

THIẾT KẾ VECTOR NHỊ THỂ MANG GEN MÃ HÓA LIPID TRANSFER PROTEIN 2 (LTP2) PHÂN LẬP TỪ ĐẬU XANH (*VIGNA RADIATA* L. WILCZEK)

Nguyễn Vũ Thanh Thanh¹, Võ Minh Hòa¹, Hoàng Hà², Lê Văn Sơn², Chu Hoàng Mậu³

¹Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

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

³Trường Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Lipid Transfer Protein (LTP) là protein có kích thước khoảng 9 kDa với 8 phân tử cystein tạo 4 cầu nối disulfide và có mật lượng lớn trong thực vật bậc cao. LTP có khả năng vận chuyển phospholipid qua các màng và có thể liên kết với chuỗi acyl trên màng. Sự tiết và định vị trong thành tế bào cho thấy LTP đóng vai trò trong sự hình thành cutin, hình thành phôi và phản ứng của thực vật dưới điều kiện khô hạn. Khi gặp các điều kiện cực đoan của môi trường, các nhân tố như hormone, các quá trình trao đổi ion, các con đường truyền tín hiệu, ... sẽ điều khiển gen LTP hoạt động và tổng hợp nên sản phẩm protein tương ứng nhằm giúp cho cây tăng khả năng chống chịu stress, chịu bệnh,... Trong những năm gần đây, gen LTP2 đã được nghiên cứu ở một số thực vật như: *Arabidopsis thaliana* L., *Vigna radiata* L., *Nicotiana tabacum* L., *Oryza sativa* L. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa LTP2 phân lập từ mRNA của giống đỗ xanh Mỹ Đức-Hà Nội (HN2) được sử dụng để thiết kế vector chuyên gen mang cấu trúc 35S-LTP-cmyc-KDEL-NOS (pCB301-LTP). Cấu trúc gen này đã được biến nạp vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Sự có mặt của gen LTP trong cây thuốc lá chuyển gen đã được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Đây sẽ là nguồn nguyên liệu để phân tích đánh giá khả năng chịu hạn của cây chuyển gen siêu biểu hiện LTP.

Từ khóa: đậu xanh, gen LTP, chịu hạn, phân lập gen, vector, chuyển gen

MỞ ĐẦU

Đậu xanh (*Vigna radiata* L. Wilczek) là cây trồng họ Đậu có vai trò quan trọng trong việc cung cấp protein cho người và vật nuôi và có tác dụng cải tạo đất. Trong những năm gần đây, hạn hán thường xuyên xảy ra làm ảnh hưởng tới năng suất cây đậu xanh. Để nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng nói chung và cây đậu xanh nói riêng, hiện nay các nhà khoa học thường tạo cây chuyển gen mang một hoặc một số gen liên quan đến khả năng chịu hạn như các gen điều khiển nhân tố khởi đầu phiên mã, các gen chức năng (HSP, LEA, LTP, PLC...). Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nghiên cứu sinh học phân tử, di truyền và hóa sinh liên quan đến tính chịu hạn ở thực vật đã được làm sáng tỏ. Ở Việt Nam, có một số gen liên quan đến khả năng chịu hạn ở thực vật đã được nghiên cứu và chuyển gen vào các đối tượng cây trồng khác nhau như chuyển gen P5CS vào cây đậu tương (Nguyễn Thị Thúy Hương *et al.*, 2011), chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã NAC2 vào cây lạc (Nguyễn Thị Thu Nga *et al.*, 2013), ... Đây là cơ sở cho việc cải tạo giống cây trồng nhằm tăng khả năng chống chịu với điều kiện ngoại cảnh bất lợi.

