



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

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

(11)



2-0002921

(51) **C12N 1/21; C12P 17/18; C12N 15/76**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00569

(22) 10/12/2019

(67) 1-2019-06942

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/02/2020 383A

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
Nhà E2, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Hồng Minh (VN); Nguyễn Kim Nữ Thảo (VN); Lê Thị Hương Huyền (VN).

(54) **CHŨNG XẠ KHUẨN STREPTOMYCES RAPAMYCINICUS VTCC 940001 ĐƯỢC CẢI
BIẾN DI TRUYỀN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP RAPAMYXIN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001 cải biến di truyền mang 2 phiên bản của gen điều hòa dương *rapG* và plasmit pSET152 để tăng năng suất sinh tổng hợp rapamycin. Chủng xạ khuẩn theo giải pháp hữu ích có hiệu quả vượt trội so với chủng hoang dại và có khả năng áp dụng sản xuất rapamycin trên quy mô công nghiệp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001 là chủng đã được cải biến di truyền từ chủng *Streptomyces rapamycinicus* DSM 41530. Chủng *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001 đã được chèn thêm 1 phiên bản của gen điều hòa dương *rapG* và plasmid pSET152 vào hệ gen giúp làm tăng hiệu quả sinh tổng hợp rapamycin cao gấp 6,5 lần so với chủng hoang dại.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) là một nhóm vi sinh vật thuộc lớp Actinobacteria, bộ Actinomycetales, thuộc nhóm Gram dương. Thuật ngữ “actinomycetes”, xuất phát từ tiếng Hy Lạp, có nghĩa là mang cả đặc điểm của vi khuẩn và nấm. Xạ khuẩn có khoảng 100 chi với hơn 1000 loài. Từ lâu, xạ khuẩn được biết đến nhiều với khả năng sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Trong số 22.500 hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật, số chất thu từ xạ khuẩn chiếm 45%, 38% từ nấm sợi và 17% từ các loại vi sinh vật khác.

Streptomyces rapamycinicus thuộc chi *Streptomyces* được các nhà khoa học Brazil phân lập vào những năm 1960 từ mẫu đất thu được ở vùng núi Rapa Nui, Chile. Đây là chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng sinh rapamycin. Rapamycin được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1975 từ loài *Streptomyces hygroscopicus* và được biết đến như một kháng sinh có khả năng kháng nấm *Candida albicans*— gây bệnh phổ biến ở người. Rapamycin có độ đặc hiệu và độc tính tương đối thấp và được hấp thu tốt ở chuột và chó. Tuy nhiên, tính kháng nấm của rapamycin không được ứng dụng nhiều vì những tác dụng phụ khi thử nghiệm lâm sàng trên chuột và cơ chế kháng nấm chưa rõ ràng. Sau đó, rapamycin gây ấn tượng với các kết quả nghiên cứu về khả năng kháng khối u, ức chế miễn dịch, bảo vệ thần kinh và chống lão hóa. Đặc biệt, khả năng ức chế miễn dịch của rapamycin đã được ứng dụng để sản xuất thuốc chống thải

ghép dưới tên thương mại là Sirolimus và thường được sử dụng điều trị cho các bệnh nhân ghép tạng. Đây là một trong số ít kháng sinh được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA, Food and Drug Administration) chấp nhận sử dụng (tháng 9/1999) trong bệnh viện cho các trường hợp ghép tạng.

Rapamycin có nhiều ứng dụng trong y khoa nhưng hiệu quả sản sinh rapamycin của chủng hoang dại còn nhiều hạn chế. Với mục tiêu tăng cường khả năng sinh rapamycin của vi sinh vật, nhóm tác giả đã sử dụng các kỹ thuật di truyền để chèn thêm một phiên bản của gen điều hòa dương *rapG* vào hệ gen của chủng *Streptomyces rapamycinicus* DSM 42530 hoang dại. Chủng *Streptomyces rapamycinicus* đột biến mang 2 phiên bản gen *rapG* (VTCC 940001) đã được đăng ký với Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật, Viện vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* đột biến mang 2 phiên bản gen điều hòa dương *rapG* và chứa plasmit pSET152 có khả năng sinh tổng hợp rapamycin cao hơn so với chủng hoang dại.

