

CONSTRUCTION OF VECTOR CARRYING RNAi STRUCTURES CONTAINING CP GENE FRAGMENT FROM COTTON LEAFROLL DWARF VIRUS (CLR DV)

Ngo Manh Dung^{1*}, Chu Hoang Ha²

¹TNU - University of Education

²Institute of Biotechnology - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 04/02/2021</p> <p>Revised: 15/3/2021</p> <p>Published: 06/4/2021</p>	<p>Cotton is one of the most important fiber plants in many countries over the world; it is a source of fiber for the textile industry and a source of oil production and animal feed from seed. Cotton leafroll dwarf virus (CLR DV) causes great damage to the cotton industry. CLR DV belongs to the family Luteoviridae, genus <i>Polerovirus</i>. In order to prevent CLR DV, the transfer of genes carrying RNAi constructs to create natural antiviral properties for plants is a proven effective measure. In this study, we have successfully designed vector carrying RNAi structure (pGWCLR DV-CPi) contained CP gene fragment from CLR DV. CPi is conservative sequences of CP gene CLR DV have size is 351bp. Strains <i>A.tumefaciens</i> carrying structure pGWCLR DV-Cpi and used as valuable raw materials in creating the transgenic cotton line antiretroviral CLR DV.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Cotton</p> <p>CLR DV</p> <p>CPi genes</p> <p>Gene tranfes vector</p> <p>RNAi</p>	

THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC RNAi MÃ HÓA PROTEIN VỎ CỦA VIRUS GÂY BỆNH XANH LÙN (CLR DV) TRÊN CÂY BÔNG

Ngo Mạnh Dũng^{1*}, Chu Hoàng Hà²

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 04/02/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 15/3/2021</p> <p>Ngày đăng: 06/4/2021</p>	<p>Cây bông là một trong những loại cây trồng lấy sợi quan trọng đối với nhiều quốc gia trên thế giới, nó là nguồn cung cấp sợi cho ngành dệt may, là nguồn sản xuất dầu và thức ăn gia súc từ hạt. Bệnh xanh lùn trên cây bông do Cotton leafroll dwarf virus (CLR DV) gây ra làm thiệt hại lớn cho ngành sản xuất bông. CLR DV thuộc họ Luteoviridae, chi <i>Polerovirus</i>. Để phòng tránh CLR DV thì chuyển gen mang cấu trúc RNAi tạo tính kháng virus tự nhiên cho cây là một biện pháp đã được chứng minh hiệu quả. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen pGWCLR DV-CPi mang cấu trúc RNAi-CPi của virus CLR DV. Đoạn CPi là trình tự bảo thủ của gen CP ở CLR DV có kích thước 351 bp. Vector này được biến nạp vào chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> CV58C1 pGV2260 và sử dụng như nguồn nguyên liệu có giá trị trong tạo các dòng cây bông chuyển gen kháng virus CLR DV.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Cây bông</p> <p>CLR DV</p> <p>Gen CPi</p> <p>Vector chuyển gen</p> <p>RNAi</p>	

* Corresponding author. Email: dungmn@tnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây bông (*Gossypium hirsutum* L.) là loại cây trồng lấy sợi tự nhiên hàng đầu và quan trọng nhất trên thế giới, được trồng khắp mọi nơi ở điều kiện khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Bông có những đặc tính đáng quý như hút ẩm, giữ ẩm, không tích điện mà các loại sợi nhân tạo không thể thay thế. Hạt bông có hàm lượng dầu, protein cao có thể dùng để sản xuất dầu và làm thức ăn gia súc.

Việt Nam là quốc gia tiêu thụ bông đứng thứ 6 và nhập khẩu bông lớn thứ 3 trên thế giới. Hàng năm, ngành dệt may phải nhập khẩu một lượng lớn bông từ Mỹ, Ấn Độ, châu Phi và một số nước khác. Trong khoảng 10 năm trở lại đây, ngành bông sợi Việt Nam đã có bước phát triển nhảy vọt, từ sản lượng 400.000 tấn lên khoảng 1,5 triệu tấn năm 2019. Tuy nhiên, do diện tích vùng trồng và sản lượng thấp, tổng sản lượng bông sản xuất ở Việt Nam mới chỉ đáp ứng được dưới 10% nhu cầu về nguyên liệu bông.

