



Original Article

# Evaluating Expression of Gene Encoding Flavonol Synthase in Green TrungDu and Purple TrungDu by Real time PCR and HPLC Technique

Hoang Thi Thu Yen<sup>1,\*</sup>, Nguyen Thuy Linh<sup>2</sup>, Huynh Thi Thu Hue<sup>2</sup>,  
Nguyen Hai Dang<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>*Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University,  
Z115 street, Tan Thinh Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam*

<sup>2</sup>*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST),  
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*Institute of Marine Biochemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

<sup>4</sup>*University of Science and Technology of Hanoi, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Received 24 May 2019

Revised 25 July 2019; Accepted 04 June 2020

**Abstract:** In plants, flavonol synthase (FLS) is a multifunctional enzyme that converts dihydroflavonol into flavonols and naringenin into dihydrokaempferol. FLS from tea has been shown to metabolize dihydroquercetin to quercetin. In this study, we conducted studying on the relationship between quercetin content and the expression level of FLS in two traditional tea cultivars of Vietnam, TrungDuxanh and TrungDutim tea grown in tea garden of Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry. Tea shoots with one apical bud and two to three young leaves using as research materials which collected in September 2017. The using of HPLC technique did not detect the quercetin content from the these tea samples. The preliminary results of quantification of FLS gene expression by real time PCR showed the expression level of FLS in green Trung Du tea is higher than purple Trung Du, although the difference is not great. Thus, at the time of collecting, the expression of FLS in green Trung Du and purple Trung Du can not synthesize quercetin but synthesize other flavonols.

**Keywords:** TrungDu tea, green TrungDu, purple TrungDu, flavonol, quercetin, flavonol synthase.

\* Corresponding author.

Email address: [yenhtt@tnus.edu.vn](mailto:yenhtt@tnus.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4909>

# Đánh giá sự biểu hiện của gen mã hóa flavonol synthase ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím bằng kỹ thuật real time PCR và HPLC

Hoàng Thị Thu Yên<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thùy Linh<sup>2</sup>, Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>2</sup>,  
Nguyễn Hải Đăng<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, đường Z115,  
Phường Tân Thịnh, Thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST),  
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Hóa sinh biển, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 24 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 7 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 04 tháng 6 năm 2020

**Tóm tắt:** Ở thực vật, flavonol synthase (FLS) là một enzyme đa chức năng, có hoạt tính chuyển hóa các dihydroflavonol thành flavonols và naringenin thành dihydrokaempferol. FLS từ chè đã được chứng minh có hoạt tính chuyển hóa dihydroquercetin thành quercetin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu mối liên quan giữa hàm lượng quercetin với mức độ biểu hiện của FLS ở 2 giống chè truyền thống của Việt Nam, chè Trung Du xanh và Trung Du tím được trồng tại vườn chè của Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Búp chè 1 tôm 2 đến 3 lá non thu thập vào tháng 09 năm 2017 được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu. Sử dụng kỹ thuật HPLC không phát hiện được hàm lượng quercetin từ 2 mẫu chè nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu bước đầu khi định lượng biểu hiện gen FLS bằng real time PCR cho thấy, sự biểu hiện của FLS ở chè Trung Du xanh cao hơn so với chè Trung Du tím, mặc dù sự khác biệt không lớn. Như vậy, tại thời điểm lấy mẫu nghiên cứu, sự biểu hiện của FLS ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím có thể không tổng hợp quercetin mà tổng hợp các flavonol khác.

*Từ khóa:* chè Trung Du, chè Trung Du xanh, chè Trung Du tím, flavonol, quercetin, flavonol synthase

## 1. Mở đầu

Flavonoid là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, có vai trò quan trọng đối với sự tăng trưởng và sinh lý bình thường của thực vật [1]. Cho đến nay, khoảng 10.000 flavonoid khác nhau đã được mô tả; cấu trúc chung của chúng bao gồm hai vòng thơm sáu carbon (vòng A và B) và một dị vòng 3 carbon chứa một nguyên tử oxy (vòng C).

