

TỐI ƯU BIỂU HIỆN CsLAR1 TÁI TỔ HỢP TRONG VI KHUẨN *E. COLI* ROSETTA VÀ PHÂN TÍCH HOẠT TÍNH

Hoàng Thị Thu Yên^{1*}, Nguyễn Thị Yên¹, Huỳnh Thị Thu Huệ², Nguyễn Hải Đăng^{3,4}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

²Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ, Viện Hóa sinh biển - Viện HLKH & CNVN

⁴Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội - Viện HLKH & CNVN

TÓM TẮT

Gen *CsLAR1* phân lập từ chè Trung Du xanh trồng tại Thái Nguyên đã được gắn vào vector pET32a(+) và biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* Rosetta. Nghiên cứu này trình bày kết quả tối ưu biểu hiện và phân tích hoạt tính của *CsLAR1* tái tổ hợp (recombinant *CsLAR1* - r*CsLAR1*). Chủng *E. coli* chứa pET32a(+)-*CsLAR1* tạo r*CsLAR1* lượng lớn ở pha tan khi được nuôi trong môi trường LB có bổ sung ethanol ở nhiệt độ 16 °C, 24 giờ. r*CsLAR1* pha tan được ủ trong dịch chiết lá chè tươi có hoạt động xúc tác làm thay đổi hàm lượng của một số chất so với đối chứng mà không phải là catechin, galocatechin hoặc epicatechin. Hoạt tính của r*CsLAR1* thu được chứng tỏ *CsLAR1* có thể xúc tác cơ chất khác ở chè ngoài leucocyanidins.

Từ khóa: chè Trung Du xanh, leucoanthocyanidin reductase, catechins, catechin, gallocatechin, *CsLAR1* tái tổ hợp, leucocyanidins

Ngày nhận bài: 26/4/2019; Ngày hoàn thiện: 30/5/2019; Ngày đăng: 16/6/2019

OPTIMIZATION OF RECOMBINANT CsLAR1 EXPRESSION IN *E. COLI* ROSETTA AND ACTIVITY ANALYSIS

Hoang Thi Thu Yen^{1*}, Nguyen Thi Yen¹, Huynh Thi Thu Hue², Nguyen Hai Dang^{3,4}

¹University of Sciences – TNU, ²Institute of genome research – VAST,

³Advanced Center for Bioorganic Chemistry, Institute of Marine Biochemistry – VAST,

⁴University of Science and Technology of Hanoi - VAST

ABSTRACT

CsLAR1 gene isolated from the TrungDuxanh tea has grown in Thai Nguyen, It was ligated to pET32a(+) vector and expressed in *E. coli* Rosetta bacteria. This study presents the optimal results of expression and activity analysis of recombinant *CsLAR1* (r*CsLAR1*). *E. coli* strain containing pET32a(+)-*CsLAR1* produces a large amount of r*CsLAR1* when cultured in an LB supplemented with ethanol at 16 °C, after inducing 24 hours. r*CsLAR1* is incubated in an extract solution from fresh tea leaves that alters the content of some substances compared to the control but not catechin, galocatechin or epicatechin. The r*CsLAR1* activity was obtained, demonstrating that *CsLAR1* can catalyze other substrate in tea in addition to leucocyanidins.

Key words: TrungDuxanh tea, Leucoanthocyanidin reductase, catechins, catechin, gallocatechin, recombinant *CsLAR1*, leucocyanidins

