



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0032248

(51)⁷ C12N 1/21; C12N 15/76; C12R 1/465; (13) B
C12N 15/63

(21) 1-2013-00335

(22) 21/07/2011

(86) PCT/CN2011/001194 21/07/2011

(87) WO2012/009963 26/01/2012

(30) CN 201010237595.4 23/07/2010 CN

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/04/2013 301A

(73) SHEN YANG FUYANG MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

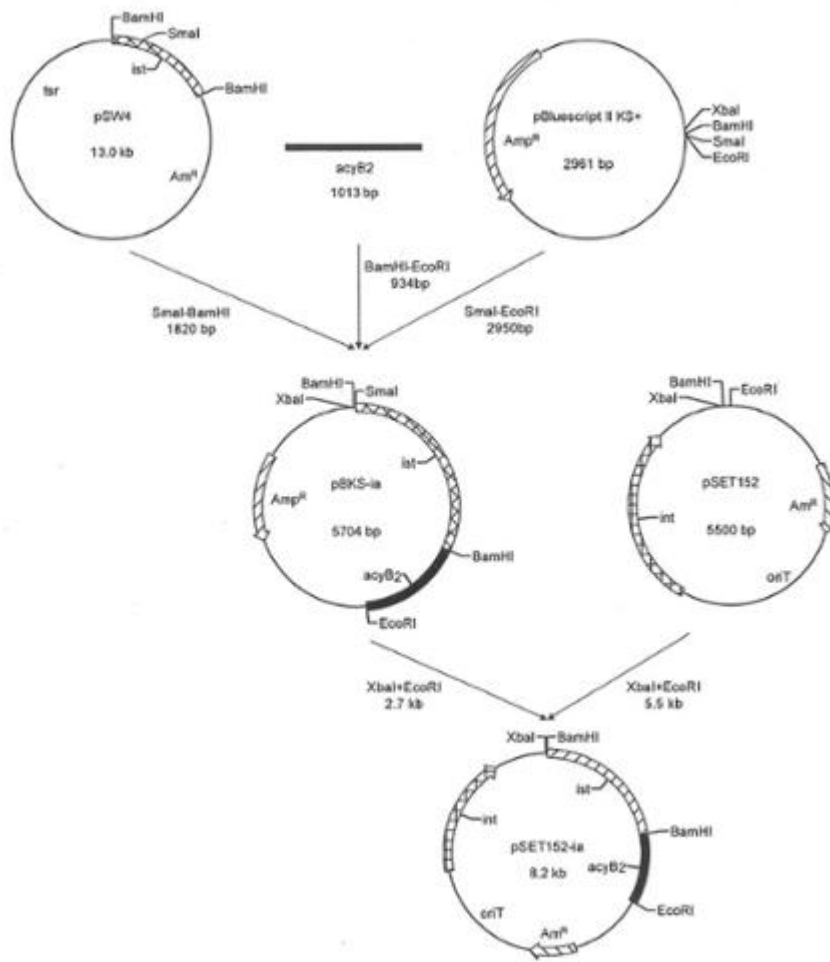
No. 18-12, Yaoyang Road, Shenbei new Area, Shen Yang City, 110000, Liaoning Province, P.R.China

(72) WANG, Yiguang (CN); JIANG, Yang (CN); YANG, Shengwu (CN); ZHAO, Xiaofeng (CN).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) CHỦNG VI KHUẨN STREPTOMYCES ĐƯỢC THIẾT KẾ GEN WSJ-IA TẠO RA ISOVALERYL SPIRAMYXIN I VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ISOVALERYL SPIRAMYXIN I

(57) Sáng chế đề cập đến chủng được thiết kế gen WSJ-IA để tạo ra isovaleryl spiramycin I. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra chủng này bao gồm các bước: (a) thiết kế plasmid tái tổ hợp chứa gen kép ist-acyB2; (b) biến nạp plasmid này vào chủng tạo ra isovaleryl spiramycin I để thu được chủng WSJ-IA. Mức isovaleryl spiramycin I được tạo ra bằng quá trình lên men của chủng WSJ-IA này được gia tăng 1,7 lần và hiệu suất lên men của nó gia tăng 4,14 lần khi so sánh với chủng chỉ chứa gen ist duy nhất.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc thu nhận chủng vi khuẩn tạo ra chất kháng sinh thành phần đơn với hàm lượng và hiệu suất cao bằng cách thiết kế bằng kỹ thuật điều hòa gen.

