

## ĐÁNH GIÁ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN *AtZAT12* TRÊN CÂY *ARABIDOPSIS* CHUYỂN GEN

Lê Thị Tuyết Châm\*, Vũ Ngọc Thắng, Vũ Thị Thúy Hằng, Trần Anh Tuấn

*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

\*Tác giả liên hệ: [lttcham@vnua.edu.vn](mailto:lttcham@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 26.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 20.07.2020

### TÓM TẮT

ZAT12 là một yếu tố phiên mã đáp ứng stress có sự biểu hiện tăng cao khi cây chịu một số stress như oxy hóa, lạnh và nhiệt... ZAT12 liên kết đáp ứng thiếu sắt với stress oxy hóa thông qua tương tác trực tiếp và điều hòa âm tính với yếu tố phiên mã FIT. Trong nghiên cứu này, các dòng chuyển gen ZAT12 được điều khiển bởi promoter của chính gen ZAT12. Mục tiêu của nghiên cứu là tạo được các dòng chuyển gen *AtZAT12* biểu hiện cao (ZAT12 Ox) đáp ứng lại với stress oxy hóa liên quan đến hấp thụ Fe. Chúng tôi tiến hành chọn lọc các dòng ZAT12 Ox bằng phương pháp quan sát hạt phát huỳnh quang, đọc trình tự và PCR. Các dòng đồng hợp tử được đánh giá sinh trưởng, sự biểu hiện ở mức phiên mã và dịch mã. Kết quả chọn được 4 dòng dương tính T0 (kí hiệu CH1-1, 1-4, 1-10 và 1-14) có sinh trưởng khác biệt, trong đó sinh trưởng của dòng CH1-1 bị ức chế. Trong điều kiện thiếu Fe, các dòng ZAT12 Ox này có biểu hiện tăng cao, nhưng không tăng thêm khi xử lý thêm với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sự biểu hiện gen ở mức độ dịch mã cũng đã được quan sát thấy ở dòng CH1-4 bằng Western Blot.

Từ khóa: ZAT12 Ox, điều kiện thiếu Fe, biểu hiện cao.

### Evaluation of *AtZAT12* Gene Expression in Transgenic *Arabidopsis*

### ABSTRACT

ZAT12 is one of the transcription factors response to abiotic stress, which has had higher expression of ZAT12 under oxidative, cold, and heat stress etc. ZAT12 links iron deficiency and oxidative stress responses through direct interaction with and negative regulation of FIT. However, in this study, ZAT12 was regulated by ZAT12 native promoter. This study aimed to generate ZAT12 with overexpression (ZAT12 Ox) in response to oxidative stress and Fe uptake. The attempts of this study were further selected the transgene lines containing 2x35S::ZAT12 by observing the dry seed under fluorescent microscope gene sequencing and PCR. The growth and gene expression as well as ZAT12 protein regulation of 2x35S::ZAT12 lines (ZAT12 Ox) were evaluated. As the results showed, the 4 positive lines (CH1-1, 1-4, 1-10 and 1-14 lines) with different growth were generated, of which the growth of CH1-1 line was inhibited. Expression of *AtZAT12* gene induced to response to Fe deficiency, but not to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplemented treatment. ZAT12 protein of CH1-4 line also detected by Western Blot.

Keywords: ZAT12 Ox, overexpression, Fe deficiency.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thực vật luôn phải đối mặt với những stress do môi trường biến đổi gây ra, nên chúng không thể phát huy hết tiềm năng di truyền của chúng. Tùy thuộc vào tác động (cấp tính hay lâu dài) và thời gian bị stress, thực vật phát triển các chương trình cụ thể để đáp ứng với các tín hiệu nhận được ở các cấp độ khác nhau (Dinneny & cs., 2008).

Sắt (Fe) là một trong số các nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự phát triển của thực vật và được tìm thấy trong các nhóm Fe-S, nhóm nhân heme (Marschner, 1995). Mặc dù rất cần thiết, nhưng Fe sẽ hạn chế sự phát triển của thực vật khi xuất hiện hàm lượng thấp vì thiếu hụt hoặc quá nhiều vì độc tính. Sự thiếu hụt Fe dẫn đến triệu chứng thiếu diệp lục ở lá non (Marschner, 1995) và do đó ảnh hưởng đến bộ máy quang hợp và cuối cùng ảnh hưởng đến

năng suất cây trồng. Để ứng phó, thực vật đã phát triển các mạng lưới kiểm soát tốt đối với sự hấp thụ, sử dụng, cân bằng bên trong và thậm chí là thải độc do có quá nhiều Fe dẫn đến tạo ra các gốc tự do (ROS) thông qua phản ứng Fenton. ROS có thể tác động rất lớn đến lipid, protein, ADN bằng cách gây ra sự peroxyd hóa lipid, biến tính protein và đột biến ADN (Mittler, 2002).