Received: 26/4/2019; Revised: 30/5/2019; Published: 16/6/2019

* Corresponding author. Email: yenhtt@tnus.edu.vn

1. Mở đầu

Catechins có nhiều lợi ích sức khỏe cho con người như khả năng chống oxy hóa [1], các hoạt tính phòng ngừa ung thư tuyến tiền liệt và buồng trứng [2]; [3], chống ung thư và bệnh tiểu đường [4-6], ngăn chặn bệnh tim mạch [6]; [7]; đặc biệt catechins có thể cũng đóng vai trò trong chống lại tác nhân gây bệnh [8]. Thành phần catechins bao gồm Epicatechin (EC), Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechin gallate (EGCG), catechin (C) và Gallocatechin (GC) [9]. Catechins được chiết xuất từ chồi, lá, thân và rễ non của cây chè được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả cho thấy hàm lượng EGCG, ECG, EGC và EC cao hơn nhiều so với C và GC. EGCG và ECG chiếm ưu thế trong lá. Sự tích lũy catechins ở chồi và lá non lớn hơn so với lá trưởng thành, thân và rễ. Tuy nhiên, chỉ EC được phát hiện ở rễ [10]. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng cả thành phần và sự tích lũy catechins có tương quan cao với mức độ biểu hiện của các gen [11-14]. Catechins của chè được tổng hợp theo 4 nhánh với sự xúc tác trực tiếp của 2 enzyme leucoanthocyanidin reductase (LAR) và anthocyanidin reductase (ANR). ANR có hai isoform được kí hiệu là CsANR1 và CsANR2 xúc tác anthocyanin để tạo thành epicatechins (EC và EGC). Chức năng của các LAR ở chè vẫn chưa được sáng tỏ hoàn toàn. CsLAR (*Camellia sinensis* LAR – CsLAR) ở chè mã hóa bởi ba locus gen được đặt tên là *CsLARI*, *CsLAR2*, *CsLAR3* (còn được gọi là *CsLARA*, *CsLARb* và *CsLARc*). Bằng kỹ thuật Real time PCR định lượng (qRT-PCR) đã xác định *CsLARI* và *CsLAR2* có mức độ phiên mã giống nhau và biểu hiện nhiều ở chồi non và lá, biểu hiện ít trong thân và rễ. *CsLAR3* biểu hiện chủ yếu ở rễ, biểu hiện vừa phải ở lá và thân; mức độ biểu hiện của nó ở rễ là gấp đôi so với ở lá. Mức độ phiên mã của ba CsLAR trong lá trưởng thành là thấp nhất trong số tất cả các cơ quan lá [15].

Cho đến nay, các gen mã hóa LAR từ các loài thực vật được nghiên cứu *in vitro* và biểu hiện chức năng xúc tác các loại leucocyanidin tạo ra các sản phẩm như afzelechin (AFZ), C và GC [16-19]. Tuy nhiên, thực vật biến đổi gen có LAR biểu hiện quá mức dẫn đến tạo ra các sản phẩm khác nhau, điều này cho thấy LAR có chức năng phức tạp. Gen *MtLAR* (*Medicago truncatula* LAR), *DuLAR* (*Desmodium uncinatum* LAR) được biểu hiện ở cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cây cỏ ba lá trắng (*Trifolium repens*) nhưng không phát hiện được sản phẩm C [17]; [19]. Tuy nhiên, cây thuốc lá chuyển gen *TcLAR* (*Theobroma cacao* LAR) tạo ra cả EC và C [20]. Các CsLAR được biểu hiện ở *E. coli* và có chức năng chuyển hóa các leucocyanidin tạo ra AFZ, C và GC [8]; [15]. Trong khi đó, CsLAR biểu hiện quá mức ở cây cỏ *Arabidopsis thaliana* nhưng không phát được sự xuất hiện C. Mặt khác, sự biểu hiện quá mức của CsLAR trong thuốc lá lại thu được EC là sản phẩm chính và C tồn tại với lượng nhỏ [15]. Do đó, nhóm nghiên cứu giả thuyết rằng các cơ chất khác của LAR có thể tồn tại trong thuốc lá ngoài các hợp chất leucocyanidin. Giả thuyết này phù hợp với nghiên cứu của Dixon và đồng nghiệp chứng minh, *MtLAR* có thể xúc tác cơ chất mới (4β-(S-cysteinyl)-epicatechin) tạo thành EC *in vitro* [21].

Gen mã hóa CsLAR1 phân lập từ chè Trung Du xanh đã được tạo dòng và nghiên cứu biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* [22]; [23]. Tuy nhiên, protein rCsLAR1 thu được hầu hết biểu hiện ở dạng không tan, chỉ một lượng nhỏ ở dạng tan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục tiến hành tối ưu các điều kiện nhiệt độ, thời gian và môi trường cảm ứng biểu hiện để thu lượng lớn rCsLAR1 ở pha tan phục vụ phân tích hoạt tính sinh học.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Chúng *E. coli* Rosetta1 và Rosetta2 chứa vector biểu hiện pET32a(+)-*CsLARI* được lưu giữ tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen,

Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tối ưu biểu hiện rCsLAR1

Dịch nuôi chủng *E. coli* Rosetta1 và Rosetta2 chứa cấu trúc biểu hiện gen mã hóa CsLAR1 trong vector pET32a(+) được phục hồi và cấy trải trên đĩa LB có bổ sung kháng sinh ampicillin (50 mg/L), nuôi qua đêm ở điều kiện 37 °C. Tiếp theo, chọn một khuẩn lạc đơn *E. coli* Rosetta1/ pET32a(+)_CsLAR1 trên đĩa biển nạp nuôi lắc trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Ampicillin (50 mg/L) qua đêm. Dịch khuẩn nuôi qua đêm được làm mới trong 8 ml LBA (OD₆₀₀ = 0,1). Sau 2h nuôi lắc ở 37 °C, dịch khuẩn đạt giá trị từ OD₆₀₀ = 0,6 sẽ được cảm ứng biểu hiện với IPTG 1mM và tiếp tục nuôi ở các điều kiện như sau: 16°C-24 h và 48 h, 23 °C-8 h, 30 °C-6 h và 37 °C-5h [24]. Thí nghiệm được thực hiện cùng đối chứng *E. coli* Rosetta chứa pET32a(+)_CsLAR1 không cảm ứng IPTG.

