

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

Hoàng Việt Cường

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE LỤC LẬP VÀ
PHÂN TÍCH HOẠT TÍNH CỦA SAPONIN PHÂN LẬP
TỪ CÂY LAN TAI CÁO
(*Hoya verticillata* var. *verticillata*)**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2026

Công trình được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học,
Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Người hướng dẫn khoa học: **1. GS.TS. Chu Hoàng Mậu**
2. PGS.TS. Từ Quang Tân

Phản biện 1: GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng.

Phản biện 2: GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc.

Phản biện 3: PGS.TS. Phạm Thị Thanh Nhân.

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
hợp tại Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên
Vào hồi 8 giờ 30 phút, ngày 22 tháng 5 năm 2026

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm Số - Đại học Thái Nguyên
3. Thư viện Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Các bài báo

1. Hoang, C. V., Tu, T. Q., Nguyen, L. T. N., Nguyen, H. D., Nguyen, Q. H., & Chu, M. H. (2023). Two New C21 Steroidal Glycosides from the Leaves of *Hoya parasitica*. *Records of Natural Products*, 17(6), pp. 1046-1051. <http://doi.org/10.25135/rnp.419.2307.2831> (SCI-E).
2. Cuong Viet Hoang, Tan Quang Tu, Thu Thi Mai Lo, Mau Hoang Chu (2024), “Dataset on intergenic spacer regions of chloroplast genome and potential DNA barcode of *H. verticillata* var. *verticillata* in Vietnam”, *Data in Brief*, 54, 110471. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2024.110471> (Scopus).
3. Hoàng Việt Cường, Phạm Thị Thu Hiền, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu (2024), “Phân tích sự phát sinh chủng loại dựa trên trình tự *psb-rps14* và *rbcl-accd* nhằm hỗ trợ định danh loài lan tai cáo (*Hoya verticillata* var. *verticillata*)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 230(01), tr. 177-184. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10996> (ACI).
4. Cuong Viet Hoang, Tan Quang Tu, Hung Duc Nguyen, Mau Hoang Chu (2025), “*In silico* studies of saponins from *Hoya verticillata* var. *verticillata* with important apoptosis potency”, *Letters in Organic Chemistry*, 22 (11), pp. 846 - 854. <https://doi.org/10.2174/0115701786363779250528013022> (SCI-E).

Trình tự hệ gene lục lạp đăng kí trên GenBank

1. Jo,S., Mau,C.H., Tan,T.Q., Cuong, H.V., Lee,C., Quan,N.H., Thuong,S.D. and Lan,N.T.N. (2023), “*Hoya verticillata* chloroplast, complete genome”, GenBank: OR475244.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR475244.1>

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Lan tai cáo (*Hoya verticillata* var. *verticillata* hoặc *Hoya parasitica* (Rox) Wall ex Traill) là loài thực vật sống phụ sinh lâu năm ở rừng ẩm nhiệt đới thuộc chi *Hoya*. *Hoya* là một chi thực vật có hoa trong họ Apocynaceae, hầu hết là những cây dây leo có lá mỏng nước và cụm hoa hấp dẫn. Lan tai cáo được tìm thấy ở khu vực từ Đông Ấn Độ đến Nam Trung Quốc và một số nước Đông Nam Á.

Trong thực tế, Lan tai cáo rất đa dạng và có nhiều đặc điểm hình thái tương tự một số loài trong chi *Hoya*, đặc biệt khi cây ở trạng thái không còn nguyên vẹn hoặc ở dạng bột, việc xác định loài gặp nhiều khó khăn hoặc dễ nhầm lẫn. Lan tai cáo với các loài khác cùng chi nếu chỉ dựa vào hình thái. Chính vì vậy, việc giải trình tự DNA lục lạp và tìm kiếm vùng DNA trong hệ gene lục lạp làm chỉ thị hỗ trợ phân biệt loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) với các loài khác trong chi *Hoya* là cần thiết và mang tính thời sự.

Nghiên cứu hệ gene lục lạp của thực vật đã đạt được những thành tựu đáng kể và có ý nghĩa rất quan trọng, góp phần nâng cao nhận thức của con người về quá trình quang hợp, phân loại thực vật và tiến hóa. Những kết quả phân tích DNA lục lạp (chloroplast DNA-cpDNA) đã được chứng minh là có giá trị trong việc tìm hiểu sự tiến hóa, tính đa dạng và mối quan hệ phát sinh chủng loại của thực vật. Những tiến bộ trong công nghệ giải trình tự thế hệ mới, đã thúc đẩy mạnh mẽ quá trình hình thành cơ sở dữ liệu cpDNA. Cơ sở dữ liệu chuyên dụng, các công cụ Tin sinh học phát triển đã góp phần nâng cao hiệu quả quản lý và phân tích khối lượng ngày càng tăng của trình tự DNA lục lạp.

Một số nghiên cứu cho thấy Lan tai cáo được sử dụng làm thuốc chống suy thận cấp tính, chữa trị và làm lành các vết thương. Một số nghiên cứu bước đầu đã ghi nhận các loài thuộc chi *Hoya*, trong đó có Lan tai cáo chứa các hợp chất flavonoid, phenolic, saponin. Tuy nhiên, nghiên cứu thành phần hóa học, tìm kiếm các chất mới và khảo sát hoạt tính sinh học của chúng làm cơ sở đề xuất sử dụng trong y học còn ít được quan tâm nghiên cứu. Vấn đề đặt ra là, Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) chứa các chất có hoạt

tính sinh học nào và có thể ứng dụng các chất này trong y học hay không là những câu hỏi tiếp theo cần được làm sáng tỏ.

Từ những lý do trên chúng tôi thực hiện đề tài luận án: **“Nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp và phân tích hoạt tính của saponin phân lập từ cây Lan tai cáo (*Hoya verticillata* var. *verticillata*)”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Phân tích đặc điểm hệ gene lục lạp, thiết lập được sơ đồ cây phát sinh chủng loại của loài Lan tai cáo và các loài khác thuộc chi *Hoya*.

Phân lập và xác định được cấu trúc hợp chất saponin tách chiết từ Lan tai cáo và phân tích hoạt tính sinh học *in silico* của các saponin đã phân lập.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu giải trình tự hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo.

i) Thu thập mẫu cây, phân loại tạo nguyên liệu cho phân tích sinh học phân tử và phân tích thành phần hóa học Lan tai cáo.

ii) Định danh loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) bằng phương pháp hình thái so sánh.

iii) Giải trình tự nucleotide của DNA lục lạp và thiết lập sơ đồ cấu trúc hệ gene lục lạp cây Lan tai cáo. Mô tả đặc điểm hệ gene lục lạp của Lan tai cáo.

3.2. Phân tích sự phát sinh chủng loại, khảo sát một số chỉ thị DNA có độ đa dạng nucleotide cao từ hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo và đề xuất mã vạch tiềm năng cho loài/chi.

i) Xác định và thu thập dữ liệu trình tự hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Hoya* trên GenBank. Phân tích tiến hóa phân tử dựa trên trình tự DNA lục lạp của các loài này.

ii) Xác định và thu thập một số trình tự DNA có độ đa dạng nucleotide cao, xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại dựa trên dữ liệu về các trình tự khai thác được từ GenBank, đề xuất mã vạch tiềm năng sử dụng trong định danh loài và chi *Hoya*.

3.3. Nghiên cứu phân lập, xác định cấu trúc và phân tích hoạt tính sinh học của một số saponin từ cây Lan tai cáo.

i) Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết phân đoạn chứa saponin từ lá Lan tai cáo.

- ii) Phân lập saponin và xác định cấu trúc của các saponin đã phân lập.
- iii) Phân tích hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các saponin phân lập từ Lan tai cáo thông qua mô hình tương tác phân tử và phân tích động học phân tử *in silico*.

