



(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) 
2-0002069

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00042

(22) 29.01.2018

(45) 26.08.2019 377

(43) 26.03.2018 360

(73) 1. 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

2. CÔNG TY TNHH VAENCO VIỆT NAM (VN)

Số 18, ngách 72, ngõ 102 đường Trường Chinh, phường Trung Tự, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Văn Bình (VN), Đinh Xuân Tú (VN), Vũ Duy Dũng (VN), Nguyễn Trung Kiên (VN), Vũ Duy Đức (VN), Vũ Đức Thanh (VN)

(54) **QUY TRÌNH KIỂM ĐỊNH SÂM NGỌC LINH (PANAX VIETNAMENSIS HA ET GRUSHV) VÀ CẬP MỒI DỪNG ĐỂ KIỂM ĐỊNH SÂM NGỌC LINH**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình kiểm định sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv) 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 Ngọc Linh trên cơ sở phân tử. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến các cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong quy trình kiểm định sâm Ngọc Linh giúp bảo vệ được người trồng sâm Ngọc Linh trước nạn hàng giả.

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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) trên cơ sở xác định loài để kiểm soát chống hàng giả và cặp mỗi dùng để kiểm định sâm Ngọc Linh.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) và là một loại cây dược liệu quý, đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh, tỉnh Kon Tum và huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam. Ngoài tự nhiên, cây sâm này chỉ mọc ở độ cao từ khoảng 1500m đến 2500m so với mặt nước biển và sống dưới tán rừng già, ẩm, nhiều mùn với nhiệt độ ban ngày từ 20°C đến 25°C, ban đêm từ 15°C đến 18°C. Các nghiên cứu định tính và định lượng đã chỉ ra rằng trong rễ cây sâm Ngọc Linh có khoảng 52 loại saponin khác nhau, trong đó có 26 loại saponin mới. Tỷ lệ saponin của sâm Ngọc Linh lớn hơn nhiều loài của chi panax trên thế giới (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) nên đây là 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 lipid trong máu, ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch, giảm đau, chống viêm. Đặc biệt hoạt chất majonosin-R2 trong sâm Ngọc Linh có tác dụng ức chế giai đoạn đầu của bệnh ung thư biểu mô da.

Hiện sâm Ngọc Linh đã được phát triển thành vùng nguyên liệu và được định hướng phát triển nguyên liệu vùng cung cấp nguyên liệu cho ngành dược. Tuy nhiên, hiện sâm Ngọc Linh giả đang trở thành một vấn đề có khả năng gây ảnh hưởng đến vùng nguyên liệu. Việc giả sâm Ngọc Linh có hai hướng, hướng thứ nhất, sử dụng các loài có hình dạng giống như sâm Ngọc Linh như Tam thất hoang hoặc sâm Vũ Diệp (có nguồn gốc từ Trung Quốc) hay sâm Lai Châu với hình dạng giống như sâm Ngọc Linh giả làm sâm tươi hoặc 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 Ngọc Linh 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 Ngọc Linh 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, sâm Lai Châu) hoặc sâm khác loại (ví dụ sâm Hàn Quốc) trà trộn với sâm Ngọc Linh 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. Đặc biệt, do đặc tính gần về mặt hình thái và phân bố gần gũi về mặt sinh thái nên việc sử dụng các môi đặc hiệu cho họ nhân sâm khó có thể phân biệt được chính xác các loài gần gũi với sâm Ngọc Linh. 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 Ngọc Linh giả từ Tam thất hoang, sâm Vũ Diệp, sâm Lai Châu hoặc sâm Hàn Quốc, 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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dựa trên kỹ thuật PCR với các cặp môi đặc hiệu cho loài và các cặp môi đặc hiệu để kiểm định sâm Ngọc Linh 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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), 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 μ l ADN tổng số, 10mM tris-HCl pH 8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 μ M dNTP, 0,5 μ l Taq polymeraza, 1 μ M mỗi xuôi, 1 μ M mỗi ngược và nước khử ion vừa đủ thể tích 25 μ l, trong đó cặp mỗi xuôi và mỗi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO. 4; và SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6; và

c) xác định loài sâm Ngọc Linh 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 243, 250, 176 bp để đưa ra kết luận về loài sâm Ngọc Linh.

