BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN *HIV-1 p24* VÀO LỤC LẠP CÂY THUỐC LÁ GIỐNG V2 BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẮN GEN

Phan Tường Lộc, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Thị Thanh

Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Bài nhận ngày 20 tháng 7 năm 2010, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 02 năm 2011)

TÓM TẮT: *Thuốc lá V2 là giống thuốc lá vàng đang được trồng ở nhiều vùng nguyên liệu của Việt Nam cho sản lượng cao. Để có thể sử dụng chuyển gen lục lạp hiệu quả, các khảo sát về khả năng tái sinh của giống thuốc lá V2 đã được thực hiện. Các mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP 1mg/l và NAA 0,1 mg/l cho tần số tái sinh là 100%, với số chồi trung bình cao nhất/ mảnh lá là 11 chồi. Bên cạnh đó, yếu tố quan trọng trong việc xác định được cây chuyển gen là áp lực chọn lọc phù hợp. Kết quả kiểm tra cho thấy, giống thuốc lá V2 khá nhạy cảm với kháng sinh spectinomycin và streptomycin. Ở nồng độ 80 mg/l, spectinomycin ức chế sự tái sinh chồi từ mảnh lá và tạo cây con từ chồi nách, đối với streptomycin, ngưỡng này là 125 mg/l. Chuyển gen HIV-1 p24 và gen aadA đã được thực hiện vào lục lạp giống thuốc lá V2 thông qua bắn gen. Cây chuyển gen giả định thu được có khả năng kháng spectinomycin và streptomycin lên đến nồng độ 500 mg/l. Qua kiểm tra ban đầu bằng PCR, gen HIV-1 p24 sơ bộ được xác định hiện diện trong bộ máy di truyền các cây chuyển gen giả định với kích thước khuếch đại đoạn đặc hiệu 700 bp.*

Từ khóa*: chuyển gen lục lạp, gen HIV-1 p24, spectinomycin, streptomycin, giống thuốc lá V2.*

1. MỞ ĐẦU

AIDS - hội chứng suy giảm miễn nhiễm ở người (*Acquired Immune Deficiency Syndrome)* do nhiễm HIV - virus gây suy giảm miễn nhiễm ở người *(human immunodeficiency virus)*, vẫn là một bệnh truyền nhiễm gây ra những thách thức nặng nề đối với sức khỏe cộng đồng. Cho đến thời điểm này vẫn chưa có một liệu pháp triệt để nào để vô hiệu hoặc loại bỏ hoàn toàn virus HIV ra khỏi cơ thể sau khi bị mắc phải. Cách điều trị lý tưởng hiện nay là kết hợp nhiều liệu pháp kháng virus để kéo dài và cải thiện chất lượng cuộc sống người bệnh [20] [21]. Một trong những hướng nghiên cứu tiên tiến được nhiều sự quan tâm là tạo các vaccine ngừa HIV [11][21].

Protein p24 (HIV-1 p24) của HIV là một protein capsid gồm 231 amino acid, có trọng lượng phân tử 24 kDa, không có các gốc đường kết hợp, tạo thành lõi hình nón của các thể virus, hiện diện sớm ở người nhiễm HIV và là đối tượng gây đáp ứng miễn nhiễm cả trong trường hợp mới nhiễm hoặc nhiễm mạn tính [9].

Do đó HIV-1 p24 được xem như là một kháng nguyên thích hợp, được kỳ vọng nghiên cứu phát triển và kết hợp với các kháng nguyên khác để tạo thành vaccine hiệu quả trong phòng chống HIV và đã có một số kết quả thành công

bước đầu. Ngoài ra HIV-1 p24 cũng được ứng dụng trong tạo các kit chẩn đoán HIV trong giai đoạn sớm [6].

