

TẠO DÒNG BỔ SUNG (COMPLEMENTATION LINES) TỪ CÂY ĐỘT BIẾN MẤT CHỨC NĂNG GEN DO CHÈN ĐOẠN T-DNA Ở *Arabidopsis thaliana*

Lê Nguyễn Tiểu Ngọc

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Phương pháp tạo dòng bổ sung (complementation lines) trên nền cây đột biến với mục đích khôi phục lại gen đã bị knock-out do đoạn T-DNA chèn vào gen mục tiêu được xem là công cụ hữu ích trong nghiên cứu vai trò chức năng gen đối với quá trình sinh trưởng, phát triển cũng như đáp ứng stress ở thực vật. Trong nghiên cứu này, *Arabidopsis thaliana* mang đột biến *CMAL* được dùng làm đối tượng nghiên cứu. Gen *CMAL* (Chloroplast *mraW*-Like) đóng vai trò thiết yếu trong quá trình sinh tổng hợp lục lạp, quang hợp và sinh trưởng, phát triển của cây. Sự chèn đoạn T-DNA vào vùng intron của gen *CMAL* tạo ra cây đột biến *cmal* biểu hiện kiểu hình còi cọc, sức sinh trưởng kém, ra hoa chậm, số lượng hạt tạo thành ít. Gen *CMAL* ngoại lai được nhân dòng trong vector đích pBI121, sau đó plasmid *CMAL/pBI121* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium tumefaciens*. Dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121* được dùng để chuyển vào cây đột biến *cmal* bằng phương pháp xâm nhập chân không. Các dòng bổ sung (*CMAL*-comlines) tạo ra được sàng lọc bằng cách gieo hạt trên môi trường dinh dưỡng Murashige và Skoog (MS, 1962) bổ sung các chất kháng sinh, đồng thời kiểm tra sự hiện diện của gen *CMAL* trong cây bằng kỹ thuật RT-PCR.

Từ khóa: *Arabidopsis thaliana*, *CMAL*, complementation lines, đột biến, nhân dòng, T-DNA.

MỞ ĐẦU

Ở thực vật, việc tạo ra các thể đột biến bằng phương pháp chèn đoạn T-DNA có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu vai trò chức năng của gen đối với quá trình sinh trưởng, phát triển cũng như đáp ứng các stress phi sinh học (hạn, lạnh, nóng, úng, UV) hoặc/và sinh học (sâu bệnh, nấm, virus) từ môi trường bên ngoài (O'Malley, Ecker, 2010). Trong phản ứng chèn đoạn T-DNA vào hệ gen thực vật, khi nghiên cứu các đột biến của các gen mục tiêu, các đoạn T-DNA được chèn ngẫu nhiên vào các vị trí khác nhau, chẳng hạn như vùng điều hòa (promoter) ở vùng thượng nguồn (5'UTR upstream), vùng mang mã di truyền (exon), vùng không mang mã di truyền (intron), trước và sau điểm kết thúc (stop codon), vùng chứa đuôi poly A ở vùng hạ nguồn (3'UTR downstream) (Azpiroz-Leehan, Feldmann, 1997; Radhamony *et al.*, 2005). Sự tương tác giữa các vùng trong gen mục tiêu có thể gây nên những thay đổi về kiểu hình ở các thể đột biến như thay đổi về hình thái, sức sống, sức sinh trưởng, phát triển, khả năng đáp ứng stress, điều này thể hiện rõ vai trò chức năng của gen trong suốt chu kỳ sống của thực vật (Koncz *et al.*, 1992).

Khi phân tích kiểu hình của các thể đột biến gây ra bằng phương pháp chèn đoạn T-DNA, trong trường hợp chỉ có một vị trí chèn đoạn biểu hiện kiểu hình, để chứng minh kiểu hình đó thực sự gây ra bởi sự knock-out gen mục tiêu, một vài phương pháp được dùng như phương pháp phân tích dị bội nhiễm sắc thể hay phương pháp tạo dòng bổ sung (complementation lines (com-lines)) từ cây đột biến để phục hồi chức năng gen bị knock-out (Radhamony *et al.*, 2005). Trong đó, phương pháp tạo các dòng bổ sung thường được sử dụng phổ biến do tính chính xác, độ tin cậy và đạt hiệu quả cao. Bên cạnh đó, việc sử dụng các dòng bổ sung để so sánh, phân tích hình thái, tính trạng ở mức độ cơ thể, tế bào hoặc/và dưới tế bào được xem là công cụ hữu ích trong nghiên cứu di truyền.

