

PHÂN LẬP VÀ MÔ TẢ TRÌNH TỰ CÁC GEN MÃ HÓA LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE VÀ ANTHOCYANIDIN REDUCTASE TỪ CHÈ TRUNG DU XANH THÁI NGUYÊN (*CAMELLIA SINENSIS*)

Hoàng Thị Thu Yến^{1,✉}, Dương Trung Thành¹, Phạm Thị Hằng¹, Dương Trung Dũng², Huỳnh Thị Thu Huệ³

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

³Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: yenhtt@tnus.edu.vn

Ngày nhận bài: 08.12.2017

Ngày nhận đăng: 15.7.2018

TÓM TẮT

Catechin là hợp chất chính của con đường chuyển hóa flavonoid ở chè, được tổng hợp theo 4 nhánh khác biệt, dưới sự xúc tác trực tiếp của 2 loại enzyme là leucoanthocyanidin reductase (LAR) và anthocyanidin reductase (ANR). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và mô tả trình tự gen mã hóa ANR và LAR từ giống chè Trung Du xanh (kí hiệu *CsANR2* và *CsLAR1*). Gen *CsANR2* thu được có chiều dài 1014 bp, mã hóa 337 amino acid. Kết quả so sánh trình tự nucleotide cho thấy gen *CsANR2* ở giống chè Trung Du xanh có ít khác biệt về trình tự nucleotide so với trình tự *CsANR2* công bố trên Genbank, với hệ số tương đồng nucleotide từ 98,9–99,6 %, tương đồng trình tự amino acid đạt 95,7–99,5%. *CsANR2* có 2 vùng chức năng chính, vùng giàu glycine ở đầu N có chức năng liên kết với NAD hoặc NADP (GGTGFVAA); vùng xác định sự đặc hiệu cơ chất có chứa các amino acid liên quan đến sự xúc tác của enzyme (130S, 167Y và 171K). Kết quả phân tích cho thấy, sự khác biệt trình tự nucleotide không dẫn đến sự biến đổi trình tự amino acid ở các domain chức năng quan trọng của *CsANR2*. Gen *CsLAR1* có kích thước 1.029 bp, mã hóa 342 amino acid. Hệ số tương đồng trình tự nucleotide của *CsLAR1* giữa chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố trên GenBank dao động từ 96,3–100%, tương đồng trình tự amino acid là 88,3–100%. *CsLAR1* có chứa 3 motif bảo thủ giữa các loài: motif RFLP, ICCN và THD. Tuy nhiên, motif ICCN của *CsLAR1* từ chè Trung Du xanh có 1 vị trí amino acid khác biệt so với các trình tự còn lại ở chè (I153T). Kết quả phân tích các vùng chức năng của *CsLAR1* cho thấy, *CsLAR1* ở chè có tính bảo thủ ở các amino acid liên kết với cơ chất, vùng giàu glycine đầu N liên kết với NADP có một vị trí amino acid thay đổi (GACGFIG), riêng mẫu chè Trung Du xanh là C, ở tất cả các mẫu công bố đều là S. Như vậy, một số biến đổi trình tự amino acid của *CsANR2* và *CsLAR1* có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme như thế nào cần phải có những nghiên cứu sâu hơn làm sáng tỏ.

Từ khóa: *Anthocyanidin reductase, Catechin, Epicatechin, Gallocatechin, Epigallocatechin, Leucoanthocyanidin reductase*

