

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ LOÀI SÂM THUỘC CHI PANAX

Nguyễn Thanh Thuận*, Vũ Thanh Thảo*, Nguyễn Văn Thanh*, Trần Cát Đông*

TÓM TẮT

Mở đầu: Nhân sâm được dùng trong y học phương Đông hàng ngàn năm. Rễ của nhân sâm có tác dụng tăng khả năng thích ứng của cơ thể, tăng hiệu quả điều trị bệnh tiểu đường type II, kích thích ham muốn tình dục, tăng cường sức khỏe và điều trị tiểu đường cũng như rối loạn tình dục ở nam giới. Sâm thường được bán dưới dạng rễ khô hay cắt lát. Các loại sâm khác nhau thì hoạt tính cũng khác nhau. Do đó cần một phương pháp khoa học để xác định các loại sâm ở mức phân tử.

Mục tiêu: Xây dựng các phương pháp thuận tiện và có độ lặp lại cao để xác định các loài sâm thuộc chi *Panax* và nguồn gốc của chúng.

Phương pháp: Chúng tôi dùng phương pháp giải trình tự, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphic (PCR-RFLP) trên vùng ITS và 18S, và Random Amplified Microsatellite (RAMS).

Kết quả: Phân tích trình tự vùng ITS có thể được dùng để xác định các loài sâm. Ngoài ra, kỹ thuật RFLP có thể giúp phân biệt nguồn gốc của chúng.

Kết luận: Các phương pháp phân tử đã sử dụng thích hợp để xác định và phân biệt các mẫu sâm.

Từ khóa: PCR-RFLP, sâm, RAMS, di truyền học.

ABSTRACT

AUTHENTICATION OF GINSENG SPECIES BY BIOMOLECULAR METHODS

Nguyen Thanh Thuan, Vu Thanh Thao, Nguyen Van Thanh, Tran Cat Dong

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 14 - Supplement of No 1 - 2010: 129-133

Background: Ginseng has been used in folk medicine for thousands of years. Its root is taken as adaptogens, aphrodisiacs, nourishing stimulant and in the treatment of type II diabetes, as well as sexual dysfunction in men. The root is most often available in dried form, either whole or sliced. Different ginsengs have different active substances and effects. Therefore, a scientific method of identifying ginseng cultivars at the molecular level is required.

Objectives: To develop some convenient and reproducible approaches for differentiation between *Panax* species and their sources.

Methods: Using sequence analysis, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphic (PCR-RFLP) with primers rDNA 18S and ITS, and Random Amplified Microsatellite (RAMS).

Results: Sequence analysis of ITS region can be used for identification at species level. RFLP method can differentiate the origin of samples.

Conclusions: These methods were useful for identifying and differentiation ginseng samples

Keywords: PCR-RFLP, ginseng, RAMS, genetics

MỞ ĐẦU

Nhân sâm là một loại thuốc bổ, đóng vai

trò quan trọng trong việc dự phòng và điều trị những bệnh lý mạn tính, cần điều trị dài ngày

* Bộ môn Vi sinh – Ký sinh, Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM

Địa chỉ liên hệ: ThS. Nguyễn Thanh Thuận

ĐT: 0983619397

Email: thuan 311983@yahoo.com

như bệnh tiểu đường, ung thư, bệnh xơ vữa động mạch, huyết khối, cao lipid máu, cao huyết áp, thiếu năng tuần hoàn não... do tác dụng tăng cường thể lực và gia tăng sức tự đề kháng không đặc hiệu của cơ thể, tác dụng chống oxi hóa một cách trực tiếp hay gián tiếp. Y học hiện đại đã chứng minh Nhân sâm duy trì sự hằng định nội môi của hệ thần kinh trung ương, hệ nội tiết và hệ miễn dịch. Tuy các tác dụng trị liệu không điển hình, tương đối yếu so với các thuốc đặc trị Tây y nhưng việc ít gây tác dụng phụ khi sử dụng dài ngày, nhất là ở những đối tượng bệnh nhân cao tuổi là ưu điểm của Nhân sâm(1).

Một loạt kỹ thuật sinh học phân tử đã được dùng để nghiên cứu đa dạng di truyền của chi *Panax* như random amplified polymorphism DNA (RAPD)(11), amplified fragment length polymorphism (AFLP)(4), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)(3), arbitrarily primed PCR (AP-PCR)(10), direct amplification of length polymorphism (DALP)(5), inter-simple sequence repeat (ISSR)(6) và giải trình tự(2).