Trong nghiên cứu này, cây *Arabidopsis thaliana* đột biến do chèn đoạn T-DNA làm mất chức năng gen *CMAL* được chọn làm đối tượng nghiên cứu. *CMAL* là một gen trong nhân mã hóa cho protein *CMAL*, protein này định vị trong lục lạp và hoạt động như một rRNA methyltransferase, giúp hình thành gốc methyl tại vị trí C₁₃₅₂ dạng N4-methylcytidine (m⁴C) trên phân tử 16S rRNA trong lục lạp (Zou *et al.*, 2020). Phân tích kiểu hình các thể đột biến này cho thấy, chỉ có vị trí đoạn T-DNA chèn vào vùng intron thứ 2 gây ra sự thay đổi kiểu hình so với cây đối chứng. Thể đột biến đồng hợp tử *cmal* biểu hiện kiểu hình kém phát triển, cây lùn, còi cọc, lá nhỏ và có màu vàng nhạt, rễ ngắn và số lượng hạt tạo thành ít (Ngoc *et al.*, 2020). Để chứng minh kiểu hình này thực sự do sự knock-out gen *CMAL* gây ra, việc tạo ra các dòng bổ sung *CMAL*-comlines là điều cần thiết. Nghiên cứu này cung cấp cái nhìn tổng quan về quy trình tạo dòng bổ sung từ các thể đột biến mất chức năng gen mục tiêu gây ra bởi sự chèn đoạn T-DNA ở cây *Arabidopsis*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây *Arabidopsis thaliana*: Hạt giống các cây hoang dại đối chứng Columbia-0 (Col-0) và cây đột biến chèn đoạn T-DNA (SAIL_564_E05 (*cmal*)) được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên Sinh vật *Arabidopsis* (Columbus, OH, USA).

Gen *CMAL*: Thông tin về gen như trình tự nucleotide, trình tự acid amin được thu thập từ Ngân hàng dữ liệu cây *Arabidopsis thaliana* (TAIR - Home Page (arabidopsis.org)). Cây *Arabidopsis* được trồng, thu mẫu và tách chiết RNA bằng bộ KIT tách chiết thực vật Plant RNeasy (GeneAll, Seoul, Hàn Quốc), sau đó RNA tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA dùng cho tất cả các thí nghiệm về sau.

Vector *pGEM-T*: Được sử dụng làm vector nhân dòng ở vi khuẩn *E. coli*. Cấu trúc của vector *pGEM-T* (Promega, USA) thuận tiện cho việc gắn và nhân dòng với các sản phẩm PCR, vector *pGEM-T* mang các gen kháng ampicillin và gen *LacZ* giúp dễ dàng sàng lọc dựa vào màu sắc khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc.

Vector *pET-22b(+)*: Được sử dụng làm vector nhân dòng và biểu hiện gen ở vi khuẩn *E. coli*. Vector *pET-22b(+)* mang các gen kháng ampicillin và gắn đuôi 6 Histone vào đoạn gen lạ, điều này giúp dễ dàng tinh sạch protein tái tổ hợp.

Vector *pBI121*: Được sử dụng làm vector nhân dòng và biểu hiện gen ở thực vật. Vector *pBI121* (Clontech, www.clontech.com) mang gen kháng kanamycin giúp sàng lọc trên môi trường nuôi cấy thực vật.