MỞ ĐẦU

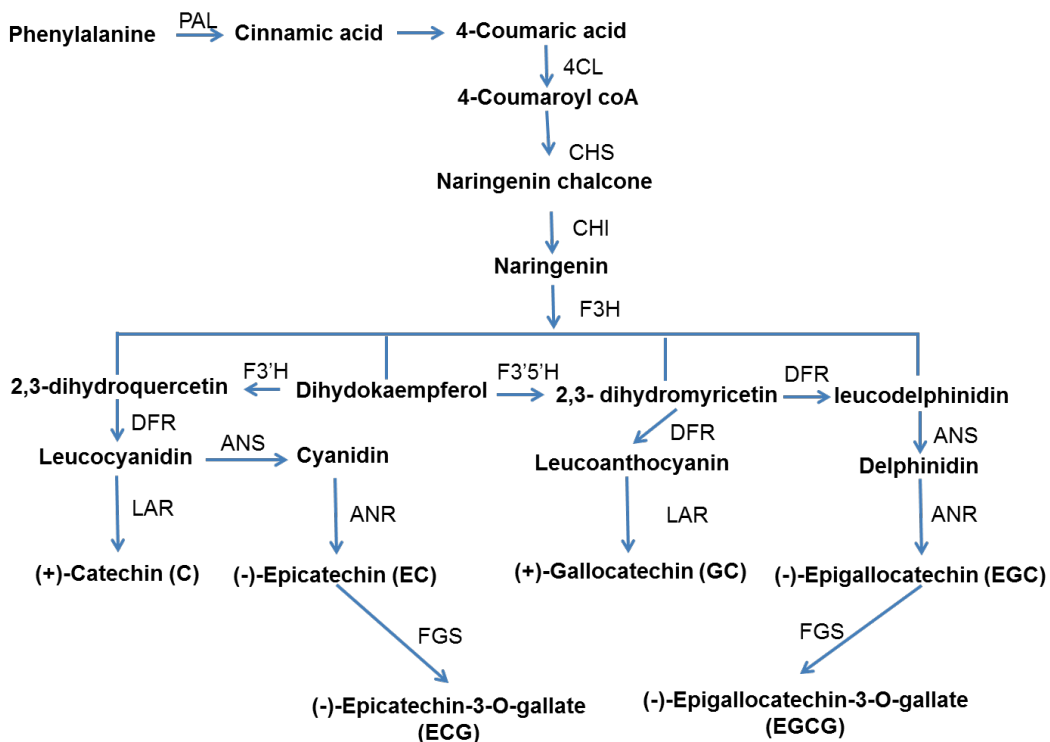
Chè là một trong những đồ uống được tiêu thụ rộng rãi nhất trên thế giới và mang lại nhiều lợi ích sức khỏe cho con người (Lin *et al.*, 2003). Hơn 300 loại chè đã được sản xuất từ lá của chè bằng các quá trình sản xuất khác nhau và sản phẩm chè được chia thành ba loại chính đó là: chè xanh, chè Olong và chè đen (Unal *et al.*, 2011). Ngoài ra, đồ uống là sản phẩm chiết xuất trực tiếp từ lá chè tươi hiện nay được sử dụng rộng rãi và mang lại giá kinh tế rất cao (Rudy 2008). Chất lượng sản phẩm chè được đánh

giá chủ yếu dựa trên cơ sở nghiên cứu thành phần hóa học có trong chè. Theo thống kê của Harbowy, Balentine (1997), thành phần hóa học chính trong chất rắn chiết xuất từ chè là polyphenol, chiếm 30–40%. Hàm lượng polyphenol quyết định đến màu sắc, độ chất của nước chè và góp phần tạo hương vị của chè. Hầu hết các đặc tính có lợi cho sức khỏe con người đã được chứng minh là do các hợp chất polyphenol có trong chè (Harbowy and Balentine 1997). Các hoạt chất catechin và dẫn xuất của nó, còn được gọi là các flavan-3-ol chiếm khoảng 70% polyphenol tổng số (Wang *et al.*, 2012; Winkel-

Shirley 2001; Xie *et al.*, 2003). Catechin có nhiều lợi ích sức khỏe cho con người như khả năng chống oxy hóa (Luximon-Ramma *et al.*, 2006; Sang *et al.*, 2003; Wang and Bachrach 2002), các hoạt tính phòng ngừa ung thư tuyến tiền liệt và buồng trứng (Bemis *et al.*, 2006; Ravindranath *et al.*, 2006), chống ung thư và bệnh tiểu đường (Kao *et al.*, 2006; Wolfram *et al.*, 2006; Yang and Koo 2000), ngăn chặn bệnh tim mạch (Bordoni *et al.*, 2002; Yang and Koo 2000); đặc biệt các catechin có thể cũng đóng vai trò trong chống lại tác nhân gây bệnh (Pang *et al.*, 2013).

Thành phần của catechin bao gồm Epicatechin (EC), ECG (Epicatechin-3-O-gallate), EGC (Epigallocatechin), EGCG (Epigallocatechin-3-O-gallate), C (catechin) và GC (Gallocatechin) (Zhen *et al.*, 2002). Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng cả thành phần và sự tích lũy catechin có tương quan cao với mức độ biểu hiện của các gen liên quan (Jiang *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2013). Catechin của chè được

tổng hợp theo 4 nhánh khác biệt của con đường flavonoid dưới sự xúc tác trực tiếp của 2 loại enzyme là leucoanthocyanidin reductase (LAR) và anthocyanidin reductase (ANR) (Hình 1). Hai enzyme này đóng vai trò chìa khóa xác định thành phần catechin bao gồm: catechin được epimer hóa còn gọi là epicatechin (EGCG, ECG, EGC và EC) và catechin không được epimer hóa (GC và C) (Pang *et al.*, 2013; Punyasiri *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2014). LAR xúc tác chuyển hóa leucocyanidin, leucoanthocyanin thành C và GC. Trong khi ANR xúc tác tổng hợp EC và EGC từ anthocyanin. Sau đó, EC và EGC được ester hóa tạo thành ECG và EGCG (Ashihara *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2009; Tanner *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003). Tuy nhiên, nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng sự biểu hiện gen *CsLAR1* ở thuốc lá cho kết quả tích lũy epicatechin cao hơn catechin, điều này cho thấy *CsLAR1* có thể cũng có thể tham gia vào sự tổng hợp epicatechin. Trong khi đó, *CsANR1* và *CsANR2* ở chè được chứng minh có thể chuyển hóa anthocyanidin thành hỗn hợp epicatechin và catechin (Pang *et al.*, 2013).