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 một phương án ưu tiên, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và phân đoạn cần kiểm tra có kích thước 243 bp.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và phân đoạn cần kiểm tra có kích thước 268 nucleotit.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và phân đoạn cần kiểm tra có kích thước 176 bp.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cặp mỗi dùng để kiểm định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dùng trong quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó cặp mỗi này được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4; và SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Theo một phương án ưu tiên, 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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 có kích thước 243 bp.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4 để nhân đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 có kích thước 268 nucleotit.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 để nhân đoạn gen lục lạp của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 có kích thước 176 bp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả điện di kiểm định mẫu sâm theo Ví dụ 1, trong đó (1) sâm Lai Châu, (2) sâm Vũ Diệp, (3) sâm Ngọc Linh, (4) Tam thất hoang và (5) sâm Hàn Quốc, trong đó dải điện di của sâm Ngọc Linh có kích thước 243 bp còn 4 loài sâm còn lại có kích thước 223 bp có thể phân biệt được trên băng điện di. (A) là thang chuẩn kích thước 1 kbp.

Hình 2 là kết quả điện di kiểm định mẫu sâm theo Ví dụ 2, trong đó (1) thực vật dại, (2) sâm Lai Châu, (3) sâm Lai Châu, (4) sâm Lai Châu, (5) sâm Ngọc Linh, (5) sâm Hàn Quốc và (6) Tam thất hoang. Trong đó dải điện di của sâm Lai Châu cho hai băng 214 bp và 286 bp, Tam thất hoang cho dải 232 bp, sâm Hàn Quốc cho dải 250 bp trong khi sâm Ngọc Linh cho dải 268 bp. (A) là thang chuẩn kích thước 1 kbp.

Hình 3 là kết quả điện di kiểm định mẫu sâm theo Ví dụ 3, trong đó (1) sâm Hàn Quốc, (2) sâm Ngọc Linh, (3) sâm Lai Châu, (4) sâm Vũ Diệp và (5) Tam thất hoang, trong đó dải điện di của sâm Ngọc Linh có kích thước 176 bp còn 4 loài sâm còn lại có kích thước 223 bp có thể phân biệt được trên băng điện di. (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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dựa trên kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho loài

và các cặp môi đặc hiệu dùng để kiểm định sâm Ngọc Linh 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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), 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 Ngọc Linh.

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 phần 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 ethanol 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 Ngọc Linh 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 bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.3 và SEQ ID NO.5 sau:

TGGCACAAATCTTTTTGGTTC	SEQ ID NO.1
CTCCGCTTAGCCTTATCCCC	SEQ ID NO.3
GACTCGCGGATTTATCGACA	SEQ ID NO.5

- mỗi ngược là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.6.

AGGAATGCGGTACAAGGAAT	SEQ ID NO.2
CCGTATGAAGGTCACGATCG	SEQ ID NO.4
ACTAGGAATGCGGTACAAGGA	SEQ ID NO.6

Theo một phương án ưu tiên, 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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 có kích thước 243 bp.

Mỗi xuôi: TGGCACAAATCTTTTTGGTTC	SEQ ID NO.1
Mỗi ngược: AGGAATGCGGTACAAGGAAT	SEQ ID NO.2

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp mỗi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4 để nhân đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 có kích thước 268 nucleotit.

Mỗi xuôi: CTCCGCTTAGCCTTATCCCC	SEQ ID NO.3
Mỗi ngược: CCGTATGAAGGTCACGATCG	SEQ ID NO.4

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp mỗi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 để nhân đoạn gen lục lạp của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 có kích thước 176 bp.

