

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

LƯƠNG THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM GEN MÃ HÓA  
PEROXIDASE Ở CÂY DỪA CẠN  
(*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Thái Nguyên, năm 2015**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

---

LƯƠNG THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM GEN MÃ HÓA  
PEROXIDASE Ở CÂY DỪA CẠN  
(*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON)**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62.42.70

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Nguyễn Thị Tâm

Thái Nguyên, năm 2015

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS .TS. Nguyễn Thị Tâm. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, tháng 07 năm 2015*

Tác giả

**Lương Thanh Huyền**

*Xác nhận của khoa chuyên môn*

*Xác nhận của người hướng dẫn khoa học*

**Nguyễn Thị Tâm**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo thuộc Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng DNA ứng dụng , Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ gen , Viện Công nghệ sinh học , Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi tiến hành các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài luận văn.

Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại , khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

***Tác giả***

Lương Thanh Huyền

## MỤC LỤC

|   | Trang |
|---|-------|
| LỜI CAM ĐOAN .....  | i     |
| LỜI CẢM ƠN .....  | ii    |
| MỤC LỤC .....   | iii   |
| DANH MỤC BẢNG .....   | iv    |
| DANH MỤC HÌNH .....   | v     |
| DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....   | vi    |
| MỞ ĐẦU .....  | 1     |
| 1. ĐẶT VẤN ĐỀ .....   | 1     |
| 2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU .....  | 2     |
| 3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU .....  | 2     |
| Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....  | 3     |
| 1.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG VÀ MỘT SỐ CÔNG DỤNG CỦA CÂY DỪA CẠN... 3              | 3     |
| 1.1.1. Đặc điểm chung của cây dừa cạn .....                               | 3     |
| 1.1.2. Một số công dụng của cây dừa cạn.....                              | 4     |
| 1.2. HỢP CHẤT ALKALOID .....  | 5     |
| 1.2.1. Alkaloid ở thực vật .....  | 5     |
| 1.2.2. Alkaloid ở cây dừa cạn .....                                       | 9     |
| 1.2.3. Một số gen liên quan đến quá trình tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn | 15    |
| Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU                              |       |
| 2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ .....                                 | 21    |
| 2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....   | 21    |
| 2.1.2. Hóa chất và thiết bị .....   | 21    |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....   | 21    |
| 2.2.1. Phương pháp thu mẫu .....  | 21    |
| 2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử .....                             | 22    |
| 2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....                               | 26    |

|   |    |
|---|----|
| Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....  | 27 |
| 3.1. KẾT QUẢ KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG <i>Prx</i> TỪ MẪU DỪA CẠN HOA HỒNG TÍM VÀ HOA TRẮNG .....  | 27 |
| 3.1.1. Kết quả khuếch đại đoạn gen <i>Prx</i> từ mRNA .....   | 27 |
| 3.1.2. Kết quả tách dòng đoạn gen <i>Prx</i> .....  | 28 |
| 3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG CỦA TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID SUY DIỄN TỪ ĐOẠN GEN <i>Prx</i> CỦA HAI MẪU DỪA CẠN NGHIÊN CỨU ..... | 34 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....   | 38 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO .....  | 40 |

## DANH MỤC BẢNG

|   | Trang |
|---|-------|
| Bảng 2.1. Thành phần phản ứng RT-PCR nhân gen <i>Prx</i> .....  | 23    |
| Bảng 2.2. Thành phần phản ứng gắn gen <i>Prx</i> vào vector tách dòng pBT .....   | 24    |
| Bảng 2.3. Thành phần phản ứng colony - PCR .....  | 25    |
| Bảng 3.1. Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của đoạn gen <i>Prx</i> (cDNA) .....   | 31    |
| Bảng 3.2. Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid suy diễn của protein <i>Prx</i> ở 2 mẫu dưa cạn TN 1-Hongtim, TN2-Trang và protein suy diễn từ AY924306 trên Ngân hàng gen ..... | 33    |
| Bảng 3.3. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự nucleotide của đoạn gen <i>Prx</i> ở 2 mẫu dưa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và 6 mẫu dưa cạn trên Ngân hàng gen.....             | 34    |
| Bảng 3.4. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự amino acid của protein <i>Prx</i> ở 2 mẫu dưa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang và 6 mẫu dưa cạn trên Ngân hàng gen.....            | 36    |

## DANH MỤC HÌNH

|  | Trang |
|--|-------|
| Hình 1.1. Hoa của ba giống <i>Catharanthus</i> .....   | 4     |
| Hình 1.2. Con đường tổng hợp vinblastine và vincristine .....  | 11    |
| Hình 1.3. Cấu trúc intron và exon của <i>CrPrx</i> .....   | 16    |
| Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn <del>cDNA</del> <del>DNA</del> .....   | 27    |
| Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR từ khuẩn lạc .....   | 28    |
| Hình 3.3. So sánh trình tự đoạn gen <i>Prx</i> của mẫu dừa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và AY924306 .....  | 30    |
| Hình 3.4. So sánh trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu dừa cạn TN 1-Hongtim, TN2-Trang và của protein suy diễn từ <del>AY924306</del> <del>AY924306</del> trên Ngân hàng gen. .... | 32    |
| Hình 3.5. Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng đoạn gen <i>Prx</i> của 8 mẫu dừa cạn.....  | 35    |
| Hình 3.6. Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng dựa trên trình tự amino acid suy diễn của 8 mẫu dừa cạn.....  | 36    |



## DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh   | Tiếng Việt                                |
|--------------|---|---|
| <i>CrPrx</i> | <i>Catharanthus roseus peroxidase</i>                           | Gen <i>Prx</i> ở cây dừa cạn              |
| <i>DAT</i>   | <i>Deacetylvindoline 4-O-acetyl tranferase</i>                  | Gen <i>DAT</i> ở cây dừa cạn              |
| DNA          | Deoxyribonucleic acid   | Axit Deoxyribonucleic                     |
| FDA          | Food and Drug Administration                                    | Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ |
| <i>ORCAs</i> | <i>Octadecanoid - responsive Catharanthus</i><br>AP2/ERF domain | Các gen <i>ORCA</i>                       |
| ORF          | Open read frame   | Khung đọc mở                              |
| PCR          | Polymerase chain reaction                                       | Phản ứng chuỗi trùng hợp                  |
| <i>Prx</i>   | <i>Peroxidase</i>   | Gen mã hóa peroxidase                     |
| Prx          | Peroxidase  | Protein peroxidase                        |
| RNA          | Ribonucleic acid  | Axit Ribonucleic                          |
| TIAs         | Terpenoid indole alkaloids                                      |   |

## MỞ ĐẦU

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự thay đổi khí hậu toàn cầu dẫn tới sự khắc nghiệt của thời tiết, môi trường sống bị ô nhiễm, thói quen sinh hoạt của con người thay đổi... Những yếu tố này tác động đến sức khỏe của con người, làm gia tăng nguy cơ mắc bệnh, trong đó có nguy cơ các tế bào bị biến đổi. Đây là một trong các nguyên nhân làm cho số ca mắc bệnh ung thư ngày càng tăng. Trong khi đó, các loại thuốc chữa trị ung thư chưa nhiều và giá thành của chúng khá đắt. Vì thế, một trong những nhiệm vụ hàng đầu của các nhà khoa học là nghiên cứu, cải tiến các biện pháp chữa trị ung thư để kéo dài thời gian sống cho người bệnh. Xu hướng của thế giới hiện nay là nghiên cứu phương pháp làm tăng hàm lượng alkaloid ở cây thảo dược để hạ giá thành thuốc chữa bệnh.

Dừa cạn là một trong những cây có khả năng sản xuất các indol alkaloid có dược tính quan trọng trong chế tạo các loại thuốc chống ung thư. Đặc biệt là hai loại vinblastine, vincristine có tác dụng chữa ung thư máu. Nhưng các chất này lại có hàm lượng rất nhỏ trong tế bào thực vật (khoảng nửa tấn lá khô dừa cạn mới chiết được 1g vinblastine cho sản xuất dược phẩm, còn vincristine thì ít hơn 10 lần nữa [6]) và không thể tổng hợp bằng con đường hóa học do chúng có cấu trúc rất phức tạp. Do vậy, nâng cao hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn theo hướng công nghệ gen là một hướng nghiên cứu được quan tâm bởi nhiều nhà khoa học trên thế giới. Để triển khai theo hướng nghiên cứu này, nhiều gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp alkaloid trong dừa cạn đã được phân lập và nghiên cứu.

Trong cây dừa cạn, vinblastine và vincristine được tạo ra từ sự kết hợp các tiền chất như catharanthine và vindoline dưới sự điều khiển của một số gen như *DAT*, *ORCA3*, *Prx*... Trong đó, peroxidase (*Prx*) là một enzyme quan

trọng xúc tác ở giai đoạn cuối của quá trình tổng hợp vinblastine và vincristine.

Nâng cao khả năng tổng hợp vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn để phục vụ cho việc tạo thuốc chữa bệnh ung thư là rất cần thiết. Để tăng năng suất tổng hợp hai loại alkaloid trên, việc nghiên cứu đặc điểm gen mã hóa enzyme xúc tác là rất quan trọng. Tuy nhiên, hiện nay trên thế giới và Việt Nam chưa có nhiều công trình nghiên cứu về các gen này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu đặc điểm gen mã hóa peroxidase ở cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)”**.

## 2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Xác định được trình tự đoạn gen mã hóa enzyme Prx ở cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) mẫu hoa hồng tím, hoa trắng và so sánh với một số trình tự đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế.

So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein Prx hai mẫu hoa hồng tím, hoa trắng với một số trình tự amino acid đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế.

## 3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Khuếch đại tách dòng và xác định trình tự đoạn gen *Prx* của hai mẫu dừa cạn hoa hồng tím và hoa trắng.
- So sánh trình tự đoạn gen *Prx*, trình tự amino acid suy diễn của protein Prx các mẫu dừa cạn nghiên cứu với một số trình tự đã công bố trên Ngân hàng gen.

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG VÀ MỘT SỐ CÔNG DỤNG CỦA CÂY DỪA CẠN

##### 1.1.1. Đặc điểm chung của cây dừa cạn

Giống *Catharanthus* có nguồn gốc ở Madagasca với 8 loài, trừ loài *C. pusillus* (Murr) G. Don tìm thấy đầu tiên ở Ấn Độ, Srilanka. Từ Madagasca loài dừa cạn được di nhập sang nhiều nước nhiệt đới Nam Á cũng như Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam và đảo Hải Nam - Trung Quốc [1].

Ở Việt Nam, dừa cạn có vùng phân bố tự nhiên tương đối đặc trưng từ tỉnh Quảng Ninh đến Kiên Giang dọc theo vùng ven biển, tập trung ở các tỉnh miền Trung như Thanh Hóa, Nghệ An, Thừa Thiên - Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng, Bình Định và Phú Yên. Ở những vùng phân bố tự nhiên ven biển, dừa cạn mọc trên các bãi cát dưới rừng phi lao, trảng cỏ, cây bụi thấp, có khả năng chịu đựng điều kiện đất đai khô cằn của vùng cát ven biển. Cây dừa cạn còn được trồng khắp nơi trong nước để làm cảnh và làm thuốc [1].

Cây dừa cạn hay hải đằng, dương giác, bông dừa, trường xuân hoa... thuộc họ *Apocynaceae*, bộ *Gentianales*, có tên khoa học là: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [36].

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don là nguồn giàu alkaloid thuộc chủng loại alkaloid terpenoid indole được biết đến với 3 giống cây khác nhau: ‘*roseus*’ với hoa màu hồng tím; ‘*ocellatus*’ với hoa màu trắng, nhụy đỏ; ‘*albus*’ với hoa màu trắng. Trong đó giống hoa màu hồng tím có hàm lượng vincristine và vinblastine cao nhất [36].



**Hình 1.1.** Hoa của ba giống *Catharanthus*

A: *Catharanthus roseus* var. *roseus*

B: *Catharanthus roseus* var. *ocellatus*

C: *Catharanthus roseus* var. *albus*

Cây dừa cạn là cây thân thảo sống lâu năm, cao 40-60 cm, phân nhiều cành, cây có bộ rễ phát triển, thân gỗ ở phía gốc, mềm ở phần trên. Mọc thành bụi dày [1].

Lá mọc đối, thuôn dài, đầu lá hơi nhọn, cuống lá hẹp nhọn, dài 4-6cm, rộng 2-3cm, hai mặt nhẵn, mặt trên sẫm bóng, mặt dưới nhạt [1].

Hoa trắng hoặc hồng tím, có mùi thơm. Hoa đều, lưỡng tính, mẫu 5. Hoa mọc riêng lẻ ở kẽ lá gần ngọn. Quả gồm 2 đại, dài 2-4cm, rộng 2-3cm, mọc thẳng đứng, hơi ngả sang hai bên, trên vỏ có vạch dọc, đầu quả hơi tù, trong quả chứa 12-20 hạt nhỏ màu nâu nhạt, hình trứng, trên mặt hạt có các hạt nổi thành đường chạy dọc. Mùa hoa quả gần như quanh năm [1].

