

XÁC THỰC BỘT TAM THẮT BẮC DỰA VÀO ĐA HÌNH CHIỀU DÀI SẢN PHẨM PCR GIỮA HAI GEN LẠP THỂ *atpH* và *atpI*

Lê Quang Trung¹, Trần Mỹ Linh², Nguyễn Chi Mai², Nguyễn Thị Thanh Huyền³,
Nguyễn Tường Vân⁴

(Đã gửi Tạp chí TNNN ngày 03 tháng 03 năm 2021)

TÓM TẮT

Trong củ tam thất (*Panax notoginseng*) có chứa các hợp chất saponin thuộc nhóm ginsenoside nên được sử dụng để phòng trị nhiều loại bệnh ở người, bao gồm cả những bệnh nan y như ung thư. Hiện nay, bột củ tam thất đang bị trộn lẫn với bột củ của một số loài tam thất khác như tam thất khương (*Stahlianthus involucratus*) để giảm giá thành và tăng lợi nhuận. Trong nghiên cứu này, 12 mẫu bột tam thất bắc, bao gồm 11 mẫu xác thực, 1 mẫu đối chứng dương được xác thực dựa vào kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi *atpHF* và *atpIR* để nhân bản đoạn bảo thủ không mã hóa (CNS) giữa gen lặp thể *atpH* và *atpI* của 2 loài. Kết quả nhân bản bằng PCR, khẳng định bằng phân tích chủng loại và mức tương đồng về trình tự DNA của sản phẩm PCR cho thấy đoạn CNS dài 1222bp là chỉ thị đặc hiệu cho tam thất bắc và đoạn 1345bp cho tam thất khương. Trên cây chủng loại, đa hình trình tự DNA đoạn 1222bp nhóm trình tự của 11 mẫu bột tam thất bắc xác thực với mẫu đối chứng dương và trình tự tham chiếu của tam thất bắc thành 1 nhánh với khoảng cách di truyền thấp (51-65%), các trình tự này cách xa các trình tự tham chiếu của các loài khác trong chi sâm tới 77%. Trong khi đoạn 1345bp nhóm trình tự của 4 mẫu xác thực và trình tự tham chiếu của tam thất khương thành 1 nhánh khác với khoảng cách di truyền 35-57%. Giữa 2 nhánh có khoảng cách di truyền tới 99%. Mức tương đồng về trình tự DNA đoạn 1222bp giữa 11 mẫu xác thực, mẫu đối chứng dương và mẫu tham chiếu của tam thất bắc cao tới 99,8-100% và mức tương đồng đoạn 1345bp của 4 mẫu xác thực và mẫu tham chiếu tới 99,9-100%. Như vậy, đa hình chiều dài sản phẩm PCR của đoạn CNS giữa gen *atpH* và *atpI* là chỉ thị để xác thực 11 mẫu bột tam thất bắc. Trên agarose gel, 7 mẫu chỉ có 1 sản phẩm PCR dài 1222bp là các mẫu bột tam thất bắc không bị trộn, trong khi 4 mẫu có 2 vạch 1222bp và 1345bp là mẫu bị trộn với bột tam thất khương.

Từ khóa: Xác thực, bột tam thất bắc, bột tam thất khương, PCR, trình tự bảo thủ không mã hóa, gen lặp thể *atpH* và *atpI*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) thuộc chi sâm (*Panax* L.) trong họ Ngũ gia bì (Araliaceae). Củ tam thất bắc là dược thảo để phòng trị nhiều loại bệnh ở người, bao gồm cả những bệnh nan y (Đỗ Huy Bích và CS., 2004; Đỗ Tất Lợi, 2004). Trong củ tam thất có chứa các hợp chất saponin thuộc nhóm ginsenoside như Rc, Rd, Re, Rb1 và Rg1... (Dong et al., 2003; Lei et al., 2007). Sau khi thu hoạch củ tam thất bắc chủ yếu được sấy khô, xay thành bột và sử dụng theo một số bài thuốc cổ truyền để phòng trị các bệnh ung thư, đông máu, tiểu đường... (Đỗ Tất Lợi, 2004; Kar-Wah & Alice, 2010; Rosette et al., 2014). Mỗi năm hàng trăm tấn củ và bột tam thất bắc được sản xuất và xuất khẩu từ các tỉnh phía nam Trung Quốc sang nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Theo một số nhà chế biến và kinh doanh tam thất bắc, do giá trị y học và thương mại cao, bột từ củ tam thất bắc đang bị trộn lẫn với bột của một số loài tam thất khác như tam thất khương thuộc chi *Stahlianthus* để giảm giá thành và thu lợi nhuận cao. Nhiều loài tam thất khương cũng đang được trồng với diện tích lớn để thu hoạch củ, sơ chế thành bột và thương mại ở nhiều tỉnh miền núi phía bắc của Việt Nam, phía nam của Trung Quốc, phía bắc Lào, phía bắc Thái Lan... Củ cuar nhiều loài tam thất khương cũng là dược thảo nhưng không chứa các hợp chất saponin (Li et al., 2015; Nguyen et al., 2020) nên giá trị thương mại thấp. Bằng mắt thường, người tiêu dùng không thể phân biệt được bột tam thất bắc bị pha trộn với bột tam thất khương. Vì vậy, việc áp dụng các chỉ thị,

