

Tạo dòng và phân tích trình tự gen mã hóa flavonol synthase từ chè Trung Du Thái Nguyên

Hoàng Thị Thu Yến^{1,*}, Mai Thị Huyền Trang¹,
Phạm Thị Hằng², Huỳnh Thị Thu Huệ²

¹*Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, Tân Thịnh, Thái Nguyên, Việt Nam*

²*Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội*

Nhận ngày 23 tháng 5 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 19 tháng 10 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và phân tích trình tự gen mã hóa Flavonol synthase (FLS) từ 2 giống chè Trung Du xanh và tím. Gen *FLS* thu được có chiều dài 996 bp, mã hóa 331 amino acid. Kết quả so sánh trình nucleotide cho thấy gen *FLS* ở giống chè Trung Du tím và xanh có tổng số 13 nucleotide sai khác so với trình tự *FLS* công bố trên Genbank. Sự khác biệt trình tự nucleotide dẫn đến sự biến đổi trình tự amino acid ở một số motif chức năng quan trọng của FLS như motif đặc trưng cho siêu họ 2OG-Fe(II) oxygenase, motif PxxxIRxxx-EQP ở đầu N quyết định đến hoạt tính của FLS, motif CPQ/RPXLAL (205→212) là vị trí bám của 2-oxoglutarate. Các biến đổi về trình tự amino acid có ảnh hưởng đến hoạt tính của FLS như thế nào cần phải có những nghiên cứu sâu hơn. Gen *FLS* phân lập được là nguyên liệu phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm làm sáng tỏ chức năng của enzyme này.

Từ khóa: Chè Trung Du, chè Trung Du xanh, chè Trung Du tím, Flavonol, Flavonol synthase, polyphenol.

1. Mở đầu

Chè là một trong những đồ uống được tiêu thụ rộng rãi nhất trên thế giới không chỉ bởi hương vị độc đáo của nó, mà còn do nước chè rất có lợi cho sức khỏe. Uống chè chống được lạnh, khắc phục được sự mệt mỏi của cơ bắp và hệ thần kinh trung ương, kích thích vỏ đại não làm cho tinh thần minh mẫn sáng khoái, hưng phấn trong những thời gian lao động căng thẳng cả về trí óc và chân tay, ngăn chặn sự phát triển và tiến triển của bệnh Alzheimer [1], làm giảm khả

năng hình thành sỏi thận [2]. Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng, chè cũng là một loại thuốc, một cây cho kháng sinh tốt mà không độc đối với cơ thể con người, chữa được một số bệnh đường ruột như kiết lỵ, tiêu chảy, lợi tiểu...[3]. Hơn nữa, uống chè còn kích thích tiêu hoá mỡ, chống béo phì [4]; chống viêm [5]; chống sâu răng, hôi miệng và ung thư vòm họng [6]; phòng ngừa ung thư [7, 8]; phòng ngừa bệnh tăng huyết áp [9]; tiểu đường [10] và ngăn ngừa cholesterol tăng cao [11]. Ngoài ra, chè còn có khả năng bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím [12]. Chè cũng được cho là ức chế sự xâm nhiễm và sinh sản của HIV [13]. Hầu hết các đặc tính có lợi cho sức khỏe được liệt kê ở trên đã được chứng minh là do các hợp chất

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-982752153.

Email: yenhtt@tnus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4474>

polyphenol có trong chè. Đến nay có hơn 300 loại sản phẩm được sản xuất từ búp chè bằng các quy trình chế biến khác nhau và được chia thành ba loại chính đó là: chè xanh (không lên men), chè Olong (lên men một phần), và chè đen (lên men hoàn toàn)...[14, 15]. Theo đánh giá của Unal và dtg (2011), khoảng 2,5 triệu tấn chè khô được sản xuất mỗi năm, trong đó chè đen chiếm khoảng 78%, chè xanh chiếm 20% và chè Olong 2% [16]. 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 [17]. Hầu hết các đặc tính có lợi cho sức khỏe được liệt kê ở trên đã được chứng minh là do các hợp chất polyphenol có trong chè.

