

Tối ưu quy trình PCR nhằm nâng cao hiệu quả phân tích DNA từ lá Thần xạ hương (*Luvunga scandens* (Roxb.) Wight)

Trần Phương Khánh¹, Nguyễn Thị Yến Nhi^{1,2}, Lê Nguyễn Thiên Hân^{2,3}, Trần Thị Kha Uyên^{1,2}, Võ Thanh Hoá^{1,2,*}, Hà Diệu Ly^{1,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Thần xạ hương (*Luvunga scandens* (Roxb.) Wight) là cây dược liệu quý, thường được sử dụng trong y học dân gian để điều trị một số bệnh như xơ gan, cổ trướng. Tuy nhiên, tình trạng sử dụng lẫn lộn giữa Thần xạ hương và các loài thực vật có hình thái tương tự đòi hỏi cần có phương pháp định danh chính xác, nhanh chóng và hiệu quả. Bên cạnh các phương pháp định danh phổ biến như phương pháp cảm quan hoặc mô tả hình thái, sự xuất hiện của mã vạch DNA đã mang lại một phương pháp định danh các loài thực vật một cách nhanh chóng và chính xác để phân biệt các loài thực vật và đặc biệt là các cây thuốc. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu tối ưu điều kiện PCR cho 3 vùng trình tự ITS1, ITS và rbcL với DNA tách chiết từ lá Thần xạ hương. Kết quả cho thấy điều kiện PCR phù hợp cho việc khuếch đại DNA trên 3 đoạn mỗi ITS1, ITS và rbcL là 35 chu kỳ nhiệt, nồng độ DNA 2-4 ng/ μ L cho sản phẩm PCR tốt nhất, với độ dài đoạn khuếch đại khoảng 500bp. Ngoài ra, quy trình tách chiết DNA từ lá Thần xạ hương sử dụng phương pháp CTAB cho thấy hiệu suất DNA cao, năng suất cao hiệu quả của việc phân tích DNA với lượng mẫu tối thiểu. Kết quả của chúng tôi cung cấp cơ sở khoa học cho việc định danh Thần xạ hương thông qua phân tích DNA, đồng thời hỗ trợ các nghiên cứu phát sinh loài trong tương lai.

Từ khoá: Thần xạ hương, Định danh thực vật, chiết xuất DNA, Polymerase chain reaction

¹Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Liên hệ

Võ Thanh Hoá, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Email: vthoa@uhsvnu.edu.vn

Liên hệ

Hà Diệu Ly, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Email: hadieuly@gmail.com

Lịch sử

- Ngày nhận: 16-08-2025
- Ngày sửa đổi: 19-12-2025
- Ngày chấp nhận: 30-04-2026
- Ngày đăng: 18-06-2026

DOI: 10.32508/vnuhcmj-hs.v7i1.701



TỔNG QUAN

Thần xạ hương, tên khoa học *Luvunga scandens* (Roxb.) Wight thuộc họ Cam (Rutaceae), là cây thuốc nổi tiếng với nhiều công dụng¹. Dân gian thường dùng chữa xơ gan, cổ trướng, bọ cạp cắn, viêm gan, viêm xoang, đau xương khớp và đau cơ^{2,3}. Mặc dù có nhiều công dụng đặc biệt, cho đến nay các nghiên cứu trên Thần xạ hương tại Việt Nam chủ yếu vẫn tập trung vào các đặc trưng về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các cao chiết. Nghiên cứu của TS. Mai Đình Trị với trên rễ cây Thần xạ hương đã phân lập được 22 hợp chất gồm các terpenoid, steroid, alkaloid acridon, coumarin và các dẫn xuất, ngoài ra phân lập được hai hợp chất mới là luvunga A⁴ và luvungaside A⁵. Thần xạ hương được ghi nhận với các tính chất dược lý như gây độc tế bào ung thư, chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn^{6,7}. Cao chiết methanol từ lá cho thấy khả năng gây độc trên tế bào ung thư gan HepG2, với % tế bào sống sót là $26,65 \pm 0,70\%$ ở nồng độ cao chiết 100 mg/L⁸. Lá Thần xạ hương cũng cho thấy khả năng gây độc trên dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan Huh7, với % tế bào ung thư sống sót là $28,7 \pm 15,9\%$ khi xử lý với nồng độ 100 μ g/mL⁹. Chiết xuất ethyl acetat từ thân và rễ Thần xạ hương cũng cho thấy tác dụng kháng khuẩn

tốt trên các chủng khuẩn như *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant S. aureus*, với giá trị MIC từ 3,125 – 25 mg/mL⁶.

Được ghi chép trong sách Cây thuốc An Giang, Thần xạ hương thường mọc hoang ở trong rừng các tỉnh phía Nam nước ta, cũng gặp ở rừng núi Cẩm, An Giang³, ngoài ra còn được ghi nhận ở một số tỉnh Vĩnh Phúc, Hoà Bình, Ninh Bình, và thành phố Hà Tiên. Hiện nay, tại các địa phương ghi nhận tình trạng sử dụng lẫn lộn giữa Thần xạ hương và một loài có đặc điểm gần giống với Thần xạ hương là Xáo tam phân (*Paramignya trimera*). Các nghiên cứu liên quan đến hình thái và mối quan hệ phát sinh loài giữa *P. trimera* và *L. scandens* (Roxb.) Wight vẫn chưa được mô tả rõ ràng, cùng với sự tồn tại nhiều tên gọi địa phương của hai loài này cũng gây khó khăn trong việc xác định và phân biệt chúng với nhau. Thần xạ hương là cây có giá trị sử dụng cao, vì vậy việc định danh chính xác để bảo tồn và sử dụng Thần xạ hương là một nhu cầu thực tế và hết sức cần thiết.