### 1.1.2. Một số công dụng của cây dừa cạn

Trong tất cả các bộ phận của cây dừa cạn đều chứa alkaloid. Người ta đã chiết, phân lập ra trên 150 alkaloid khác nhau, chủ yếu là vinblastine, vincristine, tetrahydroalstonine, pirinine, vindoline, catharanthine, vindolinine, ajmalicin... Trong đó, ajmalicin có hiệu quả tốt trong điều trị rối loạn thần kinh tim. Còn vinblastine và vincristine có tác dụng làm ngừng sự

phân chia tế bào ở pha giữa do có khả năng liên kết đặc hiệu với tubulin, protein ống vi thể ở thoi phân bào. Vì thế, chúng được sử dụng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị ung thư [1].

Theo kinh nghiệm dân gian ở Việt Nam và Trung Quốc, có nơi dùng thân và lá phơi khô, sắc uống để thông tiểu tiện, chữa bệnh đi tiểu đỏ và ít, làm thuốc điều kinh, tẩy giun, chữa sốt, chữa bệnh ngoài da [1].

## **1.2. HỢP CHẤT ALKALOID**

### **1.2.1. Alkaloid ở thực vật**

#### ***1.2.1.1. Đặc điểm chung của alkaloid***

Alkaloid là những chất hữu cơ có chứa dị vòng nitơ và có tính base, thường gặp trong nhiều loại thực vật và đôi khi còn tìm thấy trong một vài loài động vật. Đặc biệt, alkaloid có hoạt tính sinh lý rất cao đối với cơ thể con người và động vật, nhất là đối với hệ thần kinh. Với một lượng nhỏ alkaloid là chất độc gây chết người nhưng có khi nó là thần dược trị bệnh đặc hiệu. Hàm lượng alkaloid có thể đạt tới 10% trong các loại rau quả thông dụng như khoai tây, chè, cà phê [9].

Các alkaloid thông thường được phân loại theo đặc trưng phân tử chung của chúng, dựa theo kiểu trao đổi chất được sử dụng để tạo ra phân tử. Khi người ta chưa biết nhiều về tổng hợp sinh học của alkaloid, thì chúng được gộp nhóm theo tên của các hợp chất đã biết. Ví dụ: do các cấu trúc phân tử xuất hiện trong sản phẩm cuối cùng nên các alkaloid thuộc phenanthren đôi khi còn được gọi là các “phenanthren”. Hay gọi tên dựa theo nhóm động/thực vật mà từ đó người ta chiết xuất ra các alkaloid, ví dụ như các alkaloid chiết từ cây dừa cạn *vinca* thì được gọi chung là các *vinca* alkaloid [9].

### ***1.2.1.2. Tính chất của alkaloid***

Phần lớn alkaloid trong tự nhiên công thức cấu tạo có oxy thường ở thể rắn ở nhiệt độ thường. Ví dụ: Morphine, codeine, strychnine, quinine, reserpine. Những alkaloid mà thành phần cấu tạo không có oxy thường ở thể lỏng. Nhưng cũng có một số trường hợp ngoại lệ ở thể rắn. Ví dụ: Coniin, nicotine, sparteine. Các alkaloid ở thể rắn thường kết tinh và có điểm chảy rõ ràng, nhưng cũng có một số alkaloid không có điểm chảy vì bị phân hủy bởi nhiệt độ trước khi chảy [24].

Đa số alkaloid không mùi, có vị đắng và một số ít có vị cay như capsaixin, piperine... Hầu hết các alkaloid đều không màu, trừ một số alkaloid có màu vàng như berberine, palmatine, chelidonine. Các alkaloid base không tan trong nước, dễ tan trong các dung môi hữu cơ như methanol, ethanol, ether, chloroform, benzen... Muối của alkaloid dễ tan trong nước, hầu như không tan trong các dung môi hữu cơ. Dựa vào độ tan khác nhau của alkaloid base và muối alkaloid người ta sử dụng dung môi thích hợp để chiết xuất và tinh chế alkaloid. Do có tính base yếu nên có thể giải phóng alkaloid ra khỏi muối của nó bằng dung dịch kiềm trung bình và mạnh như  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$ ... [24].

Trước đây người ta cho rằng, nhân cơ bản của các alkaloid là do các chất đường hay dẫn suất của đường kết hợp với amoniac để có nitơ sinh ra. Ngày nay, bằng phương pháp dùng các nguyên tử đánh dấu (đồng vị phóng xạ) người ta chứng minh được rằng các alkaloid tạo ra từ các amino acid và đã có nhiều nghiên cứu tổng hợp alkaloid từ amino acid [34].

Qua nghiên cứu định tính và định lượng các alkaloid trong các bộ phận khác nhau của cây và theo dõi sự vận chuyển của chúng trong quá trình phát triển của cây người ta thấy, nơi tạo ra alkaloid không phải là nơi tích tụ nhiều alkaloid. Nhiều alkaloid được tạo ra ở rễ sau đó vận chuyển lên phần trên mặt



đất của cây. Sau khi thực hiện những biến đổi thứ cấp chúng được tích lũy ở lá, quả và hạt. Ví dụ: L-hyoscyamin trong cây cà độc dược (*Atropa belladonna*) được tạo ra ở rễ, sau đó chuyển lên phần trên mặt đất. Khi cây 1 tuổi thân cây chứa nhiều alkaloid hơn lá, khi cây 2 tuổi thân cây hóa gỗ nhiều hơn, hàm lượng alkaloid giảm xuống, hàm lượng alkaloid ở phần ngọn đạt được mức tối đa vào lúc cây ra hoa và giảm đi khi quả chín [6]. Ngoài ra, hàm lượng của alkaloid trong cây cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố như khí hậu, ánh sáng, chất lượng đất, giống cây và bộ phận thu hái [26].

#### **1.2.1.3. Một số nghiên cứu nâng cao khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp bằng kỹ thuật nuôi cấy mô**

Tsay và cộng sự (1994) đã nghiên cứu sản xuất imperatorin từ nuôi cấy tế bào huyền phù của cây bạch chỉ (*Angelica dahurica* var. *Formosana*). Đây là một loài cây bản địa lâu năm ở Đài Loan, được sử dụng để chữa chứng đau đầu và bệnh vẩy nến. Imperatorin được xem là thành phần hoạt động chính trong điều trị các bệnh về da. Nếu sản xuất cây bạch chỉ bằng phương pháp nhân giống truyền thống thì sẽ mất một thời gian dài mới có thể đáp ứng được nhu cầu. Vì vậy phương pháp nuôi cấy tế bào huyền phù sản xuất imperatorin đã được chọn lựa sử dụng [27].

Berberine là một isoquinoline alkaloid có trong hệ rễ của cây hoàng liên (*Coptis japonica*) và vỏ của cây quan hoàng bá (*Phellodendron amurense*). Berberine chloride được sử dụng để chữa bệnh rối loạn tiêu hóa. Để thu được nguyên liệu thô từ rễ cây *Coptis* phải mất 5-6 năm. Yamada và Sato (1981) đã chọn dòng tế bào có khả năng sản xuất berberine cao của loài *C.japonica* [31]. Sau đó, công ty hóa dầu Mitsui (Nhật Bản) đã cải thiện được năng suất bằng cách thêm 8-10M gibberellic acid vào môi trường nuôi cấy, hiệu suất berberine tăng lên rất nhiều đến 1,66 g/l [19].



Merkli và cộng sự (1997) đã nuôi cấy rễ tơ của cây cỏ ca ri (*Trigonella foenum-graecum*) bằng cách gây nhiễm chủng A4 của *Agrobacterium rhizogenes*. Các rễ tơ này đã sản xuất diosgenin, một spirostanol quan trọng cho sự bán tổng hợp của các hormon steroid [18].

Yel và cộng sự (1994) đã nghiên cứu sản xuất diosgenin bằng nuôi cấy tế bào huyền phù của cây củ nâu (*Dioscorea doryophola*). Phương pháp này được sử dụng như một cách để thay thế quá trình tổng hợp steroid [32].

Miyasaka và cộng sự (1989) đã nghiên cứu sản xuất cryptotanshinone từ nuôi cấy callus cây xô thơm đỏ (*Salvia miltiorrhiza*). Nồng độ cao nhất của cryptotanshinone thu được trong callus nuôi cấy trên môi trường có 0,2 mg/l BA trong 6 ngày là 4,59 mg/g khối lượng khô [20].

Podophyllotoxin là một aryltetralin lignan chống khối u được tìm thấy ở các cây thuộc họ Hoàng liên gai như *Podophyllum peltatum* và *Podophyllum hexandrum*. Nó cũng được dùng để tổng hợp các dẫn xuất etoposide và teniposide, sử dụng rộng rãi trong điều trị chống khối u. Tuy nhiên, trong tự nhiên những cây này sinh trưởng rất chậm, vì thế đã hạn chế việc cung cấp podophyllotoxin, bắt buộc chúng ta phải hướng tới một phương thức thay thế khác. Nuôi cấy tế bào để sản xuất podophyllotoxin đã được Kadkade và cộng sự thực hiện lần đầu tiên vào năm 1981 và 1982. Woerdenberg và cộng sự (1990) đã bổ sung phức hợp coniferyl alcohol và  $\beta$ -cyclodextrin trong môi trường nuôi cấy tế bào huyền phù của *Podophyllum hexandrum*. Khi bổ sung 3mM phức hợp coniferyl alcohol và  $\beta$ -cyclodextrin đã làm tăng hiệu suất podophyllotoxin lên 0,013% theo khối lượng khô, trong khi các môi trường nuôi cấy không có phức hợp trên chỉ sản xuất được 0,0035% podophyllotoxin [11] [30].

Ứng dụng nuôi cấy tế bào thực vật để sản xuất các hợp chất thứ cấp đã tạo ra một bước tiến xa trong khoa học thực vật. Việc phát triển và sử dụng

các công cụ di truyền cũng như sự hiểu biết ngày càng sâu sắc hơn về bản chất của tế bào và các phương thức điều hòa quá trình chuyển hóa trao đổi chất thứ cấp là cơ sở cho việc sản xuất chúng ở quy mô thương mại [23].

Ở Việt Nam, công nghệ tách chiết các hợp chất thứ cấp chủ yếu gắn liền với công nghệ nuôi cấy tế bào bắt đầu hình thành và phát triển vào năm 1970. Từ đó đến nay đã đạt được nhiều thành công, đáng kể nhất là quy trình sản xuất sâm Ngọc Linh do Học viện Quân y khai thác. Chỉ với một vài tế bào từ rễ của sâm Ngọc Linh, bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, các nhà khoa học của Học viện Quân y đã có thể sản xuất sâm Ngọc Linh với số lượng lớn trong vòng 10-20 ngày. Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ nhân sâm Ngọc Linh được cấp bằng độc quyền sáng chế số 7523 vào ngày 11/2/2009 tại Việt Nam [2].

Việt Nam cũng đang triển khai các dự án nuôi cấy và chiết xuất taxol từ cây thông đỏ ở Lâm Đồng. Ngoài ra, còn có nghiên cứu sản xuất artemisinin dùng kỹ thuật nuôi cấy tế bào từ cây thanh hao hoa vàng của Viện sinh học Nhiệt đới trong nghị định thư hợp tác với Malaysia (2007-2010), Đại học Huế nghiên cứu khả năng tích lũy glycoalkaloid ở callus cây cà gai leo *Solanum hainanense*. Tuy nhiên, những dự án nói trên vẫn ở quy mô phòng thí nghiệm [2].

## **1.2.2. Alkaloid ở cây dừa cạn**

### ***1.2.2.1. Các alkaloid chính trong cây dừa cạn***

Alkaloid toàn phần có ở lá dừa cạn với hàm lượng 0,37-1,15%, thân 0,40%, rễ chính 0,7-2,4%, rễ phụ 0,9-3,7%, hoa 0,14-0,84%, vỏ quả 1,14%, hạt 0,18%. Trong số các loại alkaloid có trong *Catharanthus roseus*, đặc biệt chú ý nhóm 20 alkaloid dimeric là những nhóm có hoạt tính chống ung thư, bao gồm vincristine và vinblastine [22].

Vinblastine có ở lá cây dừa cạn với hàm lượng 0,013-0,063%, ở bộ phận trên mặt đất 0,0015%, ở rễ 0,23%. Nếu cây bị bệnh *asteryllow-virus* thì sẽ không có vinblastine. Vincristine có hàm lượng thấp hơn vinblastine, khoảng 0,0003-0,0015% trong các bộ phận của cây [22].

Ở Việt Nam, lá dừa cạn thu thập ở nhiều địa phương khác nhau chứa hàm lượng alkaloid toàn phần từ 0,7-1,2%, cao nhất ở Phú Yên (1,21-1,62%). Vinblastine có với hàm lượng 1,6-2,0 phần vạn ở lá. Thời gian thu hái nguyên liệu tốt nhất để trên cây có hàm lượng hoạt chất cao là vào cuối tháng 8 đến giữa tháng 9 dương lịch [22].