Hình 1. Các con đường sinh tổng hợp catechin ở chè (Liu *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015). ANR (anthocyanidin reductase); ANS (anthocyanin synthase); 4CL (4-coumarate: CoA ligase); 4CL (cinnamate 4-hydroxylase); CHI (chalcone isomerase); CHS (chalcone synthase); DFR (dihydroflavonol reductase); F3H (flavanone 3 β -hydroxylase); F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase); F3'5'H (flavonoid 3'5'-hydroxylase); LAR (leucoanthocyanidin reductase); PAL (phenylalanine ammonia-lyase).

Hiện nay, Việt Nam là một trong 10 quốc gia đứng đầu thế giới về diện tích và sản lượng chè. Các giống chè được trồng chủ yếu là chè Trung Du, chè Shan và các giống chè mới, có nhiều giống chè được nhập nội từ các nước như Trung Quốc, Nhật Bản, Sri Lanka... Từ lâu chè Trung Du được biết đến là loại chè truyền thống của Việt Nam, có vị thơm, ngọt hậu, được nhiều người ưa chuộng. Mặt khác, chè Trung Du có khả năng chống chịu sâu bệnh cũng như chịu hạn, chịu rét tốt ở vụ đông, chè có giá trị kinh tế cao; khả năng sinh trưởng mạnh, độ che phủ lớn, có thể chống xói mòn và rửa trôi, bảo vệ môi trường sinh thái. Tuy nhiên, do được trồng đã nhiều năm, nên chè Trung Du dần bị thoái hóa, năng suất và chất lượng thấp (Đỗ Ngọc Qũy and Lê Thất Khương 2000; Lương Văn Vượng *et al.*, 2013). Đã có những thảo luận hoạch định chương trình, chính sách và ủng hộ các công trình nghiên cứu cải tạo, bảo tồn và phát triển giống chè Trung Du trên các phương tiện thông tin đại chúng (<http://www.thainguyen.gov.vn/>; <http://baophutho.vn/>; <http://baothainguyen.org.vn/>). Có rất ít thông tin ở mức độ sinh học phân tử về các quá trình sinh học ở chè trồng tại Việt Nam nói chung và chè Trung Du nói riêng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự 2 gen mã hóa cho LAR và ANR liên quan đến quá trình tổng hợp các hợp chất catechin từ giống chè Trung Du xanh được chọn lọc nhằm tạo nguyên liệu nghiên cứu làm sáng tỏ chức năng của các enzyme này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá từ giống chè Trung Du xanh có chất lượng tốt trồng tại Thái Nguyên được TS. Dương Trung Dũng (Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên) chọn lọc và cung cấp.

Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá chè theo quy trình kit tách RNA thực vật (GeneJET Plant RNA Purification) của hãng Thermo Scientific. Mẫu RNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose.

Tổng hợp cDNA

Để chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR, RNA tổng số tinh sạch được dùng làm khuôn để tổng hợp cDNA bằng môi Oligo(dT) và enzyme Reverse Transcriptase theo (First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real-Time PCR) của hãng Affymetrix.

Khuếch đại gen mã hóa CsANR2 và CsLAR1

Cặp mồi được thiết kế để khuếch đại gen mã hóa CsANR2 và CsLAR1 dựa trên trình tự gen đã được đăng ký trên Genbank với mã số AY641729, GU992401 và được tổng hợp bởi công ty Integrated DNA Technologies. Để phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi thiết kế thêm các đoạn nhận biết của các enzyme giới hạn vào đầu 5' mồi (Bảng 1).

Phản ứng PCR được thực hiện bằng enzyme Dream *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific) với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ ở 95°C : 3 phút; 30 chu kỳ ở (95°C : 1 phút; 55°C : 1 phút; 72°C : 1 phút); chu kỳ cuối ở 72°C : 10 phút; kết thúc và giữ ở 4°C.

Bảng 1. Danh sách và trình tự các mồi được sử dụng trong nghiên cứu.

Stt	Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Gen đích	Kích thước ước tính
1	ANR F ₃₃₇	<u>CCATGGAAGCCCAACCGACAGC</u>	Anthocyanidin reductase	1.014 bp
2	ANR R ₃₃₇	<u>GAGCTCAAATCCCCTTAGCCTTG</u>		
3	LAR F ₃₄₂	<u>GGATCCATGACTGTGTGGAAATCTG</u>	Leucocyanidin reductase	1.029 bp
4	LAR R ₃₄₂	<u>GAGCTCAGCACACATTGTGATGG</u>		

Chú thích: ¹Phần gạch bên dưới là đoạn nhận biết của enzyme giới hạn, mồi ANR F₃₃₇ và LAR F₃₄₂ tương ứng chứa điểm nhận biết của *Nco*I và *Bam*HI, ANR R₃₃₇ và LAR R₃₄₂ chứa điểm nhận biết của *Xho*I; bp: cặp nucleotide.