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường LB có bổ sung thêm ethanol để cảm ứng biểu hiện gen CsLAR1 theo Chhetri và đtg (2015) [25], dịch nuôi *E. coli* Rosetta1/pET32a(+)_CsLAR1 và Rosetta2/pET32a(+)_CsLAR1 đạt OD₆₀₀ = 0,6, sau đó bổ sung ngay ethanol (ethanol 1%, 2% và 3%) vào môi trường trước khi cảm ứng biểu hiện ở điều kiện 16 °C, 24 h và IPTG 1 mM.

Trong cả 2 trường hợp, cặn tế bào sau cảm ứng được thu và hòa với đệm PBS 1x, pH 7,4 sao cho OD₆₀₀ của các mẫu đưa về giá trị 10. Dịch này được siêu âm phá tế bào để thu protein tổng số và thực hiện ly tâm thu protein pha tan và pha tủa (Novagen). Kết quả được kiểm tra bằng điện di trên gel SDS-PAGE 12,6% (25µl/giếng).

2.2.2. Chuẩn bị mẫu rCsLAR1 để sắc ký

Nuôi chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta1/pET32a(+)_CsLAR1 với lượng nhỏ trong môi trường LB có bổ sung Ampicillin (50 mg/L) qua đêm. Nuôi mới lại dịch khuẩn

trong môi trường LBA mới, nuôi lắc 200 v/p ở 37 °C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6. Tiếp theo bổ sung ethanol 1% và cảm ứng biểu hiện CsLAR1 với IPTG 1mM ở 16 °C, nuôi lắc 200 v/p. Sau 24h nuôi cấy, rCsLAR1 ở pha tan được thu nhận bằng siêu âm phá vỡ tế bào và ly tâm. Chuyển dung dịch chứa rCsLAR1 vào ống falcol 50 (20 mL/ống). Làm tương tự với vi khuẩn không được cảm ứng biểu hiện. Tiếp theo, bổ sung vào dung dịch glycerol 10% (w/v), 100 mM KPi (pH 7,0), 4 mM dithiothreitol (DTT), 0,5 mM NADPH và 500 µL dịch chiết lá chè tươi (3 g/25 mL, 6 g/25 mL). Lắc đều và ủ ở 30 °C. Sau 4 h ủ, ly tâm 4000 v/p, 15 phút thu dịch nuôi cấy để kiểm tra hoạt tính của enzyme bằng HPLC.

2.2.3. Phương pháp sắc ký

Phương pháp sắc ký được thực hiện như mô tả của Hoàng Thị Thu Yên và đtg (2018) [23]. Pha động sử dụng hệ dung môi kênh A H₂O (acetic 1%) – kênh B ACN được thiết lập gradient biến thiên từ tỉ lệ 95/5 đến tỉ lệ 5/95 trong 45 phút; Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; Lượng bơm mẫu: 20 µL; thời gian phân tích: 45 phút; Nhiệt độ cột: 25°C; Bước sóng lựa chọn: 280 nm. Hệ thống LC-MS được kết nối với phần mềm Agilent OpenLAB Control Panel. Khí nitơ được bơm với tốc độ dòng 5,0 L/phút, áp suất đầu phun đạt 40 psi, nhiệt độ làm khô đạt 250°C. Chế độ bắn mảnh phổ khối lựa chọn ESI ở mode negative với khoảng phổ quét từ 250 đến 400 nm.

