

SINH TỔNG HỢP SAPONIN CK TRÊN CÂY MÔ HÌNH *Arabidopsis thaliana*

Nguyễn Mai Quỳnh¹, Cao Văn Chung¹, Lê Thị Thanh Hương¹, Lê Duy Đức^{1,2,*}

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Phòng Thí nghiệm Thực vật, Khoa Sinh học,

Viện Khoa học và Công nghệ tiên tiến Hàn Quốc (KAIST)

* Email: ldduc@hus.edu.vn

TÓM TẮT

Saponin CK có trong nhân sâm thuộc nhóm triterpenoid có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng lớn trong điều trị các bệnh ung thư, đái tháo đường, miễn dịch, tim mạch và nhiều bệnh khác. Tuy nhiên, với giá thành đắt đỏ và thời gian nuôi trồng nhân sâm là rất lâu và tốn kém, đòi hỏi những yêu cầu khắt khe về điều kiện môi trường, ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, hàm lượng các vi chất trong đất. Trong nghiên cứu này, ba gen liên quan chặt chẽ đến quá trình tổng hợp CK ở cây nhân sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng*) bao gồm: Tổng hợp Dammaranediol (PgDDs) và Protopanaxadiol (PgPPDs), enzyme đường hóa PgUGT71A27 và enzyme tHMGR, enzyme tăng cường con đường tổng hợp axit mevalonic ở thực vật được biến nạp vào *Arabidopsis thaliana* (cây họ cải). Các dòng đồng hợp tử mang vector tái tổ hợp được sử dụng và phân tích đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng phương pháp PCR định lượng để chọn lọc những cá thể biểu hiện gen chuyển mạnh nhất. Phân tích dịch chiết triterpenoid tổng số để phát hiện sự có mặt của saponin CK. Kết quả nghiên cứu chứng minh khả năng tổng hợp saponin CK trên cây *Arabidopsis thaliana*, là tiền đề cho việc tạo ra các loại cây trồng nông nghiệp có năng suất cao, thời gian sinh trưởng ngắn, với mục đích thu sinh khối hợp chất saponin phục vụ mục đích sản xuất công nghiệp, bổ sung vào các loại thức ăn chăn nuôi.

Từ khóa: Ginsenoside CK, hoạt chất nhân sâm, CK, *Panax ginseng*, saponin CK, sinh tổng hợp saponin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Saponin CK là một nhóm chất thuộc nhóm triterpenoid có nhiều trong các cây họ nhân sâm (Araliaceae) và tạo nên hoạt tính sinh học chính của cây nhân sâm Việt Nam như sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) hay nhân sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng*). Đây là nhóm chất chuyển hóa thứ sinh đa dạng, có vai trò trong phòng vệ thực vật, có hoạt tính sinh học trong điều trị nhiều loại bệnh như: Ung thư, đái tháo đường, tăng cường hệ miễn dịch, hỗ trợ sức khỏe, điều trị các bệnh liên quan đến thần kinh, tim mạch [1]. Saponin CK là nhóm chất gần như chỉ tìm thấy ở những cây thuộc họ nhân sâm. Cho đến nay, hơn 150 saponins tự nhiên đã được phân lập từ rễ, lá, thân, quả và hoa của *Panax ginseng* [2].

Saponin CK thuộc nhóm dammarane (tetracyclic), là nhóm chất mang hoạt tính sinh học có giá trị cao. Dammarane được phân loại thành 2 nhóm chính là Protopanaxadiol (PPD) công thức

hóa học $C_{30}H_{52}O_3$ và protopanaxatriol (PPT) công thức hóa học $C_{30}H_{52}O_4$ bởi sự khác nhau ở gốc hydroxyl ở vị trí các - bon số 6 [3, 4]. Saponin CK lần đầu tiên được phát hiện và xác định vào năm 1972 [5]; saponin CK còn có tên gọi khác là M1, IH-901, G-CK. Gần đây, các công bố khoa học ở cả cấp độ *in vitro* và *in vivo* đã chứng minh có hoạt tính sinh học của saponin CK trong việc ngăn ngừa và điều trị các loại ung thư khác nhau [6]. Ngoài ra, saponin CK đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ gan, chống viêm, hỗ trợ điều trị đái tháo đường [7]. Saponin CK có khả năng ức chế tăng sinh, di cư và xâm lấn đối với dòng tế bào ung thư thực quản ECA109 thông qua con đường VEGF-A/Pi3K/Akt [8]. Đối với 2 dòng tế bào ung thư phổi A549 và H1975, saponin CK cho thấy tác dụng ức chế phát triển và thúc đẩy chu trình chết của tế bào và đại thực bào thông qua cơ chế AMPK - mTOR và JNK [9].

Giai đoạn khởi đầu, quá trình tổng hợp saponin CK bắt nguồn theo hai con đường chính

bao gồm con đường Mevalonic axit (MAV) xảy ra trong tế bào chất và con đường Methylerthritol phosphate (MEP) xảy ra trong lục lạp. Trong đó, Acetyl - CoA dưới xúc tác của 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) biến đổi thành mevalonate, hợp chất 6 các - bon. Tiếp theo là bước hình thành khung xương, sản phẩm chính của quá trình này là 2,3 - oxidosqualene. Enzyme farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) tạo thành FPP. Sau đó, 2 phân tử FPP được chuyển thành squalene bởi squalene synthase (SS) và cuối cùng tạo thành 2,3 - oxidosqualene bởi squalene epoxidase (SE) [10 - 13].

