verticillium dahliae* cũng giống như các chủng nấm còn lại, chúng tấn công vào rễ của cây trồng từ giai đoạn rất sớm và gây nên các bệnh héo rũ cho cây trồng. Những cây trồng đã bị nhiễm nấm *V. dahliae* khi đã biểu hiện bệnh thường không chữa được. Nấm *V. dahliae* thường phát tán khá nhanh do có khả năng hình thành bào tử nhỏ và thể nghỉ. Cả hai thể này đều phát tán rất nhanh theo đất và nước trên bề mặt do kích thước rất nhỏ [1, 2, 4, 5]. Vì vậy, việc phòng chống bệnh do nấm *V. dahliae* gây ra gặp nhiều khó khăn. Hiện vẫn chưa tìm được loại thuốc đặc trị nấm bệnh này một cách hiệu quả mà chủ yếu vẫn sử dụng hóa chất để diệt nấm. Các loại hóa chất này thường gây ảnh hưởng tiêu cực tới cân bằng sinh thái, vật nuôi và con người [1, 2].

Với mục tiêu phát triển phương pháp trị nấm hiệu quả, ít độc hại cho con người và vật nuôi. Việc

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

² Khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

* Email: buitrithuc@tuaf.edu.vn

sử dụng phương pháp sinh học phân tử nhằm ức chế biểu hiện của các gene quan trọng liên quan đến bước đầu quá trình xâm nhiễm của nấm vào cây trồng đang được quan tâm nghiên cứu. Để thực hiện hướng nghiên cứu đó, trước tiên vai trò của các gene liên quan đến bước đầu xâm nhiễm vào cây trồng cần được quan tâm nghiên cứu. Gene *PR1* được biết có liên quan đến khả năng kháng điều kiện ngoại cảnh bất thuận. Và cũng được biết đến với vai trò như gene điều khiển sự biểu hiện của một số gene khác. Theo nghiên cứu của Cappellini và cs (2019), Wang (2009), sự biểu hiện của gene *PR1* ở nấm *Fusarium oxysporum* tăng cường mạnh trong quá trình xâm nhiễm vào cây cà chua [6, 7]. Tuy nhiên vai trò của gene *PR1* ở nấm *V. dahliae* chưa được hiểu rõ. Nhằm tạo ra công cụ phục vụ cho nghiên cứu vị trí, chức năng, sự tương tác của protein *PR1* với các protein khác trong nấm *V. dahliae*, đã thực hiện nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH5 α , vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng AGL1, nấm *V. dahliae* và vector pGreen3 được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và Di truyền, Đại học Goettingen, Cộng hòa Liên bang Đức. Vi khuẩn *E. coli* được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, trong khi vi khuẩn *A. tumefaciens* và nấm *V. dahliae* được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25°C. Kít Phusion ADN polymerase được cung cấp bởi hãng Thermo Scientific. Các hóa chất dùng tạo môi trường nuôi cấy được cung cấp bởi hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Công ty TNHH thành viên sinh hóa Phù Sa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách ADN tổng số từ sợi nấm *V. dahliae*

Nấm *V. dahliae* được nuôi tăng sinh trong môi trường potatoes dextro broth (PDB), sợi nấm được thu bằng cách lọc với màng lọc miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Germany) và nghiền

thành bột mịn trong nitơ lỏng. Bột nấm này sẽ được sử dụng để tách ADN. Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN được cải biến từ phương pháp của Kolar và cs (1998) [8]. Khoảng 1,0 g bột nấm đã được nghiền mịn nói trên được cho vào ống eppendorf (2 ml). Sau đó bổ sung 1 ml dung dịch tách ADN (50 mM Tris pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS và 1% 2-Mercaptoethanol) vào ống chứa bột nấm nói trên, trộn đều bột nấm và dung dịch tách trước khi ủ ở 65°C trong 1 giờ. Hỗn hợp trên được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Tiếp đó, 1.000 μ l dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf 2 ml mới để trộn với 800 μ l dung dịch phenol: chloroform (24 : 1). Hỗn hợp này được ly tâm trong vòng 20 phút ở 13.000 vòng/phút. Dịch nổi được sử dụng để kết tủa ADN bằng cách chuyển 400 μ l dung dịch nổi sang ống eppendorf 1,5 ml mới có chứa 600 μ l dung dịch isopropanol. Hỗn hợp này được đảo đều trước khi ly tâm với tốc độ tối đa trong vòng 10 phút. Cặn ADN thu được sẽ được làm khô ở 37°C trong vòng 30 phút trước khi hòa tan với 50 μ l dung dịch TE. ARN trong mẫu ADN thu được sẽ được loại bỏ bằng RNase (10 mg/ml) khi ủ trong 65°C trong 30 phút. Chất lượng ADN tổng số được kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.2. Phương pháp thiết kế cặp mồi nhân gene *PR1*