Các phương pháp định danh thực vật phổ biến gồm phương pháp cảm quan, phương pháp mô tả hình thái học và phương pháp xác định cấu trúc hóa học. Phương pháp mô tả hình thái học được sử dụng rộng

Trích dẫn bài báo này: Khánh T P, Nhi N T Y, Hân L N T, Uyên T T K, Hoá V T, Ly H D. **Tối ưu quy trình PCR nhằm nâng cao hiệu quả phân tích DNA từ lá Thần xạ hương (*Luvunga scandens* (Roxb.) Wight)**. VNUHCM J. Health Sci. 2026; 7(1):955-963.

Bản quyền

© Tạp chí ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

rãi, nhưng yêu cầu quan sát đầy đủ các bộ phận như lá, hoa, quả, hạt qua các giai đoạn phát triển, làm mất nhiều thời gian trong việc định danh^{10,11}. Hạn chế lớn của phương pháp mô tả hình thái là khó phân biệt các loài thực vật có đặc điểm hình thái tương tự nhưng không cùng loài, đòi hỏi phải có chuyên gia phân loại học¹². Phương pháp xác định cấu trúc hóa học có thể bị ảnh hưởng bởi các điều kiện sinh lý và bảo quản, làm thay đổi nồng độ các hợp chất hoặc chất đánh dấu hóa học¹³⁻¹⁵. Ngoài ra, phương pháp này sẽ không phù hợp với những thực vật chưa được xây dựng chuyên luận riêng trong các tài liệu tham khảo. Trong những năm gần đây, việc xây dựng mã vạch DNA để định danh thực vật dần trở nên phổ biến với khả năng phân tích chính xác, hữu hiệu, nhanh chóng bằng cách thông qua một vùng DNA đặc hiệu¹⁶. Ở thực vật, hệ gen lục lạp mang nhiều đặc điểm thích hợp đối với chỉ thị DNA. Tại Việt Nam, hiện nay hầu như chưa có nghiên cứu nào để cập đến việc định danh Thần xạ hương sử dụng chỉ thị DNA. Chính vì vậy, nghiên cứu “Tối ưu quy trình PCR nhằm nâng cao hiệu quả phân tích DNA từ lá Thần xạ hương *L. scandens* (Roxb.) Wight” được tiến hành nhằm bước đầu xác định các điều kiện tối ưu cho việc phân tích DNA, với mục tiêu giảm thiểu lượng mẫu sử dụng và nâng cao hiệu quả của phản ứng PCR, làm tiền đề cho các nghiên cứu về định danh và nghiên cứu về phát sinh loài của Thần xạ hương.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hoá chất, thiết bị và đối tượng nghiên cứu

Hoá chất

2X Cetyltrimethylammonium bromide buffer (CTAB), chloroform, ethanol 70, isoamylalcohol, isopropanol, Tris-EDTA 1X buffer, và Master mix 2X được cung cấp bởi PhuSaGenomics, Việt Nam; nước DEPC, agarose, DNA loading dye 6X, GeneRuler 100bp DNA Ladder được cung cấp bởi Thermo Scientific, Mỹ; SafeviewTM Stain DNA Classic được cung cấp bởi ABM, Canada; Tris-Borate-EDTA 10X (TBE), bộ kit tinh sạch PCR được cung cấp bởi Jena Bioscience, Đức.

Thiết bị

Máy block ủ điều nhiệt (Stuart, Anh), máy ly tâm (Eppendorf, Đức), máy quang phổ UV-Vis Nanodrop (MicroDigital, Hàn Quốc), máy chụp gel GelPic100 (PhuSaGenomics, Việt Nam), máy khuếch đại PCR Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf, Đức), máy lắc Vortex (Stuart, Anh), máy giải trình tự Sanger hai chiều (PhuSaGenomics, Việt Nam), kính hiển vi

quang học (Olympus, Nhật), tủ mát 4 °C (Sanyo, Nhật Bản), tủ lạnh sâu -30 °C (Sanyo, Nhật Bản).

Thu hái mẫu

Lá Thần xạ hương (*L. scandens* (Roxb.) Wight) được thu hái vào tháng 12/2022 tại huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang. Mẫu lá tươi được bảo quản trong túi nilon kín ở nhiệt độ -30 °C cho đến khi chiết xuất DNA. Tiến sĩ Dược sĩ Võ Thanh Hoá (Trường Đại học Khoa học Sức khoẻ, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh) đã thực hiện mô tả hình thái và định danh. Mẫu được lưu tại Bộ môn Dược liệu – Dược cổ truyền, Trường Đại học Khoa học Sức khoẻ, mã lưu mẫu LS202212.

Chiết tách và tinh sạch DNA

DNA từ lá Thần xạ hương được chiết tách theo phương pháp CTAB có cải tiến¹⁷. Lá tươi được nghiền nát, sau đó lấy lá tươi đã nghiền hoà tan trong 800 µL đệm CTAB 2X đã ủ trước ở 65 °C. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 65 °C trong 60 phút và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch nổi được chuyển sang một eppendorf mới, sau đó thêm 200 µL cloroform - isoamyl alcohol (24:1), trộn đều và tiếp tục ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch nổi chứa DNA (khoảng 300-350 µL) sang một eppendorf mới, thêm 500 µL dung dịch isopropanol và lắc nhẹ. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi được loại bỏ thu kết tủa. Thêm 400 µL ethanol 70%, khuấy nhẹ, ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút (lặp lại hai lần), sau đó loại bỏ phần dịch nổi và thu kết tủa. Kết tủa được sấy khô ở 60 °C trong bể ổn nhiệt, thu được DNA từ lá. DNA được hòa tan trong 50 µL dung dịch TE 1X và bảo quản ở -30 °C. Các mẫu DNA chiết xuất được đo mật độ quang học ở bước sóng 260 và 280 nm để xác định độ tinh sạch và nồng độ của DNA, sử dụng máy đo quang học Thermo ScientificTM NanoDrop Lite Plus¹⁸.

