ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

KIỀU THỊ TRÀ GIANG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ VÙNG GEN *mat*K/*ITS* CỦA MỘT SỐ MẪU CÂY THUỘC CHI DƯƠNG ĐỒNG (*Adinandra*)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, năm 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

KIỀU THỊ TRÀ GIANG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ VÙNG GEN *mat*K/*ITS* CỦA MỘT SỐ MẪU CÂY THUỘC CHI DƯƠNG ĐỒNG (*Adinandra*)

Ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Hữu Quân

Thái Nguyên, năm 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố.

Thái Nguyên, tháng 6 năm 2019

Tác giả luận văn

Kiều Thị Trà Giang

XÁC NHẬN	**XÁC NHẬN**
CỦA KHOA CHUYÊN MÔN	**CỦA GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**
PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm	**TS. Nguyễn Hữu Quân**

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Hữu Quân, giảng viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ em trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Em cũng xin chân thành cảm ơn thầy giáo TS. Phạm Văn Khang, giảng viên Khoa Hóa học đã hướng dẫn em về tách chiết và định tính các chất hóa học.

Em xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của cô Trần Thị Hồng, kỹ thuật viên phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, cô Cao Thị Phương Thảo, kỹ thuật viên phòng thí nghiệm Thực vật học và các thầy cô kỹ thuật viên các phòng thí nghiệm Khoa Sinh học; phòng thí nghiệm Hóa hữu cơ, Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện giúp em trong suốt quá trình nghiên cứu.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục sinh học, bộ phận sau đại học thuộc Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho em trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Em xin bày tỏ lời biết ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, khuyến khích và giúp đỡ em trong tiến trình học tập và hoàn thành luận văn.

Em xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài KH&CN Quỹ NAFOSTED "Phân tích thành phần hóa học và tìm kiếm các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng ung thư và kháng viêm từ một số loài thực vật thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*) ở Việt Nam" mã số 106.02-2018.338.

Thái Nguyên, tháng 6 năm 2019

Tác giả luận văn

Kiều Thị Trà Giang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC BẢNG v
DANH MỤC HÌNH ẢNH vi
MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 1
3. Nội dung nghiên cứu 2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Giới thiệu về thực vật thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*) 3
1.2. Tình hình nghiên cứu về chi Dương đồng *(Adinandra)* 5
1.2.1. Nghiên cứu về thành phần hóa học ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.2.2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học 8
1.3. Nghiên cứu sử dụng mã vạch DNA trong phân loại thực vật 11
1.4. Các nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn của các loài cây thuốc 14
1.5. Các phương pháp nghiên cứu hoạt tính sinh học *in vitro* 16
1.6. Vai trò của polyphenol, coumarin, dẫn xuất của flavon và flavonol 18
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 21
2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu 21
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu 21
2.1.2. Hóa chất, thiết bị 21
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 22
2.2. Phương pháp nghiên cứu 22
2.2.1. Phương pháp phân loại hình thái 22
2.2.2. Phương pháp giải phẫu thực vật 22
2.2.3. Phương pháp sinh học phân tử 24

2.2.4. Phương pháp hóa sinh.....26
2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết.....28
2.2.6. Phương pháp xử lý và phân tích kết quả 29
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....30
3.1. Đặc điểm hình thái ngoài và phân bố của loài *Adinandra lienii* 30
3.2. Cấu tạo giải phẫu của loài *Adinandra lienii* 31
3.2.1. Đặc điểm giải phẫu cắt ngang thân cây 31
3.2.2. Đặc điểm giải phẫu cắt ngang phiến lá cây 32
3.3. Đặc điểm của vùng gen *mat*K phân lập từ loài *Adinandra lienii* 34
3.4. Khảo sát các hợp chất có trong các phân đoạn dịch chiết của cây *Adinandra lienii* 39
3.4.1. Định tính polyphenol 39
3.4.2. Định tính các flavonoid 40
3.4.3. Định tính các coumarin.....40
3.4.4. Phân tích thành phần các hợp chất trong cao chiết của loài *A. lienii* 41
3.5. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ loài *Adinandra lienii* 42
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....46
1. KẾT LUẬN.....46
2. KIẾN NGHỊ.....46
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....47
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....48

