

## TẠO MÔ SẸO VÀ DỊCH HUYỀN PHÙ TẾ BÀO CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT TAXOL TỪ LÁ VÀ THÂN NON CÂY THÔNG ĐỎ *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC.

Lê Thị Thủy Tiên<sup>1</sup>, Bùi Trang Việt<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Lượng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa, thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Dịch huyền phù tế bào *Taxus wallichiana* được tạo ra từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân non và lá non cây *Taxus wallichiana* Lâm Đồng 2 năm tuổi. Mô sẹo hình thành và tăng trưởng tốt trên môi trường B5 có bổ sung auxin và cytokinin. Môi trường có 2,4-D (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo từ thân non, Mô sẹo từ lá non hình thành và tăng trưởng tốt trên môi trường có bổ sung NAA (3 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l). Sự tăng trưởng mô sẹo thứ cấp nhanh hơn mô sẹo sơ cấp và mô sẹo chuyển từ màu vàng nhạt sang vàng nâu sau lần cấy chuyển đầu tiên. Dịch huyền phù tế bào được tạo ra bằng cách nuôi cấy mô sẹo trong môi trường lỏng có thành phần tương tự như môi trường nuôi cấy mô sẹo. Dịch huyền phù tế bào tăng trưởng chậm, sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào từ thân non nhanh hơn so với dịch huyền phù tế bào từ lá non và có sự hiện diện của nhiều hạt tinh bột trong tế bào của dịch huyền phù. Sự hiện diện của taxol trong mô sẹo và tế bào của dịch huyền phù được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (bản sắc ký silicagel F 254) căn cứ theo R<sub>f</sub> của taxol chuẩn. Không có sự hiện diện của taxol trong môi trường lỏng nuôi cấy.

**Từ khóa:** Dịch huyền phù tế bào, mô sẹo, sắc ký lớp mỏng, taxol, *Taxus wallichiana* Zucc.

### MỞ ĐẦU

Taxol (paclitaxel), một alkaloid diterpenoid được thu nhận từ các bộ phận của cây thuộc nhóm *Taxus*. Taxol được sử dụng để làm thuốc điều trị bệnh ung thư do có đặc tính cố định vi ống làm cho chu trình tế bào bị ngừng lại ở giai đoạn G<sub>2</sub>M (Horowitz *et al.*, 1986). Taxol chính thức được sử dụng làm thuốc chữa bệnh ung thư vú và ung thư buồng trứng vào năm 1992. Ngoài ra, taxol còn có khả năng chữa được một số bệnh ung thư khác như ung thư phổi, dạ dày-ruột, cổ và đầu cũng như các khối u hắc tố ác tính.

Taxol hiện diện trong nhiều bộ phận của cây thuộc giống *Taxus* (Visendek *et al.*, 1990) và có nhiều nhất trong vỏ cây *Taxus brevifolia* (hàm lượng 0,01% trọng lượng khô). Những cây thuộc nhóm *Taxus* tăng trưởng rất chậm, việc thu hoạch vỏ sẽ làm chết cây gây thiệt

hại cho rừng và ảnh hưởng đến môi trường sinh thái (Seiki, Furusaki, 1996).

Nuôi cấy tế bào cây thông đỏ để sản xuất taxol và các hợp chất liên quan là vấn đề đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm và tập trung nghiên cứu. Dịch huyền phù tế bào là hệ thống được sử dụng nhiều nhất do có thể nuôi cấy trong các thiết bị có thể tích tích lớn (Jaziri *et al.*, 1996).