Chất lượng sản phẩm chè được đánh giá chủ yếu dựa trên cơ sở nghiên cứu thành phần hóa học có trong chè. Nước là thành phần chủ yếu trong búp chè, chiếm 75-80%... [18]. Theo thống kê của Harbowy (1997), thành phần hóa học chính trong chất rắn chiết xuất từ chè là polyphenol, chiếm 30-40% trọng lượng. Hàm lượng polyphenol quyết định đến màu sắc, độ chất của nước chè và góp phần tạo hương vị của chè. Có rất nhiều các hợp chất polyphenol được tìm thấy ở chè, tùy vào loại sản phẩm chè mà thành phần hóa học của polyphenol khác nhau, các polyphenol phức tạp được tạo ra trong quá trình sản xuất từ sự trùng hợp của các polyphenol đơn giản. Ở chè chứa cả polyphenol đơn giản và phức tạp, trong đó Flavonoid là thành phần polyphenol chủ yếu, được tổng hợp từ các polyphenol đơn giản [15]. Các flavonoid được chứng minh là có nhiều lợi ích cho sức khỏe con người như chống oxy hóa, kháng viêm và các hoạt tính kháng chất gây ung thư [19, 20]. Flavonoid có 4 loại chính: Flavonol, catechin, anthocyanin và flavone. Trong đó, catechin và flavonol chiếm hàm lượng lớn ở chè xanh [15]. Flavonol có lợi cho một số bệnh mãn tính ở người [21], hàm lượng flavonol có ở chè xanh nhiều hơn so với cà chua và rượu vang đỏ [22]. Flavonol synthase (FLS) là dioxygenase chuyển hóa các dihydroflavonol thành flavonol, enzyme này lần đầu tiên được nghiên cứu ở mùi tây, hoạt tính đầy đủ của FLS cần có sự tương tác với 2-oxoglutarate và Fe

(II) [23]. Sau đó, cDNA FLS đã được tách dòng từ cây thuốc lá cảnh (petunia), cây cam ngọt (*Citrus unshiu*) và cây cải (*Arabidopsis thailiana*) [24-26]. Gen mã hóa cho FLS tham gia tổng hợp flavonols ở chè đã được nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện ở *E.coli* [27]. Tuy nhiên, mối liên quan giữa sự biểu hiện của gen này với hàm lượng flavonol ở chè vẫn chưa được sáng tỏ.

Giống chè Trung du gồm Trung du búp xanh và Trung du búp tím (Trung du xanh và Trung du tím), từ lâu đã được coi là khởi thủy của cây chè Việt Nam. Chè Trung du được biết đến có vị thơm, ngọt hậu, 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 [28, 29]. Đã có nhiều công trình nghiên cứu cải tạo, bảo tồn và phát triển giống chè Trung du, đặc biệt là giống chè Trung du tím được cho là chè đặc sản, quý hiếm, có khả năng chữa bệnh rất cao [30-32]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu tạo dòng và phân tích trình tự gen mã hóa FLS từ hai giống chè Trung Du xanh và tím của Việt Nam làm cơ sở để nghiên cứu biểu hiện và chức năng của FLS đối với sức khỏe con người.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Lá từ giống chè Trung Du xanh và tím 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.

2.2. Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách chiết từ hai 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 FLS

Cặp môi được thiết kế để khuếch đại gen mã hóa FLS dựa trên trình tự gen đã được đăng ký trên Genbank với mã số EF205150 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 *Bam*HI vào đầu 5' mỗi xuôi (F₃₃₁: 5'-GGATCCATGGAGGTAGAGAG-3') và *Xho*I vào đầu 5' mỗi ngược (R₃₃₁: 5'-GGAGCTCTTGTGGAATCTTATTG-3').

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

Tách dòng gen

Sản phẩm khuếch đại gen mã hóa FLS 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 *Bgl*II.