Các cặp mồi đặc hiệu để nhân gene *PR1* được thiết kế dựa trên trình tự genomic của gene *PR1* của nấm *V. dahliae* được lấy từ cơ sở dữ liệu của nấm *V. dahliae* JR2 trên trang Ensembl fungi [9]. Trình tự 2.000 bp phía trước gene vào toàn bộ vùng đọc mở open reading frame (ORF) của gene *PR1* được đưa vào chương trình Primer 3 plus để thiết kế mồi và kiểm tra [10, 11]. Các mồi được thiết kế dựa trên một số tiêu chuẩn sau: Kích thước mồi dao động từ 18-22 bp, tỷ lệ GC từ 30-60%, nhiệt độ gắn mồi từ 55-65°C, kích thước sản phẩm PCR dao động từ 1.800 - 2.000 bp, sự khác nhau giữa mồi xuôi và mồi ngược không quá 5°C. Vùng ADN được nhân chứa khoảng 1.300 bp phía trước của gene và vùng đọc mở gene không chứa bộ ba kết thúc. Cặp mồi thu được từ chương trình sẽ được bổ sung đầu treo phù hợp cho quá trình gắn nối bằng enzyme T4 ADN polymerase. Đầu treo của mồi

xuôi gồm 15 nucleotide có trình tự bổ sung với đoạn ADN liền kề trên plasmid pGreen3. Đầu treo của mỗi ngược gồm 15 nucleotide (GCCCTTGCTCACCAT) của đoạn ADN mã hóa cho protein liên kết (linker), phần giúp cho hai protein gắn với nhau một cách linh động và 15 nucleotide có trình tự bổ sung với đoạn ADN liền kề trên plasmid pGreen3. Đoạn nucleotide được gạch chân trong trình tự mỗi là 15 nucleotide bổ sung với trình tự trên plasmid gốc, phần chữ đậm là trình tự ADN mã hóa protein liên kết (linker).

PR1-F: AGCACTAGTCTCGAGACCGAAATCGCAGGAATG

PR1-R: GCTCACCATGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGATCTTCTTGGGTGGCTTGTA

2.2.3. Phương pháp nhân đoạn trình tự ADN bằng phản ứng PCR

Đoạn trình tự phía trước gene *PR1* và phần đọc mở của gene được nhân lên bằng chuỗi trùng hợp Polymerase chain reaction (PCR) với enzyme Phusion ADN polymerase trong môi trường đệm HF (HF buffer) với cặp mồi đặc hiệu nêu trên [12]. Phản ứng chuỗi trùng hợp được bắt đầu bằng quá trình biến tính ở 98°C trong 1 phút, sau đó phản ứng được trải qua 40 chu kỳ gồm 3 giai đoạn: biến tính ở 98°C trong 10 giây; gắn mồi ở 63°C trong 15 giây; kéo dài ở 72°C và phản ứng PCR được kết thúc sau khi kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm của phản ứng được giữ ở 8°C cho đến khi sử dụng. Sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Băng ADN tương ứng với kích thước đoạn trình tự ADN là 1.900 bp được tách ra khỏi gel agarose bằng bộ kit QIAquick Gel Extraction theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.4. Phương pháp tạo vector tái tổ hợp

Đoạn ADN mang 1,3 kb trình tự phía trước và vùng đọc mở của gene *PR1* được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng có chứa đầu treo là 15 nucleotit bổ sung với trình tự liền kề trong vector pGreen3 [13]. Đoạn ADN này sẽ được tự động tạo đầu treo và gắn vào vector pGreen3 dựa trên phản ứng tự cắt và nối của enzyme T4 DNA polymerase. Để thực hiện được điều đó, trước