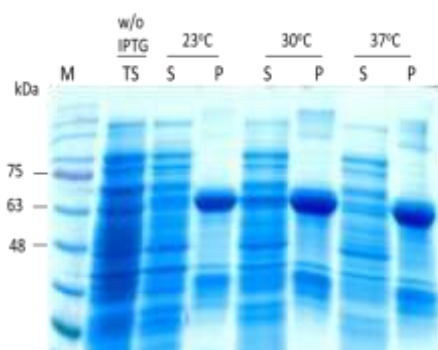
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tối ưu điều kiện nhiệt độ và thời gian để thu rCsLAR1 ở pha tan

Gen mã hóa CsLAR1 từ giống chè Trung Du xanh trồng tại Thái Nguyên đã được phân lập có kích thước 1,029 kb, mã hóa 342 amino acid. CsLAR1 có tính bảo thủ ở các amino acid liên kết với cơ chất, trong khi vùng liên kết với NADP tất cả các mẫu công bố đều là S, còn mẫu chè Trung Du xanh là C. Motif RFLP và THD có tính bảo thủ cao, trong khi motif ICCN của CsLAR1 từ chè Trung Du xanh có 1 vị trí amino acid khác biệt so với

các trình tự còn lại I153T. Motif ICCN nằm gần vị trí liên kết cơ chất, cho thấy đột biến này có thể có tầm quan trọng đối với hoạt động của CsLAR1 [22]. Vector tái tổ hợp pET32a(+) mang gen *CsLAR1* được biến nạp vào 2 chủng tế bào biểu hiện là *E. coli* Rosetta1 và *E. coli* Rosetta2. Protein tái tổ hợp thu được có kích thước lý thuyết khoảng 54,04 kDa bao gồm CsLAR1 theo tính toán lý thuyết là khoảng 37,62 kDa cùng với đoạn trình tự TrxA mã hoá cho protein thioredoxin (11,8 kDa), His-Taq (1,68 kDa), S-Taq (1,7 kDa), thrombin (0,63 kDa) và enterkinase (0,61 kDa). Trong nghiên cứu công bố trước đây, protein rCsLAR1 ở cả 2 chủng hầu hết biểu hiện ở dạng không tan, chỉ một lượng nhỏ ở dạng tan [23]. Để thu rCsLAR1 với lượng lớn ở pha tan, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian biểu hiện.

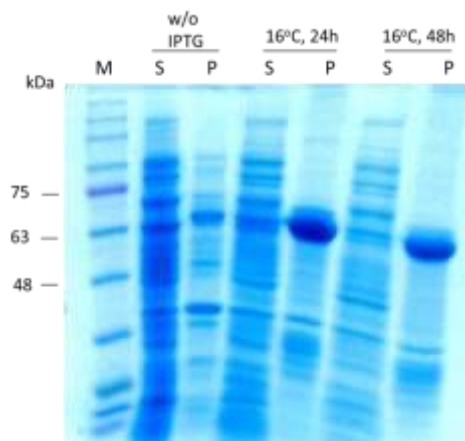
Theo Schein và đtg (1988) [26], *E. coli* sinh trưởng và phát triển tốt ở 37 °C. Tuy nhiên, cảm ứng biểu hiện ở 37 °C, protein ngoại lai được tạo ra thường tích lũy ở pha tủa (thể vùi). Trong khi cảm ứng ở 23 – 30 °C, 30-90% protein tái tổ hợp thu được ở pha tan. Tăng trưởng và cảm ứng ở 25 °C hoặc 30 °C có thể là tối ưu nếu sử dụng trình tự peptide tín hiệu của một số vector pET (Novagen). Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành tối ưu nhiệt độ biểu hiện rCsLAR1, kết quả nghiên cứu trình bày ở hình 1.



Hình 1. Tối ưu điều kiện nhiệt độ và thời gian để thu enzyme tái tổ hợp ở pha tan

w/o IPTG: Đối chứng không cảm ứng IPTG, TS: protein tổng số, S: protein pha tan, P: protein pha tủa, M: thang chuẩn protein

Kết quả trên hình 1 cho thấy lượng protein ngoại lai có kích thước khoảng 54,04 kDa biểu hiện khá nhiều ở nhiệt độ 37 °C, 30 °C và 23 °C. Đó chính là kích thước của rCsLAR1 theo tính toán lý thuyết. Tuy nhiên, hầu hết lượng protein CsLAR1 thu được đều biểu hiện ở pha tủa. Trong một số trường hợp, cảm ứng kéo dài (qua đêm) ở nhiệt độ thấp (15 – 20 °C) đã được chứng minh là nhiệt độ tối ưu thu nhận protein pha tan (Novagen). Cảm ứng biểu hiện khi giảm nhiệt độ cũng được chứng minh khi nghiên cứu biểu hiện gen mô hình GFP [24]. Do đó, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ 16°C để cảm ứng biểu hiện và thu rCsLAR1 sau 24 và 48 giờ cảm ứng. Kết quả điện di kiểm tra rCsLAR1 thu được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Tối ưu điều kiện nhiệt độ và thời gian để thu enzyme tái tổ hợp ở pha tan