Cấu trúc này có thể được thay đổi bằng cách sắp xếp lại, kiềm hóa, oxy hóa và glycosyl hóa [2]. Sự thay đổi vòng C tạo nên các nhóm phụ flavonoid như: flavones, flavonols, flavan-3-ols (catechins → proanthocyanidins - PAs) và anthocyanin [3]. Các flavonoid được chứng minh là có nhiều lợi ích cho sức khỏe con người như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng lại tác nhân gây bệnh và chất gây ung thư [4,5]. Hiện

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: yenhtt@tnus.edu.vn

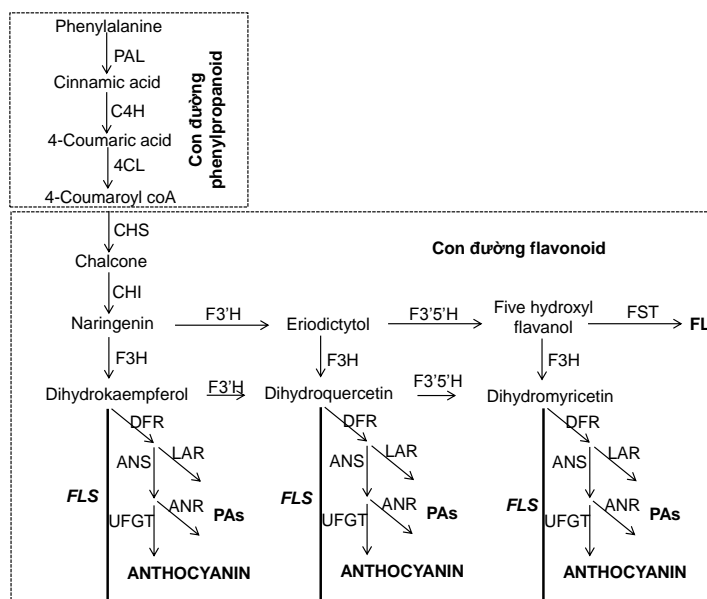
<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4909>

nay, hầu hết các gen mã hóa các enzyme tham gia con đường flavonoid đã được phân lập và nghiên cứu chức năng ở nhiều loài thực vật khác nhau (Hình 1).

Ở nhiều loài thực vật, flavonol là thành phần có nhiều nhất trong các hợp chất flavonoid [6]. Flavonol quy định màu sắc, hương vị, chất lượng và dinh dưỡng của lá, hoa và quả, chúng có khả năng chống viêm, chống oxy hóa, chống đông máu [6,7]. Flavonol ở thực vật bao gồm 3 loại chính: quercetin, kaempferol và myricetin [8-10]. Bằng phương pháp định lượng HPLC, He và cộng sự đã chỉ ra ở chè ngoài 3 loại flavonol chính còn có rutin, chúng đều tồn tại dưới dạng glycosyl hóa (O-Glycosylated flavonols) [9]. Flavonol là một trong hai thành phần chủ yếu của flavonoid ở chè [11] và được cho là có lợi cho một số bệnh mãn tính ở người [12]. Các flavonol được tổng hợp từ các dihydroflavonol

(dihydroquercetin, dihydrokaempferol và dihydromyricetin) bởi flavonol synthase (FLS). Ngoài ra, ở *Arabidopsis thaliana*, FLS có thể chuyển đổi naringenin thành dihydrokaempferol [3,8,10].

Sử dụng phương pháp real time PCR định lượng, Wang và cộng sự đã xác nhận gen *FLS* biểu hiện cao hơn ở giống chè có lá tím so với chè lá xanh [15]. Gen mã hóa cho FLS của giống chè trồng ở Hàn Quốc đã được tạo dòng và nghiên cứu biểu hiện trên *E. coli*; FLS tái tổ hợp được chứng minh có hoạt tính chuyển hóa dihydroquercetin thành quercetin [16]. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng quercetin với mức độ biểu hiện của *FLS* ở 2 giống chè truyền thống của Việt Nam: chè Trung Du xanh và Trung Du tím.



Hình 1. Các con đường có thể sinh tổng hợp các hợp chất flavonol ở chè [8-10,13,14].

Chú thích: ANR (anthocyanidin reductase); ANS (anthocyanin synthase); 4CL (4-coumarate: CoA ligase); C4H (cinnamate 4-hydroxylase); CHI (chalcone isomerase); CHS (chalcone synthase); DFR (dihydroflavonol reductase); F3H (flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase); F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase); F3'5'H (flavonoid 3'5'-hydroxylase); FLS (flavonol synthase); FST: flavonol 4-sulfotransferase; LAR (leucoanthocyanidin reductase); PAL (phenylalanine ammonia-lyase); proanthocyanidins – PAs; UFGT (UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase).

