

BỘ GIÁO DỤC

VIỆN HÀN LÂM

VÀ ĐÀO TẠO

KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



NGUYỄN ĐÌNH TRỌNG

**NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY SINH KHỐI RỄ TƠ SÂM DÂY
(*Codonopsis* sp.) TRONG HỆ THỐNG BIOREACTOR**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội, 2015

BỘ GIÁO DỤC

VIỆN HÀN LÂM

VÀ ĐÀO TẠO

KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

**NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY SINH KHỐI RỄ TƠ SÂM DÂY
(*Codonopsis* sp.) TRONG HỆ THỐNG BIOREACTOR**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

Học viên: Nguyễn Đình Trọng

Hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Chu Hoàng Hà

Hà Nội, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận văn này hoàn toàn được hoàn thiện bằng quá trình nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn trực tiếp của PGS. TS. Chu Hoàng Hà cùng với cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học. Các số liệu hình ảnh, kết quả được trình bày trong luận văn này là trung thực, không sao chép bất cứ tài liệu, công trình nghiên cứu của người khác mà không chỉ rõ nguồn tham khảo. Tôi xin chịu trách nhiệm về lời cam đoan của mình trước hội đồng khoa học.

Hà Nội, tháng 12 năm 2015

Học viên

Nguyễn Đình Trọng

LỜI CẢM ƠN

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

PGS. TS. Chu Hoàng Hà, 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.

TS. Phạm Bích Ngọc, Phó trưởng phòng Công nghệ tế bào thực vật – Viện Công nghệ sinh học, người cô, người chị đã trực tiếp hướng dẫn, luôn theo sát thí nghiệm của tôi để đưa ra những lời khuyên bổ ích và kịp thời cho tôi ngay từ những ngày đầu tiên tôi bước vào phòng thí nghiệm.

GS. TS. Lê Trần Bình, PGS. TS. Lê Văn Sơn, TS. Chu Nhật Huy, KS. Nguyễn Khắc Hưng, CN. Nguyễn Phú Tâm và các cán bộ phòng Công nghệ tế bào thực vật đã giúp đỡ, chỉ bảo tận tình về chuyên môn.

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. Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ quý báu này.

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, bạn bè đã luôn ở bên, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn này.

Hà Nội, tháng 12 năm 2015

Học viên

Nguyễn Đình Trọng

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	v
MỞ ĐẦU	1
1.1.Đặt vấn đề	1
1.2.Mục đích nghiên cứu	2
1.2.1.Mục tiêu tổng quát	2
1.2.2.Mục tiêu cụ thể	2
1.3.Nội dung nghiên cứu	3
1.4.Ý nghĩa khoa học	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1.Tổng quan về cây Sâm dây	4
1.1.1. Giới thiệu về phân bố địa lý	4
1.1.2. Phân loại	4
1.1.3. Hình thái	4
1.1.4. Tác dụng dược lý của cây Sâm dây	5
1.1.5. Tính cấp thiết của việc nghiên cứu, bảo tồn và sản xuất bền vững cây Sâm dây	11
1.2.Nuôi cấy sinh khối rễ tơ – giải pháp tạo nguồn dược phẩm sạch phục vụ sức khỏe cộng đồng	12
1.2.1. Giới thiệu về nuôi cấy sinh khối tế bào	12
1.2.2. Giới thiệu về <i>Agrobacterium rhizogenes</i> – phương pháp tạo rễ tơ ở tế bào thực vật	13
1.2.3. Cơ chế chuyển các gen vùng T-DNA vào tế bào thực vật	14
1.2.4. Nuôi cấy sinh khối rễ tơ	17
1.2.5. Ứng dụng hệ thống bioreactor trong nuôi cấy sinh khối rễ tơ	22
1.2.6. Ảnh hưởng của elicitor đến khả năng tích lũy các chất thứ cấp	24
1.3.Một số phương pháp tách chiết, phương pháp định tính và định lượng saponin	26
1.3.1. Phương pháp tách chiết	26
1.3.2. Một số phương pháp định tính saponin	27
1.3.3. Ứng dụng phương pháp quang phổ trong định lượng saponin tổng số	28
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1.Vật liệu nghiên cứu	29