¹Viện An toàn Thực phẩm

²Viện Hóa sinh Biển

³Trung tâm Phát triển công nghệ cao

⁴Viện Công nghệ Sinh học

trong đó có chỉ thị DNA là một trong những giải pháp để xác thực sản phẩm bột tam thất bắc nhằm bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng.

Đến nay đã có nhiều công bố áp dụng các chỉ thị hóa học là hàm lượng hoặc thành phần đặc thù một số chất thuộc nhóm saponin có trong sản phẩm của nhiều loài thuộc chi *Panax*, trong đó có tam thất bắc (Wang et al., 2009; Yang et al., 2016). Tuy nhiên, bên cạnh các yêu cầu về thiết bị và hóa chất đắt tiền, đòi hỏi lượng mẫu lớn cũng là hạn chế để áp dụng chỉ thị trên. Vì vậy chỉ thị DNA có thể là công cụ để khắc phục hạn chế của các chỉ thị hóa học vì cần lượng mẫu ít và có thể áp dụng ở nhiều phòng thử nghiệm có năng lực thử nghiệm trung bình ở nhiều vùng trong cả nước. Trong hệ gen thực vật, một số vùng gen trên hệ gen lặp thể đã và đang được áp dụng hiệu quả như những chỉ thị để xác thực nhiều loại dược thảo. Đa hình chiều dài và đa hình trình tự DNA trên vùng không mã hóa protein (intron) của gen *atpF* là chỉ thị để phân biệt các lát củ hà thủ ô đỏ bị trộn với củ nâu sậy khô (Cao et al., 2018; Raman et al., 2019; Nguyễn Tường Vân và CS., 2020a). Ngoài ra, trong hệ gen lặp thể còn chứa các trình tự bảo thủ không mã hóa protein (conserved noncoding sequences, CNSs) nối giữa 2 gen khác nhau (Li et al., 2020). Các trình tự này đã được chứng minh có đa hình chiều dài và trình tự đặc thù cho từng loài (Turco et al., 2013; Hettiarachchi et al., 2014) nên có thể sử dụng như những chỉ thị DNA để định loài thực vật (Li et al., 2020). Gần đây, toàn bộ hệ gen lặp thể của loài tam thất bắc, *P. notoginseng* (Wang et al., 2019) và loài tam thất khương, *Stahlianthus involucratus* (Li et al., 2019) đã được giải trình tự DNA, phân tích và công bố trên Ngân hàng gen, làm cơ sở để xác định các chỉ thị phân biệt sản phẩm của tam thất bắc và tam thất khương. Trong hệ gen lặp thể của 2 loài, giữa vùng gen *atpH* và *atpI* (*atpH-I*) đều có CNSs. Kết quả phân tích cho thấy CNSs giữa 2 vùng gen của loài *S. involucratus* và *P. notoginseng* có đa hình chiều dài tới 123bp (Wang et al., 2019; Li et al., 2019), nên có thể là những chỉ thị sử dụng kỹ thuật PCR để phân biệt bột tam thất bắc nếu bị trộn lẫn với bột của tam thất khương.

Trong nghiên cứu này, các mẫu bột tam thất bắc thành phẩm do khách hàng cung cấp được xác thực dựa vào 1) phân tích đa hình chiều dài sản phẩm PCR của các đoạn CNS giữa 2 vùng gen *atpH-I* của 2 loài; 2) khẳng định sản phẩm PCR là chỉ thị để xác thực các mẫu bột tam thất bắc không bị pha trộn và các mẫu bị pha trộn với tam thất khương dựa vào phân tích chủng loại và mức tương đồng về trình tự DNA của các CNS giữa 2 vùng gen của 2 loài. Nghiên cứu lần đầu tiên được công bố để xác thực bột tam thất bắc thành phẩm đang lưu hành trên thị trường nước ta. Nghiên cứu nhằm đưa ra công cụ để kiểm soát gian lận thương mại trong sản xuất và tiêu thụ dược thảo, trong đó có bột tam thất bắc, sản phẩm “kim bất hoán” có giá trị y học cao ở Việt Nam.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