Ngoài những nguyên nhân như giống, kỹ thuật canh tác, điều kiện khí hậu... thì sâu bệnh hại bông là nguyên nhân chính làm giảm năng suất và chất lượng xơ bông. Bệnh xanh lùn trên cây bông do virus lùn xoắn lá (CLRVD; họ Luteoviridae, chi *Polerovirus*) gây ra [1]. Bộ gen CLRVD là ARN mạch đơn, dương, kích thước 5.866 bp [2]. Đây là bệnh virus gây hại chính trên cây bông ở châu Phi, châu Á và châu Mỹ, lây truyền bởi rệp bông *Aphis gossypii*. nên việc phòng trừ, tiêu diệt rất khó khăn. Một trong những phương pháp để nâng cao sản lượng xơ bông là tạo các giống có năng suất cao, khả năng chống chịu với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi. Hiện nay, bên cạnh các biện pháp chọn giống truyền thống như thuần hoá, chọn lọc ưu thế lai..., các phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới đã áp dụng một số phương pháp chuyển gen trên đối tượng cây bông như: chuyển gen trực tiếp bằng vi tiêm (micro injection), sử dụng súng bắn gen... và đã đem lại nhiều thành tựu đáng kể.

Trong số các kỹ thuật di truyền để phát triển các cây trồng kháng bệnh do virus thì kỹ thuật RNAi được chứng minh là một cách tiếp cận đáng tin cậy. RNAi là một quá trình xảy ra tự nhiên, là một cơ chế bảo vệ phức tạp, được bảo toàn trong các sinh vật nhân chuẩn để điều chỉnh và bảo vệ gen chống lại các mầm bệnh [3]. Nguyên tắc chính của RNAi là sự điều hoà biểu hiện gen của trình tự sau phiên mã được tạo ra thông qua RNA sợi kép (dsRNA) [4]. Công nghệ RNAi đã được ứng dụng thành công trong việc chống lại virus ở nhiều loại cây trồng. Cây trồng chuyển gen mã hoá protein của virus (CP, Pro...) có khả năng kháng lại chính virus đó đã được chứng minh thực tế bằng nhiều giống cây trồng kháng virus như: PVY [5]; TYLCV, ToCV [6]; SMV [7]; PVX, PVY, PVS [8]; CLCuD [9]... Tuy nhiên, việc thiết kế vector mang cấu trúc RNAi đòi hỏi phải thực hiện nhiều thao tác phức tạp do phải tạo ra được một cấu trúc bao gồm một đoạn gen theo chiều xuôi, một đoạn gen theo chiều ngược và một DNA đệm giữa 2 đoạn gen vào cùng một vector. Để tiến tới làm chủ công nghệ tạo thực vật chuyển gen nói chung và tạo ra thực vật chuyển gen bằng kỹ thuật RNAi kháng bệnh virus nói riêng, trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi của virus gây bệnh xanh lùn phục vụ cho nghiên cứu tạo cây bông chuyển gen kháng bệnh xanh lùn.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Plasmid pBT/CLRVD-CP chứa đoạn gen nhân tạo CP của CLRVD kích thước 609bp.

Cặp môi đặc hiệu CP-CLRVD-Fi/CP-CLRVD-Ri để nhân tương ứng vùng gen CPi có độ bảo thủ cao (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự và các thông số cần thiết của hai cặp môi CP-CLRVD-Fi/CP-CLRVD-Ri

Môi	Trình tự (5'-3')	Đặc điểm	T _{gm} (°C)	KT (bp)
CP-CLRVD-Fi	CACCACGGTCGTGGGTAGAAGAAC	14CG+10AT	56	351
CP-CLRVD-Ri	TGAAGAGGCCTCGGAGATGAACT	12CG+12AT		

Vector chuyển gen: Vector pK7GWIWG2(II), bộ kit nhân dòng pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Invitrogen), bộ kit thực hiện phản ứng Gateway® LR Clonase™ II.