Một số nghiên cứu đã cho thấy sự biểu hiện của yếu tố phiên mã chứa kẽm đáp ứng với stress- *AtZAT12* được tăng cao khi cây chịu một số stress như stress oxy hóa, lạnh và nhiệt... (Iida & cs., 2000; Vogel & cs., 2005; Rizhsky & cs., 2004; Davletova<sup>a,b</sup> & cs., 2005). Đây là yếu tố phiên mã có chứa một motif *EAR* hoạt động như một chất ức chế biểu hiện gen. Sử dụng kỹ thuật lai nấm men, Le & cs. (2016) đã chứng minh rằng motif *EAR* là cần thiết cho sự tương tác giữa hai yếu tố phiên mã FIT và *ZAT12*. FIT là yếu tố phiên mã trung tâm điều khiển quá trình hấp thụ sắt ở cây hai lá mầm. Le & cs. (2016) cũng đã kết luận *ZAT12* liên kết đáp ứng thiếu sắt với stress oxy hóa thông qua tương tác trực tiếp và điều hòa âm tính với FIT (Le & cs., 2016). Trong nghiên cứu này, các dòng *Arabidopsis* chuyển gen *ZAT12* biểu hiện cao được tạo ra dưới sự điều hòa của promoter 35S và được đánh giá sinh trưởng, sự biểu hiện ở mức phiên mã và dịch mã. Kết quả sẽ làm sáng tỏ quá trình hấp thụ sắt và stress oxy hóa trong điều kiện biểu hiện cao của gen *AtZAT12*.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

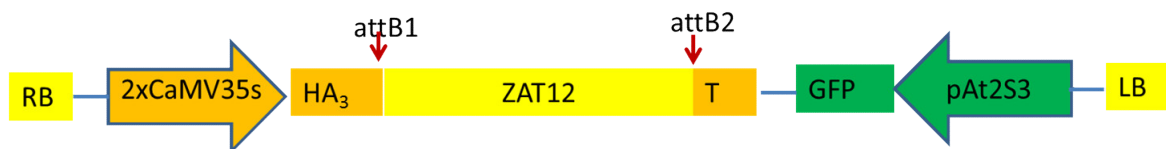
Cấu trúc *HA<sub>3</sub>-ZAT12* đã được xây dựng để nghiên cứu hoạt động của protein *ZAT12* và sau

đó biến nạp vào cây *Arabidopsis*. Sau khi biến nạp các dòng T3 đồng hợp tử được chọn lọc và đánh giá sinh trưởng cũng như đánh giá sự biểu hiện của gen ở mức phiên mã và dịch mã.

Cấu trúc biểu hiện cao *HA<sub>3</sub>-ZAT12* được tạo ra theo công nghệ Gateway (Hình 1). Đầu tiên gen *ZAT12* được khuếch đại và gắn ở 2 đầu trình tự *attB1* và *attB2*. Sản phẩm sau đó được tinh sạch và gắn vào vectơ pDONR207 nhờ phản ứng BP. Các vectơ chưa gắn gen chuyển mang gen gây chết giữa 2 vị trí gắn, là nơi được chèn gen đích sau này. Do đó, chỉ các vi khuẩn mang vectơ có gen đích được gắn vào sẽ sống sót. Sau đó trình tự này tiếp tục được chuyển vào vectơ biểu hiện pALLIGATOR 2 nhờ phản ứng LR để thu được cấu trúc cuối cùng là p2xCaMV35S::*HA<sub>3</sub>-ZAT12*.

### 2.2. Chọn lọc các dòng mang gen chuyển sau biến nạp

Quá trình biến nạp trên cây *Arabidopsis thaliana* Col-0 được thực hiện theo phương pháp nhúng hoa (Clough & Bent, 1998). Vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens* được nuôi cấy trong môi trường LB (Luria-Bertain) qua đêm ở 28°C, 225 vòng/phút bổ sung thêm kháng sinh Rifampicin, Carbenicillin và Spectinomycin. Ngày tiếp theo là bước nuôi cấy chính trong 500ml môi trường có chứa acetosyringone và các loại kháng sinh tương tự như nuôi cấy trước. Nuôi cấy chính được giữ ở 28°C, 225 vòng/phút cho đến khi giá trị OD của dịch nuôi cấy đạt 0,8-1. Vi khuẩn thu được sẽ đưa vào môi trường xâm nhiễm (bao gồm 10mM MgCl, 10mM MES và 100 AcM Acetosyringone, 1% Sucrose, 0,5% Silwet). Dịch vi khuẩn được ủ ít nhất 1 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi biến nạp.



