

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ VÀ ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN CỦA GEN MÃ HÓA ACETOACETYL-CoA THIOLASE (AACT) Ở SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Vũ Thị Trinh¹, Lưu Hàn Ly¹, Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2}, Lê Thị Thu Hiền^{1,2,✉}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hienlethu@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.01.2020

Ngày nhận đăng: 05.04.2020

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc chi Nhân sâm (*Panax* L.) là loài đặc hữu và nguồn gen đặc biệt quý hiếm của Việt Nam. Ginsenoside là một trong những thành phần chính quyết định giá trị quan trọng trong y dược của sâm Ngọc Linh và các loài khác thuộc chi Nhân sâm. Gen mã hóa acetoacetyl-CoA thiolase (AACT) ở sâm Ngọc Linh được xem là gen quan trọng tham gia vào con đường sinh tổng hợp ginsenoside. Trong nghiên cứu này, cDNA gen mã hóa AACT được phân lập từ sâm Ngọc Linh với vùng mang mã có kích thước 1224 bp, mã hóa cho 408 amino acid. Trình tự cDNA gen mã hóa AACT được công bố trên GenBank với mã số MZ272018, có sự tương đồng so với gen này ở loài *Panax notoginseng* KJ804173.1 là 99,08%. Tuy có một số điểm khác biệt trong trình tự cDNA gen mã hóa AACT ở sâm Ngọc Linh so với loài tham chiếu nhưng trình tự protein do gen mã hóa mang đầy đủ các đặc tính của AACT với các vị trí quan trọng liên quan tới hoạt tính protein đều được bảo toàn. Kết quả kiểm tra cấu trúc bậc I của protein trên InterPro cho thấy protein AACT ở sâm Ngọc Linh chứa ba vùng, bao gồm vùng thiolase-like (17-285), N-terminal (18-276) và C-terminal (286-406). Phân tích cây phát sinh chủng loại sử dụng trình tự gen mã hóa AACT cho thấy mối quan hệ loài gần gũi của *P. vietnamensis* với hai loài *P. notoginseng* và *Trachypemum ammi*. Mức độ biểu hiện khác nhau của gen mã hóa AACT ở mô lá và thân rễ tại các thời kỳ phát triển 1, 4, 6 và 11 năm tuổi của sâm Ngọc Linh đã được đánh giá sử dụng phương pháp real-time PCR. Gen mã hóa AACT được biểu hiện ở thân rễ mạnh hơn ở lá và mạnh nhất ở thân rễ sâm Ngọc Linh 11 năm tuổi. Kết quả thu được góp phần cung cấp thông tin về vai trò của yếu tố di truyền trong quá trình sinh tổng hợp ginsenoside ở sâm Ngọc Linh nói riêng và các loài thuộc chi Nhân sâm nói chung.

Từ khóa: Acetoacetyl-CoA thiolase, biểu hiện gen, chi Nhân sâm, sâm Ngọc Linh

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc chi Nhân sâm (*Panax* L.) là một trong những loài cây dược liệu quý hiếm và đặc hữu của Việt Nam, được sử dụng như thảo dược giúp phục hồi và tăng cường sức khỏe. Sâm Ngọc Linh lần đầu tiên được phát hiện ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum và đến năm 1985 được công bố là loài mới đối với

khoa học (Dung, Grushvitski, 1985). Do vùng phân bố hạn chế và việc khai thác quá mức đã khiến sâm Ngọc Linh trở nên rất hiếm trong tự nhiên.

Ginsenoside là saponin triterpenoid được tìm thấy ở các loài thuộc chi Nhân sâm (Zhang *et al.*, 2015). Ginsenoside đã được chứng minh là có nhiều tác dụng có lợi, bao gồm chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư và ngăn cản tế bào

chết theo chương trình (Briskin, 2000; Shibata, 2001; Christensen, 2009; He *et al.*, 2012). Cũng tương tự như các loại sâm khác, sâm Ngọc Linh là một nguồn giàu saponin với 37 saponin đã được phân lập (Kazuo *et al.*, 2000). Kết quả phân tích hàm lượng cho thấy, sâm Ngọc Linh bao gồm 04 hợp chất có hàm lượng lớn bao gồm: ginsenoside Rb1 (8,75%); ginsenoside Rd (12,37%); ginsenoside Rg1 (30,99%); majornoside R2 (13,72%) (Komatsu *et al.*, 2005). Nghiên cứu của Duc và đtg (1993) cho thấy *P. vietnamensis* chứa một loại dammarane quý hiếm - Majornoside R2 thuộc saponin ocotillol với hàm lượng cao hơn đáng kể so với *Panax japonicus*.

Vì các đặc tính và hoạt tính sinh học của sâm phụ thuộc phần lớn vào thành phần và hàm lượng ginsenoside, việc xác định trình tự các gen mã hóa cho các enzyme đặc hiệu tham gia trực tiếp vào quá trình tổng hợp khung của các ginsenoside là cơ sở để nghiên cứu chức năng của các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp ginsenoside. Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu về biểu hiện của các gen này.

