



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026782

(51)⁷ C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2018-03577

(22) 14/08/2018

(45) 25/12/2020 393

(43) 26/11/2018 368A

(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); HOÀNG THỊ HỒNG ANH (VN).

(54) CHỦNG VI NẤM FUNGAL ENDOPHYTE TSP25 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 2,88mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 620bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học và công nghệ sinh học liên quan đến các chủng vi nấm sống nội sinh trong cây thuốc có khả năng sinh tổng hợp huperzin A. Cụ thể, sáng chế đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer là một bệnh thần kinh thoái hóa tác động đến trí nhớ, suy nghĩ và hành vi của con người. Bệnh Alzheimer ảnh hưởng đến hơn 20 triệu người trên toàn thế giới bao gồm cả 4,5 triệu người Mỹ và được coi là nguyên nhân lớn thứ ba gây tử vong ở các nước phát triển sau bệnh tim mạch và ung thư (Wimo và cộng sự, 2007). Hiện tại không có phương thức chữa trị cho bệnh Alzheimer. Tuy nhiên, sử dụng các chất ức chế cholinesteraza (AChEI) là một trong những chiến lược được chấp nhận trong điều trị bệnh Alzheimer (Darvesh và cộng sự, 2003). Trong những năm 1980, huperzin A, một lycopodium alkaloid, được tách chiết lần đầu tiên từ một cây thảo dược truyền thống của Trung Quốc. Đó là cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) (Liu và cộng sự, 1986 a,b). Sau đó, các nhà khoa học phương Tây đã kết luận rằng chất này có tác dụng trong việc chữa trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt đối với bệnh Alzheimer của người già. Alkaloid này có khả năng xuyên qua hàng rào mạch máu não và tác động trực tiếp lên não bộ với liều lượng rất thấp tính bằng microgram. Huperzin A ức chế việc sản sinh ra axetylcholinesteraza, một enzym tạo ra sự suy thoái của axetylcholin. Khi enzym này bị thiếu hụt hoặc có với hàm lượng rất thấp thì hàm lượng axetylcholin trong não tăng lên, giúp cho trí nhớ và các chức năng nhận thức được cải thiện. So với các loại thuốc được phẩm tacrin, donepezil, rivastigmin và galanthamin; huperzin A và dẫn xuất bán tổng hợp của ZT-1 có hoạt động chống AChE tốt hơn, thời gian dài hơn, khả dụng sinh học đường uống cao hơn và ít tác dụng độc hại hơn (Liang & Tang, 2004; Ma và cộng sự, 2007). Huperzin A được phê duyệt năm 1990 ở Trung Quốc như là một thuốc điều trị bệnh Alzheimer và bán trên thị trường ở Mỹ như một chế độ ăn uống bổ sung. Năm 2007 nước Pháp coi đây là vấn đề phải quan tâm hàng đầu của quốc gia (Ma và cộng sự, 2007).

Hầu hết các huperzin A đang được sử dụng trong các loại thuốc thảo dược hiện nay là được chiết xuất từ cây *Huperzia serrata* và một số loài khác trong Họ Thạch sam. Tuy nhiên, *Huperzia serrata* và các cây khác trong Họ Thạch sam yêu cầu điều kiện canh tác ngặt nghèo và sinh trưởng phát triển rất chậm, khối lượng cây xanh thu được thấp nên phải mất rất nhiều năm (có khi tới 15 năm) phát triển trong tự nhiên mới có thể để sử dụng làm thuốc. Chính vì vậy, nguồn cung cấp hoạt chất huperzin A từ cây Thạch tùng rừng thưa làm nguyên liệu cho sản xuất thuốc là không cao (khoảng 0,1%). Bởi vậy, có rất nhiều nỗ lực để thực hiện việc sản xuất huperzin A như nuôi cấy *in vitro* cây *Huperzia serrata* và tổng hợp hóa học (Ma & Gang, 2008). Tuy nhiên, với đường hướng chiết xuất hoạt chất huperzin A từ cây *Huperzia serrata* đòi hỏi phải mất nhiều thời gian, chi phí nhiều cho trồng trọt để có thể thu được sản lượng cây đủ cho chiết xuất hoạt chất huperzin A làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp sản xuất thuốc, từ đó dẫn đến hiệu quả kinh tế không cao. Mặc dù các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng nhân giống *in vitro* có thể giúp sản xuất huperzin A cao hơn cây trồng tự nhiên nhưng nó cũng chưa đáp ứng được nhu cầu của ngành công nghiệp dược, bởi thời gian nhân được cây để thu làm nguyên liệu sản xuất thuốc cũng kéo dài hàng năm (Szypula và cộng sự, 2005; Ma & Gang, 2008).