Một mục tiêu khác đặt ra là điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp rapamycin của chủng đột biến.

Sau một thời gian nghiên cứu và thử nghiệm, nhóm tác giả giải pháp hữu ích đã tạo ra chủng *Streptomyces rapamycinicus* có khả năng tăng sinh rapamycin cao gấp 6,5 lần so với chủng hoang dại.

Do đó, theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất chủng *Streptomyces rapamycinicus* được cải biến di truyền mang 2 phiên bản gen *rapG* có khả năng sinh tổng hợp rapamycin cao gấp 6,5 lần so với chủng hoang dại

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến môi trường tối ưu để tăng khả năng sinh tổng hợp rapamycin của chủng xạ khuẩn đã được cải biến di truyền.

Các dấu hiệu và các đặc điểm nổi bật của sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ và được đánh giá đúng từ phần mô tả chi tiết sau đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Sơ đồ thiết kế vectơ pSET152/*rapG*

Hình 2. So sánh trình tự *rapG* trong vectơ tách dòng pGEM/*rapG* và trình tự *rapG* trên Genbank

Hình 3. Phân tích bằng southern blot của chủng *S. rapamycinicus* DSM 41530 hoang dại và chủng *S. rapamycinicus* VTCC 940001 đột biến

Hình 4. Hình ảnh khuẩn lạc của chủng *S. rapamycinicus* VTCC 940001 nuôi trên môi trường ISP2 ở 28°C trong 8 ngày

Hình 5. Mức độ sinh tổng hợp rapamycin của chủng *S. rapamycinicus* DSM 41530 (cột mở) và *S. rapamycinicus* VTCC 940001 (cột đóng màu xám) trong các môi trường (A), môi trường có bổ sung 15 g/L glyxerol (B) và môi trường có bổ sung 10 g/ Lbột đại hồi (C).

Hình 6. Nồng độ rapamycin trong dịch nuôi cấy của chủng *S. rapamycinicus* DSM 41530 và *S. rapamycinicus* VTCC 940001 trong các môi trường MD1 bổ sung 15 g/L glyxerol và dịch chiết đại hồi

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, các khía cạnh và phương án của giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết trong phần “Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích”.

Chủng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* DSM41530 cung cấp từ Bảo tàng vi sinh vật và tế bào, Viện Leibniz, Đức. Vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH5a và chủng ET12567(pUZ8002) được cung cấp bởi phòng Nghiên cứu và phát triển công nghệ, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Nấm men *Candida albicans* VTCC 40674 do Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật (VTCC), Viện Vi

sinh vật và Công nghệ sinh học cung cấp. Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1: Các môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Ký hiệu môi trường	Thành phần môi trường (g/L)		
YS	Cao nấm men 2 Tinh bột 10 Agar 16		
MD1	Dextrin 40	Đậu tương 30 Na ₂ HPO ₄ 3	NaCl 5 L – Lysin HCl 2 pH 5,0
MD2	Glucosa 20 Đậu tương 20	KH ₂ PO ₄ 5 pH 6,0	
MD3	Glucosa 6 Sorbitol 8	Đậu tương 10 pH 6,5	K ₂ HPO ₄ 0,025 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2
MD4	Glucosa 22 Cao Malt 10 Casein 0,3 pH 7.2	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5,3 NaCl 5 Na ₂ SO ₄ 0,3 KH ₂ PO ₄ 4 CaCO ₃ 3	ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,06 MgSO ₄ .7H ₂ O 0,06 FeSO ₄ .7H ₂ O 0,1 MnSO ₄ .H ₂ O 0,012
ISP2	Cao Malt 10 Cao nấm men 4 Glucose 4		

Bảng 2 Trình tự các oligonucleotit sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự	Gen/vector
prapGF	5'-GGTCTAGAACCAACGGCGCTGGAGCGGAG-3'	<i>rapG</i>
prapGR	5'-GGTCTAGAGGTCAGCTGTCTGGTCAGCCCGGTTG-3'	
M13F(-29)	5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'	M13
M13R(-20)	5'-GCGGATAACAATTTACACAGG-3'	

Tạo dòng vector pSET152/rapG

Đoạn gen *rapG* được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng máy PCR Mastercycler proS (Eppendorf, Đức) từ ADN của chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* DSM41530. Trình tự đoạn mồi rapGF và rapGR sử dụng để khuếch đại gen *rapG* được thể hiện chi tiết tại Bảng 2. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: 95°C - 5phút; (95°C - 30 giây, 62°C- 15 giây, 72°C- 1 phút 30 giây) × 30 chu kỳ; 72°C - 7 phút. Kích thước sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1% với hiệu điện thế 100V trong 20 phút và sử dụng thang chuẩn ADN.

