

PHÂN LẬP GENE, DỰ ĐOÁN ĐẶC ĐIỂM VÀ PHÂN TÍCH MỨC ĐỘ PHIÊN MÃ GENE CYTOCHROME P450 (CYP89A2) TỪ CÂY GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino)

Đặng Ngọc Sáng^{1,2}, Nguyễn Quang Hoàng Vũ¹, Nguyễn Thị Nguyên Mẫn³, Nguyễn Hữu Thuần Anh⁴, Trần Quốc Dung⁵, Hoàng Tấn Quảng^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường THPT Chuyên Võ Nguyên Giáp, Quảng Bình

³Công ty TNHH Một thành viên Công nghệ sinh học QueenLabs, Huế

⁴Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

⁵ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ. E-mail: htquang@hueuni.edu.vn

TÓM TẮT

Trong cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino), một số gene cytochrome P450 (CYP) và UDP-glucuronosyltransferase (UGT) đã được chứng minh đóng vai trò chính trong quá trình sinh tổng hợp gypenoside, trong đó có CYP89A2. Trong nghiên cứu này, mức độ phiên mã và đặc điểm của gene CYP89A2 đã được xác định. Đoạn gene CYP89A2 phân lập từ cây Giảo cổ lam có nguồn gốc tỉnh Quảng Nam có trình tự nucleotide tương đồng 99,17% với trình tự mRNA CYP89A2 đã được công bố trên Ngân hàng Gene (mã số MT416753). Kết quả dự đoán cấu trúc và đặc tính enzyme cho thấy enzyme CYP89A2 có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α và 8 vị trí gấp cuộn phiến β , có tới 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N-glycosylation. CYP89A2 chủ yếu hoạt động xuyên màng, có khả năng hoạt động tốt ở môi trường kiềm và chịu nhiệt độ từ 55 - 65 °C. Kết quả phân tích realtime PCR cho thấy gene CYP89A2 hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý methyl jasmonate, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, xử lý tế bào bằng salicylic acid và dịch chiết nấm men không làm thay đổi hoạt động của gene so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học để nghiên cứu cơ chế điều hòa biểu hiện gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside sau này.

Từ khóa: *Gynostemma pentaphyllum*, tin sinh học, Cytochrome P450, CYP89A2, tế bào huyền phù.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một loài dược liệu quý thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae), phân bố rộng rãi tại Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và các quốc gia Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam (Cui *et al.*, 2020). Giảo cổ lam có tác dụng hạ đường huyết, chống oxi hóa, bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu,... trong đó saponin dạng dammarane-triterpene được cho là thành phần có vai trò chính (Bùi Đình Lãm và cs., 2015). Hiện nay, có hơn 180 loại saponin được tìm thấy trong cây Giảo cổ lam, được gọi chung là gypenoside; trong đó nhiều thành phần có cấu trúc giống với saponin của Nhân sâm (*Panax ginseng*) (Chen *et al.*, 2019). Các protein họ cytochrom p450 (CYP) và UDP-glucuronosyltransferase (UGT) đóng vai trò điều chỉnh các gene liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside. Đặc biệt, quá trình glycoside hóa xảy ra ở bước phản ứng cuối cùng khi các loại saponin khác nhau được tổng hợp bằng cách thêm một hoặc một số monosaccharide vào triterpene aglycone bởi

UDP-glycosyltransferase (UGT) (Xu *et al.*, 2020).

Zhang và cộng sự (2021) đã khảo sát mức độ biểu hiện của 7 enzyme cytochrome P450 và 5 enzyme UDP-glucuronosyltransferases tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside trong cây Giảo cổ lam, tác giả nhận thấy 5 gene là CYP77A3, CYP86A7, CYP94A1, UGT74F2 và UGT91C1 biểu hiện mạnh ở lá, đến thân và rễ. Trong khi đó, các gene CYP86A8, CYP89A2, CYP90A và UGT73B4 biểu hiện mạnh trong lá, đến rễ và thân. Tăng cường mức độ biểu hiện của các gene CYP và UGT có thể tăng khả năng sinh tổng hợp gypenoside. Tuy nhiên, đặc điểm, cấu trúc, chức năng của hầu hết các gene này chưa được nghiên cứu kỹ trên cây Giảo cổ lam, mặc dù đã có một số nghiên cứu tương tự trên các loài cây khác. Hiện nay, gene CYP89A2 mới chỉ có một trình tự được công bố trên Ngân hàng Gene và chưa được nghiên cứu ở Việt Nam.

