

THỬ NGHIỆM

Số 27 Tháng 7/2020
ISSN 2588 - 1469

NGÀY NAY



TẠP CHÍ CỦA HỘI CÁC PHÒNG THỬ NGHIỆM VIỆT NAM

*Web: www.vinalab.org.vn

*Email: tapchi@vinalab.org.vn

NGHIÊN CỨU & TRAO ĐỔI

06

Xác thực hạ thủ ô đồ dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR vùng Intron của Gen lập thể atpF

13

Nghiên cứu nuôi cấy Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên giá thể sâu chít và xây dựng tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm

19

Định lượng thuốc diệt cỏ nhóm Acid Herbicide và Dicamba trong mẫu Nông nghiệp bằng hệ thống SCIEX QTRAP 6500+

23

Moderna công bố dữ liệu tạm thời của giai đoạn 1 cho vắc-xin mRNA (mRNA-1273) chống lại Coronavirus

26

Một số ứng dụng của AAS trong phân tích mỹ phẩm

29

Xét nghiệm kháng thể COVID-19: Các nhà khoa học của trường Đại học Bắc Carolina đề xuất xét nghiệm huyết thanh học SARS-CoV-2 mới

31

Phương pháp lấy mẫu thử nghiệm thuốc bảo vệ thực vật trong hoạt động đánh giá chứng nhận hợp quy

36

Quang phổ Higgs: Phương pháp mới để đo chất siêu dẫn

38

Các nhà khoa học phân lập kháng thể trung hòa vi-rút corona từ bệnh nhân COVID -19 và thử nghiệm thành công trên động vật

40

Chống lão hóa bằng cách sử dụng huyết tương pha loãng với nước muối và albumin

AN TOÀN THỰC PHẨM

42

EVFTA và yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm đối với các mặt hàng nông sản

LABS

45

10 kỹ năng quản lý cần có của người quản lý phòng thử nghiệm

48

Công nghệ mới thay đổi an toàn phòng thử nghiệm

50

Tiêu chuẩn phòng thử nghiệm OSHA

54

Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp 3 phải đảm bảo những yếu tố gì?

56

Tối ưu hóa phòng thử nghiệm mang lại môi trường hoạt động thử nghiệm hiệu quả và nhiều lợi ích tiềm năng

Giá: 65.000VNĐ

XÁC THỰC HÀ THỦ Ô ĐỎ DỰA VÀO ĐA HÌNH CHIỀU DÀI SẢN PHẨM PCR VÙNG INTRON CỦA GEN LẠP THỂ ATPF

Nguyễn Tường Vân¹, Nguyễn Chi Mai², Lê Quang Trung³

(1) Viện Công nghệ Sinh học (2) Viện Hóa sinh Biển (3) Viện An toàn Thực phẩm

TÓM TẮT

Củ hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora*) là dược thảo, được dùng để chữa các bệnh trầm cảm, thiếu máu và rụng tóc... Hiện nay, củ hà thủ ô đỏ khô thái lát đang bị trộn lẫn củ nâu (*Dioscorea cirrhosa*) và được tiêu thụ trên thị trường nước ta. Trong nghiên cứu này, 10 mẫu củ khô thái lát, bao gồm 8 mẫu xác thực, 1 mẫu hà thủ ô (Fm) và 1 mẫu củ nâu (Dc) đối chứng được xác thực dựa vào kỹ thuật PCR bằng mỗi nhân atpF1 và atpF2 để nhân bản đoạn intron trên gen lục thể atpF của 2 loài. Kết quả nhân bản bằng PCR, khẳng định bằng phân tích chủng loại và phân tích mức tương đồng về trình tự ADN của sản phẩm PCR cho thấy đoạn intron 850bp là chỉ thị đặc hiệu cho củ hà thủ ô đỏ và đoạn 1050bp cho củ nâu. Trên cây chủng loại, đa hình trình tự DNA đoạn 850bp nhóm 5 mẫu xác thực với mẫu Fm và các trình tự tham chiếu của củ hà thủ ô đỏ trên ngân hàng gen thành 1 nhánh với khoảng cách di truyền thấp (16-53%); đoạn 1050bp nhóm 3 mẫu xác thực với mẫu Dc và các trình tự tham chiếu thành 1 nhánh khác chỉ với khoảng cách di truyền 12-46%. Giữa 2 nhánh có khoảng cách di truyền tới 100%. Mức tương đồng về trình tự DNA đoạn 850bp giữa 5 mẫu xác thực, các mẫu tham chiếu và Fm tới 99,4-100% và mức tương đồng đoạn 1050bp của 3 mẫu, các mẫu tham chiếu và Dc tới 99,6-100%. Như vậy, đa hình chiều dài sản phẩm PCR của đoạn intron trên gen atpF là chỉ thị để phân biệt 5 mẫu là củ hà thủ ô đỏ và 3 mẫu là củ nâu trong tổng số 8 mẫu xác thực.