*Taxus wallichiana* Zucc. (thông đỏ) được tìm thấy ở một số vùng thuộc tỉnh Lâm Đồng với số lượng rất ít và đang bị đe dọa bởi nạn chặt phá rừng (Nguyễn Hoàng Nghĩa *et al.*, 1999; Nguyễn Trí Minh *et al.*, 2001). Việc nuôi cấy tế bào *Taxus wallichiana* để thu nhận taxol và các hợp chất liên quan là một việc làm cần thiết nhằm khai thác nguồn dược liệu quý mà không làm ảnh hưởng đến nguồn giống tự nhiên của Việt Nam. Trong bài này, chúng

tôi trình bày các kết quả về sự tạo mô sẹo và dịch huyền phù tế bào có khả năng sản xuất taxol từ lá và thân non cây thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Lá và thân non *Taxus wallichiana* Zucc. (thông đỏ Lâm Đồng) được thu từ những đoạn chồi 3 - 4 tuần tuổi trên cây 2 năm tuổi, được nhân giống bằng phương pháp giâm cành tại Trung tâm Nghiên cứu Lâm sinh Lâm Đồng (Hình 1).



Hình 1. Cây thông đỏ giâm cành 2 năm tuổi.

### Phương pháp

#### Nuôi cấy mô sẹo

Mẫu cấy được khử trùng lần lượt với calcium hypochloride 5% trong 15 phút và  $\text{HgCl}_2$  1% trong 5 phút. Sau đó, mẫu cấy được cắt thành từng đoạn 1 cm và đặt trên các môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) hay B5 (Gamborg *et al.*, 1968) có bổ sung 2,4-D (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) (Cusidó *et al.*, 2002); 2,4-D (5 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) hay NAA (3 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) (Banerjee *et al.*, 1996), sucrose (20 g/l) và được làm rắn bởi agar (6 g/l). Mẫu được nuôi trong tối, ở nhiệt độ  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  và ẩm độ  $70 \pm 2\%$ . Mô sẹo được cấy chuyển sau mỗi 4 tuần.

#### Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào

Dịch huyền phù tế bào được tạo ra bằng

cách đặt mô sẹo ở tuần thứ 4 của lần cấy chuyển thứ 3 vào môi trường lỏng B5 với sucrose (20 g/l), có bổ sung 2,4-D (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) (cho mô sẹo từ thân non) hay NAA (3 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) (cho mô sẹo từ lá non), và được lắc với vận tốc 80 vòng/phút, ở nhiệt độ  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dịch huyền phù tế bào được cấy chuyển sau mỗi 2 tuần. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào được xác định theo thể tích tế bào lắng (SCV, settled cell volume).

### Chứng minh sự hiện diện của taxol

Taxol trong mô sẹo và dịch huyền phù tế bào được chiết tách theo phương pháp của Chattopadhyay và đồng tác giả (2004): Ngâm mẫu trong methanol trong ít nhất 48 giờ, cô đặc dịch methanol để thu cặn. Cặn được hòa tan trong nước cất và lần lượt chiết với n-hexane và chloroform. Sự hiện diện của taxol trong cao chloroform được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng với bản sắc ký silicagel F254 và hệ dung môi di chuyển là methanol: chloroform (1 : 1) (Kim *et al.*, 2003) và hexane: acetone (1 : 1) (Collins-Pavao *et al.*, 1996). Vị trí của taxol trong cao chiết trên bản mỏng sắc ký được xác định so với chất chuẩn taxol tinh khiết (LC Laboratory, USA).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Sự tạo mô sẹo

Mô sẹo từ mẫu cấy lá và thân non cây thông đỏ Lâm Đồng bắt đầu hình thành tại vị trí vết cắt sau 6 tuần nuôi cấy.

Môi trường B5 giúp cho sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo từ lá non tốt hơn so với môi trường MS (Bảng 1). Mô sẹo từ lá và thân non tăng trưởng mạnh nhất trên môi trường B5 + NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) nhưng hình thái mô sẹo khác nhau tùy theo mẫu cấy ban đầu. Mô sẹo ban đầu có màu vàng nhạt, chuyển sang nâu sau những lần cấy chuyển tiếp theo và mô sẹo thứ cấp tăng trưởng nhanh hơn mô sẹo sơ cấp. Hiện tượng này cũng được quan sát bởi Enaksah và đồng tác giả (1996). Mô sẹo có nguồn gốc từ lá non có dạng xốp, màu vàng nâu, mô sẹo

