

CHỌN LỌC DÒNG TẾ BÀO MÃN ĐÌNH HỒNG (*ALTHAEA ROSEA*) CÓ KHẢ NĂNG TĂNG SINH NHANH SỬ DỤNG TRONG THU NHẬN RUTIN

QUÁCH NGÔ DIỄM PHƯƠNG*, VŨ THỊ BẠCH PHƯƠNG**, BÙI VĂN LỆ***

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là chọn lọc được dòng Mãn Đình Hồng (*Althaea rosea*) có khả năng tăng sinh nhanh chứa rutin. Mô sẹo xốp Mãn Đình Hồng được tạo trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA và 1 mg/l NAA. Sau 3 tuần, đưa vào môi trường MS lỏng bổ sung 0,5 mg/l BA và 1 mg/l NAA lắc ở 150 vòng/phút tạo dịch huyền phù tế bào. Sau 14 ngày, cấy trái đĩa. Sau 9 tuần, chọn ra dòng tế bào tăng sinh nhanh hơn so với các dòng còn lại, đưa vào nuôi cấy lỏng lắc. Sau 21 ngày xác định hàm lượng rutin tiết ra ở dịch nuôi cấy ngoại bào là 1,07 mg/g trọng lượng tươi.

Từ khóa: rutin, Mãn Đình Hồng (*Althaea rosea*), chọn lọc dòng tế bào.

ABSTRACT

Selecting fast growing Althaea rosea cell lines for producing rutin

The aim of this research is to select *Althaea rosea* fast growing cell lines for producing rutin. Friable callus tissue of *Althaea rosea* was achieved on MS liquid environment supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l NAA. After 3 weeks, friable callus was cultured in MS liquid environment supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l NAA, on rotary shaker at 150 rpm to create cell suspension. After 14 days, the cells were cultured in Petri plate. After 9 weeks, the fast growing cell lines were selected to culture in shaking liquid. After 21 days, the amount of rutin exuded from cultured exospore is 1.07 mg/g.

Keywords: rutin, *Althaea rosea*, cell lines selection.

1. Mở đầu

Rutin hay còn gọi là rutoside, quercetin-3-rutinoside hay sophorin, là một flavonoid glycoside. Rutin giúp tăng cường sức bền cho các mao mạch, nên giúp giảm các bệnh xuất huyết (haemophilia) dùng trong điều trị bệnh tim mạch [3]. Một trong những thuốc được dùng điều trị bệnh tim mạch hiện

nay có nguồn gốc từ chất thứ cấp thực vật đó là rutoside hay còn gọi là rutin. Rutin thuộc nhóm flavonoid, có hoạt tính vitamin P, có tác dụng làm bền và giảm tính thấm của mao mạch, tăng độ bền của hồng cầu, hạ thấp trương lực cơ và chống co thắt (Yang và cộng sự, 2007) [6]. Rutin có ở trong nhiều loài thực vật, Mãn Đình Hồng là một trong những loài chứa rutin.

Các tế bào có tính chất sinh lí không giống nhau. Do đó, việc chọn lọc dòng tế bào là cần thiết để tăng sản lượng hợp chất thứ cấp từ thực vật. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện

* TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

** HVCH, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

*** PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

kỹ thuật chọn lọc dòng tế bào ở cây Mãn Đình Hồng với mục tiêu thu nhận dòng tế bào có khả năng tăng sinh nhanh chứa rutin.

2. Vật liệu và phương pháp tiến hành

2.1. Nguyên liệu

Hạt cây Mãn Đình Hồng được mua từ trại giống cây trồng Quận 12, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

Tạo cây con in vitro

Các hạt Mãn Đình Hồng được rửa sạch bên ngoài bằng xà phòng và rửa lại bằng nước cất. Sau đó được chuyển vào phòng cấy, lắc hạt với cồn 70⁰ trong 1 phút. Tiếp theo lắc và ngâm hạt trong dung dịch Javen 25% trong thời gian 10 phút. Rửa hạt lại cho sạch bằng nước cất vô trùng. Các hạt này được cấy trên môi trường MS bổ sung 7,6 g/l agar.