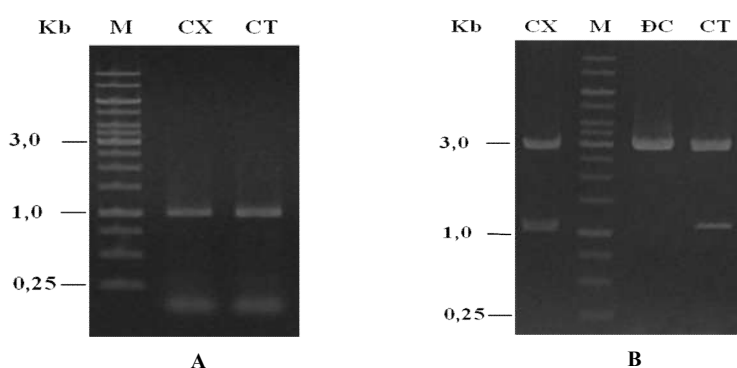
Xác định và phân tích trình tự gen

Trình tự nucleotide của gen *FLS* 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).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo dòng gen *FLS*

Gen mã hóa FLS được khuếch đại sử dụng khuôn cDNA tổng từ RNA tổng số của 2 mẫu chè Trung Du xanh và tím với cặp môi dựa trên trình tự gen *FLS* đã công bố [27]. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra, kết quả thu được thể hiện trên hình 1A.



Hình 1. Tách dòng gen *FLS*.

Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại gen *FLS* (M: Marker DNA 1 kb (Thermo Scientific) CX và CT: sản phẩm PCR khuếch đại gen *FLS* tương ứng từ giống Trung Du xanh và tím; B. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR trong DNA plasmid (Marker 1kb, ĐC: vector pJET1.2, CX và CT: dòng plasmid mang sản phẩm PCR tương ứng với giống chè Trung Du xanh và tím được phân tích bằng enzyme *Bgl*II).

Kết quả ở hình 1A cho thấy, sản phẩm PCR ở cả 2 mẫu nghiên cứu 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 [27]. Sau khi sản phẩm PCR gen *FLS* ghép nối vào vector tách dòng pJET1.2, plasmid tách chiết được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn. Kết quả thể hiện trên hình 1B cho thấy, 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. Như vậy, chúng

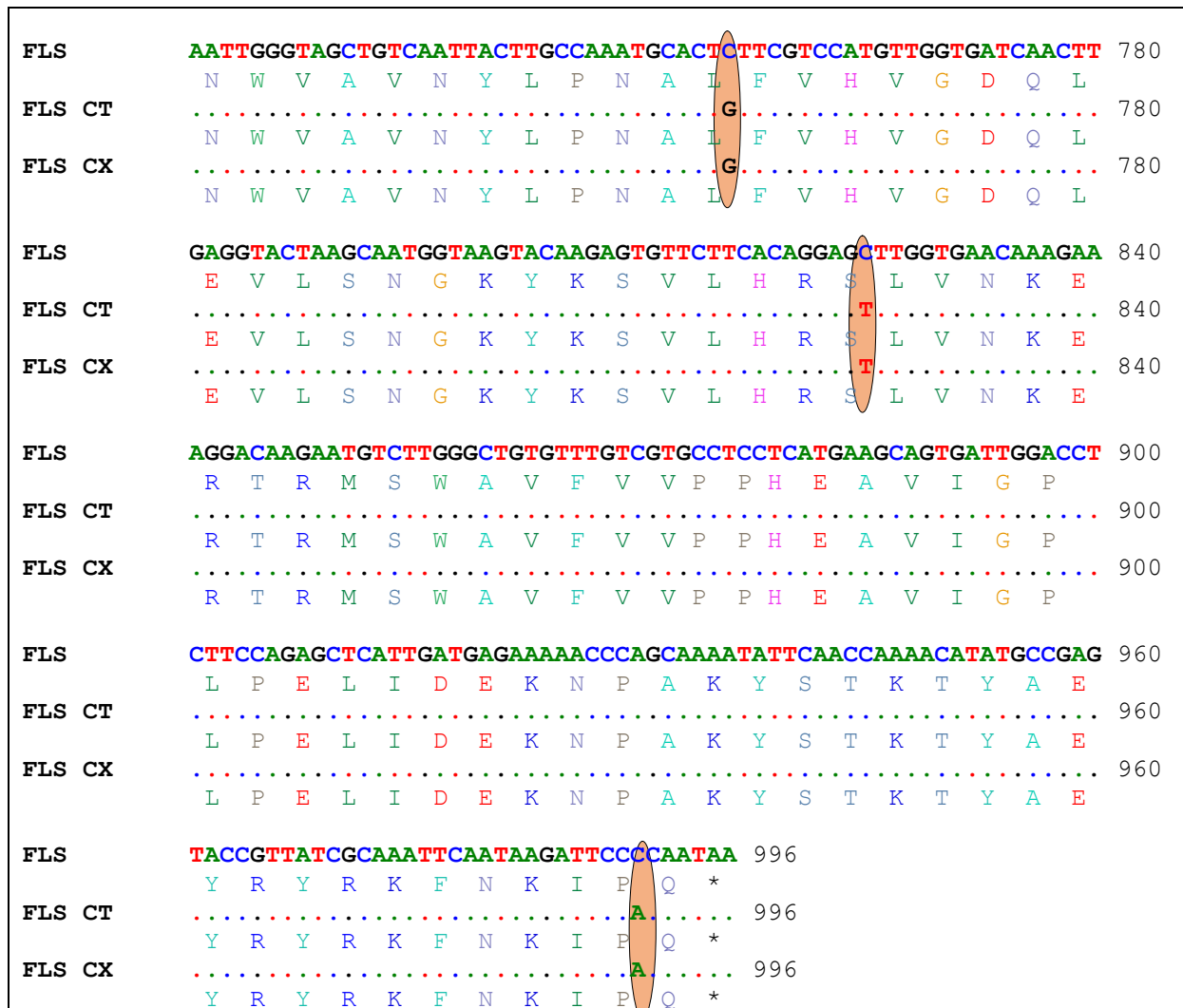
tôi đã tách dòng được sản phẩm PCR khuếch đại gen *FLS* trong vector pJET1.2.