Phương pháp nghiên cứu

Tạo dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121*

* Nhân dòng vi khuẩn *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pGEM-T* và *CMAL/pET-22b(+)*

Đoạn cDNA mã hóa gen *CMAL* (1305 bp) được nhân dòng trong hệ thống vector *pGEM-T*, và plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt, sau đó vi khuẩn được sàng lọc trên môi trường chứa kháng sinh, tám khuẩn lạc được lựa chọn và thực hiện phản ứng PCR colony để kiểm tra sự hiện diện của gen chuyển. Sau khi xác định được dòng vi khuẩn mong muốn, khuẩn lạc được nuôi cấy, plasmid được tách và giải trình tự để xác định đúng dòng vi khuẩn mang *CMAL/pGEM-T* (Macrogen, Hàn Quốc).

Sau đó, vi khuẩn chứa vector *CMAL/pGEM-T* được nhân dòng, gen *CMAL* được khuếch đại và đưa vào vector *pET-22b(+)*. Quá trình biến nạp và nuôi cấy vi khuẩn được thực hiện như phương pháp chuyển gen vào vector *pGEM-T*. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên và được xác nhận bằng phản ứng PCR colony, các khuẩn lạc có băng DNA trùng khớp với đoạn DNA mục tiêu được chọn lọc, khuẩn lạc được nuôi cấy lỏng và lắc qua đêm, plasmid được tách và giải trình tự để xác định đúng dòng vi khuẩn mang *CMAL/pET-22b(+)* (Macrogen, Hàn Quốc).

* Tạo dòng vi khuẩn *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121*

Gen *CMAL* được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ plasmid tái tổ hợp *CMAL/pET-22b(+)* và nhân dòng trong hệ thống vector *pBI121* bằng cách sử dụng các vị trí của enzyme hạn chế *Xba*I/*Sma*I, sau đó phản ứng tạo dòng *CMAL/pBI121* được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng sốc nhiệt, nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB chứa kanamycin (50 μ g/mL). Tám khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên và được xác nhận bằng phản ứng PCR colony, khuẩn lạc có băng DNA trùng khớp với đoạn DNA mục tiêu được chọn lọc, nuôi cấy lỏng và lắc qua đêm, sau đó plasmid được tách chiết và được gửi giải trình tự để xác định đúng dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp (Macrogen, Hàn Quốc).

* Biến nạp plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121* vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Sau khi xác định được gen *CMAL* được chuyển thành công vào vector *pBI121*, plasmid *CMAL/pBI121* được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 bằng phương pháp đông/rã đông (Jyothishwaran *et al.*, 2006), và vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm trên môi trường YEP sàng lọc có bổ sung kanamycin (50 μ g/mL) và rifampicin (50 μ g/mL). Các khuẩn lạc được chọn và thực hiện PCR để kiểm tra sự hiện diện của gen chuyển. Tiếp đó, khuẩn lạc được chọn lọc và nuôi trong môi trường YEP (+ kanamycin + rifampicin) để tăng sinh nhằm thu sinh khối, chuẩn bị cho thí nghiệm tiếp theo.

* Chuẩn bị vi khuẩn cho chuyển gen

Vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 mang vector *CMAL/pBI121* được tăng sinh (từ một khuẩn lạc) qua đêm trong 10,0 mL môi trường YEP có bổ sung kanamycin (50 μ g/mL) và rifampicin (50 μ g/mL) ở 28°C, tốc độ lắc 250 vòng/phút trong điều kiện tối. Sau đó, 1 mL huyền phù được chuyển sang 500 mL YEP có bổ sung kháng sinh và nuôi cấy trong điều kiện tương tự cho đến khi giá trị đo OD₆₀₀ đạt từ 0,8-1,2. Tiếp đó, sinh khối vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút tại 4°C trong 15 phút. Sinh khối vi khuẩn được huyền phù với 500 mL môi trường MS lỏng (pH 5,7, điều chỉnh với KOH), bổ sung với 15 g sucrose, 0,25 g MES, 100 μ L Silwet và 100 μ M Acetosyringone. Huyền phù được trộn đều bằng máy khuấy từ.