Từ khóa: Xác thực, củ hà thủ ô đỏ khô, củ nâu khô, PCR, intron của gen lục thể atpF

ABSTRACT

Fallopia multiflora (Fm) roots are important medical herbs for treatment of depression, anemia, hair-loss, ect. Recently, sliced - dried *Fallopia multiflora* roots are being mixed with *Dioscorea cirrhosa* (Dc), and traded and consumed rampantly in the market. In this research, 10 samples of dry roots, consisting of 8 tests, 1 for positive control of Fm and 1 for positive control of Dc were authenticated based on PCR techniques with atpF1F and atpF2R primers to amplify intron region on atpF chloroplast gene of the two species. Results of PCR amplification, whose products were confirmed by phylogenetic analysis and measurement of homological levels of DNA sequences of PCR products revealed that fragments of 850bp-intron was specific marker for *F. multiflora* samples and 1050bp-intron fragments to *D. cirrhosa*. On phylogenetic tree, polymorphism of 850bp fragments grouped 5 tested samples, Fm and related sequences of references in Genbank into one clade with low genetic distance (16-53%), while that of 1050bp fragments grouped 3 samples together with Dc sample and referred sequences into another clade with genetic distance of only 12-46%. Two clades showed significant genetic distance of 100%. Homology level of 850bp sequence when aligned 5 tested samples, referred sequences and Fm was as high as 99,4-100% and that of 1050bp sequence of 3 tested samples, referred sequences and Dc was also high from 99,6-100%. In conclusion,

fragment polymorphism of PCR products of the intron region on *atpF* chloroplast gene was DNA marker to determine 5 *F. multiflora* samples and 3 samples of *D. cirrhosa* in total of 8 tested samples.

Keywords: *Authenticity, Fallopia multiflora* dry roots, *Dioscorea cirrhosa* dry roots, PCR amplification, intron on *atpF* chloroplast gene.

1. MỞ ĐẦU

Cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson hoặc *Polygonum multiflorum*), thuộc họ rau răm (*Polygonaceae*). Do có chứa hàm lượng TSG (2,3,5,4'-tetrahydroxystilben-2-O- β -D-glucosid) cao, củ hà thủ ô đỏ có tác dụng chống lão hóa, gan nhiễm mỡ, khối u, kích thích mọc tóc với người bị rụng tóc, làm đen tóc đối với người bạc tóc sớm (Bounda and Feng, 2015; Ling and Xu, 2016). Hà thủ ô đỏ được trồng, khai thác, chế biến và thương mại ở nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Thái Lan, Malaysia... Ở nước ta, hà thủ ô đỏ phân bố chủ yếu ở các tỉnh miền núi phía bắc như Lai Châu, Điện Biên, Lào Cai, Hà Giang, Sơn La... và được đưa vào Dược điển Việt Nam (Bộ Y tế, 2009; Phạm Thanh Huyền và Nguyễn Thị Hà Ly, 2017). Hiện nay, người tiêu dùng, nhất là các công ty dược thường nhập củ hà thủ ô đỏ đã thái lát và sấy khô để chế biến sau đó phân phối cho các đại lý bán lẻ hoặc xuất khẩu. Cây củ nâu (*Dioscorea cirrhosa* Lour.), thuộc họ Củ nâu (*Dioscoreaceae*). Bên cạnh công dụng để nhuộm quần áo, củ nâu có thể sử dụng để sát trùng, cầm máu... (Kulasinghea và Ranaweera 2019). Thực tế, khó có thể phân biệt bằng mắt thường giữa các lát củ nâu và củ hà thủ ô đỏ khô. Do giá trị y học và thương mại cao nên hà thủ ô giả, hà thủ ô bị trộn lẫn với củ nâu đã và đang được bán ở thị trường nước ta làm ảnh hưởng đến vai trò bảo vệ sức khỏe đích thực của loại dược thảo này.