Tạo mô sẹo và dịch huyền phù tế bào

Cây con sau 1 tuần gieo hạt, rễ và thân sẽ được cắt thành lát mỏng 2-3mm cấy trên môi trường MS rắn bổ sung 0,5mg/l BA và 1mg/l NAA để tạo sẹo xộp [2]. Sau 3 tuần nuôi cấy, chuyển mô sẹo xộp (khoảng 2g) vào chai 250ml chứa 50 ml môi trường lỏng MS bổ sung 0,5mg/l BA và 1 mg/l NAA nuôi trong điều kiện lỏng lắc ở 150 vòng/phút để tạo dịch huyền phù tế bào. Sau 14 ngày nuôi cấy, lấy tế bào ở dịch huyền phù nhuộm 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) rồi quan sát dưới kính hiển vi để xác định khả năng sống/chết của tế bào.

Khảo sát sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào

❖ *Xác định đường cong tăng trưởng của tế bào trong dịch huyền phù:*

Lấy 10ml dịch huyền phù tế bào sau 14 ngày nuôi cấy (chứa 1ml thể tích tế bào lắng ban đầu) cấy vào erlen 100ml chứa 20ml môi trường MS lỏng bổ sung 0,5mg/l BA và 1 mg/l NAA lắc ở 150 vòng/phút. Sau các thời gian 7, 14, 21 và 30 ngày đo thể tích tế bào lắng để xác định chỉ số tăng trưởng của tế bào. Chỉ số tăng trưởng tế bào được tính theo công thức của Chen và cộng sự (2003) [4].

$$\text{Chỉ số tăng trưởng} = \frac{\text{SCV}_{\text{sau}} - \text{SCV}_{\text{trước}}}{\text{SCV}_{\text{trước}}}$$

❖ *Khảo sát ảnh hưởng của thể tích dịch huyền phù tế bào cấy chuyển ban đầu lên sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào:*

Dịch huyền phù tế bào được cấy vào erlen 100 ml chứa 20 ml môi trường MS lỏng bổ sung 0,5mg/l BA và 1mg/l NAA, lắc 150 vòng/phút (cho tất cả các nghiệm thức), theo các thể tích 5; 10; 15; 20; 25ml tương ứng với các thể tích tế bào lắng ban đầu là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ml. Đo thể tích lắng của dịch huyền phù tế bào ở ngày thứ 7 và thứ 14 để xác định chỉ số tăng trưởng của tế bào trong dịch huyền phù.

$$\text{Chỉ số tăng trưởng} = \frac{\text{SCV}_{14 \text{ ngày}} - \text{SCV}_{7 \text{ ngày}}}{\text{SCV}_{7 \text{ ngày}}}$$

Chọn lọc dòng tế bào

Dịch huyền phù tế bào Mãn Đình Hồng được lọc qua màng lọc vô trùng có kích thước 150 μ m. Hút 10ml dịch huyền phù trộn chung với 30ml môi trường MS bổ sung 2,5g/l phytigel, 0,5mg/l BA và 1mg/l NAA đang được làm tan chảy và để nguội khoảng 30-35 $^{\circ}$ C. Tiếp theo, lắc đều hỗn hợp tế bào và môi trường rồi đổ vào các đĩa Petri với bề dày khoảng 1mm (theo kỹ thuật cấy trái đĩa tạo dòng tế bào của Bergmann, 1960). [5]

Sau 5 tuần, chọn những dòng tế bào Mãn Đình Hồng tăng sinh nhanh nhất cấy chuyển sang môi trường mới có cùng thành phần và điều kiện nuôi cấy để chúng tiếp tục tăng sinh.

Sau 9 tuần nuôi cấy, các dòng tế bào đã chọn lọc tạo thành các cụm mô sẹo, có dòng tạo mô sẹo đặc, có dòng tạo mô sẹo xốp. Chọn dòng tế bào tạo mô sẹo xốp tăng trưởng nhanh nhất đưa vào nuôi cấy lỏng lắc 150 vòng/phút trên môi trường MS lỏng bổ sung 0,5mg/l BA và 1mg/l NAA để tạo dịch huyền phù tế bào.

Đo hàm lượng rutin trong dịch huyền phù tế bào từ dòng tế bào đã chọn lọc được.