Tối ưu quy trình PCR

Quy trình PCR được thực hiện nhằm khuếch đại các vùng gen ITS, ITS1 và rbcL với trình tự được thể hiện tại Bảng 1. Mỗi 20 µL hỗn hợp PCR chứa 10 µL PCR Master mix kit (2X); 0,5-0,7 µL mỗi xuôi (10 pmol/µL); 0,5 µL mỗi ngược (10 pmol/µL); 2 µL DNA, và lượng vừa đủ DEPC.

Quá trình PCR gồm giai đoạn tiền biến tính 95 °C trong 5 phút và biến tính. Giai đoạn biến tính gồm 3 bước: (1) biến tính ở 95 °C trong 20 giây; (2) ghép cặp với nhiệt độ gần mỗi (Ta) tùy thuộc vào loại

Bảng 1: Vùng gen mã vạch DNA và mỗi được sử dụng trong nghiên cứu. [Nguồn: Cheng và cộng sự (2016)¹⁹, CBOL Plant Working Group (2009)²⁰]

Vùng gen	Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Ta*
ITS	ITS-p5	CCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG ¹⁹	55 °C
	ITS-p4	CCGCTTAKTGATATGCTTAAA ¹⁹	
ITS1	ITS-u1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	57 °C
	ITS-u2	GCGTTCAAAGAYTCGATGRITC	
rbcL	rbcL-F	ATGTCACCACAAAACAGAGACTAA ²⁰	57 °C
	rbcL-R	TTCGGCACAAAATACGAAACGATCTC]	

*Ta (annealing temperature): Nhiệt độ gắn mỗi

cặp mỗi (Bảng 1) trong 30 giây; (3) kéo dài DNA. Trong nghiên cứu này, số chu kỳ nhiệt trong quá trình khuếch đại DNA sẽ được khảo sát nhằm tìm kiếm điều kiện tối ưu cho việc khuếch đại gen mục tiêu. Ngoài ra, nghiên cứu cũng khảo sát ảnh hưởng nồng độ DNA đến sự khuếch đại của trình tự rbcL và ITS cho quá trình PCR nhằm xác định nồng độ phù hợp. Sau khi quá trình PCR hoàn tất, sản phẩm được nhuộm và thực hiện điện di trên thạch agarose 3% với điện áp 110V trong 40 phút. Các mẫu có kích thước phù hợp được thu thập và tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch PCR theo quy trình của nhà sản xuất.

KẾT QUẢ, THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái của lá Thần xạ hương

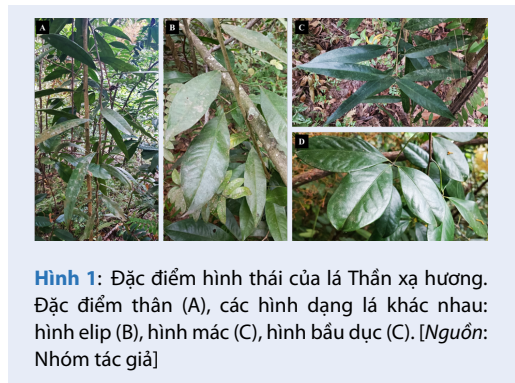
Đặc điểm hình thái của Thần xạ hương được thể hiện tại Hình 1. Thần xạ hương là cây thân gỗ, dạng dây leo thân mềm khi còn non, già trở nên hóa gỗ. Thân và cành có nhiều gai nhọn, cong dài 1-2 cm. Lá kép lông chim một lần, có 3-5 lá chét; lá chét hình elip (Hình 1B), hình mác (Hình 1C) hoặc bầu dục (Hình 1D), mép nguyên, mặt trên xanh bóng, mặt dưới nhạt hơn dài 15-20 cm, rộng 1,5-4 cm. Gân lá nổi rõ. Tuy nhiên, lá ở phần gốc có xu hướng thu hẹp chỉ còn một lá chét hình bầu dục, nhọn hai đầu, mép nguyên hoặc là một lá chét thuôn dài, hẹp. Lá non có mùi thơm nhẹ. Rễ có mùi thơm đặc trưng.

Đặc điểm vi phẫu của lá Thần xạ hương

Thần xạ hương có bốn dạng lá khác nhau tính từ phía gốc đến ngọn. Tuy nhiên, cấu tạo giải phẫu cho thấy các lá này có cấu tạo giống nhau, chỉ khác nhau về hình dạng vi phẫu (Hình 2).

Chi tiết vi phẫu lá Thần xạ hương được mô tả tại Hình 3. Vi phẫu lá lõi ở 2 mặt, lõi nhiều ở mặt dưới ngay tại gân giữa.