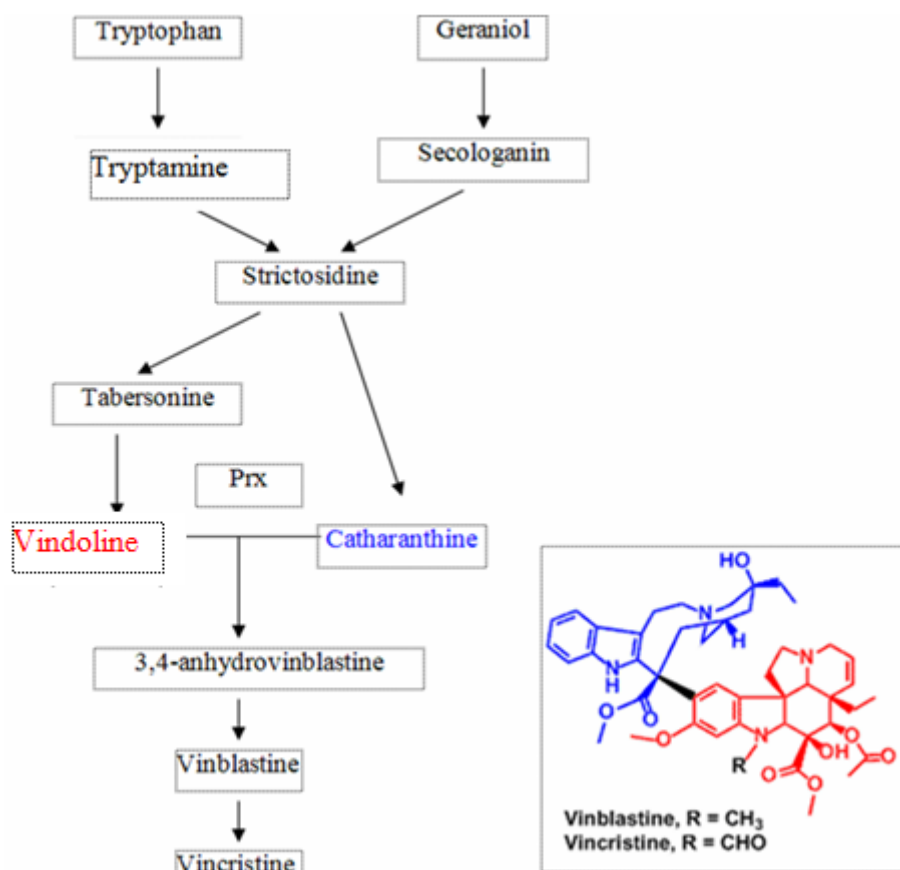
Ngoài hai alkaloid chính là vinblastine và vincristine được chiết xuất, nhiều tác giả đã bán tổng hợp được vinblastine từ cathanthine và vindoline có ở dừa cạn và vincristine (có với hàm lượng thấp) từ vinblastine (có với hàm lượng cao hơn) [15].

Lần đầu tiên ở Việt Nam đã nghiên cứu thành công phương pháp phân lập ajmalicin từ alkaloid toàn phần đã khử hóa của rễ dừa cạn mà không dùng sắc kí cột cũng như các dung môi độc hại như benzen, cloroform. Từ hỗn hợp alkaloid toàn phần đã khử hóa, ajmalicin được phân lập bằng dung môi thông dụng, không độc hại là ethanol và hỗn hợp ethyl acetat-n-hexan. Từ đó đã xây dựng một quy trình đơn giản, không độc hại để phân lập ajmalicin. Lượng ajmalicin chiết xuất và phân lập được đạt 0,184% khối lượng khô [3].

Những alkaloid này chỉ là chiếm lượng nhỏ trong cây, vì vậy nếu muốn sản xuất thì phải cần số lượng rất lớn nguyên liệu thô để chiết xuất [15].

#### ***1.2.2.2. Sinh tổng hợp vinblastine và vincristine ở cây dừa cạn***

Vinblastine và vincristine được tạo thành từ sự ghép nối của hai monomer alkaloid là catharanthine (indole) và vindoline (dihydroindole), cả hai đều xuất hiện tự do trong cây. Vincristine cũng có cấu trúc tương tự như vinblastine nhưng thay nhóm formyl bằng một nhóm methyl trên phân tử nitrogen indole của vindoline [22].



**Hình 1.2.** Con đường tổng hợp vinblastine và vincristine [17]

Những alkaloid này được hình thành bởi sự kết hợp của hai nửa, một nửa là indole và một nửa là dihydroindole. Vì thế, chúng được biết đến với tên gọi là “dimer alkaloid” hoặc “bisindole alkaloid” [22].

Sự khác nhau của *Catharanthus* alkaloid phụ thuộc vào loại terpenoid indole alkaloid (TIA). Chúng gồm hai nửa bắt nguồn từ hai quá trình chuyển hóa riêng biệt là quá trình mevalonate cho nửa không chứa tryptophan và quá trình tryptophan cho nửa chứa tryptophan. Cấu trúc phức tạp của những alkaloid này luôn có mặt hai nguyên tử nitơ. Một là indole nitơ (nửa bắt nguồn từ tryptophan). Và nguyên tử nitơ thứ hai được tạo thành từ sự tách rời của hai carbon tại vị trí  $\beta$  của vòng indole. Nửa không có tryptophan bắt nguồn từ acid mevalonic và nó là một C<sub>10</sub>-geraniol (monoterpenoid). Geraniol

được tạo thành, thông qua một chuỗi chuyển hóa sẽ chuyển thành dạng loganin và sau đó là secologanin (một monoterpenoid glucoside) [7].

Chìa khóa trung gian trong thuyết phát sinh sinh học của những monoterpenoid indole alkaloid là 3 $\alpha$  (S)-strictosidine, tạo thành từ sự ngưng hoạt tính enzyme của tryptamine và secologanin. Enzyme chịu trách nhiệm cho phản ứng quan trọng này là strictosidine synthase. Strictosidine sau đó sẽ hình thành cấu trúc cathenamine (alkaloid loại corynanthe). Enzyme liên quan ở đây là cathenamine synthase. Cathenamine sau đó phải trải qua một chuỗi các phản ứng để dẫn đến sự hình thành catharanthine (alkaloid loại iboga) và vindoline (alkaloid loại aspidosperma). Catharanthine và vindoline là các alkaloid monomeric indole, xuất hiện tự do trong cây. 3',4'-Anhydrovinblastine là chìa khóa trung gian từ sự ghép nối của catharanthine và vindoline, các enzyme liên quan là những peroxidase. Sau đó nó được chuyển thành vinblastine [4].

#### ***1.2.2.3. Vinca alkaloid và khả năng chữa trị ung thư***

Năm 1958, người ta đã chiết được một loại alkaloid từ lá dừa cạn là vincalucoblastine (còn gọi là vinblastine). Sau đó 4 năm, người ta tìm thêm một alkaloid nữa là vincalucocristine (còn gọi là vincristine). Hàm lượng các alkaloid này trong dừa cạn rất nhỏ (khoảng 1 phần vạn trong lá dừa cạn khô đối với vinblastine, còn đối với vincristine thì ít hơn 10 lần nữa) [28].

Vinca alkaloids đã được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường, huyết áp cao, các loại thuốc này thậm chí còn được sử dụng như chất khử trùng. Tuy nhiên, các vinca alkaloids chủ yếu được biết đến như chất chống ung thư. Người ta thường dùng vinblastine và vincristine làm thuốc chữa ung thư dưới dạng muối sulfat [23]. Hai alkaloid này là những chất ức chế mạnh sự phân bào. Chúng liên kết đặc hiệu với tubulin, là protein dạng sợi tạo nên thoi phân bào và ngăn cản sự kết hợp của những cấu trúc hình ống

có ở trong nguyên sinh chất của nhiều tế bào, ngăn cản sự tăng lên về số lượng trong kỳ giữa nguyên phân [28].

Vinblastine được các nhà khoa học Canada tình cờ phát hiện tính chất ức chế sự phân chia tế bào bạch cầu trên chuột khi nghiên cứu khả năng điều trị bệnh tiểu đường bằng cây dừa cạn vào năm 1958 [17]. Vinblastine được đồng ý đưa vào điều trị ung thư bởi tổ chức Food and Drug Administration (FDA) năm 1961 và đã trở thành một thành phần chính của phương pháp hóa trị liệu điều trị các tế bào mầm của tế bào ung thư, khối u ác tính và một số loại lymphoma cấp cao, bao gồm u lymphoma Hodgkin, u lymphoma không Hodgkin, u sùi dạng nấm, tế bào ung thư phổi nhỏ, ung thư vú, ung thư tinh hoàn tiến triển, bướu thịt Kaposi, bệnh mô bào huyết, ung thư nhau, choriocarcinoma (một loại ung thư tử cung)... Hiện nay, vinblastine được ứng dụng rộng rãi vào điều trị bệnh ung thư ở người. Vinblastine hấp thu nhanh chóng theo đường tiêm tĩnh mạch, thuốc phân bố nhanh vào các mô của cơ thể, liên kết nhiều với protein huyết tương. Vinblastine ít qua hàng rào máu não và không đạt nồng độ điều trị trong dịch não tủy. Vinblastine được chuyển hóa nhiều, chủ yếu ở gan để thành desacetyl vinblastine - là chất có hoạt tính mạnh hơn vincristine, thuốc thải trừ qua mật vào phân và nước tiểu, một số đào thải dưới dạng thuốc không biến đổi. Tác dụng phụ của vinblastine bao gồm: gây buồn nôn, nôn, táo bón, khó thở, tức ngực hoặc đau ở khối u, thở khò khè và sốt. Vinblastine sulfat gây kích ứng rất mạnh. Thuốc chỉ được tiêm tĩnh mạch bởi người có kinh nghiệm tiêm thuốc, thuốc không được tiêm bắp, dưới da hoặc trong màng não tủy. Vinblastine sulfat là một thuốc có độc tính cao và chỉ số điều trị thấp. Thuốc phải được sử dụng dưới sự giám sát thường xuyên của thầy thuốc có kinh nghiệm trong điều trị bằng các thuốc độc tế bào. Người bệnh suy mòn hoặc có những vùng loét trên da có thể dễ bị ảnh hưởng bởi tác dụng hạ bạch cầu của vinblastine. Vì vậy, phải dùng thuốc hết sức thận trọng cho người bệnh (đặc biệt là người bệnh cao

tuổi) có những tình trạng bệnh nói trên. Khi dùng cho người mang thai, vinblastine có thể gây độc cho thai. Thuốc chỉ được dùng ở thời kỳ mang thai khi tình trạng bệnh đe dọa tính mạng hoặc bệnh nặng mà các thuốc an toàn hơn không thể sử dụng được hoặc không có hiệu lực. Phụ nữ có khả năng mang thai nên tránh có thai trong khi dùng vinblastine. Trong thời gian điều trị vinblastine, nên ngừng cho con bú [23].

Vincristine là một alkaloid chống ung thư chiết xuất từ cây dừa cạn có tác dụng kích ứng mạnh các mô. Cơ chế tác dụng còn chưa biết thật chi tiết, nhưng vincristine là chất ức chế mạnh tế bào. Thuốc liên kết đặc hiệu với tubulin, phong bế sự tạo thành các thoi phân bào. Do đó, vincristine có tính đặc hiệu cao trên chu kỳ tế bào, và ức chế sự phân chia tế bào ở kỳ giữa (metaphase). Ở nồng độ cao, thuốc diệt được tế bào, còn ở nồng độ thấp, làm ngừng phân chia tế bào. Do thuốc có tính đặc hiệu với kỳ giữa của sự phân chia tế bào, nên độc lực với tế bào thay đổi theo thời gian tiếp xúc với thuốc. Sự kháng vincristine có thể xuất hiện trong quá trình điều trị và sự kháng chéo cũng thường xảy ra giữa các thuốc vincristine, vindesie và vinblastine, nhưng sự kháng chéo này thường không hoàn toàn. Vincristine sulfate là một trong những thuốc ung thư được dùng rộng rãi nhất, đặc biệt có ích đối với bệnh ung thư máu, thường được dùng để làm thuyên giảm bệnh bạch cầu lympho cấp. Vincristine sulfate được dùng trong liệu pháp phối hợp thuốc, là lựa chọn hàng đầu để điều trị bệnh Hodgkin, u bạch huyết không Hodgkin, ung thư biểu mô phổi, bạch cầu tủy bào mạn (đợt cấp tính), sarcom Ewing và sarcom cơ vân. Phối hợp thuốc chứa vincristine là lựa chọn hàng thứ hai cho ung thư biểu mô vú, ung thư cổ tử cung, u nguyên bào thần kinh và bệnh bạch cầu lympho mãn tính. Một số chuyên gia thường dùng vincristine chỉ để làm thuyên giảm và không dùng trong điều trị duy trì vì việc sử dụng kéo dài sẽ gây độc hại thần kinh. Thuốc gây độc hại tại chỗ, tốt nhất cho dùng thuốc bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch [23].