Thiolase là các enzyme phổ biến tham gia vào nhiều quá trình sinh hóa thiết yếu. Các thiolase sinh tổng hợp, còn được gọi là acetoacetyl-CoA thiolase (AACT), xúc tác sự ngưng tụ của hai phân tử acetyl CoA để tạo thành acetoacetyl CoA (Ahumada *et al.*, 2008). Đây là enzyme đầu tiên, đóng vai trò quan trọng, tác động đến hoạt động của các gen tiếp sau của con đường sinh tổng hợp ginsenoside. Vì vậy, trong nghiên cứu này, cDNA gen mã hóa AACT ở sâm Ngọc Linh được phân lập, xác định trình tự, so sánh sự khác biệt với các loài khác trong cùng chi Nhân sâm. Bên cạnh đó, sự biểu hiện của gen ở các mô khác nhau, trong các giai đoạn phát triển của cây được đánh giá sử dụng phương pháp real-time PCR (qPCR). Từ đó, mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của gen mã hóa AACT ở các mô và các độ tuổi phát triển khác nhau của sâm Ngọc Linh đã được xác định. Nghiên cứu góp phần cung cấp cơ sở khoa học đánh giá vai trò của yếu tố di truyền đến sự sinh tổng hợp ginsenoside ở sâm Ngọc Linh nói riêng và các loài thuộc chi Nhân sâm nói chung.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu mô lá và thân rễ của cây sâm Ngọc Linh 1, 4, 6 và 11 năm tuổi được thu tại Trung tâm sâm Ngọc Linh huyện Nam Trà My thuộc tỉnh Quảng Nam, được định loại hình thái và xác định độ tuổi bởi PGS. TS. Nguyễn Tập (nguyên cán bộ Viện Dược liệu, Bộ Y tế), được định loại phân tử tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen. Các mẫu được bảo quản tươi cho đến khi về phòng thí nghiệm, sau đó được bảo quản lạnh trong -80°C và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

RNA tổng số được tách chiết từ mô lá và thân rễ của sâm Ngọc Linh sử dụng Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và chất lượng của RNA được xác định trên máy Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). RNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% để đánh giá tính toàn vẹn. RNA tổng số dùng làm khuôn để tổng hợp cDNA sử dụng SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Hoa Kỳ).

Thiết kế môi và nhân cDNA gen mã hóa AACT bằng phương pháp RT-PCR

Sử dụng các dữ liệu thu được từ Ngân hàng gen quốc tế - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), cặp môi phân lập cDNA gen mã hóa AACT được thiết kế sử dụng phần mềm Primer 3 kết hợp với công cụ thiết kế môi OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Trình tự cặp môi AACT_F /AACT_R được trình bày trên Bảng 1 và kích thước dự kiến của sản phẩm PCR là 1364 bp, bao gồm vùng mang mã và một phần vùng 5', 3' của gen.

PCR được tiến hành trong tổng thể tích 20 µL: 16,2 µL nước nuclease-free, 0,2 µL mỗi xuôi (10 µM), 0,2 µL mỗi ngược (10 µM), 0,3 µL dNTPs (2 mM), 2 µL reaction buffer 10X, 0,1 µL DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), 1 µL cDNA khuôn. PCR được thực

hiện với chương trình sau: 94°C, 3 min; 40 chu kỳ (94°C, 1 min; 59°C, 30 s; 72°C, 40 s); 72°C, 2 min. Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng E.Z.N.A Cycle Pure Kit (Omega, Hoa Kỳ) theo

hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR tinh sạch được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1,2% và đo nồng độ bằng máy Nanodrop phục vụ xác định trình tự.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
AACT	F GATACACTTCTCCCAGCTTCCG	1364
	R CTGGAGCAATGAAACTACCAAGT	
EF	F ATCGCATTAAAGAGAGCACTAGG	186
	R CATGGTCCAAAAATATCTCTCTACG	
qPCR_AACT	F CTATTTCAGAGCTTTGAGCGTGG	145
	R GCAGCATCGAACTTTCCTAGACC	

Xác định trình tự gen bằng phương pháp Sanger

Trình tự của các đoạn DNA được xác định trên máy xác định trình tự tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), sử dụng BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Thành phần của PCR xác định trình tự gồm: 3,2 pmol mồi, 200 ng sản phẩm PCR tinh sạch, BigDye, đệm tương ứng trong tổng thể tích 15 µL. Chu trình nhiệt trên máy luân nhiệt GenAmp® PCR System 9700 như sau: 96°C, 1 min; 25 chu kỳ (96°C, 10 s; 50°C, 5 s; 60°C, 4 min). Trình tự nucleotide của mỗi mẫu được xác định từ cả 2 chiều xuôi và ngược.

Phân tích, so sánh, đánh giá các vùng trình tự nhận được với các trình tự đã công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Kết quả xác định trình tự của các đoạn gen được đối chiếu và ghép nối với nhau theo hai chiều, đồng thời được so sánh với trình tự tương ứng của các loài có quan hệ gần gũi đã được công bố trên GenBank nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do đọc trình tự và phát hiện các đa hình nucleotide đơn. Việc phân tích trình tự được hỗ trợ bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit 7.0.9.0; DNAMAN 8.0. Điểm đẳng điện (pI) và trọng lượng phân tử của protein được tính toán sử dụng http://web.expasy.org/compute_pi/. Vùng

protein bảo thủ được phân tích bằng công cụ InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005). Khoảng cách giữa các trình tự khi so sánh theo cặp nucleotide (Pairwise distance) được xác định sử dụng phần mềm Mega 6.06. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Maximum-Likelihood và phân tích bootstrap với 1000 vòng lặp dựa trên cơ sở số liệu thu được.