Chủng vi khuẩn: Chủng *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen) được dùng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng *A. tumefaciens* CV58C1 pGV2260 được sử dụng cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang cấu trúc RNAi

RNA của virus CLRDV được tách từ mẫu lá bệnh bằng Trizol (Invitrogen). cDNA được tổng hợp theo One-step RT-PCR (Qiagen). Gen mã hóa cho CLRDV-CP được nhân lên bằng cặp mồi đặc hiệu CPF-*EcoRI*/ CPR-*XhoI*. Các cặp mồi RNAi được thiết kế để khuếch đại vùng gen CP của virus (ký hiệu: CPi) quan tâm dựa vào trình tự gen tương ứng đã được đọc trên plasmid pBT/CP-CLDV. Trong đó, trình tự đầu 5' của mỗi xuôi RNAi được bổ sung thêm 4 nucleotid CACC tương thích với đầu 3' GTGG của vector nhân dòng pENTR™/D-TOPO, còn mồi ngược được đảo chiều bổ sung theo chiều 5-3'.

Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E. coli* bằng sốc nhiệt. Biến nạp vector chuyển gen vào tế bào *A. tumefaciens* CV58C1 bằng xung điện. Tế bào *E. coli* One Shot TOP10 và tế bào *A. tumefaciens* CV58C1 pGV2260 được làm cho khả biến theo Sambrook và cộng sự [10].

Tách chiết plasmid theo chỉ dẫn của kit Plasmid Extraction Kit (Bioneer).

2.2.2. Thiết kế Ti-vector mang đoạn gen CP

(1) Tạo vector pENTR™/D-TOPO® có gắn đoạn gen CP. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu CP-CLRDV-Fi/CP-CLRDV-Ri để nhân đoạn gen CP từ vector tái tổ hợp pBT có mang các đoạn gen đã tách dòng. Tạo plasmid tái tổ hợp pENCLRDV-CPi bằng cách gắn sản phẩm PCR của CLRDV được tinh sạch vào vector tách dòng pENTR™/D-TOPO trong dung dịch muối đệm, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* One shot Top 10 theo phương pháp sốc nhiệt.

(2) Tạo vector chuyển gen pK7GWIWG2(II): Phản ứng LR được thực hiện dưới sự hướng dẫn của bộ kit Gateway® LR Clonase™ II Enzyme mix Kit (Invitrogen) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Plasmid pENCLRDV-CPi tách chiết từ các dòng khuẩn lạc được sử dụng tham gia phản ứng LR tái tổ hợp với vector chuyển gen pK7GWIWG2(II). Sản phẩm của phản ứng LR được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* One shot Top 10 theo phương pháp sốc nhiệt. Sau khi phục hồi, dịch tế bào được cấy trải lên đĩa chọn lọc có chứa kháng sinh *streptomycin* 40 mg/l, *spectinomycin* 100 mg/l và *chloramphenicol* 50 mg/l. Chọn dòng bằng phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn và PCR. Một số khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên nuôi qua đêm ở 37°C trong 4 ml LB lỏng có bổ sung *streptomycin* 40 mg/l, *spectinomycin* 100 mg/l và *chloramphenicol* 50 mg/l để tách chiết plasmid. Sau đó, phản ứng cắt plasmid bằng hai enzyme *Xba* I và *Hind* III được thực hiện để xác định sự có mặt DNA tái tổ hợp đã được tạo ra và tồn tại trong tế bào.

(3) Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc vector RNAi:

Các plasmid tái tổ hợp tiếp tục được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng CV58C1 pGV2260 bằng phương pháp xung điện. Chọn lọc trên môi trường YEP có bổ sung kháng sinh *streptomycin* 40 mg/l, *spectinomycin* 100 mg/l và *rifamycin* 50 mg/l. Sau đó, khuẩn lạc được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu CP-CLRDV-Fi/CP-CLRDV-Ri.

2.2.3. Chuyển gen và kiểm tra sự biểu hiện của gen ở mức độ mRNA trong cây thuốc lá

(1) Quy trình chuyển gen vào giống thuốc lá K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo các quy trình chuẩn [11]. Mảnh lá thuốc lá có diện tích 1 cm² được cho vào dịch khuẩn *A. tumefaciens* có OD₆₀₀ = 0,7 mang gen quan tâm. Sau đó, các mảnh lá được cấy lên môi trường đồng nuôi cấy, sau hai ngày chuyển sang môi trường chọn lọc MS có bổ sung 500 mg/l *cefotaxime*, 50 mg/l *kanamycine*.