từ thân non có dạng chắc và màu nâu đậm. Mô sẹo từ thân non cũng tăng trưởng mạnh trên môi trường B5 + 2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l), mô sẹo trên môi trường này có dạng xốp, màu vàng chanh đến vàng nâu. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hiền và đồng tác giả (2005) trong các thí nghiệm tạo mô sẹo từ thân non *Taxus wallichiana*. Trên môi

trường MS, mô sẹo từ thân non tăng trưởng mạnh và có dạng chắc. Mô sẹo dạng chắc khó phóng thích tế bào hay cụm tế bào trong môi trường lỏng, do đó môi trường B5 + NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) được chọn để tạo mô sẹo từ lá non và môi trường B5 + 2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l) được chọn để tạo mô sẹo từ thân non làm nguyên liệu tạo dịch huyền phù tế bào.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến khả năng tạo mô sẹo và đường kính mô sẹo của mẫu cấy.

STT	Môi trường khoáng	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/l)	Tỷ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo (%)		Đường kính mô sẹo (mm)	
			Từ thân non	Từ lá non	Từ thân non	Từ lá non
1	MS	2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l)	77,78 ± 38,49 <sup>a</sup>	42,85 ± 3,22 <sup>bc</sup>	3,2 ± 0,26 <sup>c</sup>	2,20 ± 0,17 <sup>c</sup>
2		2,4-D (5,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l)	88,89 ± 19,24 <sup>a</sup>	29,38 ± 10,44 <sup>ab</sup>	1,43 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>a</sup>
3		NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l)	83,33 ± 28,88 <sup>a</sup>	15,74 ± 10,30 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,30 <sup>ab</sup>
4	B5	2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l)	100,00 ± 00 <sup>a</sup>	58,33 ± 14,44 <sup>c</sup>	3,33 ± 0,35 <sup>c</sup>	2,47 ± 0,25 <sup>c</sup>
5		2,4-D (5,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l)	100,00 ± 00 <sup>a</sup>	48,21 ± 3,77 <sup>c</sup>	1,90 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,53 ± 0,15 <sup>b</sup>
6		NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l)	100,00 ± 00 <sup>a</sup>	93,18 ± 9,37 <sup>d</sup>	3,83 ± 0,31 <sup>d</sup>	2,60 ± 0,53 <sup>c</sup>

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Sự tạo dịch huyền phù tế bào



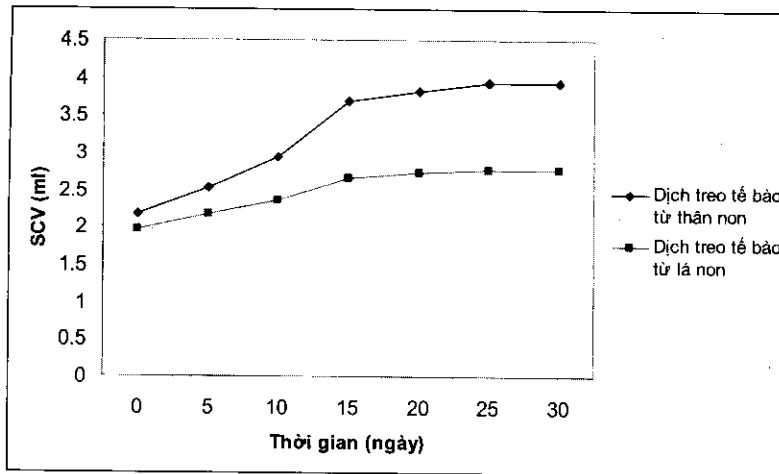
Hình 2. Cụm tế bào trong dịch huyền phù từ thân non trong môi trường có 2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l).