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Đối tượng

Giống chè Trung Du xanh và Trung Du tím (*Camellia sinensis* var. *Macrophylla*) trồng tại vườn chè của Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên tại Thái Nguyên. Búp chè (chồi đỉnh và hai đến ba lá đầu tiên) đã được thu thập vào tháng 9 năm 2017. Các mẫu chè được chia thành hai phần: phần thứ nhất được sử dụng để phân tích hàm lượng quercetin, phần thứ hai được đông lạnh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  để tách chiết RNA.

### 2.2. Phương pháp

- **Phân tích HPLC:** Sau khi tham khảo tài liệu [17,18] và thử nghiệm các điều kiện hệ dung môi và cột khác nhau, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký để xây dựng phương pháp. Pha động sử dụng hệ dung môi kênh A  $\text{H}_2\text{O}$  (1% acetic) – kênh B ACN được thiết lập gradient biến thiên từ tỉ lệ 95/5 đến tỉ lệ 5/95 trong 45 phút; Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; Lượng bơm mẫu: 5  $\mu\text{L}$ ; Thời gian phân tích: 45 phút; Nhiệt độ cột:  $25^{\circ}\text{C}$ ; Bước sóng lựa chọn: 370 nm. Hệ thống LC được kết nối với phần mềm Agilent OpenLAB Control Panel. Khí nitơ được bơm với tốc độ dòng 5,0 L/phút, áp suất đầu phun đạt 40 psi, nhiệt độ làm khô đạt  $250^{\circ}\text{C}$ .

Trước tiên, 4 mg ( $\pm 0,1$  mg) chất chuẩn quercetin (Sigma-Aldrich) được cho vào bình định mức 5 mL, hòa tan và định mức đến vạch bằng methanol. Dãy dung dịch chuẩn được khảo sát có nồng độ 1, 5, 20, 50, 200 và 500  $\mu\text{g/mL}$ . Phân tích chất chuẩn nói trên được thực hiện theo điều kiện sắc ký đã xây dựng, lặp lại 3 lần và xác định phương trình hồi quy tuyến tính. Phương trình đường chuẩn được xây dựng trên phần mềm ChemStation, Agilent có dạng:  $y = ax + b$  với yêu cầu hệ số tương quan  $R^2 > 0,99$ ; trong đó:  $y$  là diện tích đỉnh hấp thụ thu được tương ứng với nồng độ chất chuẩn  $x$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Phương pháp xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) dựa trên tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N). Trong đó:  $S$  là chiều cao tín hiệu của chất phân tích;  $N$  là nhiễu đường nền. LOD và LOQ được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó

tín hiệu lớn gấp 3 lần nhiễu đường nền (đối với LOD) và 10 lần (đối với LOQ).

Mẫu chè ngay sau khi thu hái được giữ trong đá lạnh, sau đó được rửa sạch và cắt nhỏ. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành cho 0,5 g mẫu vào ống nghiệm, thêm 5 mL dung môi methanol, chiết siêu âm 15 phút, ly tâm 4000v/phút trong 5 phút, hút lấy dịch chiết và lặp lại quy trình chiết 02 lần, thu dịch chiết vào bình định mức 25 mL và định mức đến vạch bằng methanol. Mẫu nghiên cứu được lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$  và phân tích bằng hệ thống LC Agilent Single Quadrupole 6120 (Agilent, Santa Clara, USA), cột sắc ký Zorbax SB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), cột bảo vệ SB-C18 Agilent 1260 (CA, USA).

**Tách chiết RNA tổng số, tổng hợp cDNA:** RNA tổng số được tách chiết từ mẫu chè (chồi đỉnh và 2 đến ba lá non) bằng bộ 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. 0,5  $\mu\text{g}$  RNA tổng số được dùng làm khuôn để tổng hợp cDNA bằng môi Oligo(dT) và Reverse Transcriptase, sử dụng bộ kit *First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real – Time PCR* của hãng Affymetrix.