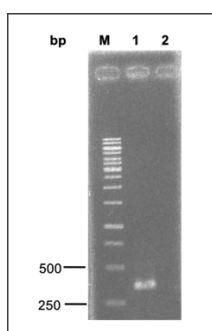
(2) Để tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen quan tâm, các mảnh thuốc lá tách chiết DNA sau khoảng 1 tháng ra cây sẽ được tách chiết DNA và PCR với cặp mồi đặc hiệu CP-CLRVDV-Fi/CP-CLRVDV-Ri để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc chuyên.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nhân đoạn gen CPi CLRVDV bằng kỹ thuật PCR

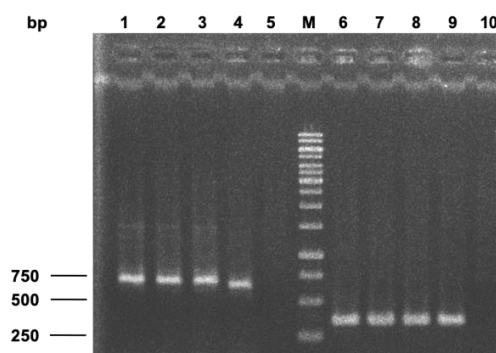
Do tính kháng của cây chuyển gen đối với một dòng virus phụ thuộc vào độ tương đồng giữa trình tự gen tương ứng của virus đó và vật liệu gen được sử dụng để chuyển vào cây. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng nếu độ tương đồng nhỏ hơn 90% thì cây chuyển gen không kháng được dòng virus đó [12]. Vì vậy, vật liệu di truyền sử dụng chuyển gen phải được chọn lựa ở những vùng có độ bảo thủ cao. Trên cơ sở trình tự của gen CP đã phân lập được, chúng tôi đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu CP-CLRVDV-Fi/CP-CLRVDV-Ri để nhân tương ứng vùng gen CPi có độ bảo thủ cao bằng kỹ thuật PCR trong plasmid pBT/CLRVDV-CP, đồng thời thiết kế thêm 4 nucleotid CACC vào 5' của mồi CLRVDV-Fi. Các trình tự này sẽ bắt cặp với đầu GTGG trên vector nhân dòng pENTRTM/D-TOPO.

Theo tính toán, đoạn gen CPi được nhân lên có kích thước tương ứng 351 bp. Sản phẩm PCR không có điểm cắt của Xba I và Hind III để thuận tiện cho việc chọn dòng sau này. Kết quả thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Phân tích sản phẩm PCR nhân đoạn gen CPi của CLRVDV

M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas);
Giếng 1: Sản phẩm PCR khuếch đại gen quan tâm;
Giếng 2: Sản phẩm PCR làm đối chứng âm - không chứa DNA khuôn.



Hình 2. Sản phẩm colony-PCR xác định dòng khuẩn lạc mang pENCLRVDV-CPi

M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 1-3: các khuẩn lạc mồi M13F/R; 6-8: chạy bằng mồi CP-CLRVDV-Fi/CLRVDV-Ri; 4, 9: đối chứng dương; 5, 10: đối chứng âm

Kết quả phân tích sản phẩm PCR hình 1 cho thấy, sản phẩm đã nhân được một phân đoạn DNA đặc hiệu có kích thước tương ứng như tính toán lý thuyết, kích thước phân đoạn này là phù hợp với chiều dài của đoạn gen CPi quan tâm. Hàm lượng của sản phẩm PCR đủ lớn cho mục đích tách dòng gen.

3.2. Dòng hóa plasmid tái tổ hợp pENCLRVDV-Gen vào tế bào *E. coli* One shot top 10

Để tạo plasmid tái tổ hợp pENCLRVDV-CPi, đầu tiên sản phẩm PCR của CLRVDV được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pENTRTM/D-TOPO trong dung dịch muối đệm. Sản phẩm gắn này được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* One shot Top 10 theo phương pháp sốc nhiệt. Kết quả chọn dòng bằng phản ứng PCR với cặp mồi M13F/R đặc hiệu nằm trên vector thể hiện trên hình 2. Do vị trí gắn của hai M13F và M13R nằm ở hai đầu vị trí mà đoạn gen CPi được chèn vào vector và khoảng cách hai mồi này khi chưa có đoạn DNA chèn vào vector là 354 bp, nên nếu vector pENTRTM/D-TOPO có đoạn gen CPi chèn vào thì kích thước của phân đoạn DNA thu được khi colony-PCR với cặp mồi M13 là 705 bp (= 351 + 354). Kết quả điện di trên hình 2 cho

thấy, sản phẩm colony-PCR từ những khuẩn lạc được kiểm tra cho những băng có kích thước tương ứng như dự tính. Chứng tỏ rằng, plasmid pENCLRDV-CPI đã biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* One Shot TOP 10.

