

TÁCH DÒNG PHÂN TỬ VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN *FLAVONOID 3' 5' HYDROXYLASE* PHÂN LẬP TỪ CÂY Ô ĐÀU (*Aconitum carmichaelii* Debx.)

Hoàng Thị Thu Hoàn^{1,2}, Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Chu Hoàng Mậu¹
¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang

TÓM TẮT

Cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) là loại cây dược liệu chứa nhiều loại dược chất quý, trong đó có flavonoid. Flavonoid là chất quan trọng có tác dụng chống oxy hóa, chống tăng sinh tế bào và đặc biệt là chống ung thư, nhưng hàm lượng flavonoid tự nhiên trong Ô đầu lại rất thấp. Flavonoid 3' 5' hydroxylase (F3'5'H) là enzyme quan trọng xúc tác cho phản ứng cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid ở cây ô đầu. Do vậy tiếp cận nghiên cứu biểu hiện mạnh gen mã hóa F3'5'H nhằm nâng cao hàm lượng flavonoid trong ô đầu là hướng mới, hiệu quả được đặt ra trong chiến lược nghiên cứu cây dược liệu. Trong bài báo này, nhóm tác giả trình bày đặc điểm của gen *Aconitum carmichaelii* flavonoid 3' 5' hydroxylase (*AcF3'5'H*) phân lập từ mRNA của cây Ô đầu và thiết kế cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* trong vector biểu hiện thực vật *pCB301* phục vụ phân tích tăng cường biểu hiện gen *AcF3'5'H* trên các cây ô đầu chuyển gen. Đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* có 1521 bp, mã hóa 506 amino acid. Cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* trong vector chuyển gen *pCB301* chứa promoter 35S, trình tự c-myc và KDEL. Vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* được biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens* tạo vi khuẩn tái tổ hợp.

Từ khóa: *Aconitum carmichaelii*; Ô đầu; flavonoid; gen *AcF3'5'H*; vector chuyển gen.

Ngày nhận bài: 25/5/2020; Ngày hoàn thiện: 01/6/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

MOLECULAR CLONING AND DESIGNING TRANSGENIC CONSTRUCT CARRYING *FLAVONOID 3' 5' HYDROXYLASE* GENE ISOLATED FROM *Aconitum carmichaelii* Debx. PLANTS

Hoang Thi Thu Hoan^{1,2}, Nguyen Thi Ngoc Lan^{1*}, Chu Hoang Mau¹
¹TNU - University of Education, ²Tan Trao University, Tuyen Quang

ABSTRACT

Aconitum carmichaelii is a medicinal plant which contains many valuable pharmaceutical substances, including flavonoids. Flavonoids are important compounds that have antioxidant, anti-cell proliferative and especially anti-cancer activities, however flavonoid content in *A. carmichaelii* plant is very low. Flavonoid 3' 5' hydroxylase (F3'5'H) is an important enzyme that catalyzes the final reaction in flavonoid biosynthesis in *A. carmichaelii* plants. Therefore, this studying approach of overexpression of gene encoding F3'5'H in order to improve flavonoid content is an effective strategy in research of medicinal plants. In this study, the authors present the characteristics of *Aconitum carmichaelii* flavonoid 3' 5' hydroxylase (*AcF3'5'H*) gene isolated from mRNA of *A. carmichaelii* plant, and the design of construct carrying *AcF3'5'H* transgene in plant expression vector to enhance *AcF3'5'H* gene expression in transgenic *A. carmichaelii* Debx plants. The coding segment of *AcF3'5'H* gene has 1521 bp, which encodes 506 amino acids. The construct carrying *AcF3'5'H* transgene in *pCB301* gene transfer vector contains 35S promoter, c-myc and KDEL sequences. The *pCB301_AcF3'5'H* gene transfer vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* to produce recombinant bacteria.