Gần đây, nhiều công bố trên thế giới về hệ gen lặp thể của một số loài thuộc chi *Fallopia* (Yao et al., 2019; Raman et al., 2019) và chi *Dioscorea* (Magwe-Tindo et al., 2018; Cao et al., 2018) làm cơ sở để xác định chỉ thị phân tử phân biệt 2 loài hà thủ ô đỏ và củ nâu. Kết quả phân tích trình tự ADN cho thấy, các hệ gen trên có nhiều gen với đa hình trình tự cao, nhất là gen có vùng intron (vùng không mã hóa) nằm giữa 2 vùng exon (vùng mã hóa) như gen *atpF*. Dựa vào đa hình trình tự ADN cũng như chiều dài sản phẩm PCR của một số gen trên lặp thể, Xia et al. (2019) đã xác định được hàng chục ADN barcodes để phân biệt 28 loài trong chi *Dioscorea*. Trước đó, đa hình đoạn *atpB-rbcL* trên hệ gen lặp thể cũng đã được áp dụng để phân biệt củ hà thủ ô đỏ với củ của một số loài thuộc các chi khác nhau (Liu et al., 2011).

Trong nghiên cứu này, các mẫu hà thủ ô đỏ và củ nâu được xác thực dựa vào 1) phân tích đa hình chiều dài sản phẩm PCR của đoạn intron trên gen lặp thể *atpF*; 2) xác định quan hệ chủng loại của mỗi loài và mức tương đồng về trình tự ADN của sản phẩm PCR giữa các mẫu của hà thủ ô đỏ và củ nâu. Nghiên cứu áp dụng chỉ thị phân tử trên đoạn intron của gen lặp thể *atpF* lần đầu tiên được công bố để xác thực củ hà thủ ô đỏ đang lưu hành trên thị trường nước ta. Kết quả nghiên cứu không chỉ góp phần bảo vệ quyền lợi của khách hàng mà còn là công cụ để kiểm soát gian lận thương mại trong tiêu thụ dược thảo, trong đó có hà thủ ô đỏ ở Việt Nam.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

Các lát củ khô chưa sơ chế do khách hàng cung cấp, bao gồm 8 mẫu để xác thực (S1-S8), 1 mẫu hà thủ ô đỏ (Fm) và 1 mẫu củ nâu (Dc) làm đối chứng dương. Cặp mồi nhân (*atpF*q1F: 5'-GTTTCGATT ATCTAATAAA TC-3' và *atpF*2R: 5'-GGATTGTG CTAAATATC GG-3') được thiết kế chung cho cả 2 loài trên vùng exon của gen *atpF* để nhân bản đoạn intron giữ 2 exon bằng phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon

BioSoft). Ký hiệu các mẫu, danh sách và mã truy cập các đoạn *atpF* tham chiếu trên ngân hàng gen của 2 loài thuộc chi *Fallopia* và *Dioscorea* được thể hiện ở Hình 2.

2.2. Phương pháp

Tách ADN, nhân bản bằng PCR và phân tích chỉ thị xác định loài dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR.