Chuyển vector CMAL/pBI121 vào thực vật qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens*

* Chuẩn bị chậu cây để chuyển gen

Hạt cây đột biến *cmal* được gieo trên chậu đất (hỗn hợp vermiculite, rêu than bùn và đá trân châu theo tỷ lệ 3:1:1), các chậu được đặt trong phòng tối trong thời gian 3 ngày ở 4°C, sau đó các chậu được chuyển sang phòng nuôi cây ở điều kiện ánh sáng dài ngày (chu kỳ 16h sáng/8h tối) ở nhiệt độ 20 – 22°C. Sau 4-6 tuần, các cụm hoa đã xuất hiện và cây đã sẵn sàng cho việc chuyển gen.

* Chuyển vector CMAL/pBI121 vào thực vật qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens*

Vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp CMAL/pBI121 được dùng để chuyển vào cây đột biến *cmal* bằng phương pháp xâm nhập chân không (Bechtold và Pelletier, 1998). Các chậu cây sau khi chuyển được đặt trong điều kiện phòng nuôi cây, và tiếp tục chăm sóc cho đến khi cây khô và thu hạt. Hạt được thu hoạch theo từng cây riêng lẻ. Hạt thu được từ cây được chuyển gen được xem như là hạt thế hệ F1.

Sàng lọc các dòng bổ sung (com- lines)

Hạt F1 được khử trùng bề mặt và gieo trên đĩa petri chứa 20 mL môi trường MS có bổ sung kanamycin (50 µg/mL) và carbenicillin (50 µg/mL). Các hạt nảy mầm và mọc lên cây con có lá màu xanh là những cây chuyển gen. Sau 3 tuần nuôi cấy, chuyển các cây con sang chậu đất và nuôi trong điều kiện phòng nuôi cây cho đến khi thu hạt thế hệ F2. Các cây com-line tiếp tục được sàng lọc cho đến khi thu được hạt thế hệ F3, F4 là các cây đồng hợp tử. Mỗi cây tương ứng với một dòng. Sự hiện diện của gen CMAL trong cây đột biến *cmal* và trong các dòng com-lines được xác nhận bằng phản ứng RT-PCR với các đoạn mồi đặc hiệu được liệt kê trong Bảng 2.

Thực hiện phản ứng PCR

* Thực hiện phản ứng PCR colony

Phản ứng PCR colony được thực hiện để kiểm tra sự có mặt của gen CMAL trong các vector sử dụng ở cả vi khuẩn *E. coli* và vi khuẩn *A. tumefaciens*. Trong nghiên cứu này, các đoạn mồi được dùng được liệt kê trong Bảng 1. Phản ứng được thực hiện như sau: dùng đầu pipet (10 µL) tách lấy khuẩn lạc và nhúng vào hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm 10 µL Taq master mix (2X), 1 µL của 10 µM mỗi primer và 8 µL H₂O. Chu trình nhiệt bao gồm 1 chu kỳ biến tính (95°C/5 phút); 35 chu kỳ tổng hợp DNA (95°C/30 giây; 56°C/30 giây; 72°C/1 phút) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/10 phút.

Bảng 1. Trình tự các đoạn mồi trong phản ứng PCR

Tên mồi	Trình tự mồi (5' – 3')	Plasmid tái tổ hợp	Kích thước sản phẩm (bp)
F_CMAL_T	gagctcCATGGCGGGAGTGATTAG	CMAL/pGEM-T	1314
R_CMAL_T	aagcttCAACTTCTGAATCACTCTTAAC		
F_CMAL_pET	gagctcCATGGCGGGAGTGATTAG	CMAL/pET-22b(+)	1314
R_CMAL_pET	aagcttCAACTTCTGAATCACTCTTAAC		
F_CMAL_pBI	tctagaATGGCGGGAGTGATTAGG	CMAL/pBI121	~1344
R_CMAL_pBI	cccgggTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT		

*Chú thích: Chữ viết thường, in đậm là trình tự nhận biết của các enzyme hạn chế.

* Thực hiện phản ứng RT-PCR

Để kiểm tra sự biểu hiện của gen CMAL, 100 mg mẫu tươi hoặc đông lạnh được dùng để tách chiết RNA tổng số bằng bộ KIT tách chiết thực vật Plant RNeasy. 500 ng RNA tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng bộ KIT Transcription (Applied Biosystems, Mỹ). Chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR bao gồm 1 chu kỳ biến tính (95°C/5 phút); 30 chu kỳ tổng hợp DNA (94°C/30 giây; 55°C/30 giây; 72°C/30 giây) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/10 phút. Trong nghiên cứu này, các đoạn mồi đặc hiệu được sử dụng được liệt kê trong Bảng 2.

