VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN THỊ VÂN ANH

Tinh sạch, nghiên cứu một số đặc tính sinh hóa và tác dụng sinh học của polisaccarit từ lá cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2017

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN THỊ VÂN ANH

Tinh sạch, nghiên cứu một số đặc tính sinh hóa và tác dụng sinh học của polisaccarit từ lá cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số : 6042 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. VÕ HOÀI BẮC

HÀ NỘI - 2017

LỜI CẢM ƠN

Trong lời đầu tiên của luận văn Thạc sỹ Khoa học này, em muốn gửi những lời biết ơn chân thành của mình tới tất cả những người đã hỗ trợ, giúp đỡ em về chuyên môn, vật chất và tinh thần trong quá trình thực hiện luận văn này.

Trước hết, em xin gửi lời cảm ơn chân thành tới cô giáo TS. Võ Hoài Bắc, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam, người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ bảo, nhận xét và giúp đỡ em tận tình trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Em xin cảm ơn các thầy, cô Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam, đơn vị đào tạo và bồi dưỡng sau đại học, những người đã dạy dỗ, chỉ bảo em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu vừa qua.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè và các thành viên trong khóa đào tạo Thạc sỹ K19 đã luôn đồng hành, giúp đỡ và động viên em rất nhiều trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Do thời gian thực hiện có hạn, kiến thức chuyên môn còn nhiều hạn chế nên luận văn của em thực hiện không tránh khỏi những thiếu sót nhất định. Em rất mong nhận được ý kiến đóng góp của thầy, cô và các bạn để em có thể hoàn thiện luận văn tốt nghiệp của mình.

Em xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2017

Học viên

Trần Thị Vân Anh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU ..... Error! Bookmark not defined.

Đặt vấn đề.....**Error! Bookmark not defined.**

Mục tiêu nghiên cứu của đề tài.....**Error! Bookmark not defined.**

PHẦN I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU..... Error! Bookmark not defined.

1.1. Polisaccarit.....Error! Bookmark not defined.

1.2 Vai trò sinh học và tác dụng của polisaccarit thực vật.....Error! Bookmark not defined.

1.3 Giới thiệu chung về cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum*.....Error! Bookmark not defined.

1.4. Khái niệm viêm .....Error! Bookmark not defined.

1.5. Vai trò của đại thực bào (macrophage) trong đáp ứng viêm ...Error! Bookmark not defined.

1.6. Vai trò của các cytokine trong đáp ứng viêmError! Bookmark not defined.

PHẦN II ..... Error! Bookmark not defined.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨUError! Bookmark not defined.

2.1. Vật liệu.....Error! Bookmark not defined.

2.1.1. Nguyên liệu thực vật*.....*Error! Bookmark not defined.

2.1.2. Hóa chất, thiết bị*.....*Error! Bookmark not defined.

2.2. Phương pháp nghiên cứu.....Error! Bookmark not defined.

2.2.1. Xử lý nguyên liệu*.....*Error! Bookmark not defined.

2.2.2.* Các *phản ứng định tính đặc trưng*.....*21

2.2.3. Định lượng polisaccarit bằng phương pháp phenol - sunfuric axit (Dubois, 1956)*.....*Error! Bookmark not defined.

2.2.4. Nghiên cứu các điều kiện tối ưu chiết rút polisaccarit.*Error! Bookmark not defined.*

2.2.5. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry.....24

2.2.6. Phương pháp tinh sạch polisaccarit.....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.7. Phân tích độ sạch của chế phẩm polisaccarit bằng phổ UV .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.8. Phương pháp sắc ký thẩm thấu gel GPC xác định độ sạch và trọng lượng phân tử của polisaccarit.....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.9. Xác định độ nhớt polisaccarit .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.10. Xác định ảnh hưởng của pH và nhiệt độ tới chất lượng của chế phẩm polisaccarit. .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.11. Phương pháp xác định mức ảnh hưởng của polisaccarit lên khả năng sống sót của đại thực bào.....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.12. Phương pháp định lượng nồng độ cytokine IL-6 và TNF-α.....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.13. Xác định hoạt tính quét các gốc tự do sử dụng phương pháp DPPH .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.14. Đánh giá tác dụng làm lành vết thương trên tế bào nguyên sợi da người theo phương pháp của Laing .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.15. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm polisaccarit trên chuột được tiêm cyclophosphamide .....*Error! Bookmark not defined.*

2.2.16. Phân tích thống kê .....*Error! Bookmark not defined.*

PHẦN III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**Error! Bookmark not defined.**

3.1. Định tính nhận biết polisaccarit và polisaccarit peptic trong nguyên liệu..... Error! Bookmark not defined.