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Nghĩa tiếng việt
APG II	An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the ordors and families of flowering plants	Hệ thống phân loại thực vật
Bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonucleic Axit (DNA)
EC_{50}	Effective dose 50%	Liều hiệu quả đáp ứng 50%
EDTA	Ethylene diamine tetraa acid cetic	Etylen diamin tetraxetic Axit
ELISA	Enzyme linked immunosorbentassay	Thử nghiệm miễn dịch gắn enzyme
EtOH	Ethyl acetatae	
Hep G2	Hepatocellular carcinoma human	Ung thư gan ở người
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế 50% cá thể
ISSR	Inter Simple Sequence Repea	Đánh giá sự sai khác di truyền ở thực vật.
ITS	Internal transcribed space	Vùng gen ITS
LB	Luria Bertani	Môi trường nuôi cấy chủng vi sinh vật
*mat*K	*mat*K maturase	Gen *mat*K
MCF-7	Ardeno carcinoma	Ung thư vú
MeOH	Methanol	
MIC	Minimalinhibitory concentration	Nồng độ tối thiểu ức chế
MS/MS	Mass spectrometry	Phương pháp khối phổ
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA	Đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên
RNA	Ribonucleic acid	Ribonucleic Axit
rRNA	RNA ribosome	Riboxom RNA
TTC	Triphenyl tetrazolium Chloride	Chỉ thị màu

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam 3

Bảng 1.2. Tác dụng chống ung thư của dịch chiết các hợp chất phenolic tự do trên 2 dòng tế bào Hep-G2 và MCF-7 10

Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm 21

Bảng 2.2. Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm 22

Bảng 2.3. Thông tin về cặp mồi nhân gen *mat*K.....25

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR nhân gen *mat*K 25

Bảng 3.1. Các trình tự nucleotide của đoạn gen *mat*K sử dụng trong phân tích ...36

Bảng 3.2. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly trình tự các nucleotide của đoạn gen *mat*K từ loài *Adinandra lienii* và các loài thuộc chi *Adinandra*.....38

Bảng 3.3. Hoạt tính sinh học của dịch chiết từ cây *A. lienii* 42

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Một số loài thực vật thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*) 4
Hình 1.2. Các hợp chất flavonoid và triterpene saponins từ *A. nitida*.....6
Hình 1.3. Các hợp chất triterpene saponins từ *A. nitida* 7
Hình 1.4. Các hợp chất flavonoid từ *A. nitida* 8
Hình 1.5. Các phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng sinh *in vitro* 17
Hình 1.6. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng sinh in vitro sinh tự ký 18
Hình 2.1. Sơ đồ chiết phân đoạn các hợp chất từ cây *A. lienii* 26
Hình 3.1. Hình thái ngoài của cây *A.lienii* (Ảnh chụp của tác giả thu tại Lào Cai, tháng 3, năm 2018) 30
Hình 3.2. Giải phẫu cắt ngang thân cây *A. lienii* 32
Hình 3.3. Giải phẫu cắt ngang phiến lá cây *A. lienii* 33
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ DNA tổng số của loài *A. lienii*.....34
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự đoạn gen *matK* của loài *A. lienii* thu tại Lào Cai..35
Hình 3.6. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự đoạn gen *matK* của loài *A. lienii* so với trình tự đoạn gen *mat*K trên GenBank bằng BLAST trong NCBI 36
Hình 3.7. Trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* phân lập từ loài *A. lienii* thu tại Lào Cai, Việt Nam và trình tự đoạn gen *matK* công bố trên GenBank.....37
Hình 3.8. Sơ đồ cây phân loại dựa trên trình tự các nucleotide của đoạn gen *mat*K 39
Hình 3.9. Phản ứng với muối sắt (III) (a) và với dung dịch H_2SO_4 đặc (b) 39
Hình 3.10. Định tính các flavonoid.....40
Hình 3.11. Định tính coumarin phản ứng với NaOH (a) và HCl đặc (b) 41
Hình 3.12. Sắc kí đồ cao chiết ethanol (A) và ethyl acetate (B) trong hệ dung môi n-hexan : acetone tỉ lệ 1:1.....41
Hình 3.13. Sắc kí đồ cao chiết ethanol (A) và ethyl acetate (B) trong hệ dung môi dichloromethane : n-hexan tỉ lệ 3:1 41
Hình 3.14. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *B. subtilis* 43
Hình 3.15. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *L. plantarum*.....43

Hình 3.16. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *S. aureus*.....44
Hình 3.17. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *E.coli* 44
Hình 3.18. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *S. marcescens*.....45
Hình 3.19. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn *S. lutea* 45