



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003401

(51) **C12N 1/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00394

(22) 28/09/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/11/2021 404

(73) Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18, Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành Phố Hà
Nội

(72) Nguyễn Thị Hồng Hà (VN); Trần Thị Hoa (VN); Trần Thị Huyền (VN); Đỗ Tiên
Phát (VN); Chu Hoàng Hà (VN); Phạm Bích Ngọc (VN).

(54) CHŨNG VI NẤM *FUSARIUM PROLIFERATUM* H11 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH
HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT *PODOPHYLLOTOXIN*

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Fusarium proliferatum* H11 phân lập từ cây
được liệu Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) phân bố tại huyện Lâm Bình,
Tuyên Quang, Việt Nam, mang trình tự ADN vùng ITS1-18S-ITS2 có kích thước là 537bp
được nêu trong SEQ ID NO: 1, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất podophyllotoxin và có
khả năng ức chế tế bào ung thư gan ở người. Các hợp chất này được sử dụng làm tiền chất
để tổng hợp sản phẩm tự nhiên chống ung thư etoposid và teniposid.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học liên quan đến các chủng vi nấm sống nội sinh trong cây được liệu có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin (PDT). Cụ thể, chủng vi nấm nội sinh *Fusarium proliferatum* H11 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ cây Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) phân bố tại huyện Lâm Bình, Tuyên Quang, Việt Nam. Chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất podophyllotoxin được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp thuốc chống ung thư etoposid và teniposit (Canel C et al., 2001; Stahelin et al., 1991) cung cấp nguồn nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong những năm gần đây việc tìm kiếm các loại thuốc mới có độc tính trên nhiều dòng ung thư khác nhau, ít tác dụng phụ đang là ưu tiên hàng đầu. Hiện nay, các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam đặt nhiều quan tâm vào các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính chống ung thư. Từ các bài thuốc dân gian đến việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học, đến nay chúng ta đã có nhiều loại thuốc ung thư được thương mại hoá có nguồn gốc thiên nhiên.

Podophyllotoxin là một chất hoá học nổi tiếng trong số hàng trăm chất từ thực vật, được phân lập chủ yếu từ rễ và thân của một số loài thuộc chi *Podophyllum* (Dysosma). Podophyllotoxin được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp sản phẩm tự nhiên chống ung thư etoposid và teniposit (Canel C et al., 2001; Stahelin et al., 1991).

Theo (Xiang et al., 2017) podophyllotoxin hiện được thu nhận chủ yếu từ một số cây thuộc chi *Podophyllum* (*Podophyllum hexandrum*), cây Táo ma (*Podophyllum peltatum*) thành phần chính của cây là podophylloxin hay một số cây thuộc chi *Juniperus* như *Juniperus sabina*, *Juniperus thurifera*, *Juniperus chinensis*...), và một số loài thuộc chi *Linum*.

Về hoạt tính sinh học, podophyllotoxin có khả năng gây độc tế bào và hoạt động như một chất ức chế lắp ráp các vi ống. Chất này được chứng minh sử dụng hiệu quả cho ung thư phổi, u tinh hoàn, u nguyên bào thần kinh, u gan và các khối u khác (Cannel C et al., 2000 và Liu et al., 2015). Ngoài ra, từ chất podophyllotoxin, các nhà khoa học đã cải tiến cấu trúc, tạo ra một loạt các chất có hoạt tính tốt trên lâm sàng như etoposid, teniposit. Etoposid là một chất chống ung thư hiệu quả và được sử dụng trong lâm sàng để điều trị ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tinh hoàn và ung thư biểu mô lymphô, thường sử dụng trong các liệu pháp kết hợp với các thuốc chống ung thư khác. Bên cạnh đó, podophyllotoxin cũng cho thấy các hoạt động chống virus bằng cách can thiệp vào một số quá trình nhân bản virus quan trọng. Bedows và Hatfield đã chỉ Teniposit có đặc tính chống ung thư tương tự etoposid, có vai trò quan trọng trong điều trị bệnh thần kinh ở trẻ em (Paul, 2002). Ngoài ra, một số dẫn chất podophyllotoxin từ dịch chiết của một số loài *Diosma* cho thấy ức chế sự sao chép của HIV do ức chế virus sao chép ngược (Botta et al., 2001). Thuốc podophyllotoxin hay còn được gọi là podofilox, là một loại kem y tế được sử dụng để điều trị mụn cóc sinh dục. Podophyllotoxin và rutin khi thử nghiệm trên đại thực bào M1 làm giảm thiểu iNOS⁺ và bức xạ gây chết người (LR) gây ra phản ứng viêm trong chuột (Vinod et al., 2019).

Podophyllotoxin là một trong 7 hợp chất đã được phân lập từ phần dưới mặt đất (rễ và thân rễ) của cây Bát Giác Liên thu tại Sa Pa (Lào Cai) và được xác định là quercetin (1), rutin (2), kaempferol (3), nicotiflorin (4), α -peltatin (5), deoxypodophyllotoxin (6), và podophyllotoxin (7) (Nguyễn Thị Dung và cs, 2018).

