



(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)



2-0002375

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00303

(22) 14/08/2018

(45) 27/07/2020 388

(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); Nguyễn Phương Nhuệ (VN).

(54) **CHŨNG VI NẤM FUSARIUM SP. RSP5.2 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ
KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0194mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 533bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A là chất có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học liên quan đến các chủng vi nấm sống nội sinh trong cây dược liệu có khả năng sinh tổng hợp huperzin A. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại 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 giải pháp hữu ích

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) có khoảng 80% dân số thế giới từ các nước phát triển dựa chủ yếu vào các loại thuốc truyền thống (chủ yếu có nguồn gốc từ thực vật) để chăm sóc sức khỏe. Trong 119 loại hợp chất hóa học, ít nhất 90 loại có nguồn gốc từ thực vật, đây là các loại thuốc đang được sử dụng ngày càng nhiều ở nhiều quốc gia (theo Balick và cộng sự, 1996). Thạch tùng răng cưa là một loài thân thảo, thuộc họ Thạch tùng (Lycopodiaceae) thường bị sinh ở những cảnh cây, hốc cây hoặc bề mặt đá, đất mùn ở dưới tán rừng quanh năm ẩm ướt, độ mùn cao, ở độ cao trên 1000m so với mặt nước biển (vành đai á nhiệt đới). Thạch tùng răng cưa là cây thuốc quý hiếm, chúng được sử dụng ở Trung Quốc để điều trị các bệnh: sốt, lạnh, sung, tâm thần phân liệt, thấp khớp, trị viêm phổi, phế ung, lao thương thổ huyết, ngộ độc, v.v. từ hơn một ngàn năm nay. Ở phương Tây, chúng được sử dụng bổ sung trong chế độ ăn uống để tăng cường trí nhớ và tăng cường nhận thức cho hệ thống thần kinh trung ương. Hoạt chất chính của Thạch tùng răng cưa là huperzin A, đây là một loại alkaloid có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer ở người cao tuổi. 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 có độ phân bố rất hẹp, ở độ cao trên 1000m, cây sinh sản chủ yếu bằng bào tử, khối lượng cây xanh rất thấp, thời gian sinh trưởng dài, rất khó khăn khi đưa ra sản xuất lớn, chính vì vậy các nhà khoa học đã nghiên cứu nhằm tìm kiếm khả năng cung cấp nguyên liệu bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, tuy nhiên hiệu quả đem lại vẫn không được cao do điều kiện nuôi cấy khắt khe, thời gian nuôi cấy dài và khối lượng cây thu được ít. 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. Hoạt 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 8,32µg/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* 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 327,8µg/L; Yang và cộng sự (2011) cũng đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporoides* ES026 sản sinh 30µg huperzin A/g CDW. 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. Năm 2015, Su và Yang đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh được 21µg huperzin A/L.

Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa được phát hiện tại Sa Pa, Đà Lạt 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 bản địa quý hiếm về cây thuốc, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu và khai thác ứng dụng trong điều trị bệnh tại Việt Nam. Mặt khác, 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 là chưa có công bố.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại 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.

Theo giải pháp hữu ích, chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 533bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0194mg/L dịch lên men.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Fusarium* sp. Rsp5.2 trên môi trường PDA-I sau 3 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc tròn, mọc cân đối, viền liền, màu trắng và sợi bông.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty và bào tử của chủng *Fusarium* sp. Rsp5.2 chụp trên kính hiển vi (độ phóng đại 100 và 400 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; bào tử lớn hình elip xếp thành chuỗi, cụm ở đỉnh các nhánh hoặc giữa các sợi nấm.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng (TLC) của dịch chiết huperzin A của chủng *Fusarium* sp. Rsp5.2 (a) và của chất chỉ thị huperzin A (b).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện kết quả sắc kí đồ HPLC (UV 310nm), phổ UV, phổ LC-MSD của dịch chiết nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 533bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ rễ 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 rễ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi được thu thập từ Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam được rửa sạch bằng nước sạch rồi được khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian thích ứng từ 2-3 phút. Sau đó, mẫu được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Cuối cùng, các mẫu rễ cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2-1cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa peptri 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; 0,5g 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 3-5 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 3-5 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 (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1982; Bùi Xuân Đồng, 1984; Ainsworth và cộng sự, 1973). ADN hệ gen của các chủng nấm thu được được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal ADN Extraction Kit) và được 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 này 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 tiến hành 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; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 3 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, phát triển như nêu trên, tác giả giải pháp hữu ích đã thu được chủng vi nấm nội sinh thuộc chi nấm *Fusarium* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 533bp và có độ tương đồng ≤ 98%, độ dài đoạn so sánh ≤ 97% so với các chủng *Fusarium* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI. Kết quả chủng được định danh là chủng *Fusarium* sp. Rsp5.2.

Chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng 0,0194mg/L dịch lên men.

Chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích là chủng tự nhiên được phân lập từ rễ 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. Trên thế giới, hoạt chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp từ các loài thuộc một số chi vi nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata*, tuy nhiên, chi *Fusarium* chưa có công bố và đây cũng là một trong những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam của nhóm tác giả.

Chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích hiện 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 có bổ sung 15% glycerol trong điều kiện lạnh sâu -86°C và bào tử của chủng được giữ trong cát.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Mẫu rễ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi thu thập tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam được rửa sạch bằng nước sạch và khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 2-3 phút; sau đó, các mẫu được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu rễ cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2-1cm) và được đặt lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I 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 3-5 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 3-5 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng có ký hiệu là Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học có thời gian sinh trưởng 3 ngày nuôi cấy. Chủng Rsp5.2 thuần được nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng 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 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; Ainsworth và cộng sự, 1973 để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng Rsp5.2 đến chi.

Chủng Rsp5.2 thuần được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở nhiệt độ 28°C trong 3 ngày và được quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng Rsp5.2 trên môi trường PDA-I sau 3 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc tròn, mọc cân đối, viền liền, màu trắng và sợi bông. Chuẩn bị lam kính, lamén 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 lamén đẩy lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa peptri ở nhiệt độ 28°C trong

khoảng thời gian 3 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamén. Đặt lam kính và lamén lên soi dưới kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử và vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty và bào tử của chủng Rsp5.2 được thể hiện trên hình 2. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; bào tử lớn hình elip xếp thành chuỗi, cụm ở đỉnh các nhánh hoặc giữa các sợi nấm.

Kết quả nhận dạng được chủng Rsp5.2 thuộc chi *Fusarium*.

Tách chiết ADN của chủng Rsp5.2 bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Sau đó khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng 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 của 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 550bp.

Trình tự gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Rsp5.2 được xác định trên máy đọc 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 gen NCBI (bảng 1).

Bảng 1 - Mức độ tương đồng đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm Rsp5.2 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		
Rsp 5.2	<i>Fusarium sp.</i> 2 DoF9	JQ388254.1	97	98
	<i>Fusarium sp.</i> 2 DoF7	JQ388252.1	96	98
	<i>Fusarium sp.</i> WF110	HQ130669.1	96	97
	<i>Fusarium sp.</i> TA-60	FJ449951.1	96	96

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng Rsp5.2 có kích thước 533bp. Đoạn gen này có mức đồng nhất trình tự $\leq 98\%$ và độ dài đoạn so sánh $\leq 97\%$ so với các chủng *Fusarium* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Fusarium sp.* 2 DoF9, *Fusarium sp.* 2 DoF7, *Fusarium sp.* WF110 và

Fusarium sp. TA-60. Kết quả so sánh này không thể khẳng định chính xác được đến loài của chủng Rsp5.2, chỉ có thể khẳng định chúng thuộc các chi với các loài có mức độ tương đồng cao với chủng. Kết quả xác định chủng Rsp5.2 thuộc chi *Fusarium* trùng với kết quả phân loại truyền thống ở trên.