Tách dòng gen

Sản phẩm khuếch đại gen mã hóa CsANR2 và CsLAR1 từ kỹ thuật PCR được tinh sạch và

gắn vào vector tách dòng pJET1.2 (Thermo Scientific), sau đó được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α và chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin với nồng độ 50

mg/ml. Plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bg*III.

Xác định và phân tích trình tự gen

Trình tự nucleotide của gen *CsANR2* và *CsLAR1* được xác định trên máy ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Đối với mỗi mẫu, trình tự được đọc với mỗi xuôi và mỗi ngược. Kết quả trình tự gen được phân tích, so sánh bằng phần mềm sinh học chuyên dụng (BLAST, BioEdit).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng gen *CsANR2* và *CsLAR1*

Nghiên cứu của Pang *et al.* (2013) đã tạo dòng và xác định trình tự gen *ANR* và *LAR* hoàn chỉnh từ giống chè của Viện nghiên cứu chè Sri Lanka. Trong đó, gen *ANR* có hai isoform được kí hiệu là *CsANR1* và *CsANR2*, cDNA của *CsANR1* có kích thước 1.044 bp (GU992402), mã hóa 347 amino acid, khung đọc mở (ORF) của *CsANR2* có kích thước 1.014 bp, mã hóa 337 amino acid. Kích thước gen *CsANR2* tương tự như Singh *et al.*, (2009) đã công bố. cDNA hoàn chỉnh gen *CsLAR1* có kích thước 1.029 bp, mã hóa 342 amino acid (Pang *et al.*, 2013). Mặt khác, nghiên cứu của Chen *et al.* (2015) chỉ ra rằng gen *LAR* ở chè có 3 isoform (*CsLAR1*, *CsLAR2* và *CsLAR3*), trong đó *CsLAR1* được xác định là có hoạt tính mạnh nhất ở chè kháng bệnh (Chen *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu của chúng tôi, gen mã hóa *CsLAR1* và *CsANR2* được khuếch đại sử dụng khuôn cDNA từ RNA tổng số mẫu chè Trung Du xanh với cặp mồi dựa trên trình tự gen đã công bố trên Genbank. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (không dẫn hình) cho thấy, gen *CsANR2* và *CsLAR1* thu được có kích thước khoảng 1,0 kb, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương tự với nghiên cứu đã công bố trước đây (Chen *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2009). Tiếp theo, sản phẩm PCR khuếch đại gen *CsANR2* và *CsLAR1* được tinh sạch và sử dụng cho phản ứng ghép nối vào vector tách dòng pJET1.2. Sau khi plasmid tách chiết được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bg*III, DNA plasmid bị cắt thành hai đoạn: một đoạn lớn có kích thước tương ứng với kích thước vector pJET1.2 (~3,0 kb) và một đoạn nhỏ hơn có kích thước khoảng 1,0 kb tương ứng với sản phẩm PCR (không dẫn

hình). Như vậy, chúng tôi đã tách dòng được sản phẩm PCR khuếch đại gen *CsANR2* và *CsLAR1* trong vector pJET1.2.