Phương pháp real-time PCR đánh giá biểu hiện gen mã hóa acetoacetyl-CoA thiolase ở các mô và các giai đoạn phát triển khác nhau

Phản ứng real-time PCR được thực hiện sử dụng SYBR Green qRT PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) trong hệ thống Cyclor 96 (Roche, Hoa Kỳ). Trình tự các cặp mồi sử dụng: qPCR_AACT và EF (gen nội chuẩn mã hóa Elongation factor 1-gamma - EF 1-γ) được trình bày trên Bảng 1. Điều kiện phản ứng real-time PCR được thực hiện với chương trình sau: 95°C, 5 min; 35 chu kỳ (95°C, 15 s; 60°C, 10 s; 72°C, 10 s). Mỗi phản ứng được lặp lại 3 lần. Sản phẩm khuếch đại được phân tích nhiệt độ biến tính để kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng. Mức độ biểu hiện gen được định lượng thông qua giá trị $2^{-\Delta\Delta Ct}$ được công bố bởi Livak và Schmittgen (2001).

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn SD và

được xử lý theo các thuật toán thống kê Student *t*-test. Sự khác biệt có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

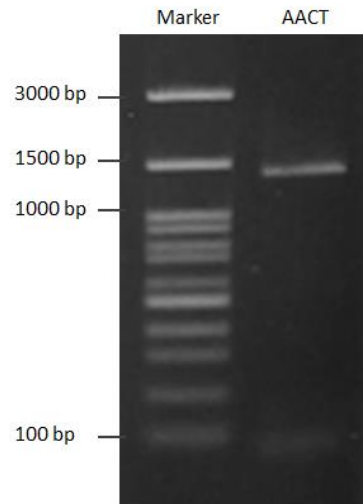
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và xác định trình tự cDNA gen mã hóa acetoacetyl-CoA thiolase sử dụng phương pháp RT-PCR

Các mẫu cDNA sâm Ngọc Linh và cặp môi khuếch đại AACT_F/AACT_R được sử dụng để nhân cDNA gen mã hóa AACT. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,2% được trình bày trên Hình 1. Sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước tương ứng với tính toán lý thuyết được tinh sạch và sử dụng cho thí nghiệm xác định trình tự gen.

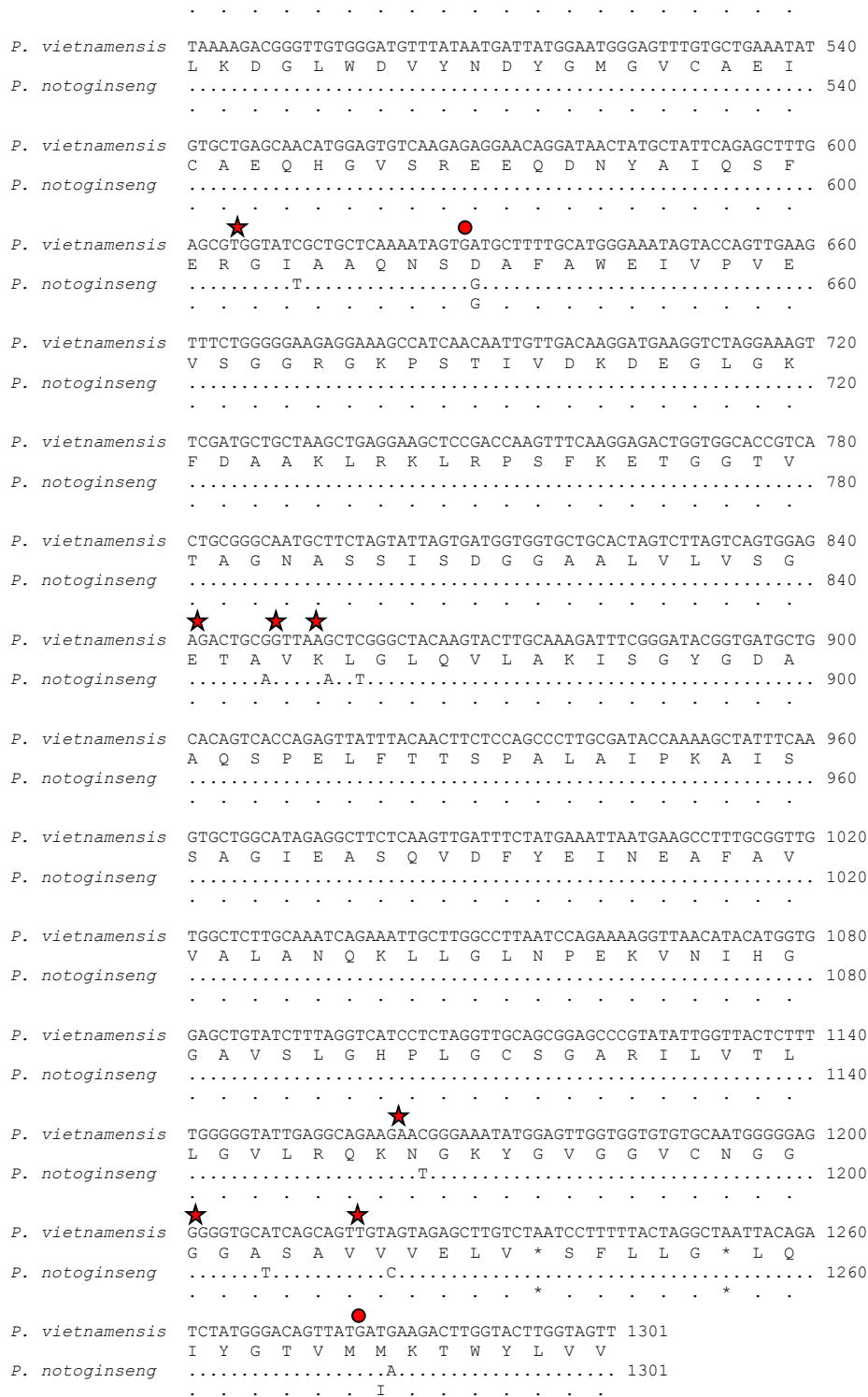
Kết quả xác định trình tự cho thấy sản phẩm PCR dài 1301 bp, trong đó vùng mang mã có kích thước 1224 bp (từ vị trí 9-1233), mã hóa cho protein chứa 408 amino acid với điểm đẳng điện 5,54 và trọng lượng phân tử được tính toán là 41,6 kDa. Trình tự cDNA gen mã hóa AACT được công bố trên GenBank với mã số MZ272018, khi so sánh với trình tự gen này ở loài *Panax notoginseng*

KJ804173.1 thì có sự tương đồng là 99,08%. Qua phân tích cho thấy, có bốn vị trí khác biệt trên trình tự amino acid (Hình 2).