Ghi chú: Biểu hiện gen *GFP* được thúc đẩy bởi promoter *pAT2S3* sẽ được sử dụng để chọn lọc hạt biến đổi gen sau biến nạp

Hình 1. Cấu trúc T-ADN mang gen *HA<sub>3</sub>-ZAT12*. *gZAT12* đã được chèn vào phía sau *HA<sub>3</sub>* của vectơ đích pALLIGATOR2

Cây *Arabidopsis* bốn tuần tuổi có nụ hoa kín được nhúng trong 30 giây vào dịch huyền phù *Agrobacteria* tương ứng và được đưa trở lại phòng nuôi cây trong điều kiện ngày dài. Cây được che bằng chụp nhựa trong 24 giờ tiếp theo để tăng độ ẩm và được trồng thêm hai tuần nữa trong điều kiện ngày dài, trước khi thu hoạch cây. Hạt biến đổi gen được lựa chọn dưới kính hiển vi huỳnh quang để chọn lọc những hạt mang vector p ALLIGATOR 2 (hạt chuyển gen đã cho thấy huỳnh quang GFP, do gen GFP có trong T-ADN (Hình 1). ADN của cây chuyển gen được tách chiết gửi đi đọc trình tự và sau đó chọn lọc bằng PCR với cặp mồi sau attB1HA<sub>3</sub> (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCATAACCCATACGACGT-3') và *ZAT12* genotyping 3' (5'TTCAAATTGTCCACC ATCCCTAG 3'). Cây chuyển gen sau đó được nhân lên với thế hệ T3 bằng tự thụ để thu các dòng đồng hợp tử. Mỗi thế hệ sẽ chọn dòng dương tính bằng phương pháp PCR.

### 2.3. Đánh giá sinh trưởng của các dòng chuyển gen *AtZAT12* có biểu hiện cao

Để đánh giá sinh trưởng, hạt chuyển gen dương tính ở thế hệ T2 thu được được khử trùng bề mặt theo phương pháp mô tả của Jakoby & cs. (2004). Các hạt này được đánh giá sinh trưởng thông qua hai hệ thống sinh trưởng sau:

- Trong hệ thống sinh trưởng *in vitro* trên đĩa thạch Hoagland (Hoagland, 1920) không bổ sung sắt, hạt cây được đặt trong các đĩa vuông ở điều kiện 21°C/19°C và chu kỳ 16 giờ sáng, 8 giờ tối (điều kiện dài ngày) trong các buồng sinh trưởng thực vật của CLF Plant Climatics (CLF, Đức).

- Trong hệ thống sinh trưởng trên đất, cây con đã qua hệ thống sinh trưởng *in vitro* trên môi trường thạch Hoagland sẽ được chuyển để trồng trên đất ở điều kiện dài ngày.

Trước khi thu hoạch mẫu cho các thí nghiệm đánh giá sự biểu hiện gen ở mức phiên mã và dịch mã cây con mang gen chuyển được đánh giá sinh trưởng thông qua sự phát triển lá và rễ.

### 2.4. Đánh giá sự biểu hiện gen *AtZAT12* ở mức độ phiên mã bằng kỹ thuật Real-Time PCR

Mẫu lá và rễ của cây 8 ngày tuổi (thế hệ T3) sinh trưởng trên môi trường thạch Hoagland trong điều kiện không bổ sung sắt và xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100mM) trong 1h được dùng để tách chiết ARN (theo hướng dẫn của Spectrum™ Total RNA Kit, Sigma-Aldrich). Thí nghiệm đánh giá sự biểu hiện gen *AtZAT12* sơ bộ ban đầu sử dụng các mẫu rễ và lá của cây 30 ngày tuổi sinh trưởng trong đất trong điều kiện đủ Fe.

Tách chiết ARN và tổng hợp cADN: ARN tổng số được chiết xuất từ khoảng 100mg mẫu. Mẫu được nghiền thành bột và đồng nhất hóa trong nitor lỏng và tách chiết theo bộ Kit ARN tổng số (Spectrum™ Plant Total RNA Kit, Sigma-Aldrich, Đức). Sau đó, đo nồng độ ARN và 1g của ARN tổng số được sử dụng để tổng hợp cADN theo Kit (Fermentas, Đức). Để giảm thiểu lây nhiễm cADN trong các mẫu, mẫu ARN tổng số đã được xử lý với DNAaseI. Sản phẩm cuối cùng cADN đã được pha loãng 1:10 trước khi thực hiện phản ứng RT-PCR. Hỗn hợp phản ứng RT-PCR bao gồm 10µl Takara Premix, 0,2µl Primer 5'; 0,2µl Primer 3'; 0,1µl SYBR green; & 10µl cADN. Chu trình nhiệt như sau: 95°C, 3 phút; (95°C, 10 giây, 58°C 18 giây, 72°C, 18 giây) × 40 chu kỳ; 72°C, 7 phút; phân tích độ sạch sản phẩm 55-95°C và giữ mẫu ở 12°C. Kết quả được phân tích trên phần mềm iQ5 (Biorad, Đức).

### 2.5. Đánh giá sự biểu hiện gen *AtZAT12* ở mức độ dịch mã bằng kỹ thuật Western Blot

Rễ cây 8 ngày tuổi (thế hệ T3) sinh trưởng trên đĩa thạch Hoagland của dòng CH1-4 được thu để thực hiện kỹ thuật Western blot. Kỹ thuật này được thực hiện theo quy trình chuẩn mô tả trong Sambrook & cs. (1989). Protein tổng số được tách chiết có chứa protein HA<sub>3</sub>-FIT được tách ra trong gel SDS 10%. Quá trình xử lý kháng thể sơ cấp HA đã sử dụng hệ thống ID SNAP (Millipore, Mỹ) của nhà sản xuất. Để phát hiện kháng thể thứ cấp kết hợp với peroxidase, chúng tôi sử dụng bộ dụng cụ ECL và phim (Amersham, Mỹ).