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả phân tích và dự đoán đặc điểm của gene CYP89A2 trong cây Giảo cổ lam có

nguồn gốc từ tỉnh Quảng Nam. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để nghiên cứu cơ chế điều hòa biểu hiện gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) *in vitro* và tế bào hình thành từ cây *in vitro* (Hình 1) có nguồn gốc tự nhiên tại xã Trà Nam, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam (Hoàng Tấn Quảng và cs., 2021).

Phương pháp

Nuôi tế bào huyền phù và xử lý kích kháng

Nuôi cấy tế bào huyền phù được thực hiện bằng cách cấy chuyển 3 g callus (30 ngày tuổi) vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường

lỏng, tốc độ lắc là 120 vòng/phút trên máy lắc SM 30A (Edmund Buhler, Đức). Các elicitor được bổ sung vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy với nồng độ hiệu quả nhất của từng chất, bao gồm methyl jasmonate (MeJA-50 μ M), salicylic acid (SA-100 μ M) và dịch chiết nấm men (YE-3 g/L). Sinh khối tế bào được thu sau 18 ngày nuôi cấy để tách chiết RNA tổng số (Quang *et al.*, 2022; Tung *et al.*, 2022).

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá cây *in vitro* bằng kit TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiễn hành điện di kiểm tra DNA tổng số thu được trên gel agarose 1% (w/v). Mẫu DNA tổng số sau đó được bảo quản -20 °C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Cây Giảo cổ lam *in vitro* và tế bào huyền phù.

Khuếch đại gene

Phản ứng PCR được thực hiện với DNA tổng số là khuôn mẫu, sử dụng 12 cặp mồi đã được công bố bởi Zhang *et al.* (2021). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1 μ L DNA tổng số (100 ng/ μ L), 1 μ L mồi của mỗi loại (10 pmol), 10 μ L 2 $\times$ GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 3 μ L nước cất, tổng thể tích phản ứng là 12 μ L. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy gia nhiệt (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, USA) với quy trình chạy như sau: 95 °C trong 3 phút, 30 chu kỳ ở 95 °C trong 1 phút, 50 °C trong 1 phút, 72 °C trong 1 phút, 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và nhuộm bằng SafeView™ Classic (abm, Canada).

Phân tích trình tự gene và xây dựng cây phát sinh

Trình tự nucleotide của sản phẩm PCR gene CYP89A2 được phân tích trực tiếp bằng phương pháp Sanger (Công ty Firstbase, Malaysia). Trình tự nucleotide của các mẫu được

kiểm tra bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với các trình tự đã được công bố trên Ngân hàng Gene thông qua công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Các trình tự DNA được sắp xếp đóng cột bằng chức năng Clustal W trên phần mềm MEGA 11 với các tham số mặc định. Cây phát sinh được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000 (Tamura *et al.*, 2021).

Dự đoán đặc điểm và chức năng của enzyme CYP89A2

Đặc điểm và chức năng của enzyme Cytochrome P450 (CYP89A2) từ cây Giảo cổ lam được dự đoán bằng các công cụ tin sinh học, bao gồm protein domain (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic *et al.*, 2021). Mô hình cấu trúc không gian của CYP89A2 được dự đoán bằng công cụ Phyre2.2 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015). Cấu trúc xoắn xuyên màng được dự đoán nhờ TMHMM Server v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service>).

php?TMHMM-2.0) (Krogh *et al.*, 2001). Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu N (N-glycosylation) của enzyme bằng công cụ NetNGlyc 1.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) (Gavel, von Heijne, 1990).

Đặc điểm hóa - lý của enzyme *CYP89A2* được dự đoán như điểm đẳng điện bằng công cụ IPC 2.0 (<http://www.ipc2-isoelectric-point.org/>) (Kozlowski, 2021), khả năng chịu nhiệt được dự đoán bằng công cụ Tm Predictor (<http://140.114.98.13/tm/>). Môi trường xúc tác (acid/base) của enzyme được dự đoán bằng công cụ AcalPred (<http://lin-group.cn/server/AcalPred>) (Lin *et al.*, 2013).