Bát Giác liên là một loài dược liệu quý hiếm ở Việt Nam trong “sách đỏ”, đang cần được bảo tồn cũng như khai thác và phát triển nhằm thu nhận được hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất. Cây đặc biệt ưa ẩm, ưa bóng, thường mọc trên đất nhiều mùn, gần khe suối, dưới tán rừng kín thường xanh ẩm, đặc biệt là ở rừng núi đá vôi, ở độ cao từ 800-1200m. *Podophyllum tonkinense* Gagnep - Bát Giác liên có đặc điểm nhận dạng là cây thân thảo sống nhiều năm, cao 30-50cm. Thân rễ thô, gồm nhiều cục tạo thành chuỗi, mọc ngang (Sách đỏ Việt Nam, 2007).

Bát Giác liên phân bố chủ yếu ở các tỉnh phía Bắc như Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Lạng Sơn và được sử dụng trong y học cổ truyền với các công dụng chữa rắn cắn, sưng tấy, áp xe vú, nhọt độc, đờm ho, ung thư vú. Theo Võ Văn Chi, 2012, Từ điển cây thuốc Việt Nam, Quyển I, trang 132, “rễ và thân rễ chữa Berberin, thường dùng trị mụn nhọt, lở ngứa, tràng nhạc, sưng yết hầu, đòn ngã, dao chém và rắn độc cắn”. Theo Sách đỏ Việt Nam, 2007, Phần II -Thực Vật, trang 134, “Nguồn gen hiếm (hoa mọc dưới lá) ở Việt Nam. Thân rễ, lá hoặc cả cây đều được dùng làm thuốc chữa rắn cắn, ung nhọt, giải độc, tiêu phù, sát trùng, v.v.. Rễ và thân rễ cũng có berberin.”

Việc tổng hợp podophyllotoxin từ thực vật thông qua con đường tổng hợp hoá học được coi là rất phức tạp và không hiệu quả bởi vì sự có mặt của 4 trung tâm bất đối xứng với một C lacton và mức độ oxy hóa cao. Thêm vào đó, việc sử dụng công nghệ nuôi cấy sinh khối tế bào thực vật, nuôi cấy cơ quan thực vật ở các loài có khả năng sản sinh podophyllotoxin khó khả thi do hàm lượng podophyllotoxin thu hồi ít (Yang et al., 2003; Li et al., 2007; Kour et al., 2008).

Gần đây, nấm nội sinh được phân lập từ các loại cây trồng đã được chấp nhận như là một nguồn nguyên liệu quan trọng của ngành công nghiệp dược. Một lượng lớn các hợp chất có cấu trúc mới và hoạt tính sinh học khác nhau đã được chiết xuất từ các nấm nội sinh này. Chúng tồn tại rộng rãi bên trong các mô khỏe mạnh của thực vật sống và là thành phần quan trọng của hệ sinh thái vi sinh thực vật. Trong suốt thời gian dài tiến hóa, một số nấm nội sinh cùng tồn tại và các cây chủ của chúng đã thiết lập một mối quan hệ đặc biệt với nhau và có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành các sản phẩm trao đổi chất trong thực vật. Việc sản xuất podophyllotoxin của các chủng nấm nội sinh hỗ trợ cho lý thuyết rằng trong quá trình kết hợp lâu dài của endophytes và thực vật chủ, endophytes thích nghi với môi trường bên trong các mô thực vật bằng cách biến đổi gen, bao gồm cả sự thu nhận ADN của thực vật vào bộ gen của chúng (Germaine et al. 2004). Điều này có thể đã dẫn đến khả năng của một số nấm nội sinh (endophytic) nhất định để sinh tổng hợp một số chất ban đầu liên quan đến vật chủ thực vật (Stierle et al. 1993). Có thể phân lập hàng trăm loài endophytic từ một cây duy nhất, và trong số đó, ít nhất một loài thường cho thấy tính đặc

hiệu của vật chủ (Tan và Zou, 2001). Do vậy, việc phân lập các chủng nấm nội sinh trong thực vật có khả năng sản sinh hoạt chất Podophyllotoxin có cơ sở khoa học và hiện được các nhà khoa học ngày càng quan tâm nhằm tạo nguồn sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược.