## 2.6. Phân tích kết quả

Số liệu được thu thập và xử lý bằng các phần mềm Excel, plasmid editor (<http://biology.labs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>) và Bio-Rad iQ5 ([www.bio-rad-iq5.software.informer.com/](http://www.bio-rad-iq5.software.informer.com/)).

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Chọn lọc các dòng *Arabidopsis* chuyển gen sau biến nạp

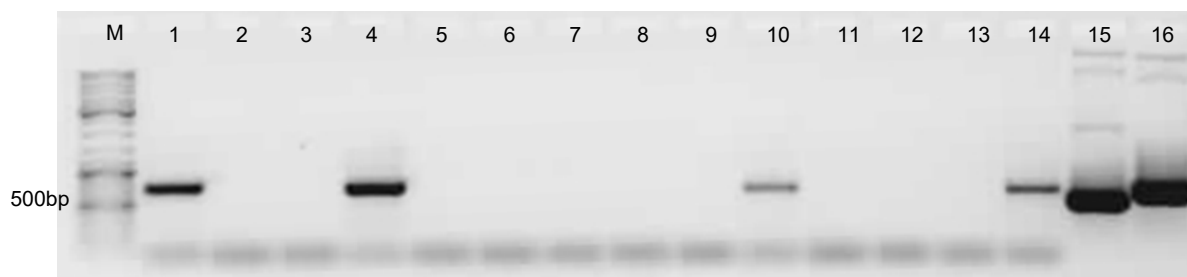
Sau khi biến nạp, hạt thu được sẽ tiến hành chọn lọc ở thế hệ T0 dựa trên phản ứng PCR với 2 cặp môi thiết kế: 1 môi nằm trên vùng HA<sub>3</sub> và 1 môi nằm trên gen đích *ZAT12* (có kích thước ~ 672bp). Kết quả chọn lọc sau biến nạp bằng kỹ thuật PCR này được thể hiện trên hình 2.

Ở T0, 4 dòng dương tính là các dòng được kí hiệu 1, 4, 10 và 14 có kích thước giống như đã dự tính là ~672bp. Kết hợp với việc đọc trình tự cho thấy cấu trúc HA<sub>3</sub>-*ZAT12* có hướng đọc theo đúng khung đọc. Từ 4 dòng đó, tiếp tục chọn lọc ở các thế hệ T1, T2 và T3 để thu được dòng chuyển gen đồng hợp tử (Bảng 1). Ở T3, 30 cá thể đồng hợp tử chọn được từ các dòng 4, 10 và

14. Riêng dòng 1 không thu được cá thể nào ở T3 do cây không ra hoa và sau đó chết. Chúng tôi tiếp tục chọn lọc bằng PCR ở các thế hệ T1, T2, và T3 tiếp theo để thu được các dòng chuyển gen đồng hợp tử. Kết quả cho thấy gen chuyển *AtZAT12* vẫn được duy trì ở thế hệ T3.

### 3.2. Đánh giá sinh trưởng của các dòng chuyển gen *AtZAT12* biểu hiện cao.

Đánh giá sinh trưởng dòng chuyển gen dương tính trong hệ thống sinh trưởng *in vitro* cho thấy: dòng 1 và 10 có sinh trưởng kém, lá nhỏ so với cây đối chứng Col-0; dòng 4 và 14 có sinh trưởng bình thường giống cây đối chứng Col-0 (Hình 4). Trong hệ thống trồng trên đất, các cây dòng 1 sinh trưởng kém, chỉ được 1-2 hoa ở T1, các thế hệ tiếp theo không ra hoa, rồi chết. Các dòng 4, 10 và 14 sinh trưởng tương đương như cây đối chứng Col-0. Theo Le & cs. (2016), *ZAT12* ức chế phiên mã của yếu tố FIT - một yếu tố phiên mã trung tâm điều hòa quá trình hấp thụ sắt ở thực vật. Khi yếu tố phiên mã *ZAT12* có biểu hiện cao dẫn đến ức chế quá trình phiên mã của *FIT*, từ đó ảnh hưởng đến hấp thụ Fe và sinh trưởng của cây.