Sản phẩm PCR trên gel được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (Bioneer, Hàn Quốc). Nồng độ và chất lượng ADN được kiểm tra bằng nanodrop trước khi thực hiện nối với vector tách dòng pGEM để tạo ra vector pGEM/*rapG*. Gen *rapG* trên pGEM/*rapG* được giải trình tự sử dụng đoạn mồi M13F(-29) và M13R(-20). Trình tự *rapG* được so sánh với trình tự đã công bố trên NCBI để chắc chắn không có đột biến gen xảy ra trong quá trình thí nghiệm. Sau đó, pGEM/*rapG* được cắt với enzym giới hạn XbaI (Neb, Mỹ). Hỗn hợp cắt gồm 17μl plasmid pGEM/*rapG* sau tinh sạch, 2μl dung dịch đệm, 1μl XbaI được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Trong một phản ứng độc lập, plasmid pSET 152 sau khi được kiểm tra chất lượng và nồng độ được cắt với XbaI. Sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên agarosa 1%. Sản phẩm cắt đúng kích thước được tinh sạch từ gel agarosa.

Phản ứng nối được thực hiện gồm: 7μl H₂O, 2μl plasmid pSET 152 đã cắt, 10μl *rapG* đã cắt, T4 Buffer 2μl, T4 Ligase 1μl, hỗn hợp ủ ở 22°C qua đêm. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và trải trên môi trường LB bổ sung kháng sinh apramycin 50mg/l, IPTG 1M, X-gal 20mg/l. Những khuẩn lạc của tế bào mang plasmid pSET/*rapG* có màu trắng trên môi trường chọn lọc. Các khuẩn lạc màu trắng được kiểm tra bằng PCR đoạn M13 trong plasmid và gen *rapG*. Khuẩn lạc sau khi được kiểm tra sẽ nuôi trong dịch thể LB và bảo quản chủng ở -80°C.

Tạo dòng xạ khuẩn đột biến

E. coli ET12567(pUZ8002) mang vector gây đột biến được tiếp hợp với bào tử chủng xạ khuẩn *S. rapamycinicus* DSM41530. Sau 5 đến 8 ngày, các khuẩn lạc của

chủng xạ khuẩn đột biến mang plasmit tái tổ hợp pSET152/*rapG* được cấy chuyển sang đĩa môi trường MS bổ sung apramycin 10mg/l. Chủng xạ khuẩn có khả năng mọc trên môi trường có kháng sinh được lựa chọn. Sau đó, ADN tổng số của chủng xạ khuẩn được tách số lượng lớn bằng kit E.N.Z.A Bacterial DNA kit (Omega, Mỹ). Hệ gen của chủng xạ khuẩn được cắt bằng enzym giới hạn EcoRI và HindIII thành nhiều mảnh nhỏ. Sản phẩm được sử dụng cho kỹ thuật lai Southern blot với đầu dò là đoạn gen *rapG* có gắn tín hiệu phóng xạ. Kết quả được in ra trên phim âm bản.

Định lượng rapamycin

Rapamycin được tách từ sinh khối của chủng xạ khuẩn: Xạ khuẩn nuôi trên đĩa thạch YS trong 96 giờ ở 30°C. 10 thỏi thạch với đường kính 4mm được nuôi trong các môi trường dịch thể (bảng 1), nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 72 giờ. Sinh khối sau ly tâm được bổ sung 7,5ml etanol, vortex trong 10 phút và lắc qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 4000 vòng/phút, 20 phút và thu dịch sau tách, phần sinh khối đem sấy khô đến khối lượng không đổi để xác định DCW. Dịch sau tách được pha loãng 10 lần với metanol được phân tích bằng HPLC. Hệ thống HPLC sử dụng cột Eclipse XDB-C18 (4,6×150mm, 5µm), tốc độ dòng 1,2ml/phút, hai pha dung dịch của hệ thống gồm pha A là nước miliQ và pha B là dung môi axetonitril 100%, với tỉ lệ được liệt kê tại bảng 3. Rapamycin được phát hiện tại bước sóng hấp phụ là 272nm.