Việc sản xuất protein này thông qua biến nạp gen đã được nghiên cứu nhiều trên đối tượng vi khuẩn *E.coli* [2][4][5][12], tuy nhiên các khó khăn về giá thành, sản lượng lớn ổn định, tiêu chuẩn chất lượng vẫn còn là vấn đề chưa giải quyết được. Vì vậy thực vật là mục tiêu tiềm năng được hướng đến [20]. Thuốc lá (*Nicotiana tobacum*) thuộc nhóm cây trồng thu hoạch lá (green leaf crops) và là cây điển hình trong các nghiên cứu chuyển gen, do tần số tái sinh của mô lá rất cao và nhiều công trình công bố về những nghiên cứu biến nạp các gen khác nhau tạo protein tái tổ hợp kháng nguyên, protein dược liệu vào lục lạp thuốc lá đã thành công trên thế giới [1][3][8][14][15][17][19]. Do thuốc lá không phải là cây lương thực, protein được tổng hợp nhiều ở lá và không hàm chứa những nguy cơ bệnh liên quan đến động vật như virus, vi sinh vật hay prion, nên việc biểu hiện protein dược liệu dùng cho người, như kháng nguyên HIV-1 p24 là rất phù hợp. Đã có công trình biến nạp gen *HIV-1 p24* vào gen nhân thành công tuy nhiên lượng protein tạo thành không cao và có thể ở dạng bị biến đổi do có gốc đường kết hợp sau dịch mã. Biến nạp gen *HIV-1 p24* vào lục lạp có thể khắc phục các trở ngại này, ngoài ra còn tránh được sự phân tán gen ngoài ý muốn do phát tán hạt phấn, cũng như tình trạng gen im lặng (không biểu hiện). Hiện nay, biến nạp gen *HIV-1 p24* vào lục lạp cũng đã được thực hiện trên nhiều giống thuốc lá khác nhau và cũng có những kết quả khác biệt rõ rệt [9]. Trong nghiên cứu này, gen *HIV-1 p24* được biến nạp gen vào giống V2, là giống thuốc lá vàng thương mại đã được nội địa hóa, có năng suất cao và đã được trồng trên nhiều vùng nguyên liệu của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Cây thuốc lá V2 được vô mẫu và giữ giống *in vitro* dùng làm nguyên liệu thí nghiệm.

- Plasdmid pITB.HIV-1 p24, do TS. Nguyễn Thị Thanh (Viện Sinh học Nhiệt đới) thiết kế và cung cấp, dùng để biến nạp gen vào lục lạp thuốc lá, có kích thước 8344 bp và cấu trúc như hình bên dưới, mang các gen và các promoter đặc hiệu.

+ *aadA*: gen mã hóa men aminoglycoside adenylyltransferase, quy định tính kháng hai loại kháng sinh spectinomycin/streptomycin dùng để chọn lọc đối tượng chuyển gen.

+ *HIV-1p24*: gen mã hóa protein HIV-1 p24, là protein vỏ capsid virus HIV.

+ *Prrn*: Promoter đặc hiệu biểu hiện mạnh ở lục lạp (Promoter rRNA).

+ *TpsbA, TrbcL:* Trình tự kết thúc (terminator) từ gen *psbA* và gen *rbcL* (RUBISCO tiểu đơn vị lớn) ở lục lạp.

+ flanking*:* vùng gen lục lạp dùng để tái tổ hợp đồng dạng.

- Môi trường nuôi cấy mô:

+ Môi trường nuôi cấy mô cơ bản là môi trường có thành phần khoáng MS, vitamin B5, pH 5,8.

+ Môi trường rắn: môi trường cơ bản có bổ sung agar 9g/l.

+ Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP, NAA.

- Kit tách DNA của công ty QIAGEN.

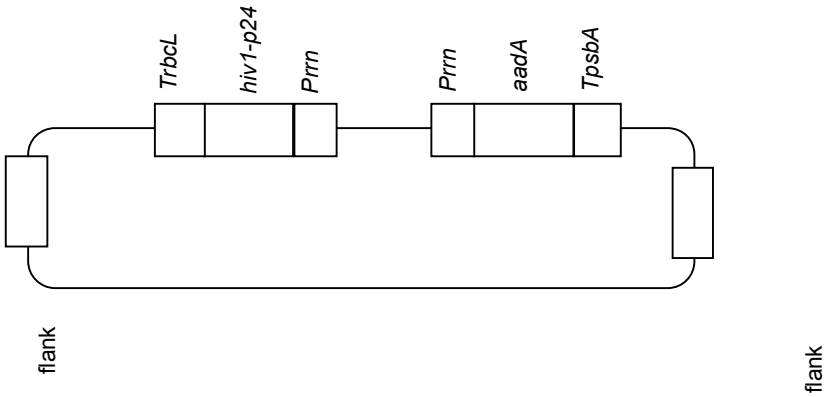
- Thành phần phản ứng PCR:

Mồi phản ứng PCR dùng để kiểm tra sự hiện diện của gen *HIV-1 p24*, có trình tự đầu xuôi: 5'- CAT ATG GCT AGC CCA TCC CCT ATT -3' và đầu ngược: 5'- TCT AGA GGA ATT CTA CTC AGC TTT ATG TC-3', do TS. Nguyễn Thị Thanh (Viện Sinh học Nhiệt đới) thiết kế trình tự và được cung cấp bởi công ty Invitrogen (Mỹ).

+ Taq polymerase (Promega, Mỹ), dNTP (Sigma, Mỹ).