Gân giữa: Biểu bì trên và biểu bì dưới có tế bào hình đa giác, vách ngoài lõi có tấm cutin, lớp cutin ở biểu



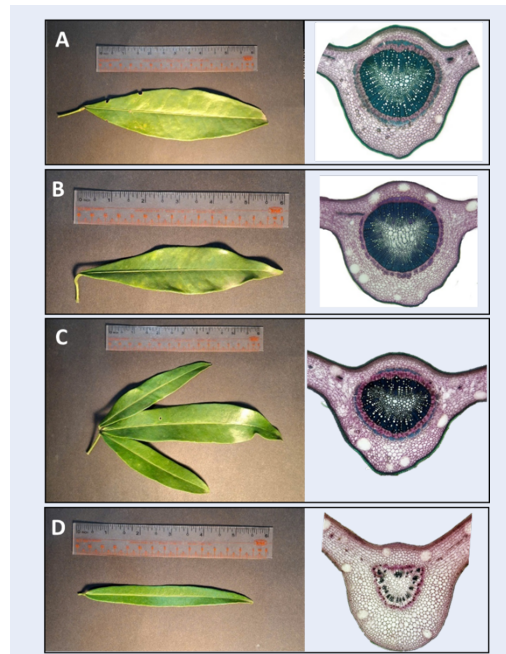
Hình 1: Đặc điểm hình thái của lá Thần xạ hương. Đặc điểm thân (A), các hình dạng lá khác nhau: hình elip (B), hình mác (C), hình bầu dục (D). [Nguồn: Nhóm tác giả]

bì trên dày hơn. Ngay dưới biểu bì có các túi tiết tinh dầu kiểu ly bào. Mô dày góc ngay dưới biểu bì, gồm 2-3 lớp tế bào hình đa giác, kích thước không đều, xếp lộn xộn, vách cellulose dày lên ở góc, có nhiều ở dưới biểu bì trên. Mô mềm gồm các tế bào đa giác hoặc bầu dục, kích thước không đều, xếp lộn xộn theo kiểu mô mềm đạo hoặc mô mềm khuyết, rải rác có tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Hệ thống dẫn tập trung ở giữa, bao quanh là các cụm mô cứng gồm các sợi mô cứng hoặc tập trung thành vòng không liên tục chỉ gồm 1-2 lớp sợi mô cứng. Bó dẫn có libe bao quanh gỗ, mô mềm gỗ xếp thành dãy, mạch gỗ xếp thành dãy, mạch gỗ to dẫn từ trong ra ngoài. Ở giữa bó dẫn là mô mềm đạo đã hóa hồ cứng. Ở lá non, không có mô cứng bao quanh bó dẫn, mô mềm gỗ vách vẫn còn là cellulose.

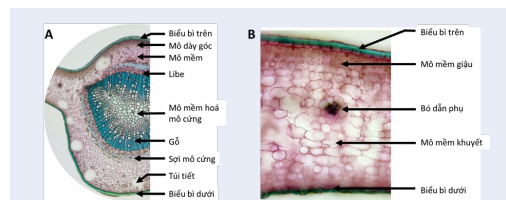
Phiến lá chính thức: Biểu bì trên và dưới có cấu tạo tương tự như biểu bì ở gân giữa. Dưới biểu bì có túi tiết tinh dầu. Thịt lá cấu tạo dị thể bất đối xứng, gồm 2-3 lớp tế bào mô giậu ngay dưới biểu bì trên, dưới mô mềm giậu là 3-6 lớp tế bào mô mềm khuyết. Rải rác có các bó dẫn phụ.

Bảng 2: Điều kiện nhiệt độ và số chu kỳ nhiệt cần khảo sát. [Nguồn: Nhóm tác giả]

	Số chu kỳ	Tiến biến tính	Biến tính	Bắt mỗi	Kéo dài	Hoàn thành
Điều kiện 1	30	95 °C/ 5 phút	95 °C/ 30 giây	Ta °C/ 30 giây	72 °C/ 90 giây	72 °C/ 60 giây
Điều kiện 2	40		95 °C/ 30 giây	Ta °C/ 30 giây	72 °C/ 90 giây	
Điều kiện 3	35		95 °C/ 30 giây	Ta °C/ 30 giây	72 °C/ 90 giây	



Hình 2: Cấu tạo vi phẫu lá Thần xạ hương. A) Hình ảnh lá chết và vi phẫu lá chết ở gốc (1) B) Hình ảnh lá chết và vi phẫu lá chết ở gốc (2). C) Hình ảnh lá kép có 3 lá chết và vi phẫu. D) Hình ảnh lá non và vi phẫu. [Nguồn: Nhóm tác giả]



Hình 3: Chi tiết vi phẫu lá Thần xạ hương A) Vi phẫu gân giữa lá, B) Vi phẫu phiến lá. [Nguồn: Nhóm tác giả]

Kết quả chiết xuất DNA

Khối lượng lá phù hợp cho quá trình chiết tách DNA sử dụng phương pháp CTAB đã được khảo sát. Kết quả định lượng nồng độ DNA và độ tinh sạch được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả độ tinh sạch và nồng độ DNA tách chiết từ lá Thần xạ hương. [Nguồn: Nhóm tác giả, phần mềm NanoDrop Lite Plus Software]

Tên mẫu	Khối lượng mẫu	Nồng độ (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
TXH_01	100 mg	1336,519	1,26
TXH_02	100 mg	1119,866	1,20
TXH_03	50 mg	678,351	1,80
TXH_04	50 mg	394,391	1,84