tiên vector pGreen3 phải được cắt mở vòng nhờ 2 phản ứng cắt với 2 enzyme giới hạn *XhoI* và *KpnI* trong môi trường đệm R của hãng Thermor scientific. Vector đã được cắt mở vòng cùng với đoạn ADN mang trình tự phía trước gene và vùng đọc mở của gene được trộn với nhau theo tỷ lệ 1 phần từ vector và 2 phần từ sản phẩm PCR cần chèn vào vector. Một thể tích 5 ul hỗn hợp này được trộn với dung dịch đệm BSA 1 ul; NEB 21 ul và thêm enzym T4 ADN polymerase 0,2 ul. Hỗn hợp này được xử lý đặt trên đá trong 1 phút; sau đó chuyển lên bể ổn nhiệt 50°C 30 giây và cuối cùng cho lên đá 10 phút trước khi được chuyển vào tế bào khả biến *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt [14, 15].

2.2.5. Phương pháp kiểm tra vector tái tổ hợp

Sau khi các dòng khuẩn lạc *E. coli* đã phát triển ổn định trên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh kanamycin. Những dòng phát triển tốt được chọn lọc và nuôi riêng rẽ trong môi trường LB có chứa 100 µg kanamycin/l. Dung dịch nuôi cấy được thu bằng cách ly tâm, plasmid được thu bằng bộ kit Plasmid miniprep của hãng Qiagen. Các plasmid sẽ được cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *EcoRV* trong môi trường đệm R của hãng Thermor Scientific. Khi đó vector tái tổ hợp sẽ cho 2 băng ADN trên agarose gel với kích thước dự kiến lần lượt là 3,3 kb và 9,4 kb. Trong khi đó vector tự đóng vòng sẽ cho 1 băng ADN có kích thước là 10,9 kb. Một vector có kết quả cắt kiểm tra như giả thuyết nêu ra được gửi đi xác định trình tự nucleotit. Trình tự của vùng trước gene và vùng đọc mở của gene *PR1* được xác định bởi hãng Cosmogenetech lần lượt với hai mồi PR1-P1: ATGCAGATCACCACGTTTCT và GFP-R: TTAGTGTACAGCTCGTCCAT nêu trên. Trình tự nucleotide thu được sẽ được so sánh với trình tự của gene *PR1* và vùng promoter của nấm *V. dahliae* trên chương trình Align Sequence Nucleotide trên trang NCBI và chương trình MultAlin version 5.4.1 [16, 17].

2.2.6. Phương pháp chuyển gene vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

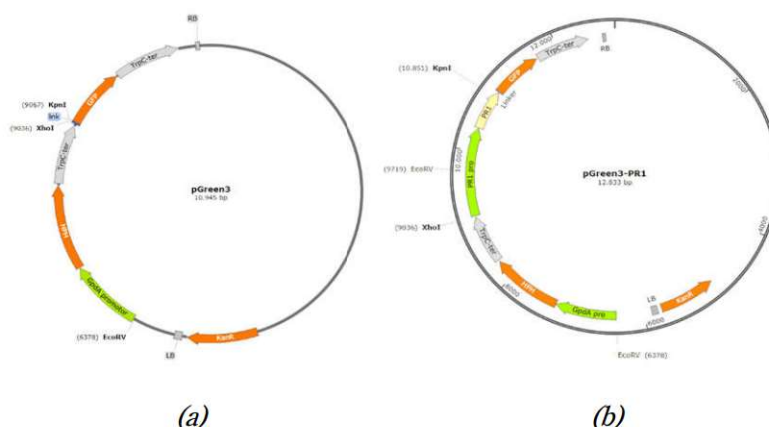
Vector tái tổ hợp sau khi đã được kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn và xác định trình tự sẽ

được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Jyothishwaran và cs (2007) [18] với một số điều chỉnh như sau: 1.000 ng plasmid tái tổ hợp được trộn với 200 μ l tế bào khả biến *A. tumefaciens* trong ống eppendorf 1,5 ml. Ống chứa hỗn hợp trên được đặt trên đá trong 10 phút, chuyển vào nitor lỏng 10 phút và sốc nhiệt ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, 600 μ l dung dịch Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) được bổ sung vào ống chứa hỗn hợp tế bào khả biến. Hỗn hợp này được nuôi ở 28°C trên máy lắc trong vòng 90 phút. Sau khi nuôi cấy dịch nuôi được ly tâm trong 5 phút với tốc độ 5.000 vòng/phút. Cặn tế bào thu được sẽ được cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin. Đĩa petri chứa dịch nuôi này được nuôi ở 25°C trong 3 ngày. Chúng vi khuẩn *A. tumefaciens* thu được được kiểm tra lại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu PR1-F/PR1-R được nêu ra ở trên.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp bằng phần mềm SnapGen Viewer

Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp pGreen3-PR1 trên phần mềm SnapGen Viewer 3.2.1 [19] được thể hiện trong hình 1. Trình tự phía trước (1,3 kb) và trình tự gene *PR1* không chứa bộ ba kết thúc được gắn vào trước cấu trúc biểu hiện của gene chọn lọc *GFP* trên vector pGreen3 giữa hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XhoI* và *KpnI* [14]. Phần trình tự nằm giữa gene *PR1* và gene *GFP*, có bố trí 15 nucleotid mã hóa cho 5 axit amin của đoạn liên kết protein (linker) giúp cho cấu trúc protein-protein linh động hơn và không làm ảnh hưởng đến khả năng thực hiện chức năng của protein nghiên cứu. Để tiến hành gắn được trình tự nói trên vào vector pGreen3, trước tiên các trình tự này cần phải được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 1. Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp pGreen3-PR1

(a) vector gốc pGreen3; (b) vector pGreen3-PR1 tái tổ hợp

3.2. Kết quả nhân dòng gene *PR1* và đoạn promoter của nó bằng phản ứng PCR

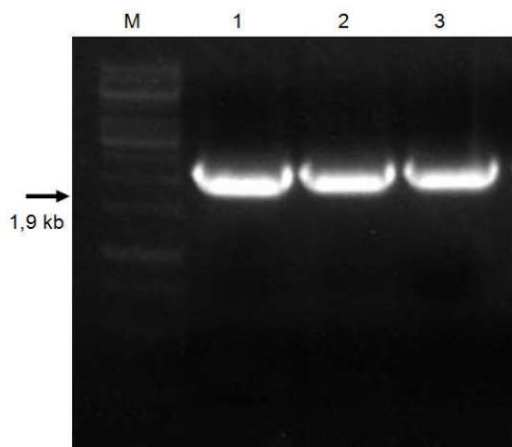
Kết quả PCR đoạn gene *PR1* và trình tự promoter của nó với cặp mồi đặc hiệu PR1-F/PR1-R được thể hiện ở hình 2.

Hình 2 cho thấy, gene *PR1* và phần promoter đã được nhân lên bằng phản ứng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho một băng duy nhất kích thước khoảng 1,9 kb tương ứng với kích thước của gene *PR1* và promoter đã được thiết kế để gắn vào

vector tái tổ hợp. Sau khi các băng ADN tương ứng trên gel được cắt ra, chúng sẽ được tinh sạch bằng bộ kit tách ADN từ gel của hãng Qiagene theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó trình tự ADN này sẽ được gắn với vector pGreen3 đã được cắt mở vòng sẵn bởi enzyme T4 ADN polymerase để tạo nên vector tái tổ hợp pGreen3-PR1. Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB có chứa 100 mg kháng sinh kanamycin. Ba chủng vi khuẩn *E. coli* sinh trưởng mạnh trên môi trường chọn lọc được

lựa chọn để tiến hành nuôi riêng trong môi trường LB lỏng qua đêm trước khi tách ADN plasmid để cắt kiểm tra.

Kết quả ở hình 2 cho thấy, gene *PR1* và phần promoter đã được nhân lên bằng phản ứng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho một băng duy nhất kích thước khoảng 1,9 kb tương ứng với kích thước của gene *PR1* và promoter đã được thiết kế để gắn vào vector tái tổ hợp. Sau khi các băng ADN tương ứng trên gel được cắt ra, chúng sẽ được tinh sạch bằng bộ kit tách ADN từ gel của hãng Qiagene theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó trình tự ADN này sẽ được gắn với vector pGreen3 đã được cắt mở vòng sẵn bởi enzyme T4 ADN polymerase để tạo nên vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1*. Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB có chứa 100 mg kháng sinh kanamycin. Ba chủng vi khuẩn *E. coli* sinh trưởng mạnh trên môi trường chọn lọc được lựa chọn để tiến hành nuôi riêng trong môi trường LB lỏng qua đêm trước khi tách ADN plasmid để cắt kiểm tra.



Hình 2. Kết quả nhân dòng trình tự phía trước 1,3 kb và gene *PR1*.