- Vật liệu dùng để bắn gen:

+ Hạt vàng và các hóa chất dùng để gắn DNA lên hạt vàng (coating) trước khi bắn gen, $CaCl_2$ 2,5 M, spermidine 0,1 M (Sigma, Mỹ).



Hình 1. Cấu trúc plasmid pITB.HIV-1 p24 dùng để chuyển gen

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xây dựng hệ thống tái sinh từ mảnh lá thuốc lá

Nuôi cấy các mảnh lá thuốc lá có kích thước 1x1 cm trên môi trường tái sinh là môi trường cơ bản, được bổ sung các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng khác nhau gồm NAA (0,1; 0,2; 0,3) và BAP (0,5; 1; 1,5) để khảo sát sự phát sinh hình thái. Môi trường có tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng cảm ứng sự tái sinh chồi tối ưu sẽ được sử dụng làm môi trường tái sinh cho mẫu chuyển gen.

- Điều kiện nuôi cấy: 9 giờ chiếu sáng/ ngày, nhiệt độ: 25 - 28^{o}C.

- Mỗi nghiệm thức 7 mẫu, lặp lại 3 lần.

- Tiêu chuẩn thí nghiệm: Chồi tái sinh trực tiếp, đồng đều, kích thước thân lá cân đối, bình thường, mô sẹo hình thành ít.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của kháng sinh chọn lọc streptomycin và spectinomycin đối với tính chống chịu tự nhiên của mô lá, đoạn thân.

Nuôi cấy mảnh lá thuốc lá trên môi trường tái sinh tối ưu nhận được từ nghiệm thức trên, có bổ sung thêm kháng sinh streptomycin hoặc spectinomycin ở các nồng độ tăng dần [16][18]. Các đoạn thân có một chồi nách cũng được nuôi cấy trên môi trường cơ bản có bổ

sung kháng sinh tương tự. Khảo sát mức độ ức chế của các kháng sinh lên sự tái sinh chồi ở mô lá cũng như sự phát triển thành cây hoàn chỉnh từ chồi nách để thiết lập nồng độ chọn lọc phù hợp. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 10 mẫu lá kích thước 1x1 cm, lặp lại 3 lần cho một nồng độ kháng sinh.

2.2.3. Phương pháp bắn gen

- Chuẩn bị hạt vàng:

+ Hòa 50 mg hạt vàng (đường kính 0,6 □m) với 1 ml cồn tuyệt đối trong tube 1,5 ml, vortex 2 phút cho hỗn hợp thành dạng huyền phù. Ly tâm 3 phút ở 10.000 x g để lấy cặn.

+ Cho vào tube 1 ml cồn 70%, vortex để hòa trộn phần cặn vàng trong 1 phút. Giữ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và thỉnh thoảng đảo trộn, sau đó ly tâm để lấy cặn ở 5000 x g trong 2 phút.

+ Cho vào tube 1 ml nước cất vô trùng và vortex trong 1 phút để trộn phần cặn thành dạng huyền phù, rồi để cặn lắng ở nhiệt độ phòng 1 phút, sau đó ly tâm 2 phút để lấy cặn. Lặp lại bước này 3 lần.

+ Cho vào tube 1 ml glycerol 50% (theo thể tích) và giữ ở -20 ^{o} C cho đến khi dùng [16].

- Bọc (DNA) plasmid vào hạt vàng (coating):

+ Hút 50 µl hạt vàng trong dung dịch huyền phù vào tube 1.5 ml. Trong khi vortex, cho thêm vào ống 5 µl plasmid (nồng độ 1µg/µl) rồi lần lượt 50 µl $CaCl_2$ 2,5 M và 20 µl spermidine 0,1 M. Tiếp tục vortex cho đến khi hỗn hợp đồng đều. Sau đó ly tâm 1 phút ở 3000 x g để gom hạt vàng xuống đáy ống. Các thao tác thực hiện ở nhiệt độ 4^{o}C.

+ Rửa cặn với lần lượt 200 µl cồn 70% và cồn tuyệt đối ở nhiệt độ phòng. Cặn sẽ được hòa trộn với 50 µl cồn tuyệt đối để trở lại dạng huyền phù và giữ trên đá cho đến khi dùng.

+ Đặt các tấm mang (macrocarrier) vào trong khung giữ (macrocarrier holder). Các tấm mang và khung giữ đã được vô trùng bằng cồn và để khô trước đó.Vortex kỹ dung dịch huyền phù hạt vàng, hút 10 µl dịch trải lên giữa tấm mang và để khô dưới luồng khí trong tủ cấy, sau đó lắp vào thiết bị để bắn gen [16].