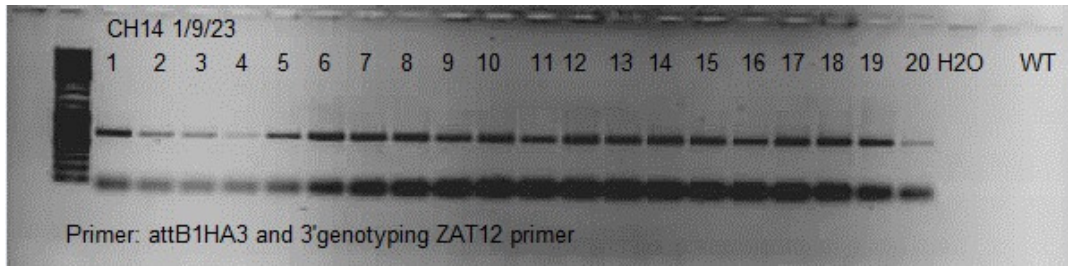


Ghi chú: M: băng chuẩn điện di (GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder); 1-14: các dòng chuyển gen T0, 15: đối chứng, vectơ pAlligator 2-ZAT12; 16: đối chứng, vectơ p35S:: ZAT12.

**Hình 2. Ảnh chọn lọc các dòng chuyển gen *ZAT12* biểu hiện cao bằng PCR ở lá cây *Arabidopsis* ở thế hệ T0**

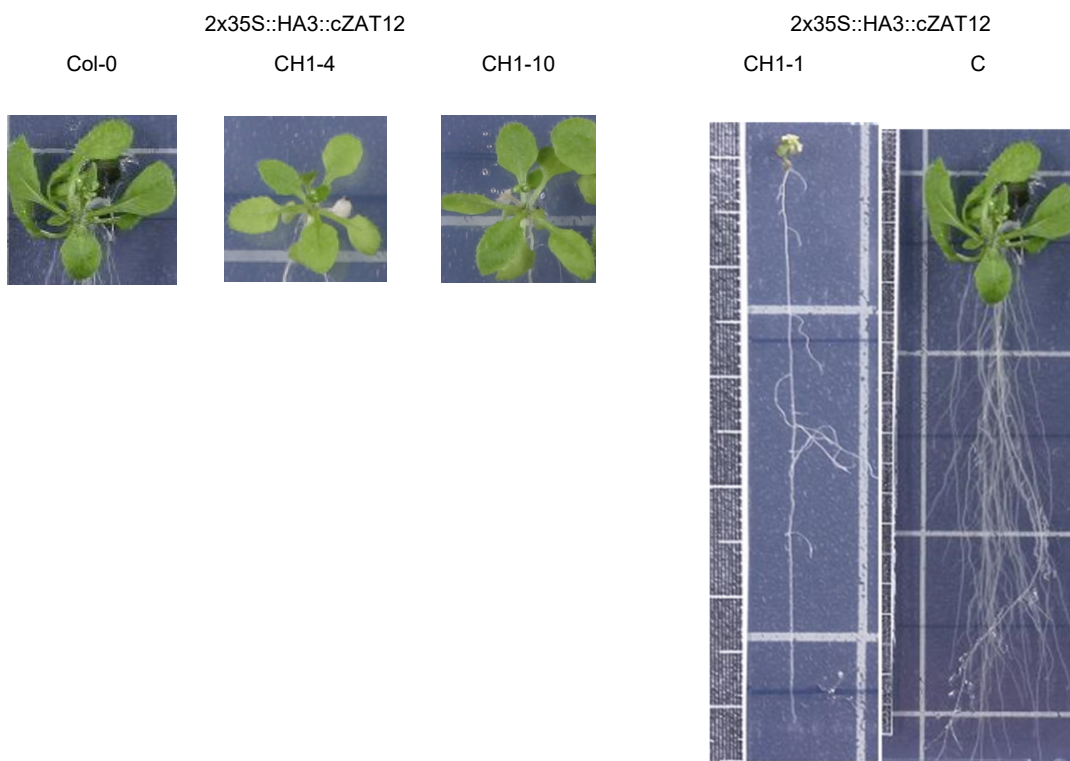
**Bảng 1. Các dòng *Arabidopsis* dương tính đã thu được sau các thế hệ chọn lọc T1-T3 của các dòng chuyển gen *AtZAT12* biểu hiện cao**

Tên dòng	Ký hiệu dòng	Thế hệ T0 (số cá thể)	Thế hệ T1 (số cá thể)	Thế hệ T2 (số cá thể)	Thế hệ T3 (số cá thể)	Đồng hợp tử/dị hợp tử	Số dòng đồng hợp tử mang gen chuyển
1	CH1-1	1	5	10	x	x	x
4	CH1-4	1	30	30	30	Đồng hợp tử	1
10	CH1-10	1	10	30	30	Đồng hợp tử	1
14	CH1-14	1	30	30	30	Đồng hợp tử	1



Ghi chú: Các giếng được đánh dấu từ 1-20 là các cá thể của dòng 4 ở thế hệ T3. Đối chứng (-) ký hiệu là H<sub>2</sub>O và cây đối chứng không chuyển gen ký hiệu là WT (Còn 10 cá thể khác cũng cho kết quả dương tính nhưng do kích thước của gel chỉ đủ cho 24 giếng nên kết quả của 10 cá thể này được chạy trên bản gel khác).