4. Những đóng góp mới của luận án

4.1. Luận án là công trình nghiên cứu mới về đặc điểm của hệ gene lục lap hoàn chỉnh của loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*). Đề xuất được mã vạch DNA tiềm năng hỗ trợ phân biệt loài và nhận diện chi *Hoya*.

4.2. Phân lập và xác định được cấu trúc của hai saponin mới từ lá Lan tai cáo là 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- β -D-fucopyranoside 20-O- β -D-glucopyranoside và 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranoside-20-O- β -D-glucopyranoside.

4.3. Đánh giá được khả năng tương tác và mô phỏng động học phân tử *in silico* của các saponin phân lập từ Lan tai cáo và xác định được parasiticoside B (3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranoside-20-O- β -D-glucopyranoside) có hoạt tính gây độc cao nhất chống lại protein ung thư Bcl-2. Parasiticoside B là ứng viên tiềm năng cho nghiên cứu thực nghiệm hoạt tính chống lại protein Bcl-2 trong ung thư.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Kết quả đạt được của luận án có giá trị khoa học và thực tiễn trong tiếp cận nghiên cứu tiến hóa phân tử dựa trên trình tự hệ gene lục lap và phân lập, xác định hoạt tính của các saponin phục vụ trong nghiên cứu và ứng dụng được phẩm từ cây Lan tai cáo.

Kết quả nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ cấu trúc hệ gene lục lap hoàn chỉnh của loài Lan tai cáo và cấu trúc hệ gene lục lap đặc trưng của các loài thuộc chi *Hoya*.

Kết quả bước đầu xây dựng được sơ đồ phát sinh chủng loại thực vật dựa trên trình tự hệ gene hoặc các vùng gene lục lap, là cơ sở để đánh giá mối quan hệ gần gũi và mức độ tiến hóa phân tử của các loài trong chi *Hoya*.

Hai saponin mới phân lập được từ Lan tai cáo là dữ liệu bổ sung cho nghiên cứu sàng lọc chất có hoạt tính sinh học ứng dụng trong nghiên cứu sinh dược học.

Trình tự DNA lục lạp hoàn chỉnh của Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) đã bổ sung nguồn dữ liệu phục vụ phân tích tiến hóa phân tử của chi *Hoya*. Mã vạch DNA tiềm năng có thể sử dụng hỗ trợ định danh chi *Hoya* và loài Lan tai cáo.

Các bài báo đăng tải trên các tạp chí khoa học công nghệ quốc tế và trong nước cùng với cấu trúc hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài Lan tai cáo công bố trên GenBank là những tư liệu có giá trị tham khảo trong thực tiễn nghiên cứu và đào tạo.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 165 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (4 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (37 trang); Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (16 trang); Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận (47 trang); Kết luận và đề nghị (2 trang); Các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (18 trang); Phụ lục (39 trang). Luận án có 11 bảng, 20 hình, 10 phụ lục và 175 tài liệu tham khảo.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 131 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: 1) Đặc điểm hệ gene lục lạp của thực vật và chi *Hoya*; 2) Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự DNA lục lạp; 3) Thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi *Hoya*

1.1. Đặc điểm hệ gene lục lạp của thực vật và chi *Hoya*

Hệ gene lục lạp của thực vật hạt kín nói chung và chi *Hoya* nói riêng thường có cấu trúc đặc trưng gồm bốn vùng: vùng sao chép đơn lớn (LSC), vùng sao chép đơn nhỏ (SSC) và hai vùng lặp đảo ngược (IR). Ở nhiều loài thuộc chi *Hoya*, sự mở rộng bất thường của vùng IR dẫn đến việc thu hẹp mạnh mẽ vùng SSC, làm cho *Hoya* trở thành một trong những chi thực vật hạt kín có vùng SSC ngắn nhất được ghi nhận. Đặc điểm này không chỉ mang ý nghĩa đặc thù về mặt cấu trúc mà còn cung cấp thông tin quan trọng để nghiên cứu cơ chế tiến hóa của hệ gene lục lạp ở nhóm thực vật này.

Trong những năm gần đây, số lượng hệ gene lục lạp của *Hoya* được giải trình tự đã gia tăng nhanh chóng, với hơn 50 loài đã được công bố và lưu trữ

trên các cơ sở dữ liệu công khai. Các dữ liệu này đã góp phần làm sáng tỏ đặc điểm bộ gene lục lạp, hỗ trợ phân loại nội bộ chi và cung cấp bằng chứng cho nghiên cứu phát sinh chủng loại trong họ Apocynaceae. Tuy nhiên, so với sự đa dạng loài phong phú của *Hoya* (trên 500 loài được mô tả), số lượng hệ gene lục lạp hoàn chỉnh hiện có vẫn còn khá khiêm tốn. Điều này cho thấy khoảng trống cần tiếp tục được bổ sung nhằm hoàn thiện cơ sở dữ liệu di truyền phục vụ nghiên cứu so sánh và phân loại.

Đáng chú ý, cho đến nay vẫn chưa có công bố đầy đủ về hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*), một loài phân bố tự nhiên tại Việt Nam. Việc giải trình tự và phân tích hệ gene lục lạp của loài này không chỉ bổ sung dữ liệu cho chi *Hoya* mà còn có ý nghĩa trong việc làm sáng tỏ đặc điểm tiến hóa phân tử, đồng thời cung cấp nguồn thông tin di truyền hữu ích cho nghiên cứu đa dạng sinh học và công tác bảo tồn.

1.2. Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự DNA lục lạp

Sự phát triển của công nghệ sinh học phân tử đã mở ra những hướng tiếp cận khách quan và chính xác hơn trong nghiên cứu phát sinh chủng loại. Phân tích dựa trên trình tự DNA lục lạp, bao gồm các gene mã hóa, vùng đệm, intron hoặc toàn bộ hệ gene, đã chứng minh hiệu quả trong việc làm sáng tỏ lịch sử tiến hóa của nhiều nhóm thực vật, trong đó có chi *Hoya* thuộc họ Apocynaceae. Đặc biệt, việc xác định các vùng DNA tiềm năng sử dụng làm mã vạch phân tử mang ý nghĩa quan trọng trong định danh loài và hỗ trợ nghiên cứu phân loại.

Tuy nhiên, số lượng hệ gene lục lạp của các loài *Hoya* được công bố vẫn còn hạn chế so với sự đa dạng loài phong phú, dẫn đến thiếu cơ sở dữ liệu đại diện và làm giảm độ tin cậy trong các phân tích phát sinh chủng loại. Mặc dù các công cụ tin sinh học hiện đại đã góp phần cải thiện chất lượng phân tích, nhưng khoảng trống dữ liệu vẫn là một thách thức. Cho đến nay, chưa có công bố nào về phân tích phát sinh chủng loại dựa trên hệ gene lục lạp của các loài *Hoya* tại Việt Nam, cũng như chưa có dữ liệu cho *H. verticillata* var. *verticillata*.

Do đó, việc giải trình tự và khai thác hệ gene lục lạp nhằm xây dựng cây phát sinh chủng loại, đồng thời tìm kiếm các chỉ thị DNA đặc hiệu phục vụ phân loại và định danh loài, là vấn đề cấp thiết đặt ra cho nghiên cứu này.

1.3. Thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi *Hoya*

Số lượng loài thực vật được nghiên cứu nhằm khai thác thành phần hóa học và hoạt tính sinh học ngày càng gia tăng, trong đó các hợp chất tự nhiên từ chi *Hoya* đã nhận được sự quan tâm đáng kể. Nhiều báo cáo cho thấy các loài thuộc chi này chứa các hợp chất thứ cấp đa dạng như flavonoid, alkaloid và đặc biệt là saponin, nhóm hợp chất có tiềm năng ứng dụng cao trong dược học. Tuy nhiên, các nghiên cứu chuyên sâu về saponin ở *Hoya* vẫn còn hạn chế cả về số lượng loài được khảo sát lẫn mức độ phân tích, dẫn đến khoảng trống trong việc đánh giá giá trị sinh học và tiềm năng ứng dụng của chúng.

Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*), một loài phân bố tự nhiên ở Việt Nam, đến nay chưa có công bố hệ thống nào về thành phần saponin cũng như hoạt tính sinh học liên quan. Việc phân lập, nhận diện và xác định cấu trúc các saponin mới từ loài này không chỉ góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu hóa học cho chi *Hoya* mà còn mở ra cơ hội phát hiện các hoạt chất có giá trị dược học.

Đặc biệt, cho đến nay chưa có nghiên cứu *in silico* nào ứng dụng mô hình tương tác phân tử và mô phỏng động học phân tử để đánh giá tương tác giữa saponin của *H. verticillata* var. *verticillata* với các protein liên quan đến apoptosis-cơ chế trung tâm trong quá trình phát sinh ung thư. Khoảng trống này nhấn mạnh sự cần thiết của việc kết hợp nghiên cứu hóa thực vật và phương pháp mô phỏng tính toán nhằm định hướng phát hiện và phát triển hợp chất có tiềm năng ứng dụng trong y dược.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các vật liệu thực vật: Mẫu *H. verticillata* var. *verticillata* (Mẫu chứng từ HOYP202302TQ1) được thu thập tại xã Sơn Dương, tỉnh Tuyên Quang, Việt Nam vào tháng 2 năm 2023 tại tọa độ địa lí 21°41'04" N, 105°29'03" E và Mẫu chứng từ HOYP202305TN được thu thập tại khu vực Hang Trai, xã Quang Sơn, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam, ở tọa độ 21°43'34" N, 105°50'52" E.

Các chủng vi khuẩn kiểm định: Vi khuẩn kiểm định sử dụng trong nghiên cứu để xác định hoạt tính kháng khuẩn gồm: *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC13709), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442), *Bacillus subtilis* (ATCC6633). Các chủng vi khuẩn do Bảo tàng chủng giống vi sinh vật, Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên và Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Thái Nguyên cung cấp. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy và lưu giữ tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên để tiến hành thử nghiệm. Các thực nghiệm được tiến hành trong phòng thí nghiệm và tuân thủ đầy đủ các quy tắc an toàn trong phòng thí nghiệm.

Các dòng tế bào ung thư: Các dòng tế bào thử nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu gồm: Tế bào ung thư phổi ở người (TA549); Tế bào ung thư vú ở người (MCF-7); Tế bào ung thư gan ở người (HepG2). Các dòng tế bào do GS.TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan, Italia cung cấp, được lưu giữ tại Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Dữ liệu: Sử dụng dữ liệu hệ gene lục lạp và trình tự các vùng DNA của hệ gene lục lạp từ các loài đã được công bố trên GenBank; dữ liệu thông tin và cấu trúc protein trên Ngân hàng dữ liệu protein (<https://www.rcsb.org/>).

2.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất: DPPH, Ascorbic acid, DMSO, SRB, Acetic acid, enzyme α -glucosidase từ nấm men, pNPG, 4-Nitrophenol (Sigma, Mỹ); DMEM, MEME, L-glutamine, sodium pyruvat, NaHCO_3 , penicillin/streptomycin, 10% FBS, Trypsin-EDTA; silica gel thường (230–400 mesh), silica gel RP-18 (150 μm), Sephadex LH-20, nhựa Diaion HP-20 (Nhật Bản); Ellipticine, sulforhodamine B, trichloroacetic acid, tris base, phosphate buffer và các hóa chất khác (Sigma, Merck).

Thiết bị: Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm đều mới, hiện đại và có độ chính xác cao thuộc các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên; Viện Sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Trung tâm Nghiên cứu Vật liệu Sinh học Quốc tế (IBMRC), Viện Nghiên cứu Khoa học Sinh học và Công nghệ sinh học Hàn Quốc (KRIBB).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Luận án đã sử dụng các nhóm phương pháp nghiên cứu, bao gồm: 1) Nhóm phương pháp nghiên cứu hệ gene lục lạp; 2) Nhóm phương pháp phân tích phát sinh chủng loại; 3) Nhóm phương pháp phân tích hoạt tính sinh học, phân lập và xác định chất; 4) Phương pháp phân tích số liệu.

2.3.1. Nhóm phương pháp nghiên cứu hệ gene lục lạp

Gồm các phương pháp: Tách chiết DNA và giải trình tự hệ gene, lắp ráp và chú thích hệ gene, phân tích hệ gene.

2.3.2. Nhóm phương pháp phân tích phát sinh chủng loại

Gồm: Nhóm phương pháp phân tích phát sinh chủng loại trình tự hệ gene lục lạp và nhóm phương pháp phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự một số vùng DNA lục lạp.

2.2.3. Nhóm phương pháp phân tích hoạt tính sinh học, phân lập và xác định chất

Gồm: Phương pháp định tính các hợp chất hữu cơ có trong Lan tai cáo, Phương pháp phân lập saponin từ Lan tai cáo, Phân tích tương tác phân tử và mô phỏng động học phân tử *in silico*.

2.3.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các phần mềm Tin sinh học được sử dụng trong phân tích hệ gene như MEGA11, BioEdit, BLAST trong NCBI.

Các số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS (Statistical software suite) của Windows phiên bản 29.0.2.0. So sánh sự khác biệt bằng kiểm định LSD (Least Significant Difference Test) và kiểm định Duncan ở mức $\alpha=0,05$.

2.4. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận án

Luận án được hoàn thành tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

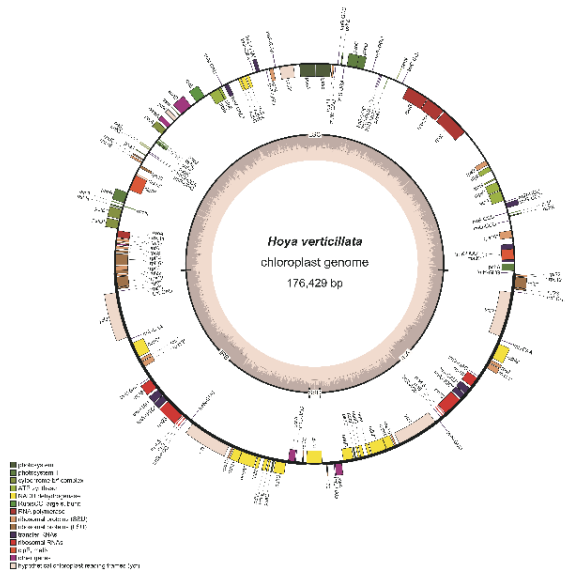
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE LỤC LẠP CỦA LOÀI LAN TAI CÁO

3.1.1. Cấu trúc hệ gene

Hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) gồm 176.429 bp (Hình 3.1). Bốn vùng điển hình của phân tử DNA dạng vòng, bao gồm vùng sao chép đơn lớn LSC (91.020 bp), sao chép

đơn nhỏ SSC (2.297 bp) và 2 vùng lặp lại đảo ngược IR, mỗi vùng IR có kích thước 41.556 bp, trong đó hàm lượng GC chiếm 37,1% (Bảng 3.1).



Hình 3.1. Bản đồ hệ gene lục lạp của Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) thu tại Việt Nam. Các gene ở bên trong vòng tròn ngoài được phiên mã theo chiều kim đồng hồ, các gene ở bên ngoài được phiên mã ngược chiều kim đồng hồ. Các gene thuộc các nhóm chức năng khác nhau được mã hóa màu. Vòng tròn đồng tâm bên trong chỉ ra cấu trúc bốn phần của hệ gene lục lạp, bao gồm các vùng LSC, SSC và IR. Vùng màu xám nhạt biểu thị hàm lượng AT và vùng màu xám đậm biểu thị hàm lượng GC.