ADN tổng số của các mẫu được tách bằng Qiagen Dneasy plant extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn đích trên gen *atpF* của Fm khoảng 850bp và của Dc khoảng 1050bp được nhân bản bằng kit PCR của hãng Fermentas (Đức) giữa ADN tổng số của các mẫu và cặp mồi nhân *atpF* 1 và 2. Chu trình PCR gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu 96°C trong 5 phút, tiếp tục 30 chu kỳ: 95°C -0,5 phút, 55°C-1 phút, 72°C – 1,5 phút; chu kỳ cuối 72°C – 10 phút. Sản phẩm PCR được chạy trên agarose gel 1%, nhuộm bằng Ethidium Bromide, quan sát bằng tia UV và so sánh kích thước với mẫu đối chứng dương và thang ADN chuẩn (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder).

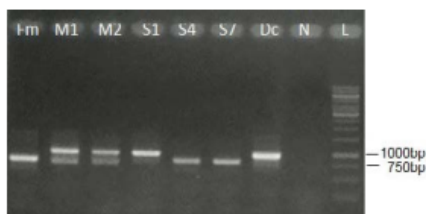
Giải trình tự sản phẩm PCR, xác định chủng loại và mức tương đồng về trình tự ADN đoạn gen đích giữa các loài.

Sản phẩm PCR của các mẫu được tinh sạch, gắn vào vector, nhân dòng trong vi khuẩn, tách dòng và gửi sang Công ty Macrogen (Korea) để giải trình tự ADN 2 chiều dựa vào cặp mồi M13. Chủng loại của các loài được phương pháp Minimum Evolution trên phần mềm Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) với khoảng cách di truyền giữa các mẫu của các loài trong chi *Fallopia* và *Dioscorea* dựa vào giá trị bootstrap (%) trên cây chủng loại. Mức tương đồng (%) về trình tự ADN trên đoạn đích đích của các mẫu được so sánh với cùng đoạn của Fm, Dc đối chứng dương cũng như của loài hà thủ ô đỏ và củ nâu đã công bố trên Ngân hàng gen trên phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft).

3. KẾT QUẢ

3.1. Chỉ thị xác thực hà thủ ô đỏ dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR

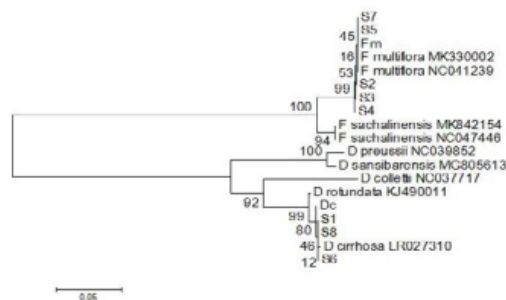
Kết quả PCR cho thấy, sản phẩm PCR của các mẫu S2-S5 và S7 có chiều dài trên 800bp, tương đương với mẫu hà thủ ô đỏ đối chứng dương (Fm). Trong khi, các mẫu S1, S6, S8 lại có chiều dài sản phẩm PCR trên 1000bp, tương đương với mẫu củ nâu đối chứng dương (Dc). Hình 1 thể hiện kết quả nhân bản bằng PCR giữa cặp mồi *AtpF* 1-2 với DNA tổng số của các mẫu đại diện (S1, S4 và S7) và mẫu trộn giữa hà thủ ô đỏ và củ nâu (M1, M2). Như vậy, các mẫu S2-S5 và S7 có thể là hà thủ ô đỏ và các mẫu S1, S6, S8 là củ nâu. Trên bản agarose gel (Hình 1) có thể xác định chỉ thị cho các mẫu hà thủ ô đỏ có chiều dài sản phẩm PCR khoảng 800bp, của củ nâu khoảng 1000bp và của mẫu trộn giữa 2 loài với 2 vạch có chiều dài khoảng 800bp và 1000bp.