2.2. Thiết bị và hoá chất nghiên cứu -----	29
2.3. Phương pháp nghiên cứu -----	29
2.3.1. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật -----	29
2.3.2. Đánh giá các dòng chuyển gen bằng phương pháp PCR-----	30
2.3.3. Đánh giá khả năng tăng sinh của các dòng rễ tơ Sâm dây -----	31
2.3.4. Xác định kích thước mẫu cấy phù hợp cho nuôi cấy -----	32
2.3.5. Xác định loại môi trường thích hợp cho nuôi cấy rễ tơ trên môi trường thạch.-----	32
2.3.6. Xác định loại môi trường lỏng thích hợp cho nuôi cấy rễ tơ -----	33
2.3.7. Ảnh hưởng của salicylic acid (SA) lên sinh trưởng và tích lũy chất khô trong rễ tơ Sâm dây-----	33
2.3.8. Lựa chọn mô hình nuôi cấy bioreactor phù hợp-----	34
2.3.9. Phương pháp nuôi cấy sinh khối rễ tơ trong hệ thống bioreactor-----	34
2.3.10. Phương pháp tách chiết saponin từ sinh khối rễ tơ -----	35
2.3.11. Phương pháp bán định lượng hàm lượng saponin trong sinh khối rễ tơ -----	35
2.3.12. Phương pháp tính toán -----	36
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN -----	37
3.1. Kiểm tra đánh giá các dòng rễ tơ chuyển gen bằng phương pháp PCR -----	37
3.2. Đánh giá tốc độ sinh trưởng của các dòng rễ tơ Sâm dây -----	39
3.3. Xác định kích thước mẫu phù hợp cho nuôi cấy -----	41
3.4. Xác định loại môi trường thích hợp cho nuôi cấy rễ tơ trên môi trường đặc -----	42
3.5. Kết quả nuôi cấy rễ tơ trên các môi trường lỏng khác nhau -----	43
3.6. Ảnh hưởng của salicylic acid (SA) lên sinh trưởng và tích lũy hợp chất thứ cấp trong rễ tơ Sâm dây -----	45
3.7. Lựa chọn mô hình nuôi cấy bioreactor phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất tại Viện Công nghệ sinh học -----	47
3.8. Kết quả nuôi cấy rễ tơ sâm dây trên các mô hình bioreactor -----	49
3.9. Kết quả bán định lượng hàm lượng saponin tổng số trong sinh khối rễ tơ, so sánh với sâm tự nhiên -----	52
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ -----	55
1.1. Kết luận -----	55
1.2. Kiến nghị -----	55
TÀI LIỆU THAM KHẢO -----	56

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<i>A. rhizogenes</i>	:	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i>	:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Aux</i>	:	Auxin
B5	:	Gamborg B5, 1968
bp	:	Base pair
DNA	:	Desoxyribonucleic acid
<i>GusA</i>	:	β -glucuronidase
kp	:	Kilobase pair
LB	:	Left border
MS	:	Murashige and Skoog, 1962
MeOH	:	Methanol
RB	:	Right border
Ri-plasmid	:	Root induction plasmid
<i>Rol</i>	:	Root locus
SA	:	Salicylic acid
SH	:	Schenk và Hildebrandt, 1972
sp	:	Species
ss T-DNA	:	Single strain T-DNA
<i>vir</i>	:	Virulence genes
JA	:	Jasmonic acid
WPM	:	McCown's Woody Plant, 1981

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Cấu trúc hóa học 7 saponin trong <i>Codonopsis lanceolata</i> -----	6
Bảng 1.2. Khả năng ức chế khối u ở chuột của CPPW1 và CPPW1B-----	8
Bảng 1.3. Một số loài thực vật được nuôi cấy rễ tơ để thu hoạt chất sinh học -----	20
Bảng 2.1. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu-----	30
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>rolA</i> , <i>rolB</i> , <i>rolC</i> -----	31
Bảng 3.1. Sự phát triển của các đoạn rễ tơ sâm dây có kích thước khác nhau -----	41
Bảng 3.2. Sự phát triển của rễ tơ sâm dây trên các loại môi trường khác nhau -----	42
Bảng 3.3. So sánh thành phần của các môi trường cơ bản MS, B5, WPM, SH -----	43
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của SA đến sự sinh trưởng của rễ tơ Sâm dây-----	45
Bảng 3.5. Kết quả nuôi cấy rễ tơ sâm dây trên các hệ thống bioreactor khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy -----	51
Bảng 3.6. Kích thước củ Sâm dây 1 -3 tuổi thu thập ở Kon Tum-----	52
Bảng 3.7. Kết quả xác định hàm lượng saponin tổng số-----	53