Xác định mức độ phiên mã của gene trong tế bào

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu tế bào huyền phù bằng kit GeneJET Plant RNA

Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ) và phản ứng sinh tổng hợp sợi cDNA thứ nhất được thực hiện bằng kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để đánh giá mức độ phiên mã của gene *CYP89A2*, chúng tôi tiến hành phản ứng realtime PCR với cặp mồi đặc hiệu của gene này là *RT-CYP89A2*, sử dụng nội đối chứng (control - house keeping gene) là 18sRNA (Bảng 1). Phản ứng Real-Time PCR được thực hiện với kit Gotaq^(R) qPCR Master Mix (A6001, Promega, Mỹ) theo quy trình chạy như sau: 95 °C trong 2 phút, 40 chu kỳ ở 95 °C trong 15 giây và 60 °C trong 1 phút (Zhang *et al.*, 2021). Thành phần phản ứng: 10 µL Go Taq qPCR Master Mix 2X (Promega, Mỹ), 1 µL mỗi mỗi loại (10 pmol), 1 µL cDNA, 7 µL nước cất. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên hệ thống QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (ABI, Mỹ).

Bảng 1. Các mồi được sử dụng trong nghiên cứu.

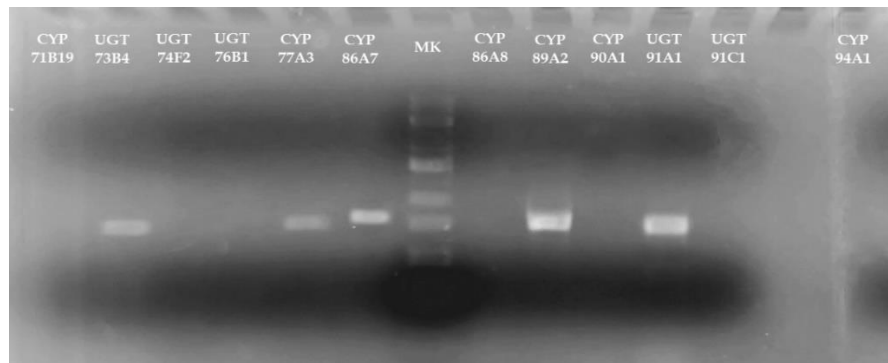
Mồi	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
RT-CYP89A2	5'-CCCTTCCAAACTCACAAAAC-3' 5'-AATGGAGATTGCGAAGAGTT-3'	(Zhang <i>et al.</i> , 2021)
GP-18sRNA	5'-ACGATGCCGACCAGGGATT-3' 5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2018)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gene *CYP89A2*

DNA tổng số của mẫu cây Giảo cổ lam được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR sau đó được điện di trên agarose gel 1%. Kết

quả thăm dò với cặp mồi đặc hiệu cho 12 gene theo mô tả của Zhang và cộng sự (2021) cho thấy có 4/7 gene *CYP* và 1/5 gene *UGT* có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu (Hình 2). Trong đó, gene *CYP89A2* thể hiện sự khuếch đại mạnh nhất (băng đậm nhất) nên được lựa chọn để nghiên cứu sâu hơn.



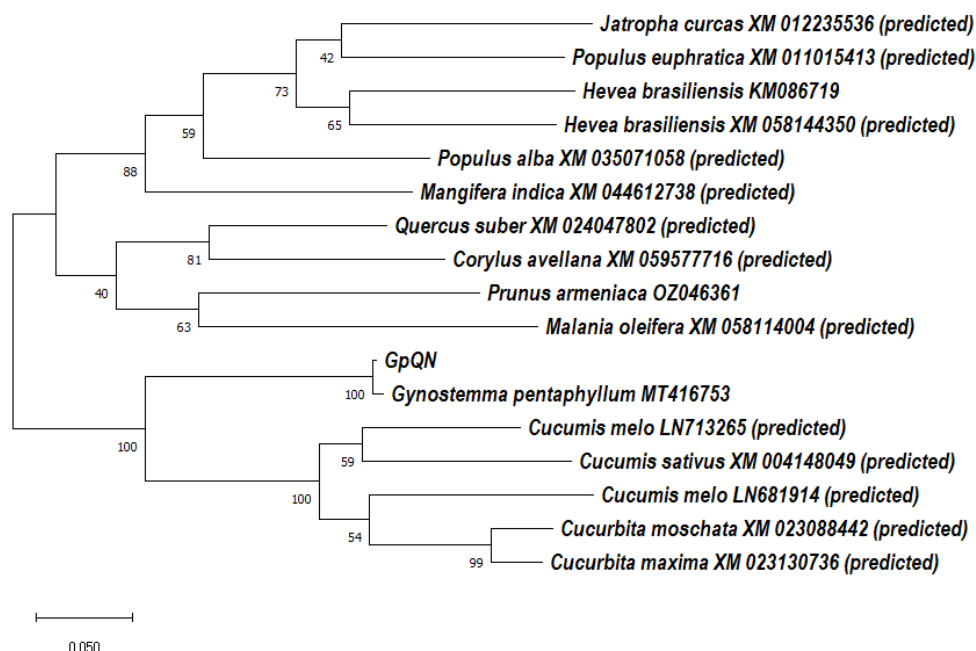
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR 12 gene *CYP* và *UGT*. MK: thang chuẩn kích thước DNA (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Mỹ).