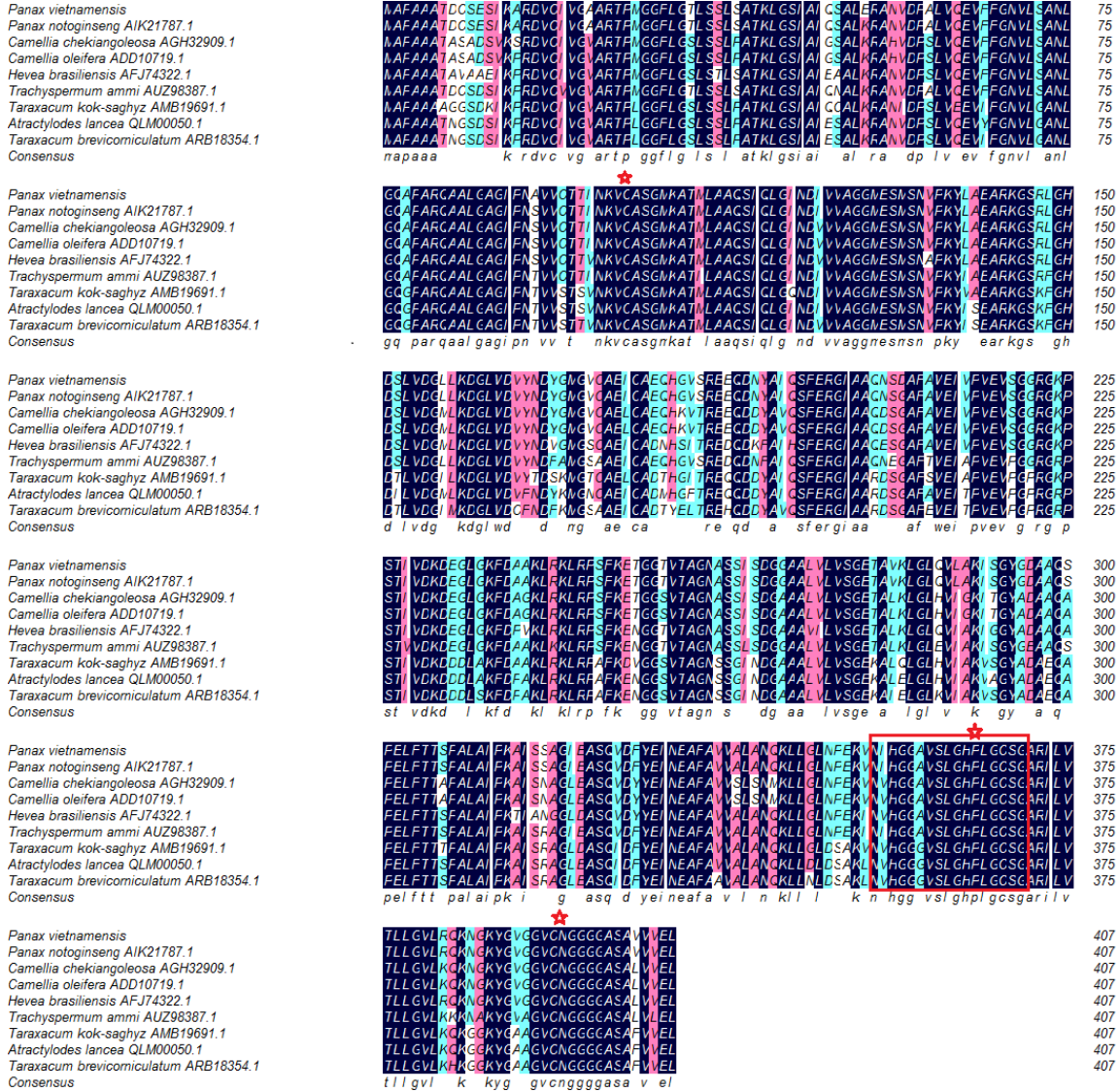


Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân cDNA gen mã hóa AACT trên gel agarose 1,2%. Marker 100 bp (Nippon Genetics, Nhật Bản)