Nấm nội sinh được phân lập từ các loại cây trồng thuộc chi *Podophyllum* (*Dysosma*) hay *Juniperus* đã được chứng minh có khả năng tạo ra podophyllotoxin. Việc nghiên cứu phân lập thành công các chủng nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* từ *Juniperus recurve*; *Penicillium* sp., *Phialocephala fortinii*, *Trametes hirsuta*, *Alternaria neesex* từ *Podophyllum hexandrum*; *Monilia* sp., *Penicillium implication* từ *Dysosma veitchii* có khả năng tạo ra podophyllotoxin cho thấy cơ sở khoa học và khả năng thay thế nguồn nguyên liệu đang dần cạn kiệt hiện nay (Yang et al., 2003; Li et al., 2007; Kour et al., 2008). Nhóm tác giả Amardeep Kour và cộng sự (2008) đã phân lập được 7 chủng nấm nội sinh từ cây thuộc *Juniperus recva* và có 01 chủng thuộc loài *Fusarium oxysporum* sản sinh podophyllotoxin, việc định lượng podophyllotoxin được thực hiện bởi HPLC, LC-MS và LC-MS/MS cho thấy hoạt chất này đo được cao nhất sau 4 ngày đạt 28µg/g trọng lượng khô tế bào. Yang Xianzhi và cộng sự (2003) đã lên men 92 chủng nấm nội sinh được phân lập từ *Sinopodophyllum hexandrum*, *Diphylleia sinensis* và *Dysosma veitchii*, phân tích bằng TLC, HPLC và kết quả cho thấy 6 chủng nấm nội sinh có thể tạo ra podophyllotoxin chiếm khoảng 6,5% tổng số chủng đã được phân lập. Trong đó 7% nấm nội sinh được phân lập từ *S. hexandrum*, 3% từ *D. sinensis* và 10% từ *D. veitchii*. Eyberger và cộng sự, thu được thành công hai chủng *Phialocephala fortinii* nội sinh là PPE5 và PPE7 từ thân rễ của *Sinopodophyllum peltatum* mà có thể tạo ra PDT với năng suất 0,5-189µg/L trong nuôi cấy lên men sau 4 tuần.

Như vậy cây Bát Giác liên là một loài dược liệu quý hiếm ở Việt Nam trong “sách đỏ”, đang cần được bảo tồn cũng như khai thác và phát triển nhằm thu nhận được hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất. Cho đến nay các nghiên cứu ở Việt Nam về cây Bát Giác Liên mới chỉ dừng lại ở nghiên cứu đặc điểm sinh học hay nghiên cứu thành phần hoá học, các nghiên cứu về nấm nội sinh ở cây Bát Giác Liên đến nay chưa có công bố nào. Do

vậy, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh từ cây Bát Giác Liên có khả năng sản sinh hoạt chất Podophyllotoxin và các dẫn xuất của nó là rất quan trọng cần được quan tâm và là hướng đi mới nhằm hướng tới một nguồn nguyên liệu lớn có hiệu quả kinh tế cao cho ngành công nghiệp dược.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng nấm nội sinh *Fusarium proliferatum* H11 được phân lập từ bên trong các mô lá, thân, rễ, củ của cây dược liệu Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) phân bố tại huyện Lâm Bình, Tuyên Quang, Việt Nam. Chủng này có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin nhằm tạo nguồn sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược. Các chất này được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp sản phẩm tự nhiên chống ung thư etoposid và teniposit.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất podophyllotoxin và có khả năng ức chế tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 0,041–20,79 μ g/mL, trong đó chủng này mang trình tự ADN vùng ITS1-18S-ITS2 có kích thước là 537bp được nêu trong SEQ ID NO:1.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Fusarium proliferatum* H11 trên môi trường PDA (Potato Glucose Agar) sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc trắng tinh, mọc cân đối, lông dài lớp lớp toả đều sát mặt thạch.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty cấu trúc cành phân nhánh của chủng *Fusarium proliferatum* H11 chụp trên kính hiển vi quang học ở vật kính 40x.

Hình 3 là hình ảnh sợi nấm chủng *Fusarium proliferatum* H11 bắt đầu phình to ở đoạn đầu, tạo chuỗi và nhìn rõ vách ngăn sau hơn 10 ngày.

Hình 4 là hình ảnh thể hiện kết quả định danh chủng H11 dựa vào vùng gene ITS.

Hình 5 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng - TLC của cặn chiết sinh khối H11 lên men (1), cao chiết dịch H11 lên men (2) cao chiết rễ cây Bát Giác liên (3) và chất chỉ thị podophyllotoxin.

(HPLC) đã định lượng được trong mẫu cặn chiết sinh khối nấm lên men (Hình 6), cao chiết dịch lên men (Hình 7) và cao chiết rễ cây Bát Giác liên (Hình 8)

Hình 6 là đồ thị thể hiện kết quả sắc kí đồ HPLC (UV 210 nm), phổ UV, phổ LC-MSD của cặn chiết sinh khối *Fusarium proliferatum* H11 lên men trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Hình 7 là đồ thị thể hiện kết quả sắc kí đồ HPLC (UV 210 nm), phổ UV, phổ LC-MSD của cao chiết dịch lên men *Fusarium proliferatum* H11 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Hình 8 là đồ thị thể hiện kết quả sắc kí đồ HPLC (UV 210 nm), phổ UV, phổ LC-MSD của cao chiết rễ cây Bát Giác liên trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Hình 9 là đồ thị thể hiện kết quả sắc kí đồ HPLC (bước sóng 210nm) của chất chuẩn podophyllotoxin.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp đề cập tới chủng nấm *Fusarium proliferatum* H11 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ bên trong các mô lá, thân, rễ, củ của cây được liệu Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) của Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin.