**Hình 3. Kết quả chọn lọc đại diện cho các dòng biểu hiện cao HA<sub>3</sub>-ZAT12 bằng PCR trên lá cây ở thế hệ T3**



Ghi chú: Bên trái là dòng chuyển gen CH1-1; Bên phải là cây đối chứng Col-0 (ký hiệu C).

**Hình 4. Sự sinh trưởng của các dòng chuyển gen 1, 4, 10 trong hệ thống sinh trưởng *in vitro* trên đĩa vuông**

### 3.3. Kết quả đánh giá sự biểu hiện của gen *AtZAT12* ở mức độ phiên mã

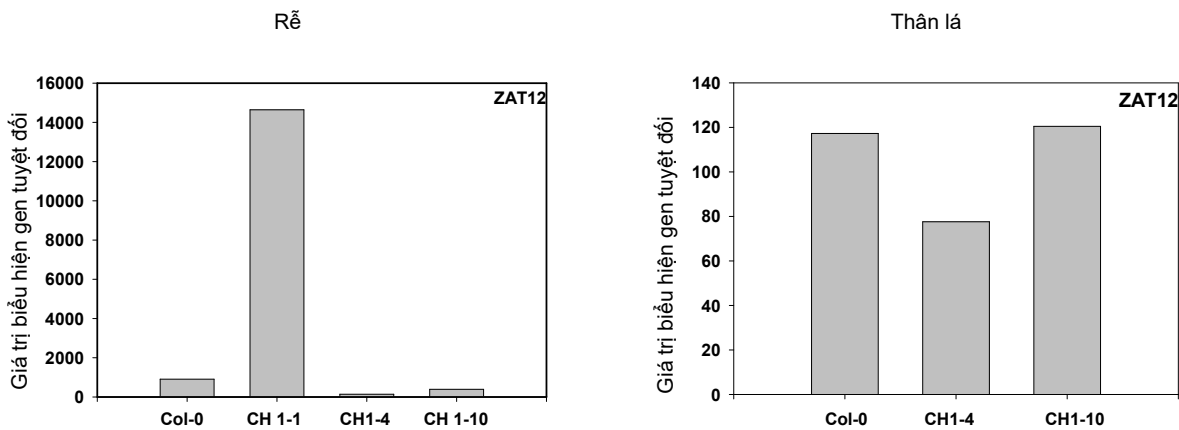
Sự biểu hiện của gen *AtZAT12* được tăng lên khi cây bị stress oxy hóa, lạnh, nhiệt... (Iida & cs., 2000; Vogel & cs., 2005; Rizhsky & cs.,

2004; Davletova<sup>a,b</sup> & cs., 2005). Để đánh giá sự biểu hiện gen *AtZAT12* của các dòng ZAT12 Ox, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Real time PCR để đánh giá sự biểu hiện gen này ở rễ và thân lá. Do dòng CH1-1 sinh trưởng kém nên chúng tôi đã không thu đủ được lượng lá để tách ARN. Do

đó kết quả chỉ trình bày sự biểu hiện của gen *AtZAT12* ở ba mẫu rễ của các dòng 1, 4 và 10 và hai mẫu lá của các dòng là 4 và 10 (Hình 5).

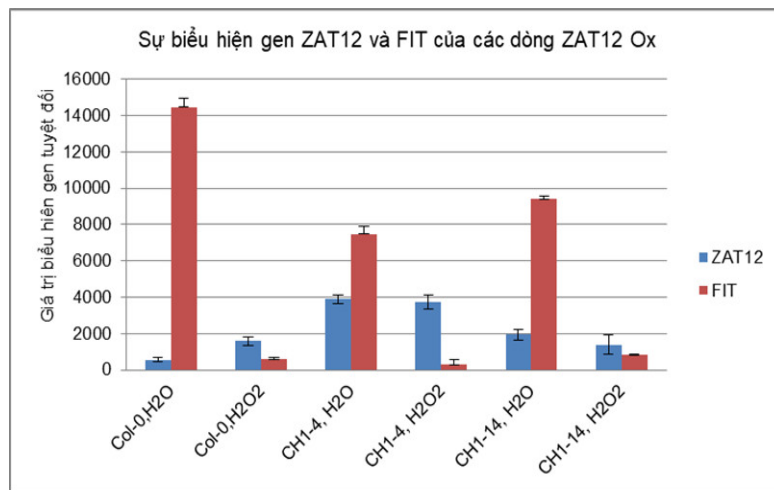
Kết quả cho thấy dòng số 4 biểu hiện gen *AtZAT12* kém hơn cả đối chứng Col-0 ở cả rễ và thân lá. Dòng 10 có biểu hiện gen *AtZAT12* thấp hơn hoặc tương đương với đối chứng Col-0 lần lượt ở rễ và thân lá. Trong khi dòng 1 có sự biểu hiện vượt trội so với đối chứng ở rễ, nhưng kiểu hình kém sinh trưởng so với dòng 4 và 10.