Mười hai mẫu bột tam thất bắc (khoảng 60 gam/mẫu) do khách hàng cung cấp, bao gồm 11 mẫu yêu cầu xác thực (S1-S11) và 01 mẫu tam thất bắc đối chứng dương (S0). Mỗi mẫu được chia thành 3 phần để thử nghiệm, để khách hàng lưu và để lưu tại phòng thử nghiệm. Cặp mồi nhân *atpHF* và *atpIR* được thiết kế chung cho cả 2 chi *Panax* và *Stahlianthus* trên phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft). Mồi *atpHF* (5'-GCCAATCCAG CAGCAATAAC GG-3') và mồi *atpIR* (5'-CGCGGCTTAT ATAGGTGAAT CC-3') lần lượt được thiết kế trên trình tự DNA ở đầu 3' vùng mã hóa (exon) của gen *atpH* và đầu 5' vùng exon của gen *atpI* để nhân bản đoạn CNS giữa 2 gen. Các mồi nhân được đặt mua và sử dụng theo hướng dẫn của Sigma® PCR Primers Set. Ký hiệu các trình tự theo mẫu, danh sách và mã truy cập các vùng từ đầu 3' của gen *atpH* đến đầu 5' của gen *atpI* tham chiếu trên ngân hàng gen của một số loài thuộc hai chi *Panax* và *Stahlianthus* được thể hiện ở Hình 2.

2.2. Phương pháp

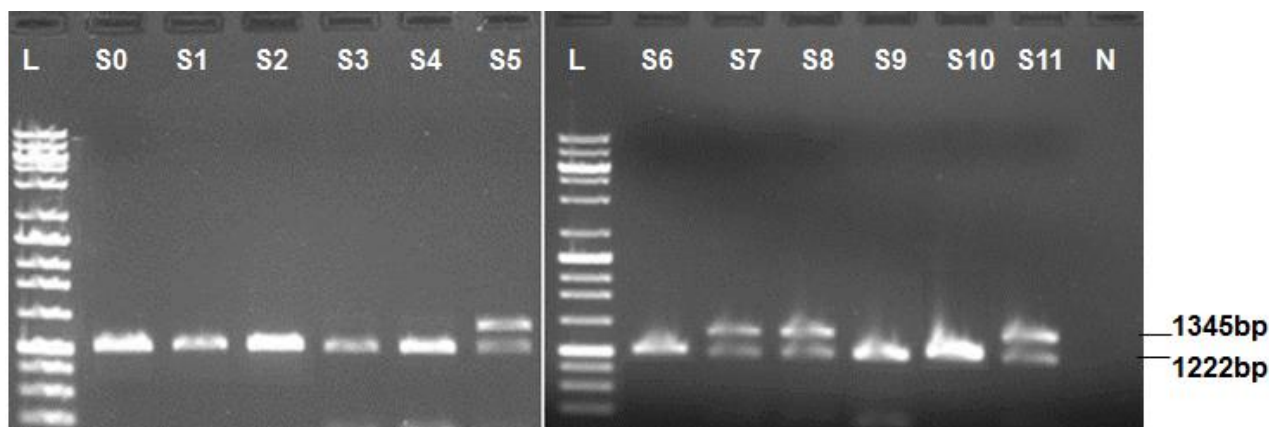
DNA tổng số của các mẫu được tách theo hướng dẫn của Qiagen Dneasy plant extraction Kit. Đoạn CNS giữa gen *atpH* và *atpI* của tam thất bắc dài khoảng 1220bp và tam thất khương khoảng 1350bp, được nhân bản bằng kit PCR của hãng Fermentas (Đức) giữa DNA tổng số của các mẫu và cặp mồi nhân *atpHF*- *atpIR*. Chu trình PCR gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu 96°C trong 2 phút, tiếp tục 30 chu kỳ: 95°C -0,5 phút, 54°C -1 phút, 72°C – 1 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. Chỉ thị xác thực bột tam thất được xác định bằng chiều dài sản phẩm PCR giữa các mẫu xác thực sau khi so sánh với mẫu đối chứng dương và thang DNA chuẩn (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). Trên agarose gel, các mẫu có 1 sản phẩm PCR dài 1220bp là các mẫu tam thất bắc không bị pha trộn và mẫu có cả vạch 1220bp và 1345bp là mẫu bột bị trộn giữa tam thất bắc và tam thất khương.

Để khẳng định các chỉ thị trên đặc trưng cho tam thất bắc và tam thất khương, các sản phẩm PCR chỉ thị được giải trình tự, phân tích chủng loại và so sánh mức tương đồng về trình tự DNA với cùng đoạn tham chiếu của 2 loài. Cụ thể, các sản phẩm PCR của từng 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 DNA hai chiều dựa vào cặp mồi M13 có sẵn trong trình tự của vector. Chủng loại của các loài thuộc chi *Panax* và *Stahlianthus* được phân tích theo phương pháp Neighbor Joining trên phần mềm Mega 3.1 với khoảng cách di truyền tin cậy giữa các mẫu dựa vào giá trị bootstrap ($\geq 70\%$) trên cây chủng loại (Kumar et al., 2004). Mức tương đồng (99,5-100%) về trình tự DNA trên đoạn đích CNS của các mẫu được so sánh với cùng đoạn của mẫu đối chứng dương và các trình tự tham chiếu trên Ngân hàng gen, sử dụng phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft).

