

## TÁCH DÒNG PHÂN TỬ VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN *DAT* PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

Bùi Thị Hà<sup>1</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>, Hoàng Phú Hiệp<sup>3</sup>,  
Lê Văn Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Tâm<sup>3</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên, \*chuhoangmau@tnu.edu.vn

**TÓM TẮT:** Cây dừa cạn, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, là thực vật hai lá mầm, có khả năng sản xuất các alkaloid, trong đó có vincristine và vinblastine, chữa được các bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư máu. Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase (*DAT*) là enzyme chìa khóa xúc tác cho phản ứng cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp vindoline ở cây dừa cạn. Nghiên cứu nâng cao hàm lượng alkaloid trong cây dừa cạn theo hướng tiếp cận ứng dụng công nghệ gen nhằm đáp ứng nguồn nguyên liệu phục vụ mục đích chữa bệnh được đặt ra trong chiến lược nghiên cứu cây dược liệu. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nhân bản, tách dòng cDNA và xác định trình tự nucleotide của gen *DAT* phân lập từ mRNA của giống cây dừa cạn có hoa hồng tím (TN1) và hoa trắng (TN2) thu tại Thái Nguyên. Gen *DAT* (cDNA) được phân lập từ hai mẫu dừa cạn TN1 và TN2 có kích thước 1320 bp, mã hóa deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase gồm 439 amino acid. Trình tự nucleotide của cDNA ở mẫu dừa cạn TN1 (hoa hồng tím) và TN2 (hoa trắng) khác nhau ở 13 vị trí nucleotide, trình tự amino acid suy diễn của *DAT* của hai mẫu dừa cạn TN1, TN2 sai khác ở 10 vị trí amino acid. Vector chuyển gen mang gen *DAT* đã được thiết kế thành công và được sử dụng trong mục đích tạo dòng cây chuyển gen có hàm lượng alkaloid được cải thiện.

*Từ khóa:* *Catharanthus roseus*, alkaloid, dừa cạn, gen *DAT*, tách dòng phân tử.

### MỞ ĐẦU

Cây dừa cạn, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, hay còn gọi là cây hải đằng, dương giác, bông dừa và trường xuân hoa, thuộc họ Trúc đào (Apocynaceae). Cây dừa cạn được trồng phổ biến ở Việt Nam để làm cảnh và làm thuốc [1]. Cây dừa cạn được nghiên cứu rộng rãi do chứa nhiều loại alkaloid terpenoid indol (TIA), có tác dụng sinh lý đối với con người và được sử dụng làm thuốc lợi tiểu, chữa huyết áp, chữa tiểu đường [1]. Đặc biệt, hai loại alkaloid là vincristine và vinblastine, có hoạt tính chống ung thư, còn các hợp chất đơn phân như ajmalicine và serpentine được sử dụng trong điều trị bệnh tim mạch và giúp lưu thông máu [1, 10].

Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase (*DAT*) là enzyme chìa khóa, xúc tác cho phản ứng cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp vindoline ở cây dừa cạn [5, 8]. *DAT* tinh sạch có giá trị 6,5 microM cho acetylcoenzyme A và 1,3 microM cho deacetylvindoline và các giá trị  $V_{max}$  12,6 pkat/microgram protein (acetylcoenzyme A) và 10,1 pkat/mg protein

(deacetylvindoline). Ước chế *DAT* bằng tabersonine, coenzyme A và các cation ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  và  $Mn^{2+}$ ) đã được quan sát và pH tối ưu của enzyme này được xác định là 7,5-9 [5]. Theo St-Pierre et al. (1998) [7] *DAT* có khối lượng phân tử là 50 kDa, gồm 9 chuỗi polypeptide. Gen *DAT* của cây dừa cạn có kích thước 1320 bp, mã hóa deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase gồm 439 amino acid, tham gia xúc tác chuỗi phản ứng cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp vindoline. Sự tác động của enzyme *DAT* vào rễ cây đã làm thay đổi monoterpene indole alkaloids (MIA) của chúng [3] và cho thấy tác động của các gen trong chuỗi chuyển hóa vindoline có thể làm thay đổi đáng kể trong các cấu trúc alkaloid [2]. Chính vì vậy, thiết kế vector chuyển gen mang gen *DAT* và nghiên cứu yếu tố tác động theo hướng tăng cường tổng hợp vindoline trong cây dừa cạn bằng công nghệ gen được chúng tôi quan tâm trong nghiên cứu này.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng mẫu lá cây dừa cạn có hoa màu

hồng tím (TN1) và hoa màu trắng (TN2) loài *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, thu tại tỉnh Thái Nguyên làm nguyên liệu tách chiết RNA tổng số phục vụ phân lập gen từ mRNA bằng kỹ thuật RT-PCR.