3.2. Xác định và phân tích trình tự gen *FLS*

Tiếp theo, chúng tôi xác định trình tự gen *FLS* gắn trong vector pJET 1.2, phân tích trình tự đã khẳng định được chắc chắn rằng đoạn cDNA phân lập được là trình tự ORF hoàn chỉnh mã hóa FLS. Trình tự gen *FLS* có kích thước 996 bp, mã hóa 331 amino acid và mã kết thúc là TAA. Khi so sánh trình tự gen *FLS* từ 2 mẫu nghiên cứu với trình tự đã đăng ký trên GenBank (EF205150) chúng tôi thấy có sự sai khác 13 vị trí nucleotide (Hình 2).

FLS	ATGGAGGTAGAGAGAGTCAAGCCCTGTCCCATGTAACCTCCATGAGCTCCCTGTAAAA	60
FLS CTC.....	60
FLS CXC.....	60
FLS	TTTATCCGACCGTCCACGAGCAACCGGAGAACAGCAAGGCTATCGAAGGTGTACCGTTC	120
FLS CTC.....	120
FLS CX	120
FLS	CCCGTGATCTCCCTCTCTCAACCACACGATGTGGTGGTTCGATGCATTATCAAAGGCTTGT	180
FLS CTG.....	180
FLS CX	180
FLS	AGTGAATGGGGATTTTTCTTCATCACGGATCACGGTGTTCGAGCCCTCGTTGATCGGACGG	240
FLS CT	240
FLS CX	240
FLS	CTAAAAGAGGTTGGGGAGGAGTTCTTTAAGCTCCCAACAGGAGGAGAAAGAGAGCTATGCA	300
FLS CTA.....	300
FLS CX	300

