

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



HOÀNG HÀ

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TẠO SINH KHỐI
THÔNG QUA HỆ THỐNG NUÔI CẤY RỄ TỖ CỦA
CÂY BÁ BỆNH (*Eurycoma longifolia*)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội - 2012

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TẠO SINH KHỐI
THÔNG QUA HỆ THỐNG NUÔI CẤY RỄ TƠ CỦA
CÂY BÁ BỆNH (*Eurycoma longifolia*)**

Chuyên ngành:
Mã số:

Sinh học thực nghiệm
624230

Học viên:
Hướng dẫn khoa học:

Hoàng Hà
PGS. TS. Chu Hoàng Hà

Hà Nội - 2012

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến những người đã hướng dẫn, giúp đỡ tận tình để tôi hoàn thành luận văn này:

Người thầy của tôi, PGS. TS. Chu Hoàng Hà, Phó Viện trưởng Viện công nghệ sinh học, trưởng phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ Sinh học, đã hướng dẫn và hỗ trợ tận tình, truyền đạt kiến thức, những kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

GS. TS. Lê Trần Bình, TS Lê Văn Sơn, TS. Phạm Bích Ngọc, CN. Nguyễn Đình Trọng và cán bộ phòng Công nghệ Tế bào Thực vật đã chỉ bảo tận tình về chuyên môn, luôn theo sát thí nghiệm của tôi để có những lời khuyên bổ ích và kịp thời.

Trong những năm học tập và nghiên cứu tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, tôi đã nhận được rất nhiều sự quan tâm giúp đỡ, động viên chân thành của tập thể cán bộ phòng. Các thực tập sinh luôn thân thiện, nhiệt tình, tạo nên một môi trường nghiên cứu chủ động, hăng say. Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ quý báu này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến phòng Tổng hợp hữu cơ Viện Hóa học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, phòng Sắc ký khối phổ phân giải cao - khoa Hóa học - Đại học Khoa học tự nhiên đã tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành đề tài.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến các thầy cô giáo tại cơ sở viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong thời gian học tập vừa qua.

Bằng tình cảm chân thành, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè đã luôn ở bên, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn này.

Hà Nội, tháng 8 năm 2012
Học viên

Hoàng Hà

NHỮNG KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

API	Atmospheric Pressure Ionization
Bp	Base pairs
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
COI	Cytochrome c oxidase subunit I
dNTP	2'- deoxyribonucleoside - 5' triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilobase
MS	Mass Spectrometry
MS	Murashige and Skoog
WPM	Woody Plant Medium

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY BÁ BỆNH	4
1.1.1. Giới thiệu và phân bố địa lý	4
1.1.2. Phân loại	4
1.1.3. Hình thái	5
1.1.4. Tác dụng dược lý của cây bá bệnh	5
1.1.5. Tính cấp thiết nghiên cứu, bảo tồn và sản xuất bền vững cây bá bệnh	6
1.2. NUÔI CÂY SINH KHỐI RỄ TƠ - GIẢI PHÁP TẠO NGUỒN DƯỢC PHÂN SẠCH PHỤC VỤ SỨC KHỎE CỘNG ĐỒNG	6
1.2.1. Giới thiệu về nuôi cấy sinh khối tế bào	6
1.2.2. Giới thiệu về <i>Agrobacterium rhizogenes</i> - phương pháp tạo rễ tơ ở tế bào thực vật	8
1.2.3. Cơ chế chuyển các gen vùng T-DNA vào tế bào thực vật	8
1.2.4. Nuôi cấy sinh khối rễ tơ	10
1.3. CÁC NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHỈ THỊ DNA VÀO VIỆC ĐỊNH DANH LOÀI	13
1.4. PHƯƠNG PHÁP KHỐI PHỔ (MASS SPECTROMETRY-MS)	15
Chương 2: VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. VẬT LIỆU	18
2.2. DỤNG CỤ - HÓA CHẤT	18
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.3.1. Thu thập và định danh loài bằng chỉ thị phân tử	18
2.3.2. Phương pháp khử trùng hạt và đưa mẫu vào nuôi cấy <i>in vitro</i>	19
2.3.3. Phương pháp chuyển gen thông qua <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20
2.3.4. Đánh giá các dòng rễ tơ chuyển gen trong phòng thí nghiệm	20
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1. THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH LOÀI BÁ BỆNH BẰNG CHỈ THỊ DNA	26
3.1.1. Thu thập mẫu	26
3.1.2. Định danh loài bằng chỉ thị DNA	27
3.2. KẾT QUẢ KHỬ TRÙNG HẠT VÀ ĐƯA CÁC MẪU BÁ BỆNH VÀO NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> LÀM NGUYÊN LIỆU CHO NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO VÀ CHUYỂN GEN TẠO RỄ TƠ	31
3.3. TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀ TIẾN HÀNH CHUYỂN GEN TẠO RỄ TƠ THÔNG QUA <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	33
3.3.1. Tối ưu hóa quy trình chuyển gen thông qua <i>A. rhizogenes</i>	33
3.3.2. Kết quả chuyển gen tạo rễ tơ thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	35
3.3.3. Kết quả thử nghiệm các môi trường nuôi cấy rễ tơ bá bệnh	37
3.3.4. Các hình thái của rễ tơ bá bệnh	39
3.3.5. Kiểm tra các dòng rễ tơ chuyển gen	40

