



(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)



2-0002377

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00301

(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); Đồng Văn Quyền (VN).

(54) **CHŨNG VI NẤM XYLARIA SP. TSP20 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 *Xylaria* sp. Tsp20 phân lập từ thân cây Thạch tùng răng cưa (*H. 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 0,0373mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS 1-5,8S-ITS2 có độ dài 560bp 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 là đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Xylaria* sp. Tsp20 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

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) là loài cây rất hiếm, thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc. Nó được xem như một loại thần dược ở các nước phương Tây và được ứng dụng trong nhiều loại thực phẩm chức năng bán rộng rãi trên thị trường. Loài cây dược liệu này được biết nhiều ở Trung Quốc dưới tên là Qian Ceng Ta, trong các bài thuốc chữa các bệnh bầm máu, rách cơ, sốt và tâm thần phân liệt. Ở Việt Nam hiện nay chỉ mới phát hiện được Thạch tùng răng cưa ở Sapa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng). Chúng chỉ mọc ở núi cao trên 1000m và thường mọc dưới tán rừng quanh năm ẩm ướt, nhiều mùn, thân cao 10-40cm, thân đơn hay lưỡng phân từ 1 đến 2 lần, hình trụ. Lá có hình bầu dục, đầu lá nhọn, chiều dài khoảng 1,5cm, rộng 0,3cm, phiến lá khá mỏng, nổi rõ gân ở giữa, mép lá có hình răng cưa, ở nách lá có túi bào tử màu vàng tươi, hình thận.

Hiện nay, bệnh Alzheimer là một bệnh thần kinh thoái hóa tác động đến trí nhớ, suy nghĩ và hành vi của con người. Alzheimer ảnh hưởng đến hơn 20 triệu người trên toàn thế giới bao gồm cả 4,5 triệu người Mỹ và được coi là nguyên nhân lớn thứ ba gây tử vong ở các nước phát triển sau bệnh tim mạch và ung thư (Wimo và cộng sự, 2007). Hiện tại không có phương thức chữa trị cho Alzheimer. Thạch tùng răng cưa đã được sử dụng trong nhiều loại thực phẩm chức năng có tác dụng hỗ trợ điều trị và ngăn ngừa bệnh Alzheimer phát triển, giúp người già duy trì được trí nhớ hiện tại, có một cuộc sống vui vẻ cùng gia đình. Tỷ lệ người già của các nước phát triển trên thế giới chiếm tỷ lệ đáng kể, tỷ lệ người mắc Alzheimer ngày càng tăng và vấn đề được đặt ra là phải có những biện pháp giúp đỡ họ có cuộc sống hài hòa. Năm 2007, nước Pháp coi đây là một trong những chiến lược của ngành y tế quốc gia. Ở Việt Nam hiện nay, tỷ lệ người lớn tuổi ngày càng gia tăng và các bệnh rối loạn về trí nhớ cũng phát triển,

dẫn đến nhu cầu về chữa bệnh cũng tăng lên. Trong khi bệnh Alzheimer cùng với các bệnh mất trí nhớ vẫn chưa có một phương pháp nào có thể điều trị, các chuyên gia y tế cũng chỉ có thể đưa ra những biện pháp để ngăn chặn tình trạng bệnh phát triển nhanh hơn.

Hoạt chất chính của Thạch tùng răng cưa là một loại alkaloid có tên 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. Alkaloid 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 axetylcholinesterase - enzym tạo ra sự suy thoái của axetylcholin. Khi enzym 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.