**Định lượng mức độ biểu hiện gen FLS bằng Real time PCR:** Thí nghiệm Real time PCR định lượng tương đối được thực hiện với gen đích (target gene = Tg) và gen tham chiếu (reference gene = Ref) ở các mẫu chè khác nhau theo phương pháp của Wang và cộng sự (2012). Khi đó, tương ứng với từng mẫu, sẽ có kết quả định lượng cho cả gen đích và gen tham chiếu với giá trị Ct khác nhau. Dựa trên các giá trị này, chu kì ngưỡng của gen đích trên các mẫu chè được tiêu chuẩn hóa bằng cách tính hiệu số chênh lệch Ct của gen đích với gen tham chiếu trên các mẫu theo công thức:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Tg}) - \text{Ct}(\text{Ref}) \quad (1)$$

Để so sánh tỷ lệ biểu hiện của một gen trên các mẫu thí nghiệm khác nhau, chúng tôi chọn mẫu chè xanh làm mẫu định chuẩn (calibrator=C). Khi đó, mức độ biểu hiện của gen đích trên mẫu chè tím so với chè xanh được tính theo công thức:

$$R = 2^{-(\Delta Ct(\text{chè tím}) - \Delta Ct(\text{chè xanh}))} \quad (2)$$

Cặp mồi được thiết kế để khuếch đại gen *GADPH* (gen tham chiếu) và gen *FLS* (gen đích) dựa trên trình tự gen đã được đăng ký trên Genbank với mã số tương ứng XM002263109, MH232961 và được tổng hợp bởi công ty Phusa Biochem Ltd (Bảng 1). Phản ứng PCR sử dụng Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Inc.) được thực hiện trong hệ thống LightCycler® 96 (Roche, Thụy Sĩ). Phản ứng với mỗi gen ở từng mẫu chè được lặp lại ba

lần. Mỗi ống phản ứng chứa 5 µl Luna Universal qPCR Mastermix 2 X, 0,2 µl mồi mỗi loại, 0,2 µl DMSO, 0,5 µl cDNA 10 ng/µl, và bổ sung nước đến thể tích 10 µl. Phản ứng real-time PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 95°C -10 phút, sau đó 45 chu kì gồm 2 bước: 95°C -15 giây và 62°C -30 giây, tiếp theo bước phân tích biến tính gồm: 95°C - 5 giây, 65°C -1 phút và tăng dần nhiệt độ lên 97°C. Dữ liệu được phân tích với phần mềm LightCycler® 96 phiên bản 1.1.

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

TT	Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')*	Gen đích	Kích thước
1	qCsGAPDH F	TCAAGCAAGGACTGGAGAGG	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	140 bp
2	qCsGAPDH R	ACAGTGGGAACGCGGAAAG		
3	qCsFLS F	AGAGGGACTAGGTTTGGATGG	<i>Flavonol synthase</i>	161 bp
4	qCsFLS R	GGACAAGTAAAGTGAGAGCAGAC		

### 3. Kết quả và thảo luận

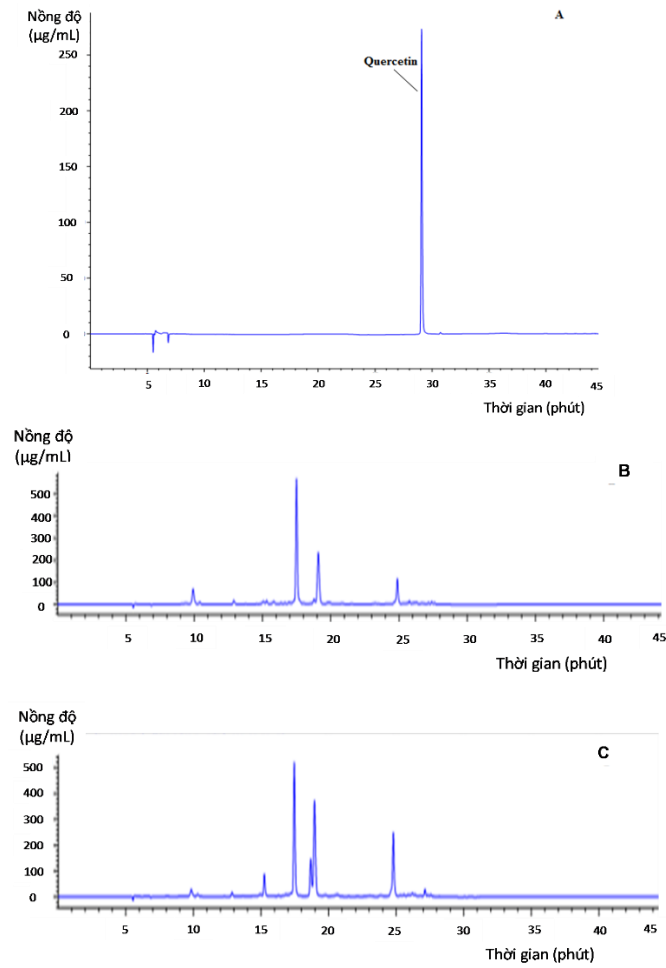
#### 3.1. Xác định hàm lượng quercetin ở mẫu chè Trung Du xanh và tím