- Bắn chuyển gen vào mô lá:

+ Lá thuốc lá trưởng thành được cắt từ cuống và đặt trên môi trường tái sinh (trong đĩa petri) 1 ngày trước khi mang đi bắn

+ Sau đó các mô lá được bắn chuyển gen trong thiết bị Bio-Rad PDS – 1000/He, với áp lực để tạo gia tốc là 1100 psi, khoảng cách đặt mẫu là 6cm.

- Mẫu lá sau khi bắn được ủ trong tối 2 ngày trên cùng môi trường, rồi được cắt thành những mảnh kích thước̃.5 cm x̃.5 cm để chuyển sang môi trường chọn lọc [16].

2.2.4. Phương pháp chọn lọc

- Mô sau khi chuyển gen sẽ được nuôi cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh spectinomycin ở ngưỡng nồng độ gây chết thấp, giữ trong điều kiện tối một tuần rồi sau đó nuôi ở điều kiện sáng để tạo chồi. Ở các đợt chọn lọc kế tiếp, các chồi sẽ được tách ra và nuôi trên môi trường cơ bản có nồng độ kháng sinh được nâng lên dần đến 500 mg/l. Các chồi

phát triển tốt sẽ được chọn lọc với hai loại kháng sinh là spectinomycin và streptomycin với nồng độ cuối cùng là 500 mg/l [10][13].

- Do số lượng bô gen lục lạp rất nhiều trong một cơ thể thực vật và tình trạng không đồng nhất heteroplasmic ở các dòng chuyển gen có thể dẫn đến sự loại bỏ lục lạp chuyển gen nếu như áp lực chọn lọc không còn. Do đó việc đồng nhất hóa các lục lạp chuyển gen ở giai đoạn *in vitro* có ý nghĩa rất lớn, thông qua việc chọn lọc cây kéo dài và tái sinh cây chuyển gen qua nhiều đợt, ở các nồng độ kháng sinh cao [10][16].

2.2.5. Phương pháp PCR và điện di DNA trên gel Agarose

Các dòng chuyển gen phát triển tốt sau khi đã chọn lọc với kháng sinh spectinomycin và streptomycin sẽ được ly trích bằng bộ kit tách DNA thực vật mini của công ty QIAGEN và kiểm tra sự hiện diện của gen *HIV-1 p24* bằng phương pháp PCR với hai mồi đặc hiệu và 30 chu kỳ nhiệt: 95^{o}C 2 phút; 95 ^{o}C 1 phút; 52 ^{o}C 1 phút; 72 ^{o}C 2 phút; 72 ^{o}C 5 phút, sau đó bảo quản ở 4 ^{o}C cho đến khi sử dụng.

Các sản phẩm PCR sẽ được chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% có chất phát hiện ethidium bromide ở nồng độ 0,5 □g/ml, với kích thước đoạn khuếch đại theo thiết kế là 700 bp, dựa theo thang chuẩn 1Kb (Biolabs - Mỹ).

2.2.6. Thống kê

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố và được lặp lại 3 lần. Kết quả là trị số trung bình của 3 lần lặp lại.

Phân tích thống kê: xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê MSTATC, sau đó dựa vào giá trị Probability (Prob.) trong bảng ANOVA để quyết định có trắc nghiệm phân hạng hay không. Nếu có, sẽ sử dụng kiểu trắc nghiệm LSD để đánh giá kết quả thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng hệ thống tái sinh từ mảnh lá thuốc lá

Các mẫu lá thuốc lá từ cây *in vitro* của giống V2 được cho tái sinh trên môi trường cơ bản có bổ sung tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng NAA và BAP ở các nồng độ khác nhau. Ở tuần thứ 1, mô lá dày lên, hầu hết các mẫu lá trong các nghiệm thức đều bắt đầu hình thành mô sẹo ở mép lá. Chồi xuất hiện ở ngày thứ 18.

- Kết quả khảo sát ở tuần thứ 5 cho thấy, ở nghiệm thức 4 số lượng chồi tái sinh nhiều nhất, tập trung ở mép mảnh mô lá, mô sẹo rất ít, hầu như không có. Ở các nghiệm thức khác số lượng chồi hình thành ít hơn, kích thước không đồng đều, lá bị xoăn, cuống to, hoặc có nhiều mô sẹo hình thành, chồi phát triển kém (nt1, nt2, nt3, nt6, nt7, nt9).

Bảng 1. Kết quả tái sinh chồi của giống thuốc lá V2 trên môi trường có bổ sung các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng NAA và BAP khác nhau.