Kết quả hiển thị thông tin hệ gene lục lạp từ GeSeq và tRNAscan-SE cho thấy hệ gene lục lạp của Lan tai cáo có tổng cộng 144 gene, bao gồm 98 gene mã hóa protein, 38 gene tRNA và 8 gene rRNA (Bảng 3.1). Các gene được phân loại thành ba nhóm chính dựa trên chức năng của chúng. Nhóm gene liên quan đến quang hợp có 44 gene, gồm các nhóm gene mã hóa các tiểu đơn vị của ATP synthase, phức hợp cytochrome, hệ thống quang hợp I và II, NADPH dehydrogenase và các tiểu đơn vị lớn của các enzyme tham gia vào quá trình quang hợp và tùy thuộc vào ánh sáng; 60 gene còn lại thuộc các nhóm chức năng liên quan đến phiên mã và dịch mã. Chín gene còn lại được

phân thành các nhóm gene khác, bao gồm 5 gene có chức năng liên quan đến quá trình xử lý RNA (*matK* – tổng hợp protein tham gia vào quá trình cắt nối các intron khỏi các RNA thông tin), 4 gene bảo tồn khung đọc mở, tổng hợp cytochrome loại c (*ccsA*), tổng hợp acid béo (*accD*), chuyển hóa carbon (*cemA*) và phân giải protein. Trình tự hệ gene lục lạp của *Lan* tại cáo có chú thích đã được đăng kí trên GenBank mang mã truy cập là OR475244.1.

Bảng 3.1. Tóm tắt hệ gene lục lạp của loài *H. verticillata* var. *verticillata*

Thành phần	Số lượng
Kích thước hệ gene (bp)	176.429
Kích thước vùng sao chép đơn lớn LSC (bp)	91.020
Kích thước vùng sao chép đơn nhỏ SSC (bp)	2.297
Kích thước vùng lặp lại đảo ngược IR (bp)	41.556
Tỷ lệ GC (%)	37,1
Tổng số gene	144
Tổng số gene mã hóa protein	98
Tổng số gene mã hóa tRNA	38
Tổng số gene mã hóa rRNA	8

Tần suất sử dụng mã di truyền của 98 gene mã hóa protein được tìm thấy trong các vùng mã hóa là 29.223, trong đó mã kết thúc bằng U- và A- được tìm thấy thường xuyên hơn G- và C-. AUU (mã hóa izoleusine) là mã di truyền được tìm thấy phổ biến nhất trong số 64 mã di truyền với tần suất RSCU là 4,27, tiếp theo là GAA (mã hóa glutamic acid) với RSCU là 4,24, AAA (mã hóa lysine) với RSCU là 4,19. Trong khi đó, hiếm nhất là các codon AUC, CUG, GUG với tần suất RSCU là 0,01. Tổng cộng có 37 codon được sử dụng thường xuyên hơn với tần suất RSCU > 1. Codon AUA được sử dụng một lần.

H. verticillata var. *verticillata* được xác định bao gồm các trình tự lặp lại mono-nucleotide với tần suất 34 lần (53,12%), trình tự lặp lại di-nucleotide là 14 lần (21,88%), trình tự lặp lại tri-nucleotide là 6 lần (9,38%), trình tự lặp lại tetra-nucleotide là 9 lần (14,06%), trình tự lặp lại penta-nucleotide là 1

lần (1,56%). Do đó, các trình tự lặp lại mono-nucleotide phổ biến nhất là A/T, với tần suất 34 lần (53,12%) (Hình 3.2).

Tần suất lặp lại đơn giản ở các vùng khác nhau của hệ gene cũng có sự phân hóa rõ ràng, trong đó vùng LSC có tần suất 49 trình tự lặp lại, bao gồm 27 mono-nucleotide, 11 di-nucleotide, 4 tri-nucleotide, 6 tetra-nucleotide, 1 penta-nucleotide; vùng IR có tần suất lặp lại là 15, trong đó có 7 mono-nucleotide, 3 di-nucleotide, 2 tri-nucleotide, 3 tetra-nucleotide và không có trình tự lặp lại penta-nucleotide (Hình 3.2A); vùng SSC chỉ có một gene và không chứa trình tự lặp lại đơn (Hình 3.2B). Trong các vùng gene mã hóa (CDS), vùng đệm xen kẽ (IGS) và vùng không mã hóa (Intron), tần suất các trình tự lặp lại đơn giản chủ yếu tồn tại ở các vùng đệm với tần suất 43 lần (vùng CDS là 11, intron là 10).

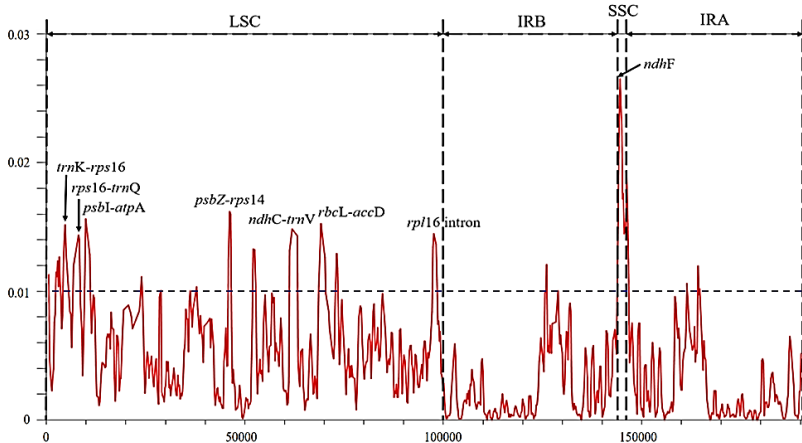
3.1.2. So sánh hệ gene lục lập hoàn chỉnh của *H. verticillata* var. *verticillata* thu thập ở Việt Nam với các loài *Hoya* khác trên GenBank

Các hệ gene được căn chỉnh bằng thuật toán Mauve, trong đó các khối màu biểu thị các vùng tương đồng giữa các loài (Hình 3.4). Kết quả cho thấy sáu hệ gene lục lập của *Hoya* có mức độ bảo tồn cao, với các khối đồng dạng được sắp xếp thẳng hàng rõ rệt. Các số trên sơ đồ thể hiện vị trí nucleotide, còn các khối màu phản ánh đặc điểm đặc trưng của từng hệ gene. Đáng chú ý, các vùng lặp đảo ngược (IR) có sự mở rộng về phía vùng sao chép đơn lớn (LSC) và vùng sao chép đơn nhỏ (SSC).

Phân tích cấu trúc cũng chỉ ra rằng sáu hệ gene lục lập này duy trì mức độ tương đồng rất cao; các gene được bố trí liên tục dọc toàn bộ hệ gene và hầu như không xuất hiện các tái sắp xếp quy mô lớn như đảo đoạn hay chuyển đoạn.