Các chủng vi khuẩn và các loại vector sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam gồm: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *A. tumefaciens* EHA105, vector pBT tách dòng gen, vector pRTRA7/3-cmyc, vector chuyển gen pBI121.

Sử dụng các nhóm phương pháp nghiên cứu: phân lập gen; tách dòng phân tử và xác định trình tự nucleotide; thiết kế vector chuyển gen.

RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent Kit; cDNA được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit; gen DAT được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu theo chu kỳ nhiệt: 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ: (94°C/1 phút, 58°C/1 phút và 72°C/1 phút 30 giây); 72°C/7 phút và 4°C:  $\infty$ . Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%; tinh sạch sản phẩm PCR theo GeneJET PCR Purification Kit và gắn vào vector tách dòng pBT rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30

giây). Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal, IPTG, kháng sinh carbenicilin và bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử [6]. Trình tự gen DAT được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130, Hoa Kỳ/Nhật Bản. Số liệu được xử lý bằng phần mềm BioEdit, DNASTar.

Vector chuyển gen mang gen DAT được thiết kế theo hai bước cơ bản (1) Thiết kế cấu trúc độc lập mang gen chuyển DAT; (2) Gắn cấu trúc gen DAT vào vector chuyển gen thực vật pBI121.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả tách dòng và xác định trình tự gen DAT

#### Kết quả khuếch đại và tách dòng cDNA

Dựa trên những thông tin về trình tự gen DAT của cây dứa cạn đã công bố trên Ngân hàng gen có mã số AF053307 [9] chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DATR-NotI* để khuếch đại đoạn mã hóa của gen DAT (cDNA) dự kiến với kích thước là 1320 bp (bảng 1).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5'-3')
DAT-NcoI	CATGCCATGGATGGAGTCAGGAAAAATATC
DAT-NotI	TTGCGGCCGCATTAGAAACAAATTGAAGTA
XbaI-DAT	CGTCTAGAATGGAGTCAGGAAAAATATCGG
Cmyc-KDEL-SacI	CCGAGCTCCTAGAGTTCGTCTTTGGAACC

RNA tổng số được tách chiết từ lá của mẫu cây dứa cạn TN1, TN2 và cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng phản ứng phiên mã ngược. Phản ứng PCR nhận bản đoạn mã hóa của gen DAT với cặp mồi đã thiết kế *DAT-NcoI/DATR-NotI*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% cùng với thang DNA 1 kb được thể hiện ở hình 1.

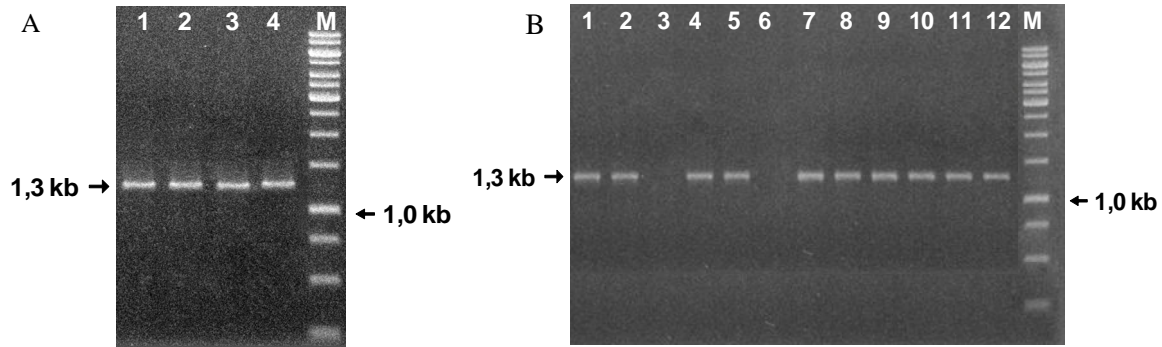
Kết quả thu được ở hình 1A cho thấy mẫu cây dứa cạn TN1 và TN2 cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 1,3 kb. Các băng đều sáng, rõ nét và

không có sản phẩm phụ. Kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen *DAT* ở dứa cạn mang mã số AF053307 trên Ngân hàng Gen. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là gen *DAT* chúng tôi đã tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen.