Bảng 3. Tỉ lệ hai pha dung môi qua cột HPLC

Thời gian (phút)	Dung môi	
	A-H ₂ O (%)	B – axetonitril (%)
0.00	85	15
300	85	15
25,00	15	85
29,00	15	85
32,00	85	15
35,00	85	15

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được minh họa chi tiết hơn qua các ví dụ thực hiện cụ thể dưới đây. Tuy nhiên, giải pháp hữu ích không bị giới hạn ở các ví dụ này, mà phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích sẽ được xác định dựa trên các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Cải biến di truyền chủng *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001

Gen *rapG* được nhân lên số lượng lớn bằng phản ứng PCR sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu rapGF và rapGR. Sản phẩm PCR có kích thước 1 kb trên gel agarosa 1%. Sau khi tạo dòng thành công gen *rapG* sử dụng vector pGEM tạo ra plasmid pGEM/*rapG*, trình tự *rapG* được xác định chính xác 100 % so với trình tự đã công bố của gen *rapG* trên ngân hàng gen thế giới (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Hình 2).

Sau khi tiếp hợp để chuyển plasmit pSET152/*rapG* vào bào tử của chủng *S. rapamycinicus* hoang dại, các khuẩn lạc có tiềm năng đã cải biến di truyền được kiểm tra bằng PCR với cặp đoạn mồi M13F và M13R. Kết quả, đoạn gen được khuếch đại có kích thước xấp xỉ 1 kb, đúng với kích thước của gen *rapG* cần chèn vào hệ gen.

Sau khi cắt hệ gen bằng enzym giới hạn HindIII và thực hiện lai sourthen blot, kết quả cho thấy có hai phiên bản *rapG* trong hệ gen của chủng đột biến so với 1 phiên bản *rapG* của chủng hoang dại (Hình 3). Những kết quả này cho phép kết luận, nhóm tác giả đã thành công trong việc cải biến di truyền, chèn thêm 1 phiên bản gen *rapG* vào hệ gen của chủng chủng *S. rapamycinicus* DSM 41530. Chủng đột biến mang 2 phiên bản của *rapG* được lưu trữ tại với Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật, Viện vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội với mã số *S. rapamycinicus* VTCC 940001. Hình ảnh khuẩn lạc của VTCC 940001 được mô tả ở hình 4.

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh rapamycin

Khả năng sinh rapamycin của chủng hoang dại và chủng cải biến di truyền được kiểm tra trên môi trường MD1, MD2, MD3, MD4 và ISP2. Trong môi trường MD2, lượng rapamycin trong dịch lên men của chủng VTCC 940001 khác biệt mang tính chất thống kê. Nồng độ rapamycin của chủng VTCC 940001 đạt 27,4 mg/l khi

lên men trong môi trường MD2 và cao nhất đạt 51,5 mg/l trong môi trường MD3 (Hình 5A).

Glyxerol là nguồn cacbon dễ kiếm và sử dụng nhiều trong lên men thu sinh khối hoặc các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật. Do đó, nghiên cứu ảnh hưởng và tối ưu nồng độ glyxerol bổ sung trong môi trường giúp tăng hiệu quả sinh rapamycin là cần thiết. Glyxerol được bổ sung vào các môi trường nghiên cứu để lên men chủng hoang dại DSM 41530 và chủng cải biến di truyền VTCC 940001 (Hình 5B). Kết quả, glyxerol giúp tăng đáng kể lượng rapamycin tổng hợp của cả chủng hoang dại và chủng cải biến di truyền. Tuy nhiên, ảnh hưởng của glyxerol phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và chủng nghiên cứu. Ví dụ, hiệu quả tăng sinh rapamycin đối với chủng hoang dại rõ rệt nhất trong môi trường MD3, trong khi việc bổ sung glyxerol trong môi trường MD1, MD2, MD4 và ISP2 không giúp cho chủng hoang dại tăng khả năng sinh rapamycin. Đối với chủng cải biến di truyền VTCC 940001, sự có mặt của glyxerol trong môi trường MD1, MD3, MD4 giúp tăng nồng độ rapamycin trong dịch lên men. Do đó, sự khác biệt rõ rệt trong khả năng sinh rapamycin của chủng cải biến di truyền so với chủng hoang dại thể hiện rõ khi lên men trong môi trường MD1/glyxerol. Nồng độ rapamycin trong môi trường MD1/glyxerol của chủng hoang dại và chủng đột biến lần lượt là 32,7 và 211,3 mg/L. Do đó, khả năng sản sinh rapamycin trong môi trường MD1/glyxerol của chủng *S. rapamycinicus* VTCC 940001 theo giải pháp hữu ích gấp $211,3/32,7 \sim 6,5$ lần chủng hoang dại *S. rapamycinicus* DSM 41530.