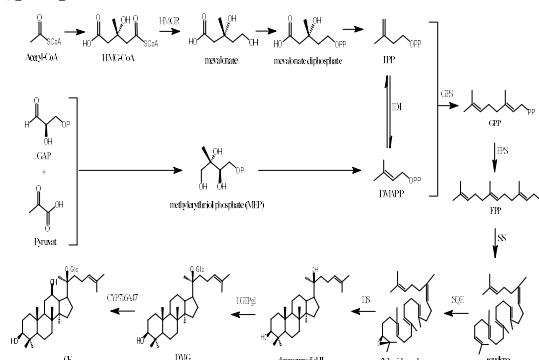
Bước cuối cùng trong con đường tổng hợp saponin bao gồm chu kỳ hóa, hydroxyl hóa và glycosyl hóa tiền chất 2,3 - oxidosqualene. Enzyme xúc tác cho quá trình chu kỳ hóa là oxidosqualene cyclase (OSC). CK thuộc nhóm dammarene, do đó dammarenediol - II synthase (DS) đóng vai trò quan trọng cho phản ứng từ 2,3-oxidosqualene tạo thành dammarenediol - II (PPD). Bên cạnh đó, Cytochrome P450s là các enzyme hydroxyl hóa và UDP-Glycosyltransferase là enzyme đường hóa [14]. Trong *Panax ginseng* có 3 CYP450 được đặc trưng: Protopanaxadiol synthase (PPDS) CYP716A46, Protopanaxatriol synthase (PPTS) CYP716A53v2 và β -amyrin - 28 oxidase (CYP716A52v2) [15 - 17]. Cho đến nay, tất cả các CYP450 liên quan đến sinh tổng hợp saponin đều thuộc phân họ CYP716A [18]. Đồng thời, UDP-glycosyltransferase là bước cuối cùng của con đường tổng hợp. Một enzyme thuộc nhóm 71 (UGT71) trong họ enzyme vận chuyển đường đã được chứng minh là có khả năng gắn đường glucose vào vị trí các - bon số 6 của gốc triterpenoid tham gia trực tiếp vào quá trình sinh tổng hợp CK [19]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các enzyme CYP716A46 và PgUGT71A27 được lựa chọn để xúc tác cho phản ứng từ PPD tạo thành saponin CK.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được tiến hành với củ nhân sâm (*Panax ginseng*) 3 năm tuổi được thu hái tại nông trại nhân sâm khu vực Gumsan, Hàn Quốc. Nòi sinh thái Columbia (Col-0) của cây *Arabidopsis thaliana*

có nguồn gốc từ Phòng Thí nghiệm Thực vật, Viện Khoa học và Công nghệ tiên tiến Hàn Quốc (KAIST). Đây là loài thực vật mô hình được sử dụng phổ biến do chúng không có khả năng tự sinh tổng hợp saponin CK.



Hình 1. Con đường sinh tổng hợp saponin CK [20]

Các con đường sinh tổng hợp của saponin CK bao gồm nhiều bước phản ứng liên tục có sự có mặt của enzyme, trong đó một loạt các enzyme AACT: Acetyl coenzyme A C-acetyltransferase; HMGS: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; MPD: mevalonate diphosphate decarboxylase; GPS: geranyl diphosphate synthase; PPS: farnesyl diphosphate synthase; SS: squalene synthase; SQE: squalene epoxidase; DS: dammarenediol synthase; AS: β -amyrin synthase; OAS: axit oleanolic synthase; cytochrome P450 (CYP716) và các enzyme đường hóa UGTs.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát thành phần định tính bằng phân tích HPLC và LC-MS/MS

Bảng 1. Chu trình pha động của sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC

Thời gian (phút)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
0	68	32
12	35	65
20	10	90
30	10	90
38	0	100
43	0	100
45	68	32
50	68	32

Saponin được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies) với detector là tia cực tím với cột C18 pha đảo (Kinetex 5 μ m XB - C18 100 Å 250 x 4.6 mm). Tốc độ dòng chảy được đặt ở mức 1 ml/phút, nhiệt độ cột 30°C. Pha động (mobile phase) bao gồm nước (kênh A) và acetonitrile (kênh B); các hợp chất chuẩn PPD được cung cấp bởi ChemFaces và Sigma Aldrich.

2.2.2. Khảo sát cấu trúc của các saponin bằng phương pháp UPLC - MS/MS

Sử dụng máy sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS - 8050, Shimadzu (triple-quadrupole) (bộ phân tích ion ba tứ cực). UPLC sử dụng cột C18 pha đảo (1,7 μ m 2,1 x 100 mm, Waters). LC/MS/MS là kỹ thuật phân tích hóa học kết hợp với khả năng tách cấu tử của hỗn hợp bằng sắc ký lỏng (HPLC) với khả năng nhận danh và định lượng cấu tử bằng đầu dò khối phổ (MS) với độ đặc hiệu và độ nhạy cao. Pha động cho sắc ký gồm axit axetic 0,01% (dung môi A) và acetonitrile có 0,01% axit axetic (dung môi B) theo chu trình pha động của sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS.