Hình 1. Kết quả nhân bản bằng PCR giữa cặp mồi *AtpF* 1-2 với ADN tổng số của các mẫu xác thực đại diện và mẫu đối chứng dương. Fm: mẫu hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora*) đối chứng dương; M1, M2: mẫu trộn giữa Fm và Dc; S1, S4, S7: mẫu xác thực; Dc: mẫu của củ nâu (*Dioscorea cirrhosa*) đối chứng dương. N: đối chứng âm. L: thang DNA chuẩn (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder)

3.2. Chứng loại các mẫu dựa vào đa hình trình tự ADN của các sản phẩm PCR

Sau khi giải trình tự, so sánh với cùng đoạn ADN tham khảo của 2 loài trên Ngân hàng gen, đoạn intron trên gen lập thể *atpF* của 6 mẫu (S2-S5, S7, Fm) có chiều dài khoảng 850bp (848-852bp) và 4 mẫu (S1, S6, S8, Dc) -1050bp (1045-1055bp). Đa hình trình tự ADN của đoạn gen đích đã nhóm các mẫu xác thực, mẫu đối chứng dương và trình tự tham chiếu thành 2 nhánh trên cây phát sinh chủng loại với khoảng cách di truyền tin cậy 100% (Hình 2).



Hình 2. Kết quả phân tích chủng loại dựa vào đa hình trình tự đoạn intron trên gen *atpF* của 10 mẫu và so sánh với cùng đoạn của hà thủ ô đỏ và củ nâu trên ngân hàng gen. Fm: mẫu hà thủ ô đỏ (*F. multiflora*) đối chứng dương; Dc: mẫu của củ nâu (*D. cirrhosa*) đối chứng dương; S1-S8: mẫu xác thực; N: đối chứng âm; KJ490011, LR027310...: mã truy cập đoạn *atpF* của các loài cùng chi với Dc và Fm. Các số 16-100 trên các nhánh cây: giá trị Bootstrap về khoảng cách di truyền giữa các mẫu.

Các mẫu S2-S5 và S7 cùng nhánh với Fm (hà thủ ô đỏ đối chứng dương), 2 trình tự tham chiếu của hà thủ ô đỏ *F. multiflora* (MK330002, NC041239) và 2 loài khác cùng chi *Fallopia* với khoảng cách di truyền 16-99%. Trong khi, các mẫu S1, S6 và S8 lại cùng nhánh với củ nâu đối chứng dương Dc, 01 mẫu tham chiếu của củ nâu *D. cirrhosa* (LR027310) và 4 loài khác cùng chi *Dioscorea* với khoảng cách di truyền 12-100%. Khoảng cách di truyền thấp (16-53%) của 6 mẫu S2-S5, S7 và Fm so với 2 mẫu tham chiếu của loài hà thủ ô đỏ trong cùng nhánh cây cho thấy 6 mẫu này thuộc loài hà thủ ô đỏ, *F. multiflora*. Tương tự, S1, S6, S8 là 3 mẫu thuộc loài củ nâu (*D. cirrhosa*) vì khoảng cách di truyền giữa chúng với mẫu củ nâu đối chứng dương và mẫu tham chiếu trong cùng nhánh cây chỉ từ 12-46%.

3.2. Mức tương đồng và sai khác di truyền của các mẫu dựa vào đa hình trình tự ADN của các sản phẩm PCR chỉ thị

Kết quả so sánh trình tự sản phẩm PCR của 6 mẫu được xác thực là hà thủ ô đỏ (S2-S5, S7, Fm) với cùng đoạn intron tham chiếu của loài này trên ngân hàng gen cho mức tương đồng cao từ 99,4-100% và sai khác di truyền thấp từ 0,000-0,006 (Bảng 1A). Tương tự, sai khác di truyền thấp (0,000-0,004) và mức tương đồng cao (99,6-100%) khi so sánh trình tự sản phẩm PCR của các mẫu S1, S6, S8, Dc với cùng đoạn intron của mẫu củ nâu tham chiếu cho thấy 4 mẫu này là thuộc loài củ nâu (Bảng 1B).