Trong môi trường lỏng B5 + 2,4-D (4,0 mg/l) + kinetin (1,0 mg/l), mô sẹo từ thân non phóng thích các nhóm nhỏ tế bào chứa các tế bào hình tròn, nguyên sinh chất đậm đặc (che khuất nhân) (Hình 2). Trong môi trường lỏng B5 + NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l), mô sẹo từ lá non cũng phóng thích các nhóm tế bào tương tự.

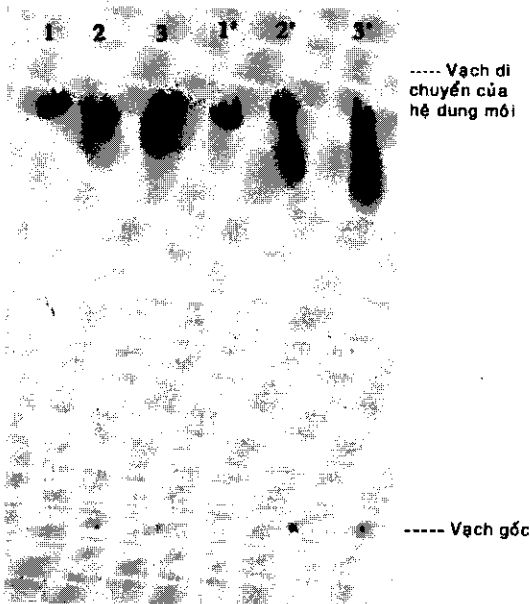
Dịch huyền phù tế bào từ lá non tăng trưởng chậm hơn so với dịch huyền phù tế bào từ thân non (Hình 3). Các cụm tế bào trong dịch huyền phù tế bào từ lá non chuyển từ màu vàng nâu sang màu nâu đen sau 3 lần cấy chuyển đầu tiên, trong khi các cụm tế bào trong dịch huyền phù tế bào từ thân non vẫn duy trì màu sắc giống như ban đầu sau nhiều lần cấy chuyển. Sự tăng trưởng chậm và sự chuyển màu của dịch huyền phù từ lá có lẽ là do môi trường nuôi cấy không phù hợp. Nhìn

chung, sự tăng trưởng chậm của dịch huyền phù tế bào từ lá và thân non có thể do một số yếu tố tác động như: môi trường nuôi cấy

không thích hợp, sự hiện diện của các chất cản trong môi trường nuôi cấy do sự tiết của tế bào nuôi cấy.



Hình 3. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào từ thân non và lá non *Taxus wallichiana*.



Hình 4. Vị trí của taxol trên bản mỏng sắc ký: 1: Chất chuẩn; 2: Mô sẹo từ thân non; 3: Dịch huyền phù tế bào từ thân non; 1': Chất chuẩn; 2': Mô sẹo từ lá non; 3': Dịch huyền phù tế bào từ lá non.

được sử dụng làm nguyên liệu tạo dịch huyền phù tế bào) và dịch huyền phù tế bào trong giai đoạn ổn định (ngày thứ 25 trong đường cong tăng trưởng) được sử dụng để làm nguyên liệu chiết tách taxol. Phương pháp sắc ký lớp mỏng chứng minh sự hiện diện của taxol trong mô sẹo và trong dịch huyền phù tế bào. Với hai hệ dung môi di chuyển khác nhau thì vị trí của taxol trên bản mỏng sắc ký khác nhau. Khi sử dụng hệ dung môi di chuyển là hexane: acetone, nhận thấy sự hiện diện của taxol chuẩn và taxol trong cao chiết ở Rf 0,4 - 0,45. Với hệ dung môi di chuyển là methanol: chloroform thì sự hiện diện của taxol chuẩn và taxol trong cao chiết được ghi nhận ở Rf 0,89 - 0,95 (Hình 4). Không có sự hiện diện của taxol trong môi trường lỏng nuôi cấy (Rf của các chất trong cao chiết từ môi trường lỏng không trùng với Rf của taxol chuẩn). Sự vắng mặt của taxol trong môi trường lỏng có lẽ là do taxol được tế bào sản xuất và giữ lại bên trong tế bào.