LTP là một trong các gen chức năng có liên quan đến khả năng chịu hạn. LTP tham gia vào quá trình sinh tổng hợp biểu bì ở thực vật giúp hạn chế sự mất nước trong điều kiện khô hạn (Arondel *et al.*, 2000; Bourgis và Kader, 1997; Kader, 1996). Gen LTP điều khiển và tổng hợp nên các sản phẩm protein tương ứng tham gia xúc tác sự vận chuyển phospholipid giữa các lớp màng tế bào, hỗ trợ việc tạo ra các lớp sáp hoặc lớp biểu bì giúp cây hạn chế mất nước (Carvalho *et al.*, 2006). Các nghiên cứu đã cho thấy, LTP có khả năng tạo phức với một số acid béo và xúc tác cho quá trình vận chuyển lipid qua màng tế bào. LTP được gắn tại một vị trí cố định trên màng sinh chất của tế bào, nó có đặc điểm như một receptor vận chuyển acid béo qua màng tế bào. LTP đã được chiết ra từ protein ở các loài thực vật khác nhau và hàm lượng cao nhất LTP đã được tìm thấy ở lớp biểu bì bên ngoài cũng như xung quanh các gân lá. Phức hợp LTP-linoleic acid đã được chiết ra từ màng sinh chất của cây thuốc lá trong điều kiện gây hạn nhân tạo (Kimberly *et al.*, 2006).

Dựa vào trình tự của gen mã hóa protein LTP đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AY300807, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để

khúc đại gen mã hóa protein LTP của đậu xanh bằng kỹ thuật RT-PCR, và thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc gen mã hóa LTP nhằm tạo cây chuyển gen chống chịu tốt với điều kiện ngoại cảnh bất lợi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Giống đậu xanh địa phương của Mỹ Đức-Hà Nội (kí hiệu HN2) có đặc điểm: năng suất cao, vỏ hạt màu xanh mỡ, khối lượng 1000 hạt khoảng 57,32 g.

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* L. K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật-Viện Công nghệ sinh học.

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1.

Các bộ kit và vector

Vector tạo dòng pBT (Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học); Vector chuyển gen pRTRA7/3; pCB301; Bộ kit Trizol[®] Regents (Invitrogen) tách RNA; Bộ kit tổng hợp cDNA (Invitrogen); kit tinh sạch DNA của hãng QIAGEN (QIAquick DNA Gel Extraction Kit).

Thiết kế môi khuếch đại gen mã hóa LTP

Trên cơ sở dữ liệu khai thác từ Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AY300807 và dựa vào cấu trúc của vector chuyển gen để thiết kế cặp môi đặc hiệu phục vụ việc khuếch đại phát hiện sự có mặt của gen LTP ở giống đậu xanh địa phương HN2.

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách từ lá cây đậu xanh sử dụng kit Trizol[®] Regents (Invitrogen).

Phương pháp RT-PCR

Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số bằng bộ kit của hãng Fermentas với chu kỳ nhiệt như sau: 01 chu kỳ 25°C trong 10 phút, 01 chu kỳ 45°C trong 50 phút, 01 chu kỳ 85°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Phản ứng PCR khuếch đại gen mã hóa LTP với thành phần như sau: 5 μ l đệm PCR 10X; 5 μ l MgCl₂ 25 mM; 4 μ l dNTPs 2,5 mM; 2 μ l mỗi loại môi NcoI-LTPF/NotI-LTPR 10 pmol/ μ l; 0,4 μ l Taq polymerase 5 u/ μ l; 4 μ l cDNA; nước deion khử trùng 28,6 μ l và theo chu kỳ nhiệt như sau: 01 chu

kì 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ 94°C trong 1 phút, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây; 01 chu kỳ 72°C trong 5 phút; và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (0,1 μ g/ml).

Sản phẩm PCR được tách khỏi gel, tinh sạch bằng bộ kit của Fermentas và gắn trực tiếp vào vector tách dòng pBT. Sản phẩm gắn này được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Chọn lọc các khuẩn lạc dương tính (màu trắng) trên môi trường LB có bổ sung 50 mg/l ampicillin, 30 mg/l X-gal và 0,1 mM IPTG. Sự có mặt của vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng phản ứng cắt enzyme.