3.3. Dòng hóa plasmid tái tổ hợp pGWCLRDV-CPI vào tế bào *E. coli* One shot top 10

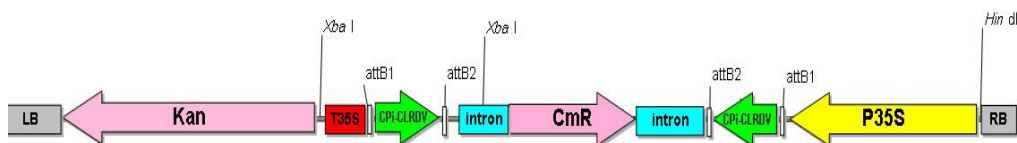
Để tạo plasmid tái tổ hợp pGWCLRDV-CPI, plasmid pENCLRDV-CPI tách chiết từ dòng khuẩn lạc ở đường chạy số 2 trên hình 2 được sử dụng tham gia phản ứng LR tái tổ hợp với vector chuyển gen pK7GWIWG2(II). Sản phẩm của phản ứng LR được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* One shot Top 10 theo phương pháp sốc nhiệt.

Thực hiện phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn và PCR để chọn được những dòng khuẩn lạc dương tính mang plasmid tái tổ hợp pGWCLRDV-CPI.

3.4. Kết quả chọn dòng bằng phản ứng cắt bởi enzyme hạn chế

Xba I và *Hind* III là hai enzyme giới hạn có các vị trí cắt trên vector pK7GWIWG2(II) (Hình 3). Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm plasmid pGWCLRDV-CPI cắt bởi hai enzyme này thu được ba phân đoạn DNA có kích thước trình bày trong bảng 2, trong đó phân đoạn 2 và 3 có kích thước thấp hơn so với đối chứng âm là vector pK7GWIWG2(II) nguyên vẹn.

Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn trên hình 4 cho thấy, dòng khuẩn lạc số 1-3 và 4 đều thu được các phân đoạn có kích thước như dự tính. Điều này khẳng định các dòng khuẩn lạc này đều chứa vector chuyển gen pGWCLRDV-CPI có cả hai vị trí tái tổ hợp chứa đoạn gen CPI chèn vào.



Hình 3. Bản đồ cấu trúc pGWCLRDV-CPI

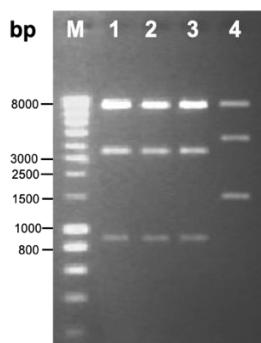
P35S, promoter 35S của Cauliflower mosaic virus; attB1 và attB2, các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng LR. LB, left T-DNA border; RB, right T-DNA border; T35S, terminator 35S; Kan, gen kháng kanamycin; CmR, gen kháng Chloramphenicol. Vị trí các điểm cắt giới hạn của enzyme *Xba* I và *Hind* III; CPI, đoạn gen CP của virus CLRDV; P35F2, PS35F2; T35R, T35S; Fi: CP-CLRDV-Fi và Ri, CP-CLRDV-Ri.

Bảng 2. Các phân đoạn thu được theo tính toán lý thuyết khi cắt plasmid pGWCLRDV-CPI và pK7GWIWG2(II) bằng enzym *Xba* I và *Hind* III (Đơn vị: bp)

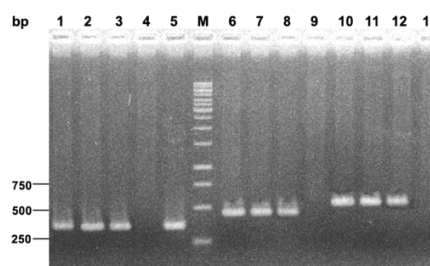
Phân đoạn	pK7GWIWG2(II)	pGWCLRDV-CPI
1	8116	8116
2	3310	2744
3	1463	894

