

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VŨ HOÀI SƠN

**XÂY DỰNG MÃ VẠCH DNA CỦA CÂY GIẢO CỔ LAM  
(*Gynostemma pentaphyllum*)**

Chuyên ngành: Di truyền học  
Mã số: 60 42 01 21

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên, 4- 2016

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. 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 từng ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, tháng 04 năm 2016*

Tác giả

**Vũ Hoài Sơn**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành đề tài luận văn thạc sĩ này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Hoàng Phú Hiệp và các thầy, cô, cán bộ Bộ môn Di truyền&Sinh học hiện đại, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi tiến hành các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài luận văn.

**Tác giả**

***Vũ Hoài Sơn***

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
Trang bìa phụ	
Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn .....	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục từ và chữ viết tắt .....	iv
Danh mục bảng.....	v
Danh mục hình .....	vi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài .....	2
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>3</b>
1.1. NGUỒN GỐC, PHÂN LOẠI VÀ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÂY GIẢO CỔ LAM .....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học .....	3
1.1.3. Đặc điểm sinh thái học .....	4
1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ GIÁ TRỊ SỬ DỤNG .....	4
1.2.1. Thành phần hóa học .....	4
1.2.2. Giá trị sử dụng của Giảo cổ lam .....	6
1.3. DNA LỤC LẠP, MÃ VẠCH DNA VÀ GEN <i>matK</i> .....	7
1.3.1. DNA lục lập .....	7

1.3.2. Mã vạch DNA (DNA barcoding).....	10
1.3.3. Gen <i>matK</i> .....	16
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP</b> .....	<b>22</b>
1.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ, ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU.....	22
1.1.1. Vật liệu .....	22
1.1.2. Hóa chất và thiết bị .....	22
1.1.3. Địa điểm nghiên cứu .....	22
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.2.1. Phương pháp thu mẫu và phân tích đặc điểm thực vật học .....	22
2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử.....	23
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>27</b>
3.1. ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC CỦA MẪU CÂY GIẢO CỔ LAM.....	27
3.1.1. Đặc điểm thực vật học của mẫu Giảo cổ lam Chợ Đồn, Bắc Kạn.....	27
3.1.2. Đặc điểm thực vật học của mẫu Giảo cổ lam Ngọc Đường, Hà Giang	28
3.1.3. Đặc điểm thực vật học của mẫu Giảo cổ lam thu tại xã Quyết Tiến, huyện Quản Bạ, Hà Giang .....	30
3.1.4. Đặc điểm thực vật học của mẫu Giảo cổ lam Sapa, Lào Cai .....	31
3.2. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN <i>matK</i> PHÂN LẬP TỪ CÂY GIẢO CỔ LAM .	32
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA từ lá cây Giảo cổ lam.....	32
3.2.2. Kết quả nhân gen <i>matK</i> bằng phản ứng PCR .....	33
3.2.3. Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen <i>matK</i> phân lập từ từ mẫu Giảo cổ lam Sapa, Lào Cai.....	34
3.3. SỰ ĐA DẠNG VỀ TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID CỦA GEN <i>matK</i> CỦA CÂY GIẢO CỔ LAM .....	39
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	44
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	45

**DANH MỤC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT**

CTAB:	Cetyl trimethyl ammonium bromide
Cs:	Cộng sự
DNA:	Deoxyribonucleic acid
EDTA:	Ethylenediamine tetraacetate
<i>matK</i> :	Maturase K (gen lục lạp ở thực vật có diệp lục)
PCR:	Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi chuỗi polymerase)
RNA:	Ribonucleic acid
TAE:	Tris - acetic acid – EDTA (dung dịch đệm TAE)

## DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1. Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR nhân gen matK.....	25
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen matK .....	25
Bảng 3.1. Các vị trí nucleotide sai khác giữa hai trình tự nucleotide của đoạn gen matK của KF269170 và GCL-SP.....	37
Bảng 3.2. Các vị trí amino acid sai khác giữa mẫu Giảo cổ lam với protein suy diễn từ trình tự gen mang mã số KF269170.1 .....	39
Bảng 3.3. Trình bày mã số, năm công bố, quốc gia và tác giả của các trình tự gen matK trên Ngân hàng gen.....	40
Bảng 3.4. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự các nucleotide của các mẫu Giảo cổ lam. ....	40
Bảng 3.5. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác về trình tự amino acid suy diễn của các mẫu Giảo cổ lam. ....	42

## DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 3.1. Hình ảnh thân, rễ, lá của mẫu cây Giảo cổ lam thu tại huyện Chợ Đồn, Bắc Kạn. ....	27
Hình 3.2. Hình ảnh thân, rễ, lá của mẫu cây Giảo cổ lam thu tại xã Ngọc Đường, thành phố Hà Giang. ....	29
Hình 3.3. Hình ảnh thân, rễ, lá của mẫu cây Giảo cổ lam thu tại xã Quyết Tiến, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang. ....	30
Hình 3.4. Hình ảnh thân, lá của mẫu cây Giảo cổ lam thu tại Sapa, Lào Cai. (A, D, F: đoạn thân leo; B, C, E: lá kép chân vịt 5 lá chét) ....	32
Hình 3.5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm DNA tổng số. ....	33
Hình 3.6. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen matK từ ba mẫu Giảo cổ lam (Làn 1: GCL – HG ; làn 2: GCL – SP ; làn 3: GCL – CD).....	33
Hình 3.7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tinh sạch gen matK. ....	34
Hình 3.8. Trình tự nucleotide của đoạn gen matK phân lập từ mẫu Giảo cổ lam Sapa (GCL – SP) và trình tự gen matK mang mã số KF269170 trên Ngân hàng Gen. ....	36
Hình 3.9. Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen matK của các mẫu Giảo cổ lam .....	38
Hình 3.10. Mối quan hệ di truyền của mẫu Giảo cổ lam dựa trên phân tích trình tự nucleotide của gen matK. ....	41
Hình 3.11. Mối quan hệ di truyền của các mẫu Giảo cổ lam dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen matK .....	42



## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Đối với nước ta dược liệu có một vị trí quan trọng. Nước ta nằm trong vùng nhiệt đới, chịu ảnh hưởng của gió mùa. Nhiệt độ trung bình hàng năm là  $25^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm khá cao tạo điều kiện thuận lợi cho cây cối phát triển. Diện tích rừng chiếm 2/3 diện tích đất. Hệ thực vật rất phong phú và đa dạng, cả nước có khoảng 20.000 loài trong đó có trên 1.000 loài cây thuốc. Về mặt kinh tế, nhà nước đã xếp cây thuốc vào loại cây công nghiệp cao cấp cần được phát triển như những cây công nghiệp khác. Hàng năm công ty Dược liệu cấp I và cấp II và gần đây các công ty tư nhân đã biết khai thác nhiều mặt hàng dược liệu để xuất khẩu như giảo cổ lam, quế, sa nhân, dứa cạn, các loại tinh dầu hồi, quế, trầm...

Giảo cổ lam là cây dược liệu quý, có thành phần hóa học chính là flavonoid và saponin. Giảo cổ lam có nhiều thành phần giống như nhân sâm song hàm lượng saponin có trong giảo cổ lam lại nhiều gấp 3 – 4 lần so với nhân sâm. Saponin đóng vai trò quan trọng đối với ngành công nghiệp dược phẩm trong việc sản xuất các loại thuốc có giá trị, trong số đó quan trọng nhất là điều trị ung thư. Dù Giảo cổ lam không thể hoàn toàn thay thế nhân sâm, song xét về một số phương diện, hiệu quả mà giảo cổ lam mang lại còn tốt hơn cả nhân sâm. Ở Việt Nam chủ yếu nghiên cứu, phân loại dựa trên hình thái và nghiên cứu tác dụng dược liệu của cây Giảo cổ lam.

Đến nay, các mẫu sinh vật vẫn thường được nhận diện bằng các đặc tính hình thái, giải phẫu hoặc các đặc tính sinh lý, sinh hóa nhờ vào bảng hướng dẫn định danh có sẵn. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, mẫu vật chưa phát triển đầy đủ các đặc tính hình thái, hoặc chúng bị hư hỏng các bộ phận ngoài, hoặc mẫu vật chết đã khiến quá trình nhận diện mẫu vật trở nên

khó khăn thậm chí là không thể. Trong những trường hợp này mã vạch DNA đã giúp giải quyết bài toán trên vì trình tự DNA dễ dàng thu nhận từ một mẫu mô rất nhỏ. Hơn nữa, mã vạch DNA còn là cơ sở cho việc định danh mẫu vật, phân tích sự tiến hóa sinh học của loài trong tự nhiên.

Xuất phát từ những cơ sở trên chúng tôi đã lựa chọn và thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ là: **“Xây dựng mã vạch DNA của cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*)”**.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

Phân tích được đặc điểm của trình tự gen lục lạp *matK* phân lập từ các giống giảo cổ lam phục vụ xây dựng mã vạch DNA cho Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*).

## **3. Nội dung nghiên cứu**

3.1. Nghiên cứu một số đặc điểm thực vật học của cây Giảo cổ lam thu từ một số địa phương miền núi phía Bắc Việt Nam.

3.2. Nghiên cứu nhân bản và phân tích đặc điểm của gen *matK* phân lập từ DNA lục lạp của cây Giảo cổ lam.

3.3. Phân tích sự đa dạng của các mẫu Giảo cổ lam dựa trên trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen *matK*.

## **4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài**

Về khoa học, kết quả xác định trình tự gen *matK* phân lập từ DNA lục lạp sẽ góp phần làm cơ sở cho việc xây dựng mã vạch DNA của cây Giảo cổ lam.

Về thực tiễn, nghiên cứu đặc điểm sinh học và giá trị của cây Giảo cổ lam cũng như xác định trình tự gen *matK* là những kết quả ban đầu cho việc phát triển và sử dụng hiệu quả cây Giảo cổ lam ở Việt Nam.