Axit shikimic là một chất tham gia vào quá trình sinh tổng hợp rapamycin, do đó chúng được tin là có ảnh hưởng tích cực đến quá trình sinh tổng hợp ramaycin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi làm rõ ảnh hưởng của axit shikimic đến khả năng sinh rapamycin của chủng hoang dại và chủng đột biến. Axit shikimic có nhiều trong quả của cây đại hồi *Illicium verum*. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, nước đun sôi là cách hiệu quả để chiết xuất axit shikimic từ quả của cây đại hồi. Do đó, chúng tôi sử dụng trực tiếp bột đại hồi trong dịch thể ở 121°C, trong 20 phút. Kết quả, dịch chiết đại hồi có tác dụng tăng cường khả năng sinh tổng hợp rapamycin của cả chủng hoang

dại và chủng cải biến di truyền so với môi trường gốc không bổ sung dịch chiết đại hồi. Chủng cải biến di truyền tăng lượng rapamycin lên 3,2 lần trong môi trường MD2 có bổ sung đại hồi so với môi trường gốc MD2. So sánh giữa chủng cải biến và chủng hoang dại, lượng rapamycin sinh ra của hai chủng vẫn khác biệt mang tính thống kê khi có mặt đại hồi ở môi trường MD1 và MD2 (Hình 5C).

Khi bổ sung cả glyxerol và bột đại hồi, nồng độ rapamycin trong dịch lên men của chủng hoang dại tăng đáng kể so với môi trường gốc, môi trường bổ sung glyxerol và môi trường bổ sung đại hồi (Hình 6). Tuy nhiên, sự có mặt của glyxerol và đại hồi không làm tăng nhiều khả năng sinh rapamycin của chủng cải biến di truyền. Điều này có thể lý giải do bột đại hồi chứa axit shikimic là chất trung gian trong quá trình tổng hợp rapamycin. Sự có mặt của chất này giúp chuỗi phản ứng sinh rapamycin trong tế bào được đẩy mạnh. Đồng thời, chủng *S. rapamycinicus* có khả năng sử dụng glyxerol để sinh rapamycin tốt nhất so với các nguồn cacbon khác. Kết quả, chủng hoang dại có thể sinh tổng hợp rapamycin tốt nhất khi có mặt cả 2 chất glyxerol và axit shikimic trong đại hồi. Đối với chủng cải biến di truyền VTCC 940001, sự có mặt của gen điều hòa dương *rapG* là một nhân tố giúp tăng cường chuyển hóa trong chu trình sinh tổng hợp rapamycin đạt đến độ bão hòa. Do đó, sự có mặt của axit shikimic không thể giúp tăng sinh rapamycin của tế bào VTCC 940001. Bên cạnh đó, chủng đột biến không làm thay đổi khả năng sử dụng glyxerol để sinh rapamycin của chủng ban đầu. Kết quả, khi bổ sung glyxerol, chủng đột biến tăng sinh tối đa lượng rapamycin, gấp 4,1 lần so với môi trường không bổ sung glyxerol và duy trì khi bổ sung bột hoa hồi trong môi trường. Từ kết quả cho thấy, môi trường tốt nhất cho chủng VTCC 940001 là môi trường MD1 bổ sung glyxerol hoặc môi trường MD1 bổ sung glyxerol và bột hoa hồi.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