3.5. Kết quả chọn dòng bằng phản ứng bằng PCR

Để kiểm tra đoạn gen CPI có được chèn vào vector chuyển gen đúng chiều các dòng khuẩn lạc dương tính bởi phản ứng cắt enzym giới hạn hay không, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR có sử dụng các cặp mồi: P35F2/CP-CLRDV-Ri, T35R/CP-CLRDV-Ri và CP-CLRDV-Fi/CP-CLRDV-Ri. Trong đó, mồi CP-CLRDV-Fi và CP-CLRDV-Ri nằm trên gen, còn P35F2 và T35R nằm trên vector. Cặp mồi CP-CLRDV-Fi/CP-CLRDV-Ri sẽ kiểm tra sự có mặt của đoạn gen CPI trên vector, cặp mồi P35F2/CP-CLRDV-Ri sẽ kiểm tra đoạn gen có được gắn vào theo chiều sense hay không, còn cặp mồi T35R/CP-CLRDV-Ri sẽ kiểm tra sự gắn theo chiều antisense (Hình 3). Do đó, theo tính toán sản phẩm PCR với cặp mồi CP-CLRDV-Fi/CP-CLRDV-Ri, P35F2/CP-CLRDV-Ri và T35R/CP-CLRDV-Ri sẽ có kích thước tương ứng là 351, 528 và 483 bp.



Hình 4. Sản phẩm cắt plasmid pK7GWIWG2(II) và pGWCLR DV-CPI bằng enzyme giới hạn *Xba I* và *Hind III*; M: thang DNA chuẩn 1 Kb; 1- 3: vector pGWCLR DV-CPI; 4: đối chứng âm (vector không chứa gen quan tâm pK7GWIWG2(II))



Hình 5. Sản phẩm PCR chọn dòng khuẩn lạc mang pGWCLR DV-CPI

M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1- 4: Sử dụng cặp môi CP-CLR DV- Fi/CLR DV-Ri với khuẩn lạc tương ứng 1-3; 6-8: Sử dụng cặp môi T35R/CP-CLR DV-Ri với khuẩn lạc tương ứng 1-3; 10-12: Sử dụng cặp môi P35F2/CP-CLR DV-R với khuẩn lạc tương ứng 1-3; 4, 9, 13: đối chứng âm; 5: đối chứng dương

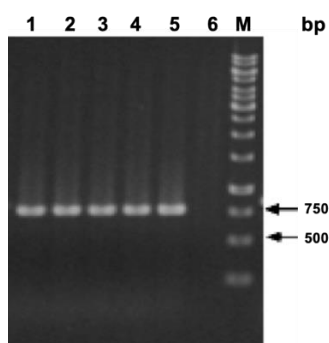
Kết quả điện di trên hình 5 cho thấy, các dòng kiểm tra đều có kết quả PCR dương tính với kích thước đúng như mong đợi. Chứng tỏ, hai vị trí tái tổ hợp trên vector đều mang đoạn gen CPI chèn vào đúng chiều.

Kỹ thuật Gateway là một phương pháp nhân dòng phổ biến, hữu ích cho những đặc tính tái tổ hợp đặc hiệu vị trí của vi khuẩn lambda để cung cấp một cách hiệu quả nhanh và nhạy gắn trình tự DNA vào hệ thống vector. Vector pK7GWIWG2(II) là vector chuyển gen có cấu trúc đặc biệt, có hai vùng chứa cấu trúc attR1-ccdB-attR2 ngược chiều nhau, được nối với nhau bởi một đoạn intron. Vì vậy, sản phẩm của phản ứng LR là một plasmid pGWCLR DV-Gene với hai vị trí tái tổ hợp mang đoạn gen CPI có chiều sense-intron-antisense (hay Gene-intron- antiGene). Đoạn intron này có vai trò rất quan trọng trong việc tạo cấu trúc loop để RNA sợi đôi (Gene-antiGene) dễ hình thành. Đây chính là cấu trúc RNAi cần thiết để có vai trò kháng lại sự lây nhiễm của CLR DV trong tế bào vật chủ khi nó được chuyển một cách ổn định vào genome vật chủ.