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Số chồi trung bình tái sinh trên một nghiệm thức		
1	0.1	0.5	35.33 E	±	2.52
2	0.2	0.5	56.67 D	±	8.02
3	0.3	0.5	52.33 DE	±	8.08
4	**0.1**	**1**	**113.3 A**	**±**	**8.02**
5	0.2	1	66.33 CD	±	3.06
6	0.3	1	88.33 B	±	19.50
7	0.1	1.5	51.33 DE	±	5.13
8	0.2	1.5	50.67 DE	±	2.08
9	0.3	1.5	86.00 BC	±	3.61
				CV = 12.58 %	

Các giá trị trung bình theo sau không cùng mẫu tự trong cùng một cột có sự khác biệt rất có ý nghĩa ở mức p = 0,01 dựa theo trắc nghiệm LSD

Các chỉ số về chồi tái sinh ở NT 4 phù hợp với tiêu chuẩn thí nghiệm đặt ra, nên môi trường của NT4 được sử dụng là môi trường tái sinh cho giống thuốc lá V2.

Nghiệm thức 1 Nghiệm thức 4 Nghiệm thức 9

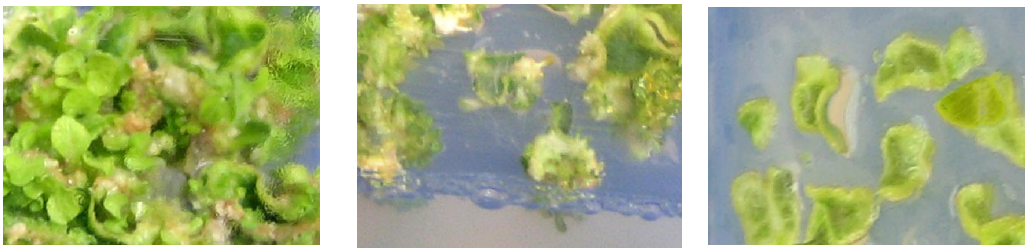
Hình 1. Sự tái sinh chồi của mẫu lá thuốc lá ở các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng khác nhau

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của kháng sinh chọn lọc streptomycin và spectinomycin lên sự tái sinh của mảnh lá và phát triển cây con từ chồi nách.

Các nghiệm thức được thực hiện trên các nồng độ kháng sinh tính theo mg/l với streptomycin ở các mức 15, 25, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150 và spectinomycin ở 15, 25, 40, 60, 80, 110, 140.

Ở nồng độ streptomycin thấp hơn 125

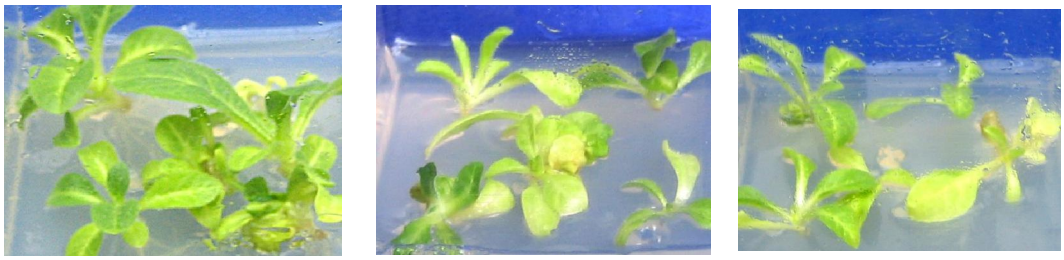
mg/l, hầu như mọi mẫu mô đều hình thành chồi khi đặt trên môi trường tái sinh từ sau ngày thứ 18. Tuy nhiên số lượng chồi trung bình trên mỗi mẫu giảm tỉ lệ nghịch với nồng độ kháng sinh gia tăng. Ở các nồng độ kháng sinh cao, chồi hình thành chậm hơn và phát triển khoảng 3-4 mm rồi dừng lại, mất màu diệp lục và chết dần. Thời gian bắt đầu hình thành chồi chậm hơn và có nhiều mô sẹo hơn. Ở nồng độ từ 125 mg/l trở lên, 100% mẫu không có sự hình thành chồi trên môi trường tái sinh.



75 mg/l 100 mg/l 125 mg/l

Hình 3. Các nồng độ streptomycin ảnh hưởng đến sự tái sinh chồi từ mảnh lá thuốc lá