3.3.6. Kết quả nuôi sinh khối rễ tơ cây bá bệnh trên môi trường WPM lỏng.....	42
3.4. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ TRONG DÒNG RỄ TƠ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ BẢN MỎNG VÀ KHỐI PHỔ KẾ..	42
3.4.1. Kết quả sắc ký bản mỏng.....	42
3.4.2. Kết quả phân tích hợp chất tự nhiên của rễ bá bệnh	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO	47

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) hay Tongkat Ali là cây thảo dược phân bố chủ yếu ở khu vực Đông Nam Á. Cây Bá bệnh là cây thuốc quý hiếm với khả năng trị bách bệnh, đã được tìm thấy ở Việt Nam tại Vườn quốc gia Bái Tử Long từ năm 2000, mọc tự nhiên ở hầu hết các diện tích đất rừng tại đây.

Trên thế giới, từ lâu cây này đã được biết đến như là nhân sâm Malaysia, cũng như tại nhiều nước Đông Nam Á như Indonesia, Brunei, Thái lan, Campuchia, Lào... với tác dụng giúp nam giới tăng cường chức năng sinh lý và sức khoẻ tình dục. Các bộ phận của cây được sử dụng nhiều trong các bài thuốc truyền thống chữa các bệnh sốt rét, bệnh tiểu đường, kháng lại các bệnh do vi sinh vật và tăng cường chức năng sinh lý và sức khoẻ tình dục, bổ sung năng lượng cho cơ thể, giúp giảm stress, mệt mỏi, tăng cường miễn dịch, ngăn ngừa khối u và phòng chống lão hoá. Các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được tìm thấy từ các bộ phận khác nhau của cây như eurycomaoside, eurycolactone, eurycomalactone, eurycomanone, và pasakbumin-B, cùng với các alkaloid và quassinoid. Cây Bá bệnh đã được sản xuất và sử dụng dưới dạng thực phẩm chức năng tại nhiều nước ở châu Á, Tây Âu và Hoa Kỳ.

Ở Việt Nam, các kết quả nghiên cứu ban đầu của các nhà khoa học trường Đại học Dược Hà Nội vào năm 2006 cho thấy cây bá bệnh tại Việt Nam cũng có tác dụng không thua kém các nước trong khu vực.

Hiện nay, giá trị y dược quý của cây Bá bệnh đã được nhiều người biết đến; do đó cần quản lý và sử dụng các phương pháp khoa học để khai thác bền vững nguồn tài nguyên này. Trước tình hình trên, bên cạnh việc nghiên cứu giá trị của cây Bá Bệnh ở Việt Nam, phân tích tác dụng dược lý để đưa ra những hướng dẫn chiết xuất, sử dụng phù hợp với sức khoẻ cộng đồng, cần sớm nghiên cứu áp dụng nuôi cấy sinh khối tế bào thực vật tạo nguồn nguyên liệu ổn định, đáp ứng nhu cầu làm thuốc.