M. thang chuẩn ADN 1 kb, 1-3. Sản phẩm nhân gene PR1 và phần promoter

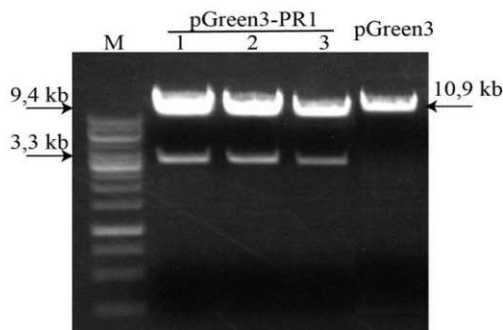
3.3. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1* bằng phản ứng cắt giới hạn

Các chủng vi khuẩn *E. coli* nói trên sau khi được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB trên máy lắc sẽ được tiến hành tách plasmid với bộ kit Plasmid miniprep của hãng Qiagene. Plasmid thu

được sẽ được sử dụng để kiểm tra và so sánh với vector gốc pGreen3 thông qua phản ứng cắt với enzyme giới hạn *EcoRV* trong môi trường đệm R của hãng Thermoscientific. Kết quả cắt kiểm tra và điện di trên gel agarose được thể hiện trong hình 3.

Kết quả ở hình 3 cho thấy, vector tái tổ hợp số 1, 2 và số 3 mang đi phân tích có 2 băng ADN sáng rõ tương ứng với kích thước lần lượt là 3,3 kb và 9,4 kb. Kích thước này phù hợp với kích thước giả định trong vector pGreen3-*PR1*. Trong vector tái tổ hợp trên phần mềm Snapgene viewer tìm thấy 2 vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *EcoRV*. Khoảng cách giữa hai enzyme cắt này lần lượt là 3,3 kb và 9,4 kb (Hình 1a). Trong khi đó vector gốc pGreen3 đối chứng chỉ có 1 băng ADN tương đương với kích thước lớn hơn băng 9,4 kb của vector tái tổ hợp. Điều này phù hợp với mô hình vector pGreen3 trên phần mềm Snapgene viewer. Trên phần mềm vector này chỉ có 1 vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *EcoRV*. Do vậy, nếu duỗi thẳng vector này ra thành đoạn ADN tại vị trí enzyme cắt giới hạn *EcoRV*, đoạn ADN này dài 10,9 kb (Hình 1b). Từ kết quả trên cho thấy, kết quả thực nghiệm với lý thuyết trên sơ đồ mô phỏng hoàn toàn trùng khớp. Từ đó có thể khẳng định đã tạo thành công vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1* phục vụ công tác nghiên cứu về chức năng, vị trí, tương tác của protein PR1.

Nghiên cứu này cho thấy, khi tạo trình tự mới có chứa 15 nucleotid bổ sung với trình tự trên vector gốc đồng thời sử dụng enzyme T4 ADN polymerase cho hiệu quả tạo vector tái tổ hợp rất cao. Chỉ chọn ngẫu nhiên 3 chủng vi khuẩn sinh trưởng tốt trên môi trường chọn lọc đem nuôi cấy trên môi trường LB sau đó cắt kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn, cả ba chủng mang đi kiểm tra đều mang đoạn ADN được chèn vào theo đúng thiết kế. Đây là phương pháp tạo vector tái tổ hợp hiệu quả có thể góp phần giảm áp lực và rút ngắn thời gian tạo vector tái tổ hợp cho nhà khoa học. So sánh với phương pháp tạo vector tái tổ hợp truyền thống đã nhận thấy rằng phương pháp tạo vector bằng bổ sung trình tự đầu treo vào môi và sử dụng enzyme T4 ADN polymerase hiệu quả cao hơn hẳn.



Hình 3. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1V* bằng enzyme cắt giới hạn *EcoR*

M- thang chuẩn ADN. 1-3 - các dòng vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1* khác nhau. pGreen3 - đối chứng dương.

Thông thường để gắn một gene vào vector theo phương pháp truyền thống sẽ phải nhân lên bằng phản ứng PCR, sau đó cắt sản phẩm PCR với enzyme cắt giới hạn, sau đó thực hiện phản ứng gắn nối với enzyme T4 ligase. Tuy nhiên, phương pháp này thường tỷ lệ thành công không cao. Để sàng lọc được các khuẩn lạc mang gene mong

muốn, phải tiến hành phản ứng colony PCR nhằm sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn mang gene đích. Sau đó tiến hành nuôi riêng và cắt kiểm tra với enzyme cắt giới hạn [20, 14]. Tuy nhiên với phương pháp sử dụng T4 ADN polymerase này, không cần phải cắt sản phẩm PCR với enzyme giới hạn và cũng không cần phải thực hiện phản ứng colony PCR.