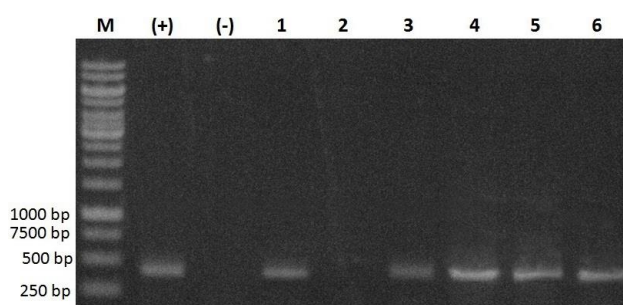
Kết quả chọn dòng bằng phản ứng PCR và phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn đã thu được dòng khuẩn lạc dương tính 1-3 mang vector pGWCLR DV-CPI quan tâm, với hai đoạn gen lặp lại đảo chiều, được ngăn cách bởi một đoạn intron ở giữa dưới sự điều khiển của promoter 35S. Cấu trúc này sẽ tạo ra RNA dạng kẹp tóc bổ sung chính nó có intron (intron-hairpin RNA, ihpRNA) sau khi được chuyển vào cây trồng. Khả năng cấu trúc ihpRNA bổ sung chính nó có hiệu quả làm bất hoạt gen ở thực vật đã được chứng minh [13]. Cấu trúc RNAi này tiếp tục được sử dụng để chuyển biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* CV58C1 pGV2260 phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen.

3.6. Tạo và lưu giữ chủng vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector chuyển gen

Tiến hành biến nạp 1 μ l plasmid pGWCLR DV-CPI vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* CV58C1 pGV2260 mang gen kháng kháng sinh rifamycin 50 mg/l; cấy trải hỗn hợp trên môi trường có kháng sinh streptomycin 40 mg/l, spectinomycin 100 mg/l (là kháng sinh chọn lọc plasmid biến nạp) và rifamycin 50 mg/l (kháng sinh chọn lọc khuẩn). Kết quả colony-PCR ngẫu nhiên một số dòng khuẩn lạc trên hình 6 cho thấy, tất cả các dòng kiểm tra đều xuất hiện phân đoạn DNA đặc hiệu, có kích thước phù hợp theo tính toán. Như vậy có thể khẳng định chắc chắn các dòng khuẩn lạc thu được mang vector RNAi tái tổ hợp.



Hình 6. Điện di colony-PCR kiểm tra sự có mặt của vector chuyển gen trong các dòng *A. tumefaciens* biến nạp
M: thang DNA chuẩn 1 Kb; 1-4: sản phẩm colony-PCR; 5: đối chứng dương; 6: đối chứng âm phản ứng PCR



Hình 7. Kết quả kiểm tra các dòng thuốc lá đại diện với môi P35F2/CP-CLRVDV-R
(+): mẫu PCR từ plasmid; (-): đối chứng âm; giếng 1-6: các dòng thuốc lá CPi1-6

3.7. Kết quả chuyển gen và đánh giá sự biểu hiện của gen trong các dòng thuốc lá K326

Với mục đích kiểm tra hiệu quả biểu hiện của vector đã thiết kế, các dòng khuẩn *A. tumefaciens* được lây nhiễm vào các mảnh thuốc lá K326. Sau quá trình chuyển gen, tái sinh và chọn lọc, có 6 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 sống sót trên môi trường chọn lọc và được chuyển ra trồng trong nhà lưới để tiến hành kiểm tra các dòng mang gen bằng phương pháp PCR, kết quả thể hiện ở hình 7.

Qua kết quả hình 7 cho thấy, các giếng 1, 3, 4, 5, 6 xuất hiện các phân đoạn DNA ở vị trí 350 bp phù hợp với kích thước của CPi khi kiểm tra với cặp môi P35F2/CP-CLRVDV-R, chứng tỏ các dòng thuốc lá CPi1, CPi3, CPi4, CPi5, CPi6 đã được chuyển thành công cấu trúc gen CPi. Như vậy, trong tổng số 6 dòng thuốc lá được kiểm tra, có 5 dòng xuất hiện phân đoạn DNA khi PCR chứng tỏ 5 dòng này đã được chuyển gen thành công.