Vi sinh vật nội sinh thực vật (endophyte) là những vi sinh vật phát triển bên trong các mô sâu của cây nhưng thường không gây bệnh cho cây chủ. Trong đó, vi khuẩn và vi nấm là các vi sinh vật nội sinh thường gặp nhất. Tần số ly trích được vi sinh vật nội sinh là vi nấm chiếm tỷ lệ cao hơn, vì vậy cơ hội tìm ra chủng vi nấm nội sinh mới từ cây là rất cao. Những nghiên cứu gần đây của Hawksworth và Rossman đã ước tính có đến 1 triệu loài vi nấm khác nhau, nhưng chỉ khoảng 100000 loài đã được mô tả. Hiện tại và tương lai, vi nấm nội sinh sẽ là nguồn đa dạng sinh học dồi dào, mới lạ trong đó có nhiều loài chưa được biết đến. Một số nấm nội sinh đã được tìm thấy như là nguồn tiềm năng của thuốc trị điều trị bệnh. Một lượng lớn các hợp chất có cấu trúc mới và hoạt tính sinh học khác nhau đã được chiết xuất từ các nấm nội sinh này (Strobel & Daisy, 2003). Do đó, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A đã được các nhà khoa học quan tâm nhằm thay thế, tăng cường lượng huperzin A cho ngành công nghiệp dược. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan được công bố, đặc biệt là ở Trung Quốc, nơi có cây *Huperzia serrata* phân bố nhiều. Hợp chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng

(TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC), Li và cộng sự (2007) đã phân lập được chủng *Acremonium* sp. 2F09P03B sản sinh huperzin A với hàm lượng 8,32mcg/L; Wang và cộng sự (2011) đã phân lập được 127 chủng nấm, đã định dạng được 69 chủng thuộc 19 chi nấm *Aspergillus*, *Podospora*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botrytis*, v.v., và đã xác định được 39 chủng có khả năng sản sinh huperzin A, trong đó chủng *Shiraia* sp. Slf14 cho sản lượng huperzin A cao nhất là 327,8mcg/L; Yang và cộng sự (2011) đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporoides* ES026 sản sinh 30mcg Huperzin A/g CDW. Năm 2015, Su và Yang đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh được 21mcg Huperzin A/L. Các chủng này đều đã được đăng ký bản quyền tại Trung Quốc, đã tìm được các điều kiện lên men thích hợp và là chủng giống gốc làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A quy mô công nghiệp.

Theo các tài liệu đã công bố hoạt tính huperzin A của các chủng nấm nội sinh khác nhau dao động từ 8,32 đến 327,8mcg/L dịch lên men. Tuy nhiên nhiều chủng nấm đại phân lập có hoạt tính thấp, cần có sự nghiên cứu về thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men để tăng khả năng sản sinh huperzin A. Các chủng nấm nội sinh tổng hợp huperzin A cần nhiều chất dinh dưỡng đặc biệt trong môi trường sống, chúng phát triển tốt trong cây Thạch tùng và ở độ cao và nhiệt độ đặc biệt cho nên trong môi trường tổng hợp huperzin A có lẽ cũng cần một số chất đặc biệt. Tuy nhiên, hai yếu tố nguồn cacbon và nguồn nitơ trong môi trường vẫn đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp huperzin A. Các chủng vi nấm khác nhau có khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ khác nhau để sinh tổng hợp huperzin A.

Theo Zhao và cộng sự (2013), nghiên cứu tối ưu các điều kiện lên men khác nhau để sản xuất huperzin A từ chủng *C. gloeosporioides* ES026 đã làm tăng 25,58% sản lượng huperzin A. Môi trường khoai tây bổ sung glucoza hoặc sucroza nhưng không có mantoza đã làm tăng khả năng sản xuất huperzin A từ nấm. Etanol được bổ sung vào môi trường đạt nồng độ cuối cùng 0,5-2% đã kích thích sự phát triển của nấm trong khi metanol với lượng tương tự đã ức chế sự tăng trưởng. Tuy nhiên, cả metanol và etanol đã làm tăng khả năng sản xuất huperzin A (năng suất cao nhất của huperzin A tăng 51,89% khi bổ sung etanol).