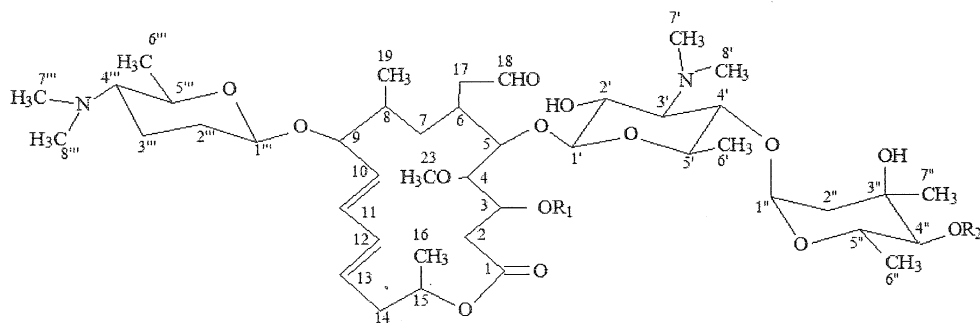
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bitespiramycin (tên ban đầu: Shengjimyxin) [patent số: ZL97104440.6] là dẫn xuất của spiramycin tạo ra được bằng cách isovaleryl hóa nhóm hydroxyl ở vị trí 4" của nhóm chức mycaroza trong phân tử spiramycin. Nó được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật thiết kế gen, để tạo ra tổ hợp hệ gen vi khuẩn giữa gen ist isovaleryl spiramycin của *streptomyces* chịu nhiệt và spiramycin. Bitespiramycin có hoạt tính tương đối mạnh chống lại vi khuẩn Gram dương, đặc biệt là *Streptococcus pneumonia*, *Mycoplasma pneumonia* và chlamydia, nó thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn chống lại vi khuẩn kháng kháng sinh β -lactam và erythromycin như *influenza bacillus*, *Legionella*, *Clostridium perfringens*; nó thể hiện sự kháng chéo hoàn toàn đối với các hoạt chất tương tự. Bitespiramycin có tính chất thu hút bởi chất mỡ tương đối cao, quá trình hấp thụ qua đường tiêu hóa của nó là nhanh với độ thấm vào mô và sự phân bố rộng trong cơ thể và thời gian duy trì dài. Do đó, nó có tác dụng sau kháng sinh tốt. Thử nghiệm lâm sàng pha III đối với Bitespiramycin được tạo ra bằng kỹ thuật thiết kế gen đã được hoàn tất, kết quả cho thấy tác dụng điều trị và độ an toàn tốt. Đơn xin cấp chứng nhận được chất mới loại I đã được xúc tiến đối với được chất này.

Nghiên cứu lâm sàng cho thấy Bitespiramycin là kháng sinh có hiệu quả và an toàn. Tác dụng điều trị của nó có thể so sánh với kháng sinh azithromycin, thường được công nhận là kháng sinh macrolit tốt nhất hiện nay. Tuy nhiên, do thực tế Bitespiramycin là dược chất đa thành phần, đối với các nỗ lực để tạo ra quy trình bào chế viên nén để có thể thu được sản phẩm có tỷ lệ thành phần có thể kiểm soát được

và chất lượng ổn định, yêu cầu về sự kiểm soát quá trình chiết cũng như quá trình tinh chế là tương đối nghiêm ngặt, và quy trình khảo sát chất lượng là phức tạp. Trong khi đó, để nâng cao hiệu quả điều trị của nó, cần thiết phải phát triển chế phẩm tiêm của nó. Đã biết rằng chế phẩm tiêm mang lại tác dụng điều trị nhanh, đặc biệt có thể sử dụng cho những bệnh nhân bị bệnh trầm trọng hoặc các bệnh nhân không thích hợp để dùng thuốc qua đường miệng. Chắc chắn là thuốc tiêm yêu cầu nghiêm ngặt hơn về việc kiểm soát chất lượng.

