



(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)



2-0002376

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00302

(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); Chu Hoàng Hà (VN).

(54) **CHŨNG VI NẤM *PENICILLIUM RETICULISPORUM* TSP41 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 *Penicillium reticulisporum* Tsp41 phân lập từ thân 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 0,0341mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 543bp 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

Giải pháp hữu ích 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 dược liệu có khả năng sinh tổng hợp huperzin A. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân 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

Trên thế giới hiện nay đang có xu hướng dần chuyển sang sử dụng các cây thuốc và thuốc có nguồn gốc từ thiên nhiên hơn là hóa chất tạo ra thuốc. 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). Trong chương trình nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc thì cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) hiện nay được biết nhiều ở Trung Quốc dưới tên là Qian Ceng Ta trong các bài thuốc dùng để chữa các bệnh bầm máu, rách cơ, sốt và tâm thần phân liệt. *Huperzia serrata* là một loài thân thảo, thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae) thường bì sinh ở những cành 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). *Huperzia serrata* 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, v.v. từ hơn một ngàn năm nay; Ở Mỹ và châu Âu, 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. Hoạt chất này được các nhà khoa học Trung Quốc chiết xuất lần đầu tiên vào năm 1948 và các thí nghiệm lâm sàng cũng như các ứng dụng điều trị đều đã được tiến hành ở quốc gia này. Sau khi các công trình nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc được chính thức công bố, các nhà nghiên cứu khoa học tại các nước phương Tây đã kết luận rằng các chất này có tác dụng trong việc chữa trị các bệnh về suy giảm trí nhớ, trong đó có bệnh Alzheimer của người già. Huperzin A có khả năng tác động trực tiếp lên não bộ với liều lượng thấp, chỉ tính bằng microgram nhờ khả năng xuyên qua hàng rào mạch máu não. Sau khi xâm nhập vào não, huperzin A ức chế việc sản sinh ra axetylcholinesteraza - enzyme tạo ra sự suy thoái của axetylcholin. Khi enzyme này bị

thiếu hụt, hoặc chỉ 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. 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, phải mất rất nhiều năm (có khi lên đến 15 năm) phát triển trong tự nhiên mới có thể để sử dụng làm thuốc, mặt khác cây thuộc họ thân thảo bé và thấp nên khối lượng cây thu được là rất ít. Chính 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 sự nỗ lực để thực hiện việc sản xuất huperzin A như nuôi cấy *in vitro* cây *Huperzia serrata* và tổng hợp hóa học. Phương pháp nuôi cấy *in vitro* không đem lại hiệu quả cao do điều kiện nuôi cấy khắc khe, thời gian nuôi cấy dài (hàng năm) và khối lượng cây thu được ít.

Nấm nội sinh trong thực vật thường sinh trưởng, phát triển nội sinh hoàn toàn hoặc một phần trong mô của các tế bào cây chủ, thường không gây triệu chứng rõ ràng của bệnh. Một số nấm endophytic kích thích tăng trưởng thực vật và sản xuất các chất có hoạt tính sinh học với các chức năng hoạt động chuyển hóa. Một số nấm nội sinh đã được tìm thấy như là nguồn tiềm năng của thuốc điều trị bệnh. Gần đây, nấm nội sinh được phân lập từ các loại cây trồng đã được chấp nhận như là một nguồn nguyên liệu quan trọng của ngành công nghiệp dược. 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. Việc nghiên cứu vi nấm nội sinh cây Thạch tùng rừng thưa sản sinh huperzin A sẽ mang đến hiệu quả to lớn trong việc thu nhận hoạt chất huperzin A, tiết kiệm thời gian và chi phí hơn phương pháp chiết xuất từ cây. Hiện nay trên thế giới, các nhà khoa học Trung Quốc - nơi đang sản xuất nhiều huperzin A làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược điều chế thuốc hỗ trợ chữa trị bệnh Alzheimer nhất - đã tiến hành nghiên cứu và phân lập được một số chủng nấm nội sinh có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A, các chủng này đã và đang được nghiên cứu các điều kiện lên men để có thể tách chiết một lượng lớn huperzin A phục vụ cho ngành công nghiệp dược trong hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer. Theo đó hoạt chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* thuộc các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Shi và cộng sự (2005) đã phân lập được 4 chủng: *Cephalosporium* sp., *Plasmopara* sp., *Saccharomyces* sp. và *Penicillium reticulisporum* nội sinh trong cây *Huperzia Serrata* trồng tại tỉnh An Huy; Huang và cộng sự (2009) đã phân lập được 4 chủng trong cây *Huperzia serrata* trồng tại tỉnh Hồ Nam (*Cladosporium* sp., *Penicillium*