Sản phẩm PCR gene *CYP89A2* (CpQN) được sử dụng để phân tích trình tự trực tiếp, kết quả cho thấy đoạn trình tự nucleotide thu được có chiều dài 850 bp đảm bảo chất lượng để so sánh trình tự. Kết quả so sánh trên Ngân hàng Gene cho

thấy trình tự thu được trong nghiên cứu này tương đồng 99,17% với trình tự mRNA *CYP89A2* của cây Giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum* (mã số MT416753), từ đó có thể khẳng định đoạn gene *CYP89A2* đã phân lập được.

Hiện nay, dữ liệu công bố về trình tự gene *CYP89A2* trên Ngân hàng Gene chưa nhiều, trong đó chủ yếu là ở dạng dự đoán. Kết quả xây dựng cây phả hệ dựa trên các gene đã công bố cho thấy gene *CYP89A2* từ cây Giảo cổ lam có sự tương đồng cao nhất với các cây thuộc họ Bầu bí, tuy nhiên mức độ tương đồng không

quá cao (khoảng 75-76%). Chẳng hạn, tương đồng với *Cucurbita maxima* 76,60% (XM_023130736), *Cucumis melo* 76,21% (LN681914) hay *Cucurbita moschata* 76,21% (XM_023087977). Đối với các họ thực vật khác, sự khác biệt cao hơn, ví dụ tương đồng 71,92% so với *Prunus armeniaca* (OZ046361) (Hình 3).



Hình 3. Cây di truyền dựa trên trình tự gene *CYP89A2*. Chỉ số ở mỗi nhánh thể hiện mức độ tin cậy với bootstrap 1000.

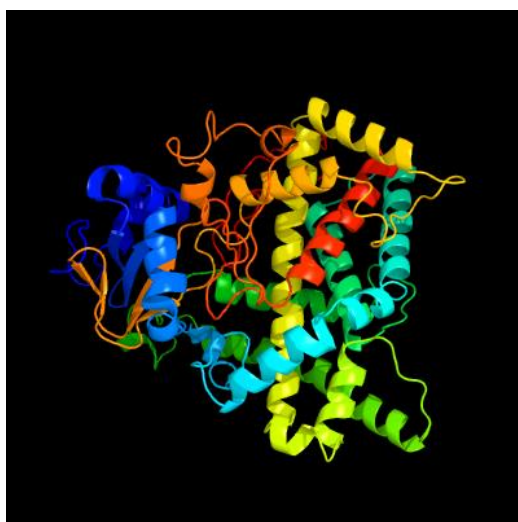
Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm hóa lý của enzyme

Từ kết quả phân tích trình tự, đoạn gene *CYP89A2* từ mẫu CpQN có mức độ tương đồng cao với trình tự gene đã được công bố, do đó, chúng tôi sử dụng trình tự mRNA đã được công bố (MT416753) để dự đoán cấu trúc và chức năng của enzyme này. Kết quả dự đoán cho thấy protein *CYP89A2* có cấu trúc tương đồng 26% với squal synthase của cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* CYP76AH3 (mã số PDB: 7x2q, mã số Phyre: c7x2qA_) với độ bao phủ 91% (460/506 amino acid) và độ tin cậy 100%. Cấu trúc bậc hai của *CYP89A2* có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α (chiếm 45%) và 8 vị trí gấp cuộn β (8%) (Hình 4). Ngoài ra, trong cấu trúc enzyme còn có các đoạn rối (Disordered) chiếm 7% và xoắn xuyên màng (TM helix) chiếm 8%.