Để định lượng quercetin từ mẫu chè nghiên cứu, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn định lượng của quercetin. Trên hệ thống LC, tín hiệu đỉnh hấp thụ của chất chuẩn quercetin được phát hiện tại thời gian lưu ở phút 29 (Hình 2). Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích đỉnh hấp thụ tại bước sóng UV 280 nm có dạng  $Y = 39,05957x - 8,54829$  và có hệ số tương quan  $R^2 > 0,99987$ . Đồng thời, giá trị phát hiện LOD = 0,02 và giới hạn định lượng LOQ = 0,07. Kết quả LOD và LOQ này cho thấy phương pháp có độ nhạy cao. Theo nghiên cứu của He và đtg (2018) ở 2 giống chè xanh và chè tím trồng tại Hàn Quốc cho thấy, ở chè có 4 loại flavonol, ngoài quercetin, kaemferol và myricetin còn có rutina và đều tồn tại dưới dạng glycosyl hóa. Hàm lượng flavonol tổng số của chè tím cao hơn so với chè xanh. Ngoài ra, lượng flavonol trong lá chè mùa hè cao hơn đáng kể so với mùa xuân. Hàm lượng của quercetin cao hơn khoảng 2,8 lần ở lá chè xanh và chè tím mùa hè so với mùa

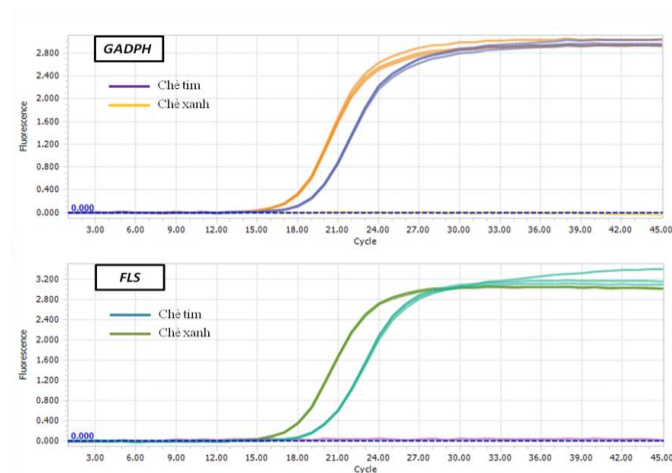
xuân [9]. Tuy nhiên, điều đáng ngạc nhiên là chúng tôi không phát hiện được hàm lượng quercetin ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím (Hình 2). Chúng tôi giả thiết rằng có thể lượng quercetin trong các mẫu chè quá ít nên không phát hiện được hoặc do các mẫu chè nghiên cứu được thu thập trong tiết trời mùa thu ở Việt Nam - giai đoạn chè chuẩn bị ngủ đông hoặc tùy thuộc vào loại giống, điều kiện thổ nhưỡng ảnh hưởng đến sự chuyển hóa tổng hợp quercetin ở chè.