Quá trình tạo ra Bitespiramycin đa thành phần bằng vi khuẩn tương ứng được bắt nguồn từ các đặc tính đa thành phần của spiramycin. Là sự phát sinh nguồn gốc của Platenomycin, là kháng sinh macrolit, nhân chính của nó là vòng lacton có 16 cạnh. Nó có ba phân tử đường: forosamin, mycaminoza và mycaroza, trong khi đó thành phần chính của Bitespiramycin là dẫn xuất isovaleryl hóa của nhóm hydroxyl ở vị trí số 4'' của phần chức mycaroza trong phân tử spiramycin. Bởi vì sự tồn tại của gen axyltransferaza trong vi khuẩn tạo ra spiramycin, vị trí số 3 của vòng lacton trong phân tử spiramycin có thể được axetyl hóa tạo ra thành phần spiramycin II; propionyl hóa tạo ra thành phần spiramycin III; và khi vị trí số 3 này của vòng lacton được loại bỏ nhóm axetyl, thành phần spiramycin I được tạo ra. Do đó, bitespiramycin cũng là hỗn hợp của ít nhất ba thành phần: các isovaleryl spiramycin I, II, III. Cấu trúc của ba thành phần chính của Bitespiramycin là như sau:



trong đó:

Isovaleryl spiramycin III $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Isovaleryl spiramycin II $R_1 = \text{COCH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Isovaleryl spiramycin I $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tất cả các thành phần đơn là isovaleryl

spiramycin I, II, và III đều có hoạt tính kháng sinh, không có sự khác biệt đáng kể về hoạt tính của chúng [đơn yêu cầu cấp patent số: 201010119745.1]. Theo tiêu chuẩn chất lượng hiện tại được thiết lập cho Bitespiramycin, hàm lượng isovaleryl spiramycin (I+II+III) không thấp hơn 60%. Do đó, thành phần đơn (hàm lượng cao hơn 60%) có thể được sử dụng để thay thế hỗn hợp đa thành phần. Để làm giảm quá trình bào chế các đa thành phần, phòng thí nghiệm này đã thiết kế chủng vi khuẩn WSJ-2 bằng cách phong bế gen 3-O-acyl transferaza bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen ở vi khuẩn tạo ra Bitespiramycin WSJ-1. WSJ-2 chỉ tạo ra isovaleryl spiramycin I [Chunyan Ma et al. Current Microbiology, 2011, 62:16-20]. Tuy nhiên, chủng này là đơn vị lên men rất thấp, do đó, nó không có lợi để sản xuất ở quy mô lớn. Mục đích của sáng chế là điều hòa gen acyB2 để cải biến chủng WSJ-2, làm tăng hiệu suất của thành phần đơn isovaleryl spiramycin I và hàm lượng của nó trong hỗn hợp. Điều này sẽ tạo cơ sở cho quá trình phát triển dược chất mới: thành phần đơn của chất đồng đẳng Bitespiramycin, isovaleryl spiramycin I để sử dụng trong lâm sàng.

Đã biết rằng gen ist isovaleryltransferaza từ *streptomyces* chịu nhiệt được liên kết với gen điều hòa acyB2, sự có mặt của gen điều hòa này có thể kích hoạt quá trình biểu hiện gen ist. Chủng *streptomyces* mô hình: *Streptomyces* màu xanh chì biến đổi chứa gen ist cũng như gen điều hòa acyB2 hoàn chỉnh có khả năng chuyển hóa từ 67 đến 79% tylosin được bổ sung từ bên ngoài thành 4''-isovaleryl tylosin, trong khi chủng *Streptomyces* tương tự chỉ chứa gen ist, hoặc gen ist có gen acyB2 không hoàn chỉnh, chỉ chuyển hóa 0-2,4% tylosin được bổ sung này [Arisawa A et al: Biosci Biotechnol Biochem 1993, 57(12): 2020-2025]. Bằng cách chuyển plasmid tái tổ hợp của dạng sao chép tự phát (các vectơ pIJ702 hoặc pIJ943) chứa gen ist và gen acyB2 vào vi khuẩn tạo ra tylosin (*Streptomyces fradiae*), trong điều kiện bổ sung dược chất từ bên ngoài (thiopeptin), thể biến nạp chủ yếu tạo ra tylosin trong quá trình lên men, ngoài một lượng nhỏ 4''-isovaleryltylosin (ca. 56 g/mL) [Arisawa A. et al : J Antibiotics 1996,49(4):349-354] có thể được phát hiện. Tuy nhiên, không có báo cáo nào về sự gia tăng hiệu suất 4''-isovaleryltylosin hoặc hàm lượng cao hơn của thành phần đơn trong hỗn hợp bằng cách chuyển gen ist và gen acyB vào vi khuẩn tạo ra