	L K E V G E E F F K L P Q E E K E S Y A	
FLS	AATGATCCTTCAAGTGGGAGTTTTGAAGGGTATGGAACAAAGATGACTAAAAATTTTGAT	360
FLS CT	N D P S S G S F E G Y G T K M T K N F D	360
FLS CX	N D P S S G S F E G Y G T K M T K N F D	360
FLS	GAGAAAGTTGAGTGGATTGATTATTATTTTCACGTCATGCACCCCTCCTAAGAAGCTCAAT	420
FLS CT	E K V E W I D Y Y F H V M H P P K K L N	420
FLS CX	E K V E W I D Y Y F H V M H P P K K L N	420
FLS	CTTGACATGTGGCCTAAGAACCCTTCTTCATACAGGGGAGTGACAGAGGAATACAATGTG	480
FLS CT	L D M W P K N P S S Y R G V T E E Y N V	480
FLS CX	L D M W P K N P S S Y R G V T E E Y N V	480
FLS	GAAATAATCAGAACAACCAACAAGTTATTTGAACTTCTCTCAGAGGGACTAGGTTTGGAT	540
FLS CT	E I M R T T N K L F E L L S E G L G L D	540
FLS CX	E I L R T T N K L L E L L S E G L G L D	540
FLS	GGGAAGGTTTTGAATTCCTTCTTTGGGTGGTGATGAAATTGAATTTGAAATGAAAATCAAC	600
FLS CT	G K V L N S S L G G D E I E F E M K I N	600
FLS CX	G K V L N S S L G G D E I E F E M K I N	600
FLS	ATGTACCACCATGCCACAACCTCAGCTCGCCCTCGGAGTTGAACCTCACACTGACATG	660
FLS CT	M Y P P C P Q P Q L A L G V E P H T D M	660
FLS CX	M Y P P C P Q P Q L A L G V E P H T D M	660
FLS	TCTGCTCTCACTTTACTTGTCCCAATGACGTTCCGGTCTTCAAGTTTGGAAAGACGGT	720
FLS CT	S A L T L L V P N D V F G L Q V W K D G	720
FLS CX	S A L T L L V P N D V P G L Q V W K D G	720



Hình 2. Kết quả phân tích trình tự gen *FLS* phân lập từ mẫu chè Trung Du xanh và tím.

FLS: Trình tự gen *FLS* từ chè được công bố trên Genbank với mã số EF205150; *FLS CT*: trình tự gen *FLS* phân lập từ mẫu chè Trung Du tím; *FLS CX*: trình tự gen *FLS* phân lập từ mẫu chè Trung Du xanh; Trình tự nucleotide thay đổi làm thay đổi trình tự amino acid (●); Trình tự nucleotide thay đổi không làm thay đổi trình tự amino acid (○)

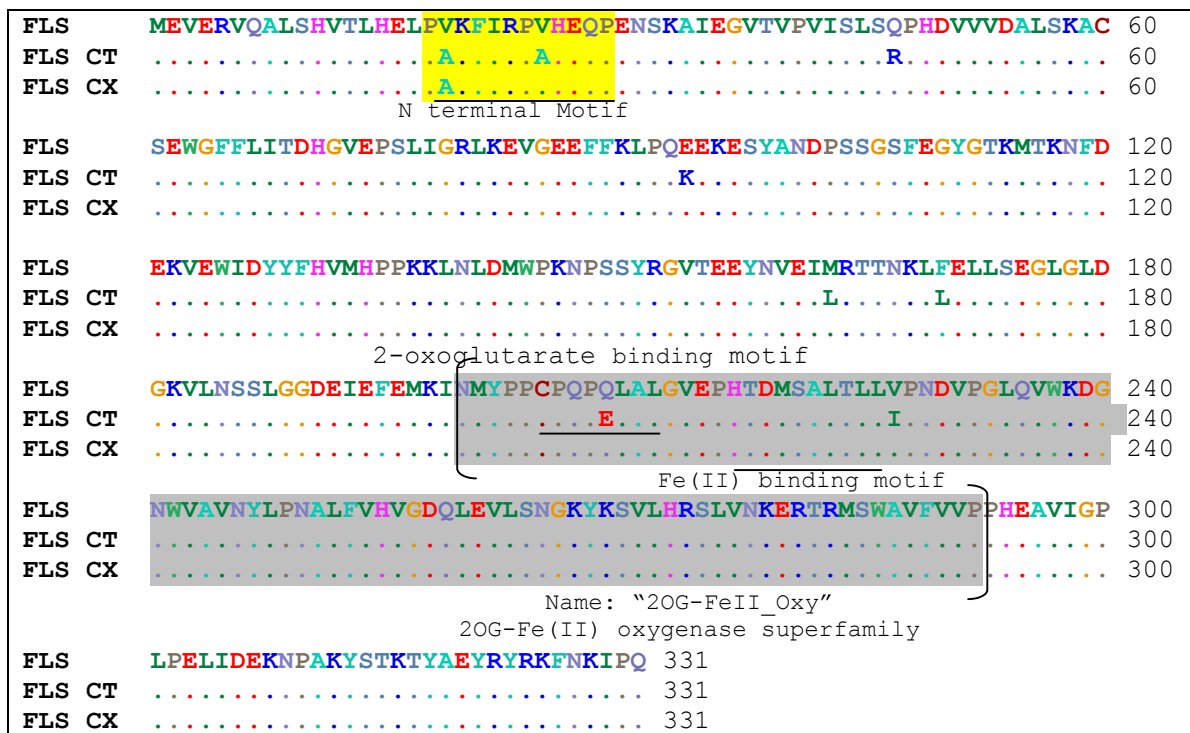
Trong đó, gen *FLS* từ mẫu chè Trung Du xanh có 5 vị trí sai khác với hệ số tương đồng di truyền là 99,5%, mẫu chè Trung Du tím có 13 vị trí sai khác với hệ số tương đồng di truyền là 98,7% so với trình tự công bố. Gen *FLS* ở 2 mẫu chè nghiên cứu có sự sai khác ở 10 vị trí nucleotide, tương đồng 99%. Đặc biệt ở vị trí nucleotide 57, 756, 825 và 990, gen *FLS* ở cả hai mẫu chè nghiên cứu tương ứng là C, G, T