### 1.2.3. Một số gen liên quan đến quá trình tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn

Quá trình tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn có sự tham gia của nhiều nhân tố phiên mã và các gen chức năng như *DAT*, *ORCA3*, *Prx*... [29].

#### 1.2.3.1. *DAT* và *ORCA3*

*DAT* (*deacetylvindoline 4-O-acetyl tranferase*) là gen mã hóa cho enzyme tham gia vào sinh tổng hợp vindoline. Gen *DAT* đã được Benoit St Pierre và cộng sự phân lập và xác định trình tự trên cây dừa cạn vào năm 1998 với mã số AF053307. Gen *DAT* được phân lập từ mRNA lá dừa cạn, dài 1320 nucleotide mã hóa cho protein dài 439 amino acid. Gen *DAT* mã hóa cho enzyme acetyl CoA deacetylvindoline 4-O-acetyl tranferase, xúc tác cho bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp vindoline. Các nghiên cứu đã cho thấy rằng, sự cảm ứng của mRNA *DAT*, sự tích lũy protein và hoạt động của enzyme *DAT* xảy ra trong các mô đang diễn ra sự sinh tổng hợp vindoline như lá, lá mầm, hạt... Sự biểu hiện của mRNA, của protein và hoạt động của enzyme *DAT* đã được xác định ở các bào quan khác nhau trong cây dừa cạn. Enzyme *DAT* hoạt động mạnh nhất ở các lá non, giảm 76% ở các lá to và lá già. Thân và hoa chỉ chứa từ 5% đến 11% lượng enzyme này, trong khi ở rễ là không đáng kể [5].

Gen *ORCA3* mã hóa protein *ORCA3* là nhân tố phiên mã có vùng AP2, sự biểu hiện quá mức của gen *ORCA3* có thể làm tăng cường biểu hiện của các gen sinh tổng hợp các chất trao đổi khác như CPR, TDC, STR và làm tăng cường tích lũy TIA ở cây dừa cạn. Đoạn mã hóa của gen *ORCA3* gồm 611 nucleotide, mã hóa cho chuỗi polypeptide suy diễn gồm 203 amino acid với một vùng AP2 bảo thủ [14] [21].

#### 1.2.3.2. Protein *Prx* và gen mã hóa protein *Prx* ở cây dừa cạn

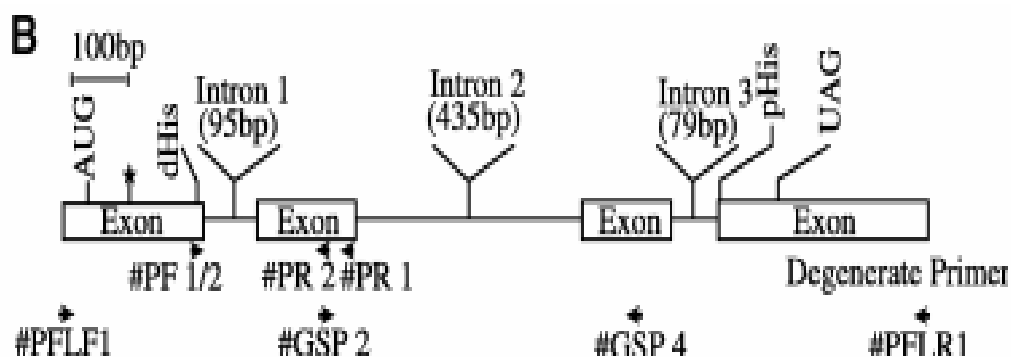
*Prx* là loại enzyme thực vật có khả năng sử dụng  $H_2O_2$  để oxy hóa một số chất cho quá trình chuyển hóa trung gian, đặc biệt là hợp chất phenol. Những enzyme này được định vị trên thành tế bào hoặc trong không bào, đây là sản phẩm của quá trình chuyển hóa trung gian. Chức năng sinh hoá của *Prx* trong cây dừa cạn đã được phát hiện bởi những nghiên cứu về khả năng oxy



hóa các hợp chất phenol sử dụng  $H_2O_2$ . Phân tích các hợp chất phenol từ không bào lá phát hiện sự có mặt của 3 axit caffeoylquinic và 4 flavonoid trong bào quan này. Điều thú vị là Prx hoạt động trong không bào chiếm tỷ lệ lên tới hơn 90% Prx tổng số trong lá [8].

Gen mã hoá enzyme Prx đã được phân lập từ mRNA của cây dừa cạn bởi Kumar và cộng sự (2007) có kích thước 1357 bp, vùng mã hoá gồm 993 nucleotide từ nucleotide số 41 đến nucleotide số 1034. Gen *Prx* mã hóa một sản phẩm protein gồm 330 amino acid với 21 amino acid của peptide tín hiệu. Khối lượng phân tử của Prx ước tính 37,43 kDa và có giá trị pI 8,68. mRNA và Prx đã được tìm thấy trong lá của cây dừa cạn và đã được xác định bằng phương pháp Northern blot và Western blot [12].

Để có được một cái nhìn sâu sắc về trình tự hoàn chỉnh của *CrPrx*, Kumar S. và cộng sự (2007) đã thực hiện PCR bằng cách sử dụng cặp mồi PFLF1 và PFLR1, được thiết kế bám để bảo tồn vùng 5'-UTR và vùng 3'-UTR trên DNA của *C. roseus*. Sản phẩm khuếch đại khi nhân bản và trình tự được tìm thấy dài 1793 bp. *CrPrx* bao gồm bốn exon (268 bp, 189 bp, 172 bp, 405 bp, dừng lại ở UAG) và ba intron (95 bp, 435 bp, 79 bp). Intron thứ hai trong *CrPrx* đã được tìm thấy có kích thước lớn nhất và lớn hơn so với các exon. Cấu trúc *CrPrx* này hỗ trợ các quan điểm về nguồn gốc của peroxidases ở *Catharanthus roseus* từ một gen tổ tiên chung với các loài khác có ba intron và bốn exon [12].



**Hình 1.3.** Cấu trúc intron và exon của *CrPrx* [12]

Phân tích Northern Blot cho thấy biểu hiện của *CrPrx* khác nhau trong các cơ quan khác nhau. Trong các mô sinh dưỡng, biểu hiện nhiều nhất trong các mô liên nút gốc, tiếp theo là rễ, lá non và lá trưởng thành. Trong các mô sinh sản, biểu hiện nhiều nhất trong quả, tiếp theo là nụ hoa. Biểu hiện *CrPrx* đã không được phát hiện trong lá già và hoa [12].

Năm 2008, người ta đã phân lập được gen mã hóa enzyme anhydrovinblastine synthase từ cDNA, gen này được xác định thuộc lớp III peroxidase có mặt trong lá *C.roseus* và đặt tên *CrPrx1*. *CrPrx1* có 1388 nucleotide, vùng mã hóa từ nucleotide số 43 đến nucleotide số 1134, trình tự amino acid suy diễn tương ứng gồm 363 amino acid, trong đó có đoạn peptide tín hiệu nằm ở đầu tận cùng N điều khiển sự vận chuyển loại protein này trong tế bào [15].

Gen *Arabidopsis Prx* (*AtPrx12*) là gen có tương đồng cao nhất với *CrPrx1*. Gen *AtPrx12* chứa hai intron, có vùng mã hóa gần như hoàn toàn giống với các vùng tương ứng trong *CrPrx1*. Do đó, người ta dự đoán rằng gen *CrPrx1* cũng có thể chứa hai intron ở các vị trí tương đương. Thiết kế mồi ở vị trí giả định của intron người ta đã khuếch đại được một intron bởi PCR. Intron I của *CrPrx1* bao gồm 828 bp, được lắp vào vị trí 300 của cDNA, và hai bên là các dinucleotide - GT và - AG. Intron thứ hai cũng có mặt và có khả năng cùng ở trong một vị trí tương đương với intron II của gen *AtPrx12*. Tuy nhiên, cố gắng để khuếch đại intron II *CrPrx1* với các cặp mồi oligonucleotide khác nhau liên tục thất bại. Người ta dự đoán rằng khó khăn trong việc khuếch đại intron II của gen *CrPrx1* có thể là do kích thước lớn của nó. Sau đó, bằng phương pháp Southern blots người ta đã xác định được số lượng bản sao gen của *CrPrx1* và kích thước của intron II. Kết quả, xuất hiện một band duy nhất, điều đó cho thấy rằng *CrPrx1* tồn tại như một gen đơn bản sao trong *C. Roseus*, kích thước ước tính của intron II là 3,5-4,0 kb [15].

Phân tích phát sinh loài cũng cho thấy *CrPrx1* thuộc về một nhánh tiến hóa của không bào peroxidases lớp III.

Năm 2011, Kumar S. và cộng sự đã tách dòng và giải trình tự của hai gen peroxidase lớp III mới, *CrPrx3* và *CrPrx4* từ cDNA cây *Catharanthus roseus*. Chiều dài đầy đủ của *CrPrx3* là 1233 bp, mã hóa chuỗi polypeptid gồm 330 amino acid. *CrPrx4* dài 1055 bp, có vùng mã hóa gồm 956 nucleotide và mã hóa cho 318 amino acid. Giả định mô hình cấu trúc 3-D của *CrPrx3* và *CrPrx4* đã phát hiện sự hiện diện của hai  $\text{Ca}^{(+2)}$  bằng các liên kết ion ở hai đầu, và một nhóm heme phối hợp tại vị trí trung tâm. *CrPrx3* và *CrPrx4* đều có một bản sao duy nhất trong *C. roseus*. Phân tích phát sinh loài cho thấy *CrPrx3* và *CrPrx4* là apoplastic trong tự nhiên. Cả hai gen trên đều có sự biểu hiện trong một loạt các mô thực vật. Định lượng bằng real-time PCR đã xác nhận, chúng biểu hiện tối đa trong mô thân tiếp theo là mô hoa [13].

#### **1.2.3.3. Một số nghiên cứu về gen mã hóa Prx ở thực vật**

Cây chè (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) có khả năng tích lũy khá nhiều kim loại nặng. Khi nồng độ các kim loại nặng như chì trong cây cao, ROS (Oxy phản ứng) được tạo ra và khi nồng độ ROS cao sẽ gây hại cho cây trồng. Các gen *glutathione peroxidase* có chức năng tích cực làm giảm thiệt hại gây ra bởi ROS. Để hiểu được cơ chế của khả năng chịu áp lực với kim loại nặng của cây chè, một gen *glutathione peroxidase* mới của cây chè đã được tách dòng và biểu hiện của nó được phân tích dưới áp lực của các nhân tố vô sinh và hữu sinh. Đoạn cDNA từ gen *glutathione peroxidase* của cây chè được khuếch đại, giải trình tự và đăng kí mang tên *CsGPX2* (mã số JQ247186) trên Ngân hàng gen Quốc tế. Chuỗi dài đầy đủ này gen này là 917 nucleotide, trong đó có 510 nucleotid mã hóa amino acid, mã hóa một chuỗi polypeptide gồm 169 amino acid. Chuỗi amino acid suy diễn từ gen *CsGPX2* của cây chè có độ tương đồng cao với trình tự amino acid suy diễn từ gen

*glutathione peroxidase* của thực vật hạt kín và tương đồng cao nhất với *glutathione peroxidase* của cây thầu dầu (*Ricinus communis*) (mã số NO.XP\_002509790.1). Gen *CsGPX2* phản ứng mạnh với hầu hết stress phi sinh học bao gồm độ mặn, nhiễm độc kim loại nặng, hạn hán, nhiệt, hormone thực vật [10].

Peroxidases là một dòng của isozyme được tìm thấy trong tất cả thực vật, chúng là các glycoprotein monomeric heme sử dụng  $H_2O_2$  hoặc  $O_2$  để oxy hóa một loạt các phân tử. Những enzyme quan trọng này được sử dụng trong các xét nghiệm miễn dịch, xét nghiệm chẩn đoán và phản ứng enzyme ở qui mô công nghiệp. Kỹ thuật chuyển gen đã được sử dụng để nghiên cứu các chức năng sinh lý và cấu trúc phân tử của các gen *Prx* trong thực vật. Người ta đã nghiên cứu chuyển các gen *Prx* để phân tích chức năng của các enzyme và promoter của chúng. Về chức năng của *Prx*, người ta nhận thấy rằng khi tăng hoạt động của các gen *TPX2* ở cà chua hoặc các gen *swap1* ở khoai lang sẽ làm tăng khả năng chịu mặn hay stress oxy hóa ở cây [33].