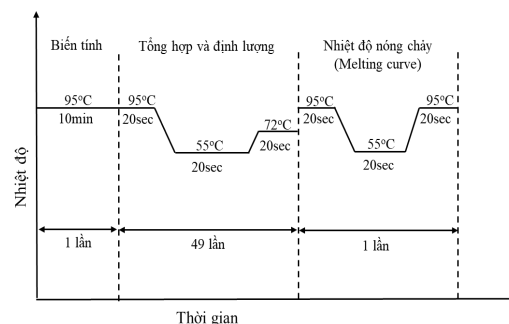
Bảng 2. Chu trình pha động của sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS

Thời gian (phút)	Dung môi A (%)	Dung môi B (%)
0	70	30
1	45	55
3	40	60
4	20	80
6	5	95
8	5	95
8,5	70	30
9,5	70	30

Tốc độ dòng chảy được đặt ở 250 μ L/phút, nhiệt độ cột 25°C. Phương pháp MRM (Multiple Reaction Monitoring) được sử dụng để phát hiện saponin. Quá trình phân mảnh của các chất được liệt kê ở bảng 4 với các chất chuẩn đặt mua từ 2 nhà cung cấp là Chemface và Sigma Aldrich. Đối với các phân tích MS, phổ được ghi lại trong phạm vi m/z từ 100 - 1.000 theo mô hình chuyển tiếp.

2.2.4. Định lượng biểu hiện gen bằng real-time PCR

Tách chiết RNA tổng số của thực vật theo quy trình của KIT tách chiết RNA của hãng TAKARA.



Hình 2. Chu trình nhiệt của phản ứng real-time PCR

Bảng 3. Danh sách các môi sử dụng cho PCR định lượng (qRT-PCR)

Tên môi	Trình tự (5'-3')
GB1F (DDs)	CAGGGCAATTCAAGCACACG
GB1R (DDs)	GGAACCCCATCCACCATCCT
GB2F (PPDs)	GCTCCTCTCCCTCCAGGTCA
GB2R (PPDs)	GCCATTGGTTCTCCCAAAG
GB6F (PgUGT71)	CTCCGATGAGGCTGCTGTGA
GB6R (PgUGT71)	TGGACGCAAGGACCACAAGA
GB8-qPCR R (tHMGR)	CAGCTGCAATTGCTGACATC
GB8-qPCR F (tHMGR)	CATCTCAATCAGCGTGTGTTG
PP2A-F	CATTGTAGAACTTGCTGAAGACAGG
PP2A-R	CAAGACGCTTCAGATTGTTGCAGC

Nồng độ mẫu được pha loãng đến 250 ng/ μ L để sử dụng cho RT - PCR. Tạo thư viện cDNA sử dụng cho real-time PCR, trộn TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green với ROX thấp) với cDNA. Real-time PCR tuân theo chu trình nhiệt phản ứng được thể hiện ở hình 2. Phản ứng được thực hiện trên thiết bị qPCR của hãng Biorad CFX96 touch. Tín hiệu huỳnh quang được đọc sau mỗi chu kỳ.

của phản ứng PCR. Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm PCR để đánh giá độ đặc hiệu của phản ứng real-time PCR [21].

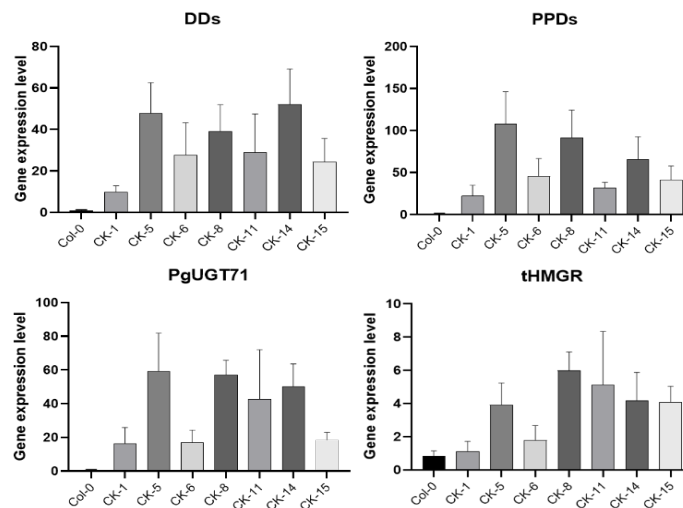
2.2.3. Xây dựng vector và thực vật biến nạp để sản xuất saponin CK

Cải biến vector pBI121 bằng cách thay thế promoter của vector này bằng promoter 35S (pK35S), đồng thời thêm trình tự kết thúc NOS vào phía sau promoter. Chèn thêm các đoạn gen sinh tổng hợp ginsenoside CK từ nhân sâm *Panax* bao gồm: Dammaranediol synthase (DDs), protopanaxadiol synthase (PPDs), PgUGT71A27 và gen mã hóa enzym xúc tác cho quá trình khử HMG - CoA thành axit mevalonic- N-terminally truncated HMG - CoA reductase (tHMGR) từ *Arabidopsis thaliana* vào vector. Sự nhân dòng của cây 4 gen này được điều khiển bởi promoter 35S. Vector sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến GV3101 *Agrobacterium*. Các tế bào biến nạp này được nuôi 2 ngày trong môi trường nuôi cấy LB. Sau đó được thu và biến nạp vào cây *Arabidopsis thaliana* hoang dại (Col-0). Khi cây bắt đầu vào giai đoạn nở hoa (từ 18 - 20 ngày tuổi), các hoa đã nở