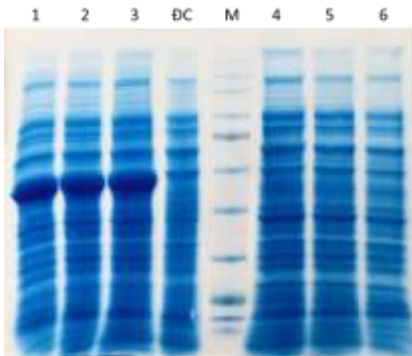
w/o IPTG: Đối chứng không cảm ứng IPTG, TS: protein tổng số, S: protein pha tan, P: protein pha tủa, M: thang chuẩn protein

Kết quả ở hình 2 cho thấy, CsLAR1 biểu hiện chủ yếu ở pha tủa và biểu hiện ít hơn ở điều kiện 16 °C, 48 h. Vì vậy, trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi lựa chọn nhiệt độ 16°C và sau 24 giờ cảm ứng để thu CsLAR1 ở pha tan.

3.2. Tăng cường biểu hiện rCsLAR1 ở pha tan trên nền môi trường LB có bổ sung ethanol

Nghiên cứu của Chhetri và đtg (2015) chỉ ra protein tái tổ hợp ở pha tan được biểu hiện tăng khi bổ sung ethanol vì ethanol là một phân tử lưỡng cực và có thể ảnh hưởng đến

môi trường, hoạt động của màng tế bào làm tăng cường tổng hợp DNA. Do đó, ethanol được nhóm nghiên cứu cho rằng có vai trò tăng cường tổng hợp protein. Hơn nữa, ethanol có thể giúp tăng cường khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp và ổn định trạng thái tự nhiên của protein. Tuy nhiên, cơ chế phân tử ethanol tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp ở *E. coli* vẫn chưa được sáng tỏ [27]. Trên cơ sở đó, để thu nhận CsLAR1 ở pha tan chúng tôi bổ sung ethanol vào môi trường nuôi ngay trước lúc cảm ứng đối với chủng biểu hiện. Kết quả nghiên cứu được trình bày trên hình 3.



Hình 3. Điện di sản phẩm biểu hiện rCsLAR1 khi cảm ứng bổ sung EtOH

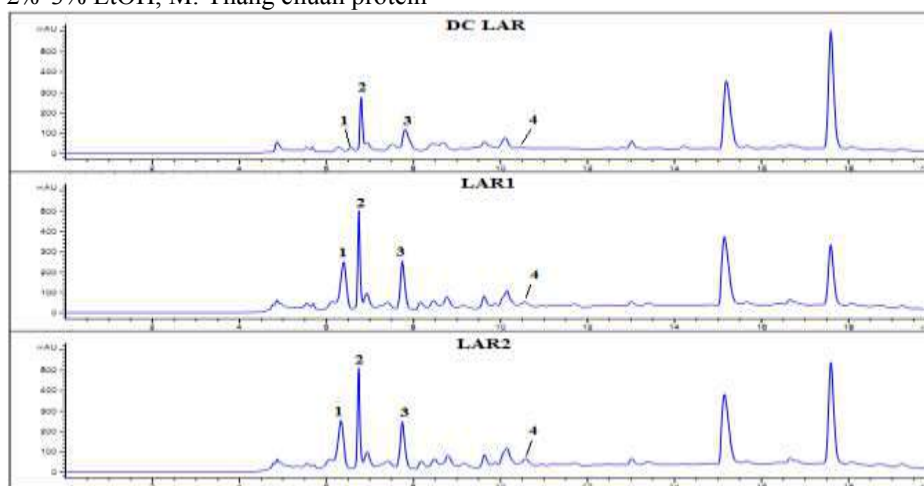
DC: đối chứng không cảm ứng, 1-3: pha tan chủng *E. coli* Rosetta1/pET32a(+)_CsLAR1 có bổ sung lần lượt 1%-2%-3% EtOH, 4-6: pha tan chủng *E. coli* Rosetta2/pET32a(+)_CsLAR1 có bổ sung lần lượt 1%-2%-3% EtOH, M: Thang chuẩn protein

Kết quả ở hình 3 cho thấy, chủng *E. coli* Rosetta2/pET32a(+)_CsLAR1 không thu được protein đích biểu hiện ở pha tan. Tuy nhiên, đối với chủng *E. coli* Rosetta1/pET32a(+)_CsLAR1, protein CsLAR1 đã biểu hiện trong pha tan với lượng khá lớn. Như vậy, chúng tôi đã tối ưu biểu hiện CsLAR1 ở pha tan thành công.