Mỗi xuôi: GACTCGCGGATTTATCGACA	SEQ ID NO.5
Mỗi ngược: ACTAGGAATGCGGTACAAGGA	SEQ ID NO.6

Theo đó, trong bước xác định loài sâm Ngọc Linh, 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 Ngọc Linh 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. Theo đó, căn cứ vào đoạn mỗi được sử dụng, kiểm tra phân đoạn có kích thước 243, 250, 177 bp để đưa ra kết luận về mẫu xét nghiệm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cặp môi dùng để kiểm định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dùng trong quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó cặp môi này được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4; và SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6. Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp môi theo giải pháp hữu ích có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 sau:

Môi xuôi: TGGCACAAATCTTTTGGTTC SEQ ID NO.1

Môi ngược: AGGAATGCGGTACAAGGAAT SEQ ID NO.2

Theo đó, cặp môi này sẽ nhận đoạn nhân gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 có kích thước 243 bp.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp môi theo giải pháp hữu ích có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4 sau:

Môi xuôi: CTCCGCTTAGCCTTATCCCC SEQ ID NO.3

Môi ngược: CCGTATGAAGGTCACGATCG SEQ ID NO.4

Theo đó, cặp môi này sẽ nhận đoạn nhân gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 có kích thước 268 nucleotit.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặp môi theo giải pháp hữu ích có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 sau:

Môi xuôi: GACTCGCGGATTTATCGACA SEQ ID NO.5

Môi ngược: ACTAGGAATGCGGTACAAGGA SEQ ID NO.6

Theo đó, cặp môi này sẽ nhận đoạn nhân gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 có kích thước 176 bp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Kiểm định mẫu sâm tươi

Để kiểm định mẫu, tiến hành lấy mẫu tươi được xác định là củ hoặc lát tươi của sâm Lai Châu, sâm Vũ Diệp, sâm Ngọc Linh, Tam thất hoang và sâm Hàn Quốc, trong

đó mỗi mẫu 200 mg. Đây là các loài thực vật có khả năng làm giả sâm Ngọc Linh ở dạng củ tươi hoặc dạng lát của củ tươi mà đã được xác định có thành phần hoạt chất saponin tổng số tương tự sâm Ngọc Linh có khả năng làm giả sâm Ngọc Linh.

Mỗi mẫu được cho vào ống eppendorf loại 2ml và nghiền 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:chloroform: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 (µl)
Dung dịch đệm (10X)	2,5
dNTP (2mM)	2,0
Mồi xuôi: SEQ ID NO.1 (10pmol)	1,0
Mồi ngược: SEQ ID NO.2 (10pmol)	1,0
Taq (500U)	0,5
ADN mẫu (20ng/ul)	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.

Kết quả điện di được thể hiện trên Hình 1, trong đó trong đó (1) sâm Lai Châu, (2) sâm Vũ Diệp, (3) sâm Ngọc Linh, (4) Tam thất hoang và (5) sâm Hàn Quốc, trong đó dải điện di của sâm Ngọc Linh có kích thước 243 bp còn 4 loài sâm còn lại có kích thước 223 bp có thể phân biệt được trên băng điện di.

Ví dụ 2: Kiểm định mẫu sâm dạng bột

Để kiểm định mẫu, tiến hành lấy 7 mẫu dạng bột đã được kiểm định về hàm lượng saponin, 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:chloroform: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 25 μ l 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
Mồi xuôi: SEQ ID NO.3 (10pmol)	1,0
Mồi ngược: SEQ ID NO.4 (10pmol)	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.

Kết quả điện di trên Hình 2 cho thấy, chỉ có một mẫu cho băng kích thước 268 pb tương ứng với mẫu sâm Ngọc Linh, các mẫu còn lại một mẫu có kích thước 232 bp, một mẫu có kích thước 250 bp, ba mẫu có hai băng kích thước 214 bp và 286 bp, một mẫu không cho kết quả. Để kiểm chứng, các mẫu được đưa giải trình tự và so với dữ liệu trên ngân hàng gen, kết quả cho thấy mẫu (1) là thực vật khác loài sâm, (2)-(4) là sâm Lai Châu, (5) sâm Hàn Quốc, (6) Tam thất hoang. Kết quả này cho thấy, hoàn toàn có khả năng kiểm định được sâm Ngọc Linh khi sử dụng đoạn mồi theo giải pháp hữu ích

Ví dụ 3: Kiểm định mẫu sâm dạng lát khô

Theo một ví dụ khác, tiến hành kiểm định 5 mẫu đã được xác định về hàm lượng saponin dạng sản phẩm thái lát, mỗi mẫu 200 mg.

