



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002746

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00125

(22) 29/01/2018

(62) 2-2018-00041

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/08/2019 377A

(73) Trung tâm Ươm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp khoa học và công nghệ (VN)
39 Trần Hưng Đạo, phường Hàng Bài, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Đinh Xuân Tú (VN); Nguyễn Văn Bình (VN); Vũ Duy Dũng (VN); Tống Văn Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH KIỂM ĐỊNH SÂM LAI CHÂU (*PANAX VIETNAMENSIS* VAR. *FUSCIDICUS*) VÀ CẶP MÔI DÙNG ĐỂ KIỂM ĐỊNH SÂM LAI CHÂU

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) trên cơ sở xác định loài để kiểm soát chống hàng giả. Quy trình theo giải pháp hữu ích có khả năng kiểm định nhằm xác định được mẫu sâm Lai Châu trên cơ sở phân tử. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến các cặp môi đặc hiệu sử dụng trong quy trình kiểm định sâm Lai Châu giúp bảo vệ và phân biệt được sâm Lai Châu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học phân tử ứng dụng, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) trên cơ sở xác định loài để kiểm soát chống hàng giả và cấp mỗi dùng để kiểm định sâm Lai Châu.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) là một loài sâm quý, thuộc dạng cỏ, thân rễ, chiều cao từ 0,5 đến 0,8 m, đây là nguồn dược liệu cho y học cổ truyền. Sâm Lai Châu được cho có tác dụng dược lý gần bằng sâm Ngọc Linh, chúng phân bố chủ yếu ở Lai Châu và một số vùng thuộc tỉnh Vân Nam, Trung Quốc. Các nghiên cứu định tính và định lượng đã chỉ ra rằng trong rễ cây sâm Lai Châu giàu saponin, tỷ lệ saponin của sâm Lai Châu lớn hơn nhiều loài của chi panax trên thế giới, chỉ kém sâm Ngọc Linh (tỷ lệ saponin toàn phần lên đến 15,75%, Nguyễn Thượng Dong, "Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ nhân sâm", NXB KHKT, 2007, trang 110). Sâm Lai Châu dễ trồng hơn sâm Ngọc Linh và đây cũng thuộc một trong những loài sâm quý có tác dụng bổ dưỡng toàn thân, tăng cường sức lực, tăng trí nhớ, tăng cường hưng phấn vỏ đại não, chống stress, bảo vệ gan, điều trị bệnh viêm loét dạ dày, điều hòa hoạt động tim mạch, làm giảm lipit trong máu, ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch, giảm đau, chống viêm.

Tuy nhiên, do kích thước và hình dạng của sâm Lai Châu rất dễ gây nhầm lẫn với sâm Ngọc Linh, sâm Vũ Diệp và Tam thất hoang gây khó khăn cho việc quản lý cũng như kiểm định nguyên liệu, kiểm tra sâm giả. Việc giả sâm Lai Châu có hai hướng, hướng thứ nhất, sử dụng các loài có hình dạng giống như Tam thất hoang hoặc sâm Vũ Diệp (có nguồn gốc từ Trung Quốc) để giả sâm Lai Châu hoặc sử dụng sâm Lai Châu để làm giả sâm Ngọc Linh do hình dạng và kích thước các loài này giống nhau. Ngoài ra, có thể sử dụng các loại sâm như sâm Hàn Quốc để làm giả sản phẩm trên cơ sở kiểm định hàm lượng saponin. Điều này gây ảnh hưởng rất lớn đến vùng nguyên liệu.

Việc phân biệt sâm Lai Châu với các loài sâm khác hay với các thực vật khác chủ yếu dựa vào kinh nghiệm người trồng, điều này gây khó khăn trong công tác quản lý. Trường hợp sản phẩm sâm Lai Châu thì việc phân biệt dựa vào hàm lượng saponin tổng số. Do đó, việc sử dụng sâm kém chất lượng (Tam thất hoang, sâm Vũ Diệp) hoặc sâm khác loại (ví dụ sâm Hàn Quốc) trà trộn với sâm Lai Châu hiện chưa được kiểm soát và cũng chưa có công cụ để kiểm định nhằm xác định chính xác loài, nhằm bảo vệ người tiêu dùng cũng như bảo vệ được vùng nguyên liệu đặc hữu.