Để khẳng định kết quả tạo vector tái tổ hợp, plasmid tái tổ hợp số 3 được gửi đi xác định trình tự.

3.4. Kết quả xác định trình tự đoạn ADN được chèn vào vector tái tổ hợp

Plasmid tái tổ hợp số 3 được lựa chọn để xác định trình tự lần lượt bằng mỗi *PR1-PI* và *GFP-R*. Để kiểm tra vị trí gắn nối giữa gene *PR1* và *GFP* có tồn tại các nucleotide mã hóa cho đoạn protein linker như thiết kế hay không, tiến hành so sánh trình tự ADN thu được và vùng trình tự gene *PR1* và *GFP* trên vector mô hình. Kết quả so sánh được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả so sánh trình tự ADN thu được và trình tự ADN từ ngân hàng dữ liệu của nấm *V. dahliae*

Tên môi	Điểm tối đa	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)	Chiều dài đoạn mang so sánh (bp)
<i>PR1-PI</i>	1.977	2.040	80%	100%	1.070
<i>GFP-R</i>	1.977	2.040	80%	100%	1.070

Kết quả so sánh chỉ ra trình tự ADN thu được cả với mỗi *PR1-PI* và mỗi *GFP-R* cho sự tương đồng 100% với trình tự trên ngân hàng dữ liệu. Phần trình tự tương đồng có chiều dài 1.070 bp chiếm 80% trong tổng trình tự của gene *PR1* và gene *GFP*. Kết quả so sánh trình tự bằng chương trình MultAlin version 5.4.1 cho thấy, trình tự ADN thu được bằng cả hai môi giống nhau và giống trình tự trên sơ đồ đã thiết kế [16]. Điều này có nghĩa là vùng linker nằm giữa hai gene *PR1* và *GFP* được gắn đúng như thiết kế (Hình 4).

Từ kết quả giải trình tự và kết quả cắt bằng enzyme giới hạn khẳng định rằng đã tạo thành công vector tái tổ hợp pGreen3-*PR1* có chứa gene *PR1* và 1,3 kb promoter phía trước. Trình tự này được gắn với gene *GFP* thông qua đoạn ADN dài

15 nucleotide mã hóa cho đoạn amino axit của protein liên kết (linker).

Theo nghiên cứu của Bui và cs (2013) việc gắn các đoạn trình tự vào một vector sẽ phải tiến hành cắt mở vòng vector và gắn từng đoạn một [14]. Quy trình này mất khá nhiều thời gian và tỷ lệ gắn chính xác đoạn cần chèn khá thấp [20, 14]. Trong nghiên cứu này, chỉ ra rằng việc kết hợp giữa thiết kế vector trên phần mềm Snapgene Viewer tạo ra cặp môi chứa 15 nucleotide bổ sung với đoạn trình tự ADN kế tiếp trong vector và sử dụng enzyme T4 ADN polymerase góp phần tăng hiệu quả của việc thiết kế vector tái tổ hợp, đồng thời tiết kiệm thời gian tạo vector tái tổ hợp. Enzyme T4 ADN polymerase được sử dụng để thực hiện đồng thời 2 chức năng là tạo đầu treo và gắn nối các đoạn

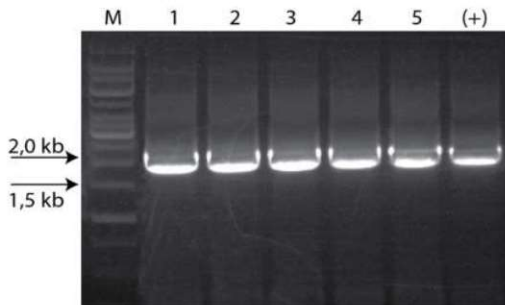
ADN. Việc thiết kế để hai protein cùng được điều khiển bởi một promoter ở sinh vật nhân chuẩn rất phức tạp. Nếu cả hai vùng đọc mở của hai gene thiết kế đều chứa bộ ba kết thúc thì việc biểu hiện đồng thời hai protein sẽ không thành công. Bên cạnh đó, nếu trong hai protein thiếu đi một protein liên kết sẽ dẫn đến nhiều kết quả không mong

muốn, chức năng của một trong hai protein hoặc cả hai protein sẽ kém đi [21, 13]. Chính vì vậy việc thiết kế một đoạn ADN dài 15 nucleotide mã hóa cho 5 amino axit của protein liên kết (linker) để tăng sự linh hoạt cho protein PR1 và GFP khi được biểu hiện.