Kết quả phân tích chủng loại (Hình 2) và mức tương đồng (Bảng 1) dựa vào đa hình trình tự ADN đoạn intron trên gen *atpF* lập thể được xác định bằng kỹ thuật PCR (Hình 1) cho thấy, trong 10 mẫu nghiên cứu, 6 mẫu (S2-S5, S7 và Fm) là các mẫu củ hà thủ ô đỏ và 4 mẫu (S1, S6, S8 và Dc) là mẫu củ nâu. Như vậy, sản phẩm PCR với vạch khoảng 850bp là chỉ thị để xác thực củ hà thủ ô đỏ và vạch khoảng 1050bp là chỉ thị để xác thực củ nâu (Hình 1).

Bảng 1. Mức tương đồng về trình tự ADN đoạn intron trên gen *atpF* của các mẫu hà thủ ô đỏ (A), các mẫu củ nâu (B) và cùng đoạn của từng loài trên ngân hàng gen.

A)		Khoảng cách di truyền							
		<i>Fm</i> MK330002	<i>Fm</i> NC041239	<i>Fm</i>	S2	S3	S4	S5	S7
Mức tương đồng (%)	<i>Fm</i> MK330002		0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
	<i>Fm</i> NC041239	100,0		0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
	<i>Fm</i>	100,0	100,0		0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
	S2	100,0	100,0	100,0		0,000	0,006	0,000	0,000
	S3	100,0	100,0	100,0	100,0		0,006	0,000	0,000
	S4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4		0,006	0,006
	S5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,4		0,000
	S7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,4	100,0	

B)		Khoảng cách di truyền				
		<i>Dc</i> LR027310	<i>Dc</i>	S1	S6	S8
Mức tương đồng (%)	<i>Dc</i> LR027310		0,002	0,004	0,004	0,004
	<i>Dc</i>	99,8		0,002	0,002	0,002
	S1	99,6	99,8		0,000	0,000
	S6	99,6	99,8	100,0		0,000
	S8	99,6	99,8	100,0	100,0	

Chú thích: S1 – S8: các mẫu xác thực; *Fm*: mẫu hà thủ ô đỏ đối chứng dương; *Dc*: mẫu củ nâu đối chứng dương; *Dc* LR027310; *Fm* MK330002... trình tự ADN đoạn *atpF* và mã truy cập trên Ngân hàng gen

4. THẢO LUẬN

4.1. Đa hình chiều dài intron trên gen *atpF* là chỉ thị để xác thực hà thủ ô đỏ

Trước đây, để xác định loài, xác thực các sản phẩm từ cây trồng, cây rừng chủ yếu dựa vào đa hình của intron trên các gen của hệ gen trong nhân tế bào. Để chọn nguyên liệu sản xuất giấy từ cây liễu thuộc chi *Salix*, đa hình chiều dài sản phẩm PCR của đoạn intron trên gen nhân *cyp73* đã được áp dụng hiệu quả để xác thực gỗ của cây liễu *S. alba* có hàm lượng lignin thấp và phân biệt với gỗ của loài *S. fragilis* có hàm lượng lignin cao và gỗ của cây lai giữa 2 loài có hàm lượng lignin trung bình (Trung et al., 2008; Triest et al., 2009). Gần đây, intron trong hệ gen lập thể cũng được áp dụng hiệu quả để xác thực loài thực vật cũng như các sản phẩm của chúng, trong đó có hà thủ ô đỏ và củ nâu. Đa hình trình tự đoạn intron trên gen *atpF* là một trong những barcode để phân biệt 28 loài thuộc chi *Dioscorea* (Xia et al., 2019) và để phân biệt hà thủ ô đỏ với một số loài khác (Liu et al., 2011). Tính đặc hiệu của chỉ thị này để xác nhận sản phẩm hà thủ ô đỏ một lần nữa được khẳng định trong nghiên cứu này. Đoạn intron 850bp trên gen *atpF* lập thể là chỉ thị để nhận biết củ hà thủ ô đỏ, với khoảng 200bp khác biệt về chiều dài sản phẩm PCR của củ nâu, tới 1050bp (Hình 1). Đồng thời, các chỉ thị này đã được khẳng định bằng kết quả phân tích chủng loại (Hình 2) và mức tương đồng (Bảng 1) dựa vào đa hình trình tự DNA đoạn intron trên gen *atpF* của chúng.