Mặc dù việc giải trình tự gen để phân biệt loài là đã biết, tuy nhiên, kỹ thuật này cần vốn đầu tư lớn, kỹ thuật phức tạp. Do đó, cần phát triển một kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện và có thể áp dụng rộng rãi với kết quả chính xác nhằm kiểm soát chống sâm Lai Châu giả từ Tam thất hoang, sâm Vũ Diệp hoặc sử dụng sâm Lai Châu làm giả sâm Ngọc Linh, giúp bảo vệ người tiêu dùng và bảo vệ vùng nguyên liệu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) dựa trên kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho loài và các cặp mồi đặc hiệu để kiểm định sâm Lai Châu sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chiết ADN tổng số từ mẫu thực vật bằng cách nghiền mẫu trong nitor lỏng, tiếp đến chiết bằng dung dịch đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromit), loại bỏ ARN bằng RNaza thu được ADN tổng số từ mẫu thực vật cần phân tích;

b) tiến hành PCR để nhân đoạn gen đặc hiệu với thành phần phản ứng bao gồm 3 µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl pH 8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 µM dNTP, 0,5 µl Taq polymeraza, 1µM mồi xuôi, 1 µM mồi ngược và nước khử ion vừa đủ thể tích 25µl, trong đó mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID. NO.2; và

c) xác định loài sâm Lai Châu bằng cách trộn sản phẩm PCR thu được ở bước c) với 6X đệm Dye và tiến hành điện di trên gel agaroza 2% trong 50 phút, sau đó nhuộm

bằng ethidium bromit trong 20 phút, kết quả điện di được so với thang chuẩn 1kb, kiểm tra phân đoạn có kích thước 204 bp để đưa ra kết luận về loài sâm Lai Châu.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó mẫu thực vật là mẫu được chọn từ nhóm bao gồm lá, thân, củ, rễ, thân, chồi, mầm và hạt, hoặc hỗn hợp của các thành phần này.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cặp mồi dùng để kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) dùng trong quy trình theo điểm 1, trong đó cặp mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 để nhân đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 có kích thước 204 bp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả điện di kiểm định mẫu sâm theo Ví dụ 2, trong đó (1) Tam thất hoang, (2) sâm Ngọc Linh, (3) sâm Lai Châu, (4) sâm Vũ Diệp và (5) sâm Hàn Quốc. Trong đó sâm Lai Châu có kích thước 204 bp, trong khi các mẫu khác cho băng điện di kích thước 189 bp. (A) là thang chuẩn kích thước 1 kbp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) dựa trên kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho loài và các cặp mồi đặc hiệu dùng để kiểm định sâm Lai Châu sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), trong đó quy trình này bao gồm các bước a) chiết ADN tổng số từ mẫu thực vật; b) tiến hành PCR để nhân đoạn gen đặc hiệu; và c) xác định loài sâm Lai Châu.

Trong bước chiết ADN tổng số từ mẫu thực vật, ADN được chiết bằng các quy trình chiết đã biết, ví dụ, quy trình CTAB (cetyltrimethylammonium bromit), trong đó mẫu được nghiền trong nitor lỏng thành bột mịn. Tiếp đó bổ sung dung dịch đệm CTAB trong khoảng 2 tiếng để phá vỡ tế bào, sau khi ly tâm, loại bỏ phần cặn, bổ

sung phân dịch vào isopropanol lạnh (-20°C) để kết tủa ADN, tiếp đến hòa tan kết tủa ADN bằng đệm TE và bổ sung enzym ARnaza để loại bỏ ARN. Sau khi loại ARN, bổ sung dung dịch 3M NaAc và etanol để thu phần kết tủa ADN. Phần ADN tổng số này được rửa và hòa với nước khử ion hoặc dung dịch đệm TE để thu được ADN tổng số từ mẫu thực vật cần phân tích.