tylosin đã được công bố cho đến nay.

Gen điều hòa *acyB2* và protein điều hòa phiên mã *Srm28c* trong vi khuẩn tạo ra spiramycin (*Streptomyces ambofaciens*) là tương đồng [Fatma Karray et al Microbiology 2007,153,4111-4122], mức độ tương đồng của chúng là 69%, mức độ tương đồng của *acyB2* và protein điều hòa *tylR* trong vi khuẩn tạo ra tylosin (*Streptomyces fradiae*) là 41%, *tylR* là protein điều hòa dương của quá trình sinh tổng hợp trong vi khuẩn tạo ra tylosin, nó điều hòa quá trình biểu hiện của môđun polyketit synthaza (*tylGI*) trong vi khuẩn tạo ra tylosin, và đóng vai trò điều hòa quá trình tổng hợp tylosin glycosyl cũng như quá trình oxy hóa vòng polyketon này. Quá trình biểu hiện cao của gen *tylR* ở vi khuẩn tạo ra spiramycin có thể làm gia tăng năng suất tylosin [George S. et al., Mol. Microbiology 2004,54(5):1326-1334]. Tuy nhiên, phương pháp gắn gen *ist* vào vi khuẩn tạo ra spiramycin, mà là tương đồng như gen *acyB2*, bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN tương đồng plasmid tái tổ hợp nhiễm sắc thể, chỉ dẫn đến sự tạo ra hỗn hợp của isovaleryl spiramycin, với hiệu suất cao là 800mg/ml [Shang Guangdong et al. Chinese Journal of Biotechnology, 1999,15(2):171]. Điều này chứng minh rằng chỉ bằng cách chuyển gen *ist* vào chủng chứa gen điều hòa tương tự với *acyB2* sẽ không có thể làm gia tăng đáng kể hiệu suất và hàm lượng thành phần của sản phẩm đích.

Phòng thí nghiệm này đã chứng minh rằng bằng cách ghép nối gen *ist* sử dụng kỹ thuật thiết kế gen, để làm gia tăng số lượng sao chép của gen *ist* ở vi khuẩn tạo ra spiramycin để làm tăng liều lượng gen *ist*, khả năng isovaleryl hóa của các vi khuẩn cũng được gia tăng; cũng được chứng minh rằng bằng cách thay thế trình tự promoter của gen *ist* ban đầu bằng promoter có hoạt tính mạnh, như trình tự promoter *ermE* của gen kháng erythromycin, quá trình biểu hiện của gen *ist* có thể được gia tăng. Điều này làm tăng sự tạo ra isovaleryl spiramycin lên 62% với vi khuẩn được thiết kế gen [Đơn yêu cầu cấp patent số. 200910148767.8].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm thu được các chủng vi khuẩn tạo ra hàm lượng cao thành phần đơn Bitespiramycin – isovaleryl spiramycin I, cũng như năng suất cao bằng phương pháp biểu hiện gen *ist* liên kết được với gen điều hòa *acyB2* ở