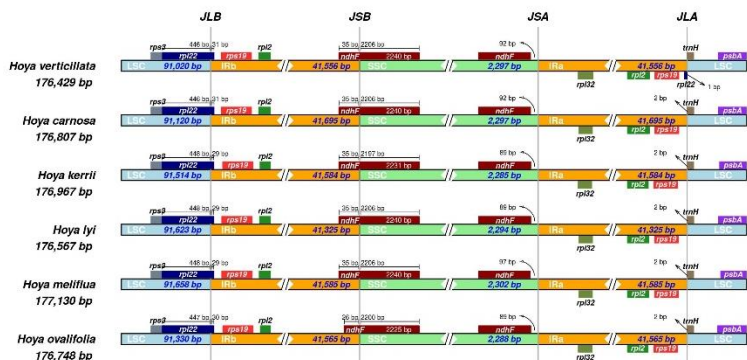
Độ đa dạng nucleotide (Pi) được tính bằng phân tích của số trượt được thực hiện trong DnaSP v. 6.12.03 (phần mềm mạnh mẽ để phân tích đa hình nucleotide từ dữ liệu trình tự DNA), sử dụng độ dài phân tích là 600 bp và kích thước bước là 200 bp. Kết quả phân tích cho thấy cả hai vùng sao chép đơn đều được xác định là có sự khác biệt trình tự đáng kể hơn so với vùng lặp lại đảo ngược IR. Với giá trị giới hạn Pi là 0,03, tám vùng biến đổi cao đã được xác định gồm 6 vùng đệm giữa các gene (*trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *psbZ-rps14*, *ndhC-trnV*, *rbcL-accD*) và 2 vùng intron thuộc các

gene *rpl16*, *ndhF* (Hình 3.5). Sáu vùng biến đổi cao thuộc về vùng sao chép đơn lớn (LSC), một vùng nằm giữa vùng sao chép đơn lớn (LSC) và vùng lặp lại đảo ngược (IR) và gene *ndhF* thuộc về vùng sao chép đơn nhỏ (SSC).



Hình 3.5. Đồ thị so sánh các giá trị đa dạng nucleotide (Pi) thông qua phân tích của sổ trượt (chiều dài của sổ là 600 bp; kích thước bước là 200 bp) trên toàn bộ hệ gene lục lạp của 30 loài *Hoya*. Trục Y biểu thị giá trị Pi tại điểm giữa của cửa sổ trượt và trục X biểu thị vị trí nucleotide. Đường chấm màu xanh biểu thị giá trị ngưỡng Pi là 0,01. Các gene vượt quá ngưỡng này được dẫn nhãn phía trên các đỉnh của đồ thị.

Ranh giới LSC/IRB luôn có vị trí bên dưới gene *rpl22* ở đầu 3' của gene *rpl22*; điểm nối vùng LSC/IRB nằm ở vị trí 29-31 bp của gene *rpl22*, điểm nối IRB/SSC nằm ở vị trí cách gene *ndhF* 26-35 bp. Điểm nối SSC/IRA nằm ở khoảng cách 89-97 bp từ vị trí gene *ndhF*, điểm nối IRA/LSC nằm ở khoảng cách *rps19-trnH*, sự khác biệt được thể hiện đối với khoảng cách *rps19-trnH* của *H. verticillata* var. *verticillata* là chứa gene *rpl22* với khoảng 30 bp và điểm nối chồng lên nhau 1bp tại gene *rpl22*. Sự thu hẹp của vùng SSC và mở rộng của vùng IR trong hệ gene *Hoya* dẫn đến những thay đổi tương quan về chiều dài của 4 vùng cấu trúc và toàn bộ trình tự hệ gene lục lạp, tuy nhiên, sự thay đổi này là rất nhỏ (Hình 3.6).

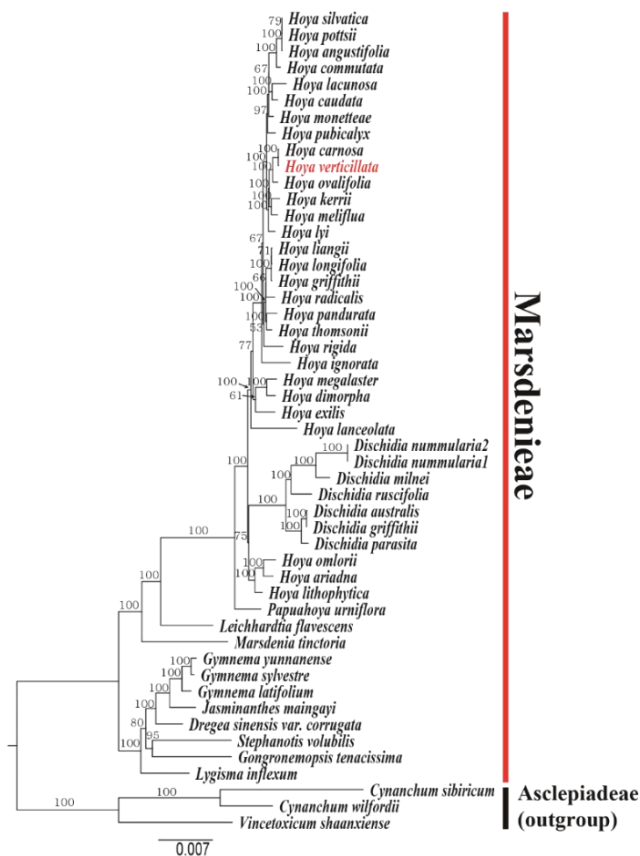


Hình 3.6. So sánh điểm nối các vùng LSC, SSC và hai vùng IR trên 6 hệ gene lục lập hoàn chỉnh của *Hoya*. Các chữ viết tắt JLB, JSB, JSA và JLA lần lượt biểu thị các điểm nối giữa LSC/IRB, SSC/IRB, SSC/IRA và LSC/IRA.

3.2. Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lập một số vùng DNA thuộc hệ gene lục lập

3.2.1. Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên hệ gene lục lập hoàn chỉnh

Dữ liệu phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự DNA lục lập của 50 hệ gene thuộc chi *Hoya*, họ Apocynaceae và nhóm ngoài được tìm kiếm và tải từ GenBank (Phụ lục PL1). Sơ đồ phát sinh chủng loại được thiết lập ở sơ đồ Hình 3.7 được chia thành 2 nhánh; nhánh đầu tiên bao gồm 3 loài của phân họ Asclepiadeae, nhánh thứ hai bao gồm các loài của chi *Hoya* và loài của các chi khác trong cùng tông Marsdenieae. Đáng chú ý, các loài của chi *Hoya* được phân bố thành 2 nhóm: một nhóm lớn với 26 loài và một nhóm nhỏ với 3 loài. Trong nhóm lớn, *H. verticillata* var. *verticillata* (Lan tai cáo) phân bố ở nhóm đơn ngành, có quan hệ họ hàng rất gần với các loài *Hoya* khác và nằm trong cùng một nhóm với *H. carnosa* (hệ số bootstrap là 100%).



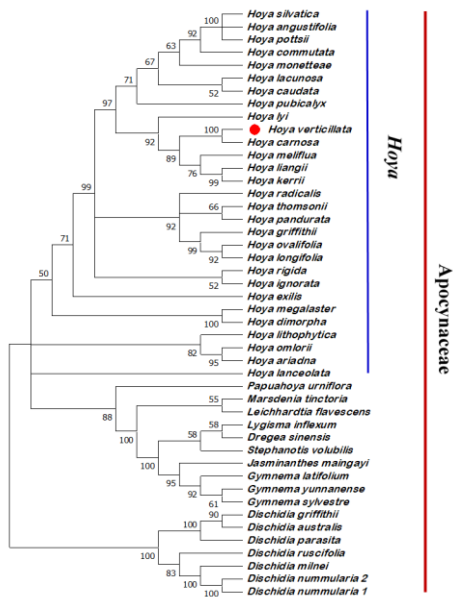
Hình 3.7. Sơ đồ phát sinh chủng loại của 50 loài thuộc họ Apocynaceae dựa trên 79 trình tự gene mã hóa protein. Trình tự được căn chỉnh có chiều dài 75.252 bp. Cây xác suất tối đa (ML) được xác định bằng phần mềm RaxML với giá trị $-\ln L = 196716.416607$. Giá trị của các nút trên biểu thị giá trị bootstrap. Các loài *Cynanchum sibiricum*, *Cynanchum wilfordii* và *Vincetoxicum shaanxiense*, thuộc họ Asclepiadeae, được đặt làm nhóm ngoài (không thuộc tông Marsdenieae).