Phân tích trình tự gen *CsANR2*

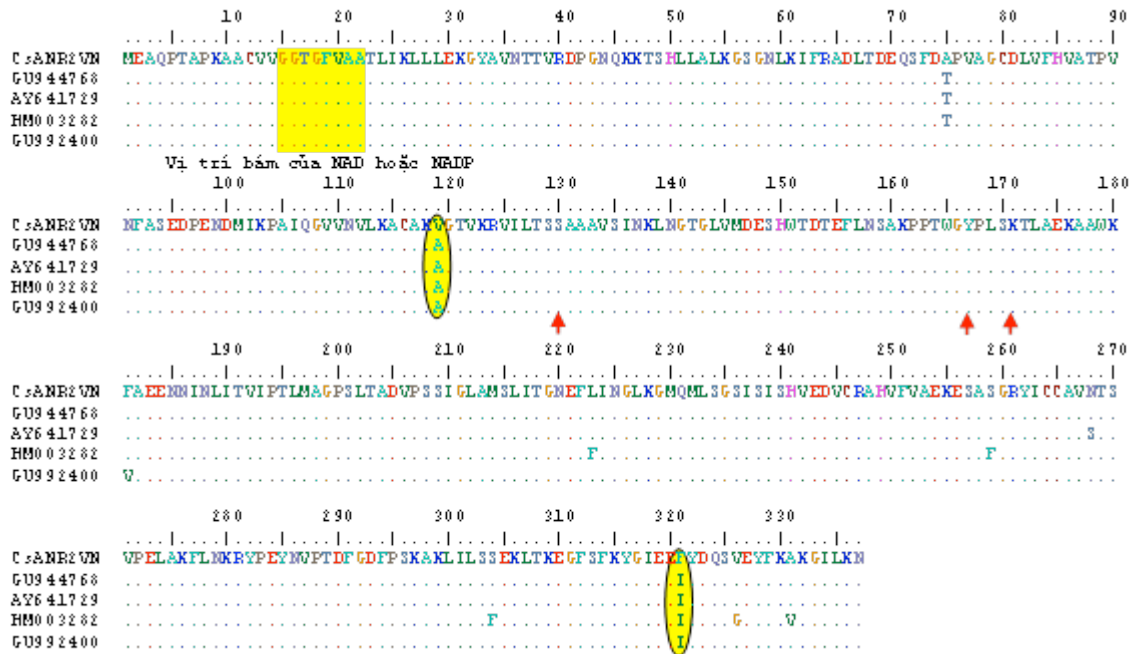
Trình tự của gen mã hóa *CsANR2* từ giống chè Trung Du được gắn với vector pJET1.2 đã được xác định. Sau khi phân tích trình tự, chúng tôi thấy rằng sản phẩm PCR phân lập được là trình tự ORF hoàn chỉnh mã hóa *CsANR2*. Gen này có kích thước 1.014 bp, mã hóa 337 amino acid. Kết quả này giống với kích thước gen *CsANR2* của các mẫu chè đã được nghiên cứu và công bố (Chen *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2009). Kết quả phân tích trình tự nucleotide gen mã hóa *CsANR2* giữa giống chè nghiên cứu với các trình tự đã công bố và được đăng ký trên GenBank (mã số: GU944768, AY641729, HM003282, GU992400) cho thấy gen *CsANR2* rất bảo thủ ở chè. Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống chè dao động từ 98,9–99,6%. Tương tự, kết quả phân tích trình tự amino acid chỉ ra *CsANR2* có hệ số tương đồng di truyền rất cao giữa các giống chè dao động từ 95,7–99,5% (Hình 2).

CsANR2 thuộc siêu họ dehydrogenase, sử dụng anthocyanidin làm cơ chất để tổng hợp EC, enzyme này hoạt động phụ thuộc vào NAD - Nicotinamide Adenine Dinucleotide hoặc NADP - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Xie *et al.*, 2003). *CsANR2* có thể có 2 vùng chức năng chính (domain), vùng 1 (vị trí 15–22: GGTGFVAA) giàu glycine có chức năng liên kết với NAD hoặc NADP; vùng 2 xác định sự đặc hiệu cơ chất và có chứa các amino acid liên quan đến sự xúc tác của enzyme (130S, 167Y và 171K) (Gargouri *et al.*, 2009). Kết quả so sánh trình tự amino acid của *CsANR2* ở hình 2 cho thấy, các amino acid quy định chức năng của *CsANR2* ở chè có tính bảo thủ cao giữa *CsANR2* chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố. Điểm đáng chú ý là *CsANR2* từ giống chè Trung Du xanh có 3 vị trí amino acid sai khác so với trình tự công bố (T75A; A119V; I321F) Ở vị trí 75, đa phần gen *CsANR2* là Threonine (T) (60%), *CsANR2* ở chè Trung Du xanh và mã số GU944768 là A. Ở vị trí 119 và 321, tất cả các mẫu công bố tương ứng đều là Alanine (A) và Isoleucine (I), còn mẫu chè Trung Du xanh là Valine (V) và Phenylalanine (F). Sự sai khác này có ảnh hưởng đến hoạt tính của *CsANR2* như thế nào cần phải có những nghiên cứu sâu hơn.

Phân tích trình tự gen CsLAR1

Gen mã hóa CsLAR1 từ giống chè Trung Du xanh thu được có kích thước 1.029 bp, mã hóa 337 amino acid. Kết quả này giống với kích thước gen CsLAR1 của các mẫu chè đã được nghiên cứu và công bố (Chen *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2013). Hệ số tương đồng di truyền trình tự nucleotide giữa chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố và đăng

ký trên GenBank (mã số KF879516, EF205148, KY615698, GU992401, KR045740) dao động từ 96,3–100%, tương đồng trình tự amino acid là 88,3–100%. Để kiểm tra sự sai khác trình tự nucleotide dẫn đến sự sai khác trình tự amino acid có thể liên quan đến các vùng chức năng của CsLAR1, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự amino acid suy diễn của CsLAR1 ở giống chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố. Kết quả so sánh được thể hiện ở hình 2.