#### 3.2. Định lượng mức độ biểu hiện của *FLS*

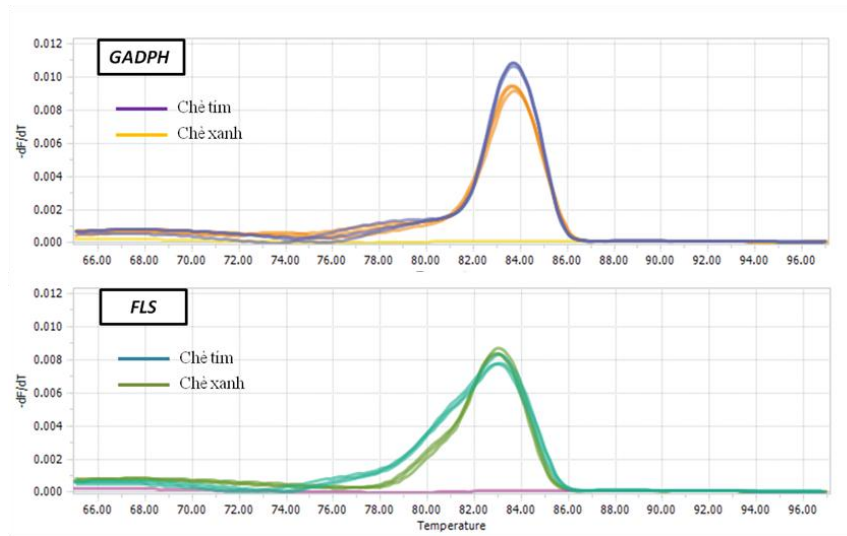
Trong thí nghiệm định lượng mức độ biểu hiện của gen *FLS* ở 2 mẫu chè nghiên cứu, chúng tôi sử dụng gen *GADPH* mã hóa cho enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase làm gen tham chiếu. Gen *GADPH* là gen quản gia (housekeeping gene), đã được chứng minh là một trong các gen tham chiếu có sự biểu hiện ổn định ở các mô, các giai đoạn phát triển của lá và dưới một số điều kiện kích thích ở các giống chè khác nhau [19-21]. Trên thực tế, Wang và cộng (2012) đã sử dụng gen *GADPH* làm gen tham chiếu để định lượng mức độ biểu hiện của gen *FLS* trong phân tích real time PCR [22]. Kết quả khuếch đại qua mỗi chu kì của các gen *GADPH* và *FLS* ở mỗi mẫu chè được thể hiện ở Hình 3.



Hình 2. Sắc ký đồ UV 280nm của chất chuẩn quercetin(A), dịch chiết flavonoid từ chè Trung Du xanh (B) và chè Trung Du tím (C)



Hình 3. Đồ thị khuếch đại gen *GADPH* và *FLS* trong phản ứng real time PCR.



Hình 4. Biểu đồ đỉnh nóng chảy của sản phẩm khuếch đại gen *GADPH* và *FLS*.

Có thể nhận thấy, đồ thị khuếch đại của các gen đều có hình dạng đặc trưng với lý thuyết. Kết quả ở Hình 4 minh họa rõ sản phẩm khuếch đại của các gen khá đặc hiệu, thể hiện là một đỉnh hấp thụ rõ ràng trên đồ thị. Tm của các sản phẩm khuếch đại gen *GADPH* là 83,7 và gen *FLS* là 82,9.

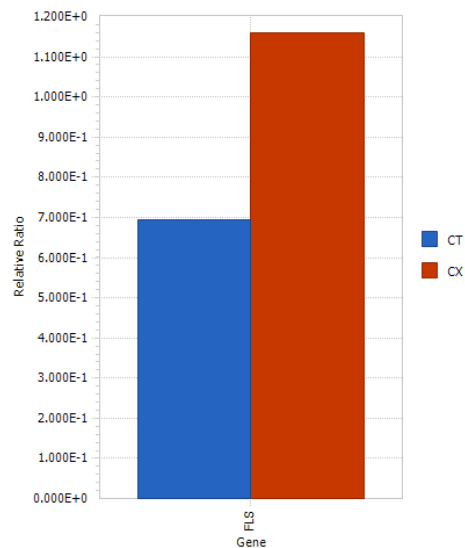
Từ mỗi biểu đồ khuếch đại của gen, một đường tín hiệu ngưỡng cắt các đường cong khuếch đại của gen tại các vị trí xác định. Giá trị hoành độ của các điểm trên là giá trị chu kỳ ngưỡng Ct của ống phản ứng. Chúng tôi thu được kết quả giá trị Ct của gen quan tâm và gen tham chiếu trên hai mẫu chè như Bảng 2.

Bảng 2. Giá trị chu kỳ ngưỡng Ct của gen *GADPH* và *FLS* trên hai mẫu chè nghiên cứu

Mẫu	<i>GADPH</i>	<i>FLS</i>
Chè xanh	17,34 ± 0,064	17,15 ± 0,015
Chè tím	18,73 ± 0,04	19,26 ± 0,056

Sử dụng công thức (1), giá trị  $\Delta Ct$  của gen *FLS* quan tâm dựa trên gen tham chiếu *GDAPH* ở mẫu chè Trung Du xanh và Trung Du tím tương ứng là  $-0.19 \pm 0.079$  và  $0.53 \pm 0.096$ . Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng chè xanh làm mẫu định chuẩn. Khi đó, coi mức độ

biểu hiện của gen quan tâm ở chè xanh là 1, mức độ biểu hiện của gen tương ứng trên chè tím được tính toán theo công thức (2). Kết quả tính toán cho thấy, gen *FLS* có mức độ biểu hiện ở cây chè tím bằng 0,607 so với mức độ biểu hiện của gen này ở cây chè xanh. Mức độ biểu hiện gen *FLS* ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím được thể hiện trên Hình 5.