<i>P. vietnamensis</i>	AGATCATCATGGCTCCTGCAGCAGCAACAGATTGTTTCAGAGTCCATCAAGGCTAGAGATG	60
	M A P A A A T D C S E S I K A R D	
<i>P. notoginseng</i>	60
<i>P. vietnamensis</i>	TTTGTATTGTTGGTGCCTGCACGTACACCAATGGGTGGCTTTCTTGGAACACTTTCATCAT	120
	V C I V G A A R T P M G G F L G T L S S	
<i>P. notoginseng</i>T.....	120
<i>P. vietnamensis</i>	TATCAGCTACCAAACTTGGATCCATAGCAATTCAAAGCGCTCTTGAAAGGGCAAATGTTG	180
	L S A T K L G S I A I Q S A L E R A N V	
<i>P. notoginseng</i>A.....	180
K.....	
<i>P. vietnamensis</i>	ATCCAGCACTAGTACAAGAGGTTTTCTTTGGAAATGTTCTCAGTGCAAATTTGGGTCAGG	240
	D P A L V Q E V F F G N V L S A N L G Q	
<i>P. notoginseng</i>	240
<i>P. vietnamensis</i>	CTCCTGCTAGACAAGCAGCATTAGGTGCAGGAATACCTAACGCGGTAGTCTGTACCACCA	300
	A P A R Q A A L G A G I P N A V V C T T	
<i>P. notoginseng</i>T.....	300
S.....	
<i>P. vietnamensis</i>	TTAACAAAGTTTGTGCATCAGGGATGAAAGCAACTATGCTAGCTGCACAAAGTATCCAGT	360
	I N K V C A S G M K A T M L A A Q S I Q	
<i>P. notoginseng</i>	360
<i>P. vietnamensis</i>	TGGGTATCAATGATATTGTTGTGGCTGGCGGCATGGAAGCATGTCTAATGTACCCAAAT	420
	L G I N D I V V A G G M E S M S N V P K	
<i>P. notoginseng</i>	420
<i>P. vietnamensis</i>	ACCTAGCAGAAGCAAGGAAGGGTCTCGTCTTGGACATGATTCTTGTGTGATGGACTGC	480
	Y L A E A R K G S R L G H D S L V D G L	
<i>P. notoginseng</i>	480



Hình 2. Kết quả so sánh trình tự cDNA gen mã hóa AACT và protein suy diễn của sâm Ngọc Linh và *P. notoginseng* KJ804173.1. ★, vị trí có sự khác biệt nucleotide nhưng không làm thay đổi amino acid. ●, vị trí có khác biệt nucleotide dẫn đến thay đổi amino acid.



Hình 3. Kết quả so sánh trình tự amino acid của protein AACT ở sâm Ngọc Linh với một số loài thực vật khác đã được công bố trên GenBank. Chú thích: Màu xanh lam đậm: độ tương đồng = 100%; màu hồng: 75% ≤ độ tương đồng < 100%; màu xanh nhạt: 50% ≤ độ tương đồng < 75%. Các vị trí hoạt động của amino acid được đánh dấu bằng hình sao. Vùng bảo thủ (NVHGGAVSIGHPIGCSG) được đánh dấu bằng khung màu đỏ.

Kết quả kiểm tra cấu trúc bậc I của protein trên InterPro cho thấy protein AACT ở sâm Ngọc Linh chứa ba vùng, bao gồm vùng thiolase-like (17-285), N-terminal (18-276) và C-terminal (286-406). Trình tự amino acid suy diễn của protein AACT ở sâm Ngọc Linh đã được so sánh với một số loài thực vật khác đã công bố trên GenBank. Kết quả so sánh sắp hàng cho thấy trình tự amino acid của AACT ở sâm Ngọc Linh

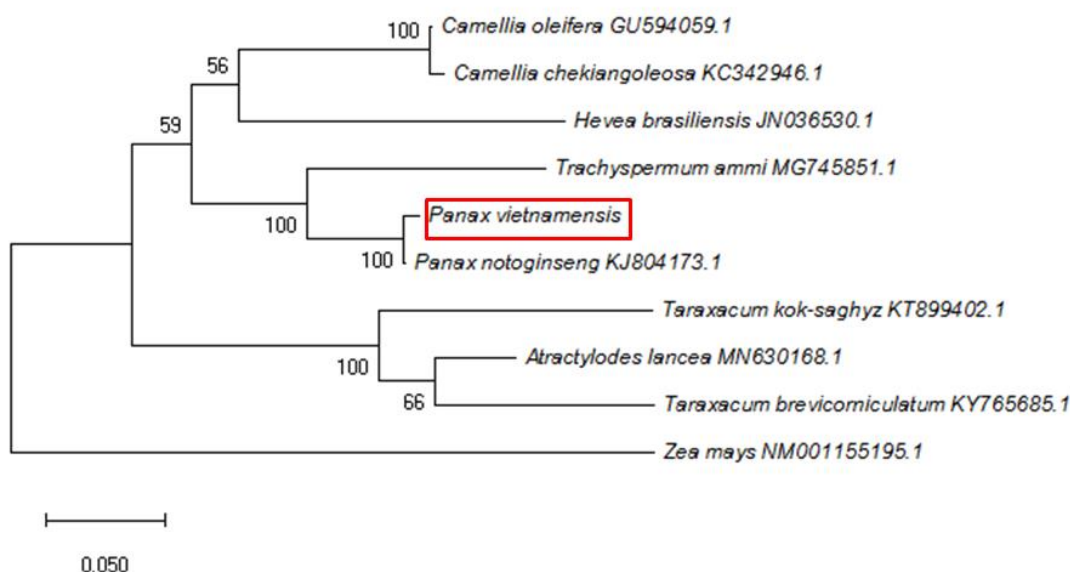
có độ tương đồng cao, từ 79,17 % đến 99,26 % so với trình tự các loài tham chiếu. Protein AACT thuộc họ protein thiolase, đặc trưng bởi vùng bảo thủ (NVHGGAVSIGHPIGCSG) ở đầu C (Yang *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2017). Các vị trí hoạt động và vùng bảo thủ đặc trưng đều được tìm thấy trong trình tự protein AACT của sâm Ngọc Linh (Hình 3) (Chen *et al.*, 2017). Như vậy, mặc dù có một số điểm khác biệt trong trình tự