Để so sánh, phân biệt và xác định chính xác nguồn gốc của các loài trong chi *Hoya*, nhóm nghiên cứu đã bổ sung thêm 3 loài khác là *Vincetoxicum shaanxiense*, *Cynanchum wilfordii* và *Cynanchum sibiricum*; nhánh tách ra sớm nhất là *Lygisma inflexum*, nhánh tách ra sớm thứ hai gồm 7 loài

(*Gymnema yunnanense*, *Gymnema sylvestre*, *Gymnema latifolium*; *Jasminathes maingayi*, *Dregea sinensis* var. *corrugata*, *Stephanotis volubilis*, *Gongronemopsis tenacissima*), trong đó *Gymnema yunnanense*, *Gymnema sylvestre*, *Gymnema latifolium* có quan hệ gần gũi thể hiện giá trị bootstrap = 100; nhánh thứ ba gồm 3 loài là *Marsdenia tinctoria*, *Leichhardtia flavescentis*, *Papuahoya urniflora*; nhánh thứ tư gồm 10 loài và phân làm 2 lớp, *Dischidia* 7 loài và *Hoya* với 3 loài, nhánh thứ năm lớn nhất gồm có 26 loài *Hoya*; Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) có đặc điểm giống và nằm chung nhánh với *H. carnosa*, có quan hệ gần gũi với *H. ovalifolia*, giá trị bootstrap là 100. Trong cây phát sinh chủng loại cho thấy ba loài *H. omlorii*, *H. ariadna*, *H. lithophytica* phân bố ở nhóm cận đơn ngành, chúng tỏ hệ gene của chúng đang trong quá trình tiến hóa.

3.2.2. Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên một số vùng DNA của hệ gene lục lạp

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại dựa trên 3 vùng gene và 6 vùng đệm có hệ số đa dạng nucleotide cao của hệ gene lục lạp Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) đã xác định được vùng gene *ndhF* và các vùng đệm *trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *ndhC-trnV*, *rbcL-accD* là những ứng cử viên mã vạch tiềm năng có thể sử dụng để hỗ trợ phân biệt các loài thuộc chi *Hoya*, phân biệt chi *Hoya* với các chi khác thuộc họ Apocynaceae. Như vậy, ngoài những gene đã được chứng minh là những ứng cử viên tiềm năng sử dụng để hỗ trợ phân biệt loài là *matK*, *rbcL* thì nghiên cứu này đã bổ sung thêm vùng gene *ndhF* (Hình 3.8) và các vùng đệm *trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *ndhC-trnV*, *rbcL-accD*. Tuy nhiên, cần có những thực nghiệm tiếp theo để xác nhận các trình tự này là mã vạch DNA để có thể sử dụng trong thực tiễn.



Hình 3.8. Mối quan hệ phát sinh loài được suy ra bằng phương pháp Maximum Likelihood dựa trên trình tự vùng gene *ndhF*. Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) và *H. carnosae* nhóm phân bố trong cùng một nhóm với hỗ trợ bootstrap mạnh (100%). Các loài thuộc chi *Marsdenia*, *Lygisma*, *Leichhardtia*, *Dregea*, *Stephanotis*, *Jasminanthes*, *Gymnema* và *Dischidia* của họ Apocynaceae được đặt làm nhóm ngoài. Các số trên mỗi nút là giá trị hỗ trợ bootstrap.

3.3. Phân tích hoạt tính sinh học của saponin phân lập từ lan tai cáo

3.3.1. Thành phần hóa học của Lan tai cáo

Cao chiết tổng số thu được từ lá Lan tai cáo được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát thành phần hóa học của lá Lan tai cáo bằng thuốc thử, kết quả đã xác định được có 5 hợp chất là flavonoid, steroid, cumarin, saponin và tannin.

3.3.2. Hoạt tính kháng khuẩn

Cao chiết có tác dụng lên cả vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*) và Gram dương (*S. aureus*, *B. subtilis*). Ở nồng độ 100 mg/mL, cao chiết có hiệu quả hơn kháng sinh Amoxicillin trong chống lại *E. coli* và có hiệu

quả tương đương với kháng sinh chống lại *P. aeruginosa* và *B. subtilis*. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thể hiện mạnh nhất đối với *E. coli* ($P < 0,05$).

3.3.3. Hoạt tính sinh học của các phân đoạn chứa saponin từ cao chiết Lan tai cáo

Hai phân đoạn (trong 5 phân đoạn: B1, B2, B3, B4, B5) **chứa saponin từ cao chiết Lan tai cáo** được tiếp tục đánh giá khả năng chống oxy hóa, gây độc dòng tế bào ung thư và khả năng ức chế α -glucosidase, kết quả xác định được phân đoạn B3 có hoạt tính mạnh hơn phân đoạn B2, các phân đoạn này được chọn cho các phân tích tiếp theo.

3.3.4. Phân lập saponin

3.3.4.1. Chiết xuất và phân lập saponin

Bột lá khô (53,6 g) *H. verticillata* var. *verticillata* được tách chiết bằng phương pháp có sự hỗ trợ siêu âm sử dụng dung môi EtOH/H₂O (75:25) ở điều kiện 200 W, 60°C, 45 phút, thu được 500 mL cho mỗi lần tách chiết (có 2 lần tách chiết). Cao chiết tổng số được tách tiếp bằng VLC silica gel RP-18 và rửa giải lần lượt bằng H₂O 100%, EtOH/H₂O 50:50, EtOH 100%, thu được 3 phân đoạn (A-C) dựa trên phân tích TLC. Phân đoạn B (5,60 g) được tách phân đoạn bằng sắc ký MPLC silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2, 75:25:3, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (B1-B5).

Phân đoạn B2 (356,5 mg) được sắc ký bằng MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2, v/v/v) thu được 4 phân đoạn (B2.1-B2.4). Phân đoạn B2.2 (42,3 mg) tiếp tục được tách phân đoạn bằng sắc ký MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 75:25:3, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (B2.2.1-B2.2.5). Phân đoạn B2.2.3 (15,3 mg) tiếp tục được tách phân đoạn bằng sắc ký MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 75:25:3, v/v/v) thu được Hợp chất 1 (3,3 mg).

Tiếp tục tách phân đoạn B3 (255,6 mg) bằng sắc ký MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 75:25:3, v/v/v) thu được 4 phân đoạn (B3.1-B3.4). Phân đoạn B3.3 (85,2 mg) được tách phân đoạn bằng sắc ký MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 75:25:3, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (B3.3.1-B3.3.5). Phân đoạn B3.3.3 (29,8 mg) được tách bằng sắc ký MPLC trên silica gel 60 (CHCl₃/MeOH/H₂O 70:30:5, v/v/v) thu được Hợp chất 2 (3,1 mg).

3.3.4.2. Thủy phân acid và sắc ký khí

Mỗi glycoside (3 mg) được thủy phân bằng 5 mL dung dịch 2N CF_3COOH trong 3 giờ ở 95 °C. Sản phẩm được chiết bằng CH_2Cl_2 , làm trung tính bằng MeOH, sau đó phân tích TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 8:5:1). Hỗn hợp monosaccharide được dẫn xuất bằng pyridin khan và $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3 \cdot \text{HCl}$ ở 60 °C, tiếp tục với HMDS-TMCS (3:1). Sản phẩm cuối cùng được chiết bằng n-hexan và phân tích GC (1 μL), so sánh với chuẩn Sigma-Aldrich. Thời gian lưu (phút): rhamnose 11,07; fucose 13,82; glucose 17,51.

Trên cơ sở kết quả sắc ký của phân đoạn B2, phân đoạn B3 và tiến hành đo bằng máy phổ hạt nhân cộng hưởng từ hạt nhân được 2 hợp chất mới là:

Parasiticoside A (Hợp chất 1): Bột trắng vô định hình, $[\alpha]_{25} = -38^0$ (MeOH, c 0,30). HR-ESI-MS: m/z 649.3563 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (được xác định là $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{NaO}_{11}$, 649.3558). Dữ liệu NMR ^1H và ^{13}C được đưa ra trong Bảng 3.10.