4.2. Những ưu điểm và hạn chế của các chỉ thị intron để xác thực hà thủ ô đỏ

Áp dụng chỉ thị phân tử ADN để định danh loài có độ chính xác cao, tốn ít thời gian, chi phí thấp, lượng mẫu nhỏ và từ hầu hết các bộ phận của nền mẫu (Teama, 2018). Trong đó, lượng mẫu nhỏ là đặc biệt quan trọng đối với những nền mẫu có giá trị thương mại cao như sâm Ngọc Linh (Nguyễn Tường Vân et al., 2020). Xác nhận nền mẫu có thể dựa vào đa hình trình tự DNA hoặc đa hình chiều dài sản phẩm PCR, trong đó xác nhận nền mẫu dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR có ưu điểm cao hơn. Trong nghiên cứu này người tiêu dùng/các công ty dược chỉ cần áp dụng các bước ở phần phương pháp để nhân bản DNA tổng số của các mẫu với cặp mồi atpF1 và 2 là có thể xác nhận được sản phẩm của mình: Chỉ có 1 vạch khoảng 850bp là hà thủ ô đỏ, 1 vạch khoảng 1050bp là củ nâu, 2 vạch 850bp và 1050bp là hà thủ ô bị pha với củ nâu.

Bên cạnh những ưu điểm, các chỉ thị phân tử nói chung, trong đó có chỉ thị intron trên gen atpF lặp thể trong nghiên cứu này cũng có những hạn chế. Yêu cầu về trình tự ADN của các vùng gen tham chiếu cho các nền mẫu trên ngân hàng gen là hạn chế lớn nhất khi áp dụng các chỉ thị ADN. Trong nghiên cứu này, về trình tự ADN đoạn intron trên gen atpF để tham chiếu trên ngân hàng gen, với loài củ nâu (*D. cirrhosa*) chỉ có 1 trình tự và hà thủ ô đỏ (*F. multiflora*) mới có 2 trình tự. ADN của nền mẫu không bị phân hủy là một trong những nhược điểm khác, đặc biệt trong nghiên cứu này. Để sử dụng làm dược liệu, củ hà thủ ô đỏ phải được sơ chế: sau khi thái lát, phơi khô và hấp tới 9 lần. Trong trường hợp củ hà thủ ô đỏ đã được sơ chế, ADN bị phân hủy thì không thể áp dụng chỉ thị phân tử như intron trên gen atpF lặp thể, mà phải phân tích hàm lượng một số chất có hoạt tính sinh học cao như TSG (2,3,5,4'-tetrahydroxystilben-2-O- β -D-glucosid), EMG (emodin-8-O- β -D-glucoside) và PG (physcion-8-O- β -D-glucoside) làm chỉ thị để xác nhận (Liu et al., 2018).

5. KẾT LUẬN

Đoạn intron 850bp trên gen lặp thể atpF của hà thủ ô đỏ là chỉ thị phân tử để phân biệt loài này với loài củ nâu có chỉ thị cùng đoạn tới 1050bp. Kết quả nhân bản bằng PCR và được khẳng định bằng phân tích chủng loại và phân tích mức tương đồng về trình tự DNA của đoạn chỉ thị cho thấy trong 8 mẫu được xác nhận trong nghiên cứu này gồm 5 mẫu là hà thủ ô đỏ và 3 mẫu là củ nâu. Kết quả nghiên cứu là bằng chứng ở mức phân tử DNA để xác thực củ hà thủ ô đỏ có giá trị y học cao đang bị gian lận thương mại trên thị trường nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế 2009. Dược điển Việt Nam IV, NXB Y học: 72-773.
2. Bounda G. A., and Feng Y. (2015). Review of clinical studies of *Polygonum multiflorum* thunb. and its isolated bioactive compounds. *Pharm. Res.* 7: 225–236.
3. Cao J., Jiang D., Zhao Z., Yuan S., Zhang Y., Zhang T., Zhong W., Yuan Q. and Huang L. 2018. Development of Chloroplast Genomic Resources in Chinese Yam (*Dioscorea polystachya*). *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2018/6293847.
4. Kulasinghea W.M.A.A., Ranaweerab K.K.T.N. 2019. Physical, chemical and biological aspects of *Dioscorea* yams and potential value additions. *J. of Agri. and Value Addition.* 2 (1): 43–59.
5. Kumar S., Tamura K. and Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5: 150–163.