nucleotide của cDNA gen mã hóa AACT của sâm Ngọc Linh so với loài tham chiếu nhưng trình tự protein vẫn mang đầy đủ các đặc tính của AACT với các vị trí quan trọng liên quan tới hoạt tính protein đều được bảo toàn.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng sử dụng phương pháp Maximum-Likelihood và

phân tích bootstrap với 1000 vòng lặp (Hình 4) dựa trên vùng cDNA gen mã hóa AACT của sâm Ngọc Linh đã được xác định và các trình tự gen tương ứng ở một số loài đã được công bố trên GenBank. Kết quả cho thấy, có sự tương đồng cao của *P. vietnamensis* với *P. notoginseng* KJ804173.1 và chúng có mối quan hệ di truyền gần với loài *Trachyspermum ammi* MG745851.1 cùng thuộc bộ Hoa tán Apiales với độ tin cậy cao.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự cDNA gen mã hóa AACT của sâm Ngọc Linh và các loài phân tích theo phương pháp Maximum-Likelihood.

Đánh giá mức độ biểu hiện của gen mã hóa acetoacetyl-CoA thiolase

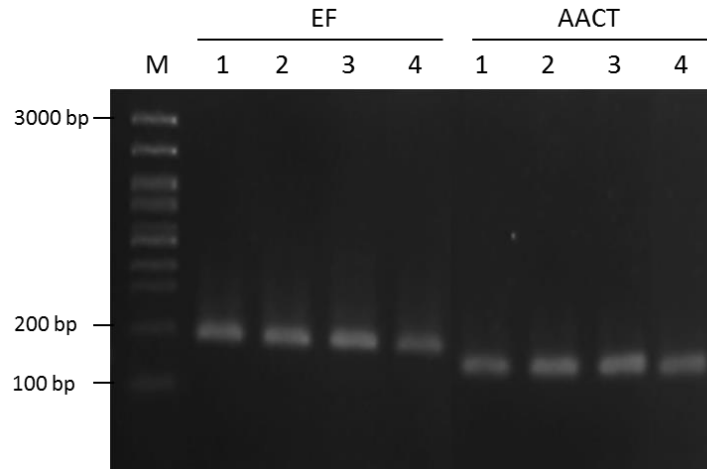
Với hai cặp mồi đã thiết kế cho phản ứng qPCR nhằm đánh giá sự biểu hiện của gen mã hóa AACT thông qua gen nội chuẩn mã hóa EF, chúng tôi đã thực hiện phản ứng khuếch đại đoạn ngắn

nằm trong hai gen trên. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2% (Hình 5) cho thấy các băng sáng, rõ nét và không xuất hiện băng phụ, chứng tỏ độ nhạy và tính đặc hiệu của real-time PCR với chất màu huỳnh quang SYBR Green. Như vậy, các cặp mồi thiết kế và sử dụng đã cho phép nhân bản đặc hiệu các đoạn gen quan tâm.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện của gen mã hóa AACT ở mô lá và thân rễ sâm Ngọc Linh tại 4 độ tuổi khác nhau.

Độ tuổi		1 năm tuổi	4 năm tuổi	6 năm tuổi	11 năm tuổi
Mô lá	Trung bình ± SD	0,047 ± 0,034	0,065 ± 0,079	0,162 ± 0,004	0,177 ± 0,042
Mô thân rễ	Trung bình ± SD	0,242 ± 0,040	0,274 ± 0,226	0,260 ± 0,053	0,982 ± 0,151

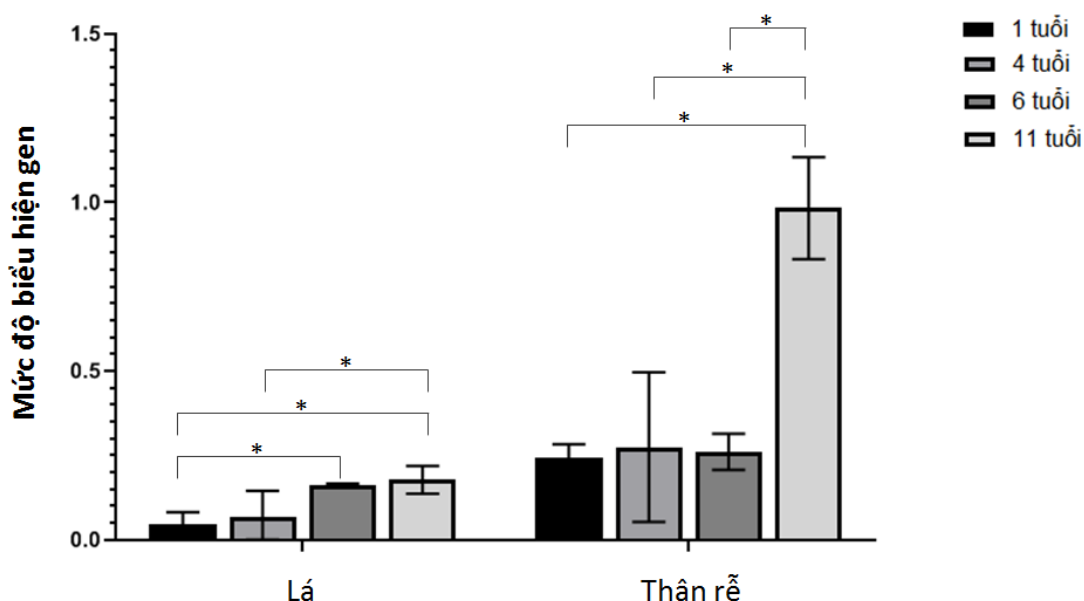
Các giá trị trung bình ± SD, n = 3 thí nghiệm độc lập.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm real-time PCR gen mã hóa AACT và EF trên gel agarose 2%. M marker 100 bp. 1, 2, 3, 4: Sản phẩm nhân gen tương ứng ở các mẫu lá 1, 4, 6, 11 năm tuổi.