và A trong khi trình tự gen *FLS* công bố tương ứng là A, C, C và C.

Sự sai khác trình tự nucleotide của gen *FLS* từ mẫu chè Trung Du tím với trình tự công bố dẫn đến sự sai khác trình tự amino acid ở 8 vị trí, với hệ số tương đồng là 97,6%. Trong khi đó, trình tự amino acid của *FLS* ở chè Trung Du xanh khác với trình tự *FLS* công bố chỉ ở 1 vị

trí (19V→A) (Hình 2 và 3), với hệ số tương đồng là 99,7%. Amino acid của FLS của 2 mẫu chè nghiên cứu có sự sai khác ở 7 vị trí (97,9%). Từ kết quả so sánh, chúng tôi cho rằng trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của FLS từ chè Trung Du tím và chè Trung Du xanh có độ tương đồng cao với các mẫu đã công bố trên Genbank. FLS là một dioxygenase và thuộc siêu họ 2OG-Fe(II) oxygenase. Enzyme này thực hiện chức năng chuyển hóa dihydroflavonol tạo flavonol thông qua domain đặc trưng cho siêu họ 2OG-Fe(II) oxygenase (hình 3 phần nền xám), domain này có cấu trúc bảo thủ bao gồm 95 amino acid (từ vị trí 199→291) [23, 27]. Ở domain này, mẫu chè Trung Du xanh không có sự sai khác so với trình tự công bố, mẫu chè Trung Du tím có 2 vị trí amino acid sai khác so với Trung Du xanh và trình tự đã công bố (209Q→E; 227M→L). Domain là vùng chức năng quan trọng của FLS nên sự sai khác này có thể ảnh hưởng đến hoạt

động của enzyme. Hơn nữa, các nghiên cứu đã chứng minh một số motif quyết định đến chức năng của FLS [33]. Motif PxxxIRxxx-EQP ở đầu N (18→29, phần nền vàng) quyết định đến hoạt tính của FLS, sự thay đổi trình tự nucleotide ở motif có thể làm mất hoạt tính của FLS. Kết quả so sánh ở mẫu nghiên cứu với trình tự công bố chỉ ra sự thay đổi 2 vị trí amino ở motif này (19/25V→A). Mặt khác, FLS chỉ có hoạt tính chức năng đầy đủ khi có mặt của Fe (II) và 2-oxoglutarate. Motif CPQ/RPXLAL (205→212) là vị trí bám của 2-oxoglutarate có một vị trí amino acid sai khác của FLS mẫu chè Trung Du tím với chè Trung Du xanh và trình tự công bố (209Q→E), trong khi motif mà Fe (II) bám các amino acid có tính bảo thủ cao (217H, 219D và 273H) ở các mẫu chè phân tích. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đặt ra một vấn đề mới cần nghiên cứu sâu hơn về các SNPs trong gen *FLS* của chè.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid suy diễn của FLS đã công bố (EF205150) với FLS chè Trung Du xanh (FLS CX) và chè Trung Du tím (FLS CT).