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cây Sâm dây-----	4
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học saponin trong sâm dây (Ichikawa <i>et al.</i> , 2009) -----	6
Hình 1.3. Cơ chế chuyển gen chung của <i>Agrobacterium</i> -----	15
Hình 1.4. Các hệ thống rễ tơ Sâm dây được nuôi cấy tại Viện Công nghệ sinh học	19
Hình 1.5. Hệ thống bioreactor sủi bọt dạng cầu -----	24
Hình 3.1. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen <i>rolA</i> , <i>rolB</i> , <i>rolC</i> bằng kỹ thuật PCR -----	38
Hình 3.2. Kết quả khảo sát tốc độ sinh trưởng của các dòng rễ tơ Sâm dây-----	40
Hình 3.3. Sự phân nhánh và kéo dài của các mẫu rễ tơ sau 2 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau.-----	42
Hình 3.4. Đường cong sinh trưởng của rễ tơ sâm dây trên các môi trường khác nhau -----	44
Hình 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của SA đến sinh trưởng rễ tơ Sâm dây -----	46
Hình 3.6. Hệ thống bioreactor mà TS. Nguyễn Hữu Hồ sử dụng tại Viện Sinh học nhiệt đới -----	48
Hình 3.7. Hệ thống bioreactor PGS. TS. Dương Tấn Nhựt sử dụng tại Viện Sinh học Tây Nguyên-----	48
Hình 3.8. Hệ thống bioreactor trong ngành công nghiệp dược phẩm ở Hàn Quốc -	48
Hình 3.9. Hệ thống bioreactor đang được sử dụng tại Viện Công nghệ sinh học---	49
Hình 3.10. Rễ tơ thu được sau 4 tuần nuôi cấy trên hệ thống bioreactor 5 lít -----	50
Hình 3.11. Các mẫu củ Sâm dây thu thập tại Kon Tum -----	52

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Sâm dây hay Đẳng sâm có danh pháp khoa học là *Codonopsis* sp., một loài thực vật lâu năm thuộc họ Hoa chuông (Campanulaceae). Chúng có nguồn gốc từ khu vực Đông Bắc châu Á và bán đảo Triều Tiên. Rễ của đẳng sâm được sử dụng trong y học cổ truyền từ xa xưa với tác dụng bổ ngũ tạng, tăng sức dẻo dai, tăng cường khả năng miễn dịch cho cơ thể, có tác dụng bổ huyết, chống mệt mỏi, giảm stress. Trong sâm dây chứa các hoạt chất chủ yếu như saponin, polysaccharide, triterpen, steroid... Do có nhiều công dụng trong y dược nên sâm dây có nguy cơ bị khai thác quá mức làm giảm khả năng tái sinh và phát triển. Cây Sâm dây đã được đưa vào chương trình bảo tồn các loài cây quý hiếm và được đưa vào sách đỏ vào năm 1996 (theo Sách đỏ Việt Nam – phần Thực vật, NXB KHTNCN, 2007).

Những giá trị y dược quý của cây Sâm dây hiện nay đã được trong và ngoài nước công nhận, do đó việc khai thác, sử dụng và quản lý bền vững nguồn tài nguyên này cần được quan tâm triệt để. 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 trong quá trình nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật để làm giảm hoặc mất tính biệt hoá ở các mô tế bào nuôi cấy cần bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng vào trong môi trường nuôi cấy. Vấn đề này là một trong những trở ngại lớn nhất do tồn dư của các chất điều hoà sinh trưởng trong sinh khối tế bào nuôi cấy. Điều này đã ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm cũng như sức khoẻ người tiêu dùng. Việc này hoàn toàn có thể khắc phục trong nuôi cấy sinh khối từ rễ tơ.

Rễ tơ là một loại bệnh xuất hiện ở thực vật bậc cao do sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* gây ra. Đặc biệt, rễ tơ có thể sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường không có chứa chất điều hoà sinh trưởng. Do khả năng sinh trưởng nhanh, kỹ thuật nuôi cấy đơn giản kết hợp hệ thống bioreactor, rễ tơ