Theo Zhu và cộng sự (2010), chủng nấm *Shiraia* sp. Slf14 sau khi lên men 14 ngày ở 28°C cho lượng huperzin A đạt 327,8mcg/L dịch lên men. Nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp huperzin A của chủng *Shiraia* sp. Slf14, Yan và cộng sự (2014) đã bổ sung vào môi trường lên men một số chất cảm ứng HSE (dịch chiết cây *Huperzia serrata* được tách chiết từ cây và lá Thạch tùng răng cưa), L-lysin và axit axetic với

các nồng độ khác nhau, lên men ở 28°C trong 14 ngày. Việc bổ sung 1 lượng rất nhỏ HSE đã làm tăng khả năng sinh huperzin A, đạt 40mcg/g sinh khối khô. Đặc biệt, khi bổ sung 0,2g/L L-lysin trong môi trường nuôi cấy năng suất huperzin A cao hơn so với đối chứng không bổ sung L-lysin khoảng 40% (Riming Yan và cộng sự, 2014).

Chủng *Colletotrichum gloeosporioides* isolate YLJ-13 (Hu Weixin và cộng sự, patent Trung Quốc số CN102168017B) có khả năng sản xuất huperzin A được lên men trong môi trường khoai tây cải tiến. Huperzin A được tiết ra khỏi tế bào, môi trường khoai tây cải tiến được sử dụng như nguồn chất cảm ứng và sản lượng lên đến 199,6mg huperzin A/L dịch lên men.

Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa mới được phát hiện tại Sa Pa và Lâm Đồng ở độ cao 1000m. Đây là loài cây dược liệu quý hiếm, thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu và khai thác ứng dụng trong điều trị bệnh tại Việt Nam. Gần đây, Bộ Khoa học và Công nghệ giao cho Viện Công nghệ sinh học chủ trì đề tài cấp Nhà nước "*Khai thác và phát triển nguồn gen loài Thạch tùng răng cưa (Huperzia serrata Thunb. Trev.) tại Sapa và Đà Lạt*" (2014-2017) nhằm bảo tồn, khai thác phát triển *ex situ* cây *Huperzia serrata* trong các vùng có điều kiện sinh thái thuận lợi để bước đầu hướng tới có thể làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A hỗ trợ chữa trị bệnh suy giảm trí nhớ. Hiện tại, đề tài đã thực hiện được 02 khu vườn trồng bảo tồn *Huperzia serrata* tại Langbiang (Đà Lạt) và Vườn Quốc gia Hoàng Liên (Sa Pa) và đang thực hiện bảo tồn *in vitro* trong phòng thí nghiệm. Ở Việt Nam trước đây đã có nhiều đề tài nghiên cứu về vi nấm nội sinh; tuy nhiên, các nghiên cứu về nấm nội sinh ở cây Thạch tùng răng cưa Việt Nam đến nay chưa có công bố.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 620bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao với hàm lượng đạt 2,88mg/L dịch lên men trong môi trường PBD-I.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Fungal endophyte* Tsp25 trên môi trường PDA-I sau 10 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc tròn, viền đều, màu xanh nâu xen trắng.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty của chủng *Fungal endophyte* Tsp25 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không thấy sự xuất hiện của bào tử.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng (TLC) của dịch chiết huperzin A của chủng *Fungal endophyte* Tsp25 (a) và của chất chỉ thị huperzin A (b).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sắc kí đồ HPLC (UV 310 nm), phổ UV, phổ LC-MSD của dịch chiết nấm *Fungal endophyte* Tsp25 trên hệ thống Sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) được thực hiện theo phương pháp của Dobranic và cộng sự (1995) và Shen và cộng sự (2000) có cải tiến như mô tả sau đây. Mẫu thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi được thu từ Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam trước tiên được rửa sạch bằng nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút rồi rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Các mẫu thân của cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2-1cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa petri chứa môi trường PDA-I (Môi trường PDA-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl; 16g agar và 1 lít nước cất) có độ pH = 7 với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7-10 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Cấy chuyển các sợi nấm của các chủng nấm phân lập được từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới và nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học.