sp., *Fusarium* sp., và *Coniothyrium* sp.); Chen và cộng sự (2011a,b) đã phân lập được 52 chủng nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* trồng ở tỉnh Hải Nam và 53 chủng trong cây trồng ở tỉnh Quảng Tây, các chủng này thuộc 26 chi (*Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Cyphellophora*, v.v.). Trong đó, 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 8,32 μ g/L; Wang và cộng sự (2011) đã phân lập được 127 chủng nấm, trong đó 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 và chủng *Shiraia* sp. Slf14 cho sản lượng huperzin A cao nhất là 327,8 μ g/L; Yang và cộng sự (2011) cũng đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporoides* ES026 sản sinh 30 μ g huperzin A/g CDW; Hu Weixin và cộng sự đã phân lập và nghiên cứu nâng cao sản lượng của chủng *C. gloeosporioides* YLJ-13 có khả năng sản sinh huperzin A lên tới 199,6mg/L rất có triển vọng cho sản xuất huperzin A quy mô lớn. Gần đây (2015), Su và Yang đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh được 21 μ g huperzin A/L.

Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa được phát hiện tại Sa Pa, 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 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. 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 cập đến chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân 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.

Chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 543bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0341mg/L dịch lên men.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 trên môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc màu xanh xen trắng, mọc không cân đối.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty và bào tử của chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 và 400 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; cuống bào tử phân nhánh với các thể bình, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng (TLC) của chất chỉ thị huperzin A (a) và dịch chiết huperzin A chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 (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 *Penicillium reticulisporum* Tsp41 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 *Penicillium reticulisporum* TSP41 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân 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.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân 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 cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) được thu từ Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam trước tiên được rửa sạch bằng nước, khử trùng lần lượt bằng ethanol 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 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; 0,5 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 3-5 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Cây 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.

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). 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 xác định 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 glucose; 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 5 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).

Kết quả của việc thực hiện phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả giải pháp hữu ích đã thu được chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 543bp và có độ tương đồng bằng 99% so với trình tự đoạn tương ứng của gen ITS1-5,8S-ITS2 từ chủng *Penicillium reticulisporum* NRRL 3447 có mã số NR 121231.1 trên ngân hàng gen và được định danh là chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41.

Chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng 0,0341mg/L dịch lên men.

Chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích 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 thuộc loài chưa có công bố trên thế giới.

Chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 theo giải pháp hữu ích 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 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 thân cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam được rửa sạch và được khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút rồi được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu cây được cắt thành từng phần nhỏ (0,2-1cm), đặt các phần nhỏ 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. Cây chuyển các sợi nấm của các loài nấm khác nhau 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 cây chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng Tsp41 có thời gian sinh trưởng 5-7 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng Tsp41 thuần khiết trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch (5 ngày), 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 Lâm Dũng và cộng sự (1982); Bùi Xuân Đồng (1984) và Ainsworth và cộng sự (1973) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng Tsp41 đến chi.

Chủng Tsp41 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C trong 5 ngày, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng trên môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch được thể hiện ở hình 1. Khuẩn lạc màu xanh xen trắng và mọc không cân đối. 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 dẩy lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa peptri ở 28°C trong khoảng thời gian 5-7 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 của chủng Tsp41 được thể hiện trên hình 2. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; cuống bào tử phân nhánh với các thể bình, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu.

Nhận dạng sơ bộ chủng vi nấm qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại. Kết quả nhận dạng được chủng Tsp41 thuộc chi nấm *Penicillium*.

ADN của chủng Tsp41 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp20 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 (50 μ l) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25 μ l hỗn hợp chuẩn, 0,5 μ mol/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 Tsp41 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). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp41 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Bảng 1- Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm Tsp41 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 41	<i>Penicillium reticulisporum</i> NRRL 3447	NR 121231.1	100	99
	<i>Penicillium pedernalense</i>	NR 146250.1	100	98

	<i>Penicillium pulvillorum</i> CBS 280.39	NR 138292.1	96	99
	<i>Penicillium canariense</i> NRRL 710	NR 121277.1	100	97
	<i>Penicillium ochrochloron</i> CBS 357.48	NR 111509.1	96	98

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng Tsp41 có kích thước 543bp. Trình tự đoạn gen này có mức đồng nhất trình tự bằng 99% so với trình tự đoạn tương ứng của gen ITS1-5,8S-ITS2 từ chủng *Penicillium reticulisporum* NRRL 3447 có mã số NR 121231.1 trên ngân hàng gen với độ dài đoạn so sánh là 100% và được định danh là chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41.

Chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 được nuôi lắc trong 1 lít môi trường PDB-I ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 5 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi ở nhiệt độ 45-60°C, nghiền thành bột mịn bằng nitor lỏng.

Chiết huperzin A từ bột nấm khô theo các bước như sau: (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 thời gian 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), 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 Tsp41 cho kết quả dương tính với huperzin A.

Xác định hàm lượng huperzin A có mặt trong dịch chiết chủng Tsp41 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 superzin 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 Tsp41 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 10,885 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 Tsp41 có hàm lượng 0,0341mg huperzin A/L dịch lên men

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

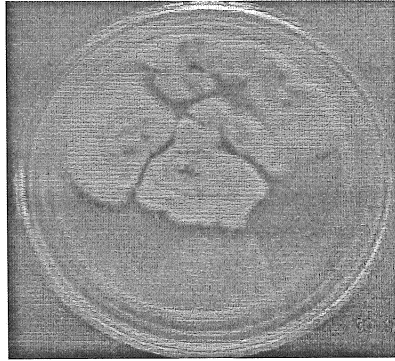
Chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 là chủng được phân lập từ cây thuốc tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer - đây là căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở người cao tuổi sau bệnh tim và ung thư.

Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa ở Việt Nam. Chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập từ thân cây Thạch tùng răng cưa phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A đạt 0,0341mg/L dịch lên men. Chủng này thuộc loài chưa được công bố trên thế giới.

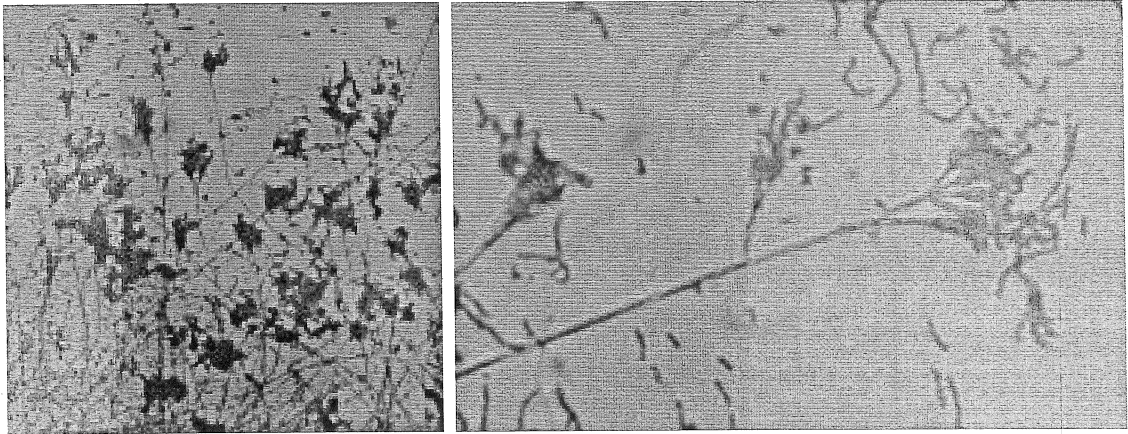
Chủng *Penicillium reticulisporum* Tsp41 sẽ được tiếp tục các nghiên cứu để nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp huperzin A nhằm làm chủng giống gốc có thể ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất huperzin A cao, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh 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, xã hội.

YÊU CẦU BẢO HỘ

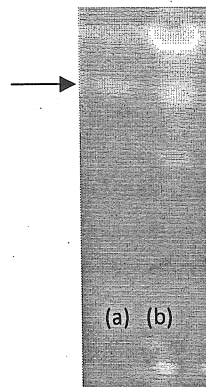
1. Chủng vi nấm *Penicillium reticulisporum* Tsp41 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0341mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 543bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