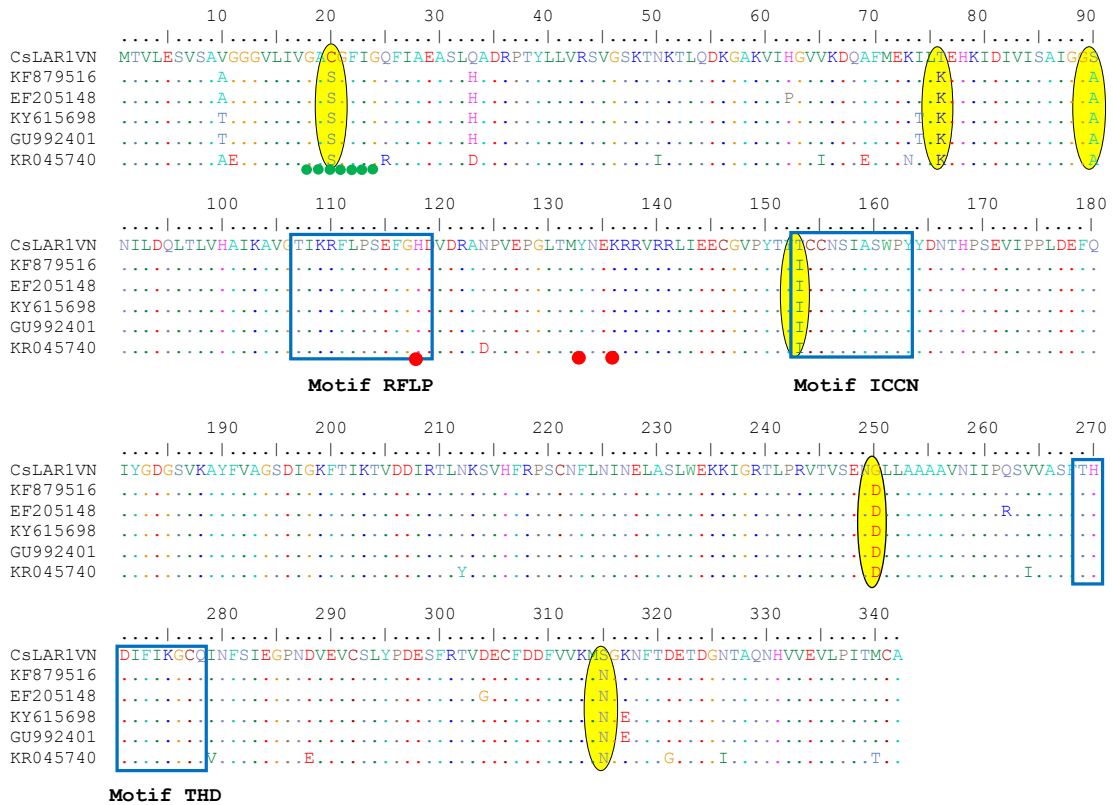
Hình 2. So sánh trình tự amino acid suy diễn của CsANR2 từ giống chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố. (◻)Trình tự amino acid thay đổi của CsANR2 so với các trình tự công bố; Dấu mũi tên chỉ gốc amino vùng liên kết cơ chất bảo thủ.

Trên hình 3 cho thấy, trình tự amino acid của CsLAR1 ở giống chè Trung Du xanh có nhiều vị trí sai khác so với CsLAR1 ở các giống chè đã công bố. Trong đó, CsLAR1 từ chè Trung Du xanh có 6 vị trí amino acid khác biệt (S20C; K76T; A90S; I153T; D250G, N315S). Giống với CsANR2, CsLAR1 cũng thuộc siêu họ dehydrogenase, đã được phân tích có chứa 3 motif bảo thủ giữa các loài: motif RFLP, ICCN và THD. CsLAR1 có 2 vùng chức năng chính, vùng liên kết với NADP giàu glycine ở đầu N (vị trí 18-24); vùng xác định sự đặc hiệu cơ chất chứa các amino acid ở vị trí 118H, 133Y và 136K (Wang *et al.*, 2017). Kết quả so sánh CsLAR1 ở chè cho thấy, CsLAR1 có tính bảo thủ ở các amino acid liên kết với cơ chất, trong khi vùng liên kết với NADP tất cả các mẫu công bố đều là S, còn mẫu chè Trung Du

xanh là C. Motif RFLP và THD có tính bảo thủ cao, trong khi motif ICCN của CsLAR1 từ chè Trung Du xanh có 1 vị trí amino acid khác biệt so với các trình tự còn lại I153T. Mặt khác, khi phân tích tiến hóa họ LAR ở thực vật nhóm nghiên cứu của Wang *et al.*, (2017) đã chỉ rằng LAR ở thực vật được chia làm 2 nhóm chính là: nhóm thực vật 2 lá mầm; thực vật 1 lá mầm và hạt trần. LAR ở thực vật 2 lá mầm lại được chia thành 2 phân lớp nhỏ dựa vào sự xuất hiện của amino acid S hoặc A ở vị trí thứ 8 của motif ICCN (Wang *et al.*, 2017). Motif ICCN CsLAR1 của chè Trung Du xanh có chứa S ở vị trí amino acid thứ 8 và có sự khác biệt lớn so với LAR ở thực vật là I trong ICCN được chuyển thành T. Như vậy, CsLAR1 từ chè Trung Du xanh có một số sự sai khác về trình tự amino acid đặc biệt so với CsLAR1