6. Ling S., and Xu J. W. 2016. Biological activities of 2,3,5,4'- tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in antiaging and antiagingrelated disease treatments. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi: 10.1155/2016/4973239.
7. Liu T., Yan H. and Xiaorong-Guo X 2011. Discrimination of the medicinal plant *Fallopia multiflora* and its adulterants by diagnostic polymerase chain reaction (PCR). *J. Med. Plant Res.* 5(15): 3461-3465.
8. Liu Y., Wang Q., Yang J., Guo X., Liu W., Ma S. and Li S. 2018. *Polygonum multiflorum* Thunb.: A Review on Chemical Analysis, Processing Mechanism, Quality Evaluation, and Hepatotoxicity. *Front. Pharmacol.* 9: doi: 10.3389/fphar.2018.00364.
9. Magwe-Tindo J., Wieringa J.J., Sonke B., Zapfack L., Vigouroux Y., Couvreur T.L.P. and Scarcelli N. 2018. Whole plastome sequences of 14 African yam species (*Dioscorea* sp.). *Mitochondrial DNA Part B.* 4: 1, 74-76.
10. Nguyễn Tường Vân, Trần Mỹ Linh, Nguyễn Chi Mai, Lê Quang Trung 2020. Xác thực sâm ngọc linh dựa vào chỉ thị DNA trên hệ gen lập thể. *Tạp chí Thử nghiệm ngày nay.* 25: 27-36.
11. Phạm Thanh Huyền và Nguyễn Thị Hà Ly 2017. Điều tra phân bố và đánh giá chất lượng nguồn gen hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson) phục vụ công tác bảo tồn và phát triển ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược.* 33 (1): 24-31.
12. Raman G., Park K.T., Nam G.H., Kwak M. and Park S. 2019. Characterization of the complete chloroplast genome sequence of the giant knotweed, *Fallopia sachalinensis* from the volcanic island Dokdo, Republic of Korea. *Mito. DNA B Resour.* 4 (2): 2972-2973.
13. Teama S. 2018. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine, Genetic Diversity and Disease Susceptibility. Yamin. Liu. *Intech. Open.* DOI: 10.5772/intechopen.79517.
14. Triest L., Trung L. Q., Talukder A., Mominul K. M. and van Puyvelde K. 2009. Nuclear cyp73 intron fragment length polymorphism supports morphological analysis of *Salix* species and hybrids, *Plant Biosys.-An Inter. J. Deal. all Aspec. Plant Bio.* DOI: 10.1080/11263500902723038.
15. Trung L.Q., van Puyvelde K., Triest L. 2008. Consensus primers of cyp73 genes discriminate willow species and hybrids (*Salix*, *Salicaceae*). *Mol. Gen. Res.* 8(2):455-458.
16. Xia W., Zhang B., Xing D., Li Y., Wu W., Xiao Y., Sun J., Dou Y., Tang W., Zhang J., Huang X., Xu Y., Xie J., Wang J. and Huang D.. 2019. Development of high-resolution DNA barcodes for *Dioscorea* species discrimination and phylogenetic analysis. *Ecol. and Evol.* 9 (18): 10843-10853.
17. Yao G., Jin J.J., Li H.T., Yang J.B., Shiva-Mandala V., Croley M., Mostow R., Douglas N.A., Chase M.W., Christenhusz M.J., Soltis D.E., Soltis P.S., Smith S.A., Brockington S.F., Moore M.J., Yi T.S. and Li D.Z. 2019. Plastid phylogenomic insights into the evolution of Caryophyllales. *Mol. Phylogenet. Evol.* 134:74-86.