Keywords: *Aconitum carmichaelii*; *AcF3'5'H* gene; Chinese Aconite; flavonoid; gene transfer vector.

Received: 25/5/2020; Revised: 01/6/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: ntnlan.dhsptn@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) chứa dược chất aconitin thuộc loại thuốc độc bảng A, có độc tính cao nhưng vẫn được cho là những vị thuốc quý, được dùng phổ biến trong y dược học cổ truyền phương Đông [1]. Những năm gần đây các nhà khoa học trên thế giới quan tâm tới nhóm chất flavonoid trong chi *Aconitum* nhằm phát triển các dược phẩm theo hướng hiện đại, nâng cao hiệu quả sử dụng một số loài thuộc chi này trong phòng và điều trị bệnh. Nhiều flavonoid đã được phân lập và thử hoạt tính sinh học [2]. Flavonoid là chất chống oxy hóa polyphenol được tìm thấy tự nhiên trong thực vật, có các hoạt động dược lý quan trọng, bao gồm tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống ung thư. Ở Việt Nam, cây Ô đầu được tìm thấy trong tự nhiên ở Nghĩa Lộ (Yên Bái), Hà Giang, Lai Châu, Lào Cai và được trồng thu củ ở Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu từ những năm 70 của thế kỷ XX [1]. Hiện nay, Ô đầu được trồng nhiều ở huyện Quán Bạ, Đồng Văn (Hà Giang) [3]. Trong báo cáo phân tích hàm lượng flavonoid toàn phần trong Ô đầu thu ở Quán Bạ, Hà Giang tính theo quercetin bằng phương pháp đo quang là rất thấp, chỉ đạt 1,60% [4], do vậy cách tiếp cận nghiên cứu làm tăng hàm lượng flavonoid trong Ô đầu được đặt ra để cải thiện hàm lượng dược chất quan trọng này trong cây Ô đầu.

Đặc điểm về cấu trúc vòng B của flavonoid là yếu tố quyết định chính của hoạt động chống oxy hóa của flavonoid. Trong con đường sinh tổng hợp flavonoid, kiểu hydroxyl hóa của vòng B được xác định bởi hai loại enzyme monooxygenase thuộc họ P450, đó là flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) và Flavonoid 3' 5' hydroxylase (F3'5'H). Hydroxyl hóa vị trí 5' bởi F3'5'H là phản ứng đặc biệt quan trọng, xác định sản phẩm cuối trong con đường sinh tổng hợp flavonoid ở thực vật [5]. F3'5'H là enzyme chìa khóa tham gia vào quá trình tổng hợp các hợp chất flavonoid. Sự tăng hoạt động của F3'5'H cho

phép tổng hợp anthocyanin và các loại flavonoid khác [6]. Vì vậy, tăng cường biểu hiện gen *F3'5'H* sẽ làm tăng hàm lượng và hoạt tính enzyme F3'5'H và sẽ làm tăng tích lũy hàm lượng flavonoid trong cây Ô đầu. Chính vì vậy, gen *Aconitum carmichaelii F3'5'H* (*AcF3'5'H*) được chọn làm đối tượng tác động và kỹ thuật chuyển gen được áp dụng nhằm làm tăng hàm lượng flavonoid trong chiến lược tạo cây Ô đầu có hàm lượng dược chất cao. Bài báo này trình bày kết quả tách dòng cDNA và tạo vector chuyển gen thực vật mang gen chuyển *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu phục vụ tạo cây Ô đầu chuyển gen có hàm lượng dược chất cao.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Loài Ô đầu (*A. carmichaelii*) thu tại huyện Quán Bạ, Hà Giang đã được định danh và lưu giữ tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên [3] sử dụng để tách chiết RNA (Hình 1). Vector chuyển gen *pCB301* và vi khuẩn *A. tumefaciens* được cung cấp bởi phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.