ở chè nói riêng và thực vật nói chung, những vị trí sai khác này xảy ra ở cả vùng domain chức năng và

motif bảo thủ nên có thể tạo sự khác biệt về chức năng của CsLAR1.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid suy diễn của CsANR2 từ giống chè Trung Du xanh với các trình tự đã công bố (◯) Trình tự amino acid thay đổi của CsANR2 với các trình tự công bố; Dấu (●) chỉ gốc amino của vùng giàu glycine; Dấu (●) chỉ gốc amino vùng liên kết cơ chất.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định và phân tích được trình tự gen *CsANR2* và *CsLAR1* từ giống chè Trung Du xanh. Gen *CsANR2* có kích thước 1.014 bp, trình tự amino acid suy diễn của *CsANR2* có độ tương đồng cao so với trình tự đã công bố trên GenBank (95.7–99.5%) và không có sự khác biệt trình tự amino acid ở các vùng quy định chức năng. Gen *CsLAR1* có kích thước 1.029 bp, tương đồng trình tự amino acid so với trình tự đã công bố dao động từ 88,3–100%. *CsLAR1* từ chè Trung Du xanh có sự khác biệt về trình tự amino acid ở motif ICCN và vùng quy định chức năng.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện tại Phòng Di truyền phân tử và tế bào, Khoa Công nghệ Sinh

học (Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên); Phòng Đa dạng sinh học hệ gen, Viện nghiên cứu hệ gen (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) với hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo: "Nghiên cứu tạo thư viện cDNA/EST, giải mã và phân tích sự biểu hiện các gen liên quan đến quá trình tổng hợp polyphenol ở chè trồng tại Thái Nguyên", mã số B2016-TNA-24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashihara H, Deng WW, Mullen W, Crozier A (2010) Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. *Phytochemistry* 71(5-6): 559–566.
- Bemis DL, Katz AE, Buttyan R (2006) Clinical trials of

- natural products as chemopreventive agents for prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 15(10): 1191–1200.
- Bordoni A, Hrelia S, Angeloni C, Giordano E, Guarnieri C, Caldarera CM, Biagi PL (2002) Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *J Nutr Biochem* 13(2): 103–111.
- Chen C, Wei K, Wang L, Ruan L, Li H, Zhou X, Lin Z, Shan R, Cheng H (2015) Expression of Key Structural Genes of the Phenylpropanoid Pathway Associated with Catechin Epimerization in Tea Cultivars. *Front Plant Sci* 8: 702.
- Đỗ Ngọc Quý, Lê Thất Khương (2000) *Giáo trình cây chè sản xuất chế biến và tiêu thụ*. Hà Nội: NXB Nông nghiệp.
- Gargouri M, Manigand C, Maugé C, Granier T, Langlois d'Estaintot B, Cala O, Pianet I, K. B, Chaudière J, Gallois B (2009) Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65 (9): 989–1000.
- Harbowy ME, Balentine DA (1997) Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16(5): 415–480.
- Jiang X, Liu Y, Li W, Zhao L, Meng F, Wang Y, Tan H, Yang H, Wei C, Wan X *et al.*, (2013) Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant (*Camellia sinensis*). *PLoS One* 8(4) e62315.
- Kao YH, Chang HH, Lee MJ, Chen CL (2006) Tea, obesity, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* 50(2) 188–210.
- Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK (2003) Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem* 51(7): 1864–1873.
- Liu M, Tian HL, Wu JH, Cang RR, Wang RX, Qi XH, Xu Q & Chen XH (2015) Relationship between gene expression and the accumulation of catechin during spring and autumn in tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Hortic Res* 2 15011.
- Lương Văn Vượng, Phạm Huy Thông, Lê Văn Đức, Lê Hồng Vân (2013) *Kỹ thuật sản xuất và chế biến chè xanh*. Hà Nội: NXB Nông nghiệp.
- Luximon-Ramma A, Neergheen VS, Bahorun T, Crozier A, Zbarsky V, Datla KP, Dexter DT, Aruoma OI (2006) Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: a potential contributor to their antioxidant functions. *Biofactors* 27(1–4): 79–91.
- Pang Y, Abeysinghe IS, He J, He X, Huhman D, Mewan KM, Sumner LW, Yun J, Dixon RA (2013) Functional characterization of proanthocyanidin pathway enzymes from tea and their application for metabolic engineering. *Plant Physiol* 161(3): 1103–1116.
- Punyasiri PA, Abeysinghe SB, Kumar V (2005) Preformed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infection. *J Chem Ecol* 31 (6): 1315–1324.
- Rani A, Singh K, Ahuja PS, Kumar S (2012) Molecular regulation of catechins biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Gene* 495(2): 205–210.
- Ravindranath MH, Saravanan TS, Monteclaro CC, Presser N, Ye X, Selvan SR, Brosman S (2006) Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. *Evid Based Complement Alternat Med* 3(2): 237–247.
- Rudy M (2008) Inactivation of polyphenol oxidase in *Camellia sinensis* for the production of high quality instant green tea. Pretoria, South Africa: University of Petoria.
- Sang S, Tian S, Wang H, Stark RE, Rosen RT, Yang CS, Ho CT (2003) Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins: radical reaction products of epicatechin with peroxyl radicals. *Bioorg Med Chem* 11(16): 3371–3378.
- Singh K, Rani A, Paul A, Dutt S, Joshi R, Gulati A, Ahuja PS, Kumar S (2009) Differential display mediated cloning of anthocyanidin reductase gene from tea (*Camellia sinensis*) and its relationship with the concentration of epicatechins. *Tree Physiol* 29(6): 837–846.
- Tanner GJ, Francki KT, Abrahams S, Watson JM, Larkin P, & Ashton AR (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J Biol Chem* 278(34): 31647–31656.
- Unal MU, Yabaci SN, Sener A (2011) Extraction, partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from tea leaf (*Camellia sinensis*). *GIDA* 36(3): 137-144.
- Wang P, Zhang L, Jiang X, Dai X, Xu L, Li T, Xing D, Li Y, Li M, Gao L *et al.*, (2017) Evolutionary and functional characterization of leucoanthocyanidin reductases from *Camellia sinensis*. *Planta*.
- Wang YC, Bachrach U (2002) The specific anti-cancer activity of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Amino Acids* 22(2): 131–143.
- Wang YS, Gao LP, Shan Y (2012) Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze). *Sci Hort* 141: 7–16.
- Wei K, Wang L, Zhang C, Wu L, Li H, Zhang F, Cheng H (2015) Transcriptome Analysis Reveals Key Flavonoid 3'-Hydroxylase and Flavonoid 3',5'-Hydroxylase Genes in Affecting the Ratio of Dihydroxylated to Trihydroxylated Catechins in *Camellia sinensis*. *PLoS One* 10(9) e0137925.
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126(2) 485–493.