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector tách dòng pBT và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các khuẩn

lạc trắng được nuôi lỏng và tách chiết plasmid để kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DAT-NotI*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR ở hình 1B cho thấy, đối với mẫu TN1 và TN2, băng DNA có kích thước khoảng

1,3 kb xuất hiện ở tất cả các giếng. Kích thước của đoạn DNA tương ứng kích thước của gen DAT theo tính toán lý thuyết. Các plasmid tái tổ hợp sẽ được đem giải trình tự nucleotide.



Hình 1. A: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen DAT (cDNA) từ hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 (M: Thang DNA 1 kb; 1&2: Đoạn gen DAT (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN1; 3&4: Đoạn gen DAT (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN2); B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony - PCR từ 12 dòng khuẩn lạc (M: Thang DNA 1 kb; 1-6: Đoạn gen DAT (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của mẫu TN2; 7-12: Đoạn gen DAT (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của mẫu TN2)

Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy, cDNA của gen *DAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1 (hoa hồng tím) và TN2 (hoa trắng) đều có kích thước 1320 bp. Trình tự gen *DAT* của hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 mà chúng tôi thu được so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen NCBI cho thấy, đoạn mã hóa của gen *DAT* có độ tương đồng cao. Gen *DAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 có độ tương đồng so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 là 99,5% và 99% là tỷ lệ tương đồng của trình tự gen *DAT* giữa hai mẫu TN1 và TN2. Như vậy có thể kết luận rằng, gen *DAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn hoa hồng tím (TN1) và mẫu hoa trắng (TN2) đã

được tách dòng thành công và xác định trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide của gen *DAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen với mã số LN809930 và LN809931.

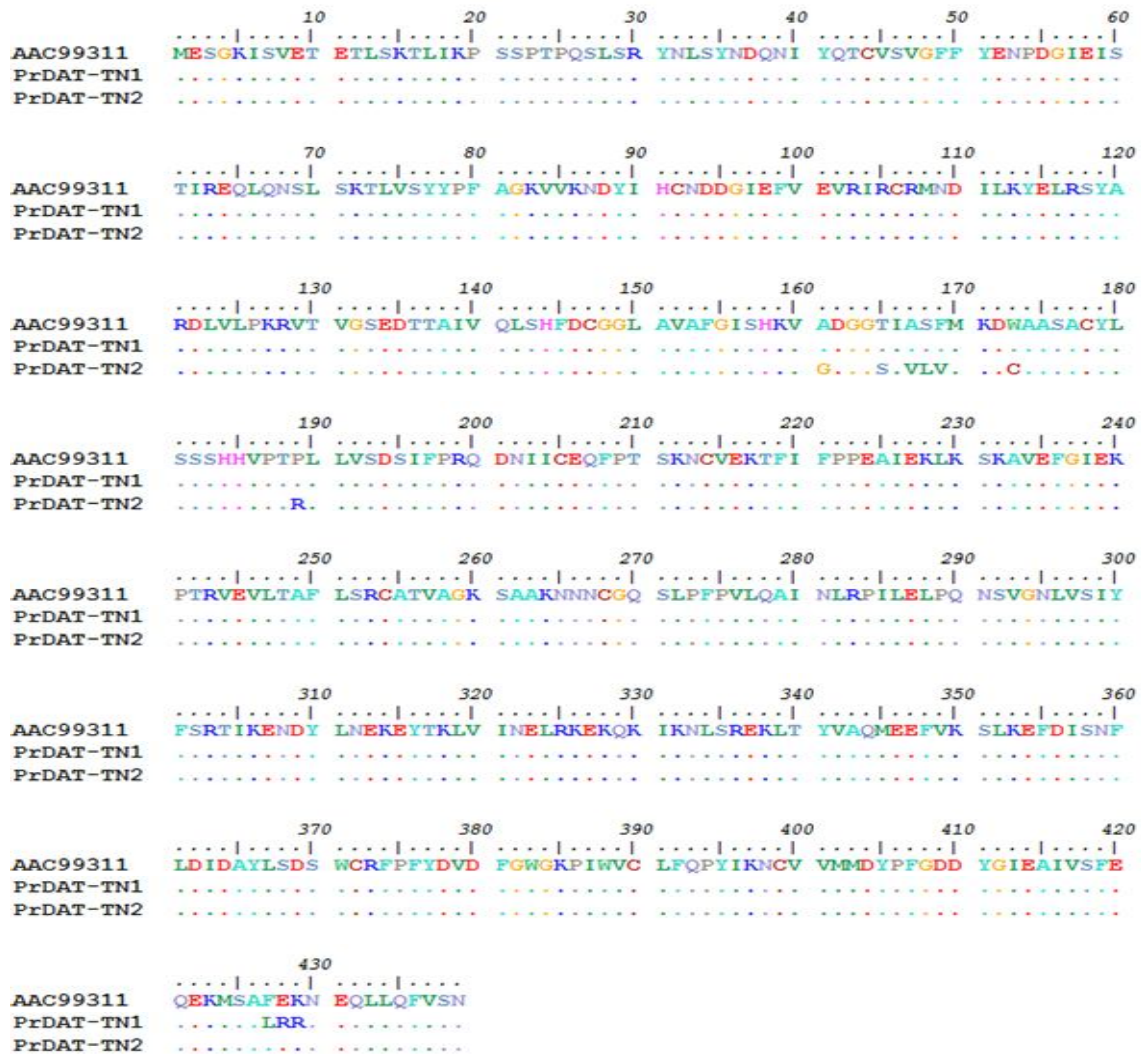
Tuy nhiên, trình tự nucleotide của cDNA ở mẫu dưa cạn hoa hồng tím TN1 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 6 vị trí nucleotide (1281, 1282, 1283, 1284, 1286, 1287), cDNA của mẫu dưa cạn hoa trắng TN2 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 7 vị trí nucleotide (482, 493, 500, 503, 505, 519, 566) và trình tự nucleotide của gen *DAT* ở hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 khác nhau ở 13 nucleotide (bảng 2).