Theo giải pháp hữu ích, mẫu thực vật được sử dụng để xác định loài là mẫu thực vật bất kỳ dùng để xác định xem liệu đó có phải là mẫu từ sâm Lai Châu hay không. Theo một phương án ưu tiên, trong đó mẫu thực vật là mẫu được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mẫu lá, thân, củ, rễ, thân, chồi, mầm và hạt, hoặc hỗn hợp của các thành phần này.

Trong bước tiến hành PCR để nhân đoạn gen đặc hiệu, tiến hành phản ứng PCR với thành phần phản ứng bao gồm 3 μl ADN tổng số, 10mM tris-HCl pH 8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 μM dNTP, 0,5 μl Taq polymeraza, 1 μM mỗi xuôi, 1 μM mỗi ngược và nước khử ion vừa đủ thể tích 25 μl , trong đó:

- mỗi xuôi là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 sau:

GGTCTCCGAGATCCTTTCTGA SEQ ID NO.1

- mỗi ngược là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 sau:

GACTCACTAAGCCGGGATCA SEQ ID NO.2

Cặp mỗi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 cho phép nhân đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 có kích thước 204bp.

Theo đó, trong bước xác định loài sâm Lai Châu, căn cứ vào kích thước đoạn ADN được nhân lên bằng các đoạn mỗi đặc hiệu được điện di trên gel agarosa, đưa ra kết luận về mẫu có phải từ loài sâm Lai Châu hay không. Theo đó, tiến hành trộn sản phẩm PCR thu được ở trên với 6X đệm Dye và tiến hành điện di trên gel agarosa 2% trong 50 phút. Tiếp đó nhuộm bằng ethidium bromit trong 20 phút. Kết quả điện di trên gel được so với thang chuẩn 1kb tại vị trí 204 bp để đưa ra kết luận về mẫu xét nghiệm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cặp mỗi dùng để kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) dùng trong quy trình theo giải

pháp hữu ích, trong đó cặp mỗi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 sau:

Mỗi xuôi: GGTCTCCGAGATCCTTTTCGA SEQ ID NO.1

Mỗi ngược: GACTCACTAAGCCGGGATCA SEQ ID NO.2

Theo đó, cặp mỗi này sẽ nhân đoạn nhân gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 có kích thước 204 bp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Kiểm định mẫu sâm

Để kiểm định mẫu, tiến hành lấy 5 mẫu sâm cần kiểm định về nguồn gốc loài, mỗi mẫu 200 mg.

Mỗi mẫu được cho vào ống eppendorf loại 2ml và nghiền tiếp bằng nitor lỏng thành bột mịn, sau đó bổ sung 1,2 ml dung dịch đệm CTAB đã được làm nóng ở nhiệt độ 65°C, trộn đều trong 5 giây, sau đó ủ nóng ở nhiệt độ 65°C trong 1,5 giờ. Trong quá trình ủ có đảo trộn để phá vỡ tế bào. Sau đó mẫu được ly tâm 10 phút với tốc độ 13500 vòng/phút, thu phần dịch. Hút 800µl dịch này bổ sung ống eppendorf loại 1,5ml chứa 800 µl dung dịch phenol:cloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) và đảo trộn nhẹ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng 23°C. Tiếp đó ly tâm 10 phút với tốc độ 13500 vòng/phút để phân tách thành 2 lớp (pha) dung dịch. Sau đó hút phần dịch nổi phía trên cho vào ống chứa 800µl isopropanol lạnh (-20°C) và trộn nhẹ nhàng bằng cách đảo ngược ống trong 10 phút ở nhiệt độ phòng 23°C để kết tủa ADN. Sau khi ly tâm 10 phút với tốc độ 13500 vòng/phút thu và hòa tan kết tủa ADN bằng 250µl TE ở nhiệt độ phòng. Sau khi bổ sung 2,5µl enzym RNaza và trộn đều ở 37°C trong thời gian 30 phút, bổ sung tiếp 25µl dung dịch 3M NaAc và 600µl ethanol lạnh (-20°C), trộn và ủ lạnh ở -20°C trong 20 phút để kết tủa ADN.