Biểu hiện của gen mã hóa AACT ở mô lá và thân rễ của sâm Ngọc Linh tại các độ tuổi khác nhau được thống kê trên Hình 6. Kết quả phân tích cho thấy mức độ biểu hiện của gen mã hóa AACT ở thân rễ luôn cao hơn ở lá tại cả 4 độ tuổi (1, 4, 6 và 11 năm tuổi) ($p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố. Dựa vào hệ gen phiên mã của *P. notoginseng*, Liu và đtg (2015) đã phân tích và so sánh sự biểu hiện các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp ginsenoside ở lá, thân rễ và hoa. Kết quả cũng cho thấy gen mã hóa AACT có mức độ biểu hiện ở thân rễ cao hơn so với lá và hoa. Năm 2008, He và đtg nghiên cứu biểu hiện của gen mã hóa squalene epoxidase đóng vai trò quan trọng trong con đường tổng hợp ginsenoside ở *P. notoginseng* cũng đã chỉ ra độ tuổi của cây càng cao thì mức độ phiên mã của gen này càng tăng. Đối với gen mã hóa AACT ở sâm Ngọc Linh, mức biểu hiện ở lá tại bốn thời điểm khác nhau (1, 4, 6 và 11 năm tuổi) tăng dần theo các độ tuổi lần lượt là 0,047; 0,065; 0,162 và 0,177 (Bảng 2). Trong khi, ở thân rễ, giai đoạn 1, 4 và 6 năm tuổi, mức độ biểu hiện của gen không có sự khác biệt lớn, nhưng tăng mạnh ở thời điểm 11 năm tuổi với mức biểu hiện là 0,982, tăng gấp khoảng 3,8 lần so với cây 6 năm tuổi (mức biểu hiện là 0,26). Mức biểu hiện của gen mã hóa AACT ở thân rễ của sâm Ngọc Linh không tăng tuyến tính theo

độ tuổi. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy hàm lượng của terpenoids có tương quan thuận với sự biểu hiện của gen mã hóa AACT (Fang *et al.*, 2013). Việc tăng cường biểu hiện gen mã hóa AACT của cây *Arabidopsis thaliana* trong cây *Taraxacum brevicorniculatum* chuyển gen đã làm tăng nồng độ sterol lên gấp 5 lần so với cây không chuyển gen (Pütter *et al.*, 2017). Gần đây, Meiyun và đtg (2021) đã kiểm tra mức độ phiên mã của gen mã hóa AACT trong rễ, chồi và lá của cây đàn hương trắng *Santalum album* sau khi xử lý với 100 μ M methyl jasmonate. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của gen đều tăng dần và đạt đỉnh sau 24 giờ so với cây đối chứng không được xử lý (Niu *et al.*, 2021). Ngoài tham gia sinh tổng hợp các hợp chất terpenoid, protein AACT còn liên quan đến thích ứng với các điều kiện bất lợi phi sinh học ở thực vật (Soto *et al.*, 2011). Đánh giá biểu hiện thiolase II ở cỏ linh lăng cho thấy biểu hiện của gen *MsAACT1* tăng lên ở cả lá và rễ sau 5 giờ xử lý với nhiệt độ thấp (4°C) hoặc mặn (100mM NaCl) (Soto *et al.*, 2011). Những nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và chức năng của gen mã hóa AACT nói riêng và các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp ginsenoside chung sẽ góp phần làm rõ hơn vai trò quan trọng của các gen này đối với sự sinh tổng hợp các hoạt chất đặc biệt có giá trị ở sâm Ngọc Linh.



Hình 6. Sự biểu hiện gen mã hóa AACT ở lá và thân rễ sâm Ngọc Linh tại 4 độ tuổi. Dấu hoa thị chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo kiểm định t-test.

KẾT LUẬN

Vùng cDNA gen mã hóa acetoacetyl-CoA thiolase liên quan đến con đường sinh tổng hợp ginsenoside ở sâm Ngọc Linh đã được phân lập và xác định trình tự. Kích thước của vùng gen nghiên cứu dài 1301 bp, trong đó vùng mã hóa cho protein AACT ở vị trí 9-1233, mã hóa cho 408 amino acid. Kết quả so sánh dựa trên trình tự cDNA gen mã hóa AACT cho thấy mối quan hệ tiến hóa giữa *P. vietnamensis* với *P. notoginseng* và quan hệ với loài *T. ammi*, khác chi và cùng thuộc bộ Hoa tán Apiales. Kết quả phân tích biểu hiện của gen cho thấy gen được biểu hiện ở các mức độ khác nhau tùy loại mô (lá, thân rễ) và ở các thời kỳ phát triển khác nhau (1, 4, 6 và 11 năm tuổi). Mức độ biểu hiện tăng dần theo các độ tuổi ở mô lá và tăng mạnh ở mô thân rễ tại thời điểm 11 năm tuổi. Đây là nghiên cứu đầu tiên về gen mã hóa AACT ở sâm Ngọc Linh, góp phần cung cấp cơ sở khoa học đánh giá vai trò của yếu tố di truyền đến sự sinh tổng hợp ginsenoside ở sâm Ngọc Linh nói riêng và các loài thuộc chi Nhân sâm nói chung.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện trong