Các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại bằng phương pháp truyền thống theo các khóa phân loại của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1982; Bùi Xuân Đồng, 1984; Ainsworth và cộng sự, 1973. Sau đó, tách chiết hệ gen của các chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal ADN Extraction Kit) và khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5' - CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Tiếp theo, đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 thu được được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự AEI PRISM @ 3700 Genetic Analyzer. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PCGENE và trình tự vùng được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (GenBank) với phần mềm Bioedit, Blast và định danh.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được đưa đi nuôi cấy và thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDB-I (Môi trường PDB-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5g Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 10 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối được sấy ở 45- 60°C và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả sáng chế đã thu được chủng vi nấm thuộc nhóm nấm bất thụ sẫm màu có vách thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 620bp và có độ tương đồng $\leq 99\%$ so với các chủng một số chủng chưa xác định được đến chi và chưa được đặt tên phân loại và được định danh là *Fungal endophyte Tsp25*.

Chủng vi nấm *Fungal endophyte Tsp25* thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao với hàm lượng 2,88mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I.

Chủng vi nấm *Fungal endophyte Tsp25* thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế là chủng tự nhiên được phân lập từ thân của cây thuốc phân bố tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Đây là một trong các nghiên cứu đầu tiên ở

Việt Nam và là chủng có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A quý mô lớn, đơn giản mà lại cho hiệu suất huperzin A cao, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer, mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam, góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế và xã hội.

Chủng *Fungal endophyte* Tsp25 theo sáng chế hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong môi trường PDA-I trong điều kiện lạnh sâu -20°C và -86°C.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mẫu thân cây Thạch tùng răng cưa tươi thu thập từ Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam được rửa sạch bằng nước sạch, khử trùng lần lượt bằng ethanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng 3-5 phút rồi các mẫu được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu thân cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2-1cm) và được đặt lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I (Môi trường PDA-I cải tiến) với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7-10 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm nội sinh trong cây. Cấy chuyển các sợi nấm của chủng phân lập từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới, nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng có ký hiệu là Tsp25 có thời gian sinh trưởng 10-14 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng Tsp25 thuần trên môi trường thạch nghiêng PDA-I đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch, sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở 4-10°C để lưu giữ và bảo quản chủng giống.

Sử dụng phương pháp phân loại truyền thống vi nấm dựa trên đặc điểm hình thái của chủng. Đặc tính hình thái của vi nấm được xác định dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc; hệ sợi, hình thái, vách ngăn sợi nấm; bào tử và cuống bào tử theo các khóa phân loại của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1982), Bùi Xuân Đồng (1984) và Ainsworth và cộng sự (1973) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng Tsp25 đến chi.

Chủng Tsp25 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C trong 10 ngày, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng Tsp25 trên môi trường PDA-I sau 10 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc tròn, viền đều và màu xanh nâu xen trắng. Chuẩn bị lam kính, lamen và các đĩa peptri đã được khử trùng. Dùng que cấy lấy một miếng thạch có sợi nấm

phát triển kích thước khoảng 0,5x0,5cm đặt lên lam kính rồi lấy lamen đặt lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa petri ở 28°C trong khoảng thời gian 10-14 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamen. Đặt lam kính và lamen lên soi dưới kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty của chủng Tsp25 được thể hiện trên hình 2, trong đó sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không thấy sự xuất hiện của bào tử.

Nhận dạng sơ bộ chủng vi nấm qua màu sắc và hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại. Kết quả nhận dạng được chủng Tsp25 thuộc nhóm nấm bất thụ sẫm màu có vách có thể thuộc lớp nấm bất toàn (*Deuteromycetes*), là một nhóm không đồng nhất về phân loại học với đa số đại diện thuộc ngành nấm túi (*Ascomycota*), nhóm này còn rất ít được hiểu biết về sinh thái, vai trò và chức năng trong các hệ sinh thái khác nhau, về phân loại học và chủng loại phát sinh.