3. KẾT QUẢ

3.1. Xác định chỉ thị xác thực bột tam thất bắc dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR

Kết quả PCR (Hình 1) cho thấy, sản phẩm PCR của 7 mẫu, bao gồm S1-S4, S6 và S9-10 gồm 1 vạch với chiều dài sau khi giải trình tự là 1222bp tương đương với mẫu tam thất bắc đối chứng dương (S0). Trong khi, 4 mẫu S5, S7-S8 và S11 lại có sản phẩm PCR gồm 2 đoạn với chiều dài sau khi giải trình tự lần lượt là 1222bp và 1345bp. Như vậy, 7 mẫu S1-S4, S6 và S9-10 có thể là bột tam thất bắc không bị pha trộn và 4 mẫu S5, S7-S8 và S11 là bột tam thất bắc bị trộn với bột củ tam thất khương.

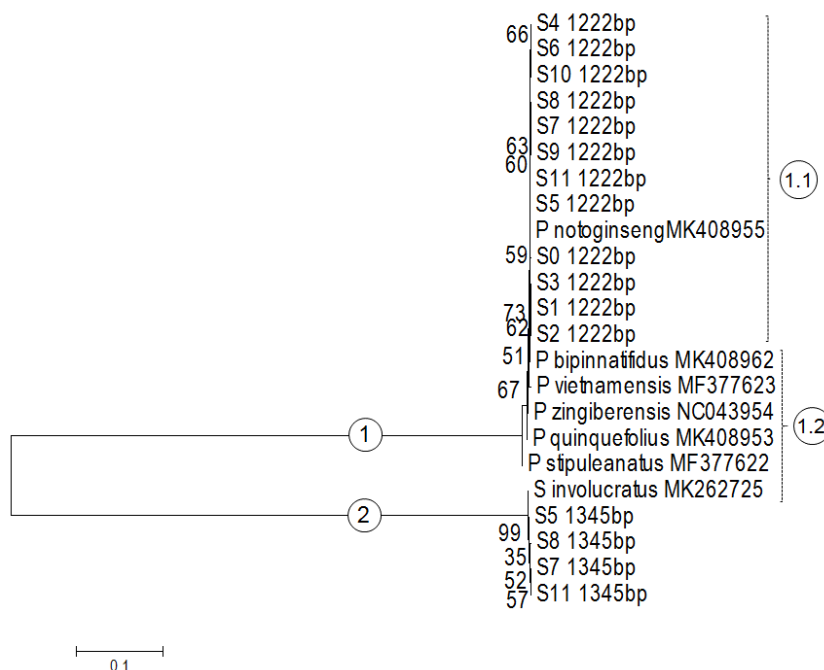


Hình 1. Sản phẩm PCR giữa DNA tổng số của 12 mẫu bột tam thất với cặp mồi nhân *atpHF* và *atpIR*. S0: ký hiệu mẫu bột tam thất bắc không bị trộn làm đối chứng dương. S1-S11: ký hiệu các mẫu tam thất bắc yêu cầu xác thực; L: thước DNA chuẩn; N: đối chứng âm

Trên bản agarose gel có thể xác định được chỉ thị cho các mẫu bột tam thất bắc gồm một vạch với chiều dài sản phẩm PCR là 1222bp, tương tự như mẫu tam thất bắc là đối chứng dương (S0). Trong khi, chỉ thị cho các mẫu bột tam thất bắc bị trộn với bột củ tam thất khương có sản phẩm PCR gồm 2 vạch với chiều dài là 1222bp và 1345bp. Như vậy, đoạn CNS giữa 2 gen *atpH* và *atpI* (*atpH-I*) có chiều dài 1345bp có thể là chỉ thị của loài trong chi tam thất khương.

3.2. Xác định chủng loại các mẫu dựa vào đa hình trình tự DNA của các sản phẩm PCR

Sau khi giải trình tự, so sánh với cùng đoạn DNA tham khảo của các loài thuộc chi sâm (*Panax*) và thuộc chi tam thất khương (*Stahlianthus*) trên Ngân hàng gen, đoạn CNS ngắn giữa 2 gen lặp thể *atpH* và *atpI* (*atpH-I*) của 12 mẫu (S0-S12) và đoạn CNS dài trong 4 mẫu (S5, S7-S8 và S11) có chiều dài lần lượt là 1222bp và 1345bp. Các đoạn *atpH-I* được ký hiệu theo tên mẫu từ S0_1222bp đến S11_1222bp và S5_1345bp, S7_1345bp, S8_1345bp và S11_1345bp. Đa hình trình tự DNA của đoạn *atpH-I* đã nhóm các mẫu tam thất bắc xác thực, mẫu đối chứng dương và các trình tự tham chiếu thành hai nhánh 1 và 2 trên cây chủng loại với khoảng cách di truyền tin cậy giữa hai nhánh là 99% (Hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phương pháp Neighbor Joining dựa vào đa hình trình tự DNA các đoạn *atpH-I* có chiều dài 1222bp và 1345bp của 12 mẫu bột tam thất bắc và cùng đoạn tham chiếu trên Ngân hàng gen của một số loài thuộc chi *Panax* (*P*) và *Stahlianthus* (*S*). S1-S11: các mẫu bột tam thất bắc xác thực. S0: mẫu bột tam thất bắc là đối chứng dương. MK408955-MK262725: mã truy cập trên Ngân hàng gen.