Phân tích hoạt tính CsLAR1 tái tổ hợp

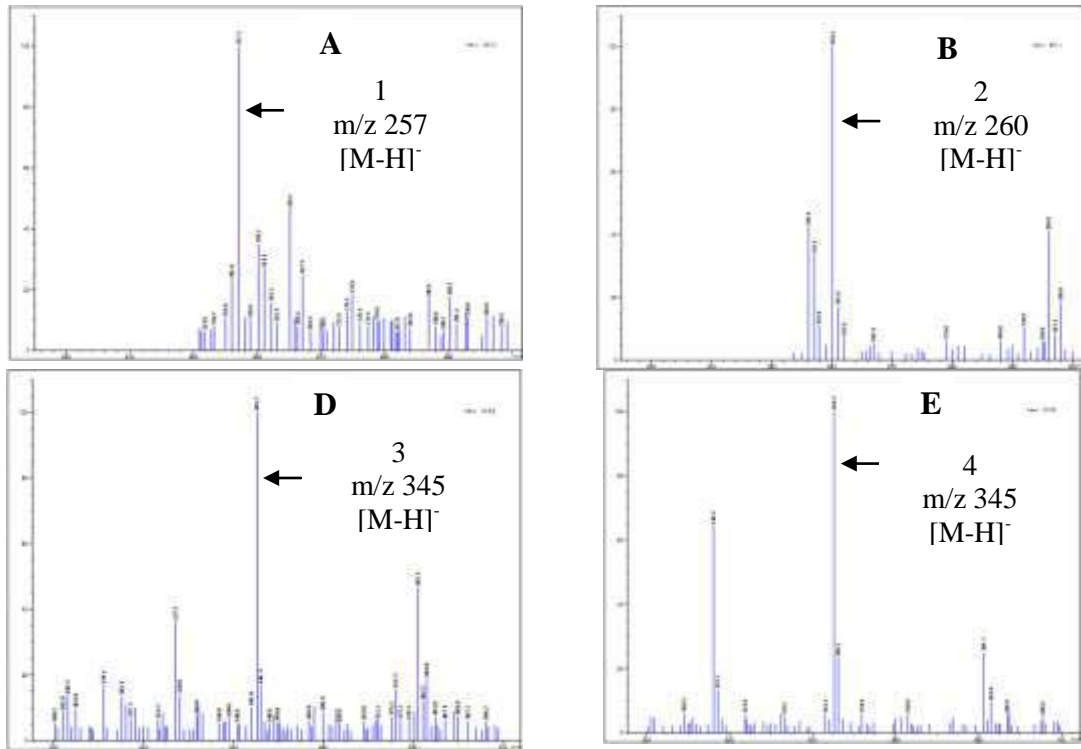
Các loại leucocyanidin là cơ chất trực tiếp của CsLAR1, không bền và không có sẵn trên thị trường. Do đó, chúng tôi không thể trực tiếp phát hiện hoạt tính xúc tác của rCsLAR1. Chúng tôi đã sử dụng rCsLAR1 ở pha tan trộn với dịch chiết của lá chè tươi và tiến hành phản ứng ở nhiệt độ thích hợp. Hoạt tính sinh học của rCsLAR1 được phân tích và kiểm tra trên hệ thống LC-MS, kết quả thể hiện ở hình 4.

Kết quả hình 4 cho thấy sắc ký đồ của mẫu đối chứng, các chất số 1, 2, 3, 4 có hàm lượng thấp hoặc không có. Tuy nhiên, ở mẫu sau khi ủ với dịch rCsLAR1 thì hàm lượng 4 hợp chất này tăng lên rõ rệt. Sắc ký đồ của 4 chất với hàm lượng không khác nhau khi tăng hàm lượng rCsLAR1 trong phản ứng, điều này có thể giải thích do nguồn cơ chất CsLAR1 xúc tác giống nhau. Như vậy, bước đầu có thể xác định CsLAR1 có hoạt tính sinh học và hoạt động tốt.