Trong bộ gen thực vật, các gen RNA ribosome (rDNA) được sắp xếp trong những đơn vị lặp lại nối tiếp nhau với mỗi đơn vị gồm 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26S rDNA. Vùng mã hóa của ba gen rDNA được bảo tồn cao hơn hai vùng ITS.

Một kỹ thuật khác dựa trên PCR là random amplified microsatellite (RAMS). Kỹ thuật RAMS là sự kết hợp đặc tính phân tích RAPD và vùng vi vệ tinh. Bản chất của kỹ thuật này là các dấu ấn được phát hiện khi khuếch đại hai vùng vi vệ tinh ngẫu nhiên cùng với trình tự xen giữa hai vùng này. Phương pháp này có độ lặp lại cao và cho phép phát hiện đa hình của DNA trong cùng một loài hay giữa các loài(7).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các mẫu sâm

Các mẫu sâm tươi hay khô được thu mua từ các nguồn sau: các mẫu *P. ginseng* được mua ở Việt Nam (Pg1, Pg2) và Hàn Quốc (Pg3, Pg4); *P. quinquefolius* L. (Pq), *P. notoginseng* (Pn1, Pn2) và *P. vietnamensis* (Pv) từ Việt Nam.

Tách chiết DNA.

Tách chiết DNA từ các mẫu *Panax* theo phương pháp của Manian được biến đổi (9). Thành tế bào được phá vỡ bằng cách làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền mịn trong cối sứ. Màng tế bào được phá vỡ bằng cách ủ trong đệm chiết ở 65°C trong 30 phút. Sau đó, DNA được chiết bằng hỗn hợp chloroform-isoamyl alcohol (24:1). Tủa DNA bằng isopropanol và rửa bằng ethanol 70%. DNA được hòa tan lại trong 100µl TE.

Thực hiện PCR-RFLP.

Vùng ITS được khuếch đại với cặp mồi chung ITS_AF (5'- GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G -3') và ITS_BR (5'- CTT TTC CTC CGC TTA TTG ATA TG -3') (8). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 25µl gồm 1µM/mồi (IDT); 1U *Taq* polymerase (BioLabs); 0,4mM dNTP (BioLabs); 1X PCR buffer (BioLabs); 2mM MgCl₂ (BioLabs). Chu trình phản ứng là 1 chu kỳ: 94°C 5 phút; 30 chu kỳ: 94°C 30 giây, 45°C 1 phút, 72°C 1 phút; 1 chu kỳ: 72°C 7 phút.

Vùng 18S cũng được khuếch đại với cặp mồi chung 18SCOM_F (5'- TGC ATG GCC GTT CTT AGT TGG TGG -3') và 18SCOM_R (5'- CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC -3') (12). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 25µl gồm 0,4µM/mồi (IDT); 1U *Taq* polymerase (BioLabs); 0,4mM dNTP (BioLabs); 1X PCR buffer (BioLabs); 2mM MgCl₂ (BioLabs). Chu trình phản ứng là 94°C 5 phút / 35 chu kỳ 94°C 30 giây, 52°C 30 giây, 72°C 1 phút / 72°C 7 phút.

Sản phẩm PCR được tinh chế qua cột Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System và cắt bằng hỗn hợp enzyme *HaeIII* và

HindIII (BioLabs) trong 1 giờ ở 37°C. Sản phẩm cắt được điện di trên gel polyacrylamide 15%.

Giải trình tự

Các sản phẩm PCR được giải trình tự bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả được BLAST trên NCBI để tìm các trình tự tương đồng

Thực hiện RAMS

Các mồi cho phản ứng RAMS: RAMS1 (ACA)₅, RAMS2 (CCA)₅, RAMS3 (CGA)₅, RAMS4 (GT)₅G (7). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 25µl gồm 5ng DNA khuôn; 0,5µM/mồi (IDT); 1U Taq polymerase (BioLabs); 0,2mM dNTP (BioLabs); 1X PCR buffer (BioLabs); 2mM MgCl₂ (BioLabs). Chu trình phản ứng là 95°C 5 phút / 35 chu kỳ gồm 95°C 30 giây; 38,5°C (RAMS1), 53°C (RAMS2), 53°C (RAMS3), 33,5°C (RAMS4) 45 giây; 72°C 2 phút / 72°C 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.