Ở nhánh 1, Các đoạn *atpH-I* có chiều dài 1222bp của các mẫu xác thực S1-S11 (S1_1222bp đến S11_1222bp) cùng nhánh với mẫu tam thất bắc đối chứng dương S0 (S0_1222bp), 01 trình tự tham chiếu của tam thất bắc *P. notoginseng* (có mã truy cập là MK408955) và của 5 loài khác cùng chi sâm (*Panax*) với khoảng cách di truyền 51-73%. Trong khi, ở nhánh 2, các đoạn *atpH-I* có chiều dài 1345bp của các mẫu S5, S7, S8 và S11 (S5_1345bp, S7_1345bp, S8_1345bp và S11_1345bp) lại cùng nhánh với loài tam thất khương *S. involuocratus* (có mã truy cập là MK262725) với khoảng cách di truyền 35-57%. Trong nhánh 1, đa hình trình tự DNA của các đoạn *atpH-I*_1222bp của 11 mẫu bột tam thất bắc xác thực (S1-S11), mẫu tam thất bắc đối chứng dương (S0) và mẫu tham chiếu của loài tam thất bắc

trong cùng nhánh phụ 1.1 có khoảng cách di truyền tin cậy tới 73% với các mẫu tham chiếu trong nhánh phụ 1.2 của các loài khác trong chi *AtpH-I*, cho thấy 11 mẫu (S1-S11) đều có bột tam thất bắc. Tương tự, đa hình trình tự DNA của đoạn *atpH-I*_1345bp của 4 mẫu xác thực (S5, S7, S8 và S11) và mẫu tham chiếu của loài tam thất khương trong cùng nhánh 2 với khoảng cách di truyền thấp (35-57%) cho thấy 4 mẫu S5, S7, S8 và S11 có cả bột tam thất bắc và tam thất khương. Như vậy, kết quả phân tích chủng loại phù hợp với kết quả PCR (Hình 1). Các đoạn *atpH-I*_1222bp có thể là chỉ thị để xác thực bột tam thất bắc *P. notoginseng* và đoạn *atpH-I*_1345bp đặc trưng cho bột tam thất khương thuộc chi *Stahlianthus*. Trong 11 mẫu xác thực, 7 mẫu S1-S4, S6, S9-S10 là bột tam thất bắc không bị trộn và 4 mẫu bột tam thất bắc S5, S7, S8 và S11 bị trộn với bột tam thất khương.

3.3. Phân tích mức tương đồng và sai khác di truyền dựa vào đa hình trình tự DNA của các sản phẩm PCR chỉ thị

Kết quả phân tích mức tương đồng trình tự DNA và khoảng cách di truyền giữa các đoạn 1222bp và 1345bp trên vùng gen *atpH-I* của các mẫu tam thất bắc xác thực, mẫu tam thất bắc đối chứng dương, với cùng đoạn của mẫu tam thất bắc và tam thất khương tham chiếu được thể hiện ở Bảng 1. Trình tự DNA sản phẩm PCR có chiều dài 1222bp (S1_1222-S11_1222bp) của 11 mẫu tam thất bắc được xác thực (S1-S11) so sánh với cùng đoạn của mẫu tam thất bắc đối chứng dương (S0) và của trình tự tham chiếu của *Panax notoginseng* trên ngân hàng gen cho mức tương đồng cao từ 99,8-100% và sai khác di truyền thấp từ 0,000-0,002. Như vậy cả 11 mẫu đều có bột tam thất bắc. Trong khi, sai khác di truyền thấp (0,000-0,001) và mức tương đồng cao (99,9-100%) khi so sánh trình tự sản phẩm PCR có chiều dài 1345bp (S5_1345bp, S7_1345 bp, S8_1345 bp, S11_1345 bp) của 4 mẫu xác thực (S5, S7, S8 và S11) với cùng đoạn tham chiếu của tam thất khương cho thấy 4 mẫu này có chứa bột của tam thất khương *S. involucratus*. Giữa các đoạn CNS dài 1222bp là chỉ thị cho tam thất bắc và 1345bp cho tam thất khương có mức tương đồng thấp (51,2-51,3%) và khoảng cách di truyền cao (0,487-0,488). Như vậy, kết quả phân tích mức tương đồng (Bảng 1) dựa vào đa hình trình tự DNA đoạn CNS giữa 2 gen *atpH* và *atpI* lập thể phù hợp với kết quả phân tích dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR (Hình 1) và phân tích chủng loại (Hình 2). Sản phẩm PCR trên CNS có chiều dài 1222bp và 1345bp lần lượt là những chỉ thị đặc thù cho tam thất bắc và tam thất khương. Trong 11 mẫu xác thực, 7 mẫu chỉ có bột tam thất bắc (S1-S4, S6, S9-S10) với chỉ thị là sản phẩm PCR với 1 vạch có chiều dài 1222bp trên bản gel và 4 mẫu (S5, S7, S8 và S11) có lẫn cả bột tam thất bắc và tam thất khương với 2 vạch 1222bp và 1345bp trên bản gel (Hình 1).