khuôn khổ đề tài: “Giải trình tự và phân tích hệ gen phiên mã (transcriptome) ở sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)”, mã số: 16/17-HĐ-NVQG. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn ông Trịnh Minh Quý và các cán bộ Trung tâm sâm Ngọc Linh huyện Nam Trà My đã cung cấp mẫu và PGS. TS. Nguyễn Văn Tập đã hỗ trợ định loại hình thái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahumada I, Cairó A, Hemmerlin A, González V, Pateraki I, Bach TJ, Boronat A (2008) Characterisation of the gene family encoding acetoacetyl-CoA thiolase in *Arabidopsis*. *Funct Plant Biol* 35(11): 1100-1111.
- Briskin DP (2000) Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol* 124: 507-514.
- Chen Q, Yan J, Meng X, Xu F, Zhang W, Liao Y, Qu J (2017) Molecular cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase and mevalonate kinase genes involved in terpene trilactone biosynthesis from *Ginkgo biloba*. *Molecules* 22(1): 74.
- Christensen LP (2009) Ginsenosides: Chemistry,

- biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 55: 1-99.
- Duc NM, Nham NT, Kasai R, Ito A, Yamasaki K, Tanaka O (1993): Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. *Chem Pharm Bull* 41: 2010-2014.
- Dung HT, Grushvitski IV (1985) A new species of the genus *Panax* (Araliaceae) from Vietnam. *Bot Z ISSB*: 0006-8136.
- Fang X, Shi L, Ren A, Jiang AL, Wu FL, Zhao MW (2013) The cloning, characterization and functional analysis of a gene encoding an acetyl-CoA acetyltransferase involved in triterpene biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Mycoscience* 54(2): 100-105.
- He DT, Wang B, Chen JM (2012) Research progress on pharmacological effects of ginsenosides. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* 14: 118-121.
- He F, Zhu Y, He M, Zhang Y (2008) Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notoginseng*. *DNA Seq* 19(3): 270-273.
- Kazuo Y (2000) Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*. *Pharm Biol* 38: 16-24.
- Liu MH, Yang BR, Cheung WF, Yang KY, Zhou HF, Kwok JSL, Liu GC, Li XF, Zhong S, Lee SMY, Tsui SKW (2015) Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis. *BMC Genomics* 16: 265.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Meiyun N, Haifeng Y, Yuping X, Yueya Z, Xinhua Z, Yuan L, Jaime A, Teixeira da S, Guohua M (2021) Cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase genes in *Santalum album*. *Sci Rep* 11: 1082.
- Niu M, Yan H, Xiong Y, Zhang Y, Zhang X, Li Y, Ma G (2021) Cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase genes in *Santalum album*. *Sci Rep* 11(1): 1-13.
- Pütter KM, van Deenen N, Unland K, Prüfer D, Gronover CS (2017) Isoprenoid biosynthesis in dandelion latex is enhanced by the overexpression of three key enzymes involved in the mevalonate pathway. *BMC Plant Biol* 17(1): 1-13.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33: 116-120.
- Shibata S (2001) Chemistry and tumor preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci* 16: 28-37.
- Soto G, Stritzler M, Lisi C, Alleva K, Pagano ME, Ardila F, Ayub ND (2011) Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation. *J Exp Bot* 62(15): 5699-5711.
- Yang SY, Yang XY, Healy-Louie G, Schulz H, Elzinga M (1990) Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon. *J Biol Chem* 265(18): 10424-10429.
- Zhang GH, Ma CH, Zhang JJ, Chen JW, Tang QY, He MH, Yang SC (2015) Transcriptome analysis of *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* discovers putative ocotillol-type ginsenosides biosynthesis genes and genetic markers. *BMC Genomics* 16(1): 1-20.

ISOLATION, SEQUENCING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING ACETOACETYL-CoA THIOLASE FROM *PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.

Vu Thi Trinh¹, Luu Han Ly¹, Huynh Thi Thu Hue^{1,2}, Le Thi Thu Hien^{1,2}

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Panax vietnamensis Ha et Grushv., naturally distributed in Ngoc Linh Mountain, is an endemic

Panax species of Vietnam. For centuries, *P. vietnamensis* has been used in traditional folk medicine to treat many serious diseases or enhance physical strength. Ginsenosides are responsible for most of the medicinal effects of the *Panax* species. Acetoacetyl-CoA thiolase (AACT) is considered as an important enzyme involved in the biosynthesis of ginsenoside. In this study, a full-length cDNA of the gene encoding AACT protein (GeneBank accession number MZ272018) was obtained from *P. vietnamensis* using reverse transcription PCR. The gene open reading frame (1224 bp) encodes 408 amino acids. This cDNA sequence is 99.08% similar to the cDNA sequence of *Panax notoginseng* (KJ804173.1). The functional analysis of its protein by InterPro showed that the structure of AACT monomer consists of three domains, including thiolase-like domain (17-285), N-terminal (18-276), and C-terminal (286-406). Although there were some differences in the nucleotide sequence of the AACT cDNA gene between *P. vietnamensis* and the reference species, all important domains and sites related to the thiolase activity were observed. Phylogenetic analysis using AACT cDNA gene sequence revealed a close relationship of *P. vietnamensis* with *P. notoginseng* and *Trachypemum ammi*. The quantitative real-time PCR results indicated the expression of AACT gene of *P. vietnamensis* depended on types of tissue and plant developmental stages (1, 4, 6 and 11 years old). The gene was expressed at higher levels in roots than in leaves and the highest expression of AACT gene was detected in the 11-year-old roots. The results provided valuable information for further studies on the biosynthesis of ginsenoside in *P. vietnamensis* in particular and *Panax* species in general.

Keywords: *Acetoacetyl-CoA thiolase, gene expression, Panax genus, Panax vietnamensis* Ha et Grushv.