Glutathione Peroxidases (Gpxs) là các enzyme chống oxy hóa trong nốt sần cây họ đậu cho đến nay ít được nghiên cứu. Chức năng của hai gen *Gpxs* có mặt trong các nốt sần cây đậu *Lotus japonicus* đã được kiểm tra. Phân tích biểu hiện gen trong tế bào nấm men, lai tại chỗ mRNA và protein huỳnh quang đã được sử dụng để mô tả các enzyme và sự phiên mã của gen trong nốt sần. *LjGpx1* và *LjGpx3* được nitro hóa trong ống nghiệm hoặc trong thực vật rồi được xử lý với S-nitrosoglutathione. Kết quả là những biến đổi của peroxidatic cysteine của *LjGpx3* trong thử nghiệm *in vitro* thay đổi cùng với sự ức chế enzyme. Các enzyme thường có mặt trong các vùng bị nhiễm bệnh, nhưng mRNA của *LjGpx3* cũng được phát hiện trong vỏ và bó mạch. *LjGpx1* được định vị ở lập thể và nhân, còn *LjGpx3* ở bào tương và lưới nội chất. Dựa trên các thí nghiệm bổ sung nấm men, cả hai enzyme đều chống lại sự oxy hóa, sự mặn, và tổn thương màng. Có thể kết luận rằng, cả hai

*LjGpxs* thực hiện chức năng chống oxy hóa quan trọng trong nốt sần, ngăn ngừa peroxide lipid và các quá trình oxy hóa khác ở các mạch và các tế bào bị nhiễm bệnh [16].

Nói chung trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu về *Prx* ở thực vật và số ít ở động vật, tuy nhiên việc nghiên cứu về gen này trên cây dứa còn hạn chế.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về cây dứa chỉ được tập trung vào khảo sát hàm lượng alkaloid, phương pháp nuôi cấy và phương pháp chiết rút để thu sản phẩm alkaloid từ cây dứa. Tuy nhiên, nghiên cứu sinh học phân tử các gen liên quan đến cơ chế sinh tổng hợp các alkaloid ở dứa còn ít được đề cập tới.

## Chương 2

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

##### 2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cây dứa cựa (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) hoa màu hồng tím, ký hiệu là TN 1-Hongtim và hoa màu trắng, ký hiệu là TN2-Trang, thu thập ở tỉnh Thái Nguyên.

##### 2.1.2. Hóa chất và thiết bị

Sử dụng các hoá chất: Trizol Regents, DEPC, EDTA, SDS, Tris-HCl, Isopropanol, X-gal, Kanamycin, Agar, Agarose, cồn tuyệt đối, vector tách dòng pBT, Bộ Kit dùng cho phản ứng PCR, bộ Kit tách dòng “TA cloning Kit” (hãng Invitrogen), bộ Kit tách plasmid tái tổ hợp “Accuprep™ Plasmid Mini Extraction Kit” do hãng Bioneer cung cấp, Kit tinh sạch sản phẩm RT-PCR là QIA quick Gel Extractionkit DNA extraction Kit K05013 của hãng Fermentas, các cặp mồi đặc hiệu nhân gen *Prx*. Ngoài ra còn một số hóa chất khác.

Máy li tâm lạnh eppendorp của Đức , máy PCR Eppendorp (Đức), bộ điện di DNA của hãng Bio - Rad, máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM® 3100 Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) và một số thiết bị khác.

#### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

##### 2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Thu thập mẫu dứa cựa có hoa màu hồng tím và hoa trắng ở khu vực thành phố Thái Nguyên, cây dứa cựa được chọn đều là các cây khỏe mạnh, hoa đẹp. Tiến hành trồng các cây này ở một địa điểm thích hợp có cường độ ánh sáng vừa đủ, tưới nước hàng ngày với lượng nước như nhau. Sau một thời gian, thu hoạch lá non để tiến hành tách mRNA.

### 2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử

#### 2.2.2.1. Phương pháp tách chiết mRNA tổng số

Chúng tôi tiến hành tách chiết mRNA tổng số theo các bước như sau:

1. Nghiền nhanh 100mg mẫu trong nitơ lỏng thành bột mịn.
2. Thêm 1ml Trizol Regents, đảo nhẹ 5 phút.
3. Thêm 200 $\mu$ l C:I (24 cloroform: 1 isoamyl), đảo đều 5 phút.
4. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút, thu 500 $\mu$ l dịch nổi cho vào ống eppendort 1,5ml.
5. Bổ sung 500 $\mu$ l isopropanol để ở 4<sup>0</sup>C vào ống, đảo đều 15 phút ở 25<sup>0</sup>C, để ở tủ -20<sup>0</sup>C trong vòng 30 phút.
6. Ly tâm 12000 vòng trong 15 phút ở 4<sup>0</sup>C, thu cặn, làm khô tủa.
7. Bổ sung 500 $\mu$ l cồn 70% (cồn pha trong DEPC), ly tâm 7000 vòng/phút trong 5 phút, thu tủa. Bước này lặp lại hai lần.
8. Làm khô RNA bằng mở nắp ống eppendort trong box vô trùng.
9. Bổ sung 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, ủ ở nhiệt độ 55<sup>0</sup>C trong 15 phút cho tan RNA, vortex.

#### 2.2.2.2. Phương pháp tạo cDNA từ mRNA

Tạo cDNA từ mRNA bằng phương pháp phiên mã ngược theo hướng dẫn trên bộ kit của hãng Invitrogen.

Làm tan, ly tâm nhanh các thành phần của kit, giữ trên đá. Cho vào ống vô trùng các thành phần sau: 6 $\mu$ l RNA, 1 $\mu$ l môi oligo d(T), 3 $\mu$ l nước. Ủ 70<sup>0</sup>C trong 5 phút. Sau đó thêm các thành phần sau: 1,5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 4 $\mu$ l Buffer 5X, 2 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$ l RTase, 1 $\mu$ l dNTP, 0,5 $\mu$ l Inhibitor. Tiến hành ly tâm nhanh, chuyển sang ủ ở máy PCR theo chu trình nhiệt: 5 phút trong 25<sup>0</sup>C; 60 phút trong 42<sup>0</sup>C; kết thúc phản ứng ở 70<sup>0</sup>C trong 5 phút.

### 2.2.2.3. Phương pháp nhân gen *Prx* bằng kỹ thuật RT-PCR

Dựa trên thông tin của trình tự gen *Prx* phân lập từ cây dừa cạn đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế có mã số AY924306 [35], cặp mồi đặc hiệu nhân gen *CrPrxF/CrPrxR* được thiết kế để khuếch đại đoạn mã hoá của gen *Prx*:

*CrPrxF*-Xba: 5'GCTCTAGAATGGCTTCCAAAACCTCTCTTCTTCCT-3';

*CrPrxR*-Sac: 5'CGAGCTCCTAATGTAACCTATTAGCTACATTAC- 3'

Đoạn DNA được nhân có kích thước dự tính 1,0 kb.

Phản ứng RT-PCR được tiến hành với thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.1

**Bảng 2.1.** Thành phần phản ứng RT-PCR nhân gen *Prx*

| STT           | Thành phần         | Nồng độ    | Thể tích (μl) |
|---------------|--------------------|------------|---------------|
| 1             | PCR Masster Mix    | 2X         | 12,5          |
| 2             | <i>CrPrxF</i> -Xba | 10 pmol/μl | 1,0           |
| 3             | <i>CrPrxR</i> -Sac | 10 pmol/μl | 1,0           |
| 4             | cDNA               | 500 ng/ μl | 2,0           |
| 5             | Nước khử ion       | -          | 8,5           |
| Tổng thể tích |                    |            | 25,0          |

Chu trình nhiệt và thời gian của phản ứng nhân gen *Prx* bao gồm: Biến tính khởi động ở 94°C trong 4 phút; (biến tính ở 94°C trong 30 giây; gắn mồi ở 58°C trong 30 giây; tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây) x 35 chu kỳ; ổn định mẫu và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút; bảo quản mẫu ở 4°C.

Kiểm tra sản phẩm cDNA trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromide 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

### 2.2.2.4. Phương pháp tinh sạch sản phẩm RT-PCR

Sau khi nhân được gen *Prx*, bước tiếp theo cần thu nhận gen ở dạng tinh sạch và không lẫn gel agarose. Vì vậy, cần phải tiến hành thôi gel.



Sản phẩm RT-PCR được tinh sạch (thời gel) theo bộ kit DNA extraction Kit K05013 của hãng Fermentas.

#### 2.2.2.5. Kỹ thuật tách dòng gen

Tách dòng phân tử được thực hiện theo Sambrook và cộng sự (2001) [25].

#### Tạo vector tái tổ hợp

Sản phẩm RT-PCR nhân gen *Prx* sau khi được làm sạch được gắn trực tiếp vào vector pBT nhờ enzyme nối T<sub>4</sub> ligase. Thành phần của phản ứng gắn gen vào vector tách dòng pBT được trình bày ở bảng 2.2.

**Bảng 2.2.** Thành phần phản ứng gắn gen *Prx* vào vector tách dòng pBT

| STT           | Thành phần           | Nồng độ   | Thể tích (μl) |
|---------------|----------------------|-----------|---------------|
| 1             | T4 DNA Ligase Buffer | 10X       | 1,0           |
| 2             | T4 DNA Ligase        | 5 u/μl    | 1,0           |
| 3             | <i>Prx</i>           | 100 ng/μl | 5,0           |
| 4             | pBT                  | 100ng/μl  | 1,0           |
| 5             | Nước khử ion         | -         | 2,0           |
| Tổng thể tích |                      |           | 10,0          |

Hỗn hợp trên được ủ ở nhiệt độ là 22<sup>0</sup>C trong 3 giờ và sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E. coli* DH5α.

#### Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến chủng *E.coli* DH5α

Tế bào khả biến được lấy từ tủ -80<sup>0</sup>C chuyển sang môi trường -4<sup>0</sup>C. Sau 30 phút biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt.

Bổ sung 15μl vector tái tổ hợp vào ống đựng tế bào khả biến *Ecoli* DH5α và trộn nhẹ. Hỗn hợp trên được để trong bình đá 10 phút, sau đó ủ ở 42<sup>0</sup>C (trong 1 phút 30 giây), rồi chuyển nhanh vào đá lạnh trong 5 phút. Bổ sung 500μl LB lỏng (trypton, cao nấm men, NaCl) nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37<sup>0</sup>C trong 1 giờ.

## Cấy trải

Sau khi nuôi phục hồi, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút, loại dịch nổi giữ lại 150-250 $\mu$ l, trộn nhẹ.

Sử dụng que cấy đã khử trùng cấy trải 150 - 250 $\mu$ l dịch khuẩn trên môi trường LB đặc (Trypton, cao nấm men, NaCl và agar) có bổ sung kháng sinh carbenicilin (100mg/l), IPTG (0,1mM) và X - gal (40mg/l). Nuôi qua đêm ở 37<sup>0</sup> trong 16 giờ.

## Chuyển khuẩn lạc sang pha nuôi lỏng

Chọn khuẩn lạc có màu trắng nuôi trong môi trường LB lỏng (có bổ sung carbenicilin 100mg/l) nuôi ở 37<sup>0</sup>C trong khoảng 3 giờ.

## Chọn dòng và kiểm tra sản phẩm chọn dòng

Chọn ngẫu nhiên các khuẩn lạc màu trắng và kiểm tra sản phẩm chọn dòng bằng kỹ thuật colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu nhân gen *Prx*. Thành phần phản ứng colony-PCR được thể hiện ở bảng 2.3.

**Bảng 2.3.** Thành phần phản ứng colony - PCR

| STT           | Thành phần         | Nồng độ          | Thể tích ( $\mu$ l) |
|---------------|--------------------|------------------|---------------------|
| 1             | PCR Masster Mix    | 2X               | 7,5                 |
| 2             | <i>CrPrxF</i> -Xba | 10 pmol/ $\mu$ l | 0,5                 |
| 3             | <i>CrPrxR</i> -Sac | 10 pmol/ $\mu$ l | 0,5                 |
| 4             | DNA plasmid        | 200 ng/ $\mu$ l  | 0,5                 |
| 5             | Nước khử ion       | -                | 6,0                 |
| Tổng thể tích |                    |                  | 15,0                |

Chu trình nhiệt được đặt như sau: 94<sup>0</sup>C trong 4 phút; lặp lại 30 chu kỳ với nhiệt độ là: 94<sup>0</sup>C trong 30 giây, 58<sup>0</sup>C trong 45 giây, 72<sup>0</sup>C trong 45 giây; sau đó để ở 72<sup>0</sup>C trong 10 phút và lưu giữ ở 4<sup>0</sup>C.

Sản phẩm colony-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% trong đệm TAE 1X. Sau đó nhuộm gel trong ethidium bromide 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

### **Tách plasmid**

Sau khi kiểm tra sản phẩm chọn dòng, tiến hành tách plasmid từ các dòng khuẩn lạc dương tính với PCR bằng bộ kit Plasmid Extraction Kit. Kiểm tra sản phẩm tách plasmid trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromide 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

#### **2.2.2.6. Phương pháp xác định và phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *Prx***

Trình tự của đoạn gen *Prx* được xác định trên máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) sử dụng bộ hoá chất sinh chuẩn Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing. Trình tự nucleotide đoạn gen *Prx* được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTar.