Hình 1. Cây Ô đầu (*A. carmichaelii*) lưu giữ tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nhân bản, tách dòng và giải trình tự gen *AcF3'5'H*

Thiết kế cặp mồi PCR nhân bản gen *AcF3'5'H*

Nghiên cứu thông tin về gen *AcF3'5'H* và thiết kế cặp mồi để nhân gen *AcF3'5'H* dựa trên trình tự gen *F3'5'H* của cây

A.carmichaelii mang mã số JN635708.1 trên GenBank [7]. Cặp mồi *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R* được thiết kế có trình tự là:

Fla-NcoI-F:

5'agCCATGGatgttctaccagagaactgtcgctgca
gcgatcattttttcatt -3'

Fla-NotI-R:

5'-atGCGGCCGCgactacataagcagagggtg-3'

Kích thước của đoạn DNA được nhân bản dự kiến là 1536 bp.

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách bằng bộ kit Trizol Reagents của hãng Invitrogen. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng bộ KIT SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis.

Nhân bản, tách dòng và giải trình tự gen AcF3'5'H

Nhân bản gen *AcF3'5'H* được thực hiện bằng PCR với cặp mồi đã thiết kế *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R*. Chu trình nhiệt của PCR là 94°C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kì (94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút); 72°C/7 phút và lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% và được tinh sạch theo bộ kit GeneJET PCR Purification của hãng Fermentas. Tách dòng cDNA trong vector pBT được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001) [8]. Trình tự DNA được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Trình tự nucleotide của gen được phân tích, so sánh trên phần mềm BLAST và BioEdit.

2.2.2. Thiết kế vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H

Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển AcF3'5'H

Xử lý đồng thời vector tái tổ hợp *pBT-AcF3'5'H* và vector *pRTRA7/3* bằng *NcoI/NotI*, sau đó chọn và tinh sạch đoạn DNA theo chỉ dẫn của kit GeneJET PCR Purification để thu nhận đoạn gen *AcF3'5'H*. Trộn gen *AcF3'5'H* với vector *pRTRA7/3* bổ

sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* mang cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA*.

Vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* được nhân dòng trong *E.coli* DH5 α và chọn dòng bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R*.

Tạo vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H

Xử lý đồng thời vector *pRTRA7/3_AcF3'5'H* và vector *pCB301* với *HindIII*, sau đó chọn và tinh sạch các băng DNA điện di theo kích thước để thu nhận các thành phần cần cho việc tạo vector chuyển gen gồm: cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA*; vector mở vòng *pCB301*. Trộn cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA* tinh sạch với vector *pCB301* đã mở vòng, bổ sung T4 DNA ligase để xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector chuyển gen thực vật *pCB301_AcF3'5'H*. Vector tái tổ hợp được nhân dòng trong *E. coli* DH5 α . Tiến hành chọn dòng bằng colony - PCR với cặp mồi *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R*.

2.2.3. Tạo dòng vi khuẩn A. tumefaciens CV58 mang vector chuyển gen

Biến nạp vector *pCB301-AcF3'5'H* vào tế bào khả biến *A.tumefaciens* CV58 bằng xung điện với thông số 400 Ω , 2,5 kV, 2,5 μ F,. Nuôi phục hồi khuẩn sau biến nạp trong 200 μ l LB lỏng ở 28°C, lắc 200 rpm trong 2 giờ. Cây trái trên môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L, ủ ở 28°C trong 48 giờ. Tiến hành chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pCB301_AcF3'5'H* bằng colony-PCR và dòng *A.tumefaciens* dương tính sẽ được lưu giữ phục vụ cho chuyển gen vào cây đích.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