Tách plasmid mang gen mã hóa LTP phục vụ cho đọc trình tự gen bằng bộ Kit AccuPrep Plasmid Extraction của hãng Bioneer. Trình tự nucleotide của gen mã hóa LTP được xác định trên máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM[®] 3100 Advant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystem. Kết quả đọc trình tự gen được xử lý bằng phần mềm DNASTar và BioEdit.

Phương pháp thiết kế vector chuyển gen

Vector pRTRA7/3: là vector trung gian, trên vector này vừa có hai điểm cắt của enzyme giới hạn là *NcoI* và *NotI* vừa có trình tự nhận biết của *HindIII*.

Plasmid pBT-LTP và pRTRA3/7 được cắt đồng thời bằng enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI*. Sau đó, phản ứng ghép nối được thực hiện tạo plasmid pRTRA7/3-LTP. Dòng tế bào mang vector tái tổ hợp được chọn bằng cách xử lý với *HindIII*. Đoạn gen mang cấu trúc mong muốn được thu nhận và ghép nối vào vector chuyển gen pCB301. Vector tái tổ hợp mang cấu trúc gen pCB301-LTP được kiểm tra và biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* CV58C1.

Chuyển cấu trúc mang gen LTP vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1

Quy trình chuyển gen vào giống thuốc lá *N. tabacum* K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1 được tiến hành theo phương pháp của Topping năm 1998. Kiểm tra sự có mặt của gen cần chuyển sử dụng phương pháp PCR với cặp môi đặc hiệu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khuếch đại và xác định trình tự gen mã hóa LTP

Dựa trên cơ sở dữ liệu khai thác từ Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AY300807, chúng tôi đã

thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân và phát hiện sự có mặt của gen mã hóa LTP ở giống đậu xanh địa phương HN2. Để sau này có thể ghép nối gen mã hóa LTP vào vector chuyển gen dễ dàng, chúng tôi đã thiết kế mồi xuôi có thêm trình tự của enzyme giới hạn *NcoI*, mồi ngược bổ sung trình tự của enzyme giới hạn *NotI*. Trình tự mồi được thiết kế thể hiện trong bảng 1.

Sau khi tách RNA tổng số từ lá non của giống đậu xanh HN2, chúng tôi đã tổng hợp cDNA và khuếch đại gen mã hóa LTP. Kết quả cho thấy, gen mã hóa LTP đã được khuếch đại đặc hiệu với kích thước khoảng 350 bp. Sản phẩm PCR được làm sạch

và gắn vào vector tách dòng pBT tạo thành pBT-LTP. Sản phẩm này được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E. coli* DH5 α . Sau khi nuôi cấy, chúng tôi đã thu nhận dịch nuôi, tách chiết plasmid và xác định trình tự gen từ sản phẩm này.

Kết quả xác định trình tự cho thấy, chiều dài gen mã hóa LTP ở giống đậu xanh HN2 có kích thước 351 nucleotide. Chúng tôi đã đăng ký trình tự gen mã hóa LTP nghiên cứu trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số HE589494. Kết quả xác định trình tự nucleotide là cơ sở để chúng tôi tiếp tục thiết kế vector chuyển gen mang gen mã hóa LTP phục vụ việc nghiên cứu chuyển gen.

Bảng 1. Trình tự mồi nhân gen mã hóa LTP.

Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn mồi
<i>NcoI</i> -LTPF	CATGCCATGGATGGCTAGCCTGAAGGTTGCA	56°C
<i>NotI</i> -LTPR	ATTTGCGGCCCGCCTTGATGTTAGCGCAGTTGGT	56°C

Thiết kế vector chuyển gen

Ghép nối đoạn gen LTP vào vector trung gian pRTRA7/3

Để gen mã hóa LTP siêu biểu hiện trong cây chuyển gen, chúng tôi đã gắn gen mã hóa LTP vào vector trung gian pTRA7/3 có chứa 35S promoter, gen mã hóa cho tín hiệu nhận biết (c-myc), tín hiệu nhận biết của mạng lưới ER (KDEL) và đoạn gen kết thúc (NOS) tạo thành cấu trúc 35S-LTP-cmyc-KDEL-NOS. Cấu trúc này sau đó được chuyển vào vector chuyển gen pCB301 và tạo chủng *A.tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301-LTP.