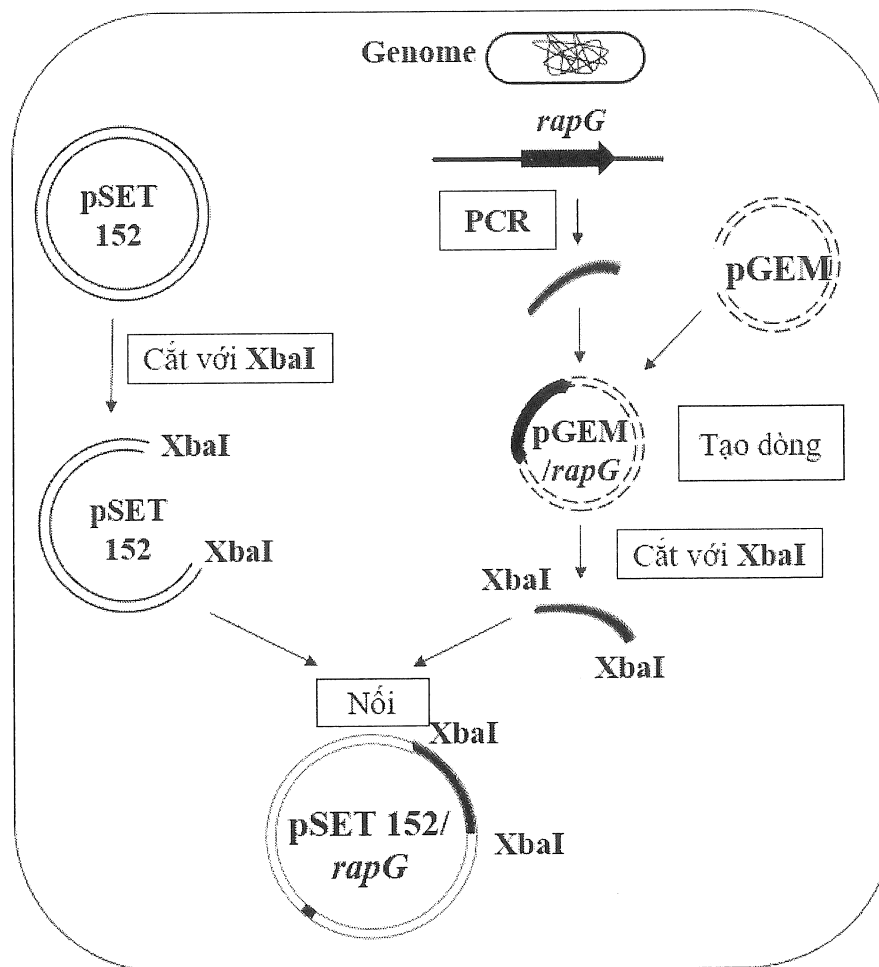
Chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001 cải biến di truyền có khả năng tổng hợp rapamycin cao hơn gấp 6,5 lần so với chủng hoang dại. Môi trường tốt nhất cho chủng VTCC 940001 là môi trường MD1 bổ sung 15 g/l glyxerol. Chủng VTCC 940001 theo giải pháp hữu ích có tiềm năng trong việc ứng

dụng sản xuất rapamycin trên quy mô công nghiệp giúp tăng năng suất và giảm giá thành sản phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces rapamycinicus* VTCC 940001 được cải biến di truyền mang 2 phiên bản của gen điều hòa dương *rapG*, trong đó:

- chủng này được cải biến di truyền từ chủng *Streptomyces rapamycinicus* DSM 41530;
- chủng này chứa 1 gen *rapG* trong hệ gen, và chứa plasmit pSET152 mang thêm 1 bản sao của gen *rapG* này;
- chủng này có khả năng sinh tổng hợp rapamycin cao gấp 6,5 lần chủng hoang dại khi nuôi cấy trên môi trường MD1 có bổ sung glycerol bao gồm các thành phần (g/l): dextrin 40, đậu tương 30, NaCl 5, Na₂HPO₄ 3, lysin HCl 2, glycerol 15, pH 5,0; và
- chủng này được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