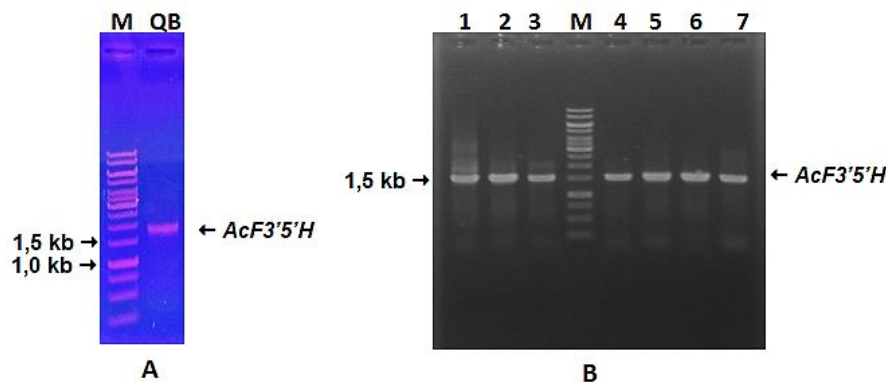
3.1. Tách dòng cDNA AcF3'5'H phân lập từ cây Ô đầu

Mẫu lá non từ cây Ô đầu được sử dụng để tách chiết RNA tổng số và xử lý bằng DNase. Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số bằng phản

ứng phiên mã ngược. Khuếch đại gen *AcF3'5'H* (cDNA) bằng PCR với cặp mồi *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* thu được bằng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 1,54 kb, đúng như tính toán theo lý thuyết (Hình 2A). Sản phẩm PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* tinh sạch được ghép nối vào vector tách dòng *pBT* (kích thước 2705 bp) để tạo vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H*. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào *E.coli* DH5 α , các khuẩn lạc được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh ampicillin, có chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Sáu dòng khuẩn lạc trắng được lựa chọn để tiến hành phản ứng colony-PCR nhằm kiểm tra sự có mặt của gen *AcF3'5'H*. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR ở hình 2B cho thấy một băng DNA có kích thước khoảng 1,5 kb là kích thước của gen

AcF3'5'H. Các dòng khuẩn lạc cho kết quả dương tính với colony-PCR được nuôi tăng sinh và sử dụng để tách chiết plasmid phục vụ giải trình tự nucleotide.

Kết quả giải trình tự đoạn DNA từ plasmid tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* trên thiết bị tự động thu được trình tự nucleotide có kích thước 1536 bp. Kết quả phân tích bằng BLAST trong NCBI đã cho thấy đây chính là trình tự nucleotide đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu, có độ tương đồng 99,47% so với trình tự gen mang mã số JN635708.1 trên GenBank (Trình tự gen sử dụng để thiết kế cặp mồi PCR *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R*). Kết quả phân tích BLAST đã khẳng định đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu thu tại huyện Quán Bạ, Hà Giang là gen *AcF3'5'H* mRNA của cây Ô đầu (Hình 3).