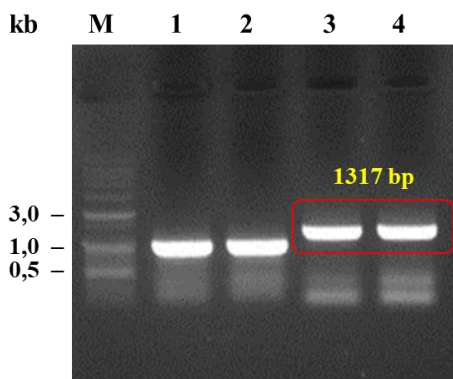
Bảng 2. Trình tự các đoạn mồi trong phản ứng RT-PCR

Tên mồi	Trình tự mồi (5' – 3')	Kích thước sản phẩm (bp)
RT_F_CMAL	ATCATTCAAAGCCACTCTG	338
RT_R_CMAL	GGCCACGAATTCATATATCTTC	
RT_F_TUBULIN	CTCAAGAGTTCTCAGCAGTA	483
RT_R_TUBULIN	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận gen *CMAL* từ cDNA cây *Arabidopsis* đối chứng

Cây đối chứng Col-0 được trồng, thu mẫu và tách chiết RNA tổng số, sau đó phản ứng phiên mã ngược được thực hiện để tổng hợp cDNA. Gen *CMAL* với chiều dài đầy đủ 1305 bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các đoạn mồi được dùng để nhân dòng trong vector pGEM-T. Kết quả sản phẩm PCR trên **Hình 1** cho thấy, giếng 3,4 xuất hiện các băng DNA có chiều dài tương ứng 1317 bp – đúng với kích thước gen *CMAL* và hai vùng trình tự nhận biết. Phần gel chứa DNA mong muốn được cắt, sau đó DNA được tinh sạch và thu nhận bằng bộ KIT tách chiết (GeneAll, Hàn Quốc).



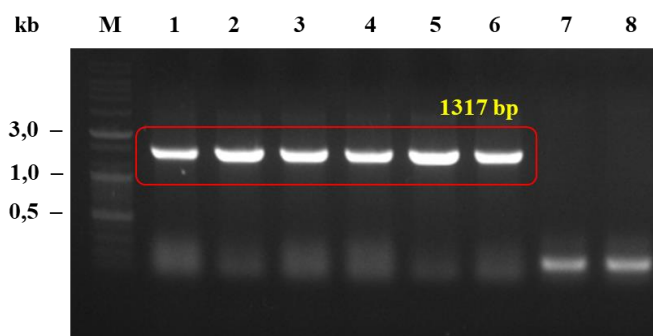
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR

M: thang chuẩn 1kb Plus (NEB); 1,2: Mẫu không chứa gen CMAL; 3-4: Mẫu có chứa gen CMAL

Tạo dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121*

* Tạo dòng vi khuẩn *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121*

Gen *CMAL* được nhân dòng trong vector pGEM-T mang gen kháng ampicillin và gen LacZ. Sau quá trình biến nạp và nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB có bổ sung X-gal. Tám khuẩn lạc màu trắng được chọn lọc và thực hiện phản ứng PCR colony (**Hình 2**). Kết quả sản phẩm điện di cho thấy, từ giếng 1 đến giếng 6 có sự xuất hiện một băng DNA được khuếch đại với kích thước khoảng 1317 bp, tương đương với kích thước mong muốn (gen *CMAL* và hai vùng trình tự nhận biết), điều này khẳng định gen *CMAL* đã được chuyển thành công vào vector pGEM-T. Plasmid tái tổ hợp *CMAL/pGEM-T* được gửi giải trình tự, sau đó, kết quả trình tự được so sánh sự tương đồng với trình tự gốc của gen *CMAL* được thu thập từ Ngân hàng dữ liệu cây *Arabidopsis* (arabidopsis.org) bằng phần mềm CLUSTALW (<https://www.genome.jp>) để xác định chính xác gen được chuyển vào là gen *CMAL*.