Hình 4. Kết quả so sánh trình tự ADN thu được và trình tự ADN trên mô hình vector đã được xây dựng bằng chương trình MultAlin version 5.4.1.

3.5. Kết quả chuyển vector pGreen3-PR1 vào vi khuẩn *A. tumefaciens*



Hình 5. Kết quả kiểm tra các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* bằng phản ứng PCR.

M-Thang chuẩn ADN 1 kb. (+) đối chứng dương ADN plasmid pGreen-PR1. 1-5 các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang đi kiểm tra

Vector pGreen3-PR1 (1.000 ng) được trộn với tế bào khả biến của vi khuẩn *A. tumefaciens* để

chuyển vector vào vi khuẩn bằng phương pháp sốc nhiệt [18] với 3 bước như sau: Hỗn hợp trên được đặt trong đá trong 5 phút, sau đó chuyển vào nito lỏng trong 5 phút. Cuối cùng hỗn hợp trên được chuyển vào trong tủ 37°C trong 5 phút trước khi được cô đặc và cấy trải lên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh kanamycin. Kết quả thu được 5 khuẩn lạc có khả năng sống trên môi trường có chứa kanamycin. Năm khuẩn lạc này được kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với các cặp mồi đặc hiệu *PR1-F/PR1-R*. Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở hình 5.

Kết quả ở hình 5 cho thấy, cả 5 chủng *A. tumefaciens* thu được đều xuất hiện một băng ADN tương ứng với kích thước khoảng 1,9 kb. Kích thước này tương đương với kích thước của băng ADN được nhân lên từ plasmid pGreen3-PR1, đối chứng dương. Điều này chứng tỏ cả 5 chủng thu được đều mang vector tái tổ hợp. Các chủng vi

khuẩn này được nuôi riêng rẽ và giữ trong glycerol ở -80°C để sử dụng khi cần. Chúng số 3 được sử dụng để biến nạp vào *V. dahliae* JR2 để tạo thể đột biến trong các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Đã tạo thành công chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* có chứa vector tái tổ hợp pGreen3-PR1, vector có chứa gene PR1 được gắn với gene GFP thông qua 15 nucleotide mã hóa cho một đoạn của protein liên kết. Sử dụng chương trình Snapgen Viewer đã thiết kế được mô hình vector tái tổ hợp pGreen3-PR1 có chứa đoạn trình tự promoter của gene PR1, gene PR1 và gene GFP. Sau đó đoạn trình tự promoter và trình tự gene PR1 (1,9 kb) đã được nhân lên với cặp mồi đặc hiệu bằng phương pháp PCR. Đoạn trình tự này cũng đã được chèn vào vector pGreen3 nằm phía trước gene GFP và liên kết với gene này thông qua đoạn ADN gồm 15 nucleotide mã hóa cho protein liên kết. Vector tái tổ hợp đã được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn và giải trình tự với hai mồi PR1-PI và GFP-R. Vector tái tổ hợp này đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* sẵn sàng cho công tác chuyển gene và nghiên cứu chức năng gene trên nấm *V. dahliae*. Kết quả nghiên cứu đồng thời chỉ ra rằng phương pháp tạo vector tái tổ hợp sử dụng enzyme T4 ADN polymerase kết hợp xây dựng sơ đồ bằng phần mềm Snapgene viewer cho hiệu quả tạo vector tái tổ hợp cao. Phương pháp này có thể ứng dụng trong các nghiên cứu tạo vector tái tổ hợp trong đó có sự kết nối của nhiều đoạn ADN.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo và Đại học Thái Nguyên thông qua đề tài mã số B2020-TNA-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Berlander, I. and P. ML. (2005). Verticillium wilt.
2. Pegg, B. L. B. (2002). Verticillium Wilts. CABI Publishing, Wallingford, UK.
3. Pegg, G. F., B. L. Brady, and E. A. Wood. The distribution of Verticillium dahliae in soil and

plant tissue in a strawberry nursery as determined by bait plants and immunoassay. *Plant Pathology*, 34 (1): p. 23-28.