sẽ bị loại bỏ, sau đó nhúng toàn bộ phần trên của cây vào môi trường 1/2MS chứa 0,02% Silwet và Sucrose 5% có bổ sung vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector tái tổ hợp. Hạt giống của cây F0 được sàng lọc trên đĩa thạch MS chứa 50 mM kháng sinh kanamycin. Các đĩa được trồng dưới ánh sáng trắng trong 7 ngày. Các cây sống sót tiếp tục được trồng vào đất. Các cây thế hệ F2 có gen biến đổi đồng hợp tử được chọn lọc bởi qRT - PCR. Những dòng này được sử dụng để chiết xuất và định lượng saponin.

2.2.4. Chiết xuất saponin từ *Arabidopsis thaliana*

Hạt *Arabidopsis thaliana* được trồng trên môi trường MS trong 10 ngày dưới ánh sáng trắng liên tục ở 22°C. Thu 100 cây *Arabidopsis thaliana* khỏe mạnh và xay thành bột mịn sử dụng nitrogen lỏng. Thêm 5 mL ethanol 70% vào hỗn hợp thu được, sau đó ủ ở 60°C trong 30 phút (làm yếu đi thành tế bào). Tiếp đó, siêu âm dung dịch trong 5 phút để phá vỡ các tế bào. Ly tâm thu dịch nổi ở tốc độ 3.500 vòng trong 10 phút. Bay hơi ethanol bằng hệ thống cô quay có hút chân không.



Hình 3. Mức độ biểu hiện phiên mã của các dòng chuyển gen. Thế hệ F2 của các dòng đồng hợp tử gen sinh tổng hợp saponin do promoter 35S điều khiển đã được chọn lọc và được nuôi dưới ánh sáng trắng trong 10 ngày trên các đĩa môi trường thạch MS. Tách chiết mRNA tổng số của mỗi dòng để tổng hợp cDNA. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (n = 3) và các kết quả thống kê so sánh có độ tin cậy cao (p < 0,05)

Hòa tan cặn bằng 3 mL n-Butanol, dùng máy vortex lắc đều dung dịch trong 2 phút. Sau đó, làm bay hơi n-Butanol bằng hệ thống cô quay có gia nhiệt (60°C). Khi butanol bay hơi hoàn toàn, thêm

1 ml methanol để hòa tan cặn đáy và chuyển sang ống mới. Dịch chiết thu được dùng cho các thí nghiệm phân tích thành phần bằng phương pháp HPLC và LC-MS/MS. Trước khi đưa vào máy phân

tích, các mẫu được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng trong 1 phút để loại bỏ kết tủa (nếu có).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá mức độ biểu hiện của các gen được chuyển vào cây *Arabidopsis thaliana*

Để kiểm tra tiềm năng biểu hiện của saponin CK trong cây *Arabidopsis thaliana*, 4 gen tổng hợp saponin bao gồm: tHMGR, PgDD, PgPPD và PgUGT71AE2 đã được biến nạp vào nòi sinh thái Columbia (Col - 0) của cây *Arabidopsis thaliana* dưới sự điều khiển của promoter 35S. Promoter 35S là một promoter mạnh được sử dụng rộng rãi ở nhiều sinh vật. Các dòng biến nạp được chọn lọc bằng qRT-PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Hai dòng đồng hợp tử của mỗi vector đã được chọn lọc và khuếch đại. Trên tổng số 7 dòng đồng hợp tử F2 được lựa chọn. Mức độ biểu hiện gen được đánh giá bằng kỹ thuật PCR định lượng (qRT-PCR). mRNA tổng số được tách từ lá của các cây F2 trưởng thành (3 g lá non), sau đó được phiên mã ngược và tổng hợp cDNA. Kết quả cho thấy, các dòng p35S - CK-5, p35S - CK-8 được khuếch đại có khả năng biểu hiện cao đối với cả 4 gen sinh tổng hợp saponin được chuyển (Hình 3). Hai dòng chuyển gen này sẽ được tiếp tục sử dụng để kiểm tra sự có mặt của saponin CK trong dịch chiết tổng số.

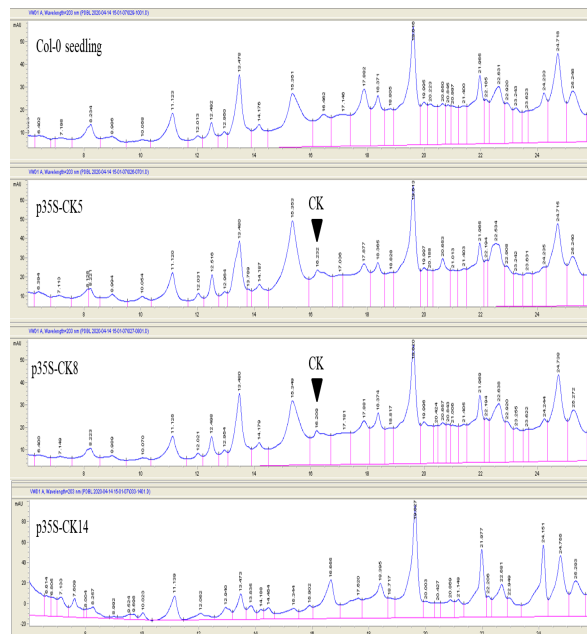
3.2. Khảo sát sự có mặt của saponin CK trong dịch chiết lá cây chuyển gen

Hai dòng, p35s-CK - 5 và p35s - CK -8 được gieo trên đĩa $\phi 100$ chứa môi trường MS có bổ sung kháng sinh kanamycin. Cây được nuôi trong tủ ẩm nhiệt 27°C với điều kiện ánh sáng trắng trong 10 ngày. 100 cây mầm trên đĩa sẽ được thu và tách chiết saponin tổng số với dung môi là butanol.