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định và phân tích được trình tự gen *FLS* từ 2 giống chè Trung Du xanh và tím trồng tại Thái Nguyên. Trình tự amino acid suy diễn của từ các giống chè nghiên cứu có độ tương đồng cao so với trình tự đã công bố trên Genbank (97,6-99,7%). Amino acid của *FLS* của 2 mẫu chè nghiên cứu có 331 amino acid với hệ số tương đồng 97,9%.

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 và được 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

- [1] S.Y. Lee, J.W. Lee, H. Lee, H.S. Yoo, Y.P. Yun, K.W. Oh, T.Y. Ha, J.T. Hong, Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms, *Brain Res Mol Brain Res* 140 (2005) 45-54.
- [2] Y. Itoh, T. Yasui, A. Okada, K. Tozawa, Y. Hayashi, K. Kohri, Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis, *J Urol* 173 (2005) 271-275.
- [3] D. Bandyopadhyay, T.K. Chatterjee, A. Dasgupta, J. Lourduraja, S.G. Dastidar, In vitro and in vivo antimicrobial action of tea: the commonest beverage of Asia, *Biol Pharm Bull* 28 (2005) 2125-2127.
- [4] W.X. Tian, L.C. Li, X.D. Wu, C.C. Chen, Weight reduction by Chinese medicinal herbs may be related to inhibition of fatty acid synthase, *Life Sci* 74 (2004) 2389-2399.
- [5] S. Sang, J.D. Lambert, S. Tian, J. Hong, Z. Hou, J.H. Ryu, R.E. Stark, R.T. Rosen, M.T. Huang, C.S. Yang, C.T. Ho, Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities, *Bioorg Med Chem* 12 (2004) 459-467.
- [6] M.J. Lee, J.D. Lambert, S. Prabhu, X. Meng, H. Lu, P. Maliakal, C.T. Ho, C.S. Yang, Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 (2004) 132-137.
- [7] S. Gupta, N. Ahmad, R.R. Mohan, M.M. Husain, H. Mukhtar, Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase, *Cancer Res* 59 (1999) 2115-2120.
- [8] R.L. Thangapazham, N. Passi, R.K. Maheshwari, Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells, *Cancer Biol Ther* 6 (2007) 1938-1943.
- [9] C.S. Yang, J.Y. Chung, G. Yang, S.K. Chhabra, M.J. Lee, Tea and tea polyphenols in cancer prevention, *J Nutr* 130 (2000) 472S-478S.
- [10] K. Hosoda, M.F. Wang, M.L. Liao, C.K. Chuang, M. Iha, B. Clevidence, S. Yamamoto, Antihyperglycemic effect of oolong tea in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 26 (2003) 1714-1718.
- [11] C. Bursill, P.D. Roach, C.D. Bottema, S. Pal, Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding Protein in HepG2 liver cells, *J Agric Food Chem* 49 (2001) 5639-5645.
- [12] S.K. Katiyar, F. Afaq, A. Perez, H. Mukhtar, Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress, *Carcinogenesis* 22 (2001) 287-294.
- [13] S. Liu, H. Lu, Q. Zhao, Y. He, J. Niu, A.K. Debnath, S. Wu, S. Jiang, Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41, *Biochim Biophys Acta* 1723 (2005) 270-281.
- [14] A. Finger, In-Vitro studies on the effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation of polyphenolic black tea constituents, *J Sci Food Agric* 66 (1994) 293-235.
- [15] M.E. Harbowy, D.A. Balentine, Tea chemistry, *Critical Reviews in Plant Sciences* 16 (1997) 415-480.
- [16] M.U. Unal, S.N. Yabaci, A. Sener, Extraction, partial purification and characterisation of