TXH_01 và TXH_03 được ký hiệu cho mẫu lá tươi, TXH_02 và TXH_04 được ký hiệu cho mẫu lá được bảo quản trong tủ lạnh -30 °C. Độ tinh sạch của DNA được xác định thông qua thông số OD₂₆₀/OD₂₈₀, với giá trị tham chiếu cho DNA tinh sạch là khoảng $\geq 1,8$ ¹⁸. Khi dùng lượng mẫu 100 mg, kết quả thu được DNA có nồng độ cao, tuy nhiên giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ khoảng 1,2 cho thấy DNA không tinh sạch hoàn toàn, có thể chỉ ra sự hiện diện của protein, phenol hoặc các chất gây ô nhiễm khác trong mẫu²¹. Vì vậy, mẫu TXH_01 và TXH_02 không phù hợp để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Khi giảm khối lượng mẫu lá tươi xuống 50 mg, giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ của DNA tăng lên trong khoảng từ 1,80 đến 1,84, cho thấy mẫu có độ tinh sạch cao dù sử dụng mẫu lá tươi hay lá đã qua bảo quản trong tủ âm sâu, cho thấy DNA đảm bảo đủ cho quá trình PCR. Nguyên nhân của sự khác biệt rõ rệt này có thể đến từ ảnh hưởng của các hợp chất chuyển hoá thứ cấp lên quá trình tách chiết. Lá Thần xạ hương chứa nhiều hợp chất phenolic⁸, flavonoid²² và tinh dầu với thành phần chính là các sesquiterpene^{8,23}. Các hợp chất polyphenol, alkaloid, flavanoid, phenol, terpene và quinine được báo cáo có thể gây trở ngại cho quá trình phân lập DNA^{24,25}. Do đó, quy trình tách chiết cần được tối ưu hóa cho từng

loài và mô thực vật để giảm thiểu ảnh hưởng của các chất này²⁶. Việc sử dụng lượng vừa đủ mẫu lá cho quá trình tách chiết DNA có thể giúp kiểm soát tác động của các hợp chất này lên sản phẩm DNA sau khi tách chiết, từ đó nâng cao chất lượng và độ tinh sạch của DNA thu được. Polysaccharide trong mô thực vật có ái lực cao với DNA, rất khó loại bỏ hoàn toàn trong quá trình chiết tách và là nguyên nhân chính gây ức chế hoạt động của Taq polymerase trong các phản ứng PCR²⁷. Các phương pháp tách chiết DNA thực vật thường bổ sung polyvinylpyrrolidone (PVP) và β -mercaptoethanol vào đệm ly giải nhằm loại bỏ polyphenol và polysaccharide tăng độ tinh sạch^{26,28}. Tuy nhiên, việc bổ sung PVP phân tử cũng góp phần kết tủa DNA, gây giảm nồng độ DNA thu hồi²⁹. Hơn nữa, dư lượng β -mercaptoethanol còn sót lại có thể ức chế trực tiếp Taq polymerase ở các chu kỳ PCR tiếp theo³⁰. Vì vậy DNA cần phải tinh sạch thêm nhiều bước, loại bỏ β -mercaptoethanol để đảm bảo hiệu suất PCR. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ sử dụng phương pháp CTAB thông thường và kết hợp bước tủa với ethanol 70% để thu được DNA có độ tinh sạch đạt và vẫn đảm bảo hiệu suất PCR.

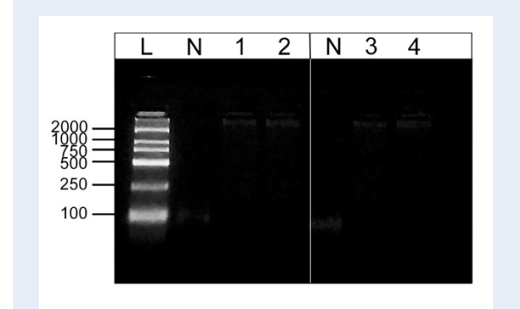
Tối ưu quy trình PCR

Quy trình PCR được tiến hành trên các đoạn mỗi rbcL và ITS với mẫu DNA tách chiết từ mẫu TXH_03. Vùng rbcL phổ biến ở thực vật và có tỷ lệ khuếch đại cao³¹ và ITS được ghi nhận là trình tự DNA để phân biệt ở cấp độ loài với ghi nhận mức độ cao khác biệt di truyền giữa các loài cụ thể³². Các đoạn mỗi ITS-p5 và ITS-p4 của vùng ITS được sử dụng trong nghiên cứu cũng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây về tỷ lệ khuếch đại thành công cao trên cây họ Rutaceae³³. Sau khi điện di, sản phẩm PCR thu được ở nồng độ DNA ban đầu là 678,351 ng/ μ L không xuất hiện băng trên gel (Hình 4). Nguyên nhân có thể đến từ ảnh hưởng của nhiều chất chuyển hóa thứ cấp, chẳng hạn như polysaccharide và phenolic, gây ảnh hưởng đến chất lượng DNA cũng như ức chế quá trình PCR³⁰.

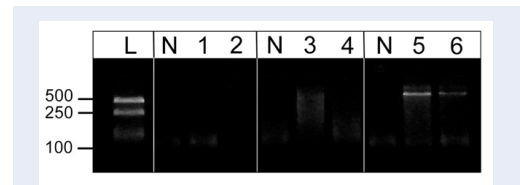
Ảnh hưởng của số chu kỳ nhiệt đến sự khuếch đại của gen mục tiêu

Ảnh hưởng của số chu kỳ nhiệt đến sự khuếch đại DNA cũng đã được khảo sát với nồng độ DNA là 5 ng/ μ L (Hình 5). Ở điều kiện 1 và điều kiện 2, mẫu không xuất hiện vạch, cho thấy PCR không thành công ở mẫu này. Ở điều kiện 3, có một vạch ở vị trí hơn 500bp trong cả hai mẫu phản ứng. Từ kết quả này, chúng tôi đã sử dụng điều kiện 3 (35 chu kỳ nhiệt) để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ DNA đến sự khuếch đại của trình tự rbcL và ITS