Để xác định cây chuyển gen có khả năng sản xuất saponin CK, phân tích HPLC đã được thực hiện để phát hiện CK saponin trong các dòng biến đổi *Arabidopsis thaliana*. Thời gian lưu cao nhất là 16,1 phút đã xuất hiện trong các dòng chuyển gen nhưng không xuất hiện ở cây hoang dại Col - 0 (Hình 4). So sánh với chất chuẩn saponin CK, thời gian xuất hiện đỉnh tương ứng cũng là 16,2 phút.

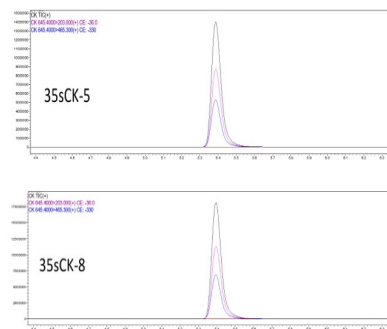
Các cây biến đổi gen được trồng dưới ánh sáng trắng trong 10 ngày, trong đĩa MS ở 22°C. saponin tổng số của 100 cây chuyển gen thế hệ T2,

nuôi cấy trong môi trường MS 10 ngày tuổi được tách chiết bằng butanol. Kết quả phân tích HPLC cho thấy, sự có mặt của các hợp chất saponin CK, trong đó kiểu đại Col - 0 là đối chứng âm.



Hình 4. Các dòng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen có thể sản xuất saponin CK

3.3. Kiểm tra cấu trúc của saponin CK trong dịch chiết cây chuyển gen



Hình 5. Xác định saponin CK trong dịch chiết thực vật bằng UPLC-MS/MS. Saponin tổng số được chiết xuất từ 100 cây non 10 ngày tuổi bằng butanol. Các mẫu cuối cùng được hòa tan trong 500 μ L methanol, 1 μ L mẫu được tra để phân tích UPLC-MS/MS

Để khẳng định được đỉnh xuất hiện ở thời gian 16,2 phút ở các cây chuyển gen là hợp chất saponin CK. Phương pháp phân tích UPLC - MS/MS đã được thực hiện để xác định sự có mặt của cấu trúc saponin CK trong các mẫu tách chiết.

Sắc ký ion tổng (TIC) của chất chuẩn saponin CK xuất hiện ở 5,4 phút và sự phân mảnh ion từ 645,4 Da thành 2 phân mảnh lần lượt là 203,0/465,3 Da (Bảng 4). Kết quả kiểm tra với dịch chiết tổng số của 2 dòng chuyển gen p35S - CK - 5 và p35S - CK - 8 cho thấy, sắc ký tổng và sự phân mảnh ion có thời điểm xuất hiện và khối lượng ion đúng với chất chuẩn CK (Hình 5). Kết quả cho thấy, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen sinh tổng hợp saponin có thể tạo ra saponin CK trong giai đoạn cây con 10 ngày tuổi.

4. THẢO LUẬN

Saponin triterpenoid là một nhóm đa dạng các hợp chất thiên nhiên trong thực vật, mang nhiều đặc tính có lợi cho con người, saponin được ứng dụng rộng rãi trong y học và dược học. Triterpenoids trong thực vật nói chung được tổng hợp sinh học thông qua con đường tổng hợp axit mevalonic (MVA), bước đa dạng hóa đầu tiên là tạo vòng 2 - 3 oxidosqualene được xúc tác bởi oxidosqualene cyclase [22]. Sau khi OSC xây dựng khung xương triterpenoid cơ bản, khung xương được sửa đổi thành aglycone kỵ nước gọi là sapogenin. Bước biến đổi đầu tiên là quá trình oxy hóa được xúc tác bởi cytochrome P450 monooxygenase (P450) [22, 23]. Quá trình đường hóa sẽ quyết định sự đa dạng, hoạt tính và độ bền của các chất saponin. Uridine diphosphate (UDP) - glycosyltransferase (UGTs), là bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp saponin.

Thực vật mô hình *Arabidopsis thaliana* có tổng cộng 13 OCS, 246 loại P450 [22, 24] và 112 UGTs [25 - 27]. Tuy nhiên, không có tricyclic triterpenoid nào được báo cáo ở *Arabidopsis thaliana* vào thời điểm đó.