Hình 5. Biểu đồ so sánh mức độ biểu hiện của gen *FLS* ở hai mẫu chè tím và chè xanh. CT: chè Trung Du tím, CX: chè Trung Du xanh.

Kết quả nghiên cứu Hình 5 cho thấy cả 2 mẫu chè Trung Du xanh và Trung Du tím đều có sự biểu hiện của gen *FLS*, gen *FLS* biểu hiện cao hơn ở cây chè Trung Du xanh. Ngược lại với kết quả này, nhóm nghiên cứu của Wang và đtg (2017) cho rằng mức độ biểu hiện của gen *FLS* ở chè tím cao hơn chè xanh [15]. Theo tổng hợp của Chen và cộng sự (2014), *FLS* là một enzyme đa chức năng, ngoài chức năng chuyển hóa dihydroquercetin thành quercetin, *FLS* còn có chức năng chuyển hóa các dihydroflavonol khác (dihydrokaempferol và dihydromyricetin) và naringenin tương ứng thành myricetin, kaempferol và dihydrokaempferol [3]. Như vậy, sự biểu hiện của *FLS* ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím có thể tổng hợp lượng ít quercetin hoặc không tổng hợp mà tổng hợp các flavonol khác. Hơn nữa, con đường sinh tổng hợp của anthocyanin, flavonol và PAs chia sẻ các bước phổ biến trong con đường phenylpropanoid và favonoid (từ PAL đến F3H). Mỗi nhóm hợp chất flavonoid được tổng hợp từ nhiều phân nhánh của con đường favonoid chung (Hình 1). Một số nghiên cứu đã chỉ ra mối quan hệ cạnh tranh giữa các favonoid khác nhau do sự cạnh tranh cơ chất [9,23,24]. Mặt khác, nghiên cứu của He và đtg (2018) còn chứng minh anthocyanin và flavonol cũng có vai trò trong quá trình hình thành lá chè có màu tím [9]. Do vậy, cần có nhiều nghiên cứu hơn để làm sáng tỏ chức năng của *FLS* và mối liên quan đến sự tích lũy anthocyanin, PAs và flavonol trong con đường tổng hợp các hợp chất flavonoid ở chè.

#### 4. Kết luận

Búp chè Trung Du xanh, Trung Du tím có chồi đỉnh và 2 đến 3 lá non thu thập vào tháng 09 năm 2017 tại vườn chè của Đại học Nông Lâm Thái Nguyên được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu. Sử dụng kỹ thuật HPLC không phát hiện được hàm lượng quercetin từ 2 mẫu chè nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu bước đầu định lượng sự biểu hiện gen *FLS* bằng real time PCR cho thấy sự biểu hiện của *FLS* ở chè Trung Du xanh cao hơn so với chè Trung Du tím, mặc dù sự khác biệt không lớn. Như vậy, tại thời điểm

lấy mẫu nghiên cứu, sự biểu hiện của *FLS* ở chè Trung Du xanh và Trung Du tím có thể không tổng hợp quercetin mà tổng hợp các flavonol khác.