chúng, mà đã có được, có khả năng chỉ tạo ra thành phần isovaleryl spiramycin I, sử dụng hệ biểu hiện ổn định và hiệu quả cao. Để đạt được mục đích này, cần phải vượt qua được các trở ngại về giới hạn của các vi khuẩn tạo ra kháng sinh ở giá trị thực nghiệm về cải biến gen bằng gen ngoại sinh, nhờ đó cải thiện tỷ lệ chuyển hóa của ADN ngoại sinh. Trong khi đó, cần lựa chọn hệ vector để biểu hiện ổn định, để mà các vi khuẩn được thiết kế gen có thể phù hợp với quá trình sản xuất công nghiệp với quy mô lớn. Sáng chế nhằm mục đích áp dụng vector tích hợp đối với quá trình sao chép không tự phát ở *Streptomyces*, vector này chứa enzym integraza của thể thực khuẩn *Streptomyces* cũng như các vị trí gắn kết, và chỉ chứa đơn vị sao chép của *E. coli*, để làm dễ dàng cho quá trình tổng hợp trong *E. coli*, trong khi vector này thiếu đơn vị sao chép của *Streptomyces*. Khi nó đi vào các tế bào *Streptomyces*, quá trình tích hợp nhờ vào các vị trí gắn kết (attP) trên thể mang và các vị trí gắn kết đặc hiệu của vi khuẩn chủ. Do đó, gen ngoại sinh có thể được biểu hiện một cách ổn định trong quá trình sản xuất với quy mô lớn. Các nghiên cứu về quá trình đồng biểu hiện của gen ist isovaleryl axylaza và gen điều hòa acyB2 ở vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I để làm gia tăng hiệu suất và hàm lượng của isovaleryl spiramycin I, cũng như các nghiên cứu về quá trình sản xuất thử nghiệm quy mô thí điểm, không được tìm thấy và báo cáo cho tới thời điểm này trong và ngoài nước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là cấu trúc plasmid tái tổ hợp gen ist-acyB2 pSET52-ia;

Fig.2 là kết quả PCR của nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin và chứa gen ist-acyB2; trong đó M: DNA MarkerIII; 1- vi khuẩn đối chứng WSJ-2; 2-5: Thể biến nạp WSJ-IA 1-4;

Fig.3 là kết quả HPLC của thành phần isovaleryl spiramycin I trong sản phẩm lên men bằng chủng vi khuẩn WSJ-IA chứa plasmid tái tổ hợp gen ist-acyB2 pSET52-ia; trong đó A: vi khuẩn đối chứng WSJ-2; B: WSJ-IA, vi khuẩn được thiết kế gen chứa gen ist và gen điều hòa acyB2; SP-spiramycin; ISO-SP-isovaleryl spiramycin I.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn được thiết kế gen tạo ra thành phần isovaleryl spiramycin I với hiệu suất cao và hàm lượng cao, vi khuẩn được thiết kế gen này là chủng tách dòng với gen ist isovaleryl transferaza được liên kết với gen điều hòa acyB2 được đồng biểu hiện ở vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2.

2. Sáng chế đề xuất cấu trúc của chủng vi khuẩn được thiết kế gen tạo ra thành phần isovaleryl spiramycin I với hiệu suất cao và hàm lượng cao, cấu trúc này sử dụng ADN tổng của *Streptomyces* chịu nhiệt (*Streptomyces thermotolarentes* CGMCC4.1501) làm khuôn, thiết kế đoạn môi theo trình tự ist-acyB2 được công bố bởi NCBI, và thu được đoạn gen ist-acyB2 được liên kết bằng phương pháp PCR, chèn các vị trí phân cắt thích hợp; sáng chế cũng đề xuất gắn các đoạn gen ist và gen acyB2, tương ứng, với vectơ tích hợp có thể chuyển vào chủng vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I ở các vị trí phân cắt thích hợp, để thiết kế plasmid tái tổ hợp gen ist-acyB2. Tiếp đó, plasmid tái tổ hợp gen ist-acyB2 được đưa vào vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2, sau đó tiến hành PCR để xác minh rằng ist-acyB2 được tích hợp vào hệ gen thể biến nạp để thu được WSJ-IA.

3. Sáng chế nhằm mục đích nhận dạng các đặc tính của chủng *Streptomyces* WSJ-IA theo các tiêu chuẩn về phân loại và sự tương đồng của *Streptomyces*.