Parasiticoside B (Hợp chất 2): Bột trắng vô định hình, $[\alpha]_{25} = -45^0$ (MeOH, c 0,22). HR-ESI-MS: m/z 795.4142 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (được xác định là $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{NaO}_{15}$, 795.4137). Dữ liệu NMR ^1H và ^{13}C được nêu trong Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^{13}C và ^1H NMR của hợp chất 1 và 2 (dung môi pyridine- d_5 , δ tính bằng ppm, J tính bằng Hz)

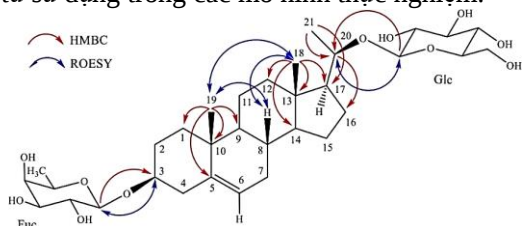
1			2		
Position	δC	δH	Position	δC	δH
1	37,5	1,06 m; 1,62 m	1	37,4	1,08 m; 1,66 m
2	31,3	1,70 m; 2,14 m	2	32,3	1,75 m; 2,18 m
3	78,1	3,93 ov	3	77,9	3,97 ov
4	39,3	2,28 m; 2,72 m	4	39,2	2,40 m; 2,82 m
5	140,9	-	5	140,9	-
6	125,0	5,67 br s	6	125,0	5,72 br s
7	32,1	1,40 m; 1,95 m	7	32,7	1,43 m; 1,97 m
8	31,8	1,30 ov	8	32,2	1,35 ov
9	50,3	0,80 m	9	50,3	0,87 m
10	36,9	-	10	36,3	-
11	21,0	1,27 m; 1,45 m	11	23,9	1,18 m; 1,48 m
12	39,1	1,00 m; 1,82 m	12	39,3	1,11 m; 1,83 m
13	40,5	-	13	40,6	-

14	56,7	1,08 ov	14	56,7	1,09 ov
15	28,0	1,91 m; 2,40 m	15	28,0	1,92 m; 2,48 m
16	26,4	1,05 m; 1,53 m	16	26,8	1,09 m; 1,54 m
17	62,4	1,60 ov	17	62,3	1,64 ov
18	16,9	0,85 s	18	16,9	0,91 s
19	16,0	1,28 s	19	15,9	1,26 s
20	81,3	3,98 ov	20	81,2	4,01 ov
21	23,5	1,12 d (6,0)	21	23,6	1,28 d (6,0)
Fuc-1	99,8	4,78 d (7,6)	Fuc-1	99,9	4,80 d (7,6)
2	74,2	4,52 dd (9,4; 7,6)	2	74,4	4,53 dd (9,4; 7,6)
3	76,6	4,08 dd (9,4; 2,9)	3	76,4	4,12 dd (9,4; 2,9)
4	72,9	3,93 br d (2,9)	4	73,1	3,96 br d (2,9)
5	70,8	3,62 br q (6,4)	5	70,9	3,68 br q (6,4)
6	17,0	1,46 d (6,4)	6	16,8	1,49 d (6,4)
Glc-1	103,4	4,90 d (7,6)	Glc-1	103,5	4,88 d (7,6)
2	74,7	4,05 ov	2	74,6	4,06 ov
3	78,0	4,26 ov	3	77,9	4,28 ov
4	72,2	4,18 ov	4	72,3	4,18 ov
5	78,1	3,96 m	5	78,1	3,96 m
6	62,4	4,33 m; 4,54 m	6	62,3	4,30 m; 4,52 m
			Rha-1	101,2	6,35 br s
			2	72,1	4,79 br s
			3	72,2	4,61 dd (9,4; 3,5)
			4	73,8	4,35 dd (9,9; 9,4)
			5	69,0	4,83 dq (9,9; 5,9)
			6	18,7	1,78 d (5,9)

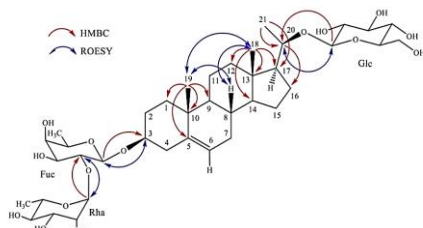
3.3.4.3. Xác định cấu trúc saponin

Quá trình thủy phân acid và phân tích NMR 2D của các hợp chất **1** và **2** xác định các gốc đường: D-fucopyranosyl (Fuc), D-glucopyranosyl (Glc) cho hợp chất **1**; D-fucopyranosyl (Fuc), D-glucopyranosyl (Glc) và α -rhamnopyranosyl (Rha) cho hợp chất **2**. Phân tích GC cho thấy cấu hình tuyệt đối: Fuc và Glc ở dạng D, Rha ở dạng L (thời gian lưu: Rha 11,07; Fuc 13,82; Glc 17,51 phút). Hướng β của Fuc và Glc được chứng minh bằng giá trị $^3J_{H-1,H-2} \sim 7,6$ Hz, trong khi Rha dạng pyranoid α được xác định với $^3J_{H-1,C-1} \sim 166$ Hz.

Kết quả phân tích sắc kí và quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân xác định hợp chất **1** là 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- β -D-fucopyranoside 20-O- β -D-glucopyranoside và được đặt tên là parasiticoside A, hợp chất **2** là 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranoside-20-O- β -D-glucopyranoside, được đặt tên là parasiticoside B. Kết quả tìm kiếm trên thư viện dữ liệu cho thấy đây là 2 hợp chất mới. Việc xác định cấu trúc phân tử của 2 chất mới là cơ sở để xây dựng mô hình cấu trúc phân tử sử dụng trong các mô hình thực nghiệm.



Hình 3.14. Cấu trúc liên kết (HMBC) và cấu hình không gian (ROESY) của hợp chất **1**



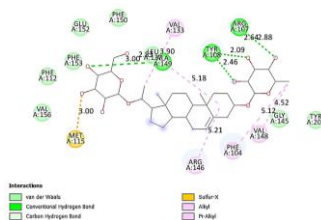
Hình 3.15. Cấu trúc liên kết (HMBC) và cấu hình không gian (ROESY) của hợp chất **2**

3.3.5. Nghiên cứu tương tác phân tử và động học phân tử *in silico* của saponin

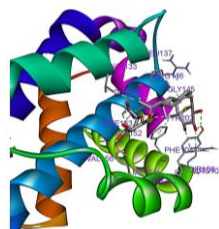
3.3.5.1. Nghiên cứu tương tác phân tử *in silico*

Thực hiện trên các saponin steroid phân lập từ *H. verticillata* như chất ức chế protein chống apoptosis Bcl-2 với navitoclax làm đối chứng.

Kết quả cho thấy Hợp chất **1** (parasiticoside A), Hợp chất **2** (parasiticoside B), Hợp chất **3**, Hợp chất **4**, Hợp chất **5** và navitoclax đều hình thành tương tác Van der Waals với các gốc amino acid của Bcl-2 (6GL8). Mỗi tương tác phân tử cụ thể với các amino acid của 6GL8 đã được chứng minh trong Hình 3.17.