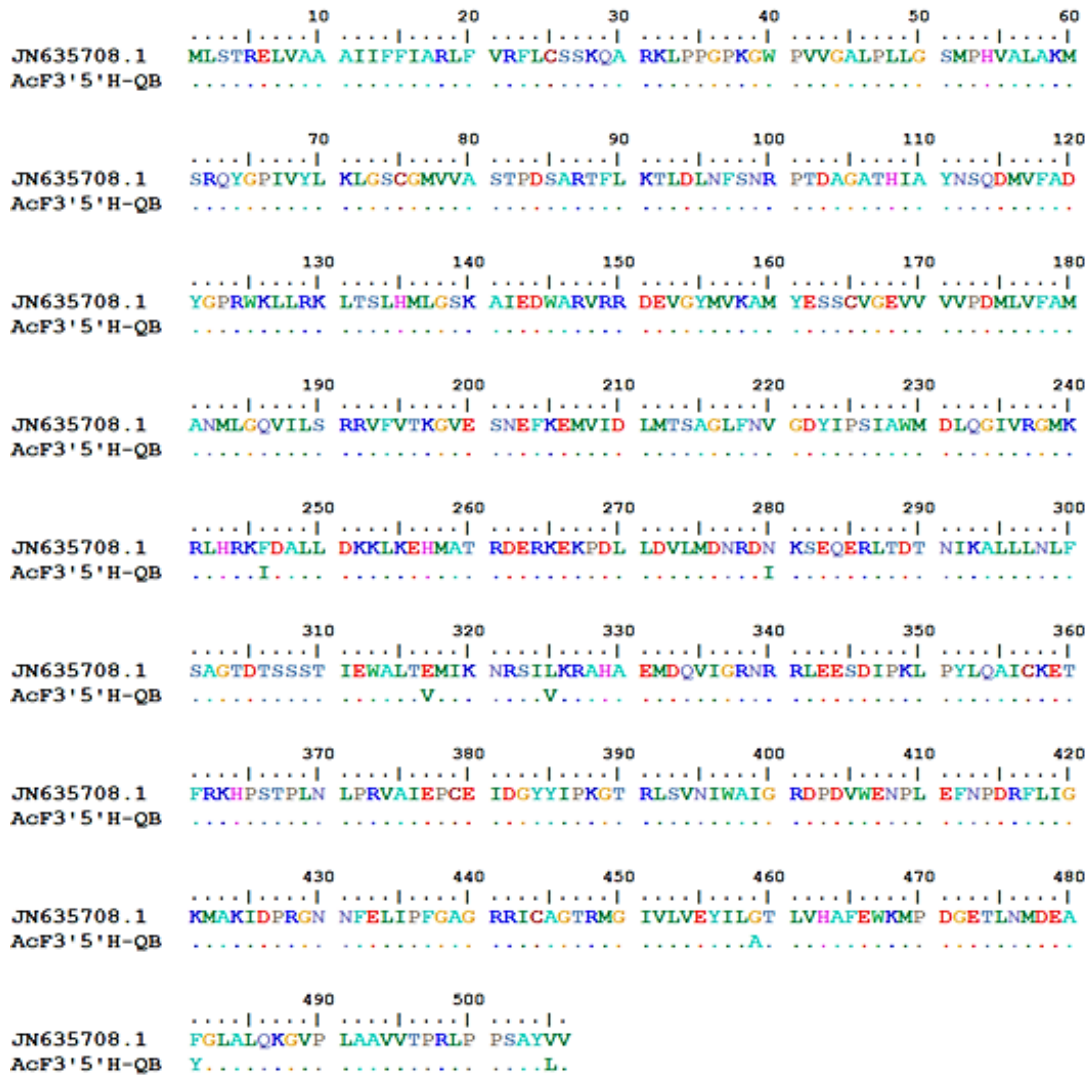


Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose. A: Kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* từ cDNA (M-thang DNA 1 kb; QB- Sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu thu tại Quán Bạ, Hà Giang); B: sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ 7 dòng khuẩn lạc màu trắng (M: thang DNA 1 kb; Làn điện di từ số 1-7: sản phẩm colony-PCR)

select all 20 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of result			
		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Aconitum carmichaelii flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, co	2765	2765	100%	0.0	99.47%	JN635708.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Aconitum carmichaeli var. truppelianum flavonoid 3'5'-hydrox	2699	2699	100%	0.0	98.69%	KY272865.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Aconitum vilmorinianum flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, c	2501	2501	99%	0.0	96.38%	JQ806761.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Delphinium chefoense flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) m	1701	1701	94%	0.0	88.12%	KX825847.1

Hình 3. Kết quả phân tích BLAST gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu

Trình tự đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* có kích thước 1521 bp (Dữ liệu bổ sung-S1), mã hóa 506 amino acid. So với trình tự amino acid suy diễn từ gen *F3'5'H* mang mã số JN635708.1 trên GenBank, protein suy diễn từ đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu Quán Bạ, Hà Giang có sự sai khác ở 6 amino acid ở các vị trí 246, 280, 317, 325, 459, 481, 505 (Hình 4).