ADN của chủng Tsp25 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp25 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết 500-600bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50µl) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25µl hỗn hợp chuẩn, 0,5µmol/L mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 1 phút 30 giây, 53°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút; kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 600bp. Tinh sạch đoạn gen này bằng kit tinh sạch ADN (GeneJET PCR Purification Kit #K0701, Thermo Scientific).

Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp25 được xác định trên máy giải trình tự tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (bảng 1). Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng Tsp25 có kích thước 620bp. Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp25 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Bảng 1- Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm Tsp25 khi so sánh với trình tự các chủng trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Tên chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh %	Mức độ tương đồng %
	Tên	Mã số		
Tsp 25	<i>Fungal endophyte sp. MS25</i>	DQ485958.1	97	96
	<i>Fungal sp. CMU27</i>	GQ924914.1	97	96
	<i>Fugal sp. RTB2.2</i>	KF688127.1	91	99

Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen này có mức tương đồng với các trình tự gen trên NCBI $\leq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\leq 97\%$ so với các chủng chưa xác định được đến chi và chưa được đặt tên phân loại được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (*Fungal endophyte sp. MS25*, *Fungal sp. CMU27* và *Fugal sp. RTB2.2*). Chủng Tsp25 được định danh là *Fungal endophyte Tsp25*.

Chủng vi nấm *Fungal endophyte Tsp25* được nuôi lắc trong 1 lít môi trường PDB-I ở 180 vòng/phút ở 28°C trong 7 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi thu được ở nhiệt độ 45-60°C và nghiền thành bột mịn bằng nitor lỏng.

Chiết huperzin A từ bột nấm khô theo các bước như sau: (1) bổ sung một lượng amoniac 10% với tỉ lệ 1ml/g bột nấm trong 1-2 giờ ở nhiệt độ phòng; (2) bổ sung 30ml dung môi HCl 5% tỉ lệ 1:30ml, lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ; (3) ly tâm thu dịch chiết ở 6000 vòng/phút trong 10 phút; (4) chỉnh dung dịch thu được về độ pH = 10 bằng NaOH 10%/NH₄OH 25%; (5) chiết 3 lần với clorofom (tỷ lệ 1:1), thu pha dưới. (6) cô quay loại bỏ dung môi, thu được cặn alkaloid toàn phần; và (7) hòa tan cặn alkaloid thu được trong 1ml metanol.

Dịch alkaloid toàn phần thu được được xác định hoạt chất huperzin A bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn huperzin A trong metanol 1mg/ml, pha loãng đến các nồng độ chuẩn; (2) hoạt hóa bản mỏng silicagel bằng cách sấy 1 giờ ở 110°C, mẫu được chấm lên bản mỏng bằng pipet (chất chuẩn huperzin A 1μl nồng độ 10⁻⁶; mẫu dịch chiết nấm là 5μl), sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm vào bình dung môi có thành phần clorofom:isopropanol:etyl axetat:amoniac (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1), đặt nắp bình, theo

đổi vạch dung môi di chuyển đến khi cách mép trên tấm bản mỏng 1cm thì lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy nhẹ bản mỏng; và (4) sử dụng thuốc nhuộm KMnO_4 0,5% và Iod 0,5% xịt đều lên bản mỏng. Sấy nhẹ bản mỏng, quan sát vết. Kết quả xác định được alkaloid toàn phần thu được của chủng Tsp25 cho kết quả dương tính với huperzin A.

Xác định hàm lượng huperzin A có mặt trong dịch chiết chủng Tsp25 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent series 1100. Trên hệ thống HPLC, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin A chuẩn được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu R_t 10,262 – 10,663 phút đối với các mẫu chất chỉ thị dùng trong thang định lượng, đồng thời hệ thống MS phát hiện được pic ion phân tử của huperzin A tại thời điểm 10,3 – 10,7 phút với pic ion phân tử 243,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích pic UV 310nm tại thời gian lưu R_t 10,3 – 10,7 phút. Kết quả cho thấy pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng Tsp25 được phát hiện ở thời gian lưu R_t 10,591 phút trùng với thời gian lưu R_t , phổ UV và số khối MS so với chất chỉ thị huperzin A.