Hiện nay, Thạch tùng răng cưa xếp vào nhóm cây đang bị đe dọa tuyệt chủng do giá trị sử dụng của nó. Bên cạnh đó, loài Thạch tùng răng cưa có độ phân bố rất hẹp, trên 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. Chính vậy, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* và một số cây Họ Thạch sam có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A đã được các nhà khoa học quan tâm nhằm thay thế, tăng cường lượng huperzin A cho ngành công nghiệp dược. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan được công bố, đặc biệt là ở Trung Quốc – nơi có cây *Huperzia serrata* phân bố nhiều. Hợp chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Với phương pháp phân loại bằng đặc điểm hình thái và bằng phân tích trình tự ITS – rADN, 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) – sau khi khử trùng mẫu rễ, thân, lá cây *Huperzia serrata* bằng etanol và natri hypoclorit, các mẫu cây được đặt nuôi trên môi trường PDA có bổ sung streptomycin sunfat - 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 8,32µg/L; Wang và cộng sự (2011) đã phân lập được 127 chủng nấm, trong đó bằng nhận dạng hình thái và phân tích trình tự ITS đã định dạng được 69 chủng thuộc 19 chi nấm *Aspergillus*, *Podospora*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botrytis*, v.v. và bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng (TLC), sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC) 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 327,8µg/L. Trình tự hệ gen của chủng *Shiraia* sp. Slf14 đã được Zhang và cộng sự công bố vào năm 2014. Cũng bằng kỹ thuật TLC và HPLC, Yang và cộng sự (2011) cũng đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 có khả năng sản sinh 30µg 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. 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. Gần đây (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, gần đây, Bộ Khoa học và Công nghệ giao cho Viện Công nghệ sinh học chủ trì đề tài cấp Nhà nước “Khai thác và phát triển nguồn gen loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb. Trev.) tại Sapa và Đà Lạt” (2014-2017) nhằm bảo tồn, khai thác phát triển *Ex situ* cây *Huperzia serrata* trong các vùng có điều kiện sinh thái thuận lợi để bước đầu hướng tới có thể làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A hỗ trợ chữa trị bệnh suy giảm trí nhớ. Hiện tại, đề tài đã thực hiện được 02 khu vườn trồng bảo tồn *Huperzia serrata* tại Langbiang (Đà Lạt), Vườn Quốc gia Hoàng Liên (Sa Pa) và đang thực hiện bảo tồn *in vitro* trong phòng thí nghiệm. Trước đây đã có nhiều đề tài nghiên cứu về vi nấm nội sinh trong thực vật; 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 *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thạch tùng răng cưa 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 *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 560bp và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0373mg /L dịch lên men.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Xylaria* sp. Tsp20 trên môi trường PDA-I sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch (1) và trong ống thạch nghiêng (2) sau 10 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc tròn, viền đều, màu trắng; sau 10 ngày mọc thể quả màu đen xen trắng.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty của chủng *Xylaria* sp. Tsp20 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không sinh bào tử.

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 của chủng *Xylaria* sp. Tsp20 (b).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sắc kí đồ HPLC (UV 310nm), phổ UV, phổ LC-MSD của dịch chiết nấm *Xylaria* sp. Tsp20 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 *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại vùng Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 560bp được nêu trong SEQ ID NO:1.

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 cây được rửa sạch với nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút. Sau đó, các mẫu cây 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 petri chứa môi trường PDA-I (Môi trường PDA-I cải tiến có

thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO_3 ; 0,5g MgSO_4 ; 1g KH_2PO_4 ; 0,5g K_2HPO_4 ; 0,5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3g KCl ; 0,3g NaCl , 16g agar và 1 lít nước cất) với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7-10 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm nội sinh trong cây. Cấy chuyển các sợi nấm của 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 7-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần.

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

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được nuôi cấy và xác định khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A. Chủng nấm 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 NaNO_3 ; 0,5g MgSO_4 ; 1g KH_2PO_4 ; 0,5g K_2HPO_4 ; 0,5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3g KCl ; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C , tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 7 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối tươi được sấy ở $45-60^\circ\text{C}$ và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả giải pháp hữu ích đã thu được chủng vi nấm thuộc chi *Xylaria* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 560bp và có độ tương đồng có độ tương $\leq 99\%$ và độ dài đoạn so sánh $\leq 82\%$ so với các chủng thuộc chi *Xylaria* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Xylaria* sp. Tsp20.

Chủng vi nấm *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng 0,0373mg/L dịch lên men. Chủng *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là chủng được phân lập từ thân 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 rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Trên thế giới hợp chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* thuộc chi *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Chi *Xylaria* chưa có công bố và đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam.

Chủng *Xylaria* sp. Tsp20 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 -20°C và -86°C.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Mẫu thân cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi 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 7-10 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 7-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học có thời gian sinh trưởng 7-10 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng Tsp20 thuần trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch (7-10 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 và vi hình thái của chủng như 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 Tsp20 đến chi.

Chủng Tsp20 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C trong 7-10 ngày, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái

khuẩn lạc của chủng Tsp20 trên môi trường PDA-I sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch và trong ống thạch nghiêng sau 10 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc tròn, viền đều, màu trắng; sau 10 ngày mọc thể quả màu đen xen trắng. Chuẩn bị lam kính, lamen và các đĩa peptri đã được khử trùng. Dùng que cấy lấy một miếng thạch có sợi nấm phát triển kích thước khoảng 0,5 x 0,5 cm đặt lên lam kính rồi lấy lamen đặt lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa peptri ở 28°C trong khoảng thời gian 7-10 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamen. Đặt lam kính và lamen lên soi dưới kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty của chủng Tsp20 được thể hiện trên hình 2. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không sinh bào tử. 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 Tsp20 thuộc chi *Xylaria*.