Dịch huyền phù tế bào Mãn Đình Hồng từ mô sẹo xốp của dòng tế bào đã được chọn lọc đưa vào 20ml môi trường MS lỏng bổ sung 0,5mg/l BA và 1mg/lNAA, lắc ở 150 vòng/phút. Sau 3 tuần nuôi cấy được đem đi định lượng rutin ngoại bào trong dịch môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 500nm [1]. Hàm lượng rutin được xác định theo đường chuẩn.

Điều kiện nuôi cấy

Các mẫu cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 3000lux, nhiệt độ 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, độ ẩm 75 – 80%. Tất cả môi trường đều được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng tại nhiệt độ 121 $^{\circ}$ C, 1 atm, trong 15 phút.

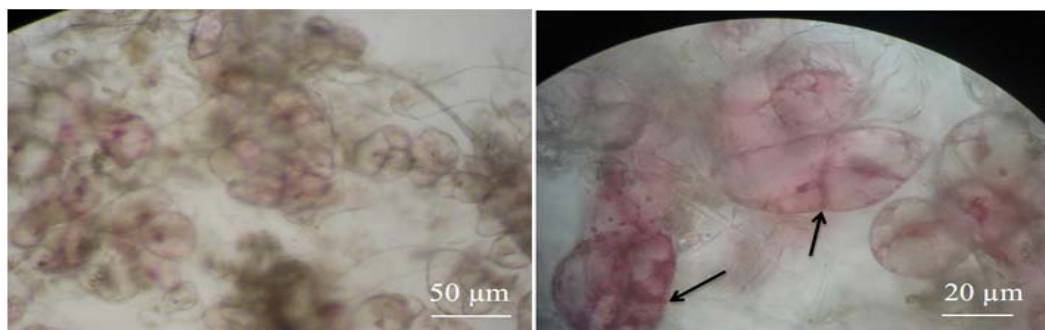
Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS để phân tích và xử lý kết quả thí nghiệm theo thuật toán thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

Tạo mô sẹo và dịch huyền phù tế bào

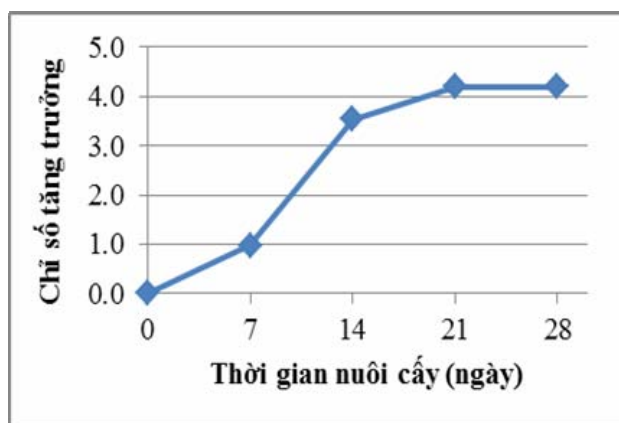
Tế bào trong dịch huyền phù khi được nhuộm TTC có khả năng bắt màu hồng (hình 1). Điều này chứng tỏ đây là những tế bào sống và có khả năng tăng trưởng trong dịch huyền phù.



Hình 1. Tế bào trong dịch huyền phù được nhuộm TTC.
Hình mũi tên chỉ tế bào đang phân chia

Khảo sát sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào

❖ *Xác định đường cong tăng trưởng của tế bào trong dịch huyền phù:* sự tăng trưởng của tế bào dịch huyền phù được trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy chỉ số tăng trưởng đạt cao nhất vào ngày thứ 21. Sau 21 ngày, sinh khối tế bào không tăng thêm, thể hiện tế bào đi vào pha ngừng tăng trưởng tế bào trong dịch huyền phù.



Hình 2. Đường cong tăng trưởng của tế bào trong dịch huyền phù

❖ *Khảo sát ảnh hưởng của thể tích dịch huyền phù tế bào cấy chuyên ban đầu lên sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào*