Tiếp đến ly tâm 10 phút với tốc độ 13500 vòng/phút thu ADN tổng số, rửa sạch ADN 1-2 lần bằng 70% (v/v) ethanol lạnh. Sau khi làm khô ADN bằng máy hút chân không 10-15 phút, hòa tan ADN bằng 25µl dung dịch TE và bảo quản ở -20°C để làm mẫu kiểm định.

Tiếp đó, tiến hành PCR với thành phần như sau:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Dung dịch đệm (10X)	2,5
dNTP (2mM)	2,0
Mỗi xuôi: SEQ ID NO.1 (10 pmol)	1,0
Mỗi ngược: SEQ ID NO.2 (10 pmol)	1,0
Taq (500U)	0,5
ADN mẫu (20ng/ μ l)	3,0
Nước cất vừa đủ	25,0

Sau khi thực hiện phản ứng PCR theo chu trình nhiệt bao gồm biến tính 95°C trong 5 phút, sau đó chạy 35 chu kỳ bao gồm biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mồi 55°C trong 30 giây và tổng hợp 72°C trong 30 giây và cuối cùng giữ 72°C trong 5 phút thu được sản phẩm phản ứng PCR.

Hòa tan agarosa vào dung dịch TBE 0,5X để tạo nồng độ 2%, sau đó tiến hành đun sôi đều trong lò vi sóng và để hạ nhiệt độ (khoảng 50°C) rồi đổ vào khay. Các mẫu ADN sau khi đã nhân bằng phản ứng PCR được trộn với 6X đệm Dye và chạy điện di trên agarosa gel nồng độ 2% trong 50 phút, sau đó nhuộm với ethidium bromit (20 phút) và soi dưới ánh sáng UV để quan sát và chụp hình. Để kiểm tra kết quả, các mẫu được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự.

Kết quả điện di được thể hiện trên Hình 1, trong đó cho thấy (1) Tam thất hoang, (2) sâm Ngọc Linh, (3) sâm Lai Châu, (4) sâm Vũ Diệp và (5) sâm Hàn Quốc. Trong đó sâm Lai Châu có kích thước 204 bp, trong khi các mẫu khác cho băng điện di kích thước 189 bp. (A) là thang chuẩn kích thước 1 kbp.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình kiểm định sâm Lai Châu trên cơ sở sinh học phân tử cho phép xác định được chính xác loài sâm Lai Châu một cách nhanh chóng và chính xác. Bằng các kỹ thuật PCR chuẩn, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép xác định nhanh loài, để từ đó khẳng định được mẫu sâm giúp giúp chống nặn sâm giả.

Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, quy trình cho phép phân biệt được sâm Lai Châu với các loài sâm khác như sâm Ngọc Linh, sâm Vũ Diệp hoặc Tam thất hoang hoặc sâm Hàn Quốc, để từ đó giúp quản lý, kiểm soát được nặn sâm giả, giúp bảo vệ được

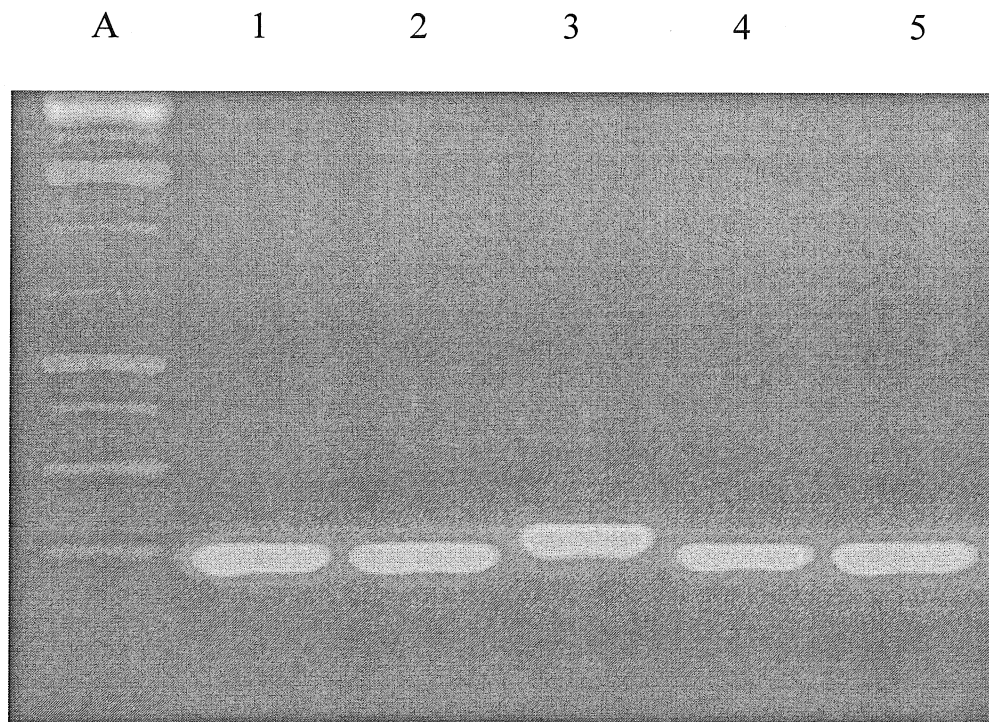
vùng nguyên liệu, phát triển vùng nguyên liệu theo hướng bền vững cũng như bảo vệ được người tiêu dùng.