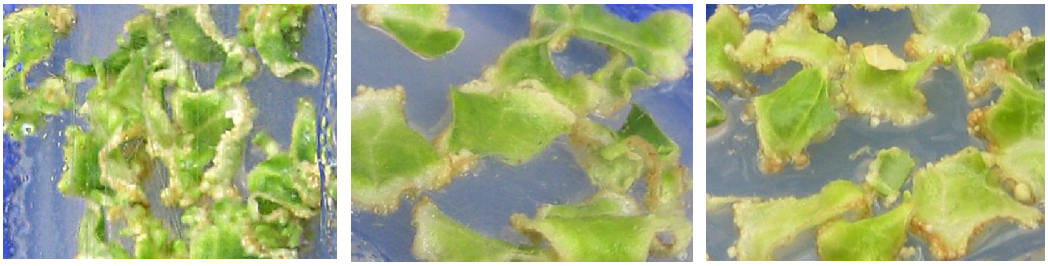
Đối với đoạn thân, ở nồng độ streptomycin dưới 125mg/l đoạn thân ra rễ sau 3-5 ngày nuôi cấy ở nồng độ kháng sinh thấp. Ở các nồng độ cao thời gian ra rễ chậm, rễ ngắn và ngừng phát triển sau đó. Ở nồng độ trên 125 mg/l, đoạn thân không phát triển, không có sự hình thành rễ.



100 mg/l 125 mg/l 150 mg/l

Hình 4. Các nồng độ streptomycin ảnh hưởng đến sự phát triển của đoạn thân thuốc lá

Đối với kháng sinh spectinomycin, ở các nồng độ kháng sinh thấp dưới 25 mg/l, chồi vẫn hình thành với số lượng tỉ lệ nghịch với nồng độ kháng sinh, thời gian phát triển chậm, có tạo mô sẹo. Nồng độ từ 40 mg/l - 80 mg/l, các nốt phát sinh chồi, mô sẹo hình thành, nhưng ngừng phát triển. Từ nồng độ 80 mg/l hoàn toàn không có sự phát sinh chồi.



25 mg/l 60 mg/l 80 mg/l

Hình 5. Các nồng độ spectinomycin ảnh hưởng đến sự tái sinh chồi từ mảnh lá thuốc lá

Ở nồng độ dưới 40 mg/l, rễ hình thành sau khi nuôi cấy đoạn thân 3, 4 ngày. Nồng độ từ 40 mg/l trở lên không có sự tạo rễ ở toàn bộ các đoạn thân nuôi cấy.

15 mg/l 25 mg/l 40 mg/l

Hình 6. Các nồng độ spectinomycin ảnh hưởng đến sự phát triển của đoạn thân thuốc lá

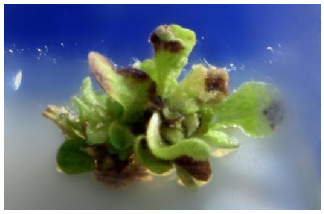
Với kết quả trên nồng độ dùng để chọn lọc ban đầu được đưa ra với kháng sinh spectinomycin là 100 mg/l và streptomycin là 125 mg/l.

3.3. Chuyển gen và chọn lọc cây chuyển gen

Bắn gen được thực hiện trên 48 mẫu lá và cho tái sinh trên môi trường có chất chọn lọc spectinomycin 100 mg/ml. Từ 21 ngày đến 30 ngày chồi bắt đầu hình thành trên một số mẫu lá, sau 45 ngày, thu được 10 chồi phát triển lớn. Các mảnh mô lá không có sự hình thành chồi ngả vàng và chết. Chuyển các chồi sang môi trường cơ bản để tạo cây và tiếp tục chọn lọc với kháng sinh spectinomycin tăng đến nồng độ 300 mg/l, còn lại 6 dòng có khả năng hình thành rễ và phát triển thành cây. Các dòng cây này được chọn lọc khắc nghiệt trên spectinomycin 500 mg/l và sau đó được bổ sung streptomycin với nồng độ tăng dần từ 125, 300, 500 mg/l. Kết quả là các dòng cây đều có khả năng kháng 2 kháng sinh spectinomycin và streptomycin ở nồng độ 500 mg/l, được xem là các cây chuyển gen giả định, tuy nhiên ở một số dòng có hiện tượng lá bị loang lỗ mất màu diệp lục theo từng đốm và bề ngang bản lá bị thu hẹp. Biểu hiện này cũng phù hợp với mô tả trong công bố của tác giả Vasumathi Kode và cs (2005) [7]. Theo nhận định của tác giả này hiện tượng trên là do tình trạng tồn tại heteroplasmic (hiện diện hỗn hợp lạp thể hoang dại và lạp thể tái tổ hợp). Điều

này hoàn toàn hợp lý và các biểu hiện trên giảm dần hoặc không còn trong các lần chọn lọc tiếp theo, do sự tiến đến dạng đồng nhất lục lạp.

Chồi tái sinh ở mẫu lá trên môi trường có spectinomycin 100 mg/l



Cụm chồi phát triển trên nồng độ spectinomycin tăng dần đến 300 mg/l.