Chúng tôi sử dụng enzyme *NcoI* và *NotI* để cắt vector pRTRA7/3 và pBT-LTP, sản phẩm thu nhận được lai để tạo plasmid tái tổ hợp pRTRA7/3-LTP. Sau đó, plasmid tái tổ hợp pRTRA7/3-LTP được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt để chọn lọc. Để thu nhận plasmid tái tổ hợp ở trên, chúng tôi lại dùng *NotI* và *NcoI* để cắt kiểm tra. Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm cắt phân thành hai băng khoảng 4200 bp và 350 bp tương ứng với phần vector pRTRA7/3 và gen mã hóa LTP. Chúng tôi đã tiến hành giữ chủng trong glycerol 100% bảo quản ở nhiệt độ -80°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Thiết kế vector chuyển gen pCB301-LTP

Để thiết kế được vector pCB301 mang gen mã

hóa LTP, chúng tôi đã cắt vector pRTRA7/3 tái tổ hợp thu nhận ở trên bằng enzyme hạn chế *HindIII* để tạo được cấu trúc 35S-LTP-cmyc-KDEL-NOS với kích thước khoảng 1190 bp. Đồng thời, vector chuyển gen pCB301 cũng được cắt bằng enzyme hạn chế *HindIII* với kích thước khoảng 6200 bp. Sau đó, 2 sản phẩm cắt ở trên được ghép nối để tạo pCB301-LTP nhờ enzym T4 ligase. Sản phẩm ghép nối được tinh sạch theo bộ kit tinh sạch của hãng QIAGEN (QIAquick DNA Gel Extraction Kit) và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α để chọn lọc, nhân nhanh plasmid tái tổ hợp với số lượng lớn.

Kiểm tra vector tái tổ hợp bằng phản ứng cắt sử dụng enzyme giới hạn

Để kiểm tra vector tái tổ hợp có mang gen mã hóa LTP hay không, chúng tôi đã sử dụng phương pháp kiểm tra sản phẩm cắt vector tái tổ hợp pCB301-LTP bằng enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI*. Kết quả trên hình 1 cho thấy, khi cắt pCB301-LTP bằng *NotI* và *NcoI* thu được 2 băng: một là gen mã hóa LTP có kích thước khoảng 350 bp, hai là vector pCB301-35S-cmyc-KDEL-NOS kích thước khoảng 7000 bp.

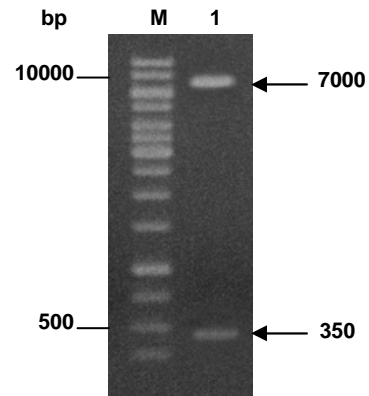
Sở dĩ khi điện di thu được băng có kích thước 7000 bp là do chiều dài vector pCB301 (khoảng 6200 bp), đoạn 35S có kích thước khoảng 544 bp, đoạn cmyc-KDEL-NOS có kích thước khoảng 300 bp. Kết quả thí nghiệm thu được phù hợp với

các tính toán lý thuyết. Như vậy có thể khẳng định, chúng tôi đã thiết kế và biến nạp thành công vector chuyển gen pCB301-LTP vào trong tế bào *E. coli* DH5 α . Tế bào vi khuẩn này được giữ chùng trong glycerol ở -85 $^{\circ}$ C.