Các đoạn mồi theo giải pháp hữu ích đặc hiệu với loài, cho phép dễ dàng phân biệt được sâm Lai Châu trên cơ sở điện di gel agarosa với độ phân giải cao. Các đoạn mồi có thể dễ dàng tổng hợp và được sử dụng bởi các phòng sinh học phân tử giúp cho việc kiểm định dễ dàng và tin cậy.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) chiết ADN tổng số từ mẫu thực vật bằng cách nghiền mẫu trong nitor lỏng, tiếp đến chiết bằng dung dịch đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromit), loại bỏ ARN bằng RNaza thu được ADN tổng số từ mẫu thực vật cần phân tích;
 - b) tiến hành PCR để nhân đoạn gen đặc hiệu với thành phần phản ứng bao gồm 3 µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl pH=8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 µM dNTP, 0,5 µl Taq polymeraza, 1µM mỗi xuôi, 1 µM mỗi ngược và nước khử ion vừa đủ thể tích 25µl, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2; và
 - c) xác định loài sâm Lai Châu bằng cách trộn sản phẩm PCR thu được ở bước b) với 6X đệm Dye và tiến hành điện di trên gel agarosa 2% trong 50 phút, sau đó nhuộm bằng ethidium bromit trong 20 phút, kết quả điện di được so với thang chuẩn 1kb, kiểm tra phân đoạn có kích thước 204 bp để đưa ra kết luận về loài sâm Lai Châu.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó mẫu thực vật là mẫu được chọn từ nhóm bao gồm lá, thân, củ, rễ, thân, chồi, mầm và hạt, hoặc hỗn hợp của các thành phần này.
3. Cặp mỗi dùng để kiểm định sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) dùng trong quy trình theo điểm 1, trong đó cặp mỗi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 để nhân đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.

HÌNH 1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Trung tâm Ươm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp khoa học và công nghệ	
<120>	Quy trình kiểm định sâm Lai Châu (<i>Panax vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i>) và cấp mỗi dùng để kiểm định sâm Lai Châu	
<130>		
<160>	3	
<170>		
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<220>		
<222>		
<223>		
<400>	3	
	GGTCTCCGAGATCCTTTCTGA	
<210>	2	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<220>		
<222>		
<223>		
<400>	4	
	GACTCACTAAGCCGGGATCA	
<210>	3	
<211>	204	
<212>	ADN	
<213>	<i>Panax vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i>	
<220>		
<223>	Gen lục lạp	
<220>		
<222>		
<223>		
<400>	3	
	GGTCTCCGAG ATCCTTTCTGA TGACCTATGT TGTGTTGAAG GGATATCTAT ATAATCCGAT	60
	CGATTGCGTA AAGCCCGCGG TAGCAACGGA ACCGGGGAAA GTATACAGAA AAGACAGTTC	120
	TTTTCTATTA TATTAGTATT TTCTATTAGA TTAGATTAGT ATTAGTTAGT GATCCCGGCT	180
	TAGTGAGTCC CGGCTTAGTG AGTC	204