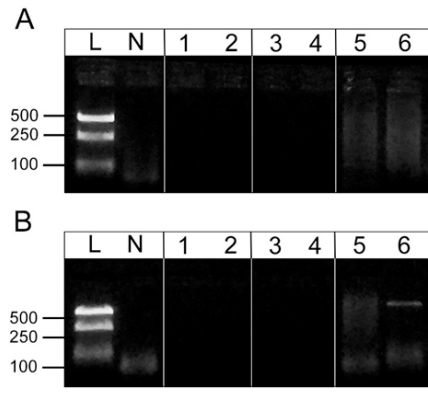
Hình 4: Sản phẩm PCR của DNA từ lá Thần xạ hương. L: thang DNA, N: đối chứng âm, làn 1, 2: Sản phẩm PCR sử dụng mỗi rbcL, làn 3, 4: Sản phẩm PCR sử dụng mỗi ITS. [Nguồn: Nhóm tác giả]



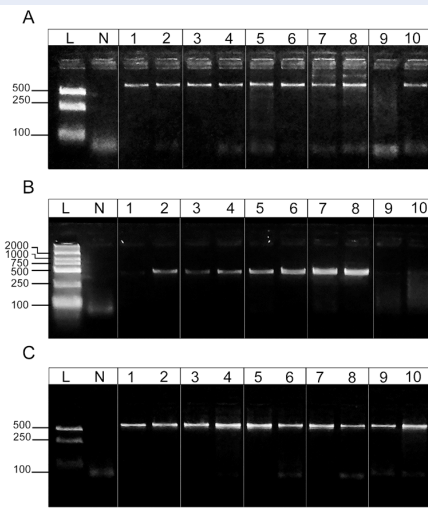
Hình 5: Sản phẩm PCR sử dụng mỗi rbcL để đánh giá điều kiện nhiệt của PCR. L: thang DNA, N: đối chứng âm, nồng độ DNA 5 ng/ μ L, mỗi ITS; làn 1, 2: điều kiện 1; làn 3, 4: điều kiện 2; làn 5, 6: điều kiện 3. [Nguồn: Nhóm tác giả]

Sau khi cố định được số chu kỳ nhiệt phù hợp cho quá trình khuếch đại PCR, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nồng độ DNA phù hợp cho quá trình khuếch đại DNA. Với các đoạn mỗi rbcL và ITS, khi giảm nồng độ DNA xuống lần lượt là 50 ng/ μ L, 10 ng/ μ L và 1 ng/ μ L, một dải mờ xuất hiện ở dải 5 và 6 như thể hiện trong Hình 6, cho thấy DNA được khuếch đại thành công ở nồng độ 1 ng/ μ L. Tuy nhiên, ở nồng độ 1 ng/ μ L, dải mờ cho thấy quá trình khuếch đại DNA vẫn chưa tối ưu, do đó tiếp tục khảo sát ở khoảng nồng độ 1-5 ng/ μ L để tìm nồng độ khuếch đại của trình tự ITS và rbcL thích hợp. Thí nghiệm cũng được thực hiện trên trình tự ITS1, kết quả được thể hiện tại Hình 7.

Chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm nồng độ phù hợp cho quá trình khuếch đại DNA ở 3 đoạn mỗi ITS1, ITS và rbcL ở điều kiện 35 chu kỳ nhiệt, với dãy nồng độ tăng dần từ 1-5 ng/ μ L. Khi tăng dần nồng độ DNA cho quá trình PCR, chúng tôi nhận thấy nồng độ 2-4 ng/ μ L trên cả 3 đoạn mỗi cho thấy vạch kết quả có độ sáng rõ, không kéo vệt và đều có ở vị trí hơn 500bp. Do đó quy trình PCR tối ưu nhằm nâng cao hiệu quả phân tích DNA từ lá Thần xạ hương (*L. scandens* (Roxb.) Wight) là khuếch đại DNA ở 3 đoạn mỗi



Hình 6: Sản phẩm PCR với cặp mồi rbcL, B: Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS. L: thang DNA, N: đối chứng âm, dải 1, 2: Nồng độ DNA 50 ng/μL, dải 3, 4: Nồng độ DNA 10ng/μL, dải 5, 6: Nồng độ DNA 1 ng/μL. [Nguồn: Nhóm tác giả]



Hình 7: Sản phẩm PCR của lá Thần xạ hương sử dụng các đoạn mồi A) ITS1, B) ITS và C) rbcL. L: thang DNA, N: đối chứng âm; dải 1,2: nồng độ DNA 5 ng/μL; dải 3,4: nồng độ DNA 4 ng/μL; dải 5,6: nồng độ DNA 3 ng/μL; dải 7,8: nồng độ DNA 2 ng/μL; dải 9,10: nồng độ DNA 1 ng/μL. [Nguồn: Nhóm tác giả]

ITS1, ITS và rbcL với 35 chu kì nhiệt, nồng độ DNA 2-4 ng/μL, và độ dài đoạn khuếch đại khoảng 500bp.