Chủng nấm trên được phân lập theo phương pháp của Arnold và cộng sự (2000) có cải tiến. Các bước tiến hành như mô tả sau đây:

- Xử lý mẫu trước khi phân lập: Mẫu cây được rửa sạch bằng nước cất, khử trùng bằng etanol 70% trong 1-2 phút, tiếp theo rửa bằng NaOCl 5% trong 5 phút. Sau cùng mẫu được rửa trong nước khử khoáng vô trùng.
- Mẫu sau khi xử lý, cắt mẫu thành từng phần nhỏ (0,2-1cm) ở các bộ phận khác nhau từ rễ, củ, thân, lá và được đặt lên đĩa petri chứa môi trường thạch nước (water agar 1,5%) có bổ sung kháng sinh Cefotaxim 200mg/ml. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ cho đến khi bắt đầu phát triển khuẩn ty nấm. Cây chuyển các hệ sợi nấm sang môi trường thạch

khoai tây (PDA) ở cùng nhiệt độ, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần, giữ ở 4-10°C để lưu giữ và bảo quản chủng giống.

Các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại bằng phương pháp truyền thống như nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới, giọt tiết, sắc tố khuếch tán ra môi trường, vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử, v.v., theo các khóa phân loại Nguyễn Lâm Dũng (1982), Maren A Klich (2002) để sơ bộ nhận dạng, phân loại các chủng nấm đến chi. Sau đó, tách chiết hệ gen của các chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN genom G-spin™ Total ADN Extraction kit (INtRON, Korea) theo phương pháp sinh học phân tử theo Chomczynski & Sacchi (1987) và khuếch đại đoạn gen ITS1-18S-ITS2 bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Tiếp theo, đoạn gen ITS1-18S-ITS2 thu được được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự AEI PRISM @ 3700 Genetic Analyzer. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PCGENE và trình tự vùng được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng gen (Genebank-NCBI) bằng công cụ BLAST SEARCH.

Các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được lên men và xác định khả năng sinh tổng hợp hoạt chất PDT. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDA (Potato Glucose Agar): 2% D-glucosa (Đức); 1,8%(w/v) agar (Việt Nam); 20% (w/v) khoai tây; độ pH 7 ở nhiệt độ 25°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 5 ngày, tiến hành lọc thu sinh khối nấm tươi và dịch lên men. Sinh khối được tách chiết bằng dung môi hữu cơ metanol, thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết alkaloid toàn phần, dịch đem cô quay thu cặn chiết. Dịch lên men cô quay thu cao chiết. Cặn chiết nấm và cao chiết dịch lên men được đưa đi xác định khả năng sinh tổng hợp PDT bằng phương pháp sắc ký lỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống Sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Bên cạnh đó, bằng phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Sử dụng các dòng tế bào ung thư ở người, ở chuột và tế bào lành do GS. TS. J. M. Pezzuto,

Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp. Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5 \mu\text{M}$ [Hughes JP, (2011)].

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển nêu trên, giải pháp hữu ích đã thu được chủng thuộc chi *Fusarium* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng này có trình tự đoạn gen ITS1-18S-ITS2 có kích thước 537bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và có độ tương đồng 99,44% so với trình tự đoạn tương ứng của gen chủng *Fusarium proliferatum* isolate GA8 có mã số MF687301.1 trên ngân hàng gen và được định danh là chủng *Fusarium proliferatum* H11.

Chủng *Fusarium proliferatum* H11 hiện được lưu giữ trong bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và xác định hoạt tính của chủng *Fusarium proliferatum* H11

Chủng H11 phân lập được có thời gian sinh trưởng từ 3-5 ngày nuôi cấy ở 25°C. Nuôi cấy chủng thuần khiết trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch (5 ngày), sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở 4-10°C để lưu giữ và bảo quản chủng giống. Bào tử của chủng được giữ trong cát vô trùng.

Sử dụng phương pháp phân loại truyền thống vi nấm dựa trên đặc điểm hình thái của chủng như hệ sợi, vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử theo các khóa phân loại của Nguyễn Lâm Dũng (1982), Maren A Klich (2002) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng H11 đến chi. Chủng H11 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA ở 25°C trong 5 ngày, quan sát đặc điểm hình thái cho thấy khuẩn lạc trắng tinh, mọc cân đối, lông dài lớp lớp toả đều sát mặt thạch (Hình 1). Chuẩn bị lam kính, lamén và các đĩa peptri đã được khử trùng. Dùng que cấy lấy một miếng thạch có sợi nấm phát triển kích thước khoảng 0,5 x 0,5 cm đặt lên lam kính rồi lấy lamén đẩy lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa peptri ở 25°C trong khoảng thời gian 3-5 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamén. Đặt

lam kính và lamên lên soi dưới kính hiển vi quang học, vật kính 40x quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty của chủng H11 mọc lớp lớp dày đặc, cấu trúc cành phân nhánh (Hình 2), sự hình thành bào tử tương đối hiếm gặp. Sau hơn 10 ngày, sợi nấm bắt đầu phình to ở đoạn đầu, tạo chuỗi và nhìn rõ vách ngăn (Hình 3). Nhận dạng sơ bộ chủng vi nấm qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại. Kết quả nhận dạng được chủng H11 thuộc chi nấm *Fusarium*.