Công nghệ RNAi được xem là một kỹ thuật hiện đại và hữu hiệu chống lại các bệnh do virus gây ra ở thực vật. Việc tạo cây trồng chuyển gen kháng virus bằng kỹ thuật RNAi là một lĩnh vực mới mẻ và được cả thế giới quan tâm. Tính hiệu quả của kỹ thuật RNAi trong việc tạo cây trồng chuyển gen mã hoá protein của virus có khả năng kháng lại chính virus đó đã được chứng minh bằng thực tế. Nhiều loại cây trồng kháng virus đã được tạo ra bằng kỹ thuật này cho thấy khả năng làm chậm sự tích lũy của virus hoặc làm giảm nhẹ các triệu chứng của bệnh. Sự kết hợp kỹ thuật chuyển gen và công nghệ RNAi sẽ là biện pháp công nghệ sinh học có hiệu quả trong việc cải thiện và tăng cường tính kháng virus của cây trồng. Kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy sự hoạt động của vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi CPi trong cây thuốc lá. Đây sẽ là tiền đề cho việc nghiên cứu chuyển gen tạo cây bông kháng virus CLRVDV giúp giảm đáng kể những thiệt hại do bệnh xanh lùn gây ra.

4. Kết luận

Chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen (Ti-plasmid) mang cấu trúc RNAi của đoạn gen nhân tạo pGWCLRVDV-CPi của CLRVDV. Các vector chuyển gen đã được chuyển vào biến nạp vào *A. tumefaciens* CV58C1 pGV2260 sẵn sàng cho nghiên cứu tạo cây bông chuyển gen kháng bệnh xanh lùn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. J. Distéfano, I. B. Kresic, and H. E. Hopp, "The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Pulerovirus," *Archives of Virology*, vol. 155, pp. 1849-1854, 2010.

-
- [2] Y. C. Agrofoglio, C. Delfosse, F. Casse, H. E. Hopp, B. Kresic, and A. J. Distéfano, "Identification of a New Cotton Disease Caused by an Atypical Cotton Leafroll Dwarf Virus in Argentina," *Phytopathology*, vol. 107, pp. 1-8, 2017.
- [3] A. Kumar and N. B. Sarin, "RNAi: A promising approach to develop transgenic plants against geminiviruses and insects," *J. Plant Physiol Pathol*, vol. 1, no. 1, pp. 1-6, 2013.
- [4] M. Zotti, E. A. dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C. N. Taning, and G. Smagghe, "RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes," *Pest Management Science*, vol. 74, pp. 1239-1250, 2018.
- [5] D. Miroshnichenko, V. Timerbaev, and A. Okuneva, "Enhancement of resistance to PVY in intragenic marker-free potato plants by RNAi-mediated silencing of eIF4E translation initiation factors," *Plant Cell Tiss Organ Cult*, vol. 140, pp. 691-705, 2020.
- [6] F. M. Jin, J. Song, J. Xue, H. B. Sun, Y. Zhang, S. Wang, and Y. -H. Wang, "Successful generation of anti-ToCV and TYLCV transgenic tomato plants by RNAi," *Biologia Plantarum*, vol. 64, pp. 490-496, 2020.
- [7] H. Luan, W. Liao, Y. Song, H. Niu, T. Hu, and H. Zhi, "Transgenic plant generated by RNAi-mediated knocking down of soybean Vma12 and soybean mosaic virus resistance evaluation," *AMB Express*, vol. 10, no. 1, 2020, Art. no. 62.
- [8] A. Hameed, M. N. Tahir, S. Asad, R. Bilal, J. V. Eck, G. Jander, and S. Mansoor, "RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in Potato," *Molecular Biotechnology*, vol. 59, pp. 73-83, 2017.
- [9] S. Khatoon, A. Kumar, N. B. Sarin, and J. A. Khan, "RNAi-mediated resistance against Cotton leaf curl disease in elite Indian cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivar Narasimha," *Virus Genes*, vol. 52, pp. 530-537, 2016.
- [10] J. Sambrook, E. F. Fritschi, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998.
- [11] J. F. Topping, G. D. Foster, and S. C. Taylor, *Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance*. New Jersey: Humana Press Inc., 1998.
- [12] P. Tennant, G. Fermin, M. M. Fitch, R. M. Manshardt, J. L. Slightom, and D. Gonsalves, "Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology," *European Journal of Plant Pathology*, vol. 107, no. 6, pp. 645-653, 2001.
- [13] N. A. Smith, S. P. Singh, M. B. Wang, P. Stoutjesdijk, A. Green, and P. M. Waterhouse, "Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs," *Nature*, vol. 407, pp. 319-320, 2000.