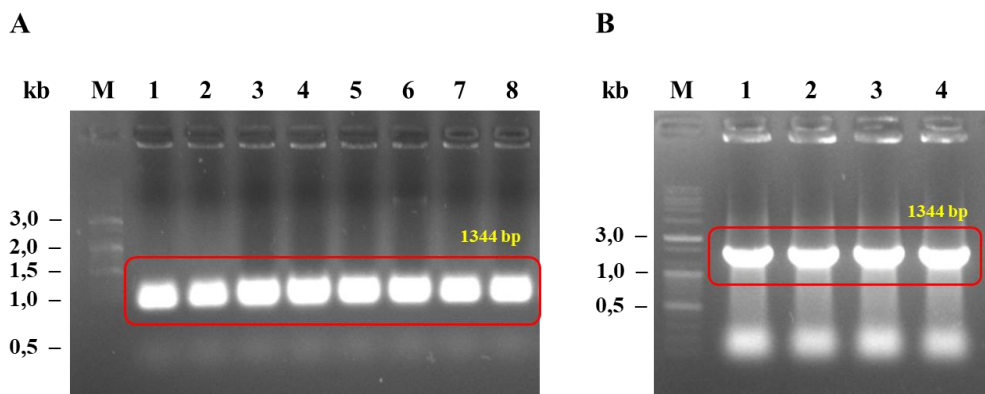
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp *CMAL/pGEM-T*

M: Thang chuẩn 1kb Plus (NEB), 1-6: Khuẩn lạc chứa gen CMAL; 7-8: Khuẩn lạc không chứa gen CMAL.

Sau khi xác định được dòng vi khuẩn mang vector *CMAL/pGEM-T*, thông thường có thể tiến hành bước kế tiếp là khuếch đại và nhân dòng gen *CMAL* trong vector đích pBI121 biểu hiện ở thực vật. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, để thuận tiện cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp nhằm thực hiện các phản ứng phân tích hoạt tính của protein *CMAL*, tác giả đã nhân dòng gen *CMAL* trong vector biểu hiện pET-22b(+) giúp dễ dàng tinh sạch protein tái tổ hợp dựa vào đuôi His-tag. Gen *CMAL* được đưa vào vector pET-22b(+) tại vị trí các enzyme giới hạn *SacI/HindIII*, plasmid tái tổ hợp *CMAL/pET-22b(+)* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21, vi khuẩn được nuôi

cây, plasmid được tách chiết và giải trình tự để xác định đúng dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp *CMAL/pET-22b(+)*.

Để gen *CMAL* ngoại lai biểu hiện được trong tế bào thực vật, vector pBI121 được sử dụng để tạo dòng, plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121* được biến nạp vào tế bào *E. coli*, và sự có mặt của gen *CMAL* được kiểm định bằng phản ứng PCR colony (Hình 3A). Kết quả sản phẩm điện di cho thấy, tất cả 8 giếng đều xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 1344 bp, kích thước này phù hợp với kích thước tính toán mong muốn, do đoạn gen được chuyển (*CMAL-6His*) là đoạn gen tái tổ hợp bao gồm gen *CMAL* và phần đuôi His-tag gắn vào từ vector pET-22b(+). Plasmid *CMAL/pBI121* được giải trình tự và so sánh sự tương đồng với trình tự gốc của gen *CMAL* bằng phần mềm CLUSTALW để xác định chính xác gen *CMAL* được chuyển thành công vào vector pBI121.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121*

(A) Vi khuẩn *E. coli*, M: Thang chuẩn 1 kb (NEB), 1-8: Khuẩn lạc chứa gen *CMAL*;
 (B) Vi khuẩn *A. tumefaciens*, M: Thang chuẩn 1 kb Plus (NEB), 1-4: Khuẩn lạc chứa gen *CMAL*.