Bảng 2. Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của gen *DAT*

Vị trí	482	493	500	503	505	519	566	1281	1282	1283	1284	1286	1287
AF053307	C	A	C	C	T	G	C	T	G	A	G	A	G
TN1	C	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	G	A
TN2	G	T	T	T	G	T	G	T	G	A	G	A	G

Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự cDNA của hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 với protein mang mã số

AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *DAT* mang mã số AF053307), kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 2. Trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 và của protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của DAT ở hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 và DAT mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *DAT* mang mã số AF053307) (hình 2) cho thấy, protein DAT gồm 439 amino acid và có độ tương đồng cao. So với protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng

gen thì trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1 có độ tương đồng 99,3%, của mẫu TN2 có độ tương đồng 99,4%; còn trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu TN1 và TN2 tương đồng là 97,7%. Tuy nhiên, các trình tự amino acid của protein DAT cũng có sự khác nhau ở 10 vị trí amino acid (bảng 3).

Bảng 3. Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid suy diễn của protein DAT ở mẫu dưa cạn hoa hồng tím TN1, hoa trắng TN2 và protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen

Vị trí	161	165	167	168	169	173	189	427	428	429
AAC99311	A	T	A	S	F	W	P	F	E	K
TN1	A	T	A	S	F	W	P	L	R	R
TN2	G	S	V	L	V	C	R	F	E	K

Bảng 3 cho thấy, trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1 khác với *DAT* mang mã số AAC99311 ở 3 amino acid (427, 428, 429), còn trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN2 khác với *DAT* mang mã số AAC99311 ở 7 amino acid (161, 165, 167, 168, 169, 173 và 189).

Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase là một thành viên của họ transferase có chức năng xúc tác ở khâu cuối cùng trong sinh tổng hợp vindoline. Motif HXXXD có thể là một phần trong vị trí hoạt động của enzym này. Vùng transferase của *DAT* có 427 amino acid, từ amino acid thứ 8 đến 434 [9]. Cây dứa cạn gồm ba giống khác nhau, giống dứa cạn hoa hồng tím, dứa cạn hoa trắng và dứa cạn hoa trắng nhụy đỏ. Marfori và Alejar (1993) đã phân tích sự thay đổi hàm lượng alkaloid trong mô sẹo có nguồn gốc từ lá, rễ và hoa của giống dứa cạn hoa hồng tím và giống hoa trắng đã nhận xét rằng hàm lượng alkaloid phụ thuộc vào nguồn gốc mô sẹo từ lá, rễ hay hoa và hàm lượng alkaloid ở mô sẹo có nguồn gốc từ rễ của giống dứa cạn Hoa hồng tím cao hơn ở giống hoa trắng [4]. *DAT* của mẫu dứa cạn TN1 (hoa hồng tím) và TN2 (hoa trắng) khác nhau ở 10 amino acid ở vùng transferase, sự khác nhau này có liên quan gì đến tổng hợp alkaloid và sự khác nhau về hàm lượng alkaloid giữa giống hoa hồng tím và giống hoa trắng là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu.

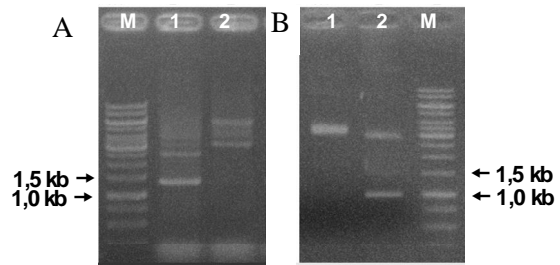
### Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc gen *DAT*

#### Tạo cấu trúc chứa gen đích *DAT*

Gen *DAT* của cây dứa cạn màu hoa hồng tím đã được tách dòng trong vector pBT được cắt bằng hai loại enzyme giới hạn là *NcoI/NotI*, kết quả tạo ra hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1,3 kb và 2,71 kb. Trong đó phân đoạn DNA 1,3 kb chính là gen *DAT* cần thu nhận. Hình 3 thể hiện sản phẩm DNA tinh sạch sau khi cắt vector pBT tái tổ hợp bởi cặp enzyme giới hạn là *NcoI/NotI* có kích thước khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước gen *DAT* đã ước tính. Đoạn DNA này được dùng để phát triển vector chuyển gen ở các bước tiếp theo.

Sau khi cắt mở vòng được vector pRTRA7/3 bằng sử dụng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* với kích thước tính toán là 3,3 kb.

Tiến hành gắn với gen *DAT* nhờ phản ứng nối với sự xúc tác của DNA T4 ligase tạo ra cấu trúc tái tổ hợp pRTRA7/3 - *DAT*. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  và chọn dòng bằng phản ứng colony - PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, cả 5 dòng khuẩn lạc xuất hiện một băng DNA đặc hiệu khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước của gen *DAT*. Như vậy cả 5 dòng vi khuẩn chọn lọc đều mang plasmid tái tổ hợp chứa gen *DAT*. Plasmid tái tổ hợp pRTRA-*DAT* được sử dụng để thu nhận cấu trúc mang gen *DAT* phục vụ phát triển vector chuyển gen ở thực vật.



Hình 3. Kết quả cắt vector pRTRA7/3 và pBT-*DAT* với cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI*

A: Kết quả cắt pBT-*DAT*; M: DNA ladder 1 kb; 1: pBT-*DAT* chưa cắt; 2: pBT-*DAT* đã cắt; B: Kết quả cắt pRTRA7/3; M: DNA ladder 1 kb; 1: pRTRA7/3 chưa cắt; 2: pRTRA7/3 đã cắt.