ADN của chủng H11 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal ADN Extraction Kit). Vùng gen ITS1-18S-ITS2 của chủng H11 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'- CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'- CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-18S-ITS2 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết 500 - 600bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50 μ l) bao gồm 300 ng ADN hệ gen, 25 μ l hỗn hợp chuẩn, 1,5 μ mol/l mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong 1 phút; tiếp theo là 36 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 30 giây, 53°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây; kéo dài ở 72°C trong 5 phút; giữ ở 15°C cho đến khi lấy mẫu. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Tinh sạch đoạn gen này bằng kit tinh sạch ADN (GeneJET PCR Purification Kit #K0701, Thermo Scientific).

Trình tự đoạn gen ITS1-18S-ITS2 của chủng H11 được xác định trên máy giải trình tự tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên ngân hàng gen NCBI (Hình 4). Trình tự đoạn gen ITS1-18S-ITS2 của chủng H11 được thể hiện ở MZ947759.

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-18S-ITS2 tách từ chủng H11 có kích thước 537bp. Chủng H11 có độ tương đồng 99,44% so với trình tự đoạn tương ứng của gen chủng *Fusarium proliferatum* isolate GA8 có mã số MF687301.1 trên ngân hàng gen và được định danh là chủng *Fusarium proliferatum* H11.

Chủng *Fusarium proliferatum* H11 được nuôi lắc trong 1 lít môi trường PDA ở 150 vòng/phút, 25°C trong 5 ngày. Thu sinh khối nấm tươi và dịch lên men bằng cách lọc. Sinh khối nấm tươi được sấy khô ở nhiệt độ 45-60°C, ngâm sinh khối khô trong dung môi hữu cơ metanol 100ml trong 24 giờ, siêu âm 1 giờ và lặp lại 3 lần, chiết thu được dịch chiết sinh khối nấm, dịch đem cô quay thu cặn chiết. Dịch lên men sau lọc cô quay thu cao chiết. Cặn chiết từ sinh khối nấm lên men và cao chiết từ dịch lên men được đem đi xác định hoạt chất podophyllotoxin bằng phương pháp sắc ký lỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống Sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Kết quả cho thấy bằng phương pháp sắc ký lỏng (TLC) trong mẫu cặn chiết sinh khối nấm (1), cao chiết dịch lên men (2) và cao chiết rễ cây Bát Giác liên (3) đều phát hiện có mặt hợp chất podophyllotoxin (Hình 5).

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã xác định được pic podophyllotoxin trong mẫu cặn chiết sinh khối nấm (Hình 6), cao chiết dịch lên men (Hình 7) và cao chiết rễ cây Bát Giác liên (Hình 8).

Bằng phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Kết quả phân tích cho thấy các mẫu đều thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 0,041–20,79 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 1).

Bảng 1. Phần trăm ức chế tế bào ung thư gan ở người HepG2 và tế bào ung thư gan ở người LU-1 của cao chiết rễ cây Bát Giác liên, cao chiết sinh khối lên men H11, cao chiết dịch lên men H11.

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	% ức chế					
	Cao chiết rễ cây Bát Giác liên		Cao chiết sinh khối lên men H11		Cao chiết dịch lên men H11	
	LU-1	HepG2	LU-1	HepG2	LU-1	HepG2
100	55,48	62,03	62,42	62,23	64,23	60,34

20	52,81	57,80	61,01	57,42	64,37	58,30
4	51,65	56,78	60,64	55,98	61,23	55,38
0,8	48,72	51,11	59,17	52,89	60,04	54,75
0,16	32,08	40,68	57,95	50,82	56,69	52,71
0,032	13,03	16,39	31,45	29,34	48,68	44,19
IC50	1.46±0.22	0.70±0.09	0.11±0.02	0.20±0.03	0.041±0.006	0.071±0.011

Bảng 2. Phần trăm ức chế tế bào ung thư gan ở người HepG2 và tế bào ung thư gan ở người LU-1 của chất đối chứng dương Ellipticin.

Nồng độ (µg/mL)	Ellipticin	
	LU-1	HepG2
10	93,26	93,27
2	82,26	87,16
0,4	52,41	50,75
0,08	26,32	23,31
IC50	0,35±0,03	0,37±0,04

Giải pháp được đưa ra dựa trên kết quả phân lập, đặc điểm sinh học đã xác định được chủng vi nấm nội sinh H11 thuần khiết về mặt sinh học. Đây là chủng tự nhiên được phân lập từ cây dược liệu Bát Giác liên phân bố tại Việt Nam, có khả năng tổng hợp hoạt chất podophyllotoxin nhằm tạo nguồn sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược sử dụng làm tiền chất để tổng hợp sản phẩm tự nhiên chống ung thư etoposid và teniposit. Giải pháp đưa ra cũng là một trong các nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam và là chủng thuộc loài mới chưa công bố trên thế giới.