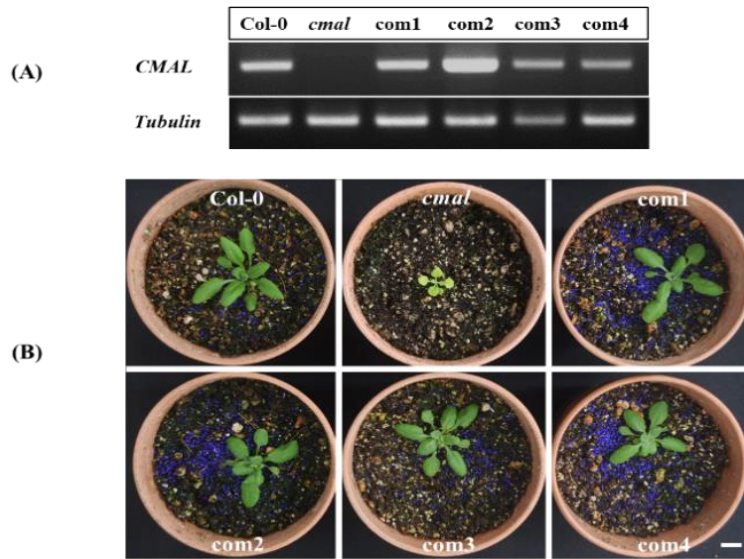
* Biến nạp plasmid tái tổ hợp *CMAL/pBI121* vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

Sau khi chọn được dòng vi khuẩn mục tiêu, plasmid *CMAL/pBI121* được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp đông/rã đông, và nuôi cấy chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh thích hợp. Chọn ngẫu nhiên bốn khuẩn lạc và thực hiện phản ứng PCR colony để kiểm tra tính chính xác của gen chuyển (Hình 3B). Kết quả sản phẩm điện di cho thấy, cả 4 giếng gel đều xuất hiện một băng DNA với kích thước khoảng 1344 bp, điều này chứng minh plasmid *CMAL/pBI121* đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens*. Tiếp đó, một trong bốn khuẩn lạc được chọn lọc và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường YEP có bổ sung các kháng sinh thích hợp để chuẩn bị cho thí nghiệm chuyển vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector *CMAL/pBI121* vào cây đột biến *cmal*.

Tạo dòng bổ sung *CMAL-comlines* bằng phương pháp chuyển gen qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Chậu cây đột biến *cmal* được sử dụng để chuyển plasmid *CMAL/pBI121* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Sau khi chuyển, các chậu cây được đặt trong phòng nuôi cây và tiếp tục chăm sóc đến khi thu hạt. Hạt F1 được gieo trên môi trường chọn lọc, và các cây con có lá thật màu xanh được chuyển sang đất trồng để thu hạt F2. Đến thế hệ F2, tiếp tục gieo hạt và sàng lọc các đĩa chứa cây con sinh trưởng trên môi trường chọn lọc theo tỷ lệ 3:1 (3 come-line: 1 đột biến). Chọn những cây com-line từ đĩa có tỷ lệ 3:1 chuyển sang chậu đất và tiếp tục trồng cho đến khi thu hạt thế hệ F3, F4.

Để chứng minh sự thay đổi kiểu hình ở cây *cmal* do sự bất hoạt của gen *CMAL*, phải tạo ra được ít nhất 02 dòng đồng hợp tử *CMAL-comline* ở thế hệ F3 hoặc F4 có kiểu hình giống nhau và giống với kiểu hình của cây đối chứng. Trong thí nghiệm này, những phân tích khái quát về hình thái và quá trình sinh trưởng, phát triển của cây cho thấy các cây comline có kiểu hình tương tự như cây đối chứng. Kết quả này khẳng định kiểu hình ở cây đột biến *cmal* là do sự bất hoạt của gen *CMAL* gây ra. Bên cạnh đó, sự có mặt của gen *CMAL* ở các dòng bổ sung cũng đã được kiểm định bằng phản ứng RT-PCR (Hình 4), đây là cơ sở khoa học chứng minh rằng gen *CMAL* ngoại lai đã được chuyển thành công vào cây đột biến *cmal*. Như vậy, hoạt động của gen *CMAL* ngoại lai ở các dòng bổ sung đã bù lại gen *CMAL* bị mất đi trong cây đột biến, cho nên các dòng bổ sung *CMAL-comline* có kiểu hình tương tự như cây đối chứng.