Bảng 1. Mức tương đồng trình tự DNA và khoảng cách di truyền giữa các đoạn 1222bp và 1345bp trên vùng gen *atpH-I* của các mẫu bột tam thất bắc xác thực với cùng đoạn của mẫu tam thất bắc đối chứng dương, tam thất bắc và tam thất khương tham chiếu.

#	Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Homo																		
1	Pn_MK408955		0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
2	S5_1222bp	100.0		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
3	S0_1222bp	99.9	99.9		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.489
4	S1_1222bp	99.9	99.9	99.8		0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
5	S2_1222bp	99.9	99.9	99.8	100.0		0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
6	S3_1222bp	99.9	99.9	99.8	100.0	100.0		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
7	S4_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8		0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
8	S6_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0		0.000	0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
9	S10_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	100.0		0.002	0.002	0.002	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
10	S7_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8		0.000	0.000	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488

11	S8_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0		0.000	0.001	0.488	0.488	0.488	0.488	0.488
12	S9_1222bp	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	100.0		0.001	0.487	0.487	0.487	0.487	0.487
13	S11_1222bp	100.0	100.0	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9		0.487	0.487	0.487	0.487	0.487
14	S5_1345bp	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.3	51.3	51.3	51.3		0.000	0.001	0.001	0.001
15	Si_MK262725	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.3	51.3	51.3	51.3	100.0		0.001	0.001	0.001
16	S7_1345bp	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.3	51.3	51.3	51.3	99.9	99.9		0.000	0.001
17	S11_1345bp	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.3	51.3	51.3	51.3	99.9	99.9	100.0		0.001
18	S8_1345bp	51.2	51.2	51.1	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	99.9	99.9	99.9	99.9	
	Genetic distance																		

*Chú thích: S0_1222bp, S1_1222bp – S11_1222bp: trình tự DNA các đoạn CNSs dài 1222bp trong mẫu tam thất bắc chứng dương và mẫu xác thực; S5_1345bp, S7_1345bp, S8_1345bp, S11_1345bp: trình tự DNA các đoạn CNSs dài 1345bp trong 04 mẫu xác thực; Pn: tam thất bắc, *Panax notoginseng*; Si: tam thất khung, *Stahlianthus involucratus*; MK408955, MK262725 mã truy cập trình tự DNA đoạn CNSs của Pn và Si trên Ngân hàng gen*

4. THẢO LUẬN

4.1. Đa hình chiều dài của CNS giữa gen *atpH* và *atpI* là các chỉ thị để xác thực bột tam thất bắc

Các trình tự bảo thủ không mã hóa (conserved noncoding sequences, CNS) giữa các gen trong hệ gen của thực vật đã được chứng minh có đa hình chiều dài và đa hình trình tự DNA đặc thù cho từng loài (Turco et al., 2013). Hettiarachchi et al., 2014) đã xác định được các CNS đặc thù làm cơ sở để định loại và phân tích chủng loại của trên 6000 loài thực vật. Gần đây, CNS còn được áp dụng hiệu quả như những chỉ thị đặc hiệu để phân biệt các loài thực vật có quan hệ gần nhau về di truyền (Li et al., 2020). Mức đa hình và tính bảo thủ cao của các CNS cũng được sử dụng để truy xuất nguồn gốc tổ tiên và mức độ tiến hóa làm cơ sở để chọn tạo giống của nhiều loài cây lương thực như lúa, kê, cao lương, ngô... (Turco et al., 2013). Đồng thời, CNS trong hệ gen lạp thể đã được áp dụng để xác thực một số loài và sản phẩm dược thảo có giá trị kinh tế cao và đang bị gian lận thương mại trên thị trường. Nguyễn Tường Vân và CS. (2020b) đã dựa vào đa hình trình tự DNA của CNS giữa các vùng gen *trnC-rps16* và *trnE-trnM* để xác thực củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) khi bị trà trộn với củ của một số loài khác trong chi sâm. Tính đặc hiệu của chỉ thị CNS trong hệ gen lạp thể một lần nữa được khẳng định trong nghiên cứu này khi áp dụng để xác thực bột tam thất bắc bị pha trộn với bột tam thất khung. Với trên 120bp khác biệt về chiều dài sản phẩm PCR, đoạn CNS 1222bp và 1345bp giữa gen *atpH* và *atpI* lạp thể của tam thất bắc và tam thất khung lần lượt là các chỉ thị để nhận biết bột tam thất bắc không bị trộn hoặc bị trộn với tam thất khung (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 CNS giữa gen *atpH* và *atpI* của chúng.