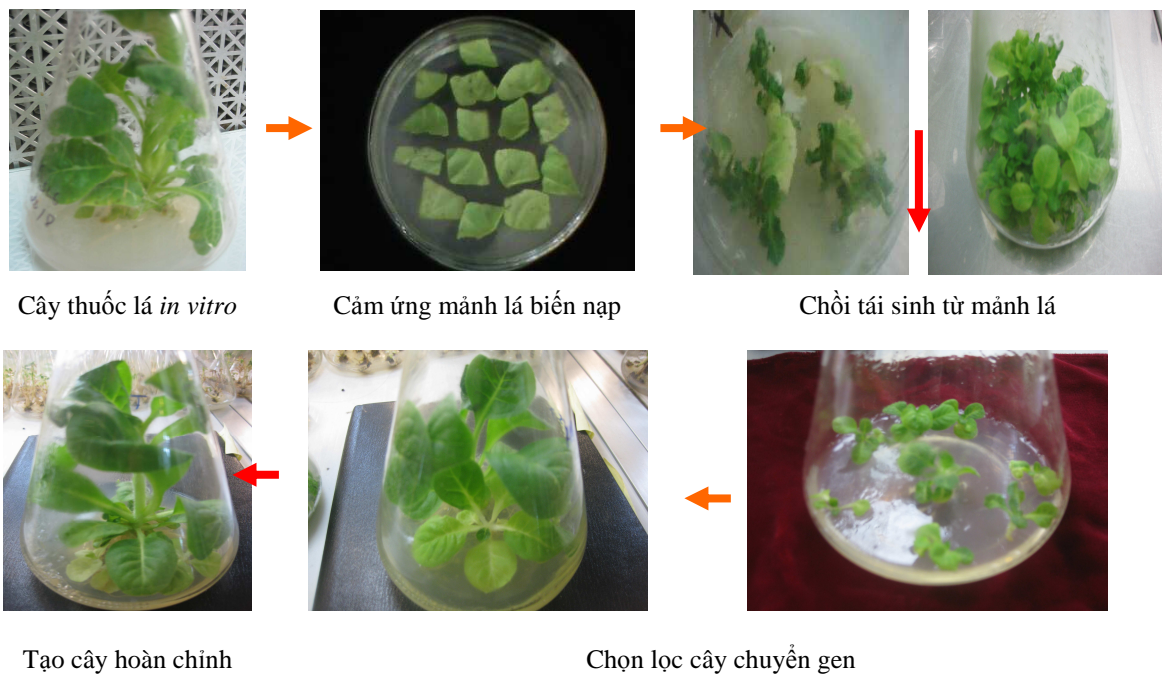
Kết quả tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid pCB301-LTP

Plasmid pCB301-LTP sau khi thiết kế thành công được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* chủng CV58C1 bằng phương pháp xung điện. Sản phẩm của quá trình biến nạp được nuôi chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 50 mg/l kanamycin và 100 mg/l rifamycin, ở 28 $^{\circ}$ C. Sau 2 ngày nuôi cấy, chúng tôi đã thu nhận được khuẩn lạc. Để chọn ra những dòng khuẩn lạc như mong muốn (mang vector chuyển gen), chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR. Mười dòng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được chọn ngẫu nhiên để tiến hành phản ứng colony PCR bằng cặp mồi đặc hiệu nhân gen mã hóa LTP. Sản phẩm phản ứng được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả cho thấy có 8 trong 10 dòng khuẩn lạc được lựa chọn cho kết quả dương

tính với phản ứng PCR với 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 350 bp. Như vậy, chúng tôi đã biến nạp thành công vector pCB301-LTP vào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1. Đây là nguồn nguyên liệu phục vụ cho chuyển gen vào thực vật nhằm tạo cây trồng có khả năng chịu hạn tốt.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt pCB301-LTP bằng *Nco*I và *Not*I. M: Thang marker DNA 1 kb; 1: Mẫu pCB301-LTP.



Hình 2. Chuyển gen mã hóa LTP vào cây thuốc lá K326 *in vitro* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Kết quả bước đầu chuyển cấu trúc pCB301-LTP vào cây thuốc lá

Sau khi biến nạp vector pCB301-LTP vào vi khuẩn *A. tumefaciens*, chúng tôi đã tiến hành chuyển gen vào mảnh lá của cây thuốc lá đã được cảm ứng trong môi trường WPM (Hình 2).