KẾT LUẬN

Đảm bảo sự tinh sạch, nguyên vẹn và chất lượng cao khi tách chiết DNA là rất quan trọng trong các nghiên cứu phân tử và di truyền. Tuy nhiên, việc phân lập DNA từ thực vật thường bị ảnh hưởng bởi sự nhiễm bẩn quá mức bởi các chất chuyển hóa thứ cấp, làm cản trở quá trình phân lập thành công DNA và gây khó khăn cho các nghiên cứu phân tích trên DNA đã phân lập. Nghiên cứu chúng tôi đã ứng dụng quy trình tách chiết DNA từ lá Thần xạ hương sử dụng phương pháp CTAB và tối ưu điều kiện PCR thực hiện trên 3 trình tự gen ITS, ITS1 và rbcL. Kết quả cho thấy quy trình tách chiết này cho hiệu suất DNA cao, phù hợp cho các ứng dụng phân tử, đồng thời hỗ trợ hiệu quả quá trình định danh và xác định loài với độ chính xác cao dù chỉ sử dụng lượng mẫu tối thiểu. Phương pháp này không chỉ có giá trị trong nghiên cứu hệ thống học và phân loại thực vật mà còn có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong bảo tồn nguồn gen, kiểm nghiệm dược liệu, và truy xuất nguồn gốc sinh học trong lĩnh vực được học và công nghệ sinh học.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

- Bp: Base pairs, số cặp nucleotide
- CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide buffer
- DNA: Acid deoxyribonucleic
- L. scandens*: *Luvunga scandens* (Roxb.) Wight, Thần xạ hương
- MIC: Minimum inhibitory concentration, Nồng độ ức chế tối thiểu
- ITS: Internal transcribed spacer
- OD: optical density, Mật độ quang
- PCR: Polymerase chain reaction, Phản ứng chuỗi polymerase
- P. trimera*: *Paramignya trimera*, Xáo tam phân
- rbcL: Rubisco large subunit
- TE: Tris-EDTA

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết rằng không có xung đột lợi ích khi thực hiện nghiên cứu này.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Tất cả tác giả tham gia viết bản thảo và chỉnh sửa nội dung bản thảo. Tất cả các tác giả đã đọc và duyệt bản thảo cuối cùng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2023-44-01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- PH H. Cây cỏ Việt Nam - Quyển II. Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Trẻ; 1999.
- Truong LH. A survey of medicinal plants of Ta Kou Mountain, Ta Kou Nature Reserve, Vietnam.; 2006. Contract No.: 107.01.05.
- Chi VV. Cây thuốc An Giang. An Giang: Ủy ban Khoa học - Kỹ thuật An Giang; 1991.
- Nguyen TP, Minh NP, Dat TB, Le TD, Nguyen MAT, Pham TN, et al. Limonoid from the rhizomes of *Luvunga scandens* (Roxb.) Buch. Ham. Natural Product Research. 2017;31(19):2281–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1303690>.
- Tran NM, Do TH, Truong LH, Le DT, Phan MN, Pham NK, et al. Acridone alkaloids from the rhizomes of *Luvunga scandens* (Roxb.) Buch. Ham. Natural Product Research. 2019;33(15):2176–81. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1492577>.
- Sirinuta P, Petkongkeaw B, Thongyoo P. Biological activities of stem extracts from *Luvunga scandens*. In: and others, editor. The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Thailand. NATPRO5; 2014.
- Thi DT, Van DL, Van TP, Thi HN, Thi TD, To UNT, et al. Chemical composition, anti-inflammatory and cytotoxic activity of essential oils from two *Luvunga* species (*L. scandens* and *L. hongiaoensis*) from Vietnam. Natural Product Research. 2024;38(11):1834–43. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2225125>.
- Tri LM, Nghia CN, Nhi NT, Ngan HT, Nguyen HM. In vitro cytotoxic activity against human hepatoma HepG2 cells, antioxidant activity, total phenol and flavonoid content of methanol extracts from four plants in Bay Nui, An Giang Province. Journal of Health Sciences. 2020;1(2):86–93. Available from: <https://doi.org/10.32508/stdjhs.v1i2.447>.
- Nguyen HM, Le HN, Nguyen NT, Vo HT, Pham TT, Yen CH. Screening for in vitro inhibiting Nrf2 of some Vietnamese medicinal plants. VNUHCM Journal of Engineering and Technology. 2023;6(3):1975–99. Available from: <https://doi.org/10.32508/stdjet.v6i3.1098>.
- Kumar M, Gupta S, Gao XZ, Singh A. Plant Species Recognition Using Morphological Features and Adaptive Boosting Methodology. IEEE Access : Practical Innovations, Open Solutions. 2019;7:163912–8. Available from: <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2952176>.
- Leaf-Based Plant Identification Through Morphological Characterization in Digital Images. Computer Analysis of Images and Patterns. Cham: Springer International Publishing; 2015.
- Chase MW, Fay MF. Barcoding of plants and fungi. Science. 2009;325(5941):682–3. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1176906>.
- Lahe F, Aremu AO, Van Staden J, Finnie JF. Evaluating the effect of storage on the biological activity and chemical composition of three South African medicinal plants. South African Journal of Botany. 2013;88:414–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.09.003>.
- Sharma MK. Exploring the biochemical profiles of medicinal plants cultivated under stressful environmental conditions. Current Agriculture Research Journal. 2024;12(1):81–103. Available from: <https://doi.org/10.12944/CARJ.12.1.07>.
- Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry: PPB. 2020;148:80–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>.
- Antil S, Abraham JS, Sripoorna S, Maurya S, Dagar J, Makhija S, et al. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. Molecular Biology Reports. 2023;50(1):761–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>.
- Doyle J. DNA Protocols for Plants. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1991. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- Boesenberg-Smith KA, Pessarikli MM, Wolk DM. Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. Clinical Microbiology Newsletter. 2012;34(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>.
- Cheng T, Xu C, Lei L, Li C, Zhang Y, Zhou S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. Molecular Ecology Resources. 2016;16(1):138–49. Available from: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>.
- Group CP, Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, et al. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(31):12794–7. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.
- Hassan R, Husin A, Sulong S, Yusoff S, Johan MF, Yahaya BH, et al. Guidelines for nucleic acid detection and analysis in hematological disorders. The Malaysian Journal of Pathology. 2015;37(2):165–73.
- Nguyen HM, Nguyen NY, Chau NT, Nguyen AB, Tran VK, Hoang V, et al. Bioassay-Guided Discovery of Potential Partial Extracts with Cytotoxic Effects on Liver Cancer Cells from Vietnamese Medicinal Herbs. Processes (Basel, Switzerland). 2021;9(11):1956. Available from: <https://doi.org/10.3390/pr9111956>.
- Salihu AS, Salleh WM, Ghani NA, Althaher AR, Abed SA. Chemical composition, anticholinesterase activity and cytotoxicity of the essential oil of *Luvunga scandens* (Roxb.). Wight from Malaysia; 2025. Available from: <https://doi.org/10.1515/znc-2025-0053>.
- Aboul-Maaty NA, Oraby HA. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Center. 2019;43(1):25. Available from: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>.
- Padmalatha K, Prasad MN. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. African Journal of Biotechnology. 2006;5(3):230–4. Available from: <https://doi.org/10.5897/AJB05.188>.
- Sahu SK, Thangaraj M, Kathiresan K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. ISRN Molecular Biology. 2012;2012. Available from: <https://doi.org/10.5402/2012/205049>.
- Lade BD, Patil AS, Paikrao HM. Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. SpringerPlus. 2014;3(1):457. Available from: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-457>.
- Krishnan S, Sasi S, Kodakkattumannil P, Senaani SA, Lekshmi G, Kottackal M, et al. Cationic and anionic detergent buffers in sequence yield high-quality genomic DNA from diverse plant species. Analytical Biochemistry. 2024;684. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jab.2023.115372>.
- Schenk JJ, Becklund LE, Carey SJ, Fabre PP. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. Applications in Plant Sciences. 2023;11(3). Available from: <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology. 2012;113(5):1014–26. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Kang Y, Deng Z, Zang R, Long W. DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. Scientific Reports. 2017;7(1):12564. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>.
- Álvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003;29(3):417–34. Available from: <https://doi.org/10.1016>