Do hệ thống sinh trưởng này chưa cho thấy sự biểu hiện cao của các dòng ZAT12 Ox, ngoại trừ dòng số 1. Căn cứ vào công bố trước đây của Le & cs. (2016) về sự biểu hiện của *AtZAT12* trong điều kiện thiếu Fe kéo dài, chúng tôi tiến hành thí nghiệm hệ thống sinh trưởng 8 ngày trong điều kiện thiếu sắt và xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong 1 giờ. Kết quả thí nghiệm đánh giá sự biểu hiện của các gen *AtZAT12* và *AtFIT* được thể hiện trong hình 5.



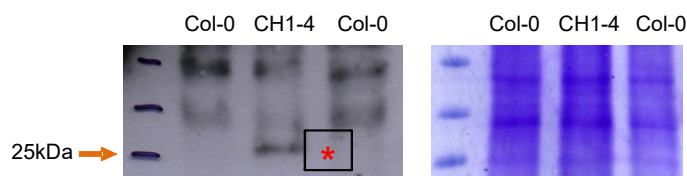
Ghi chú: Hình bên trái là sự biểu hiện ở rễ của 4 dòng: đối chứng và dòng 1 (CH1- 1), dòng 4 (CH 1- 4) và dòng 10 (CH 1-10). Hình bên phải là kết quả sự biểu hiện của 2 dòng 4 và 10. Col-0: là đối chứng.

**Hình 5. Sự biểu hiện gen *AtZAT12* ở rễ và thân lá của các dòng biểu hiện ZAT12 Ox sinh trưởng trong đất bằng kỹ thuật Real-time PCR**



Ghi chú: Cây 8 ngày tuổi sinh trưởng trong điều kiện thiếu Fe được xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100mM) trong 1 giờ và thu mẫu rễ cho tách chiết ARN để thực hiện Real time PCR. Trục hoành mô tả tên dòng và điều kiện thí nghiệm: có xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kí hiệu: tên dòng, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); không xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kí hiệu: tên dòng, H<sub>2</sub>O).

**Hình 6. Sự biểu hiện gen *AtZAT12* và gen *AtFIT* ở rễ trong các dòng ZAT12 Ox (thế hệ T3) sinh trưởng *in vitro* bằng kỹ thuật Real-time PCR**



Ghi chú: Protein ZAT12 được phát hiện có kích thước tương đương với dự đoán (đánh dấu \* màu đỏ).

**Hình 7. Biểu hiện gen *AtZAT12* ở mức dịch mã phát hiện bằng kỹ thuật Western Blot (sử dụng kháng thể sơ cấp kháng HA)**

Các dòng ZAT12 Ox được kích hoạt tăng sự biểu hiện trong điều kiện đối chứng, nhưng dường như ngược lại trong điều kiện xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hình 6). Sự biểu hiện của gen *AtFIT* cho kết quả ngược lại. Kết quả này cũng tương tự với kết quả công bố trước đó của Le & cs. (2016). Trong điều kiện stress thiếu Fe có thể vai trò của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> không còn là nhân tố gây stress như thông thường.

### 3.4. Kết quả đánh giá sự biểu hiện của gen *AtZAT12* ở mức độ dịch mã

Để đánh giá sự biểu hiện của gen *AtZAT12* ở mức độ dịch mã, do các dòng chuyển gen ZAT12 Ox biểu hiện cao được gắn hemagglutinine (HA) sẽ dễ dàng theo dõi hàm lượng protein nhờ kỹ thuật Western Blot sử dụng các kháng thể đơn dòng thương mại kháng HA (Lee & cs., 2007). Dòng biến đổi gen số 4, chứa 3HA (p2xCaMV35S::HA<sub>3</sub>-ZAT12) đã được sử dụng để đánh giá.

Protein ZAT12 đã biểu hiện trong dòng CH 1-4 đúng với kích thước dự tính là xấp xỉ 25kDa (đánh dấu \* màu đỏ). Như vậy gen *ZAT12* trong dòng chuyển gen này đã hoạt động và tạo ra sản phẩm protein. Thế nhưng những thí nghiệm sau đó về việc tăng sự biểu hiện trong các điều kiện thiếu hụt Fe (-Fe) và xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chưa có sự khác biệt. Dường như có cơ chế kiểm soát hàm lượng protein này trong tế bào hoặc là chúng bị phân hủy ngay khi chúng không cần thiết.