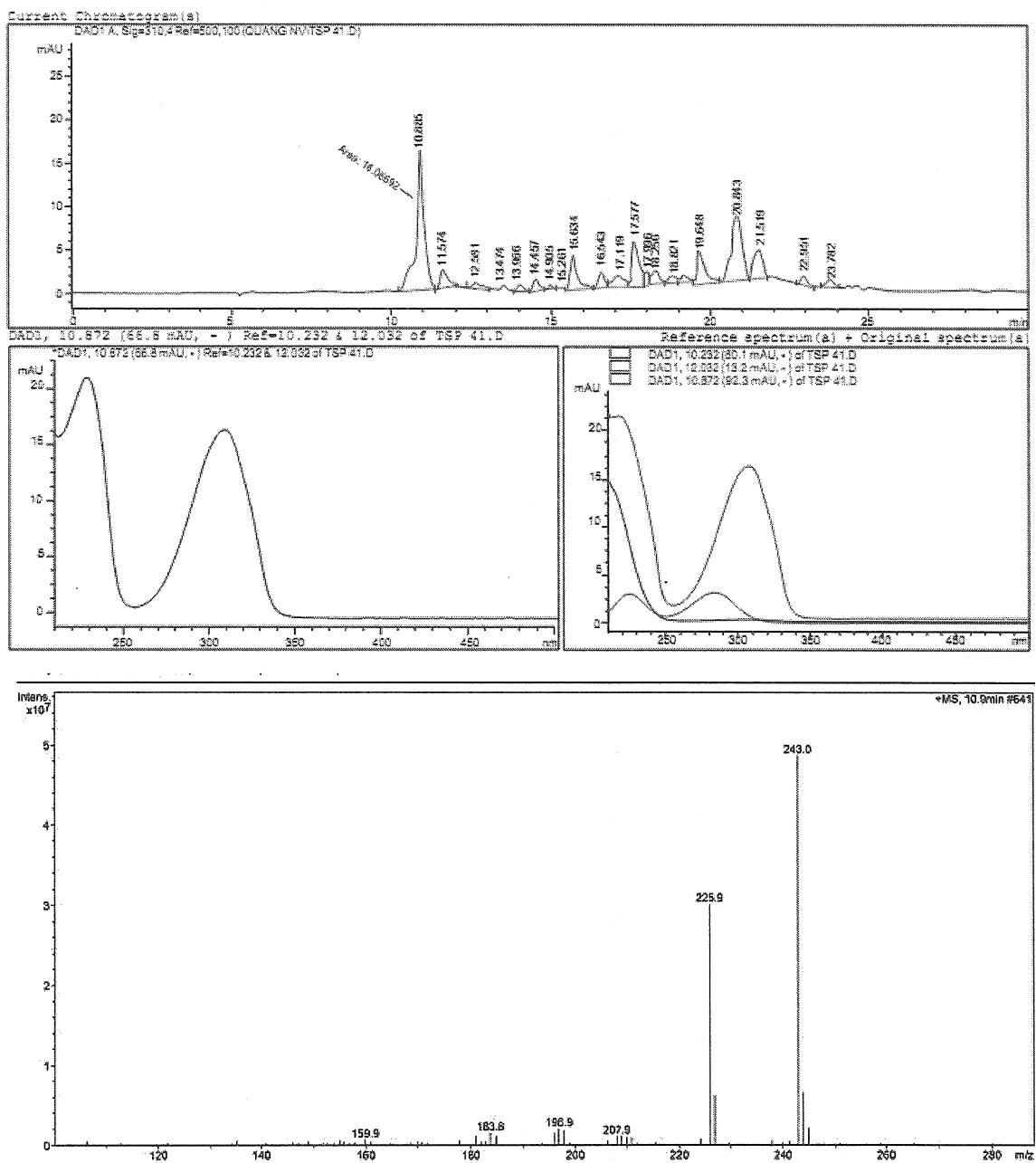
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI NẤM *PENICILLIUM RETICULISPORUM* TSP41 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 531

<212> ADN

<213> *Penicillium reticulisporum* Tsp41

<400>

cctctgggtc aacctccac ccgtgtttat cgtaccttgt tgcttcggcg ggcccgcctc	60
acggccgccc gggggcatcc gccccgggc ccgcgcccgc cgaagacacc attgaactct	120
gtctgaagat tgcagtctga gcgattagct aaatcagtta aaactttcaa caacggatct	180
cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcatg acgtaatgtg aattgcagaa	240
ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggtattcc ggggggcatg	300
cctgtccgag cgtcattgct gccctcaagc acggcttggtg tgttggggcc cgcccccg	360
ttccgggggg cgggcccgaaggcagcggc ggcaccgcgt ccggtcctcg agcgtatggg	420
gctttgtcac ccgctctgta ggcccggccg gcgcccgcg gcgaccccaa atcaatctat	480
ccagggtgac ctcggatcag gtagggatac ccgctgaact taagcatatc aataagcgga	540
gga	543