Chọn lọc cây trên môi trường có spectinomycin 500 mg/l

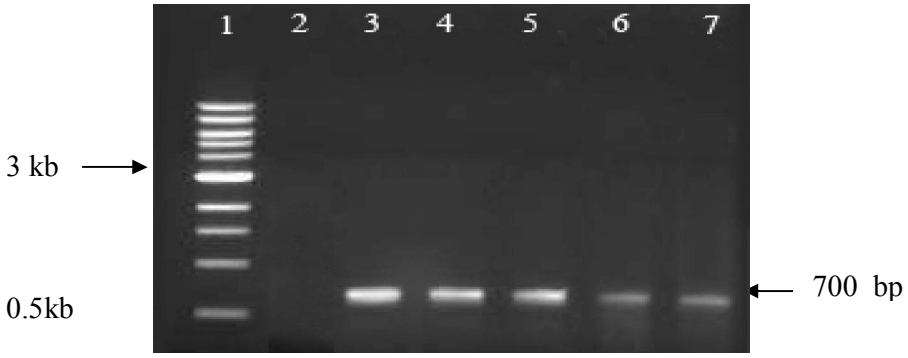
Một số cây bị mất màu diệp lục loang lỗ khi chọn lọc trên spetinomycin và streptomycin ở nồng độ 500 mg/l

Cây chuyển gen sau chọn lọc phát triển bình thường

Hình 7. Chọn lọc chồi và cây chuyển gen trên trên kháng sinh spectinomycin và streptomycin

3.4. Phát hiện sự hiện diện của gen *HIV-1 p24* trong các dòng chuyển gen giả định bằng phương pháp PCR.

Bốn dòng chuyển gen giả định phát triển tốt nhất được tách DNA và kiểm tra sự biến nạp của gen *HIV-1 p24* trong bộ máy di truyền bằng phương pháp PCR. Kết quả phân tích cho thấy có sự hiện diện đoạn khuếch đại đặc hiệu của gen *HIV-1 p24* ở cả 4 dòng thí nghiệm với kích thước 700 bp.



Hình 7. Các băng khuếch đại đoạn gen HIV-1 p24 bằng các mồi đặc hiệu ở các dòng thuốc lá chuyển gen

1. Thang chuẩn 1Kb (Biolabs - Mỹ), 2. đối chứng âm (cây không chuyển gen), 3. đối chứng dương (plasmid từ vi khuẩn *E. coli*) 4.5.6.7. các dòng T1, T2, T5, T6

4. KẾT LUẬN

- Môi trường tái sinh có tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng NAA 0,1 mg/l, BAP 1 mg/l thích hợp để tái sinh mô lá thuốc lá V2 cho tần số tái sinh cao, trung bình 113,3 chồi trên một nghiệm thức.

- Nồng độ kháng sinh dùng để chọn lọc cho giống thuốc lá V2 ở mức tối thiểu đối với streptomycin là 125 mg/l và spectinomycin là 80 mg/l.

- Các dòng thuốc lá V2 chuyển gen giả định có khả năng kháng 2 loại kháng sinh spectinomycin và streptomycin từ nồng độ ức chế ban đầu lên đến nồng độ cao 500 mg/l vẫn phát triển bình thường. Kết quả kiểm tra bằng PCR xác định có đoạn khuếch đại trình tự đặc hiệu của gen *HIV-1 p24* trong cây.

Do promoter *Prrn* biểu hiện đặc hiệu ở lục lạp, nên với khả năng chống chịu kháng sinh ở áp lực cao và kết quả PCR gen *HIV-1 p24* nhận được có thể thuyết phục rằng các dòng thuốc lá V2 nói trên đã được biến nạp thành công các tổ hợp gen *HIV-1 p24 và aadA* vào lục lạp. Đây cũng là cơ sở để tiến hành các phân tích phân tử sâu hơn như Southern Blot để khẳng định sự biến nạp gen *HIV-1 p24* trên lục lạp và các phân tích phân tử, sinh hóa để xác định mức độ biểu hiện protein (Western Blot, ELISA) ở các dòng cây chuyển gen thu được.

PRELIMINARILY CHLOROPLAST TRANSFORMATION OF TOBACCO VARIETY V2 BY BOMBARDMENT

Phan Tuong Loc, Nguyen Huu Ho, Nguyen Thi Thanh

Lab for Plant Genetic Engineering, Institute of Tropical Biology, VAST.