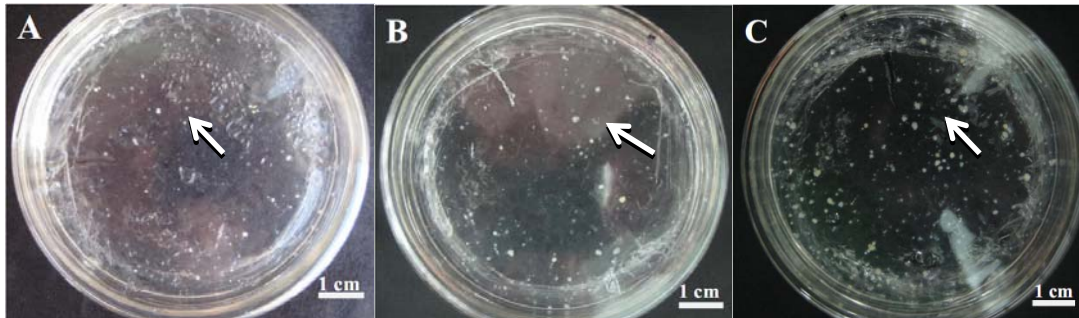
Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích dịch huyền phù tế bào Mãn Đình Hồng cấy chuyên ban đầu lên sự tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào

Nghiệm thức	Thể tích huyền phù tế bào ban đầu (ml/20 ml)	Thể tích tế bào lắng ban đầu (ml)	Thể tích tế bào lắng ngày thứ 7 (ml)	Thể tích tế bào lắng ngày thứ 14 (ml)	Chỉ số tăng trưởng
J1	5	0,5	0,950 ± 0,029	2,083 ± 0,044	1,193 ± 0,048
J2	10	1,0	1,983 ± 0,017	4,540 ± 0,038	1,287 ± 0,030
J3	15	1,5	2,630 ± 0,051	10,573 ± 0,038	2,977 ± 0,045
J4	20	2,0	3,093 ± 0,047	11,033 ± 0,033	2,570 ± 0,053
J5	25	2,5	3,573 ± 0,050	10,060 ± 0,038	1,813 ± 0,047

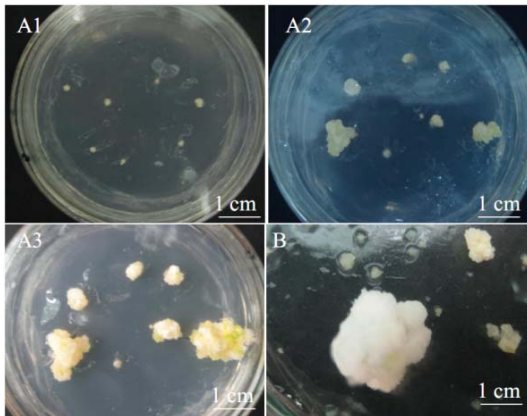
Kết quả từ bảng 1 cho thấy, ở nghiệm thức J3 là môi trường MS lỏng bổ sung 0,5mg/l BA, 1mg/l NAA với thể tích dịch huyền phù tế bào cấy chuyên ban đầu là 15ml (chứa thể tích tế bào lắng là 1,5ml) trong 20ml môi trường cho tốc độ tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào là thích hợp nhất trong loạt nghiệm thức đã tiến hành (chỉ số tăng trưởng là 2,977).

Chọn lọc dòng tế bào

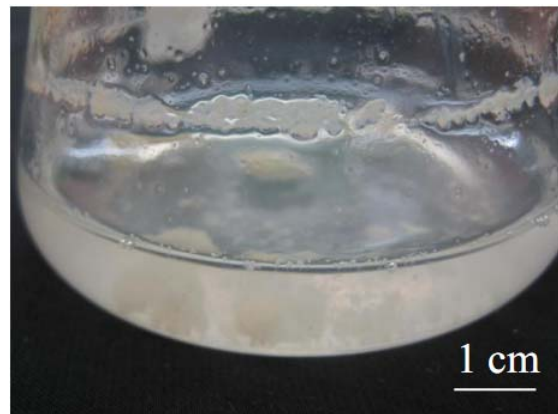
Sau khi thực hiện cấy trải đĩa, kết quả thu được sau các tuần nuôi cấy được trình bày ở hình 3, 4, 5.