Chủng được nuôi trong 1 lít môi trường PDB-I ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 3 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 trong nitơ lỏng đến khi thành bột mịn. Chiết huperzin A toàn phần từ bột nấm khô theo phương pháp: (1) bổ sung một lượng ammoni 10% với tỉ lệ 1ml/1g 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 là 10 bằng NaOH 10%/NH₄OH 25%; (5) chiết 3 lần với cloroform (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, sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm vào bình dung môi có thành phần cloroform:isopropanol:etyl axetat:amoni (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1) và đẩy nắp bình, theo dõi 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 KMnO₄ 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 Rsp5.2 cho kết quả dương tính với huperzin A.

Xác định hàm lượng huperzin A có mặt trong dịch chiết chủng Rsp5.2 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer). 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 Rt 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 [M+H⁺]. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích pic UV 310nm tại thời gian lưu Rt 10,3 – 10,7 phút. Kết quả cho thấy pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng Rsp5.2 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 10,895 phút tương đương với thời gian lưu Rt, 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 Rsp5.2 có hàm lượng 0,0194mg/L dịch lên men.

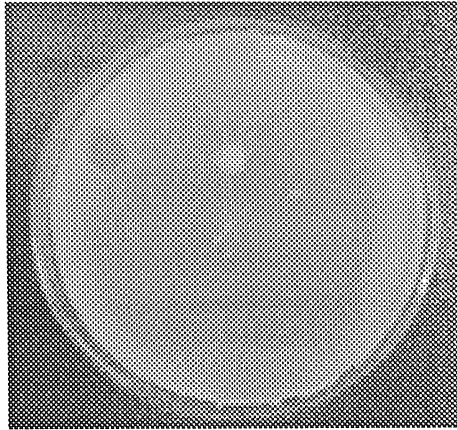
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 là chủng được phân lập từ cây dược liệu phân bố 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 - một căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở người cao tuổi sau bệnh tim và ung thư.

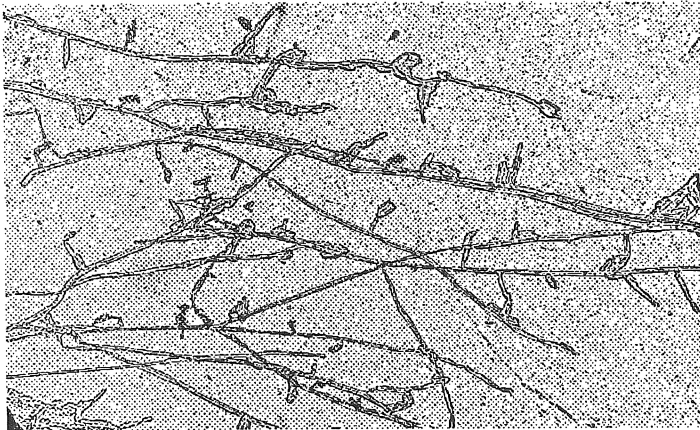
Hiện nay trên thế giới, các công bố về việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) chủ yếu thuộc các chi *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Chưa có công bố chủng sinh tổng hợp huperzin A thuộc chi *Fusarium*. Ở Việt Nam hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu nào về vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa. Chủng *Fusarium* sp. Rsp 5.2 là một trong 5 chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A.

YÊU CẦU BẢO HỘ

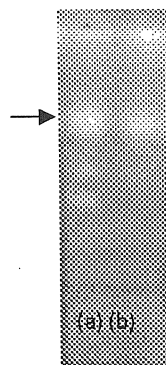
1. Chủng vi nấm *Fusarium* sp. Rsp5.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0194mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 533bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