Những năm gần đây, cùng với xu hướng chung trên thế giới, ở nước ta hướng nghiên cứu công nghệ sinh khối tế bào thực vật để sản xuất các sản phẩm thứ cấp đã bắt đầu được quan tâm đầu tư phát triển. Tuy nhiên quá trình nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật nhằm làm giảm hoặc mất tính biệt hóa ở các mô tế bào

nuôi cấy cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng vào trong môi trường nuôi cấy. Vấn đề này là một trong những trở ngại lớn do tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối tế bào nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm và sức khỏe người sử dụng. Việc này hoàn toàn có thể khắc phục trong nuôi cấy sinh khối từ rễ tơ. Rễ tơ là một bệnh ở thực vật được gây ra bởi quá trình tương tác giữa vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* và tế bào vật chủ. Rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh, phát triển tốt trên môi trường không cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng và có thể nuôi cấy tạo sinh khối liên tục điều này có ý nghĩa trong dây chuyền sản xuất các hợp chất thứ cấp hay các dược phẩm sinh học tái tổ hợp. Rễ tơ có thể sản xuất một lượng lớn các hợp chất thứ cấp và là cơ quan biệt hóa nên rễ tơ có sự di truyền ổn định hơn nuôi cấy tế bào huyền phù và mô sẹo. Xuất phát từ các ưu điểm trên và do hợp chất dược lý quý của Bá bệnh chủ yếu thu được từ rễ, chúng tôi đã thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu xây dựng quy trình tạo sinh khối thông qua hệ thống nuôi cấy rễ tơ của cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia*)**”. Công trình này được thực hiện tại phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2. Mục đích nghiên cứu

Mục tiêu tổng quát: Nghiên cứu cơ sở khoa học và thực nghiệm của việc tạo sinh khối cây bá bệnh làm nguyên liệu dược và thực phẩm chức năng bằng công nghệ nuôi cấy rễ tơ.

Mục tiêu cụ thể:

- Thu thập được mẫu cây Bá Bệnh làm nguyên liệu cho nuôi cấy mô tế bào và chuyển gen tạo rễ tơ.
- Tối ưu hóa được quy trình chuyển gen thông qua *Agrobacterium rhizogenes* và tạo được các dòng rễ tơ.
- Đánh giá điều kiện nuôi cấy và chọn lọc được một số dòng rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh để nuôi cấy tạo sinh khối.
- Bước đầu đánh giá hàm lượng hoạt chất của sản phẩm nuôi cấy thu được so với dược liệu tự nhiên.

3. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập và định danh mẫu cây bá bệnh bằng chỉ thị phân tử
- Đưa mẫu cây bá bệnh vào nuôi cấy *in vitro*

- Nghiên cứu tối ưu quy trình chuyển gen sử dụng *Agrobacterium rhizogenes*, tạo rễ tơ bá bệnh và xác định các điều kiện môi trường thích hợp cho sinh trưởng
- Đánh giá sơ bộ hàm lượng hoạt chất của sản phẩm nuôi cấy thu được so với dược liệu tự nhiên .

4. Ý nghĩa khoa học

Làm cơ sở cho việc sản xuất quy mô công nghiệp sinh khối rễ tơ cây bá bệnh cho mục đích làm nguyên liệu dược và thực phẩm chức năng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cây bá bệnh

1.1.1. Giới thiệu và phân bố địa lý

Cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) hay Tongkat Ali là cây thảo được phân bố chủ yếu ở khu vực Đông Nam Á. Bá bệnh là một cây thuốc được sử dụng trong dân gian từ rất lâu, nó còn được gọi với những cái tên khác đó là: cây mật nhân, hay cây bách bệnh. Tại Việt Nam bá bệnh có mặt trong vườn quốc gia Bái Tử Long, khu Bảo tồn thiên nhiên Đồng Sơn- Kỳ Thượng, Hoàn Bò, Quảng Ninh, một số rừng ở Tây Nguyên .

Cây Bá bệnh từ lâu đã được biết đến như là nhân sâm Malaysia, cũng như tại nhiều nước Đông Nam Á như Indonesia, Brunei, Thái lan, Campuchia, Lào... với tác dụng giúp Nam giới tăng cường chức năng sinh lý và sức khỏe tình dục. Các bộ phận của cây được sử dụng nhiều trong các bài thuốc truyền thống chữa các bệnh sốt rét, bệnh tiểu đường, kháng lại các bệnh do vi sinh vật [21] và tăng cường chức năng sinh lý và sức khỏe tình dục, bổ sung năng lượng cho cơ thể, giúp giảm stress, mệt mỏi, tăng cường miễn dịch, ngăn ngừa khối u và phòng chống lão hóa.

1.1.2. Phân loại

Giới:	Plantae
Ngành:	Magnoliophyta
Lớp:	Magnoliopsida
Bộ:	Sapindales
Họ:	Simaroubaceae
Chi:	<i>Eurycoma</i>
Loài:	<i>E. longifolia</i>



Hình 1. Cây Bá bệnh

Tên hai phần: *Eurycoma longifolia* Jack