Kết quả định lượng huperzin A thu được từ 1ml dịch chiết của chủng Tsp25 có hàm lượng đạt 2,88mg huperzin A/L dịch lên men.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

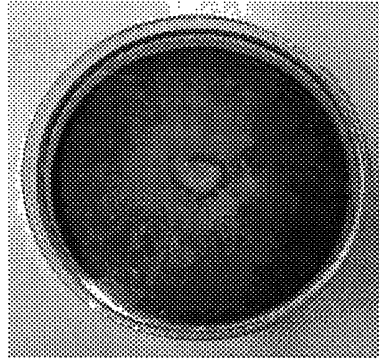
Chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 là chủng thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ cây dược liệu tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer - đây là căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở người cao tuổi sau bệnh tim và ung thư.

Chủng *Fungal endophyte* Tsp25 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam, chủng được phân lập từ thân cây Thạch tùng rừng thưa phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam và là chủng gốc thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao (đạt 2,88 mg/L dịch lên men). Chủng *Fungal endophyte* Tsp25 sẽ là chủng giống gốc để tiến hành các nghiên cứu nâng cao hoạt tính trong các điều kiện, môi trường nuôi cấy tối ưu để xây dựng được quy trình sản xuất huperzin A quy mô lớn cho hiệu suất huperzin A cao. Chủng chỉ cần nuôi trong môi trường với các nguyên liệu đơn giản, rẻ tiền, quy trình lên men sản xuất huperzin A đơn giản, không cần máy móc thiết bị phức tạp và chỉ trong một thời gian ngắn (từ 15-20 ngày) đã thu được hàm lượng huperzin A một cách nhanh hơn, đơn giản hơn, hiệu quả hơn có thể ứng dụng làm

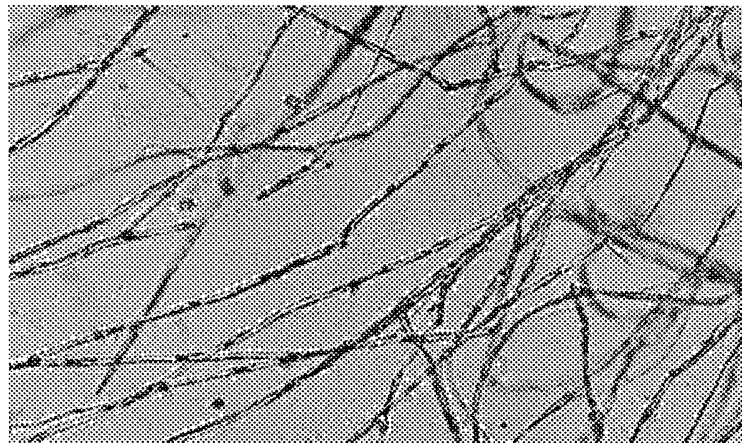
nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A quy mô lớn phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer; mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam; góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế và xã hội.

YÊU CẦU BẢO HỘ

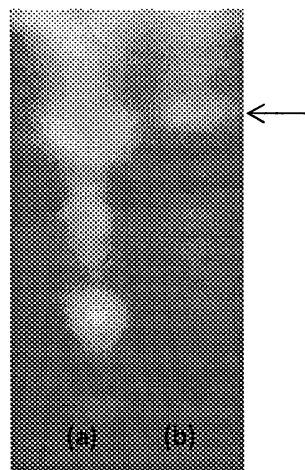
1. Chủng vi nấm *Fungal endophyte* Tsp25 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 2,88mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 620bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