Phân tích kết quả

Sản phẩm điện di được chụp hình bằng máy Dolphin (Wealtec Corp.). Phân tích kết quả bằng phần mềm BioNumerics 3.0 để tạo cây phát sinh loài làm căn cứ phân biệt.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

PCR với cặp mồi ITS cho sản phẩm có kích thước phù hợp với dự đoán trong khoảng 750bp. Riêng các mẫu Pg1 và Pg2 không cho sản phẩm. Còn cặp mồi 18S cho sản phẩm khoảng 500bp nhưng mẫu Pn2 không cho sản phẩm.

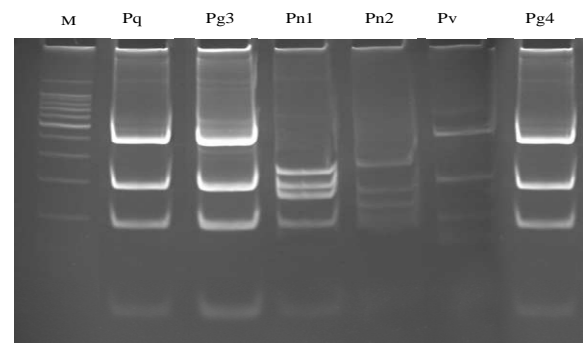
Kết quả giải trình tự và BLAST trên NCBI cho thấy các mẫu đều thuộc chi *Panax*. Tuy nhiên, kết quả trên vùng 18S không thể phân biệt ở mức loài. Điều này có thể là do sự bảo tồn cao của vùng này giữa các loài có quan hệ gần. Dựa vào kết quả trên vùng ITS, chúng tôi có thể xác định loài có quan hệ gần nhất với các mẫu (bảng 1) nhưng không thể phân biệt nguồn gốc của các mẫu.

Bảng 1. Kết quả BLAST trình tự vùng ITS trên NCBI

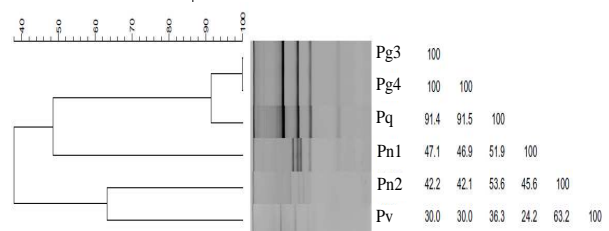
Mẫu	Loài	Query	Max
-----	------	-------	-----

		coverage (%)	ident (%)
Pq	<i>Panax quinquefolius</i>	98	98
Pg3	<i>Panax ginseng</i>	98	99
Pg4	<i>Panax ginseng</i>	96	99
Pn1	<i>Panax notoginseng</i>	97	98
Pn2	<i>Panax notoginseng</i>	98	97
Pv	<i>Panax quinquefolius</i> <i>Panax vietnamensis</i>	96	98

Mặc dù mẫu Pn1 và Pn2 là *P. notoginseng*, kết quả phân tích RFLP trên vùng ITS cho thấy chúng có mức tương đồng không đáng kể (dưới 50%). Nguyên nhân có thể là do nguồn gốc, điều kiện sinh trưởng, thổ nhưỡng khác nhau. Các mẫu Pq, Pg3 và Pg4 có mức tương đồng cao, cho thấy chúng có quan hệ gần với nhau (hình 1, 2).



Hình 1. Kết quả RFLP vùng ITS. M: thang 100bp

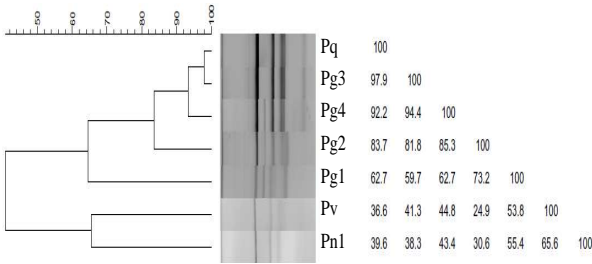


Hình 2. Kết quả phân tích sự đa hình sản phẩm RFLP đoạn ITS

Phân tích RFLP trên vùng 18S cho thấy các mẫu Pg3, Pg4 (thu mua từ Hàn Quốc) có mức tương đồng cao hơn các mẫu Pg1, Pg2 (thu mua tại Việt Nam) khoảng 20% (hình 3, 4). Nhìn chung phân tích RFLP trên vùng 18S cho kết quả tương đồng cao hơn vùng ITS do vùng này được bảo tồn cao hơn.