4.2. Những ưu điểm và hạn chế của các chỉ thị CNS để xác thực bột tam thất bắc

Áp dụng chỉ thị phân tử DNA 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., 2020b). 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. Các phòng thử nghiệm đủ năng lực chỉ cần áp dụng các bước ở phần Phương pháp trong nghiên cứu này để nhận bản DNA tổng số của các mẫu với cặp môi atpHF và atpIR là có thể xác nhận được sản phẩm của mình có bị pha trộn

hay không. Sau khi chạy sản phẩm PCR trên bản gel, các mẫu chỉ có 1 vạch 1222 bp là các mẫu bột tam thất bắc không bị trộn, trong khi các mẫu có 2 vạch 1222bp và 1345bp là các mẫu bột tam thất bắc bị trộn với bột tam thất khương.

Bên cạnh những ưu điểm, các chỉ thị DNA nói chung, trong đó có chỉ thị CNS, cũng có một số hạn chế. Yêu cầu về trình tự DNA của các vùng gen tham chiếu cho các nền mẫu trên ngân hàng gen là hạn chế lớn nhất khi áp dụng loại chỉ thị này. Đoạn DNA liên quan tham chiếu sẵn có trên Ngân hàng gen là cơ sở để thiết kế các cặp mồi nhân, để xác định chủng loại cũng như để so sánh mức tương đồng của các sản phẩm PCR chỉ thị. Trong nghiên cứu này, trình tự DNA đoạn CNS giữa *atpH* và *atpI* để tham chiếu cho các loài thuộc chi tam thất khương chỉ tìm thấy 1 trình tự đoạn CNS của loài *S. involucratus* với mã đăng nhập là MK262725 trên ngân hàng gen nên khó có thể kết luận chính xác bột tam thất khương của loài nào trong chi *Stahlianthus*. Ngoài ra, chỉ có vai trò định tính để xác thực bột tam thất bắc có bị pha trộn hay không cũng là một hạn chế của loại chỉ thị này. Thực tế, trên thị trường củ tam thất bắc còn bị tách chiết hầu hết các hợp chất saponin sau đó sấy khô và nghiền cùng với củ tam thất bắc không bị tách chiết. Cho mỗi mẫu trong nghiên cứu này, các chỉ thị CNS không thể xác định được chính xác tỷ lệ bột tam thất bắc đã bị tách chiết các hợp chất saponin và tỷ lệ pha trộn từ bột của tam thất khương. Để xác thực về định lượng, người tiêu dùng có thể gửi mẫu đến các phòng thử nghiệm đủ năng lực sử dụng các chỉ thị hóa học với các công nghệ phân tích hiện đại (Wang et al., 2009; Shin et al., 2010; Yao et al., 2011). Trong bột tam thất bắc có chứa nhiều hợp chất saponin thuộc nhóm ginsenoside như Rc, Rd, Re, Rb1 và Rg1 (Dong et al., 2003; Lei et al., 2007). Phân tích hàm lượng 1 hoặc một số chất trong các chất trên sử dụng các phương pháp hiện đại như HPLC, LC-MS/MS, UHPE... là những giải pháp hiệu quả để xác định tỷ lệ bột tam thất không bị pha trộn (Yang et al., 2021).

5. KẾT LUẬN

Các trình tự DNA bảo thủ không mã hóa (CNS) dài 1222bp và 1345bp giữa hai gen lặp thể *atpH* và *atpI* được xác định bằng phương pháp PCR là các chỉ thị để xác thực bột tam thất bắc. Trên bản gel, các mẫu chỉ có 1 sản phẩm PCR dài 1222bp là mẫu tam thất bắc không bị trộn, trong khi mẫu có cả 2 sản phẩm PCR dài 1222bp và 1345bp là mẫu bột bị trộn giữa tam thất bắc và tam thất khương. Các sản phẩm PCR 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 11 mẫu bột tam thất bắc của khách hàng yêu cầu xác thực có 7 mẫu không bị pha trộn và 4 mẫu bị pha trộn giữa bột tam thất bắc và tam thất khương. Kết quả nghiên cứu là bằng chứng ở mức phân tử DNA để xác thực bột tam thất bắc có giá trị y học cao đang bị gian lận thương mại trên thị trường. Phương pháp nghiên cứu có thể áp dụng để xác thực các sản phẩm khác của tam thất bắc như củ và nụ hoa của tam thất bắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 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
- Dong, T.T.X., Cui, X.M., Song, Z.H., Zhao, K.J., Ji, Z.N., Lo, C.K., Tsim, K.W.K 2003. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and seasonal variations in its active constituents. *J. Agricul. Food Chem.* 51. 4617-4623.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập, Trần Toàn 2004. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Tập II, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
- Đỗ Tất Lợi 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội.
- Hettiarachchi N, Kryukov K, Sumiyama K, Saitou N 2014. Lineage-Specific Conserved Noncoding Sequences of Plant Genomes: Their Possible Role in Nucleosome Positioning. *Genome Biol. Evol.* 6 (9): 2527-42.