Với việc tận dụng con đường tổng hợp mevalonic axit ở thực vật và bổ sung thêm 3 enzyme thiết yếu từ cây nhân sâm bao gồm: Dammaranediol synthase, PPD synthase (CYP716A46) và enzyme đường hóa UGT71A27. Cây *Arabidopsis thaliana* hoang dại không ưu tiên tích lũy nhóm chất triterpenoid và không có khả năng tổng hợp saponin CK đã cho thấy khả năng tổng hợp và tích lũy CK ngay từ giai đoạn cây non 10 ngày tuổi. Trước đây, việc sinh tổng hợp các

loại saponin khác thường được thực hiện trên các đối tượng là nấm men và vi khuẩn [22]. Kết quả trong việc sản xuất saponin CK trên nấm men bằng việc biểu hiện một loạt các enzyme CYP716A47 và UGTPg1 để giúp nấm men tiếp tục chuyển hóa Oxidosqualene thành saponin CK [28]. Tương tự, với một số chất saponin khác như Rh2, Rg3 cũng thành công sản xuất hiệu quả trên đối tượng nấm men [11, 29 - 31]. Ngoài ra, một số nhóm nghiên cứu còn thành công trong việc chuyển các gen tương tự vào vi khuẩn và giúp sản xuất saponin CK trên chủng *Lactococcus lactis* và chủng vi khuẩn *Aspergillus tubingensis* [32] cũng như một số chất saponin khác như: Rg3, F1, Ia, 20(R)-PPD, 20(R)-PPT [32 - 34]. Những kết quả này cho thấy, khả năng cải biến bộ máy sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của các loài sinh vật, qua đó tổng hợp các hợp chất mong muốn một cách dễ dàng hơn.

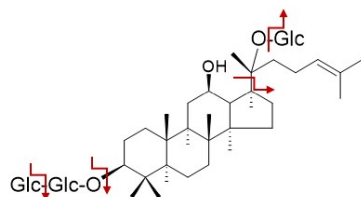
Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên việc thành công biểu hiện các enzyme khác loài ở thực vật cũng có khả năng thay đổi các con đường sinh tổng hợp đã có trong loài nhận gen. Sự biểu hiện mạnh của các enzyme từ nhân sâm *Panax ginseng* đã giúp cây *Arabidopsis thaliana* có thể tổng hợp được saponin CK. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoàn toàn có thể sản xuất một số hợp chất saponin có hoạt tính sinh học cao ở các loài thực vật khác, mở ra khả năng tạo ra các loại cây trồng tổng hợp một hoặc nhiều chất saponin có trong nhân sâm. Điều này sẽ giúp cải thiện năng suất, khả năng sản xuất các chất thuộc nhóm saponin trong thực vật, hoặc nuôi cấy tế bào thông qua các sinh vật biến đổi gen.

Kết quả phân tích sắc ký lỏng (Hình 4) và khối phổ (Hình 5) cho thấy, sự có mặt của saponin CK trong dịch chiết tổng số. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chưa đánh giá được khả năng tích lũy saponin CK trong cây, đồng thời chưa định lượng được lượng - chất mới tạo ra trong cây chuyển gen. Mặt khác, trong kết quả phân tích HPLC cũng cho thấy, có nhiều đỉnh mới xuất hiện so với cây hoang dại (Col-0), nhưng do hạn chế về số lượng chất chuẩn của saponin triterpenoid nên chưa thể định tính được các đỉnh đó thuộc nhóm chất nào. Mặt khác, nghiên cứu cũng chưa đánh giá được tác động của các gen được chuyển vào

đến các đặc điểm khác của cây *Arabidopsis thaliana*. Cần có thêm những nghiên cứu tiếp theo để đánh giá các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa để đánh giá tác động của các gen ngoại lai lên đối tượng vật chủ.

Mặc dù vậy, kết quả nghiên cứu cũng là bước đầu cho thấy khả năng điều khiển quá trình sinh tổng hợp các chất thứ cấp trong thực vật thông qua quá trình chuyển các gen quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp nhóm chất bất kì ở thực vật (hợp chất saponin CK).

Hoạt chất Saponin	Khối lượng chất ban đầu (Dalton)	Khối lượng chất sau khi phân tách (Dalton)
PPD	425.3	407.35/109.1
CK	645.5	465.3/203.0
Rh2	645.3	133.5/89.3
Rg3	807.4	365.1/203.0
F2	807.4	627.4/203.0
Rd	969.6	789.3/203.0
F1	661.3	481.3/203.0



Bảng 4. Khả năng phân mảnh khối lượng của saponin thuộc nhóm PPD dưới năng lượng va chạm (CE) 12eV

Các mũi tên cho thấy, các khả năng phân cắt có thể tạo ra từng mảnh ion trong phổ. Các chất chuẩn được đặt mua từ hãng Chemface và Sigma Aldrich được sử dụng để khảo sát khả năng phân tách trong điều kiện của thí nghiệm. Mỗi chất có khả năng tạo ra 2 mảnh có khối lượng khác nhau và đặc trưng cho từng chất được khảo sát.