4. TT, B., et al. (2019). Verticillium dahliae transcription factors Som1 and Vta3 control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonization to induce disease. *New Phytol* 221 (4): p. 2138-2159.

5. VT, T., et al. (2014). Verticillium transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots. *New Phytol*, 202 (2): p. 565-581.

6. Cappellini, R. A., G. L. Peterson, and C. M. Maragos (2019). Characterization of the pathogenesis-related protein 1 (PR1) gene in Fusarium graminearum. *Journal of Plant Pathology*, 101 (2): p. 345-352.

7. Wang, S. (2019). Functional analysis of the PR1 gene family in fungi. *Fungal Biology*, 123 (8): p. 589-598.

8. Kolar, M., et al. (1998). Transformation of Penicillium chrysogenum using dominant selection markers and expression of an Escherichia coli lacZ fusion gene. *Elsevier*, 62 (1): p. 127-134.

9. Yates, A.D., et al. (2022). Ensembl Genomes 2022: An expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic Acids Research*,

10. Untergasser, A., et al. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer 3. *Nucleic acids research*, 35 W71-W74.

11. Untergasser, A., et al. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer 3 *Nucleic Acids Research*. 35 W71-W74.

12. Xia, Y., et al. (2015). New insights into the QuikChange process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 43 (2): p. e12.

13. Joo, H. and Z. Lin (2016). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, 7 1903.

14. Bui, T.-T., *et al.* (2013). Production of lycopene by metabolically engineered *E. coli*. *Journal of Research in Microbes*,
15. Froger, A. and J. E. H. (2017). Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp*, 6 253.
16. F. CORPET (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res*, 16 (22): p. 10881-10890.
17. M, J., *et al.* (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36 (W5-9): p.
18. Jyothishwaran, G., *et al.* (2007). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current science*, 93 (6).
19. SnapGene software (www.snapgene.com).
20. Bergkessel, M. and C. Guthrie chapter twenty five - Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529 299-309.
21. Baneyx, F. and M. Mujacic Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22 (11): p. 1399-1408.

CREATE THE STRAIN OF *Agrobacterium tumefaciens* CARRYING THE RECOMBINANT VECTOR pGreen3-PR1

Nguyen Thi Huong¹, Nguyen Duy Linh¹, Duong Thi Thanh², Bui Tri Thuc²

¹ Faculty of Biotechnology, Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University

² Faculty Biotechnology, and Food Technology, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

Summary

Verticillium fungus is known for premature wilting and aging in many crops, significantly affecting crop yield. Currently, there is no specific method to control this type of fungus and only uses conventional chemical treatments. Using molecular biology techniques to inhibit the invasion of the fungus into the host is being interesting study. The *PR1* gene is known to be related to the early stages of the fungus's invasion process into the host. To study the function of the *PR1* gene in *V. dahliae* fungus, we created a strain of *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) carrying the recombinant vector pGreen3-*PR1*. In this study, we used SnapGene Viewer software and genetic modification techniques to create the recombinant vector pGreen3-*PR1*, in which the *PR1* gene was fused with the *GFP* gene through a 15-nucleotide encoding sequence for a linker protein. SnapGene Viewer software was used to create the model of the recombinant vector pGreen3-*PR1*. The sequence of the *PR1* gene and its promoter was amplified by PCR using specific primer pairs. The PCR product of 1.9 kb was ligated into the pGreen3 vector to create the recombinant vector pGreen3-*PR1*. The recombinant vector was confirmed by restriction enzyme digestion with *EcoRV* and sequence analysis using *PR1-P1* and *GFP-R* primers. The result of the DNA sequence inserted into the recombinant vector shows 100% similarity with the sequence that was inserted into the vector designed using SnapGene Viewer software. The recombinant vector was then successfully transformed into *A. tumefaciens* bacteria using a heat shock method. The *A. tumefaciens* strain carrying the pGreen3-*PR1* recombinant vector is now ready for further research on the position and function of the *PR1* gene in *Verticillium* fungus.

Keywords: *PR1 gene, pGreen3, recombinant vector, Verticillium.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 20/02/2023

Ngày thông qua phản biện: 22/5/2023

Ngày duyệt đăng: 25/5/2023