- Kar-Wah L, Alice W 2010. Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chinese Medicine*. 5: 458-469.
- Kumar S., Tamura K. and Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5: 150–163
- Lei J, Li X, Gong XJ, Zheng YN 2007. Isolation, synthesis and structures of cytotoxic ginsenoside derivatives. *Molecules*, 12: 140-150.
- Li C, Zheng Y, Huang P 2020. Molecular markers from the chloroplast genome of rose provide a complementary tool for variety discrimination and profiling. *Nature. Sci. report*. 10:12188
- Li DM, Xu YC, Zhu GF 2019. Complete chloroplast genome of the plant *Stahlianthus involucratus* (Zingiberaceae). *Mitochondrial Part B*. 4 (2): 2702–2703
- Li QM, Luo JG, Zhang YM, Li ZR, Wang XB, Yang MH, Luo J, Sun HB, Chen YJ, Kong LY 2015. Involucratustones A–C: Unprecedented Sesquiterpene Dimers Containing Multiple Contiguous Quaternary Carbons from *Stahlianthus involucratus*. *J. Chem. A Euro*. 21 (38): 13206-13209
- Nguyen NL, Vo TH, Lin YC, Liaw CC, Lin ZH, Chen MC, Kuo YH 2020. Bioassay-Guided isolation and HPLC quantification of antiproliferative metabolites from *Stahlianthus thorelii*. *Molecules*. 551 (25) doi:10.3390/molecules25030551.
- Nguyễn Tường Vân, Nguyễn Chi Mai, Lê Quang Trung 2020a. Xác thực hà thủ ô đồ dựa vào đa hình chiều dài sản phẩm PCR vùng Intron của Gen lạp thể *atpF*. *Tạp chí Thử nghiệm ngày nay*. 27: 6-12
- Nguyễn Tường Vân, Trần Mỹ Linh, Nguyễn Chi Mai, Lê Quang Trung 2020b. Xác thực sâm ngọc linh dựa vào chỉ thị DNA trên hệ gen lạp thể. *Tạp chí Thử nghiệm ngày nay*. 25: 27-36.
- 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
- Rosette U, Peter AA, Yi W 2014. Anti-diabetic potential of *Panax notoginseng* saponins: a review. *Phytotherapy research*. 28: 5-10.
- Shin JS, Ahn SC, Choi SW, Lee DU, Kim BY, Baik MY 2010. Ultra high pressure extraction (UHPE) of ginsenosides from Korean *Panax ginseng* powder. *Food Sci Biotechno*. 19: 743e8.
- 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.
- Turco G, Schnable JC, Pedersen B, Freeling M 2013. Automated conserved non-coding sequence (CNS) discovery reveals differences in gene content and promoter evolution among grasses. *Plant Genetics and Genomics*. 4 (170): 1-15
- Wang CZ, Ni M, Sun S, Li XL, Hi H, Mehendale SR, Yuan CS 2009. Detection of Adulteration of Notoginseng Root Extract with Other *Panax* Species by Quantitative HPLC Coupled with PCA. *J Agric Food Chem*. 57 (6): 2363–2367
- Wang K, Sun,H, Huang C, Lia S, Wang Y. 2019. Phylogenetic relationship and characterization of the complete chloroplast genome of *Panax notoginseng*, the endemic medicinal herbs to China. *Mitochondrial Part B*. 4 (2): 2111–2113
- Yang W, Qiao X, Li K, Fan J, Bo T, Guo D-a, Ye M 2016. Identification and differentiation of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* by monitoring multiple diagnostic chemical markers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.005>
- Yang Y, Ju Z, Yang Y, Zhang Y, Yang L, Wang Z 2021. Phytochemical analysis of *Panax* species: A review. *J Ginseng Res*. 45:1-21
- Yao H, Shi P, Shao Q, Fan X 2011. Chemical fingerprinting and quantitative analysis of a *Panax notoginseng* preparation using HPLC-UV and HPLC-MS. *Chin Med*. 6 (9). <https://doi.org/10.1186/1749-8546-6-9>