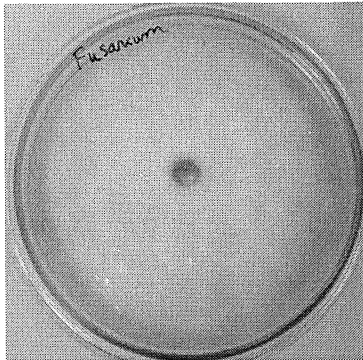
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm *Fusarium proliferatum* H11 được phân lập từ cây dược liệu Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) phân bố tại huyện Lâm Bình Tuyên Quang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin nhằm tạo nguồn sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược ở quy mô lớn, góp phần giảm giá thành sản phẩm và bảo tồn nguồn nguyên liệu tự nhiên quý hiếm đang dần cạn kiệt. Các chất này được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp sản phẩm tự nhiên chống ung thư etoposid và teniposit.

Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh cây Bát Giác liên ở Việt Nam. Giải pháp hữu ích đưa ra là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập từ bên trong các mô lá, thân, rễ, củ cây Bát Giác liên phân bố tại huyện Lâm Bình, Tuyên Quang, Việt Nam và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất podophyllotoxin. Chủng này thuộc loài mới chưa được công bố trên thế giới.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi nấm *Fusarium proliferatum* H11 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ cây dược liệu Bát Giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep) phân bố tại huyện Lâm Bình, Tuyên Quang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin và có khả năng ức chế tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 0,041–20,79 μ g/mL, trong đó chủng này mang trình tự ADN vùng ITS1-18S-ITS2 có kích thước là 537bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