### **2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 4/2014 đến tháng 5/2015

Địa điểm nghiên cứu: Các thí nghiệm thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ gen, khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên; tại Phòng DNA ứng dụng, Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

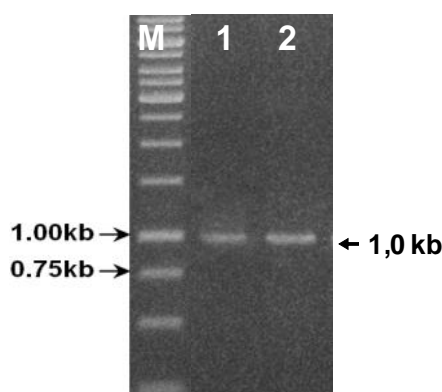
### Chương 3

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. KẾT QUẢ KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG *Prx* TỪ MẪU DỪA CẠN HOA HỒNG TÍM VÀ HOA TRẮNG

#### 3.1.1. Kết quả khuếch đại đoạn gen *Prx* từ mRNA

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá của cây dừa cạn được sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA với cặp môi đặc hiệu (Random Hexamer Primer). Phản ứng PCR nhân bản đoạn mã hóa của gen *Prx* với cặp môi đã thiết kế *CrPrxF*-Xba/*CrPrxR*-Sac, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% cùng marker 1 kb được thể hiện ở hình 3.1.



**Hình 3.1.** Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn cDNA *CrPrx* (M: thang DNA chuẩn 1 kb, 1: TN1-Hongtim; 2: TN2-Trang)

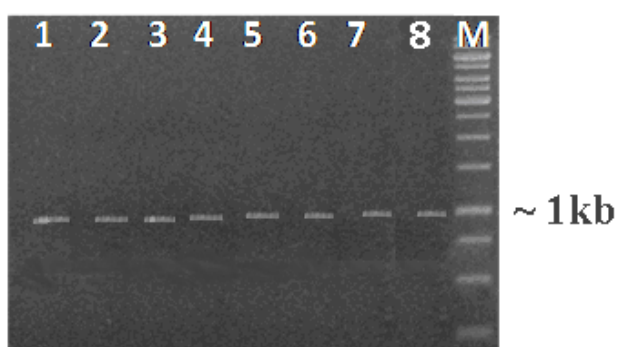
Kết quả thu được ở hình 3.1 cho thấy, mẫu cây dừa cạn hoa hồng tím và hoa trắng đều cho sản phẩm PCR là một band DNA với kích thước ước tính khoảng 1,0 kb, phù hợp theo tính toán lý thuyết khi thiết kế môi và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá *Prx* ở cây dừa cạn mang mã số AY924306 trên Ngân hàng gen. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là

đoạn gen *Prx* chúng tôi tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự *Prx* mang mã số AY924306 trên Ngân hàng gen.

### 3.1.2. Kết quả tách dòng đoạn gen *Prx*

Sản phẩm PCR kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% được tiến hành tinh sạch theo GeneJET PCR Purification kit, sau đó gắn vào vector tách dòng pBT rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 $\alpha$  bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30 giây). Tiến hành chọn dòng bằng phản ứng colony-PCR trực tiếp từ khuẩn lạc màu trắng với cặp mồi đặc hiệu.

Chọn ngẫu nhiên ở đĩa nuôi cấy dòng tế bào khả biến *E.coli* chứa vector tái tổ hợp mang đoạn gen *Prx* mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang 8 khuẩn lạc màu trắng để thực hiện phản ứng colony -PCR. Sản phẩm colony-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromid 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím. Kết quả cho thấy, tất cả 8 dòng khuẩn được kiểm tra đều dương tính với phản ứng PCR. Đoạn cDNA được nhân có kích thước khoảng gần 1,0kb phù hợp với kích thước dự kiến khi thiết kế cặp mồi



**Hình 3.2.** Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR từ khuẩn lạc

(1, 2, 3, 4: *Prx* khuếch đại từ khuẩn lạc TN1-Hongtim; 5, 6, 7, 8: *Prx* khuếch đại từ khuẩn lạc TN2-Trang; M: thang DNA chuẩn 1 kb;

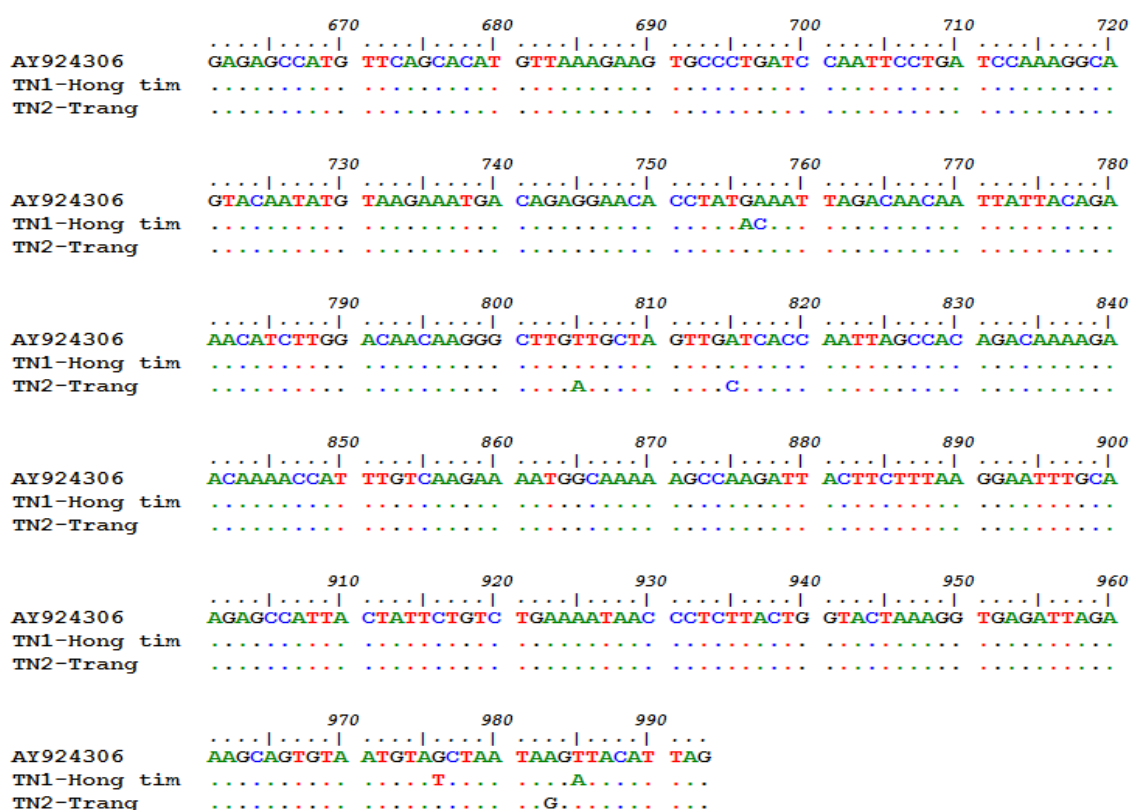
Những dòng khuẩn lạc dương tính với PCR đã được chọn để tách plasmid tái tổ hợp và đem đi giải trình tự. Sản phẩm tách plasmid được kiểm

tra bằng điện di trên gel agarose 0,8 % trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong ethidium bromid 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

### 3.1.3. Kết quả xác định trình tự đoạn gen *Prx* phân lập từ mẫu dưa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang

Kết quả xác định trình tự đoạn *Prx* từ mẫu dưa cạn TN 1-Hongtim và TN2-Trang thu tại Thái Nguyên bằng máy xác định trình tự nucleotide tự động được trình bày ở hình 3.3.

|              |             |             |             |            |            |            |
|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| AY924306     | 10          | 20          | 30          | 40         | 50         | 60         |
| TN1-Hong tim | ATGGCTTCCA  | AAACTCTCTT  | CTTCCTTGTC  | ATTCTCTCCT | TCTCTGCTCT | CTCAACTTTT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 70          | 80          | 90          | 100        | 110        | 120        |
| TN1-Hong tim | GCTGAAAATG  | AAGCCGAGGC  | AGACCCTGGT  | CTTGTAATGA | ACTATTACAA | GGATTCATGT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 130         | 140         | 150         | 160        | 170        | 180        |
| TN1-Hong tim | CCTCAAGCTG  | AAGATATCAT  | CAGGGAACAA  | GTCAAACCTC | TTTACAAACG | TCACAAGAAC |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 190         | 200         | 210         | 220        | 230        | 240        |
| TN1-Hong tim | ACCGCTTTCT  | CTTGGCTAAG  | GAACATTTTC  | CATGATTGCT | TTGTCGAATC | TTGTGATGCT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 250         | 260         | 270         | 280        | 290        | 300        |
| TN1-Hong tim | TCATTGTTGC  | TGGACTCAAC  | TAGAAAGAGTC | CTGTCTGAGA | AGGAAACAGA | TAGGAGTTTT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 310         | 320         | 330         | 340        | 350        | 360        |
| TN1-Hong tim | GGAAATGAGGA | ATTTTCAGATA | CCTTGGAAGAC | ATCAAAGAAG | CCCTTGAAAG | GGAGTGTCTT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 370         | 380         | 390         | 400        | 410        | 420        |
| TN1-Hong tim | GGAGTTGTTT  | CTGTGCTGA   | TATTCTTGTT  | TTGTCTGCAA | GAGATGGCAT | TGTTTCGTTA |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 430         | 440         | 450         | 460        | 470        | 480        |
| TN1-Hong tim | GGAGGGCCAT  | TTATCCCTCT  | TAAACCAGGA  | AGAAGAGATG | GCAGGAGAAG | CAGAGCAGAG |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 490         | 500         | 510         | 520        | 530        | 540        |
| TN1-Hong tim | ATACTGGAGC  | AACATCTCCC  | AGACCACAAT  | GAGAGCCTCA | CTGTTGTTCT | TGAGAGGTTT |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 550         | 560         | 570         | 580        | 590        | 600        |
| TN1-Hong tim | GGATCTATTG  | GCATCAATAC  | CCCTGGCTTG  | GTTCCTTGTC | TAGGTGCTCA | TAGTGTGGG  |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |
| AY924306     | 610         | 620         | 630         | 640        | 650        | 660        |
| TN1-Hong tim | AGAACCCACT  | GTGTGAAGCT  | GGTTCATCGT  | TTATATCCAG | AGGTGGATCC | TGCATTTCCA |
| TN2-Trang    | .....       | .....       | .....       | .....      | .....      | .....      |



**Hình 3.3.** So sánh trình tự đoạn gen *Prx* của mẫu dừa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và AY924306

Kết quả so sánh bằng phần mềm BioEdit cho thấy, cDNA *CrPrx* phân lập từ hai mẫu TN1-Hongtim và TN2-Trang đều có kích thước 993 bp. Trong đó, đoạn gen *Prx* từ mẫu TN1-Hongtim có 298 base loại A, 281 base loại T, 198 base loại C, 216 base loại G. Đoạn gen *Prx* từ mẫu TN1-Trang có 295 base loại A, 281 base loại T, 199 base loại C và 218 base loại G.

Trình tự cDNA *CrPrx* của hai mẫu TN1-Hongtim và TN2-Trang thu được so với trình tự gen *CrPrx* mang mã số AY 924306 trên Ngân hàng gen quốc tế cho thấy, đoạn mã hóa của gen *CrPrx* có độ tương đồng rất cao. Đoạn gen *Prx* ở mẫu TN1-Hongtim và TN2-Trang đều có độ tương đồng 99,3% so với trình tự có mã số AY924306 (trình tự sử dụng để thiết kế cặp môi nhân đoạn gen *Prx*) và tương đồng với nhau 98,8%.

Tuy nhiên, trình tự nucleotide của cDNA *CrPrx* phân lập từ mẫu TN1-Hongtim có sự sai khác so với trình tự mang mã số AY 924306 ở 7 vị trí nucleotide (12, 32, 68, 756, 757, 976, 985), cDNA *CrPrx* của mẫu TN1-Trang có sự sai khác so với trình tự mang mã số AY 924306 ở 7 vị trí nucleotide (12, 557, 559, 570, 805, 815, 983); trình tự nucleotide của cDNA *CrPrx* ở hai mẫu TN1-Hongtim và TN2-Trang khác nhau ở 12 nucleotide (32, 68, 557, 559, 570, 756, 757, 805, 815, 976, 983, 985 (Bảng 3.1).

Hai trình tự nucleotide của *CrPrx* phân lập từ mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số LN809932 và LN809933.