## 4. THẢO LUẬN

ZAT12 là một yếu tố phiên mã liên quan đến mạng lưới tín hiệu đáp ứng lại các stress bất thuận ở cây. Trong nghiên cứu này chúng

tôi thấy *ZAT12* có biểu hiện đáp ứng lại -Fe, nhưng dường như lại không đáp ứng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kết quả này tương ứng với kết quả đã công bố trước đó của Le & cs. (2016) cho thấy rằng điều kiện thiếu sắt làm tăng hàm lượng các gốc tự do nên gen *ZAT12* được biểu hiện để đáp ứng với điều kiện stress này. Tuy nhiên, khi có thêm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thì sự biểu hiện không tăng cao nữa và dường như chỉ cần 1 lượng gốc tự do đã đủ để kích hoạt sự biểu hiện gen *ZAT12*. Xu & cs. (2017) cũng đã chỉ ra phiên mã của *ZAT12* tăng cao ở cây *Arabidopsis* với sự có mặt của gốc tự do O<sup>2-</sup> (Xu & cs., 2017). Và FIT- yếu tố phiên mã trung tâm của quá trình hấp thụ Fe đường như bị ức chế khi sự biểu hiện của *ZAT12* tăng cao trong hệ thống sinh trưởng *in vitro* 8 ngày trong điều kiện thiếu Fe. Kết quả này cũng tương ứng với công bố trước đó của Le & cs. (2016). Về mặt kiểu hình, dường như sự biểu hiện cao của *ZAT12* dẫn đến các kiểu hình khác nhau của cây. Các dòng CH1-1 có kiểu hình khác biệt hoàn toàn so với các dòng còn lại, tương tự kết quả công bố trong nghiên cứu của Iida & cs. (2000). Trong nghiên cứu này, các dòng chuyển gen *ZAT12* biểu hiện cao có cây nhỏ, lá cong, cuống lá ngắn và quả hướng xuống dưới. Trong nghiên cứu của Vogel & cs. (2004), cũng cho thấy kiểu hình của cây chuyển gen *ZAT12* biểu hiện cao cũng có những bất thường về kiểu hình như lá xanh đen và tròn hơn, lá dày hơn, hàm lượng chlorophyll trong khối lượng lá tươi của cây chuyển gen cao hơn 1,5-1,8 lần. Nghiên cứu này, chưa cho thấy mức độ biểu hiện cao của protein ZAT12 trong các dòng biểu hiện cao 35S::ZAT12. Kết quả này có thể do protein ZAT12 thường bị phân hủy qua con đường ubiquitin khi hàm lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có mặt trong tế

bào tăng cao. Do đó cần tìm được điều kiện biểu hiện để có thể thu được số lượng lớn protein ZAT12 này.

## 5. KẾT LUẬN

Các dòng biểu hiện cao 35S::ZAT12 có kiểu hình hết sức khác biệt, trong đó dòng CH1-1 cho kiểu hình ức chế sinh trưởng. Biểu hiện ZAT12 ở mức phiên mã của bốn dòng này cũng rất khác nhau, trong đó dòng CH1-1 luôn biểu hiện ở mức độ rất cao. Trong điều kiện thiếu Fe các dòng 35S::ZAT12 này có biểu hiện tăng cao, nhưng khi xử lý thêm với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thì sự biểu hiện này không tăng thêm.

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Petra Bauer và các thành viên của Phòng thí nghiệm Thực vật, Trường Đại học Tổng hợp Saarland, Cộng hòa liên bang Đức đã tạo điều kiện giúp chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Clough S.J. & Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 16(6): 735-743.
- Davletova<sup>a</sup> S., Schlauch K., Coutu J. & Mittler R. (2005). The zinc-finger protein ZAT12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 139(2): 847-856.
- Davletova<sup>b</sup> S., Rizhsky L., Liang H., Shengquang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. & Mittler R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The plant cell*. 17(1): 268-281.
- Dinneny J.R., Long T.A., Wang J.Y., Jung J.W., Mace D., Pointer S., Barron C., Brady S.M., Schiefelbein J. & Benfey P.N. (2008). Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science*. 320(5878): 942-5.
- Hoagland D.R. (1920). Optimum nutrient solutions for plants. *Science*. 52 (1354): 562-564. doi:10.1126/science.52.1354.562
- Iida A., Kazuoka T., Torikai S., Kikuchi H. & Oeda K. (2000). A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *The plant journal*. 24(2): 191-203.
- Jakoby M, Wang H. Y., Reidt W., Weisshaar B. & Bauer P. (2004). FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*. 577(3): 528-534.
- Le C.T.T., Brumbarova T., Ivanov R., Stoof C., Weber E. & Mohrbacher J., Fink-Straube C. & Bauer P. (2016). Zinc Finger Of *Arabidopsis thaliana* 12 (Zat12) interacts with Fer-Like Iron Deficiency-Induced Transcription Factor (FIT) linking iron deficiency and oxidative stress responses. *Plant Physiol*. 170: 540-557.
- Lee S.C., Lan W.Z., Kim B.G., Li Legong, Cheong Y.H., Pandey G.K., Lu G., Buchanan B. & Luan S. (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104(40): 15959-15964.
- Marschner H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> ed. Academic press. p.11.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7: 405-410.
- Rizhsky L., Davletova S., Liang H. & Mittler R. (2004). The zinc finger protein ZAT12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *The journal of biological chemistry*. 279(12): 11736-43.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G. & Thomashow M.F. (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The plant journal*. 41(2): 195-211.
- Xu J., Tran T., Padilla Marcia C.S., Braun D.M. & Goggin F.L. (2017). Superoxide-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Plant Physiol. Biochem*. 117: 51-60.