ADN của chủng Tsp20 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 (50µl) bao gồm 100 ng ADN hệ gen, 25 µl hỗn hợp chuẩn, 0,5 µmol/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 Tsp20 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 gen NCBI (bảng 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng Tsp20 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng Tsp20 có kích thước 560bp. Trình tự đoạn gen này có mức đồng nhất trình tự $\leq 99\%$ và độ dài đoạn so sánh $\leq 82\%$ so với các chủng *Xylaria* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI, kết quả so sánh này chưa xác định được đến loài của chủng, chỉ có thể khẳng định chủng Tsp20 thuộc chi *Xylaria* so với các chủng có mức độ

tương đồng cao như *Xylaria* sp. XF1, *Xylaria* sp. ZJ12-6B, *Xylaria* sp. 3 UFMGCB 5027, v.v..

Chủng *Xylaria* sp. Tsp20 được nuôi lắc trong 1 lít môi trường PDB-I ở 180 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 7 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi thu được ở nhiệt độ 45-60°C, nghiền thành bột mịn bằng nitor lỏng.

Bảng 1- Mức độ tương đồng đoạn gen vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm Tsp20 khi so sánh 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 20	<i>Xylaria</i> sp. XF15	HQ43567.1	82	99
	<i>Xylaria</i> sp. ZJ12-6B	FJ48792.1	82	99
	<i>Xylaria</i> sp. 3 UFMGCB 5027	JN19722.1	79	99
	<i>Xylaria</i> sp. 3 WL-2011	JN198509.1	79	99
	<i>Xylaria venosula</i>	AB462754.1	82	98

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 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), đậy 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; (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 Tsp20 cho kết quả dương tính với huperzin A. Kết quả sắc ký bản mỏng được thể hiện trên hình 3.

Xác định hàm lượng huperzin A có mặt trong dịch chiết chủng Tsp20 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 UV310nm tại thời gian lưu Rt 10,3 – 10,7 phút. Kết quả cho thấy pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng Tsp20 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 10,91 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 dịch chiết của chủng Tsp20 có hàm lượng 0,0373mg/L dịch lên men.

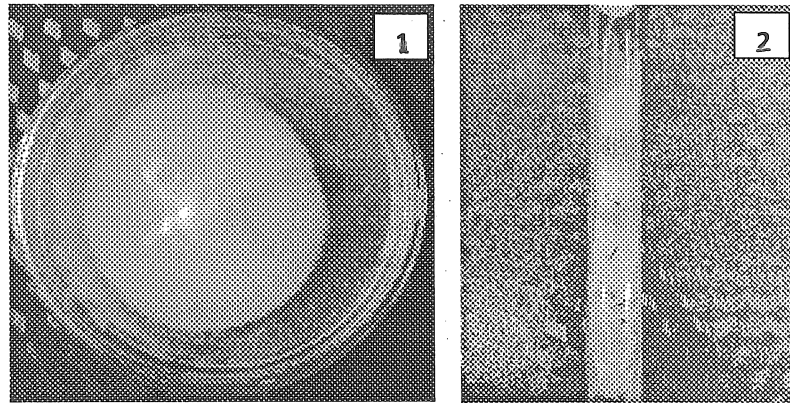
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm *Xylaria* sp. Tsp20 là chủng thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ cây dược liệu tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer – chứng bệnh gây sa sút trí tuệ ở người cao tuổi.

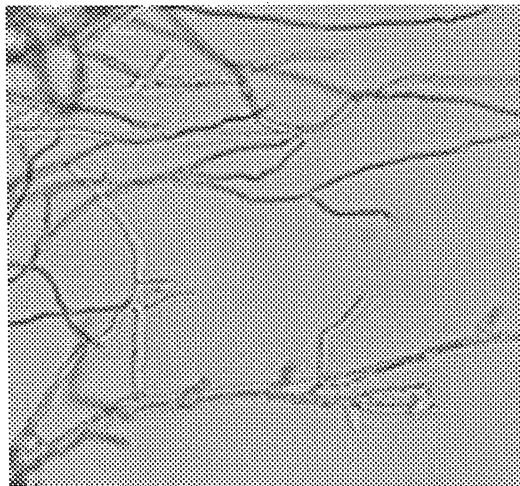
Cho đến nay, chưa có công bố chủng sinh tổng hợp huperzin A thuộc chi *Xylaria*. Ở Việt Nam hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu nào về vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa. Chủng *Xylaria* sp. Tsp20 là một trong 5 chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A. Chủng này sẽ được tiếp tục các nghiên cứu để nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp huperzin A nhằm làm chủng giống gốc có tiềm năng 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

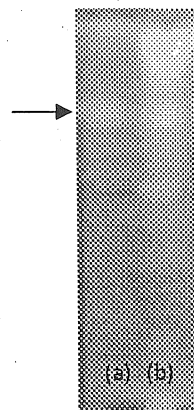
1. Chủng vi nấm *Xylaria* sp. Tsp20 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 0,0373mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 560bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