## KẾT LUẬN

Môi trường B5 có bổ sung NAA (3,0 mg/l) + kinetin (0,25 mg/l) là môi trường thích hợp cho sự tạo mô sẹo từ lá non và môi trường B5 có bổ sung 2,4-D (4,0 mg/l) và kinetin

## Xác định sự hiện diện của taxol trong các hệ thống tế bào

Mô sẹo qua 3 lần cấy chuyển (tại thời điểm

(1,0 mg/l) là môi trường thích hợp để tạo mô sẹo từ thân non cây thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.). Sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào có nguồn gốc từ lá non chậm hơn dịch huyền phù tế bào có nguồn gốc từ thân non, đồng thời có sự sản xuất taxol từ các hệ thống tế bào nuôi cấy.

Trong tương lai chúng tôi sẽ cải tiến các môi trường nuôi cấy để giúp cho sự tăng trưởng nhanh của các hệ thống tế bào có chứa taxol và các hợp chất liên quan.

**Lời cảm ơn:** Chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu Lâm sinh Lâm Đồng đã hỗ trợ nguyên liệu thực vật để chúng tôi có thể hoàn thành các thí nghiệm này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Banerjee S, Upadhyay N, Kukreja AK, Ahuja PS, Kumar S, Saha G, Sharma RP, Chattopadhyay SK (1996) Taxanes from in vitro cultures of the Himalayan yew *Taxus wallichiana*. *Planta Med* 62(4): 329-331.
- Chattopadhyay SK, Srivastava S, Negi AS, Tirupadipuliur RSK, Garg A, Khanuja SPS (2004) Process for preparing brevifolol. United State patent application 20040127741.
- Collins-Pavao M, Chin CK, Pedersen H (1996) Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*. *J Biotechnol* 49: 95-100.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Orsorio A, Morales C, Fírol MT (2002) Improved taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog* 18: 418-423.
- Enaksha RM, Wickremesinhe ERM, Arteca RN (1996) *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35: 181-193.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Nguyen Thi Thanh Hien, Dinh Van Khiem, Nguyen Hong Vu, Nguyen Trinh Don, Duong Tan Nhut (2005) Primary study on the induction and growth of callus of *Taxus wallichiana* Zucc., a valuable medicinal plant in Lam Dong province. *Proceedings of Vietnam-Korea international symposium 2005 on Biotechnology and Bio-system engineering, Dai hoc Nong lam*:191-197.
- Horowitz SB, Lothsteria L, Manfredi JJ, Mellado W, Parness J, Roy SN, Schiff PB, Sorbara L, Zeheb R (1986) Taxol: Mechanism of action and resistance. *Ann NY Acad Sci* 466: 733-744.
- Jaziri M, Zhiri A, Guo YW, Dupont JP, Shimomura K, Hamada H, Vanhaelen M, Homès J (1996) *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative source for taxoids production: A literature survey. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 46: 59-75.
- Kim JW, Choi YH, Yoo IP, Noh MJ, Han JH (2003) Method and apparatus for preparing taxol using supercritical fluid from source materials. United State patent: 6, 503, 396.
- Nguyễn Trí Minh, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thanh Hằng, Dương Tấn Nhựt (2001) Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng phát triển cây thông đỏ Lâm Đồng ở vùng Lâm Đồng. *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Công nghệ và Môi trường lần thứ 6, khu vực Nam Trung Bộ và Tây Nguyên*: 171-176.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15: 473.
- Nguyễn Hoàng Nghĩa, Trần Văn Tiến (1999) Bảo tồn và phát triển nguồn gen thông đỏ ở Lâm Đồng. *Tạp chí Lâm nghiệp* 7: 27-29.
- Seiki M, Furusaki S (1996) An immobilized cell system for taxol production. *Chemtech* 26(3): 41-45.
- Visendek N, Lim P, Campbell A, Carison C (1990) Taxon content in bark, wood, root, leaf, twig and seedling from several *Taxus* species. *J Nat Prod* 53(6): 1609-1610.