Sau hai ngày đồng nuôi cấy, chúng tôi đã tiến hành cấy chuyển các mảnh lá sang môi trường GM có bổ sung 500 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamycin và 1mg/l BAP. Sau 2-3 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy từ các mảnh lá xuất hiện các chồi nhỏ. Chúng tôi đã tiến hành tách các chồi nhỏ và cấy lên môi trường MS cơ bản có bổ sung 500 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamycin để nhân nhanh chồi. Sau 4-5 tuần, các chồi nhỏ sống sót được đặt

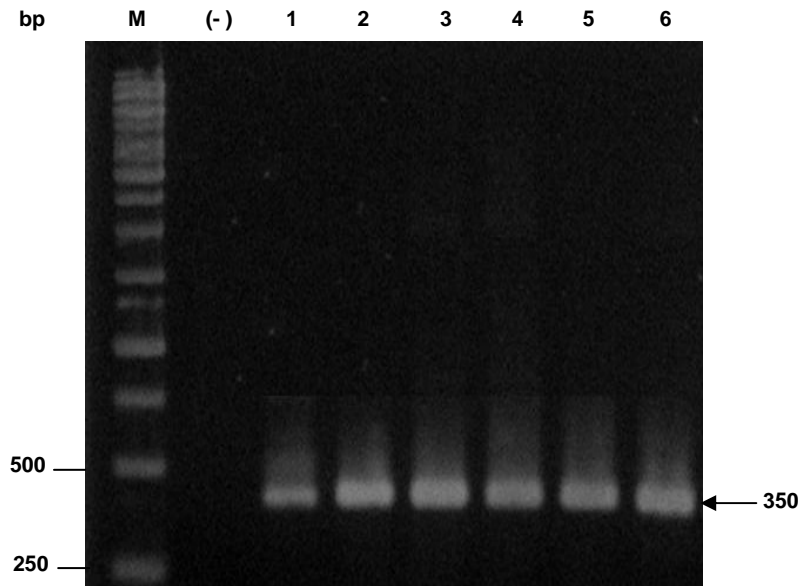
lên môi trường RM có bổ sung 500 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamycin.

Các cây thuốc lá hoàn chỉnh được đưa ra môi trường trấu cát nhằm phát triển hệ rễ. Sau 2-3 tuần, cây thuốc lá được chuyển ra nhà kính. Tỷ lệ chọn lọc sơ bộ của các mảnh lá trên môi trường chọn lọc được thể hiện qua bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, số lượng mô lá sống sót trên môi trường chọn lọc giảm dần theo thời gian, điều này cho thấy khả năng những mô lá tồn tại và phát triển được là những mô có khả năng mang các tế bào đã được chuyển gen. Sau 3 - 4 tuần, có 155/200 mô lá sống sót trên môi trường chọn lọc và tạo được chồi và sau 6-8 tuần cây thuốc lá chuyển gen hoàn chỉnh được tạo thành.

Bảng 2. Kết quả chuyển gen mã hóa LTP vào cây thuốc lá trên môi trường chọn lọc.

Tổng số mô lá	Số mô sống sót sau (tuần)			Số mô cảm ứng tạo chồi	Số cây dương tính PCR
	1	2	3		
200	185	173	157	155	6/6



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhận đoạn gen mã hóa LTP ở cây thuốc lá bằng cặp mồi đặc hiệu. M: Thang marker DNA 1kb; 1 – 6: Sản phẩm PCR; (-): Đối chứng âm.

Kết quả kiểm tra cây thuốc lá chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây thuốc lá chuyển gen, bước đầu chúng tôi đã

tách chiết DNA tổng số từ lá của cây thuốc lá chuyển gen và nhân gen mã hóa LTP bằng cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, 6 mẫu được kiểm tra đều xuất hiện băng có

kích thước 350 bp tương ứng với gen mã hóa LTP. Như vậy, bước đầu chúng tôi đã chuyển được gen mã hóa LTP vào cây thuốc lá.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu và nhân được gen mã hóa LTP bằng phản ứng RT-PCR. Sản phẩm PCR được dòng hoá vào vector pBT. Trình tự nucleotide của gen mã hóa LTP dài 351 nucleotide.