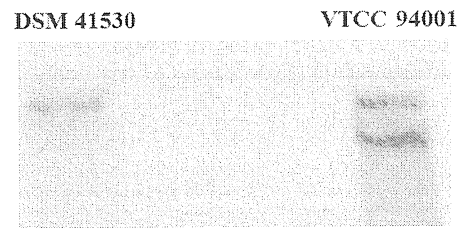


Hình 1

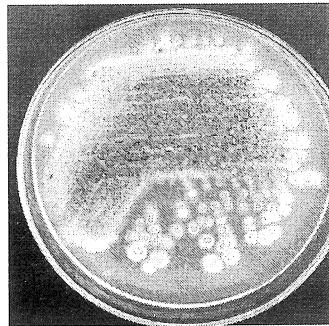
Range 1: 10039598 to 10040587 [GenBank](#) [Graphics](#)[Download](#) [Help](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1818 bits(984)	0.0	988/990(99%)	0/990(0%)	Plus/Minus
Query 4		ACCAACGGCGCTGGAGCGGAGGCCGACGCGATCGCGCGGGGCGTTCTCCGTGGACTCCACC		63
Sbjct 10040587		ACCAACGGCGCTGGAGCGGAGGCCGACGCGATCGCGCGGGGCGTTCTCCGTGGACTCCACC		10040528
Query 64		GTCCCGGGCGCGGGACCAACAAGGATTCTTCCAGGCCTTCCAGCGCGGGTGGGACGCGGAG		123
Sbjct 10040527		GTCCCGGGCGCGGGACCAACAAGGATTCTTCCAGGCCTTCCAGCGCGGGTGGGACGCGGAG		10040468
Query 124		CTCGGCGACGGCTTGCCGCTGCGGAGCCTCAACCGGGATGTGACCGGTGACTTCCGGGTC		183
Sbjct 10040467		CTCGGCGACGGCTTGCCGCTGCGGAGCCTCAACCGGGATGTGACCGGTGACTTCCGGGTC		10040408
Query 184		AGGAGCCGCGCGCGCCAAGGTCCGCGACCTGGCGTTACCGATCTCCACAGCATGTGCGCC		243
Sbjct 10040407		AGGAGCCGCGCGCGCCAAGGTCCGCGACCTGGCGTTACCGATCTCCACAGCATGTGCGCC		10040348
Query 244		ATCCGSAACCGCACTCGCGCTGSGCGGTGTGGAGGACCGGGTACGGATGTACGTCTGTGAAA		303
Sbjct 10040347		ATCCGSAACCGCACTCGCGCTGSGCGGTGTGGAGGACCGGGTACGGATGTACGTCTGTGAAA		10040288
Query 304		CGCGGCGCATGGACGTTGGCAGGTTCCGCGCATCGGGAACCGGCACACCGTGGCGGCGCGG		363
Sbjct 10040287		CGCGGCGCATGGACGTTGGCAGGTTCCGCGCATCGGGAACCGGCACACCGTGGCGGCGCGG		10040228
Query 364		CAGTTCCTCTCTCCGGCACGTGSGGCAGCCGTGGCGCTTCGAGGCGGCGCCGCACACGACG		423
Sbjct 10040227		CAGTTCCTCTCTCCGGCACGTGSGGCAGCCGTGGCGCTTCGAGGCGGCGCCGCACACGACG		10040168
Query 424		GTGAAGATCCTTCTGCTGCTTCCGGGCGCTCACCCCACTGCTGGGAAACCGGGCCGTC		483
Sbjct 10040167		GTGAAGATCCTTCTGCTGCTTCCGGGCGCTCACCCCACTGCTGGGAAACCGGGCCGTC		10040108
Query 484		ACCGGGCCCGCGGATTGSGCCGAGGTACGCTGCTGGTGGCCCAACGCGAATATGGTGTAC		543
Sbjct 10040107		ACCGGGCCCGCGGATTGSGCCGAGGTACGCTGCTGGTGGCCCAACGCGAATATGGTGTAC		10040048
Query 544		GAGACCATGACCGGCTTGGGCCCCGGCGGTGTGCAAGCCGCCACAGCACCTTGTCTGAA		603
Sbjct 10040047		GAGACCATGACCGGCTTGGGCCCCGGCGGTGTGCAAGCCGCCACAGCACCTTGTCTGAA		10039988
Query 604		CTGGCCCACTCGGTGGCGAGGCGTCGGTTGACGATGTGGAGCCCCGGCTGGCGCCCGCG		663
Sbjct 10039987		CTGGCCCACTCGGTGGCGAGGCGTCGGTTGACGATGTGGAGCCCCGGCTGGCGCCCGCG		10039928
Query 664		CTCGCCGGGGCCGCGAAGGACCTCGCGGACAGCCACCTCACCGACCCGAGCTCTCCCC		723
Sbjct 10039927		CTCGCCGGGGCCGCGAAGGACCTCGCGGACAGCCACCTCACCGACCCGAGCTCTCCCC		10039868
Query 724		ACGATGCTGGCGCGTGAACCTCAACGTCTCCTTACGCACTTGCAGCGGGCGTTACCCGTG		783
Sbjct 10039867		ACGATGCTGGCGCGTGAACCTCAACGTCTCCTTACGCACTTGCAGCGGGCGTTACCCGTG		10039808
Query 784		GCGGGAGAGTCGTTGATCGCCTACATCCGTCACCGGCGGCTGGAAAGAGGCCCGCGCGCT		843
Sbjct 10039807		GCGGGAGAGTCGTTGATCGCCTACATCCGTCACCGGCGGCTGGAAAGAGGCCCGCGCGCT		10039748
Query 844		CTCATCGCCTCGGCCGGCAGGCTGAGCGTCTCGGAACCTCGCCGCCCACTGGCAGTTGCGC		903
Sbjct 10039747		CTCATCGCCTCGGCCGGCAGGCTGAGCGTCTCGGAACCTCGCCGCCCACTGGCAGTTGCGC		10039688
Query 904		GACAGCAGCCACTTCATCCGGGTCTTCAAGAAAGACCTACGGCCAGACGCCACCGAGTAC		963
Sbjct 10039687		GACAGCAGCCACTTCATCCGGGTCTTCAAGAAAGACCTACGGCCAGACGCCACCGAGTAC		10039628
Query 964		GCCCCGCTCAACCGGGCTGACCGACAGCTGA	993	
Sbjct 10039627		GCCCCGCTCAACCGGGCTGACCGACAGCTGA	10039598	