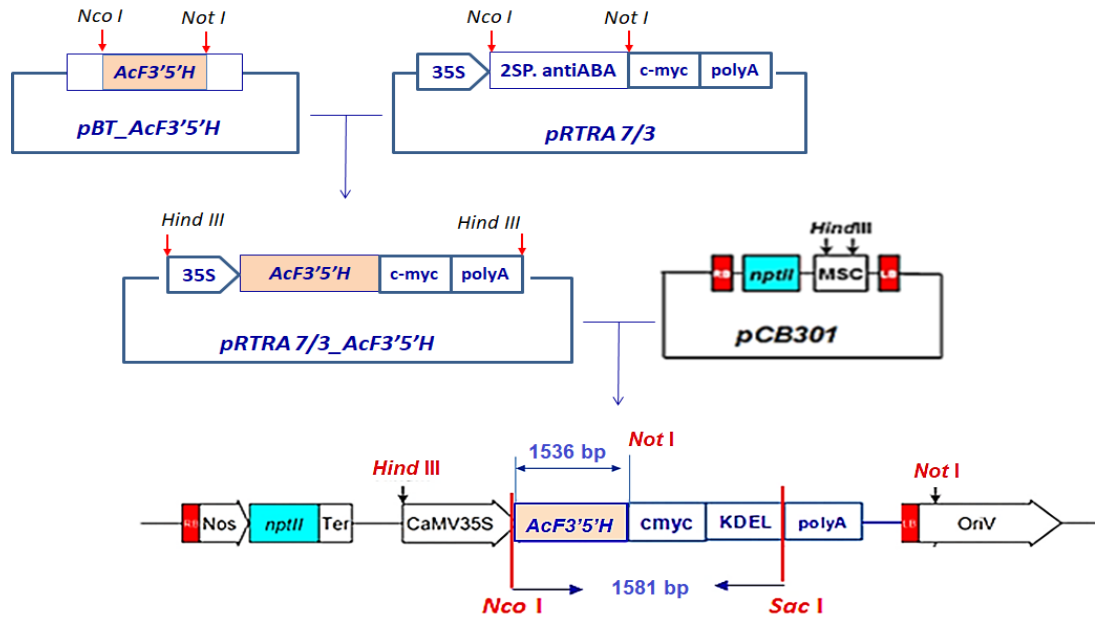
Hình 4. Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn mã hóa của gen *F3'5'H* mang mã số JN635708.1 trên GenBank và từ gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu Quân Bạ, Hà Giang

3.2. Kết quả thiết kế vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*

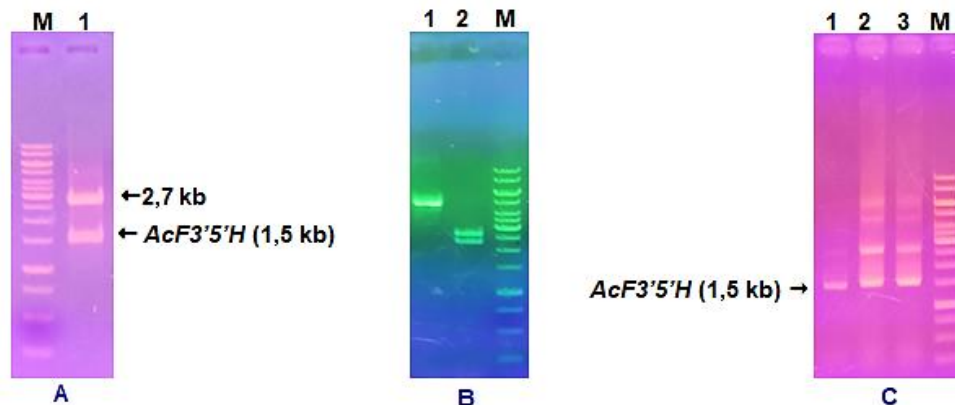
Các thí nghiệm tạo vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* được thực hiện theo các bước như mô tả ở sơ đồ hình 5, bao gồm: 1) Tạo vector *pRTRA7/3* tái tổ hợp; 2) Thu nhận cấu trúc *35S_AcF3'5'H_c-myc*; 3) Tạo vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*.