Mỗi mẫu được cho vào ống eppendorf loại 2ml và nghiền bằng nitơ 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:chloroform: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 (µl)
Dung dịch đệm (10X)	2,5
dNTP (2mM)	2,0
Mồi xuôi: SEQ ID NO.5 (10pmol)	1,0
Mồi ngược: SEQ ID NO.6 (10pmol)	1,0
Taq (500U)	0,5
ADN mẫu (20ng/ul)	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.

Kết quả điện di trên Hình 3 cho thấy, các mẫu có các băng điện di rõ nét, tách biệt nhau, trong đó có một mẫu (mẫu số 2) có kích thước 176 bp, ba mẫu còn lại có kích thước 156bp. Điều này có thể kết luận được rằng, với mẫu số 2 là mẫu sâm Ngọc Linh và các mẫu còn lại không phải là sâm Ngọc Linh.

Để kiểm chứng, tiến hành giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen, kết quả cho thấy mẫu (1) là sâm Hàn Quốc, mẫu (3) là sâm Lai Châu, mẫu (4) là sâm Vũ Diệp và mẫu (5) là Tam thất hoang.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình kiểm định sâm Ngọc Linh trên cơ sở sinh học phân tử cho phép xác định được chính xác loài sâm Ngọc Linh 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 giúp chống nạo sâm Ngọc Linh giả.

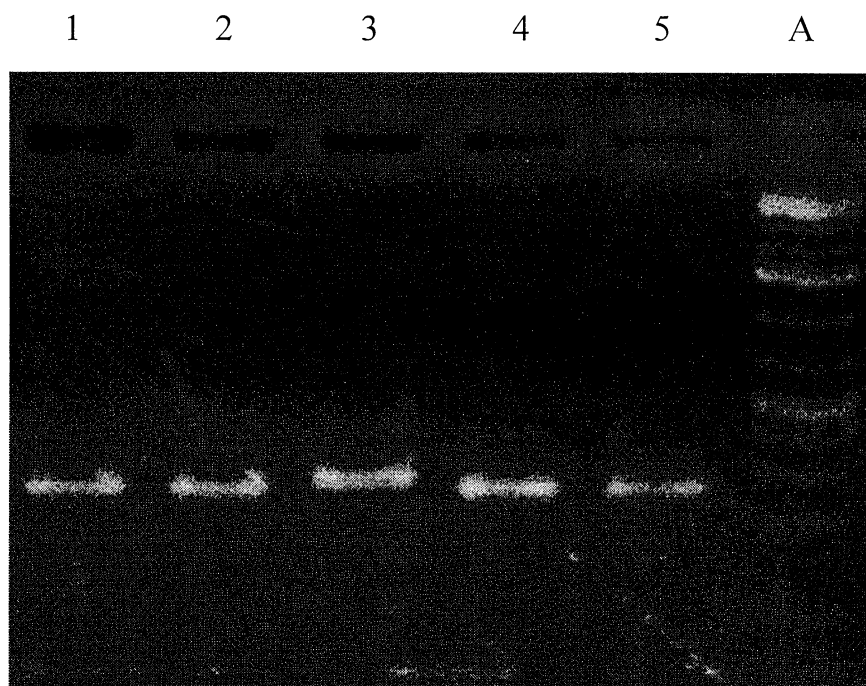
Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, quy trình cho phép phân biệt được sâm Ngọc Linh với các loài sâm giả sâm Ngọc Linh như sâm Lai Châu, sâm Vũ Diệp hoặc Tam thất hoang, để từ đó giúp quản lý, kiểm soát được nạn hàng giả sâm Ngọc Linh, giúp bảo vệ được vùng nguyên liệu, phát triển vùng nguyên liệu theo hướng bền vững.

Các đoạn mồi theo giải pháp hữu ích đặc hiệu với loài, cho phép dễ dàng phân biệt được sâm Ngọc Linh 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.