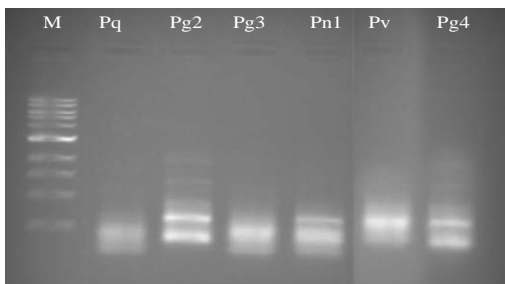
Hình 3. Kết quả RFLP vùng 18S. M: thang 100bp



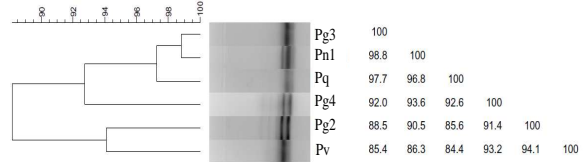
Hình 4. Kết quả phân tích sự đa hình sản phẩm RFLP đoạn 18S

Thử nghiệm các môi RAMS thì chỉ có môi RAMS1 cho sản phẩm khi phân tích trên gel. Do đó, chúng tôi chọn môi này cho các thử nghiệm tiếp theo. Khảo sát nồng độ MgCl₂ cho thấy nồng độ MgCl₂ ở 2mM cho kết quả PCR rõ nhất.

Trên cơ sở các thông số như trên, chúng tôi tiến hành RAMS trên các mẫu. Kết quả phân tích trên BioNumerics cho thấy các mẫu có mức đa dạng thấp (dưới 15%). Điều này là do kích cỡ mẫu thấp và chỉ có một môi được thử nghiệm (hình 5, 6).



Hình 5. Kết quả PCR môi RAMS1. M: thang 1000bp



Hình 6. Kết quả phân tích đa hình sản phẩm khuếch đại RAMS1.

Từ các kết quả trên, chúng tôi nhận thấy để có thể kết luận chính xác về loài và nguồn gốc của các mẫu cần kết hợp nhiều phương pháp. Phân tích trình tự vùng ITS có thể giúp xác định loài của các mẫu. Ngoài ra, sự kết hợp giữa phân tích RFLP và giải trình tự có thể phân biệt nguồn gốc của các mẫu này.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, các mẫu *Panax* sp. được xác định loài và phân biệt nguồn gốc nhờ các kỹ thuật sinh học phân tử. Nhìn chung, các mẫu sâm thu mua từ Hàn Quốc có mức tương đồng cao hơn các mẫu thu mua tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Court, William E. (2000). *Ginseng : the genus panax. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, ed. Roland Hardman. Vol. 15. Amsterdam: Harwood Academic. ix,266p.
2. Fushimi, H., K. Komatsu, M. Isobe, et al. (1996). 18S ribosomal RNA gene sequences of three *Panax* species and the corresponding ginseng drugs. *Biol Pharm Bull*, 19(11): p. 1530-2.
3. Fushimi, H., K. Komatsu, M. Isobe, et al. (1997). Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three Ginseng drugs. *Biol Pharm Bull*, 20(7): p. 765-9.
4. Ha, W. Y., P. C. Shaw, J. Liu, et al. (2002). Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *J Agric Food Chem*, 50(7): p. 1871-5.
5. Ha, W. Y., F. C. Yau, P. P. But, et al. (2001). Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolius*. *Planta Med*, 67(6): p. 587-9.
6. Hon, C. C., Y. C. Chow, F. Y. Zeng, et al. (2003). Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 24(9): p. 841-6.
7. Latiffah, Z., K. Harikrishna, S.G. Tan, et al. (2005). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Random Amplified Microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps in Malaysia. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 13(1): p. 23-34.
8. Linder, C. R., L. A. Moore, R. B. Jackson (2000). A universal molecular method for identifying underground plant parts to

- species. *Mol Ecol*, 9(10): p. 1549-59.
9. Manian, S., S. Sreenivasaprasad, P.R. Mills (2001). DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 33(4): p. 307-310.
 10. Shaw, P. C., P. P. But (1995). Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. *Planta Med*, 61(5): p. 466-9.
 11. Um, J. Y., H. S. Chung, M. S. Kim, et al. (2001). Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. *Biol Pharm Bull*, 24(8): p. 872-5.
 12. Zhang Huan, Senjie Lin (2002). Detection and Quantification of *Pfiesteria piscicida* by Using the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2): p. 989-994.