Hình 1



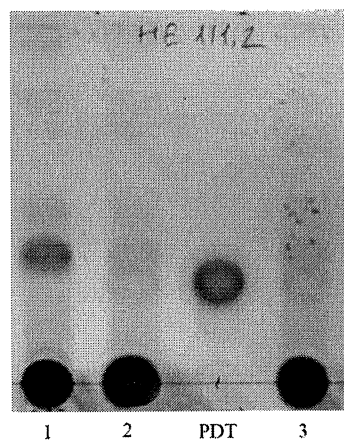
Hình 2



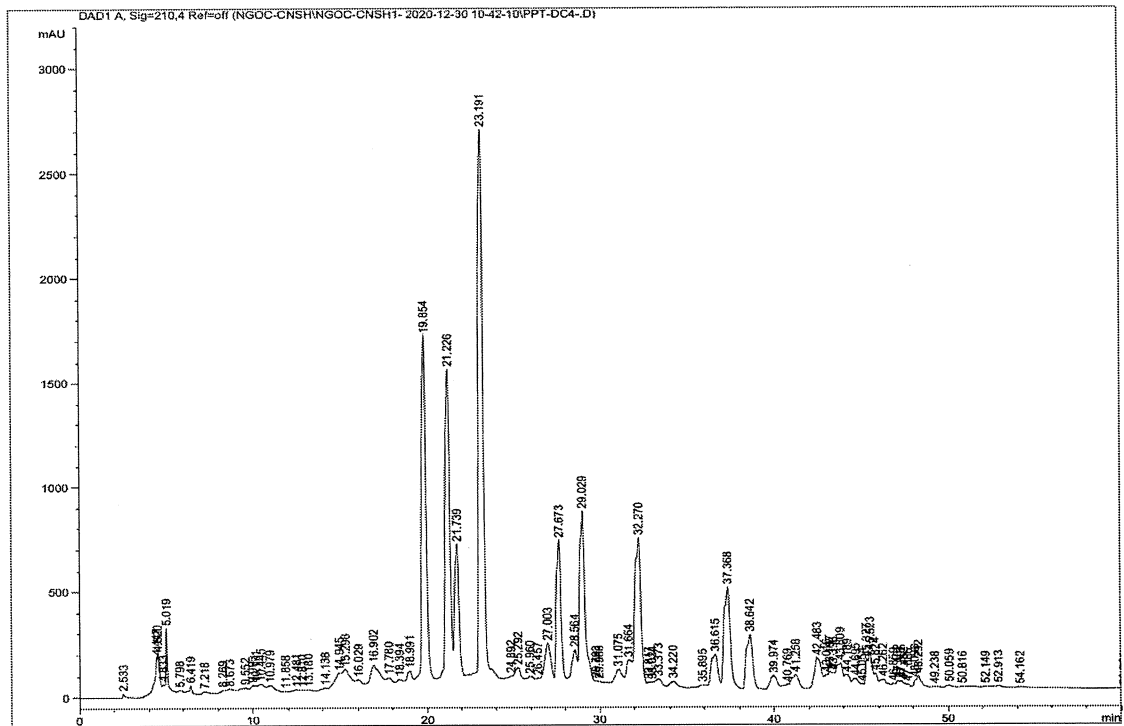
Hình 3

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected									
	GenBank	Graphics	Distance tree of results		New MSA Viewer				
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate GA8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	<i>Fusarium prolifer...</i>	974	974	99%	0.0	99.44%	553	MF607301.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate M12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	<i>Fusarium prolifer...</i>	972	972	100%	0.0	99.26%	554	MF607300.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate M39 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	<i>Fusarium prolifer...</i>	972	972	99%	0.0	99.44%	556	MF607281.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate GR2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	<i>Fusarium prolifer...</i>	972	972	100%	0.0	99.26%	552	MF606823.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> strain ZR074 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 a...	<i>Fusarium prolifer...</i>	972	972	100%	0.0	99.26%	556	KJ528683.1	
☒ <i>Fusarium</i> sp. R201 18S ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RN...	<i>Fusarium</i> sp. R201	972	972	99%	0.0	99.44%	552	JX559858.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate GA16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	<i>Fusarium prolifer...</i>	970	970	99%	0.0	99.26%	553	MF607307.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> voucher HGUP199012 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran...	<i>Fusarium prolifer...</i>	970	970	99%	0.0	99.26%	555	MZ724825.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate R8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	<i>Fusarium prolifer...</i>	968	968	99%	0.0	99.44%	539	MF607283.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate M3H small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	<i>Fusarium prolifer...</i>	968	968	99%	0.0	99.26%	554	MF607282.1	
☒ <i>Fusarium proliferatum</i> isolate YY10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	<i>Fusarium prolifer...</i>	966	966	99%	0.0	99.26%	553	MT123928.1	