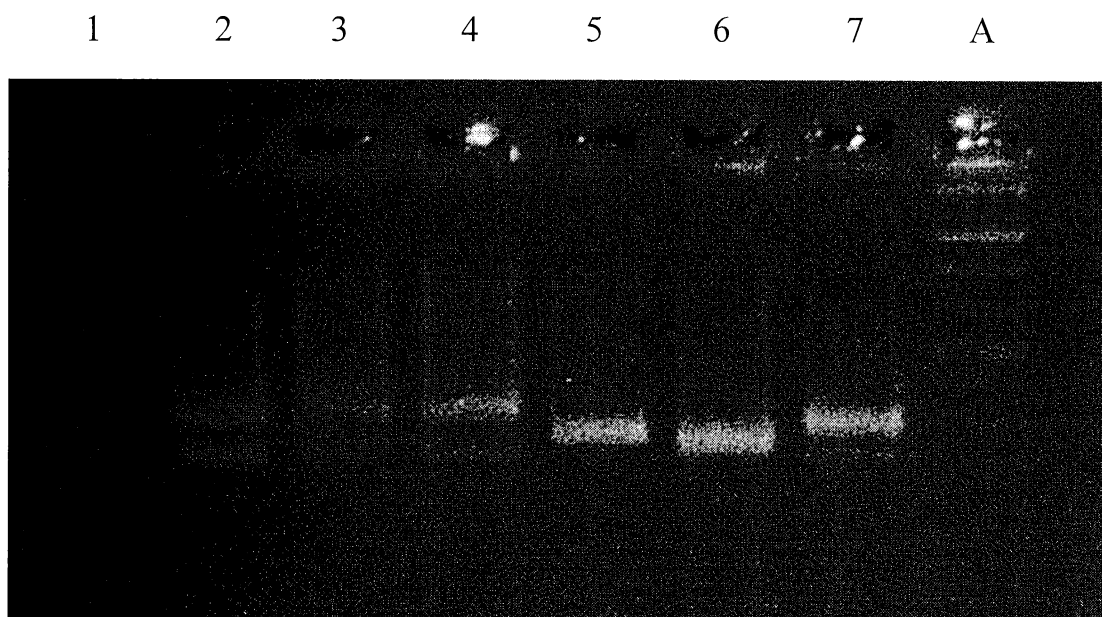
YÊU CẦU BẢO HỘ

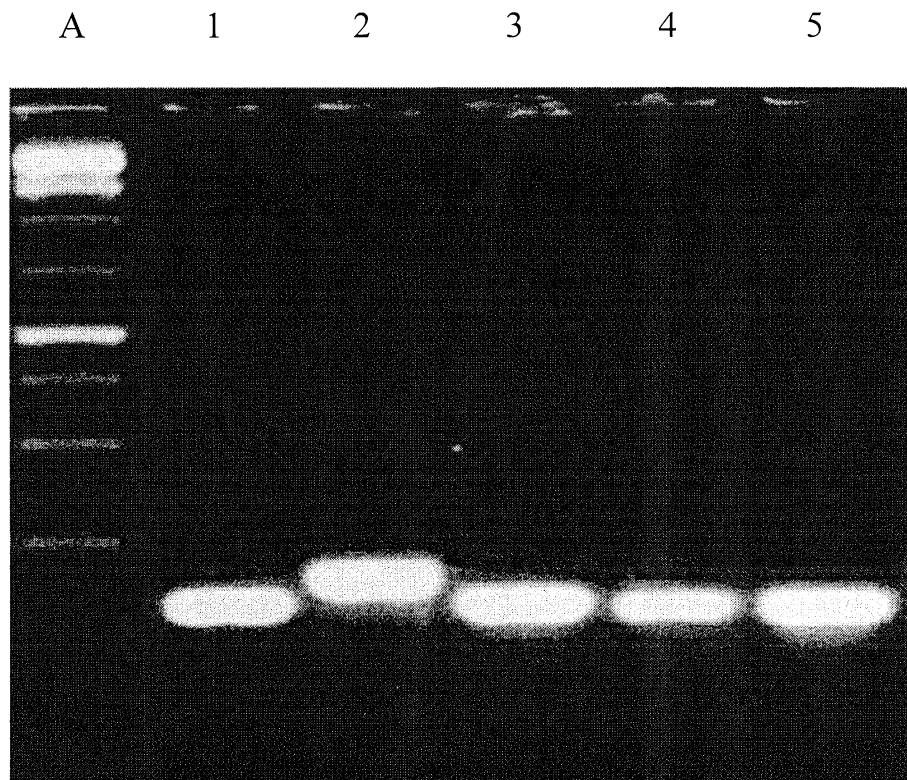
1. Quy trình kiểm định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) chiết ADN tổng số từ mẫu thực vật bằng cách nghiền mẫu trong nito lỏng, tiếp đến chiết bằng dung dịch đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromit), loại bỏ ARN bằng RNaza thu được ADN 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 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; và
 - c) xác định loài sâm Ngọc Linh 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 243 bp để đưa ra kết luận về loài sâm Ngọc Linh.
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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dùng trong quy trình theo điểm 1, trong đó cặp mỗi này có trình tự được nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 và đoạn gen lục lạp đặc hiệu của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) được kiểm định có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7.