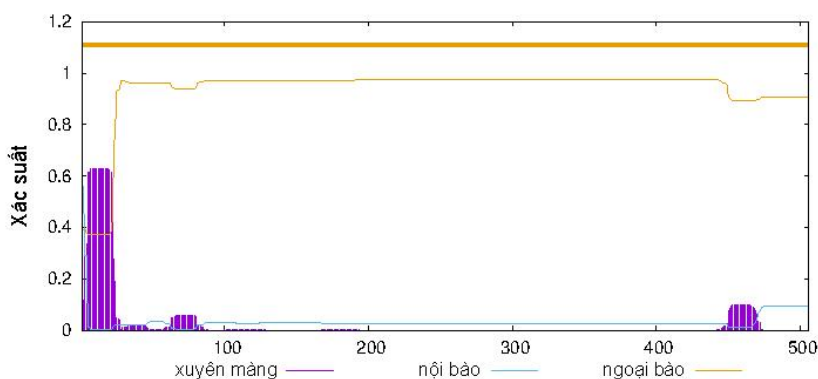
Vùng bảo tồn được dự đoán bằng chương trình SMART cho thấy enzyme có 13 domain hiện diện là PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding,

ClpB_D2_small và MoCF_biosynth. Kết quả dự đoán cấu trúc xuyên màng cho thấy phân tử enzyme phần lớn nằm xuyên màng và một phần nhỏ được tiết ra môi trường ngoại bào, không có phần enzyme nằm bên trong tế bào (Hình 5). Phân tích trình tự *CYP89A2* bằng công cụ NetNGlyc 1.0 Server nhận thấy có tới 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N-glycosylation (Hình 6).

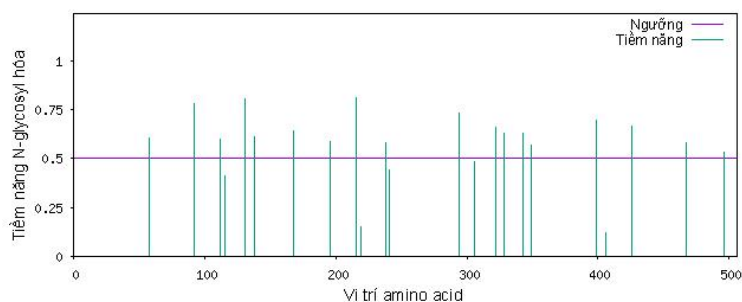
Đối với *CYP89A2*, trình tự mRNA có chiều dài 1.521 bp và mã hóa trình tự polypeptide dài 506 amino acid, enzyme có khối lượng phân tử là 58,44 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 7,06. Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của *CYP89A2* bằng công cụ Tm Predictor cho thấy enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55 - 65 °C (Tm index = 0,9846). Enzyme có khả năng chịu nhiệt cao, đây là cơ sở để lựa chọn mức nhiệt độ thích hợp nhằm kiểm tra hoạt tính enzyme. Dựa vào công cụ dự đoán khả năng chịu được môi trường xúc tác kiềm/acid của AcalPred, chúng tôi nhận thấy enzyme *CYP89A2* có khả năng chịu kiềm, chỉ số xúc tác mang tính base là 0,9385 trong khi chỉ số acid là 0,0614.



Hình 4. Dự đoán cấu trúc không gian của *CYP89A2*. Cấu trúc cuộn xoắn α được trình bày bằng hình lát mỏng dạng cuộn, cấu trúc β được trình bày bằng hình mũi tên dạng sợi.



Hình 5. Mô hình cấu trúc không gian của *CYP89A2* được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0.



Hình 6. Vị trí các amino acid có thể glycosyl hóa.

Xác định mức độ phiên mã của gene *CYP89A2* trong tế bào huyền phù

Để hiểu rõ vai trò và hoạt động của gene *CYP89A2*, chúng tôi đánh giá mức độ phiên mã của gene này trong tế bào huyền phù nuôi cấy ở các điều kiện xử lý kích kháng khác nhau. Trong nghiên cứu trước đây, công thức xử lý kích kháng riêng lẻ tốt nhất là MeJA (50 μ M), SA (100 μ M) và YE (3 g/L) (Quang *et al.*, 2022), vì vậy, mức độ phiên mã của gene *CYP89A2* được xác định trong các công thức tốt

nhất này.