Hình 4. Sắc ký đồ UV 280nm phân tích hoạt tính của rCsLAR1

DC LAR: Sắc ký đồ mẫu đối chứng không chứa rCsLAR1; LAR1 và LAR2: Sắc ký đồ hoạt tính của rCsLAR1 với hàm lượng tương ứng 3 g/25 mL và 6 g/25 mL



Hình 5. Phổ ESI-MS negative của 4 chất thay đổi khi phân tích hoạt tính của CsLAR1 trong dịch chiết lá chè loại A (chất 1), B (chất 2), C (chất 3), D (chất 4)

Theo nghiên cứu của Pang và đtg (2013); Wang và đtg (2018), CsLAR1 xúc tác các cơ chất có thể cho các sản phẩm catechin (m/z 289), epicatechin (m/z 290) hoặc galocatechin (m/z 306) [8]; [15]. Trên hệ thống LC, pic tín hiệu của các chất 1, 2, 3 và 4 được phát hiện lần lượt tại thời gian lưu 5,5 phút, 5,8 phút, 6,8 và 10,5 phút (Hình 4). Đồng thời, hệ thống MS phát hiện được pic ion phân tử tại m/z 257,0 [M-H]⁻, 260,0 [M-H]⁻, 345,0 [M-H]⁻ và 345,0 [M-H]⁻ tương ứng với các thời gian lưu trên (Hình 5). Như vậy, các chất thay đổi thu được có pic ion phân tử không phải là catechin, epicatechin hoặc galocatechin như chức năng của CsLAR1 đã công bố. Do đó, cần có nghiên cứu thêm để xác định rõ các hợp chất này. Hoạt tính của rCsLAR1 thu được chứng tỏ CsLAR1 có thể xúc tác cơ chất khác ở chè ngoài nhóm chất leucocyanidin.

4. Kết luận

Chủng *E. coli* Rosetta1 chứa pET32a(+)_{CsLAR1} được nuôi trong môi

trường LB có bổ sung ethanol ở nhiệt độ 16°C, cảm ứng sau 24 giờ tạo rCsLAR1 lượng lớn ở pha tan. Bằng kỹ thuật HPLC đã phát hiện rCsLAR1 pha tan có hoạt động xúc tác làm thay đổi hàm lượng của một số chất so với đối chứng mà không phải là catechin, galocatechin hoặc epicatechin khi được ủ trong dịch chiết chè.

Lời cảm ơn

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Luximon-Ramma, V. S. Neergheen, T. Bahorun, A. Crozier, V. Zbarsky, K. P. Datla, D. T. Dexter & O. I. Aruoma, "Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: a potential contributor to their antioxidant functions", *Biofactors*, Vol. 27, No. 1-4, pp. 79-91, 2006.
- [2]. D. L. Bemis, A. E. Katz & R. Buttyan, "Clinical trials of natural products as chemopreventive agents for prostate cancer",