Đã thiết kế được vector chuyển gen pCB301 mang gen LTP, bước đầu cấu trúc pCB301-LTP được chuyển vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1 và được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện và hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Bộ B2010-TN09-01 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aronel V, Vergnolle C, Cantrel C, Kader JC (2000) Lipid transfer protein are encoded by a small multigen family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 157: 1-12.

Bourgis F, Kader JP (1997) Lipid transfer protein: Tools for manipulating membrane lipids. *Physiol Plant* 100: 78-84.

Carvalho AO, Souza-Filho GA, Ferreira BS, Branco AT,

Araujo IS, Fernandes KV, Retamal CA, Gomes VM (2006) Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedling tissues. *Plant Physiol Biochem* 44: 732-742.

Nguyễn Thị Thúy Hương (2011) Phân lập, tạo đột biến diêm gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển gen vào cây đậu tương Việt Nam. Luận án tiến sĩ sinh học - Đại học Thái Nguyên.

Kader JC (1996) Lipid transfer protein in plants. *Ann Rev Plant Mol Biol* 47: 627-654.

Kimberly DC, Mark AT, Lawrence BS (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of tree Tobacco. *Plant Physiol* 140:176-183.

Liu KH, Lin TY (2003) Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in *Vigna radiata*. *DNA sequence - J Seq Map* 14(6): 420-426.

Masuta C, Furuno M, Tanaka H, Yamada M, Koiwai A (2005) Molecular cloning of a cDNA clone for tobacco lipid transfer protein and expression of the functional protein in *Escherichia coli*. *FEBS* 311(2): 119-123.

Nguyễn Thị Thu Nga, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình (2013) Thiết kế vector chuyển gen mang gen mã hóa nhân tổ phiên mã NAC2 điều khiển tính chống chịu hạn của cây lạc. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013 tr: 935-939.

Vignols F, Lund G, Pammi S, Tremousaygue D, Grellet F, Kader JC, Puigdomenech P, Delseny M (1994) Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. *Gene* 142: 420-426.

CONSTRUCTION OF BINARY VECTOR CARRYING LIPID TRANSFER PROTEIN 2 (LTP2) - ENCODING GENE ISOLATED FROM MUNGBEAN (*VIGNA RADIATA* L. WILCZEK)

Nguyen Vu Thanh Thanh^{1,*}, Vo Minh Hoa¹, Hoang Ha², Le Van Son², Chu Hoang Mau³

¹College of Sciences, Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³College of Pedagogy, Thai Nguyen University

SUMMARY

Lipid-transfer proteins (LTPs) are basic, 9-kDa proteins present in high amounts in higher plants. LTPs can enhance the *in vitro* transfer of phospholipids between membranes and can bind acyl chains. LTPs secretion and location in the cell wall were suggested that LTPs play roles in cutin formation, embryogenesis and the response of plants to droughty conditions. In this study, the gene encoding LTP2 isolated from mRNA of mungbean cultivar Myduc-Hanoi (HN2) was used to design binary vector carrying 35S - LTP - cmc - KDEL - NOS (pCB301 - LTP) construct. This cassette was transformed into tobacco via *Agrobacterium*

* Author for correspondence: E-mail: thanhthanhdkhkt@gmail.com

tumefaciens. The presence of LTP gene in transgenic tobacco plants was confirmed by PCR using specific primers. The result showed that there were 6/6 lines of transgenic tobacco plants had positive PCR product which is 350 bp in size corresponding to this of LTP gene. These results lead to further studies of LTP gene overexpression and analysis of drought tolerance in transgenic tobacco plants.

Keywords: *mungbean, LTP, vector, transgenic, PCR, tobacco*