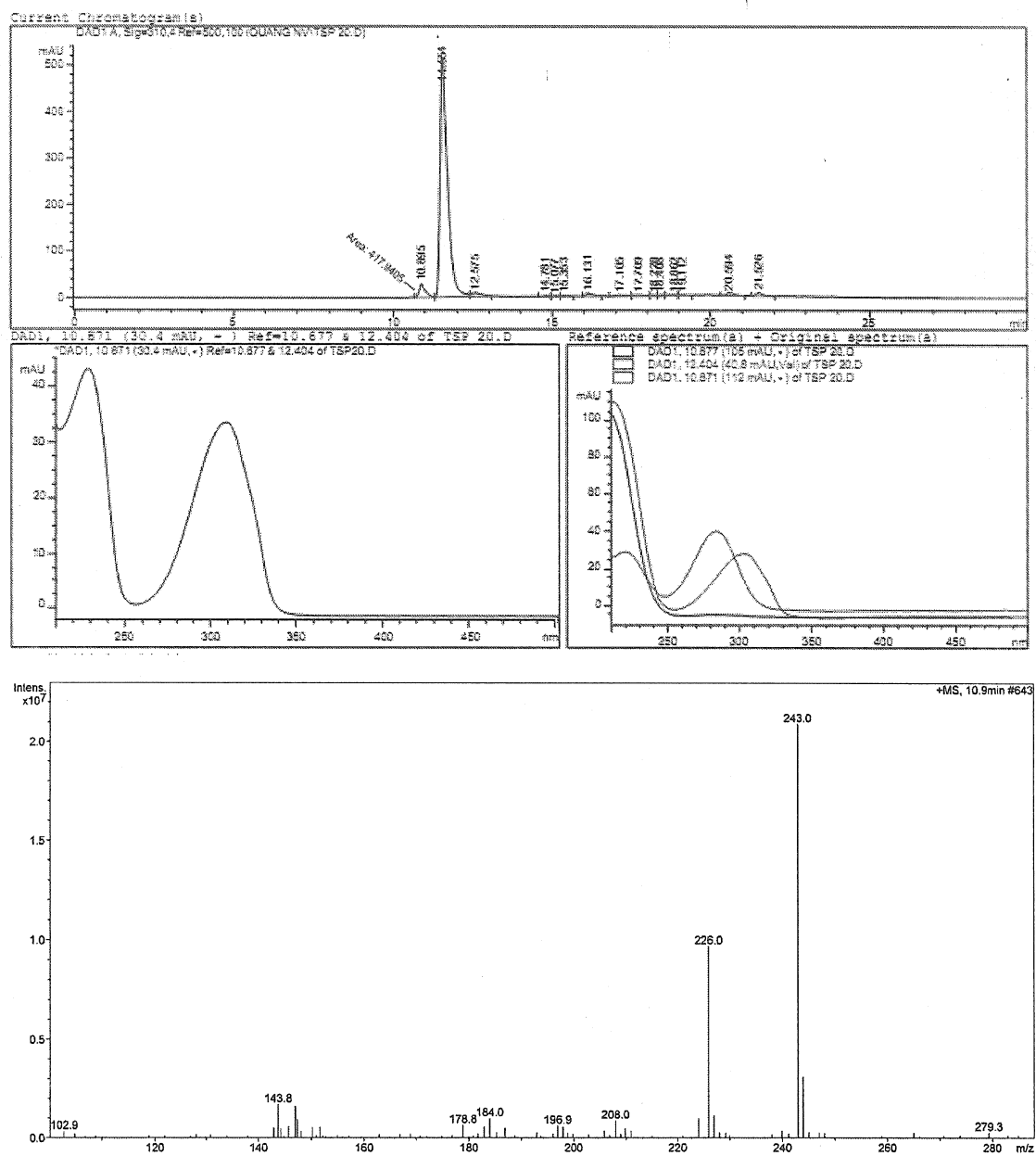
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> **CHŨNG VI NẤM XYLARIA SP. TSP20 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> *Xylaria* sp. Tsp20

<400>

tcgggggtgc ggggggtatc ggtaggtgac ctgcggacat atcattaagc ggaggattcc	60
gtaggtgaac ctgccgagtt atactatgcg gagaccttac ccggtgatgc gggcttaacc	120
tgccggtggt ctaccaaact ctgtttacta tgttattctg aataatataa ctaaataagt	180
taaaactttc aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg	240
ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc	300
cattagtatt ctagtgggca tgcctgttcg agcgtcattt caacccttaa gccctgttgc	360
ttagcgttgg gaggctacag atacactctg tagttcctta aagttagtgg cggagtcggt	420
ttcacactct agacgtagta aattttatct cgcctataga tgagccggtc ccttgccgta	480
aaaccccta atttctaaag gttgacctcg gatcaggtag gaataccgc tgaacttaag	540
catatcaata agcggaggaa	560