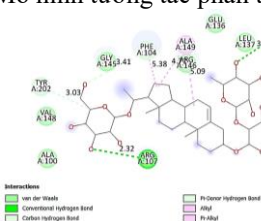


A-1

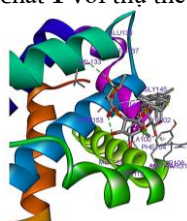


A-2

A: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của Hợp chất **1** với thụ thể 6CL8

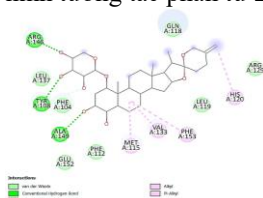


B-1

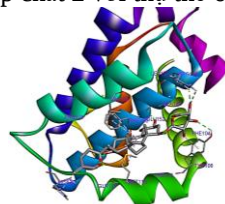


B-2

B: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của Hợp chất **2** với thụ thể 6CL8

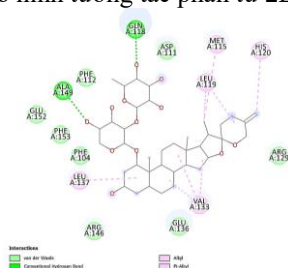


C-1



C-2

C: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của Hợp chất **3** với thụ thể 6CL8

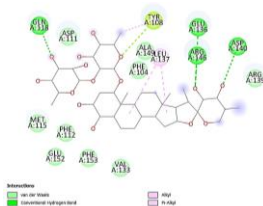


D-1

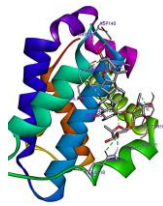


D-2

D: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của Hợp chất **4** với thụ thể 6CL8

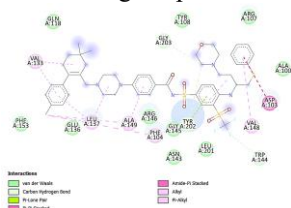


E-1

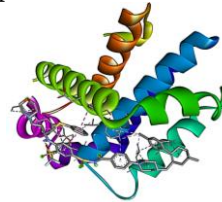


E-2

E: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của Hợp chất 5 với thụ thể 6CL8



F-1



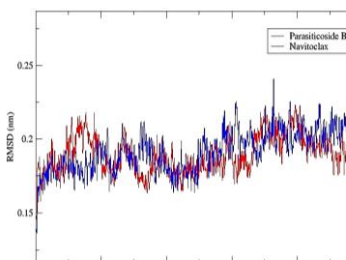
F-2

F: Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của navitoclax với thụ thể 6CL8

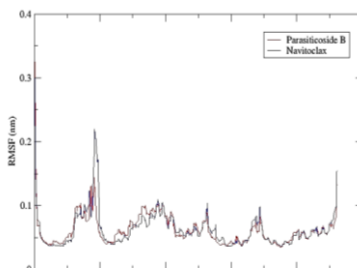
Hình 3.17. Mô hình tương tác phân tử 2D và 3D của hợp chất với 6GL8

3.3.5.2. Nghiên cứu động học phân tử in silico

Trong nghiên cứu động học phân tử, các tương tác chủ yếu hình thành giữa protein Bcl-2 (6GL8) và các hợp chất là liên kết hydrogen (Hình 3.18)



Hình 3.18. Biểu đồ so sánh độ ổn định cấu trúc (RMSD) của phức hợp Hợp chất 2 (Parasiticoside B) và Navitoclax trong 10 ns mô phỏng động học phân tử. Trục tung là độ lệch bình phương trung bình căn bậc hai (RMSD) tính bằng nanomet (nm) dao động từ 0 đến 0,25 nm; trục hoành là thời gian tính bằng nano giây (ns) dao động từ 0 đến 10 ns.



Hình 3.19. Biểu đồ so sánh dao động cấu trúc (RMSF) của phức hợp Hợp chất 2 (Parasiticoside B) và Navitoclax trong mô phỏng động học phân tử. Trục tung là biến động bình phương trung bình căn bậc hai tính bằng nano mét (nm), trục hoành là số đơn vị liên kết. Parasiticoside B (đường màu đỏ), Navitoclax (đường màu xanh).

Hợp chất **2** (Parasiticoside B) tạo bốn liên kết hydrogen với Arg107, Phe104, Tyr202 và Val133, mang lại độ ổn định tốt (-8,87 kcal/mol). Hợp chất **1** (Parasiticoside A) cũng hình thành bốn liên kết hydrogen với Ala149, Arg107, Leu137 và Tyr108; trong đó Ala149 và Val133 là amino acid không phân cực, góp phần ổn định liên kết (-8,28 kcal/mol).

Hợp chất **3** và **4** có liên kết với Ala149, cho thấy độ ổn định cao (-9,29 và -11,09 kcal/mol). Hợp chất **5** hình thành năm liên kết hydrogen với Arg146, Asp140, Gln118, Glu136, Tyr108, một tương tác pi-alkyl yếu với Leu137, đạt độ ổn định -11,16 kcal/mol. Navitoclax (đối chứng) tạo ba liên kết hydrogen với Gly203, Trp144, Tyr202 và sáu tương tác kỵ nước (Ala149, Asp103, Leu137, Phe104, Val133, Val148), với độ ổn định -8,34 kcal/mol.

Giá trị năng lượng liên kết lần lượt là -8,28; -8,87; -9,29; -11,09; -11,16 và -8,34 kcal/mol cho Hợp chất **1** (parasiticoside A), Hợp chất **2** (parasiticoside B), chất **3**, **4**, **5** và navitoclax. Đặc biệt, mô phỏng cho thấy liên kết của Hợp chất **2** (parasiticoside B) với 6GL8 duy trì ổn định trong suốt quá trình, gợi ý đây là ứng viên tiềm năng cho nghiên cứu thực nghiệm về khả năng ức chế Bcl-2 trong ung thư.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) đã được giải trình tự với kích thước 176.429 bp, có cấu trúc 4 vùng điển hình của phân tử DNA dạng vòng, bao gồm vùng sao chép đơn lớn-LSC (91.020 bp), vùng sao chép đơn nhỏ-SSC (2.297 bp) và hai vùng lặp lại đảo ngược IR, mỗi vùng IR có kích thước 41.556 bp, trong đó hàm lượng GC chiếm 37,1%. Hệ gene lục lạp của Lan tai cáo có 144 gene, trong đó 98 gene mã hóa protein, 38 gene tRNA và 8 gene rRNA.

1.2. Phân tích sự phát sinh chủng loại cho thấy Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) có mối quan hệ di truyền gần nhất với loài *H. carnosa*, chi *Hoya* và có mối quan hệ di truyền gần với các loài của chi khác trong cùng tông Marsdenieae. Vùng gene *ndhF* và các vùng đệm *trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *ndhC-trnV*, *rbcL-accD* được đề xuất là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng có thể sử dụng hỗ trợ nhận diện loài thuộc chi *Hoya*.

1.3. Các phân đoạn chứa saponin tách từ cao chiết tổng số của lá Lan tai cáo *H. verticillata* var. *verticillata*) có hoạt tính chống oxy hoá, gây độc tế bào ung thư và ức chế α -glucosidase. Hai saponin mới được phân lập từ phân đoạn B2 và B3 là 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5-ene-3-O- β -D-fucopyranoside 20-O- β -D-glucopyranoside và 3 β ,20-dihydroxy-pregn-5 ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranoside-20-O- β - D-glucopyranoside. Phân tích mô hình tương tác và động học phân tử *in silico* của các saponin phân lập từ Lan tai cáo đã xác định chất Hợp chất 2 có thể là ứng cử viên tiềm năng chống protein Bcl-2 trong ung thư.

2. Đề nghị

2.1. Tiếp tục phân tích tiến hóa phân tử dựa trên trình tự DNA lục lạp của các loài *Hoya* từ dữ liệu của GenBank để củng cố hoặc bổ sung cho hệ thống các loài thuộc họ Apocynaceae (Asclepiadaceae).

2.2. Tiếp tục thực nghiệm để chứng minh vùng gene *ndhF* và các vùng đệm *trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *ndhC-trnV*, *rbcL-accD* làm mã vạch DNA lục lạp hỗ trợ định danh chi *Hoya* và phân biệt loài thuộc chi này.

2.3. Tiếp tục nghiên cứu xây dựng mô hình cấu trúc saponin tối ưu có hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư dựa trên kết quả phân tích mô hình tương tác và động học phân tử *in silico*.