Kết quả phân tích Real-Time PCR cho thấy gene *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý MJ, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, xử lý tế bào bằng SA và ME không làm thay đổi hoạt động của gen so với đối chứng (Bảng 2). Theo Quang và cộng sự (2022), các elicitor khi xử lý riêng lẻ đều làm tăng hàm lượng gypenoside trong tế bào, trong đó SA cho hiệu quả cao nhất, đạt 79,721 mg/g khô khi xử lý với

SA 100 μ M sau 6 ngày nuôi cấy, gấp khoảng 2 lần mẫu tự nhiên. Tuy nhiên, phân tích mức độ phiên mã cho thấy gene *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất khi xử lý với MJ, điều này có thể gene *CYP89A2* có thể đóng các vai trò khác trong chu trình sinh tổng hợp gypenoside. Theo Zhang và cộng sự (2021), mức độ biểu hiện của *CYP89A2* trong lá cây Giảo cổ lam là cao nhất, tiếp đến là rễ và biểu hiện ở thân thấp nhất.

Theo các tài liệu đã công bố, gene *CYP89A2* thường biểu hiện mạnh khi có tác động của các yếu tố môi trường, giúp cây kháng lại các yếu tố bất lợi bên

ngoài, đặc biệt là chất diệt cỏ. Theo Chen và cộng sự (2023), gene *CYP89A2* biểu hiện vượt mức ở cây *Polypogon fugax* nhằm làm giảm độc tố của quizalofop-p-ethyl lên tế bào, là yếu tố điều hòa khả năng kháng chất diệt cỏ trong cây (Chen *et al.*, 2023). Gene *CYP89A2* cũng biểu hiện ở các mô trong cây *Apera spica-venti* khi xử lý thuốc diệt cỏ (Babineau *et al.*, 2017). Ở cây *Arabidopsis thaliana*, biểu hiện của gene *CYP89A2* cũng tăng lên khi xử lý ánh sáng đỏ xa (far red) (Cole, 2018). Tuy nhiên, vai trò chức năng cụ thể của gene *CYP89A2* vào con đường sinh tổng hợp saponin cần nghiên cứu thêm.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện của gene *CYP89A2* trong các loại mẫu khác nhau.

Gene	Xử lý kích kháng	Giá trị Ct GP-18S	Gene	2- $\Delta\Delta$ Ct
<i>CYP89A2</i>	YE	26,30	34,51	0,10
	SA	28,79	36,78	0,11
	MJ	32,43	33,81	10,83
	NC	28,94	33,76	1,00

KẾT LUẬN

Đoạn gene *CYP89A2* phân lập từ cây Giảo cổ lam có nguồn gốc tỉnh Quảng Nam có trình tự nucleotide tương đồng 99,17% với trình tự mRNA *CYP89A2* của cây Giảo cổ lam đã được công bố trên Ngân hàng Gene (mã số MT416753). Kết quả dự đoán cấu trúc và đặc tính enzyme cho thấy enzyme *CYP89A2* có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α và 8 vị trí gấp cuộn phiến β , có 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N-glycosylation. *CYP89A2* chủ yếu hoạt động xuyên màng, có khả năng hoạt động tốt ở môi trường kiềm và chịu nhiệt độ từ 55 - 65 $^{\circ}$ C. Enzyme *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý methyl jasmonate, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhóm Nghiên cứu mạnh, Đại học Huế (mã số NCM.DHH2020.12).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Babineau M, Mahmood K, Mathiassen SK, Kudsk P, Kristensen M (2017) De novo transcriptome assembly analysis of weed *Apera spica-venti* from seven tissues and growth stages. *BMC Genomics* 18(1): 128. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3538-4>.
 Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền, Ngô Xuân Bình (2015) Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb)

bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 15: 249-256.

Chen PY, Chang CC, Huang HC, Zhang LJ, Liaw CC, Lin YC, Nguyen NL, Vo TH, Cheng YY, Morris-Natschke SL, Lee KH, Kuo YH (2019) New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules* 24(7). 10.3390/molecules24071375

Chen W, Li S, Bai D, Li Z, Liu H, Bai L, Pan L (2023) Detoxification mechanism of herbicide in *Polypogon fugax* and its influence on rhizosphere enzyme activities. *Ecotoxicol Environ Saf* 263: 115263. 10.1016/j.ecoenv.2023.115263.