S1055-7903(03)00208-2.

33. Phi TC, Chu HH, Le NT, Nguyen DB. Phylogenetic relationship of *Paramignya trimera* and its relatives: an evi-

dence for the wide sexual compatibility. *Scientific Reports*. 2020;10(1):21662. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78448-2>.

Optimization of PCR conditions to improve efficiency of DNA analysis from *Luvunga scandens* (Roxb.) Wight leaves

Tran Khanh Phuong¹, Nguyen Thi Yen Nhi^{1,2}, Le Nguyen Thien Han^{2,3}, Tran Thi Kha Uyen^{1,2}, Vo Thanh Hoa^{1,2,*}, Ha Dieu Ly^{1,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City.

²Vietnam National University Ho Chi Minh City.

³University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

Correspondence

Vo Thanh Hoa, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City.

Vietnam National University Ho Chi Minh City.

Email: vthoa@uhsvnu.edu.vn

Correspondence

Ha Dieu Ly, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City.

Email: hadieuly@gmail.com

History

- Received: 16-08-2025
- Revised: 19-12-2025
- Accepted: 30-04-2026
- Published Online: 18-06-2026

DOI : 10.32508/vnuhcmj-hs.v7i1.701



Copyright

© VNUHCM Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

ABSTRACT

Luvunga scandens (Roxb.) Wight, commonly known as Thần xạ hương, is a valuable medicinal climbing plant in the Rutaceae family. It has been traditionally used in Vietnamese folk medicine and across Southeast Asia to treat various diseases, particularly liver disorders such as cirrhosis and ascites. Its therapeutic effects are mainly attributed to bioactive compounds like alkaloids and essential oils that possess hepatoprotective, anti-inflammatory, and detoxifying properties. However, *L. scandens* is frequently confused with other morphologically similar medicinal species, leading to misidentification, adulteration, and potential safety issues in herbal products. Conventional identification methods, including organoleptic evaluation and morphological characterization, often prove insufficient, especially with dried or processed materials. Therefore, DNA barcoding has emerged as a fast, accurate, and reliable molecular tool for plant species authentication. In the present study, PCR conditions were preliminarily optimized for three commonly used DNA barcode regions, namely ITS1, ITS, and rbcL, using genomic DNA extracted from the leaves of *L. scandens*. The results demonstrated that suitable PCR conditions for successful amplification of these regions were 35 thermal cycles and a DNA concentration of 2-4 ng/ μ L, which yielded the best PCR products with amplicon sizes of approximately 500 bp. Furthermore, the CTAB-based DNA extraction protocol employed in this study proved highly efficient, yielding high-quality DNA suitable for downstream applications while requiring minimal plant material. These optimized conditions provide a solid, reproducible workflow for molecular identification. The established DNA extraction and PCR protocols will support future research on species authentication, quality control of medicinal products, phylogenetic analysis, and taxonomic studies of this important plant. By enabling precise differentiation from similar species, this work contributes to the standardization and safe use of Thần xạ hương *L. scandens* in traditional medicine.

Key words: *Luvunga scandens* (Roxb.) Wight, Plant identification, DNA extraction, Polymerasechain reaction

Cite this article : Phuong T K, Nhi N T Y, Han L N T, Uyen T T K, Hoa V T, Ly H D. **Optimization of PCR conditions to improve efficiency of DNA analysis from *Luvunga scandens* (Roxb.) Wight leaves.** *VNUHCM J. Health Sci.* 2026; 7(1):955-963.