5. KẾT LUẬN

Khả năng sản xuất saponin CK trên thực vật mô hình đã được chứng minh qua nghiên cứu biến nạp một số gen của *Panax ginseng* vào cây *Arabidopsis thaliana* không có khả năng tự sinh tổng hợp saponin CK. Kết quả cho thấy, phương pháp tổng hợp saponin sử dụng sinh vật biến đổi gen là hoàn toàn phù hợp, cho thấy tiềm năng ứng

dụng cao trong sản xuất lương thực, thực phẩm. Các loại thực vật chuyển gen sản xuất saponin CK nói riêng và các hoạt chất saponin nói chung có thể sử dụng làm nguyên liệu để tách chiết các tinh chất nhân sâm phục vụ công nghiệp mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm, hay sử dụng trực tiếp bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để tăng sức đề kháng cho vật nuôi. Với kỹ thuật chuyển gen này, các chất có hoạt tính sinh học trong các loài có giá thành cao, nuôi trồng mất nhiều thời gian và tiền bạc có thể được sản xuất một cách dễ dàng hơn thông qua các vật chủ thích hợp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài TN.23.11. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Piao, X., H. Zhang, J. P. Kang, D. U. Yang, Y. Li, S. Pang, Y. Jin, D. C. Yang and Y. Wang (2020). Advances in Saponin diversity of *Panax ginseng*. *Molecules*, 25(15): p. 3452.
- Yao, L., J. Lu, J. Wang, and W. Y. Gao. (2020). Advances in biosynthesis of triterpenoid saponins in medicinal plants. *Chin J Nat Med*, 18(6): p. 417 - 424.
- Rahimi, S., J. Kim, I. Mijakovic, K. H. Jung, G. Choi, S. C. Kim, and Y. J. Kim (2019). Triterpenoid-biosynthetic UDP-glycosyltransferases from plants. *Biotechnol Adv*, 37(7): p. 107394.
- Cardenas, P. D., A. Almeida, and S. Bak (2019). Evolution of Structural Diversity of Triterpenoids. *Front Plant Sci*, 10: p. 1523.
- Tiro Yosioka, T. S., Kanako Imai, Isao Kitagawa (1972). Soil Bacterial hydrolysis leading to genuine aglycone. V. On Ginsenosides-Rb1, Rb2 and Rc of the ginseng root saponins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 20(11): p. 2418 - 2421.
- Liu, J., Y. Wang, Z. Yu, G. Lv, X. Huang, H. Lin, C. Ma, Z. Lin and P. (2022). Qu. functional mechanism of ginsenoside compound K on tumor growth and metastasis. *Integr Cancer Ther*, 21: p. 1 - 13. Doi 10.1177 15347354221101203.
- Chu, L. L., N. T. Y. Hanh, M. L. Quyen, Q. H. Nguyen, T. T. P. Lien and K.V. Do (2023). Compound K Production: Achievements and Perspectives. *Life (Basel)*, 13(7): p. 1565.

8. Huang, J., D. Pan, F. Liu, Y. Hong, G. Huang, X. Huang, X. Wang and Z. Lin. (2022). Ginsenoside compound K inhibits the proliferation, migration and invasion of Eca109 cell via VEGF-A/Pi3k/Akt pathway. *J Cardiothorac Surg*, 17(1): p. 99.
9. Li, C., Y. Dong, L. Wang, G. Xu, Q. Yang, X. Tang, Y. Qiao and Z. Cong (2019). Ginsenoside metabolite compound K induces apoptosis and autophagy in non-small cell lung cancer cells via AMPK-mTOR and JNK pathways. *Biochem Cell Biol*, 97(4): p. 406 - 414.
10. Lee, M. H., J. H. Jeong, J. W. Seo, C. G. Shin, Y. S. Kim, J. G. In, D. C. Yang, J. S. Yi and Y. E. Choi (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 45(8): p. 976 - 984.
11. Kim, T. D., J. Y. Han, G. H. Huh and Y. E. Choi (2011). Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 52(1): p. 125 - 137.
12. Han, J. Y., J. G. In, Y. S. Kwon, and Y. E. Choi (2010). Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 71(1): p. 36 - 46.
13. He, F., Y. Zhu, M. He and Y. Zhang (2008). Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notoginseng*. *DNA Seq*, 19(3): p. 270 - 273.
14. Fukushima, E. O., H. Seki, K. Ohyama, E. Ono, N. Umemoto, M. Mizutani, K. Saito and T. Muranaka (2011). CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 52(12): p. 2050 - 2061.
15. Han, J. Y., H. S. Hwang, S. W. Choi, H. J. Kim and Y. E. Choi (2012). Cytochrome P450 CYP716A53v2 Catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 53(9): p. 1535 - 1545.
16. Han, J. Y., H. J. Kim, Y. S. Kwon and Y. E. Choi (2011). The cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 52(12): p. 2062 - 2073.
17. Han, J. Y., M. J. Kim, Y. W. Ban, H. S. Hwang and Y. E. Choi (2013). The involvement of beta-amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 54(12): p. 2034 - 2046.
18. Yang, J. L., Z.F. Hu, T. T. Zhang, A. D. Gu, T. Gong and P. Zhu (2018). Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis. *Molecules*, 23(3): p. 589.
19. Le, D. D., W. Kim, S. Lim, S. C. Kim and G. Choi (2021). Identification of three groups of ginsenoside biosynthetic UDP-glycosyltransferases from *Gynostemma pentaphyllum*. *Plant Sci*, 313: p. 111069.
20. Hou, M., R. Wang, S. Zhao and Z. Wang (2021). Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis. *Acta Pharm Sin B*, 11(7): p. 1813 - 1834.
21. VanGuilder, H. D., K. E. Vrana and W. M. Freeman (2008). Twenty - five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5): p. 619 - 626.
22. Seki, H., K. Tamura and T. Muranaka. P450s and UGTs (2015). Key players in the structural diversity of triterpenoid saponins. *Plant Cell Physiol*, 56(8): p. 1463 - 1471.
23. Zhao, M., Y. Lin, Y. Wang, X. Li, Y. Han, K. Wang, C. Sun, Y. Wang and M. Zhang (2019). Transcriptome analysis identifies strong candidate genes for ginsenoside biosynthesis and reveals its underlying molecular mechanism in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Sci Rep*, 9(1): p. 615.
24. Rahimi, S., J. Kim, I. Mijakovic, K. H. Jung, G. Choi, S. C. Kim and Y. J. Kim (2019). Triterpenoid-biosynthetic UDP - glycosyltransferases from plants. *Biotechnology Advances*, 37(7): p. 107394.
25. Li, Y., S. Baldauf, E. K. Lim and D. J. Bowles (2001). Phylogenetic analysis of the UDP - glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276(6): p. 4338 - 4343.
26. Meech, R., D. G. Hu, R. A. McKinnon, S. N. Mubarakah, A. Z. Haines, P. C. Nair, A. Rowland and P. I. Mackenzie (2019). The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New members, new functions, and novel paradigms. *Physiol Rev*, 99(2): p. 1153 - 1222.
27. Khorolragchaa, A., Y. J. Kim, S. Rahimi, J. Sukweenadhi, M. G. Jang and D. C. Yang (2014). Grouping and characterization of putative