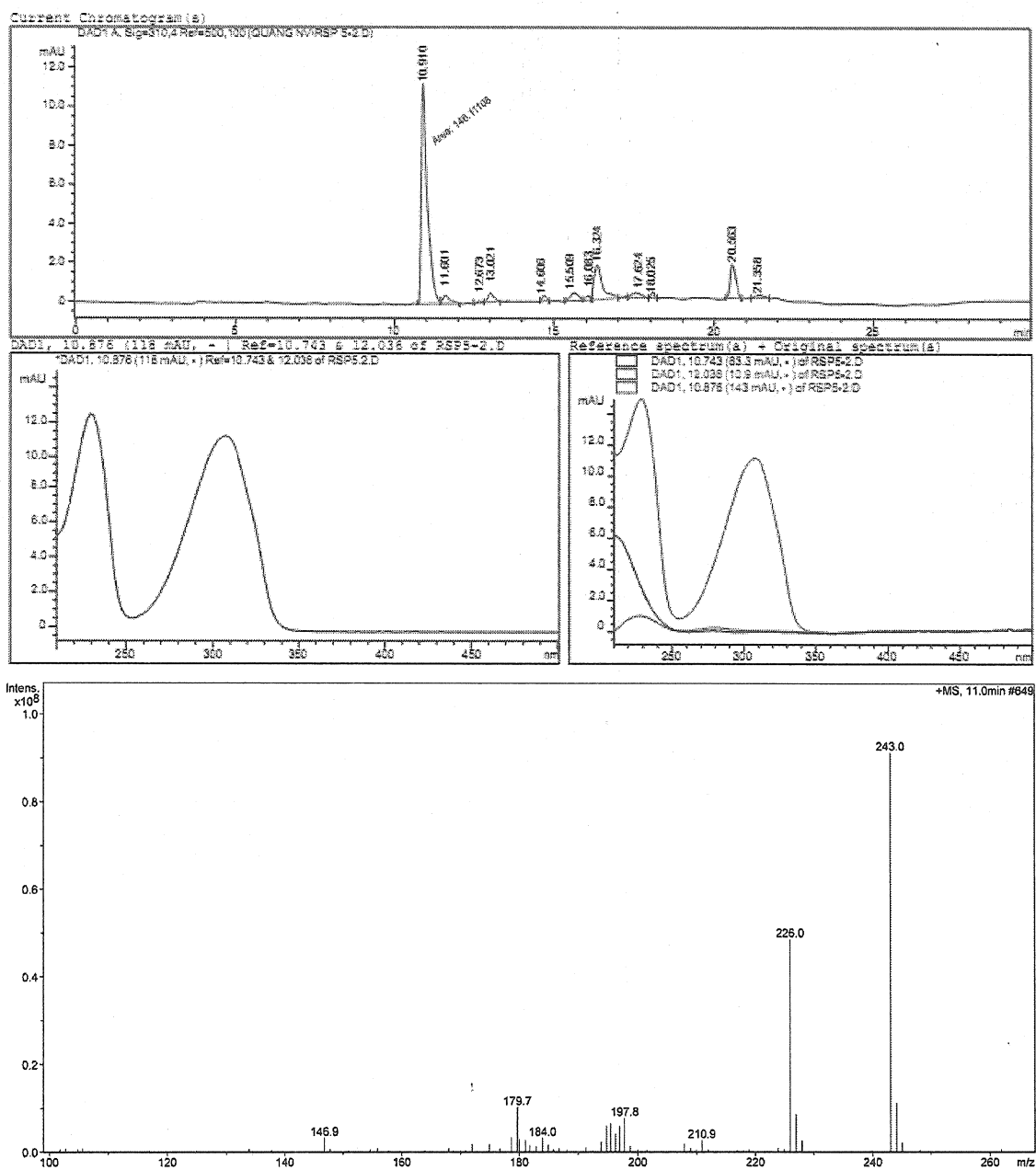
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> **CHŨNG VI NẤM *FUSARIUM* SP. RSP5.2 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A**

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 533

<212> ADN

<213> *Fusarium* sp. Rsp5.2

<400>

gctttggggg ggtgcctctc ccaaaccctt gtgcacatac cttaatgttg cctcggcgga	60
tcagcccgcg ccagtaaaa cgggacggcc cgccagagga tccaaactct tgctgttatt	120
gtaacttctg agtaaaacaa acaaataaat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc	180
tggcatcgat gaagaacgca gcaaaatgcg ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga	240
atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc cgccagtatt ctggcgggca tgctgttcg	300
agcgtcattt caaccctcaa gccccgggt ttggtgttgg ggatcggcga gtcttaggac	360
cagccgccc ctaaatctag tggcggcttc actgcagcct ccattgcgta gtagctaaca	420
cctcgcaact ggaacgcggt gcggccatgc cgttaaacc ccaacttctg aatgttgacc	480
tcggatcagg taggaatacc cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaa	533