Cắt vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* bằng cặp enzyme *NcoI/NotI* để nhận gen *AcF3'5'H*. Vector *pRTRA7/3* chứa promoter

CaMV35S khởi động phiên mã, trình tự nucleotide xác định chuỗi peptide c-myc và trình tự nucleotide xác định đoạn *KDEL*. Mở vòng *pRTRA7/3*, ghép nối gen *AcF3'5'H* với vector *pRTRA7/3* nhờ *T4 DNA ligase* tạo vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* (Hình 6A, B). Nhân dòng vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* trong *E.coli* DH5 α và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *AcF3'5'H* bằng colony-PCR (Hình 6C).



Hình 5. Sơ đồ thí nghiệm tạo vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H

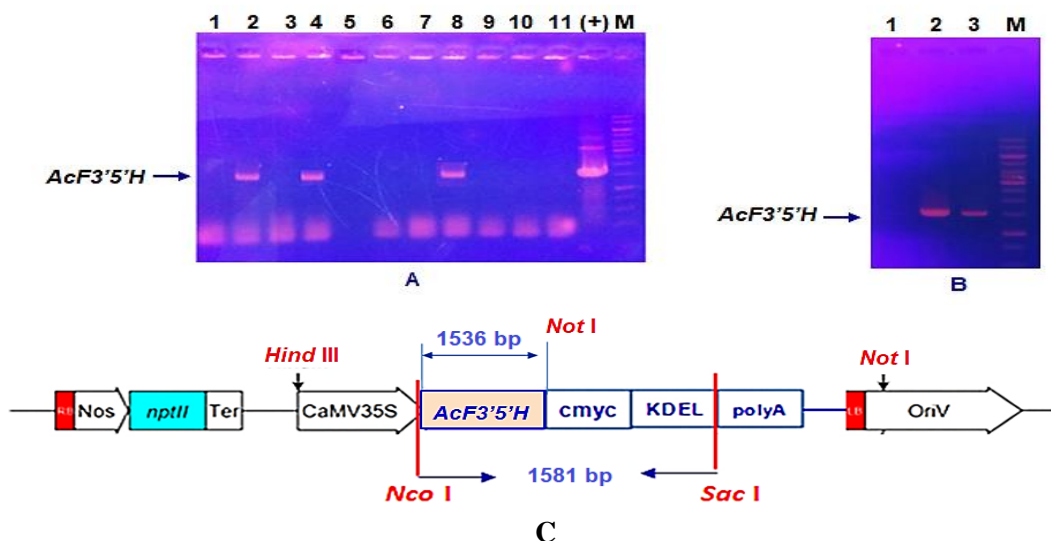


Hình 6. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt bởi enzyme giới hạn và colony-PCR

A: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt vector pBT_AcF3'5'H bằng NcoI/NotI ; M- thang DNA 1 kb; 1- Sản phẩm cắt pBT_AcF3'5'H bằng NcoI/NotI thu được vector pBT (2,7 kb) và đoạn gen AcF3'5'H (1,5 kb).
B: Mô vòng vector pRTRA7/3; M: thang DNA 1 kb; 1- Vector pRTRA7/3 không cắt bởi NcoI/NotI làm đối chứng; 2- Vector pRTRA7/3 cắt bởi NcoI/NotI ;

C: Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra sự có mặt của gen AcF3'5'H trong vector pRTRA7/3_AcF3'5'H với cặp mồi Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R từ các khuẩn lạc *E.coli* DH5α.