Cole A (2018) Regulation of Seed Germination by MFT, MEE26, and *CYP89A2* in *Arabidopsis thaliana*. Thesis, University of York.

Cui WY, Jin Y, Liu H, Zu ML, Zhai XF, Yang C, Gu YL, Cheng Y, Piao XL (2020) Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities. *Nat Prod Res* 1-9.

Gavel Y, von Heijne G (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3: (5) 433-442.

Hoàng Tấn Quảng, Phạm Thị Diễm Thi, Trần Thúy Lan, Phạm Mai Thu Thủy, Vũ Đức Hoàng, Phan Thị Á Kim (2021) Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của callus cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) - một loại thảo dược quý. *Tạp chí Khoa*

- học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên 130(1C): 127-137.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10(6): 845-858.
- Kozłowski Lukasz P (2021) IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Res* 49(W1): W285-W292.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3): 567-580.
- Letunic I, Khedkar S, Bork P (2021) SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 49(D1): D458-D460.
- Lin H, Chen W, Ding H (2013) AcalPred: a sequence-based tool for discriminating between acidic and alkaline enzymes. *PLoS One* 8(10): e75726.
- Quang HT, Thi PTD, Sang DN, Tram TTN, Huy ND, Dung TQ, The QTT (2022) Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*). *Molecules* 27(9): 2972. <https://doi.org/10.3390/molecules27092972>.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022-3027.
- Tung NT, Thi PTD, Sang DN, Thao DT, Quang HT (2022) Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. *Res J Biotech* 17: 61-68.
- Wang T, Tian XR, Wu XY, Luo Z, Li G, Peng XL, Liu SB (2018) Effect of light quality on total gypenosides accumulation and related key enzyme gene expression in *Gynostemma pentaphyllum*. *Chin Her Med* 10(1): 34-39.
- Xu R, Zhang J, You J, Gao L, Li Y, Zhang S, Zhu W, Shu S, Xiong C, Xiong H, Chen P, Guo J, Liu Z (2020) Full-length transcriptome sequencing and modular organization analysis of oleanolic acid- and dammarane-type saponins related gene expression patterns in *Panax japonicus*. *Genomics* 112(6): 4137-4147.
- Zhang Y, Chen Q, Huang Y, Zhao R, Sun J, Yuan X, Xu H, Liu H, Wu Y (2021) Gene excavation and expression analysis of CYP and UGT related to the post modifying stage of gypenoside biosynthesis in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by comprehensive analysis of RNA and proteome sequencing. *PLOS ONE* 16: (12) e0260027. [10.1371/journal.pone.0260027](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260027). eCollection 2021.

GENE ISOLATION, CHARACTERISTICS PREDICTION AND TRANSCRIPTION LEVEL OF CYTOCHROME P450 GENE (CYP89A2) FROM *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino

Dang Ngoc Sang^{1,2}, Nguyen Quang Hoang Vu¹, Nguyen Thi Nguyen Man³, Nguyen Huu Thuan Anh⁴, Tran Quoc Dung⁵, Hoang Tan Quang^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University

²Vo Nguyen Giap Gifted High School, Quang Binh

³QueenLabs Biotechnology One Member Company, Hue

⁴Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City

⁵University of Education, Hue University

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: htquang@hueuni.edu.vn

SUMMARY

Gypenosides produced from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino are mainly dammarane-type triterpenoid saponins with diverse structures and important biological activities. Seven cytochrome P450 (CYP) and five UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes have been demonstrated to be involved in gypenoside biosynthesis and distribution in *G. pentaphyllum*. In this study, the transcription levels and characteristics of the CYP89A2 gene were determined. The result showed that the nucleotide sequence of CYP89A2 gene fragment had

99.17% similarity to the reference gene (GenBank accession number of MT416753). The secondary structure prediction reveals that *CYP89A2* has 15 α -helices and 8 β -sheets. The predicted *CYP89A2* is an alkaline extracellular enzyme and resistant to temperatures from 55-65 °C. Realtime PCR analysis showed that the *CYP89A2* transcription level was high in suspension cells with methyl jasmonate treatment, about 11 times higher than that of control. Meanwhile, salicylic acid and yeast extract elicitation did not change gene transcription compared to the control. The results provide a scientific basis for studying the gene expression regulation mechanism of gypenoside biosynthesis in the future.

Keywords: *Bioinformatics tools, Gynostemma pentaphyllum, Cytochrome P450, CYP89A2, suspension cell.*