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

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 Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) và cấp mỗi dùng để kiểm định sâm Ngọc Linh

<130>

<160> 9

<170>

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 1

TGGCACAAATCTTTTGGTTC

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 2

AGGAATGCGGTACAAGGAAT

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 3

CTCCGCTTAGCCTTATCCCC

<210> 4

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 4
 CCGTATGAAGGTCACGATCG

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 5
 GACTCGCGGATTTATCGACA

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 6
 ACTAGGAATGCGGTACAAGGA

<210> 7
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> *Panax vietnamensis* Ha et Grushv
 <220>
 <223> Gen lục lạp

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 7

TGGCACAAAT	CTTTTTGGTT	CTTAAAAAGA	AACAGTTCGA	GAAGGTTCAA	TTGTCCGAAA	60
TGAATTTCTA	GA CTCGCGGA	TTTATCGACA	TTGAGTTCAT	AACATAGACA	TTGAGTTCAT	120
AACATA)AAA	AGAAAAATGA	TTTTTGGTGA	TTATCTATGA	TAAAAAAATT	ACATTATGAA	180
AAGCCTTTTG	CTTATTTATA	CTATTTTTC	ACGAGATGTC	GGGAATTCCT	TGTACCGCAT	240
TCC						243

<210> 8
 <211> 268
 <212> ADN
 <213> *Panax vietnamensis* Ha et Grushv
 <220>
 <223> Gen lục lạp

<220>						
<222>						
<223>						
<400> 8						
CTCCGCTTAG	CCTTATCCCC	CTCTAGGGGT	ATTTTAGTGA	TAGGTTCTAT	AGGAACTGGA	60
CGATCCTATT	TGGTCAAATA	CCTAGCGACA	AACTCCTATG	TTCCTTTCAT	TACGGTATTT	120
CTGAACAAGT	TCCTGGATAA	CAAGCCTAAA	GGTTTTCTTA	TTGATGATAT	CGATATTGAT	180
GCTAGTGACG	ATATTGATGC	TAGTGACGAT	ATTGATGCTA	GTGACGATAT	TGATGCTAGT	240
GACGATATCG	ATCGTGACCT	TCATACGG				268

<210> 9
 <211> 176
 <212> ADN
 <213> *Panax vietnamensis* Ha et Grushv
 <220>
 <223> Gen lục lạp

<220>						
<222>						
<223>						
<400> 9						
GGACTCGCGG	ATTTATCGAC	ATTGAGTTCA	TAACATAGAC	ATTGAGTTCA	TAACATAAAA	60
AGAAAAATGA	TTTTTGGTGA	TTATCTATGA	TAAAAAAATT	ACATTATGAA	AAGCCTTTTG	120
CTTATTTATA	CTATTTTTC	ACGAGATGTC	GGGAATTCCT	TGTACCGCAT	TCCTAG	176