glycosyltransferase genes from *Panax ginseng* Meyer. *Gene*, 536(1): p. 186 - 192.

28. Yan, X., Y. Fan, W. Wei, P. Wang, Q. Liu, Y. Wei, L. Zhang, G. Zhao, J. Yue and Z. Zhou (2014). Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Res*, 24(6): p. 770 - 773.

29. Wang, P., Y. Wei, Y. Fan, Q. Liu, W. Wei, C. Yang, L. Zhang, G. Zhao, J. Yue, X. Yan and Z. Zhou (2015). Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. *Metab Eng*, 29: p. 97 - 105.

30. Zhuang, Y., G.Y. Yang, X. Chen, Q. Liu, X. Zhang, Z. Deng and Y. Feng (2017) Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme. *Metab Eng*, 42: p. 25 - 32.

31. Wang, P., W. Wei, W. Ye, X. Li, W. Zhao, C. Yang, C. Li, X. Yan and Z. Zhou (2019). Zhou. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces*

cerevisiae cell factory at high-efficiency. *Cell Discov*, 5: p. 5.

32. Li, L., S. J. Lee, Q. P. Yuan, W.T. Im, S. C. Kim, and N. S. Han (2018). Production of bioactive ginsenoside Rg3(S) and compound K using recombinant *Lactococcus lactis*. *J Ginseng Res*, 42(4): p. 412 - 418.

33. Wang, D. D., Y. Jin, C. Wang, Y. J. Kim, Z. E. J. Perez, N. I. Baek, R. Mathiyalagan, J. Markus, and D. C. Yang (2018). Rare ginsenoside Ia synthesized from F1 by cloning and overexpression of the UDP-glycosyltransferase gene from *Bacillus subtilis*: Synthesis, characterization and *in vitro* melanogenesis inhibition activity in BL6B16 cells. *J Ginseng Res*, 42(1): p. 42 - 49.

34. Song, W. S., K. C. Shin and D. K. Oh (2023). Production of ginsenoside compound K from American ginseng extract by fed-batch culture of *Aspergillus tubingensis*. *AMB Express*, 13(1): p. 64.

EXPRESSION BIOSYNTHESIS SAPONIN CK GENES IN *Arabidopsis thaliana*

Nguyen Mai Quynh¹, Cao Van Chung¹, Le Thi Thanh Huong¹, Le Duy Duc^{1,2}

¹ Faculty of Biology, VNU University of Science, Ha Noi

² Plant Biolgy Laboratory, Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)

Summary

Ginsenoside compound K or saponin CK found in ginseng is a type of triterpenoid with high biological activity, which has great effects in the treatment of cancer, diabetes, immunity, nervous system, cardiovascular diseases, etc. In this study, three genes closely related to CK synthesis in Korean ginseng (*Panax ginseng*) including Dammaranediol synthesis (PgDDs) and Protopanaxadiol (PgPPDs), saccharifying enzyme PgUGT71A27 and tHMGR enzyme (enzyme enhancing the Mevalonic acid synthesis pathway) of *Arabidopsis thaliana* were transformed into wild type plants (Col-0) by gene transfer method using *Agrobacterium* bacteria carrying cloning vector. Homozygous lines in the F2 generation carrying recombinant vector were used and analyzed to evaluate gene expression levels by qRT-PCR method to select individuals carrying homozygous genes and expressing the most strongly the transferred genes. Then, total saponin was extracted from 10-day-old seedlings with methanol to quantify Saponin. The research results successfully synthesized saponin CK on *Arabidopsis thaliana*. The success of this research is the premise for creating high-yield agricultural crops with short growing periods, with the aim of collecting biomass of the saponin CK from these plants to serve the purpose of production such as: Industrial production purposes, supplement to animal feed.

Keywords: Ginsenoside CK, Saponin CK biosynthesis, biomass of CK.

Ngày nhận bài: 16/12/2024

Ngày chuyển phản biện: 20/12/2024

Ngày thông qua phản biện: 8/01/2025

Ngày duyệt đăng: 15/01/2025