Sử dụng HindIII cắt vector pRTRA7/3_AcF3'5'H để thu nhận cấu trúc 35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA và mở vòng vector chuyển gen pCB301. Gắn cấu trúc 35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA vào vector pCB301 tạo vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H (Hình 5). Biện nạp pCB301_AcF3'5'H và nhân dòng trong *E.coli* DH5α và chọn được 3 dòng khuẩn lạc dương tính với colony-PCR (Hình 7A). Plasmid pCB301_AcF3'5'H được tách từ các dòng khuẩn lạc dương tính với PCR và biện nạp vào *A.tumefaciens*. Kết quả kiểm tra các dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens* bằng colony-PCR thu được 2 dòng cho kết quả dương tính (Hình 7B). Như vậy, vector chuyển gen thực vật pCB301_AcF3'5'H đã được thiết kế thành công (Hình 7C) và tạo được hai dòng *A.tumefaciens* tái tổ hợp mang vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H.



Hình 7. A- Điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR với cặp mồi *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R* các dòng khuẩn lạc *E.coli DH5α* xác nhận gen *AcF3'5'H* trong vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*. M: thang DNA 1 kb; 1-11: các dòng khuẩn lạc; (+): vector *pBT_AcF3'5'H*.

B- Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR với cặp mồi *Fla-NcoI-F/Fla-NotI-R* từ các dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens CV58*. M: thang DNA 1 kb; 1, 2, 3: các dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens*.

C- Cấu trúc vector *pCB301_AcF3'5'H*. *nptII*: gen kháng kanamycin; *CaMV35S*: promoter 35S; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hóa peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL

4. Kết luận

Gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu đã được nhân bản, tách dòng và giải trình tự từ cDNA. Đoạn mã hóa gen *AcF3'5'H* phân lập được có kích thước là 1521 bp. Thiết kế thành công vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* và tạo được dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* tái tổ hợp chứa cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* phục vụ biến nạp vào mô thực vật nhằm nâng cao hàm lượng flavonoid trong cây Ô đầu và một số loại cây dược liệu khác.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp Bộ mã số B2020-TNA-11. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. T. L. Do, *Vietnamese medicinal plants and medicine taste*. Medical Publishing House, Hanoi, 2004.
- [2]. J. B. Harborne, and C. A. Williams, "Advances in flavonoid research since 1992," *Phytochemistry*, vol. 55, no. 6, pp. 481-504, 2000.
- [3]. Q. H. Nguyen, H. T. T. Hoang, H. T. Tran, T. T. T. Vu, T. D. Sy, M. H. Chu, and L. T. N. Nguyen, "In vitro multiple shoot regeneration

and hairy root induction of *Aconitum carmichaelii* Debex.-an important medicinal plant," *SYLWAN*, vol. 164, pp. 228-242, 2020.

- [4]. L. D. Vu, "Research on chemical composition and some biological effects of *A. acarmichaelii* Debx. Planted in Ha Giang province," PhD thesis of Traditional Pharmacy, Institute of Medicinal Materials, 2014.
- [5]. Y. S. Wang, Y. J. Xu, L. P. Gao, O. Yu, X. Z. Wang, X. J. He, X. L. Jiang, Y. J. Liu, and T. Xia, "Functional Analysis of Flavonoid 3',5'-hydroxylase From Tea Plant (*Camellia Sinensis*): Critical Role in the Accumulation of Catechins," *BMC Plant Biology*, vol. 10, pp. 12870-13014, 2014.
- [6]. C. Seitz, S. Ameres, K. Schlangen, G. Forkmann, and H. Halbwirth, "Multiple evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase," *Planta*, vol. 242, pp. 561-573, 2015.
- [7]. L. L. Ma, C. L. Wang, and J. H. Wang, "Aconitum carmichaelii flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA", GenBank: JN635708.1., 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN635708.1>. [Accessed May 2020].
- [8]. J. F. Sambrook, and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., vol. 1, 2 and 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100 pp, 2001.