ABSTRACT: *V2 is a high yield, large tobacco variety which is cultivated in many material areas of Vietnam. For successful chloroplast transformation, an efficient shoot regeneration system was required. Highest frequent regeneration was obtained when culturing V2 leaf discs on the basis medium supplemented NAA 0.1 mg/l and BA 1mg/l. Besides, the key factor in determining transgenic plants is consistently selective pressure. V2 variety of tobacco was sensitive to the antibiotics spectinomycin and streptomycin. At the concentration of 80 mg/l, spectinomycin inhibited completely shoot regeneration and plant growth. With streptomycin, the threshold is 125 mg/l. HIV-1 p24 and aadA genes were transferred to chloroplasts of the tobacco V2 variety by bombardment. Putatively transgenic plants were capable of resisting to streptomycin and spectinomycin up to 500 mg/l concentration. Through initial PCR testing, HIV-1 p24 was assumed present in the genome of the transgenics with the specific amplification band of 700 bp.*

Key words*: Chloroplast transformation, HIV-1 p24 gene, spectinomycin, streptomycin, tobacco variety V2.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Arlen P.A., Singleton M., Adamovicz J.J., Ding Y., Davoodi-Semiromi A., Daniell H. (2008) Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect. Immun.* 76, 3640-3650.

[2]. Bhardwaj D., Bhatt S., Khamar M.B., Modi I.R., Ghosh K.P. (2006) Recombinant HIV-1 p24 protein: cloning, expression, purification and use in the development of ELISA kits. *Current Science*, 91, 913-917.

[3]. Daniell H., Ruiz G., Denes B., Sandberg L., Langridge L. (2009) Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnol*. 9, 23.

[4]. Ehrlich L.S., Krausslich H.G., Wimmer E., Carter C.A. (1990) Expression in *Escherichia coli* and purification of human immunodeficiency virus type 1 capsid protein (p24). *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10, 1169-1175.

[5]. Hausdorf G., Gewiess A., Wray V., Porstmann T. (1994) A recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein (rp24): its expression, purification and physico-chemical characterisation. *Journal Virol. Mothods* 50, 1-9.

[6]. Iweala O.I. (2004) HIV diagnostic test: an overview. *Contraception* 70, 141-147.

[7]. Kode V., Mudd A.E., Lamtham S., Day A. (2005) The tobacco Plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *The plant journal* 44, 237-244.

[8]. Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H. (2005) Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.* 73, 8266-8274.

[9]. MacCable S.M., Klaas M., Rabade G.N., Poage M., Badillo C.A.J., Zhou F., Karcher D., Bock R., Gray J.C. and Dix J.P. (2008) Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for prodcution of human immunnodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnology Journal* 6, 914-929.

[10]. Maliga P. (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 289-313.

[11]. Meyers A., Chakauya E., Shephard E., Tanzer L. F., Maclean J., Lynch A., Williamson-L. A., Rybicki P. E. (2008) Expression of HIV-1 antigens in plants as potential subunit vaccines. *BMC Biotechnology* 8, 53.

[12]. Narciandi R.E., Motlongo J., and Figueroa L.P. (2006) High level production of the recombinant gag24 protein from HIV-1 in *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotech.* 5, 103-107.

[13]. Nguyen T. Thanh, Nugent G., Cardi T., and Dix P.J. (2005) Generation of homoplasmic plastid transformation of commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science* 168, 1495-1500.

[14]. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. (2005) Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9062-9067.

[15]. Potula H.H., Kathuria S.R., Ghosh A.K., Maiti T.K., Dey S. (2008) Transient expression, purification and characterization of bioactive human fibroblast growth factor 8b in tobacco plants. *Transgenic Res*. 17, 19-32.

[16]. Singh N. D., Ding Y., Daniell H. (2009) Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: protocols for expression, purification, or oral delivery and functional evaluation. Methods in molecular biology, recombinant proteins from plants, *Humana Press*, a part of Springer Science + Business Media, 483.

[17]. Shoji, Y., Bi H., Musiychuk K., Rhee A., Horsey A., Roy G., Green B., Shamloul B., Farrance C.E., Taggart B., Mytle N., Ugulava N., Rabindran S., Mett V., Chichester J.A., Yusibov V. (2009) Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* 27, 1087-1092.

[18]. Tsuruya K., Suzuki M., Plader W., Sugita C.H., Sugita M. (2006) Chloroplast transformation reveals that tobacco *ycf5* is involved in photosynthesis. *Acta Physiologiae Plantarum* 28(4), 365-371.

[19]. Zheng G.G. Yang Y.H., Rao Q., Lin Y.M., Zhang B., Wu K.F. (2006) Expression of bioactive human M-CSF soluble receptor in transgenic tobacco plants. *Protein Expr. Purif*. 46, 367-373.

[20]. Zhou F., Badillo C. J. A., Karcher D., Rabadez G. N., Piepenburg K., Borcher M. I. A, Maloney P. A., Kavanagh A. T, Gray C. J., Bock R. (2008) High level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnology Journal* 6, 897-913.

[21]. www.unaids.org.vn