**Bảng 3.1.** Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* (cDNA)

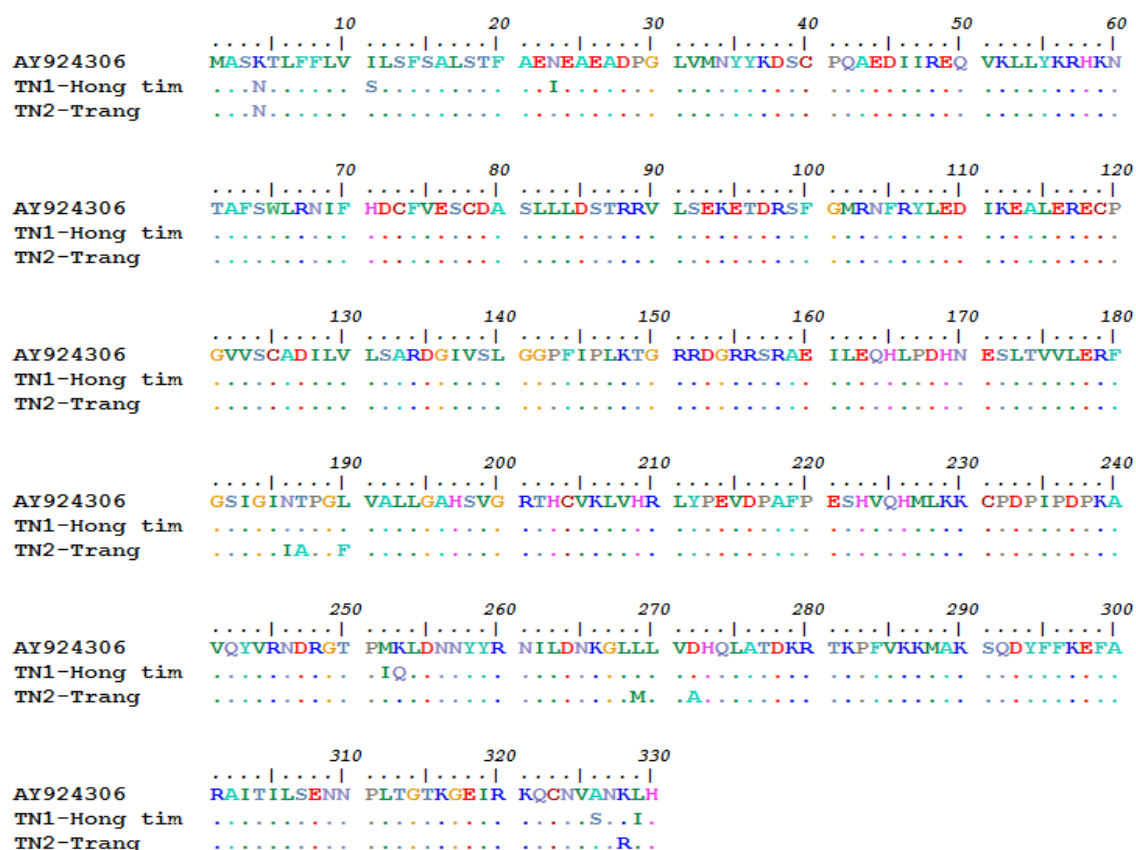
| Vị trí      | 12 | 32 | 68 | 557 | 559 | 570 | 756 | 757 | 805 | 815 | 976 | 983 | 985 |
|-------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AY924306    | A  | T  | A  | A   | A   | G   | G   | A   | T   | A   | G   | A   | T   |
| TN1-Hongtim | T  | G  | T  | A   | A   | G   | A   | C   | T   | A   | T   | A   | A   |
| TN2-Trang   | T  | T  | A  | T   | G   | C   | G   | A   | A   | C   | G   | G   | T   |

Như vậy, chúng tôi đã tách dòng thành công và giải trình tự đoạn gen *Prx* phân lập từ mẫu cây dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang thu tại Thái Nguyên .

Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự cDNA của hai mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang với protein suy diễn từ trình tự gen mang mã số AY924306 trên Ngân hàng gen , kết quả được chúng tôi minh họa ở hình 3.4. Kết quả cho thấy *Prx* đều có 330 amino acid. So với protein suy diễn từ trình tự gen mang mã số AY 924306 trên Ngân hàng gen



thì trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1-Hongtim và mẫu TN2-Trang đều có độ tương đồng 97,9%; còn trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu hoa tương đồng là 96,4%. Tuy nhiên các trình tự amino acid của protein Prx cũng có sự khác nhau ở 13 amino acid (Bảng 3.2).



**Hình 3.4.** So sánh trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu dừa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và của protein suy diễn từ AY24306 trên Ngân hàng gen

**Bảng 3.2.** Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid suy diễn của protein Prx ở 2 mẫu dừa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và protein suy diễn từ AY924306 trên Ngân hàng gen

| Vị trí      | 4 | 1 | 2 | 18 | 18 | 19 | 25 | 25 | 26 | 27 | 32 | 32 | 32 |
|-------------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|             |   | 1 | 3 | 6  | 7  | 0  | 2  | 3  | 9  | 2  | 6  | 8  | 9  |
| AY924306    | K | I | N | N  | T  | L  | M  | K  | L  | D  | A  | K  | L  |
| TN1-Hongtim | N | S | I | N  | T  | L  | I  | Q  | L  | D  | S  | K  | I  |
| TN2-Trang   | N | I | N | I  | A  | F  | M  | K  | M  | A  | A  | R  | L  |

Bảng 3.2 cho thấy, trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1-Hongtim khác với Prx suy diễn từ AY924306 ở 7 amino acid (4, 11, 23, 252, 253, 326, 329), còn trình tự amino acid suy diễn của mẫu hoa trắng khác với Prx mang mã số AAY26520 ở 7 amino acid (4, 186, 187, 190, 269, 272, 328).

Việc hình thành cấu trúc xoắn  $\alpha$  trong cấu hình protein bậc hai chủ yếu dựa trên sự tiếp xúc giữa các nguyên tử trên trục polypeptide dẫn đến hiện tượng các chuỗi bên (gốc R) của các amino acid trên chuỗi polypeptide thường được đẩy ra xa khỏi chuỗi xoắn. Điều này giúp các chuỗi bên có được vị trí lý tưởng để có thể tương tác với các vùng khác của các phân tử protein. Amino acid Serine mặc dù không có cấu trúc ngăn cản sự hình thành vòng xoắn  $\alpha$ , nhưng hiếm khi có mặt trong các chuỗi xoắn  $\alpha$ . Theo bảng 3.2, ở vị trí amino acid số 11 và 326, chuỗi polypeptide suy diễn của mẫu TN1-Hongtim chứa Serine, trong khi hai mẫu còn lại không chứa amino acid này. Điều này có thể dẫn đến việc hình thành cấu trúc xoắn  $\alpha$  ở mẫu TN1-Hongtim khác với hai mẫu còn lại, có thể sự khác nhau này liên quan đến tổng hợp alkaloid và

dẫn đến sự khác nhau về hàm lượng alkaloid giữa mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và mẫu TN2-Trang, đây là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu.

### 3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG CỦA TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID SUY DIỄN TỪ ĐOẠN GEN *Prx* CỦA HAI MẪU DỪA CẠN NGHIÊN CỨU

Tiến hành so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* mẫu TN1-Hongtim và TN2-Trang ở Việt Nam với 6 trình tự gen *Prx* đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế để xác định hệ số tương đồng và hệ số sai khác của các trình tự đoạn gen *Prx*, đồng thời thiết lập sơ đồ hình cây để phân tích sự đa dạng của các mẫu dừa cạn thông qua trình tự đoạn gen *Prx*.

**Bảng 3.3.** Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* ở 2 mẫu dừa cạn TN1-Hongtim, TN2-Trang và 6 mẫu dừa cạn trên

Ngân hàng gen

Hệ số tương đồng

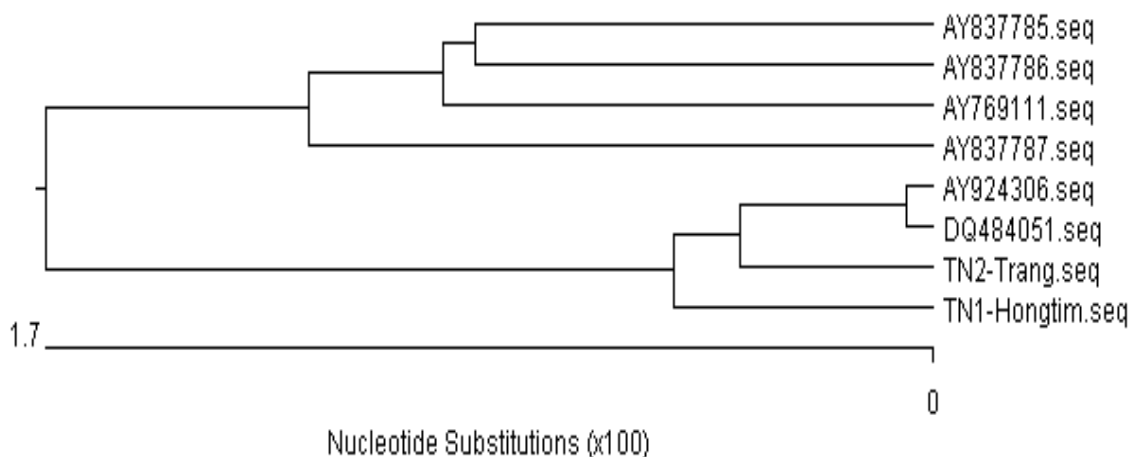
|   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |   |
|---|-----|------|------|------|------|------|------|------|---|
| 1 |     | 98.8 | 99.3 | 99.2 | 96.4 | 96.2 | 96.2 | 97.2 | 1 |
| 2 | 1.2 |      | 99.3 | 99.2 | 95.7 | 95.4 | 95.4 | 96.4 | 2 |
| 3 | 0.7 | 0.7  |      | 99.9 | 96.4 | 96.2 | 96.2 | 97.2 | 3 |
| 4 | 0.8 | 0.8  | 0.1  |      | 96.4 | 96.2 | 96.2 | 97.2 | 4 |
| 5 | 3.6 | 4.4  | 3.6  | 3.6  |      | 98.0 | 98.2 | 97.5 | 5 |
| 6 | 3.9 | 4.7  | 3.9  | 3.9  | 2.1  |      | 98.2 | 98.0 | 6 |
| 7 | 3.9 | 4.7  | 3.9  | 3.9  | 1.8  | 1.8  |      | 97.5 | 7 |
| 8 | 2.8 | 3.6  | 2.8  | 2.8  | 2.6  | 2.1  | 2.6  |      | 8 |
|   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |   |

1. TN1-Hongtim.seq
2. TN2-Trang.seq
3. AY924306.seq
4. DQ484051.seq
5. AY769111.seq
6. AY837785.seq
7. AY837786.seq
8. AY837787.seq

Hệ số sai khác

Trong các trình tự đoạn gen *Prx* của dừa cạn được sử dụng để so sánh có 2 mẫu phân lập từ Việt Nam (TN1-Hongtim và TN2-Trang), 6 mẫu từ Ấn Độ (mang mã số AY924306, DQ484051, AY769111, AY837785, AY837786, AY837787). Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy hệ số tương đồng giữa các cặp so sánh dao động từ 95,4% đến 99,9%; còn hệ số sai khác từ 0,1% đến 4,7%.

Mối quan hệ di truyền của 8 mẫu dừa cạn trên cơ sở phân tích gen *Prx* được thể hiện ở sơ đồ hình cây trên hình 3.5.



**Hình 3.5.** Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng đoạn gen *Prx* của 8 mẫu dừa cạn

Sơ đồ hình cây ở hình 3.5 dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* cho thấy 8 mẫu dừa cạn được phân thành hai nhóm chính, nhóm I gồm 4 mẫu chia thành hai nhóm phụ, nhóm phụ 1 gồm 3 mẫu: AY837785, AY837786, AY769111; nhóm phụ 2 gồm 1 mẫu là AY837787. Nhóm phụ 1 lại chia thành 2 nhóm nhỏ: nhóm nhỏ 1 gồm 2 mẫu là AY837785 và AY837786; nhóm nhỏ 2 gồm 1 mẫu AY769111. Nhóm II gồm 4 mẫu, phân thành 2 nhóm phụ: nhóm phụ 1 gồm 3 mẫu AY924306, DQ485051, TN2-Trang; nhóm phụ 2 gồm 1 mẫu TN1-Hongtim. Nhóm phụ 1 lại chia thành 2 nhóm nhỏ: nhóm nhỏ 1 gồm 2 mẫu AY924306, DQ485051 và nhóm nhỏ 2 gồm 1 mẫu là TN2-Trang.

Như vậy, hai mẫu dừa cạn mà chúng tôi nghiên cứu thuộc cùng một nhóm chính nhưng ở hai nhóm phụ khác nhau.

Tiếp tục phân tích mối quan hệ của 8 mẫu dừa cạn dựa trên trình tự amino acid suy diễn, kết quả thể hiện ở bảng 3.4.