- Expert Opin Investig Drugs*, Vol. 15, No. 10, pp. 1191-1200, 2006.
- [3]. M. H. Ravindranath, T. S. Saravanan, C. C. Monteclaro, N. Presser, X. Ye, S. R. Selvan & S. Brosman, "Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines", *Evid. Based Complement Alternat Med.*, Vol. 3, No. 2, pp. 237-247, 2006.
- [4]. Y. H. Kao, H. H. Chang, M. J. Lee & C. L. Chen, "Tea, obesity, and diabetes", *Mol. Nutr. Food Res.*, Vol. 50, No. 2, pp. 188-210, 2006.
- [5]. S. Wolfram, Y. Wang & F. Thielecke, "Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench", *Mol. Nutr. Food Res.*, Vol. 50, No. 2, pp. 176-187, 2006.
- [6]. T. T. Yang & M. W. Koo, "Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation", *Atherosclerosis*, Vol. 148, No. 1, pp. 67-73, 2000.
- [7]. A. Bordoni, S. Hrelia, C. Angeloni, E. Giordano, C. Guarnieri, C. M. Caldarera & P. L. Biagi, "Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells", *J. Nutr. Biochem.*, Vol. 13, No. 2, pp. 103-111, 2002.
- [8]. Y. Pang, I. S. Abeysinghe, J. He, X. He, D. Huhman, K. M. Mewan, L. W. Sumner, J. Yun & R. A. Dixon, "Functional characterization of proanthocyanidin pathway enzymes from tea and their application for metabolic engineering", *Plant Physiol*, Vol. 161, No. 3, pp. 1103-1116, 2013.
- [9]. Y. S. Zhen, Z. M. Chen, S. J. Cheng & M. L. Chen, *Tea: bioactivity and therapeutic potential*, Taylor & Francis, London, 2002.
- [10]. L. Cui, S. Yao, X. Dai, Q. Yin, Y. Liu, X. Jiang, Y. Wu, Y. Qian, Y. Pang, L. Gao & T. Xia, "Identification of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of astringent taste compounds in tea (*Camellia sinensis*)", *J. Exp. Bot.*, Vol. 67, No. 8, pp. 2285-2297, 2016.
- [11]. X. Jiang, Y. Liu, W. Li, L. Zhao, F. Meng, Y. Wang, H. Tan, H. Yang, C. Wei, X. Wan, L. Gao & T. Xia, "Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant (*Camellia sinensis*)", *PLoS One*, Vol. 8, No. 4, pp. 62315-62329, 2013.
- [12]. A. Rani, K. Singh, P. S. Ahuja & S. Kumar, "Molecular regulation of catechins biosynthesis in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]", *Gene*, Vol. 495, No. 2, pp. 205-210, 2012.
- [13]. K. Wei, L. Wang, C. Zhang, L. Wu, H. Li, F. Zhang & H. Cheng, "Transcriptome Analysis Reveals Key Flavonoid 3'-Hydroxylase and Flavonoid 3',5'-Hydroxylase Genes in Affecting the Ratio of Dihydroxylated to Trihydroxylated Catechins in *Camellia sinensis*", *PLoS One*, Vol. 10, No. 9, 137925-137937, 2015.
- [14]. L. Xiong, J. Li, Y. Li, L. Yuan, S. Liu, J. Huang & Z. Liu, "Dynamic changes in catechin levels and catechin biosynthesis-related gene expression in albino tea plants (*Camellia sinensis* L.)", *Plant Physiol Biochem*, Vol. 71, pp. 132-143, 2013.
- [15]. P. Wang, L. Zhang, X. Jiang, X. Dai, L. Xu, T. Li, D. Xing, Y. Li, M. Li, L. Gao & T. Xia, "Evolutionary and functional characterization of leucoanthocyanidin reductases from *Camellia sinensis*", *Planta*, Vol. 247, pp. 139-154 2018.
- [16]. K. N. Kristiansen, "Conversion of (+)-dihydroquercetin to (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidin and (+)-catechin with an enzyme extract from maturing grains of barley", *Carlsberg Res. Commun*, Vol. 51, pp. 51-60, 1986.
- [17]. Y. Pang, G. J. Peel, E. Wright, Z. Wang & R. A. Dixon, "Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*", *Plant Physiol*, Vol. 145, No. 3, pp. 601-615, 2007.
- [18]. H. A. Stafford & H. H. Lester, "Flavan-3-ol Biosynthesis: The Conversion of (+)-Dihydroquercetin and Flavan-3,4-cis-Diol (Leucocyanidin) to (+)-Catechin by Reductases Extracted from Cell Suspension Cultures of Douglas Fir", *Plant Physiol*, Vol. 76, No. 1, pp. 184-186, 1984.
- [19]. G. J. Tanner, K. T. Francki, S. Abrahams, J. M. Watson, P. J. Larkin & A. R. Ashton, "Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA", *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, No. 34, pp. 31647-31656, 2003.
- [20]. Y. Liu, Z. Shi, S. Maximova, M. J. Payne & M. J. Guiltinan, "Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase", *BMC Plant Biol.*, Vol. 13, pp. 202, 2013.
- [21]. C. Liu, X. Wang, V. Shulaev & R. A. Dixon, "A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins", *Nat. Plants*, Vol. 2, pp. 16182, 2016.
- [22]. Hoàng Thị Thu Yên, Dương Trung Thành, Phạm Thị Hằng, Dương Trung Dũng & Huỳnh Thị Thu Huệ, "Phân lập và mô tả trình tự các gen mã hóa leucoanthocyanidin reductase và anthocyanidin reductase từ chè Trung du xanh

Thái Nguyên (*Camellia sinensis*)", *Công nghệ Sinh học*, T. 16, S. 3, tr. 234-242, 2018.

[23]. Hoàng Thị Thu Yên & Huỳnh Thị Thu Huệ, "Biểu hiện gen mã hóa leucoanthocyanidin reductase phân lập từ chè trung du xanh (*Camellia sinensis* var. *macrophylla*) trong vi khuẩn *E. coli*", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, T. 187, S. 11, tr. 129-135, 2018.

[24]. X. Jiang, H. Zhang, J. Yang, M. Liu, H. Feng, X. Liu, Y. Cao, D. Feng & M. Xian, "Induction of gene expression in bacteria at optimal growth temperatures", *Appl. Microbiol Biotechnol*, Vol. 97, No. 12, pp. 5423-5431, 2013.

[25]. G. Chhetri, P. Kalita & T. Tripathi, "An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*", *MethodsX*, Vol. 2, pp. 385-391, 2015.

[26]. C. H. Schein & M. H. M. Noteborn, "Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature", *Bio/Technology*, Vol. 6, pp. 291-294, 1988.

[27]. G. Chhetri, P. Kalita & T. Tripathi, "An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*", *MethodsX*, Vol. 2, pp. 385-391, 2015.