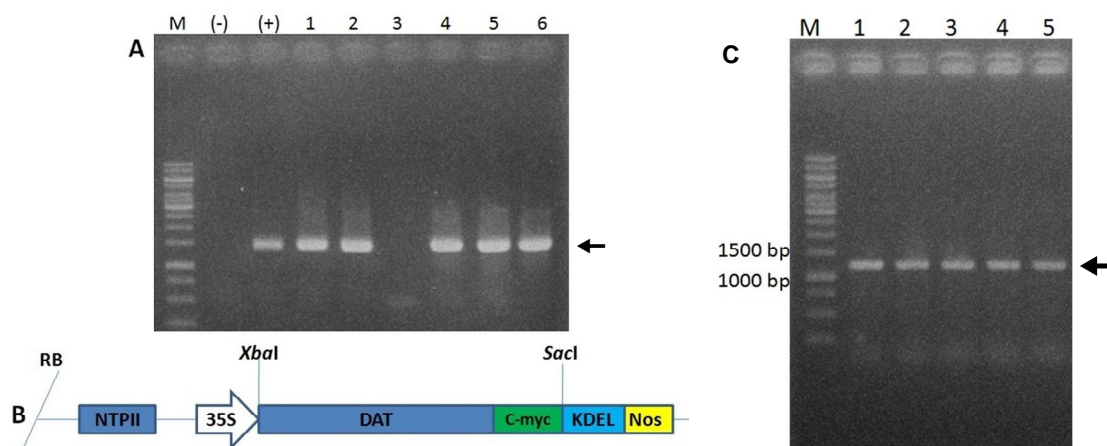
#### Tạo cấu trúc 35S-*DAT*-*cmyc*

Sau khi được cấu trúc gen *DAT* đầy đủ các thành phần cần thiết cho biểu hiện và kiểm tra hoạt động của gen, việc tiếp theo là gắn cấu trúc này vào vector chuyển gen phù hợp để có thể biến nạp được vào hệ gen thực vật. Gen *DAT* được gắn vào vector pRTRA 7/3 nhằm thu nhận cấu trúc chứa đuôi *cmyc* để chuyển vào vector chuyển gen pBI121. Đoạn *DAT*-*cmyc* được nhân bản bằng cặp mồi *DAT-XbaI/DAT-cmyc-SacI* (bảng 1) và gắn vào vector pBI121 để thu nhận cấu trúc chuyển gen 35S-*DAT*-*cmyc* (hình 4B).

Việc gắn cấu trúc gen *DAT* vào vector chuyển gen pBI121 được thực hiện bởi các phản ứng thu nhận cấu trúc gen *DAT* bằng enzyme giới hạn, cắt mở vòng vector pBI121 và gắn cấu trúc gen *DAT* tạo vector chuyển gen. Sử dụng T4 ligase để gắn cấu trúc 35S-*DAT*-*cmyc* vào

plasmid pBI121 mở vòng. Sản phẩm tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng sốc nhiệt để chọn lọc và nhân dòng nhờ colony-PCR (hình 4A). Vi khuẩn sau khi biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin. Sau đó điện di kiểm tra bằng colony-PCR cho thấy dòng khuẩn lạc 3 âm tính (không xuất hiện băng đặc hiệu) có thể do chứa plasmid pBI121 tự đóng vòng, kháng được kanamycin nhưng không mang cấu trúc gen *DAT*. Các dòng khuẩn lạc 1, 2, 4, 5, 6 dương tính với phản ứng colony-PCR (xuất hiện

băng đặc hiệu khoảng 1,3 kb) có thể chứa plasmid tái tổ hợp mang cấu trúc gen *DAT*. Những dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi trong LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc (kanamycin) để nhân dòng vector tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp pBI121\_CaMV35S\_DAT\_c-myc được tách chiết, kiểm tra và biến nạp vào *A. tumefaciens*. Các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121\_CaMV35S\_DAT\_c-myc được kiểm tra bằng colony-PCR và sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen tiếp theo (hình 4C).



Hình 4. A: Kết quả PCR kiểm tra các dòng khuẩn lạc *Agrobacterium tumefaciens* sau biến nạp; B: Mô hình cấu trúc chuyển gen được thiết kế; C: Kết quả kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen pBI121\_CaMV35S\_DAT\_c-myc.

## KẾT LUẬN

cDNA của gen *DAT* phân lập từ mẫu dừa cạn TN1 (hoa hồng tím) và TN2 (hoa trắng) thu tại Thái Nguyên đã được khuếch đại, tách dòng thành công và xác định được trình tự nucleotide. Đoạn gen *DAT* phân lập được có kích thước 1320 nucleotide, mã hóa 439 amino acid. Trình tự nucleotide của gen *DAT* phân lập từ mẫu dừa cạn TN1 và TN2 thu tại Thái Nguyên có độ tương đồng là 99% và so với trình tự nucleotide của gen *DAT* mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen là 99,5%. Gen *DAT* ở mẫu dừa cạn TN1 (hoa hồng tím) và TN2 (hoa trắng) có sự khác nhau ở 13 nucleotide, trình tự amino acid suy diễn của *DAT* ở hai mẫu dừa cạn TN1 và TN2 có sự sai khác ở 10 amino acid. Vector chuyển gen mang gen *DAT* phân lập từ cây dừa cạn hoa hồng tím đã thiết kế thành công và tạo

được vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp phục vụ chuyển gen trong mục đích cải thiện hàm lượng alkaloid trong cây dừa cạn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 307-309.
2. Makhzoum A., Petit-Paly G., St Pierre B., Bernards M. A., 2011. Functional analysis of the *DAT* gene promoter using transient *Catharanthus roseus* and stable *Nicotiana tabacum* transformation systems. *Plant Cell Rep.*, 30(7): 1173-1182.
3. Magnotta M., Murata J., Chen J., De Luca V., 2007. Expression of deacetyltransferase in *Catharanthus*

- roseus* hairy roots. *Phytochemistry*, 68(14): 1922-1931.
4. Marfori E. C., Alejar A. A., 1993. Alkaloid yield variation in callus cultures derived from different plant parts of white and rosy-purple periwinkle *Catharanthus roseus* (L.) Don. *Philippine Journal of Biotechnology*, 4: 1-8.
  5. Power R., Kurz W. G., De Luca V., 1990. Purification and characterization of acetylcoenzyme A: deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 279(2): 370-376.
  6. Sambrook J., Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 1st ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  7. St-Pierre, Lafamme P., Anne-Marie Alarco, Vincenzo De Luca, 1998. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for conenzym A-dependent acyl transfer. *Plant J.*, 14(6): 703-13.
  8. St-Pierre B., Vazquez-Flota F.A., De Luca V., 1999. Multicellular compartmentation of catharanthus roseus alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell.*, 11(5): 887-900.
  9. St-Pierre B., Laflamme P., Alarco A. M., De Luca V., 1999. Catharanthus roseus deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase (DAT) gene, complete cds. *GenBank*: AF053307.1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF053307>.
  10. Van der Heijden M. S., Brody J. R., Gallmeier E., Cunningham S. C., Dezentje D. A., Shen D., Ralph H. Hruban, and Scott E. Kern, 2004. Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am. J. Pathol.*, 165(2): 651-657.

## MOLECULAR CLONING AND DESIGNING TRANSGENIC VECTOR CARRYING *DAT* GENE ISOLATED FROM *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Bui Thi Ha<sup>1</sup>, Ho Manh Tuong<sup>2</sup>, Hoang Phu Hiep<sup>3</sup>,  
Le Van Son<sup>2</sup>, Nguyen Thi Tam<sup>3</sup>, Chu Hoang Mau<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, VAST

<sup>3</sup>Thai Nguyen University of Education

### SUMMARY

*Catharanthus roseus* (L.) is a dicotyledonous plant, which has the ability of producing some special alkaloids as vincristine and vinblastine that can cure cancers, especially blood cancer. Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase (DAT) is the catalyst key enzyme for the last reaction of vindoline biosynthetic process in *Catharanthus roseus*. Research on improvement of alkaloid content in periwinkle plants by approach of application of gene technology aims provide sufficient materials for medicinal purposes has been set out in the strategy of medicinal plant research in Vietnam. In this paper, we presented the results of cloning and determining the nucleotide sequencing of *DAT* gene (cDNA) isolated from mRNA of two varieties of *Catharanthus roseus* plant, viz. pink-purple flower variety (TN1) and white flower variety (TN2) that were collected at Thainguyen province. *DAT* gene isolated from two periwinkle sample TN1 and TN2 is 1320 nucleotides in length, encoding of acetyl CoA deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase including 439 amino acids, participating in the last reaction chain of vindoline biosynthetic process. Comparative alignment of sequence of *DAT* gene between two sample TN1 (pink-purple flower) and TN2 (white flower) in Vietnam showed in 13 different location in nucleotide sequence of *DAT* gene. Sequence of deduced amino acid of two

periwinkle samples TN1 and TN2 had 10 different location in amino acid sequence of DAT. Transgenic vector carrying *DAT* gene has been designed successfully. These results form the basis for generation of transgenic periwinkle plants overexpressing DAT, aiming to improve the alkaloid content in periwinkle plants.

*Keywords:* *Catharanthus roseus*, alkaloid, *DAT* gene, blood cancer, molecular cloning, periwinkle.

*Ngày nhận bài:* 12-11-2014