- polyphenol oxidase from tea leaf (*Camellia sinensis*), *GIDA* 36 (2011) 137-144.
- [17] M. Rudy, Inactivation of polyphenol oxidase in *Camellia sinensis* for the production of high quality instant green tea, University of Petoria, Pretoria, South Africa, 2008.
- [18] Đỗ Văn Ngọc, Giống chè, kỹ thuật trồng và chăm sóc, NXB Nông Nghiệp, Viện nghiên cứu chè, Phú Thọ, 2000.
- [19] M.M. Berger, Can oxidative damage be treated nutritionally?, *Clinical Nutrition* 24 (2005) 172-183.
- [20] J.A. Vita, Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (2005) 292-297.
- [21] D.L. McKay, J.B. Blumberg, The role of tea in human health: an update, *J Am Coll Nutr* 21 (2002) 1-13.
- [22] G.J. Volikakis, C.E. Efstathiou, Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta* 551 (2005) 124-131.
- [23] L. Britsch, W. Heller, H. Grisebach, Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley, *Z. Naturforsch* 36 (1981) 742-750.
- [24] T.A. Holton, F. Brugliera, Y. Tanaka, Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*, *Plant J* 4 (1993) 1003-1010.
- [25] T. Moriguchi, M. Kita, K. Ogawa, Y. Tomono, T. Endo, M. Omura, Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development, *Physiologia plantarum* 114 (2002) 251-258.
- [26] M.K. Pelletier, J.R. Murrell, B.W. Shirley, Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. Further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes, *Plant physiology* 113 (1997) 1437-1445.
- [27] G.Z. Lin, Y.J. Lian, J.H. Ryu, M.K. Sung, J.S. Park, H.J. Park, B.K. Park, J.S. Shin, M.S. Lee, C.I. Cheon, Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*, *Protein expression and purification* 55 (2007) 287-292.
- [28] Đỗ Ngọc Qũy, Lê Thất Khương, Giáo trình cây chè sản xuất chế biến và tiêu thụ, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2000.
- [29] Lương Văn Vượng, Phạm Huy Thông, Lê Văn Đức, Lê Hồng Vân, Kỹ thuật sản xuất và chế biến chè xanh, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2013.
- [30] Thu Hà, Bảo tồn, nâng cao chất lượng chè trung du ở vùng chè đặc sản Tân Cương, Công thông tin điện tử tỉnh Thái Nguyên, <http://www.thainguuyen.gov.vn/>, Thái Nguyên, 2016.
- [31] Vi Vân, Nâng cao năng suất, chất lượng chè trung du, Báo Thái Nguyên điện tử, <http://baothainguuyen.org.vn/>, Thái Nguyên, 2015.
- [32] Đinh Vũ, Chè tím Trung du và nỗi lo bảo tồn, Báo Phú Thọ điện tử, <http://baophutho.vn/>, Phú Thọ, 2012.
- [33] R. Lukacin, L. Britsch, Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3beta-hydroxylase, *European journal of biochemistry* 249 (1997) 748-757.

Cloning and Sequence Analysis of Gene Encoding Flavonol Synthase from Trung Du Teas Growing in Thai Nguyen

Hoang Thi Thu Yen¹, Mai Thi Huyen Trang¹,
Pham Thi Hang², Huynh Thi Thu Hue²

¹University of Sciences, Thai Nguyen University, Tan Thinh, Thai Nguyen, Vietnam

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi

Abstract: In this study, we conducted the cloning and sequencing gene encoding FLS from the two green and purple Trung Du tea cultivars. The length of FLS gene is 996 bp, encodes 331 amino

acid. Results of *FLS* gene analysis showed that green and purple Trung Du cultivars has 13 nucleotide variants total as compare with *FLS* sequence published on Genbank. Nucleotide sequence differences lead to change amino acid sequence of key functional motives in *FLS* like motif characterizes the 2OG-Fe (II) oxygenase superfamily, the PxxxIRxxx-EQP motif at the N-terminal (18→29) determines the *FLS* activity, the CPQ/RPxLAL motif) is the binding site of 2-oxoglutarate. How amino acid position changes affect *FLS* activity need further research. *FLS* gene isolates are sources for further research to aim elucidating the function of this enzyme.

Keywords: Green Trung Du, purple Trung du, Flavonol, Flavonol synthase, polyphenol.