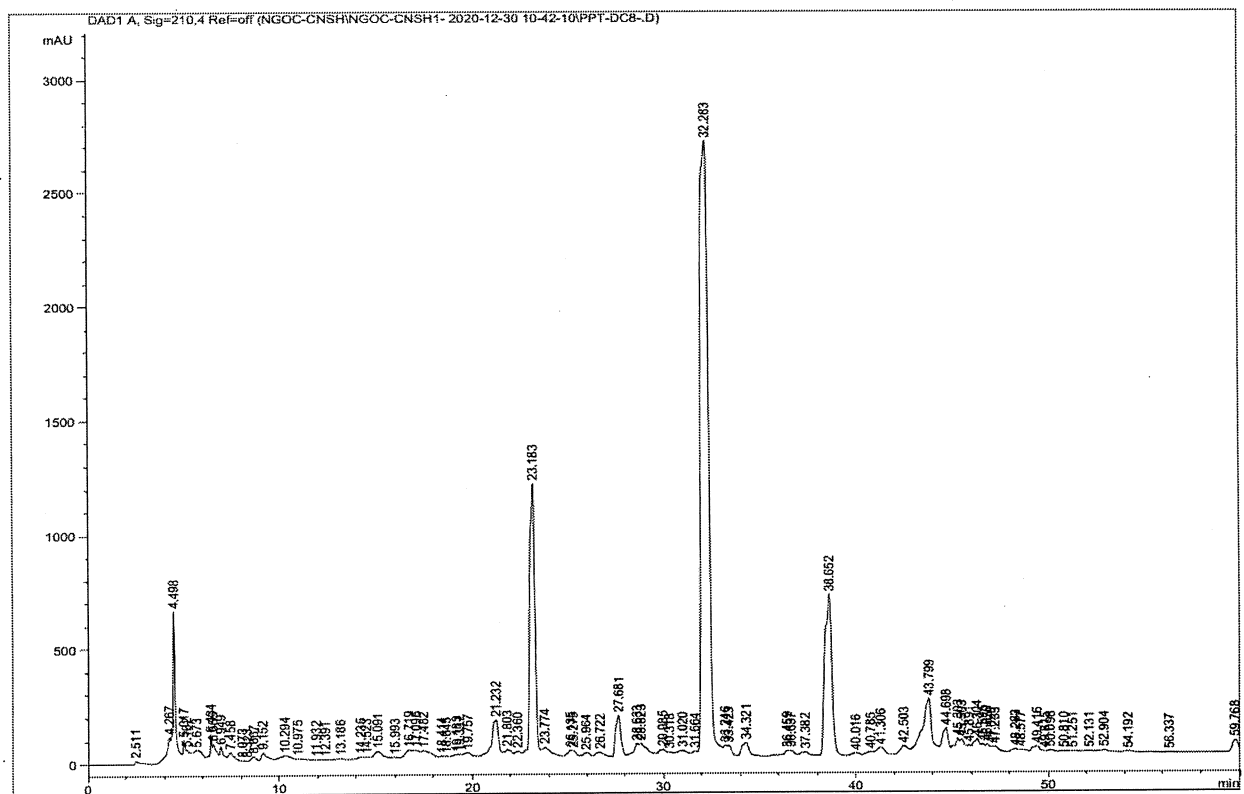
Hình 4



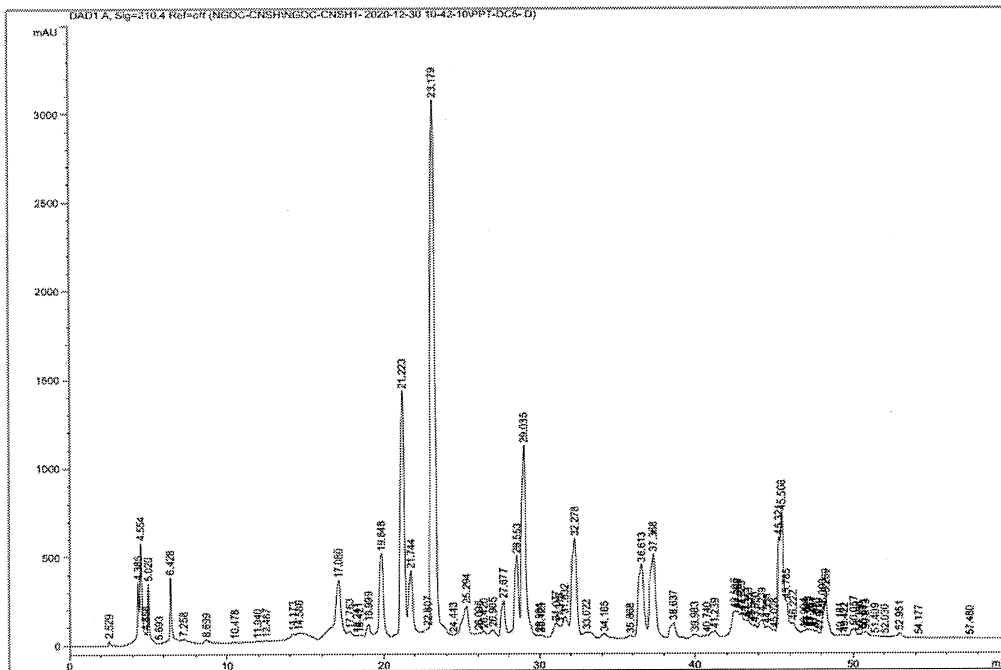
Hình 5



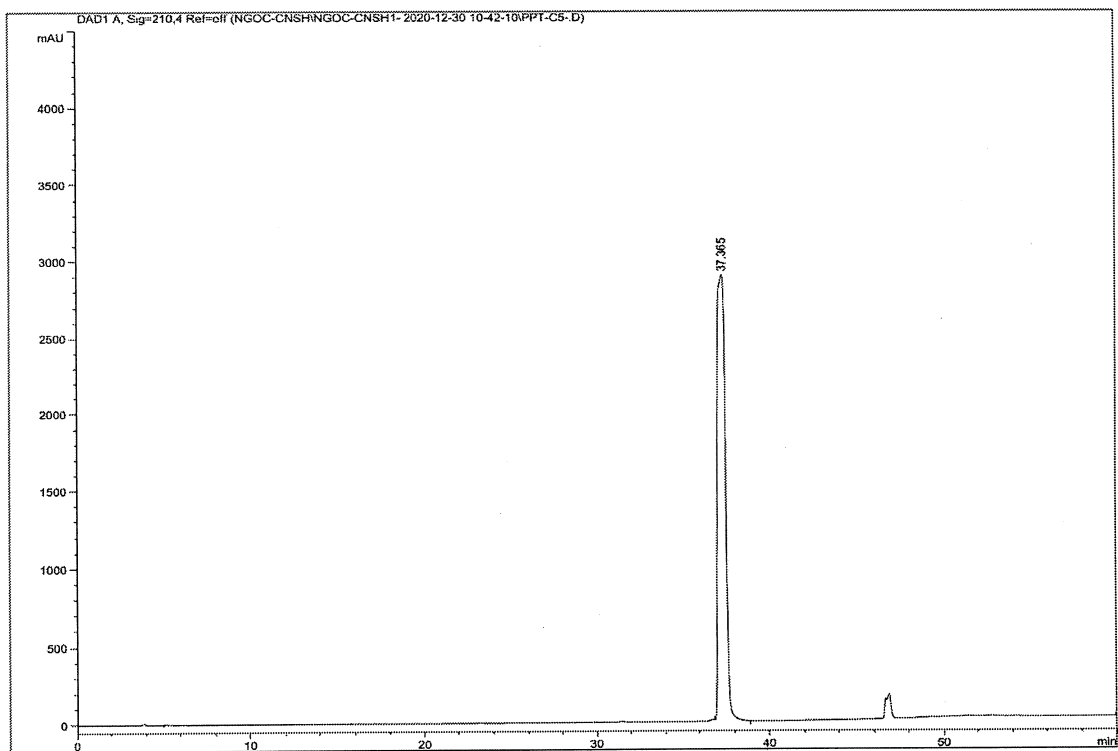
Hình 6



Hình 7



Hình 8



Hình 9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> CHŨNG VI NẤM *FUSARIUM PROLIFERATUM* H11 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT PODOPHYLLOTOXIN

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 537

<212> ADN

<213> *Fusarium proliferatum* H11

<400>

```

1  aaaaacgtaa caaggtctcc gttggtgaac cagcggaggg atcattaccg agtttacaac
61  tcccaaacc ctgtgaacat accaattgtt gcctcgggcg atcagcccg tcccggtaaa
121 acgggacggc ccgccagagg acccctaaac tctgtttcta tatgtaactt ctgagtaaaa
181 ccataaataa atcaaaactt tcaacaacgg atctcttggg tctggcatcg atgaagaacg
241 cagcaaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac
301 gcacattgcg cccgccagta ttctggcggg catgcctgtt cgagcgtcat ttcaaccctc
361 aagcccccg gtttgggtgt ggggatcggc gagccctcgt ggcaagccgg ccccgaaatc
421 tagtggcggg ctgctgcag ctccattgc gtagtagtaa aaccctcgca actggtacgc
481 ggcgcggcca agccgttaa cccccaactt ctgaatgtga cctcgatcag gtagatc

```