- Wolfram S, Wang Y, Thielecke F (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 50(2): 176–187.
- Wu ZJ, Li XH, Liu ZW, Xu ZS, Zhuang J (2014) De novo assembly and transcriptome characterization: novel insights into catechins biosynthesis in *Camellia sinensis*. *BMC Plant Biol* 14: 277.
- Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299 (5605): 396–399.
- Xiong L, Li J, Li Y, Yuan L, Liu S, Huang J, Liu Z (2013) Dynamic changes in catechin levels and catechin biosynthesis-related gene expression in albino tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Plant Physiol Biochem* 71: 132–143.
- Yang TT, Koo MW (2000) Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 148(1): 67–73.
- Zhen YS, Chen ZM, Cheng SJ, Chen ML (2002) *Tea bioactivity and therapeutic potential*. London: Taylor & Francis.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENES ENCODING LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE AND ANTHOCYANIDIN REDUCTASE FROM THE GREEN TRUNG DU TEA IN THAI NGUYEN (*CAMELLIA SINENSIS*)

Hoang Thi Thu Yen¹, Duong Trung Thanh¹, Pham Thi Hang¹, Duong Trung Dung², Huynh Thi Thu Hue²

¹Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

³Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Catechins are major components of the flavonoid pathway in tea in which they are synthesized in four distinct ways under the direct catalysis of two enzymes, leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR). In this study, we conducted the cloning and sequence analysis of genes encoding ANR and LAR (namely, CsANR2 and CsLAR1) from the Green Trung Du cultivar. The length of CsANR2 gene is 1,014 bp, encoding 337 amino acids. Comparative analysis of the nucleotide sequences showed that there was limited difference between the CsANR2 gene in the green tea cultivar and the CsANR2 sequence published in Genbank, with nucleotide identity of 98.9–99.6%, and amino acid similarity of 95.7–99.5%. CsANR2 has two major functional regions, the N-terminal glycine-rich domain that functions in association with NAD or NADP (GGTGFVAA); the substrate-specific domain has amino acids involved in enzyme catalysis (S130, Y167 and K171). The results showed that the difference in nucleotide sequences does not lead to amino acid change in the important functional domains of CsANR2. The length of CsLAR1 gene is 1,029 bp, encoding 342 amino acids. The difference between CsLAR1 of green Trung Du tea and those published in GenBank ranged from 96.3–100% in nucleotide, and 88.3–100% in amino acid sequence. CsLAR1 contains 3 conserved amino acid motifs among species, RFLP, ICCN and THD. However, the ICCN motif of CsLAR1 from green Trung Du tea has a distinct amino acid from the published sequences (I153T). Analysis of the functional domains of CsLAR1 showed that CsLAR1 in tea was conserved in the amino acids linked to the substrate, and the N-terminal glycine-rich domain binding to NADP has a modified amino acid (GACGFIG). How these amino acid modifications affect CsANR2 and CsLAR1 enzymatic activities, that further research is needed to be conducted for clarification.

Keywords: *Anthocyanidin reductase, Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Gallocatechin, Leucoanthocyanidin reductase*