Hình 4. (A), Sự biểu hiện của gen *CMAL* trong cây được đánh giá bằng RT-PCR; (B), Các cây được chuyển trồng trong đất sau 20 ngày. Col-0: Cây đối chứng, *cmal*: Cây đột biến, com1-4: Các cây *CMAL*-comline thế hệ F4; *Tubulin*: Gen tham chiếu.

KẾT LUẬN

Gen *CMAL* ngoại lai được nhân dòng trong vector pBI121 và được chuyển thành công vào *A. thaliana* đột biến *cmal* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Các dòng bổ sung (*CMAL*-comline) thu được có kiểu hình giống cây hoang dại đối chứng (Col-0) và sự hiện diện của gen *CMAL* trong cây *A. thaliana* chuyển gen được xác nhận bằng RT-PCR. Điều này chứng minh rằng gen *CMAL* ngoại lai đã bổ sung cho hoạt tính của *CMAL* trong cây đột biến *cmal*, và gen này đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của *A. thaliana*.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn GS.TS. Hunseung Kang đã tài trợ về tài chính và đưa ra những lời khuyên quý báu để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997). T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet*, 13: 152–156.
- Bechtold N, Pelletier G (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, 82: 259-266.
- Jyothishwaran G, Kotresha D, Selvaraj T, Srideshikan SM, Rajvanshi PK, Jayabaskaran C (2006). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science*, 93(6): 770-772.
- Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J (1992). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 20: 963-976.
- Ngoc LNT, Park SJ, Huong TT, Lee KH, Kang HS (2021). N4-methylcytidine rRNA methylation in chloroplasts is crucial for chloroplast function, development, and abscisic acid response in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 63: 570-582.
- O'Malley RC, Ecker JR (2010). Linking genotype to phenotype using the Arabidopsis unimutant collection. *The Plant Journal*, 61: 928-940.
- Radhamony RN, Prasad AM, Srinivasan R (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electron J Biotechnol*, 8(1): 82-106.
- Zou M, Mu Y, Chai X, Ouyang M, Yu LJ, Zhang L, Meurer J, Chi W (2020). The critical function of the plastid rRNA methyltransferase, *CMAL*, in ribosome biogenesis and plant development. *Nucleic Acids Res*, 48: 3195-3210.

GENERATION OF COMPLEMENTATION LINES IN THE LOSS-OF-FUNCTION MUTANT DUE TO T-DNA INSERTION IN *Arabidopsis thaliana*

Le Nguyen Tieu Ngoc*

Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University

SUMMARY

The generation of the complementation lines in the loss-of-function mutants to complement a knock-out gene due to a T-DNA fragment inserted into the target gene is considered a useful tool in researching of the functional role of gene during plant growth and development as well as stress response. The *cmal* mutant was used in this study. In *Arabidopsis thaliana*, *CMAL* gene (Chloroplast *mraW*-Like) plays a crucial role in chloroplast biogenesis, photosynthesis, and plant growth and development. The insertion of T-DNA into the second intron of *CMAL* gene to generate the *cmal* mutant displayed growth-defect phenotypes with stunted stems, retarded growth, delayed flowering time, the formed seed number was small. Foreign *CMAL* was cloned into the target pBI121 vector in *E. coli*, plasmid *CMAL/pBI121* was subsequently transformed into *E. coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. After that, *A. tumefaciens* carrying *CMAL/pBI121* recombinant plasmids were used to transform the *cmal* mutant using vacuum infiltration method. The resulting complementation lines (*CMAL-comlines*) were screened by sowing the seeds on Murashige and Skoog (MS, 1962) medium supplemented with antibiotics, and the presence of *CMAL* gene was confirmed via RT-PCR.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *CMAL*, complementation lines, mutant, cloning, T-DNA.

* Author for correspondence: Tel: 0865769027; Email: lntngoc@ttn.edu.vn