**Bảng 3.4.** Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự amino acid của protein Prx ở 2 mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang và 6 mẫu dừa cạn trên Ngân hàng gen

Hệ số tương đồng

|   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     | 7    | 8    |   |
|---|-----|------|------|------|------|-------|------|------|---|
| 1 |     | 97.7 | 97.7 | 97.7 | 96.2 | 96.2  | 96.2 | 93.9 | 1 |
| 2 | 2.3 |      | 98.5 | 96.9 | 96.2 | 96.2  | 96.2 | 93.9 | 2 |
| 3 | 2.3 | 1.5  |      | 98.5 | 97.7 | 97.7  | 97.7 | 95.4 | 3 |
| 4 | 2.3 | 3.1  | 1.5  |      | 96.9 | 96.9  | 96.9 | 94.7 | 4 |
| 5 | 3.9 | 3.9  | 2.3  | 3.1  |      | 100.0 | 97.9 | 97.9 | 5 |
| 6 | 3.9 | 3.9  | 2.3  | 3.1  | 0.0  |       | 97.9 | 97.9 | 6 |
| 7 | 3.9 | 3.9  | 2.3  | 3.1  | 2.2  | 2.2   |      | 96.4 | 7 |
| 8 | 6.4 | 6.4  | 4.7  | 5.6  | 2.2  | 2.2   | 3.7  |      | 8 |
|   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     | 7    | 8    |   |

AY769111.pro

AY837785.pro

AY837786.pro

AY837787.pro

AY924306.pro

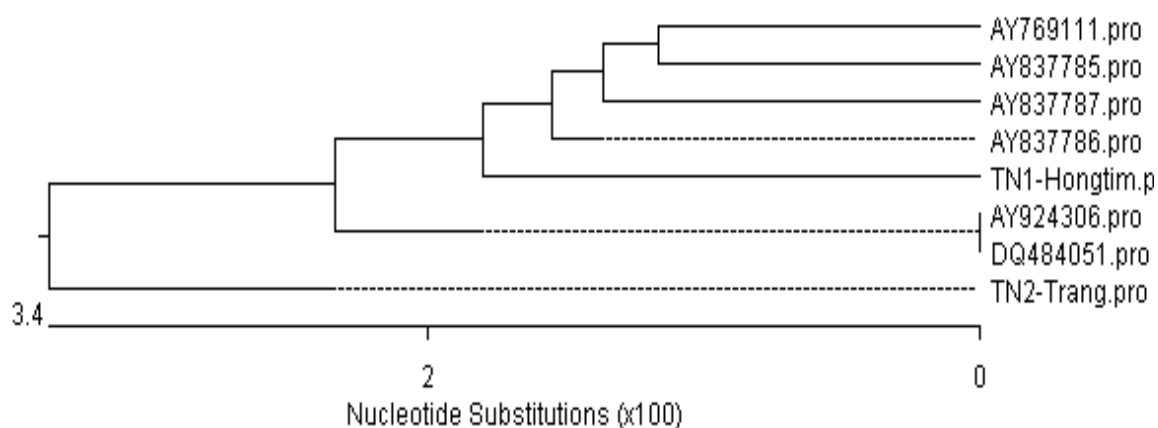
DQ484051.pro

TN1-Hongtim.pro

TN2-Trang.pro

Hệ số sai khác

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy, các mẫu dừa cạn so sánh có hệ số tương đồng về trình tự amino acid suy diễn dao động từ 93,9% đến 100%.



**Hình 3.6.** Sơ đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng dựa trên trình tự amino acid suy diễn của 8 mẫu dừa cạn

Khoảng cách di truyền được tính trên cơ sở so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* giữa 8 mẫu dừa cạn là 1,7% (Hình 3.5), còn dựa trên trình tự amino acid thì khoảng cách di truyền giữa các mẫu lại lớn hơn rất nhiều, là

3,4% (Hình 3.6). Kết quả phân tích này cho thấy, trình tự nucleotide của các đoạn gen *Prx* ở các mẫu dừa cạn không khác nhau nhiều, nhưng chúng mã hóa nhiều amino acid khác nhau, dẫn tới tổng hợp các enzyme *Prx* có chức năng xúc tác khác nhau. Vì vậy, khả năng tổng hợp các alkaloid như vinblastine và vincristine ở các mẫu cũng khác nhau.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 1. KẾT LUẬN

1.1. Đoạn gen *Prx* phân lập từ mẫu dừa cạn TN1-Hong tim và TN2-Trang thu tại Thái Nguyên đã được tách dòng thành công và xác định được trình tự nucleotide. Đoạn gen *Prx* của cả hai mẫu nghiên cứu có kích thước 993 nucleotide, mã hóa 330 amino acid.

1.2. Trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* phân lập từ mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang thu tại Thái Nguyên tương đồng với nhau 98,8%, tương đồng so với trình tự nucleotide của đoạn gen *Prx* mang mã số AY924306 là 99,3%.

1.3. Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen *Prx* của mẫu dừa cạn TN1-Hongtim và TN2-Trang thu tại Thái Nguyên có sự tương đồng so với trình tự amino acid của protein mang mã số AY924306 đều là 97,9% và tương đồng với nhau là 96,4%.

1.4. Hệ số tương đồng của đoạn gen *Prx* ở 2 mẫu dừa cạn nghiên cứu so với 6 mẫu trên Ngân hàng gen dao động từ 95,4% đến 99,9%, hệ số sai khác là 0,1% đến 4,7%. Hệ số tương đồng về trình tự amino acid suy diễn của 8 mẫu so sánh dao động từ 93,9% đến 100%.

### 2. ĐỀ NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu trình tự đoạn mã hóa gen *Prx* làm cơ sở cho việc thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc *Prx* phục vụ chuyển gen để cải thiện hàm lượng alkaloid ở cây dừa cạn.

## **CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN**

Bùi Thị Hà, Lương Thanh Huyền, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2014), Tách dòng phân tử gen mã hóa peroxidase từ hai giống dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) tại Thái Nguyên, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 129(15), tr. 103-108.

### **Các trình tự gen đã đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế**

1. Bui H. T., Luong H. T., Nguyen T. T, Chu M. H., (2015), “*Catharanthus roseus* mRNA for peroxidase (*prx* gene), isolate TN1 (Pink-purple flower)”, *Direct Submission on NCBI*, Accession: LN809932.
2. Bui H. T., Luong H. T., Nguyen T. T, Chu M. H., (2015), “*Catharanthus roseus* mRNA for peroxidase (*prx* gene), isolate TN2 (White flower)”, *Direct Submission on NCBI*, Accession: LN809933.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Viện dược liệu (2001), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập 1, *Nxb Khoa học và Kỹ thuật*, tr. 57-89.
2. Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Vương Chí Hùng, Nguyễn Tiến Hùng (2009), Study on the dynamic variation of 10-DAB and taxol contents of *Taxus wallichiana* needles cultivated in Lam Dong province. PHARMA INDOCHINA VI. The development of indochina pharmacy in the context of global economic recession. 15-18/12/2009, tr.621-624.
3. Trần Văn Thanh (2002), Nghiên cứu chiết xuất Ajmalicin từ rễ dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), Luận án tiến sĩ dược học, Đại học dược Hà Nội.

### Tiếng Anh

4. Aerts R.J., Stoker A., Beishuizen M., van de Heuvel M., van der Meijden E., Verpoorte R. (1992), “Detrimental effects of Cinchona leaf alkaloids on larvae of the polyphagous insect *Spodoptera exigua*“, *J Chem Ecol*, 18:1955–1964.
5. Benoit St Bierr, Bierr Laflammer, Anne Marie Alarco, Vincenzo Deloca, (1998), “The terminal O–acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis define a new class of protein responsible forr coenzyme A-dependent acyl transfer”, *The Plant journal*, 14(6) 703-713.
6. Carey, Francis A. (2006), “Strictly speaking, these compounds are not classified as alkaloids because they are not isolated from plants”, *Organic Chemistry* , tr. 954.
7. Contin A., van der Heijden R., Lefeber A.W.M., Verpoorte R. (1998), “The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose

- phosphate/pyruvate pathway in *Catharanthus roseus* cell culture”, *FEBS Lett*, 434:413–416.
8. Ferreres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A., Pereira D.M., Valentao P., Andrade P.B., Duarte P., Barceló A.R., Sottomayor M. (2011), “Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affair”, *J Exp Bot*, 62(8): 2841-2854.
  9. Guggisberg A., Hesse M. (2007), *Alkaloids*, The University of Zurich.
  10. Jian-Yu Fu (2014), “Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses”, *Botanical Studies*, 55:57.
  11. Kadkade P. G. (1982), “Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*”, *Plant Sci Lett*, 25: 107-115.
  12. Kumar S., Dutta A., Sinha A. K., Sen J. (2007), “Cloning, characterization and localization of a novel basic peroxidase gene from *Catharanthus roseus*”, *FEBS J.*, 274(5): 1290-1303.
  13. Kumar S., Jaggi M., Taneja J., Sinha A. K. (2011), “Cloning and characterization of two new Class III peroxidase genes from *Catharanthus roseus*”, *Plant Physiol Biochem.*, 49 (4):404-412.
  14. Leslie van der Fits and Johan Memelink (2001), “The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element”, *The Plant Journal*, 25(1). 43 – 53.
  15. Maria Manuela R. Costa, Frederique Hilliou, Patrícia Duarte, Luís Gustavo Pereira, Iolanda Almeida, Mark Leech, Johan Memelink, Alfonso

- Ros Barceló, and Mariana Sottomayor (2008), “Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*”, *Plant Physiol*, 146(2): 403–417.
16. Matamoros M. A., Saiz A., Peñuelas M., Bustos-Sanmamed P., Mulet J. M., Barja M. V., Rouhier N., Moore M., James E. K., Dietz K. J., Becana M. (2015), “Function of glutathione peroxidases in legume root nodules”, *J Exp Bot*, pii: erv066.
  17. Memelink J., Gantet P. (2007), “Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*”, *Springer Science*, 11101-006-9051.
  18. Merkli A., Christen P., and Kapetanidis I. (1997), “Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L”, *Plant Cell Reports*, 16(9): 632-636.
  19. Misawa M. (1994), “Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites”, *FAO Agricultural services bulletin*, 108.
  20. Miyasaka H., Nasu M., and Yoneda K. (1999), “*Salvia miltiorrhiza*: In vitro production of cryptotanshinone and feruginol. In: Biotechnology in agriculture and forestry. 7, Medicinal and Aromatic Plants II ed. By Bajaj YPS. Springer-Verlag Berlin”, *Heidelberg*, 417-430.
  21. Montiel G., Zarei A., Körbes AP., Memelink J. (2011), “The jasmonate-responsive element from the ORCA3 promoter from *Catharanthus roseus* is active in *Arabidopsis* and is controlled by the transcription factor AtMYC2”, *Plant Cell Physiol*. 52(3):578-587.
  22. Pahwa D. (2008), *Catharanthus alkaloids*, B.Pharm Punjab University Chandigarh.

23. Pearce H. L., Miller M. A. (2005), “The evolution of cancer research and drug discovery at Lilly Research Laboratories”, *Adv Enzyme Regul*, 45: 229–255.
24. R. H. F Manske (1979), *The alkaloid*, Chemistry and physiology.
25. Sambrook J., Russell D. W. (2001), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
26. Sottomayor M., Lopes Cardoso I., Pereira L. G., Ros Barceló A. (2004), “Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don”, *Phytochem Rev*, 3:159–171.
27. Tsay H. S., Chang W. D., Chen C. C., and Chang Y. S. (1994), “The production of imperatorin from *Angelica dahurica* var. *formosana* by cell suspension culture”, *J Agric Assoc China*, 168: 32-48.
28. Van der Heijden R., Jabos D., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R. (2004), “The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology”, *Curr Med Chem*, 11: 607–628.
29. Verpoorte R., Van der Heijden R., Moreno P. R. H. (1997), Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells, *The Alkaloids*. G.A. Cordell (Editor) Academic Press, 221–299.
30. Woerdenbag H. J., Van Uden W., Frijlink H. W., Lerk C. F., Pras N., and Malingre T. M. (1990), “Increased podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* cell suspension cultures after -cyclodextrin complex”, *Plant Cell Rep*, 9: 97-100.
31. Yamada Y., and Sato F. (1981), “Production of berberine in cultured of *Coptis japonica*”, *Phytochemistry*, 20: 545-547.

32. Yeh F. T., Huang W. W., Cheng C. C., Na C., and Tsay H. S. (1994), “Tissue culture of *Dioscorea doryophora* Hance. II. Establishment of suspension culture and the measurement of diosgenin content”, *Chinese Agronomy Journal*, 4: 257-268.
33. Yoshida K., Kaothien P., Matsui T., Kawaoka A., Shinmyo A. (2003), “Molecular biology and application of plant peroxidase genes”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(6):665-670.
34. Zhao J., Verpoorte R. (2007), “Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering”, *Phytochem Rev*, 6: 435–457.

#### **Trang web**

35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY924306.1>
36. [http://en.wikipedia.org/wiki/Catharanthus\\_roseus](http://en.wikipedia.org/wiki/Catharanthus_roseus)