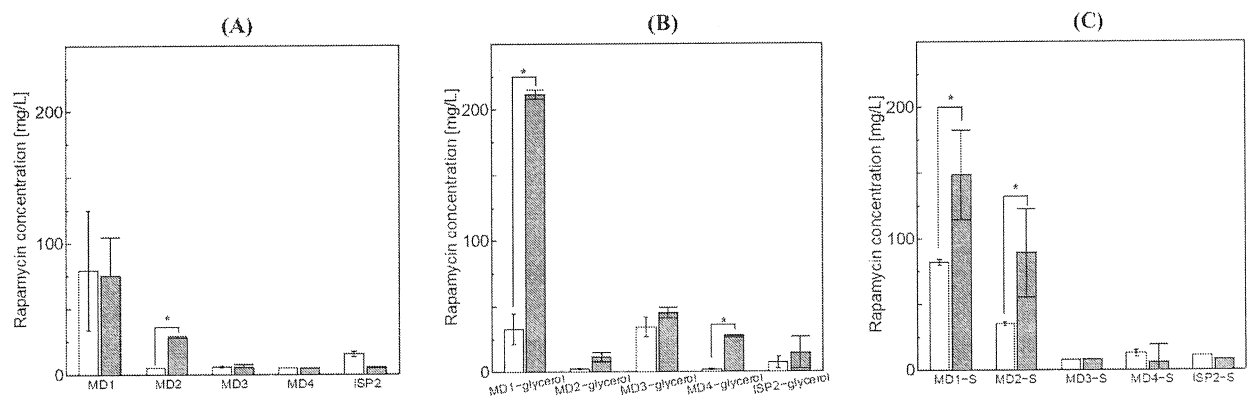
Hình 2



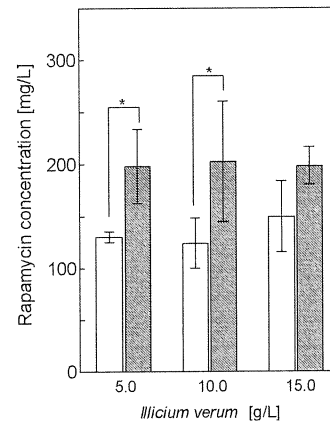
Hình 3



Hình 4



Hình 5

**Hình 6**