3.2. Nghiên cứu các điều kiện tối ưu chiết rút polisaccarit .....Error! Bookmark not defined.

3.2.1. Lựa chọn dung môi chiết rút hiệu quả polisaccarit*Error! Bookmark not defined.*

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết rút polisaccarit .....*Error! Bookmark not defined.*

3.2.3. Thời gian tối ưu chiết rút polisaccarit .....*Error! Bookmark not defined.*

3.2.4. Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thích hợp chiết rút polisaccarit ...*Error! Bookmark not defined.*

3.3. Tinh sạch polisaccarit ..... Error! Bookmark not defined.

3.4. Nghiên cứu một số tính chất của polisaccarit tinh sạch. .....Error! Bookmark not defined.

3.4.1. Xác định độ sạch và trọng lượng phân tử của chế phẩm polisaccarit .....*Error! Bookmark not defined.*

3.4.2. Xác định độ nhớt của chế phẩm polisaccarit.....*Error! Bookmark not defined.*

3.4.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH và nhiệt độ tới chất lượng của chế phẩm polisaccarit.....*Error! Bookmark not defined.*

3.5. Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của polisaccarit tinh sạch được từ lá Xuân Hoa *P. palatiferum*..... Error! Bookmark not defined.

3.5.1. Xác định hoạt tính quét các gốc tự do .....*Error! Bookmark not defined.*

3.5.2. Đánh giá hoạt tính độc tố của polisaccarit tới khả năng sống của tế bào macrophage.....*Error! Bookmark not defined.*

3.5.3. Đánh giá ảnh hưởng của polisaccarit đến sự giải phóng cytokine .....*Error! Bookmark not defined.*

3.5.4. Đánh giá tác dụng làm lành vết thương trên tế bào nguyên sợi da người.....*Error! Bookmark not defined.*

3.5.5. Đánh giá khả năng tăng cường miễn dịch của polisaccarit từ từ cây Xuân Hoa P. Palatiferum.....*Error! Bookmark not defined.*

PHẦN IV 58

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 58

4.1. Kết luận 58

4.2. Đề nghị 58

TÀI LIỆU THAM KHẢO 59

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Xây dựng đồ thị chuẩn glucoz..... 22

Bảng 2.2. Xây dựng đồ thị chuẩn protein theo phương pháp Lowry .. 25

Bảng 3.1. Phản ứng định tính nhận biết polisaccarit và polisaccarit peptic 34

Bảng 3.2. So sánh phương pháp loại protein bằng Sevag và TCA..... 41

Bảng 3.3. Hoạt tính polisaccarit các phân đoạn qua cột Sephadex G100 42

Bảng 3.4. Các bước tinh sạch polisaccarit từ lá cây Xuân Hoa *P. Palatiferum* 42

Bảng 3.5. Xác định hoạt tính quét các gốc tự do sử dụng phương pháp DPPH 49

Bảng 3.6. Sự thay đổi trọng lượng của chuột trong 5 ngày thí nghiệm55

Bảng 3.7. Trọng lượng tương đối của tuyến ức, lách, hàm lượng hemoglobin (Hb), số lượng hồng cầu (HC), bạch cầu (BC) 56

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk 11

Hình 3.1. Phản ứng định tính nhận biết polisaccarit..... 35

Hình 3.2. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hàm lượng polisaccarit 36

Hình 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polisaccarit chiết xuất 37

Hình 3.4. Thời gian tối ưu chiết rút polisaccarit. 38

Hình 3.5. Tỷ lệ dung môi thích hợp chiết rút polisaccarit. 39

Hình 3.6. Sắc ký qua cột Sephadex G100..... 41

Hình 3.7. Sơ đồ tinh sạch chế phẩm polisaccarit 44

Hình 3.8. Đồ thị biểu diễn phổ hấp thụ ánh sáng của polisaccarit chiết từ lá cây Xuân Hoa..... 45

Hình 3.9. Phổ sắc ký thẩm thấu gel GPC của polysaccharit tinh sạch từ cây Xuân Hoa *P. palatiferum*..... 46

Hình 3.10. Ảnh hưởng của pH đến chế phẩm polisaccarit 47

Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến chất lượng chế phẩm polisaccarit..... 48

Hình 3.12. Ảnh hưởng của polisaccarit lên khả năng sống chết của tế bào RAW264.7..... 50

Hình 3.13. Ảnh hưởng của polisaccarit tinh sạch trên sự giải phóng.. 51

của IL-6 51

Hình 3.14. Ảnh hưởng của polisaccarit tinh sạch trên sự giải phóng của TNF-α 52

Hình 3.15. Hình ảnh trên kính hiển vi sự hàn gắn vết rạch trên nguyên bào sợi của polisaccarit 53

Hình 3.16. Mức độ hàn gắn vết rạch của polisaccarit XH trên nguyên bào sợi 54

DANH MỤC NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

A490 : Bước sóng 490

A660 : Bước sóng 660

BSA : Bovine Seurum Albumin

CY : Cyclophosphamide

DPPH : 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl

HPLC : High performance liquid chromatography

IL-6 : interleukin-6

MTT : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

OD : Optical Density

TCA : trichloroacetic acid

TNFα : Tumor necrosis factor-alpha