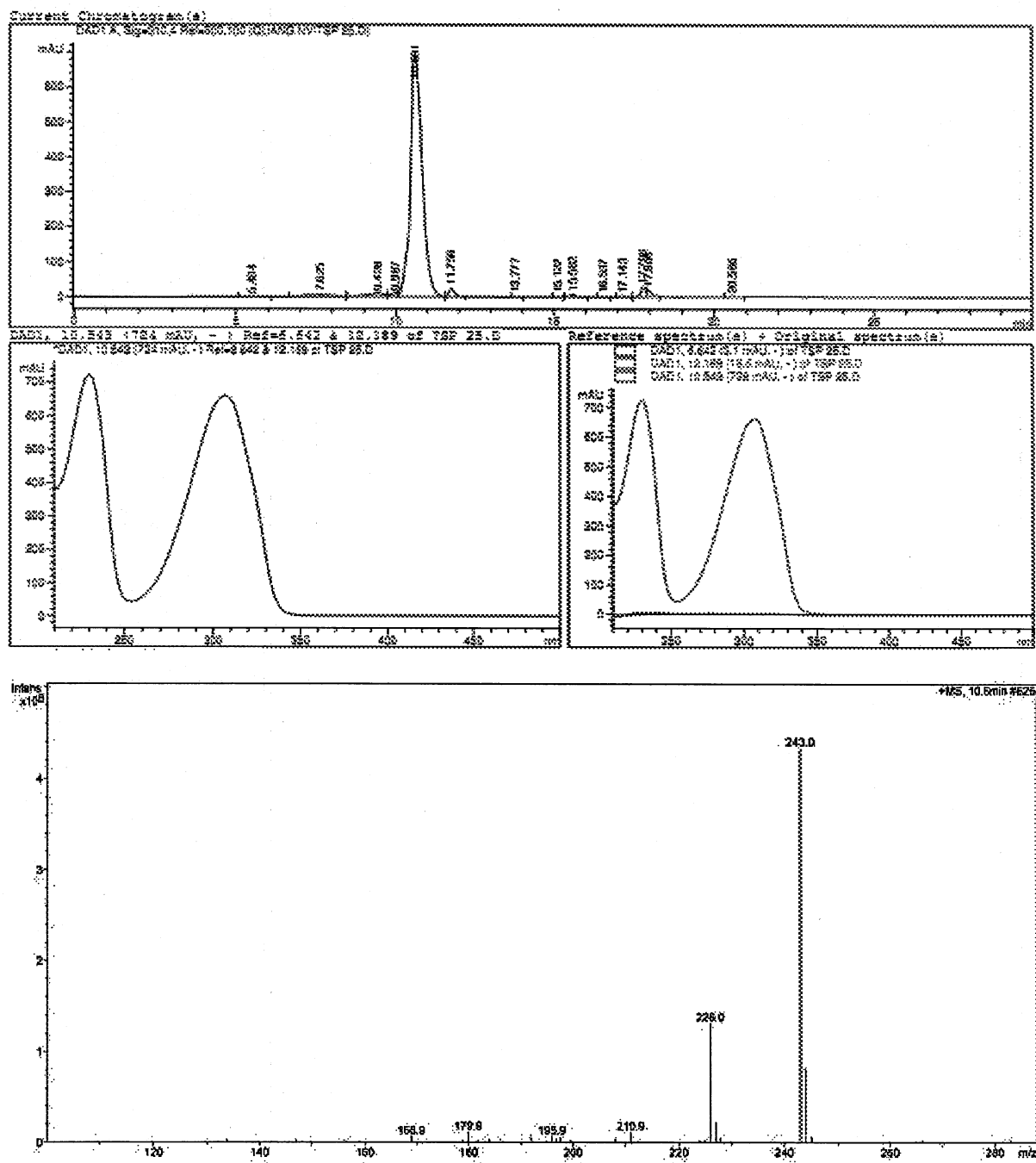
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI NẤM *FUNGAL ENDOPHYTE* TSP25 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 620

<212> ADN

<213> *Fungal endophyte* Tsp25

<400>

tataaaacct cccaaccctt ttgtggaacc ttaccgtcgt ttgcctcggc gtgagctacg	60
gctaccctgc cttctaccct gtagtaccct atagctaccc ttagtagtacc tatagctacc	120
ctgtagtacc ctacagctac cctataggta ccttgaagct accctgtaga cggccttatgg	180
cccgccgaag gaccgctaaa ctcttgTTTT tattgctggt attctgaatt ataaactaaa	240
ataagttaaa actttcaaca acggatctct tggttctggc atcgatgaag aacgcagcga	300
aatgcgataa gtaatgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca tcgaatcttt gaacgcacat	360
tgcgcccatt agtattctag tgggcatgcc tattcgagcg tcatttcgac ccctaagccc	420
ctgttgctta gcgttgggaa tctacggcgt agttccttaa agttagtggc ggagttaggg	480
tacactctca gcgtagtaat atctctcgct cgtgtggtgg ccctggctgc tggccggtta	540
aaccctata tcttttagtg gttgacctcg aattaggtta gaataccgc tgaacttaag	600
catatcaata agcggaggaa	620