Hình 3. Các dòng tế bào Mãn Đình Hồng phát triển sau khi đổ đĩa. A: 3 tuần; B: 4 tuần; C: 5 tuần. Hình mũi tên chỉ vị trí các dòng tế bào tăng trưởng nhanh

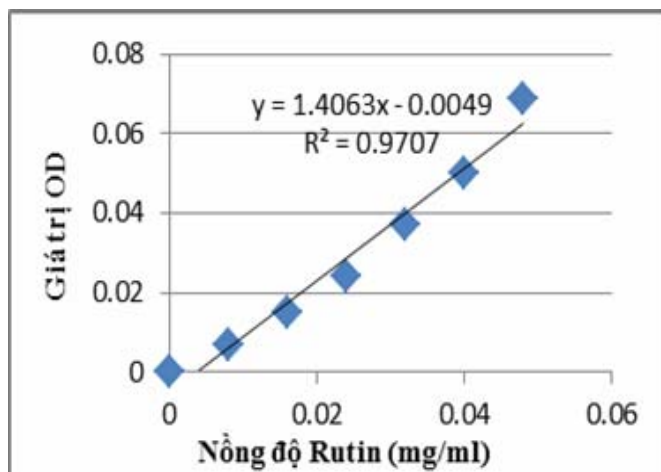


Hình 4. Các dòng tế bào Mãn Đình Hồng tăng sinh nhanh được cấy chuyển sang môi trường mới để tiếp tục tăng sinh. A1, A2, A3: các dòng tế bào 5, 9, 12 tuần tuổi. B: dòng tế bào tạo mô sẹo xốp 9 tuần tuổi



Hình 5. Dịch huyền phù tế bào Mãn Đình Hồng từ mô sẹo xốp của dòng tế bào được chọn lọc sau 7 ngày nuôi cấy

Đo hàm lượng rutin trong dịch huyền phù tế bào từ dòng tế bào đã chọn lọc được. Kết quả dựng đường chuẩn rutin được trình bày trong hình 6.



Hình 6. Đường chuẩn của rutin

Đường chuẩn được xây dựng có hệ số tương quan giữa nồng độ rutin và giá trị mật độ quang (OD = 500nm) là $R^2 \approx 1$, một giá trị đáng tin cậy để thấy rằng: nồng độ rutin trong một dung dịch có mối quan hệ tuyến tính với giá trị mật độ quang (OD = 500nm). Mối quan hệ đó được thể hiện bằng phương trình: $y = 1,4063x - 0,0049$. Kết quả đo hàm lượng rutin được trình bày bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đo hàm lượng rutin trong dịch ngoại bào Mãn Đình Hồng ở độ hấp thụ có bước sóng 500 nm

Giá trị OD dung dịch đem đo (chứa 6ml dịch nuôi cấy)	Hàm lượng rutin của 25ml dịch đem đo (chứa 6ml dịch nuôi cấy)(mg)	Hàm lượng rutin trong 20ml dịch nuôi cấy (tương ứng 2,5g sinh khối tươi)	Hàm lượng rutin trong 1g sinh khối tươi (mg/g)
0,04	$0,032 \cdot 25 = 0,80$	2,67	1,07

Từ bảng kết quả trên cho thấy, dòng tế bào Mãn Đình Hồng chọn lọc được có chứa rutin với hàm lượng là 1,07mg/g sinh khối tươi.

4. Kết luận

Đã chọn được dòng tế bào Mãn Đình Hồng có khả năng tăng trưởng nhanh và chứa rutin. Hàm lượng rutin tiết ra trong dịch nuôi cấy ngoại bào là 1,07mg/g sinh khối tươi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2002), *Dược điển Việt Nam III*, Nxb Y học.
2. Nguyễn Thành Hải, Trần Chấn Đại, Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lê (2008), “Nuôi cấy mô sẹo và dịch huyền phù cây Mãn Đình Hồng (*Althaea rosea*) cho mục tiêu thu nhận Rutin”, *Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV – Hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm*, tr. 801 – 804.
3. Abeywardena M.Y. And Head R.J. (2001), “Dietary polyunsaturated fatty acid and antioxidant modulation of vascular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat”, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acid*, 65: 91- 97.
4. Chen Y.Q., YiF., Cai M., and Luo J-X. (2003), “Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*”, *Plant Growth Regulation*, 41: 265 – 268.
5. Razdan M.K. (2003), *Introduction to Plant Tissue Culture*, Enfield: Science Publishers Inc., ISBN. 1-57808-237-4, 375p.
6. Yang J., Guo J, Yuan J. (2008), *In vitro* antioxidant properties of rutin, *LWT – Food Science and Technology*, 41: 1060 – 1066.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 21-5-2012; ngày phân biện đánh giá: 21-6-2012;
ngày chấp nhận đăng: 23-10-2012)