#### Lời cảm ơn

Công trình thực hiện được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2016-TNA-24.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] P.-G. Pietta, Flavonoids as Antioxidants, *Journal of Natural Products* 63 (2000) 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
- [2] J.J. Turnbull, J. Nakajima, R.W. Welford, M. Yamazaki, K. Saito, C.J. Schofield, Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3beta-hydroxylase, *J Biol Chem.* 279 (2004) 1206-1216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309228200>.
- [3] A.X. Cheng, X.J. Han, Y.F. Wu, H.X. Lou, The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis, *Int J Mol Sci.* 15 (2014) 1080-1095. <https://doi.org/10.3390/ijms15011080>.
- [4] M.M. Berger, Can oxidative damage be treated nutritionally?, *Clinical Nutrition*, 24 (2005) 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.10.003>.
- [5] J.A. Vita, Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (2005) 292-297. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.292S>.
- [6] B.H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol Ther* 96 (2002) 67-202. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00298-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00298-x).
- [7] E. Butelli, L. Titta, M. Giorgio, H.P. Mock, A. Matros, S. Peterek, E.G. Schijlen, R.D. Hall, A.G. Bovy, J. Luo, C. Martin, Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors, *Nat Biotechnol* 26 (2008) 1301-1308. <https://doi.org/10.1038/nbt.1506>.
- [8] S. Czemplin, R. Stracke, B. Weisshaar, N. Cordon, N.N. Harris, A.R. Walker, S.P. Robinson, J. Bogs, The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries, *Plant Physiol*, 151



- (2009) 1513-1530. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142059>
- [9] X. He, X. Zhao, L. Gao, X. Shi, X. Dai, Y. Liu, T. Xia, Y. Wang, Isolation and Characterization of Key Genes that Promote Flavonoid Accumulation in Purple-leaf Tea (*Camellia sinensis* L.), *Sci Rep* 8 (2018) 130. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18133-z>.
- [10] Y.B. Kim, K. Kim, Y. Kim, P.A. Tuan, H.H. Kim, J.W. Cho, S.U. Park, Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *Scutellaria baicalensis*, *Scientific World Journal* 2014 (2014) 980740. <https://doi.org/10.1155/2014/980740>.
- [11] M.E. Harbowy, D.A. Balentine, Tea chemistry, *Critical Reviews in Plant Sciences* 16 (1997) 415-480. <https://doi.org/10.1080/07352689709701956>.
- [12] D.L. McKay, J.B. Blumberg, The role of tea in human health: an update, *J Am Coll Nutr* 21 (2002) 1-13. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719187>.
- [13] T. Tohge, L.P. De Souza, A.R. Fernie, Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants, *J Exp Bot* 68 (2017) 4013-4028. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx177>.
- [14] B. Winkel-Shirley, Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology, *Plant Physiol* 126 (2001) 485-493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>.
- [15] L. Wang, D. Pan, M. Liang, Y.S. Abubakar, J. Li, J. Lin, S. Chen, W. Chen, Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Purple Leaves of Zijuan Tea (*Camellia sinensis* var. *kitamura*), *Int J Mol Sci* 18 (2017) 833. <https://doi.org/10.3390/ijms18040833>.
- [16] 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 Expr Purif* 55 (2007) 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.05.013>.
- [17] A. Finger, S. Kuhr, U.H. Engelhardt, Chromatography of tea constituents, *J Chromatogr* 624 (1992) 293-315. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85685-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85685-M).
- [18] L.Z. Lin, P. Chen, J.M. Harnly, New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas, *J Agric Food Chem* 56 (2008) 8130-8140. <https://doi.org/10.1021/jf800986s>.
- [19] X. Hao, D.P. Horvath, W.S. Chao, Y. Yang, X. Wang, B. Xiao, Identification and evaluation of reliable reference genes for quantitative real-time PCR analysis in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Int J Mol Sci* 15 (2014) 22155-22172. <https://doi.org/10.3390/ijms151222155>.
- [20] M. Sun, Y. Wang, D. Yang, C. Wei, L. Gao, T. Xia, Y. Shan, Y. Luo, Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*, *Chinese Bulletin of Botany* 45 (2010) 579-587. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-3466.2010.05.007>.
- [21] Z.J. Wu, C. Tian, Q. Jiang, X.H. Li, J. Zhuang, Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*), *Sci Rep* 6 (2016) 19748. <https://doi.org/10.1038/srep19748>.
- [22] Y.S. Wang, L.P. Gao, Y. Shan, Y.J. Liu, Y.W. Tian, T. Xia, Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Scientia Horticulturae* 141 (2012) 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.04.013>.
- [23] M. Liu, H.L. Tian, J.H. Wu, R.R. Cang, R.X. Wang, X.H. Qi, Q. Xu, X.H. Chen, Relationship between gene expression and the accumulation of catechin during spring and autumn in tea plants (*Camellia sinensis* L.), *Hortic Res* 2 (2015) 15011-15019. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.23>.
- [24] K. Wei, L. Wang, C. Zhang, L. Wu, H. Li, F. Zhang, H. Cheng, 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 (2015) 137925-137937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137925>.