4. Bằng cách sử dụng vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin WSJ-2 mà chứa monogen ist làm đối chứng, sáng chế đã thử nghiệm hoạt động lên men của chủng WSJ-IA, bao gồm việc đo độ chuẩn lên men của chủng WSJ-IA bằng cách sử dụng phương pháp vi sinh vật, và hàm lượng isovaleryl spiramycin I trong dịch lên men bằng phương pháp phân tích định lượng HPLC. Kết quả thể hiện rằng việc đưa gen điều hòa acyB2 vào có thể cải thiện đáng kể hàm lượng cũng như hiệu suất thành phần isovaleryl spiramycin tạo ra bởi chủng này.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hiệu quả tích cực của sáng chế là đã chỉ ra rằng việc đưa gen điều hòa acyB2 vào chủng vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2 có thể làm tăng độ chuẩn lên men lên 414%, và làm tăng hàm lượng isovaleryl spiramycin I lên 170,2%. Chủng tạo ra isovaleryl spiramycin I với hàm lượng cao được thiết kế theo sáng chế

đã được thử nghiệm với quy mô thí điểm trong thùng lên men 2 tấn, các mẫu isovaleryl spiramycin I thu được đã được sử dụng trong các nghiên cứu dược lực học. Ứng dụng của chủng này trong quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp của thành phần kháng sinh này có thể không chỉ làm đơn giản việc kiểm soát chất lượng và tiêu chuẩn kiểm tra của sản phẩm mà còn tạo điều kiện để bào chế chế phẩm tiêm chứa isovaleryl spiramycin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau chỉ nhằm mục đích giúp các chuyên gia kỹ thuật trong lĩnh vực này hiểu hơn về sáng chế, mà không được hiểu theo bất kỳ cách nào là giới hạn phạm vi sáng chế.

Ví dụ 1: Thiết kế plasmid tái tổ hợp pSET52-ia chứa gen kép ist-acyB2

Plasmid tái tổ hợp pSW4 thiết kế được trước đó trong phòng thí nghiệm này [Shang Guangdong et al., Chinese Journal of Biotechnology, 1999,15(2):171] được cắt bằng enzym SmaI-BamHI để thu được gen ist hoàn chỉnh và đoạn 1820 chứa phần trước của gen acyB2, bằng cách sử dụng ADN tổng của *Streptomyces* chịu nhiệt được cung cấp bởi Trung tâm thu nhận nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp Trung Quốc (China General Microbiological Culture Collection Center) (*Streptomyces thermotolarentes* CGMCC4.1501) để làm khuôn, thiết kế đoạn môi theo trình tự acyB2 được NCBI công bố.

P1: CGCTCAGGGACGCAAGACC (trình tự SEQ ID NO.7) và P2: CCGGAATTCGCCCCGTGACCTCACCGTC (trình tự SEQ ID NO.8), nhiệt độ PCR: quá trình làm biến tính trước ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 2 phút; 94°C trong thời gian 30 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong thời gian 1 phút, 28 chu kỳ; quá trình kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 5 phút, để thu được đoạn 1013bp của phần sau của gen acyB2. Enzym BamHI-EcoRI được sử dụng để cắt sản phẩm PCR để thu được đoạn 934bp, các đoạn nêu trên được cắt bằng SmaI-BamHI(1820bp) và BamHI-EcoRI(934bp) được gắn vào vector pBluescript II KS(+) (E·Merck) bởi các vị trí enzym cắt giới hạn SmaI-EcoRI, để thu được plasmid tái tổ hợp gen pBKS-ia chứa ist và acyB2 hoàn chỉnh. Plasmid pSET152, được gắn vào plasmid chuyển tiếp hợp *E. coli*/*Streptomyces* đã tích hợp thông qua các vị trí cắt giới hạn bằng enzym XbaI-EcoRI [Bierman M. et al Gene

1992,116,43-49, từ ngân hàng gen chia sẻ, www.genecool.com], để thu được plasmid tái tổ hợp gen *ist-acyB2* pSET52-ia (phương pháp thử nghiệm theo các quy trình thực hiện, TAKARA Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.). Quá trình thiết kế được thể hiện trong Fig.1

Ví dụ 2: Chuyển plasmid tái tổ hợp pSET52-ia vào vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2

Vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2 được thiết kế bởi phòng thí nghiệm này [Chunyan Ma et al. *Current Microbiology*, 2011,62:16-20]. Chúng nêu trên được nuôi cấy trên môi trường nghiêng [bột bánh đậu nành 2,0%, glucoza 1,0%, tinh bột 3,0%, CaCO₃ 0,5%, NaCl 0,4%, agar 2,0%] ở nhiệt độ 28°C trong thời gian từ 7 đến 10 ngày, để chuẩn bị tế bào tế bào nguyên sinh theo các quy trình được mô tả trong tài liệu [D.A.Hopwood et al. *Genetic manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, Norwich; John Innes Foundation UK, 1985]. Cụ thể là, mẫu nuôi cấy chủng được mức để cấy vào môi trường R2YE chứa sucroza, được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian từ 2 đến 4 ngày, môi trường tương tự được cấy bằng cách chuyển 10% môi trường nuôi cấy ở trên với việc bổ sung 0,5% glyxin, được nuôi cấy trong 20 giờ. Thể sợi nấm được thu gom bằng cách ly tâm, được rửa 2 đến 3 lần bằng dung dịch sucroza 10,3%, thể sợi nấm được làm tan vi khuẩn ở nhiệt độ 37°C trong dung dịch P chứa 2mg/ml lysozym trong thời gian khoảng 15 đến 60 phút, lọc qua vải bông để thu được tế bào nguyên sinh. Để vượt qua giới hạn của vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-2 để cải biến gen ngoại sinh, đầu tiên plasmid tái tổ hợp pSET52-ia được chuyển vào E. coli 12567 thiếu hụt metyl hóa [Mac Neil et al *Gene* 1992, 111, 61-68, từ ngân hàng gen chia sẻ, www.genecool.com]. ADN plasmid từ thể biến nạp được chiết, tiếp đó được chuyển vào tế bào nguyên sinh trong môi trường chứa PEG, được phủ trên môi trường rắn R2YE. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 24 giờ, thể nuôi cấy được đổ ngập bằng dung dịch chứa apramycin để có được nồng độ apramycin cuối cùng là 50µg/ml trong môi trường, và được nuôi cấy trong thời gian từ 7 đến 10 ngày, để có được thể biến nạp kháng. Thể biến nạp này được tiếp tục được cấy truyền mà không cần định lượng, và tiếp đó thử nghiệm sau khi định lượng để thu được vi khuẩn tạo ra isovaleryl spiramycin I WSJ-IA với sự biểu hiện ổn định của plasmid tái tổ hợp kháng pSET52-ia.

Đoạn môi đối với phía trước của gen *ist* và phía sau của gen *acyB2* P3:

GAGGTAGAAGGCGAAGGT (trình tự SEQ ID NO.9) và P4: CGTCAGATGCCAGTTCAC (trình tự SEQ ID NO.10) được thiết kế, PCR được tiến hành đối với ADN tổng của vi khuẩn đối chứng WSJ-2 và thể biến nạp (4) của WSJ-IA để xuất trong sáng chế làm khuôn, quy trình PCR là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 2 phút; 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút, 28 chu kỳ; kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 5 phút (Fig.2). Kết quả thu được chỉ ra rằng sản phẩm PCR 1733bp có thể thu được từ hệ gen WSJ-IA, trái lại không sản phẩm PCR nào thu được từ chủng đối chứng, điều này có nghĩa là gen *ist-acyB2* đã được tích hợp thành công vào hệ gen của chủng đích. Chủng nêu trên được gửi đến Trung tâm thu nhận nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp Trung Quốc, No. 1, 3rd Bldg., Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing, ngày 25 tháng 6 năm 2010 để bảo quản. Số đăng ký: No.CGMCC 3942, tên mục: *Streptomyces spiramyceticus*.

Ví dụ 3: Phát hiện và xác nhận các đặc tính của chủng WSJ-IA

Tham khảo “sự phân loại và phát hiện của actinomycetes” [Yan Xunchu ed., 1992], sáng chế đã phát hiện và xác nhận các đặc tính của chủng WSJ-IA.

1. Hình thái học nuôi cấy WSJ-IA và các đặc tính sinh hóa và sinh lý

(1) Các đặc tính nuôi cấy

Thể sợi nấm khí sinh, thể sợi nấm chất nền và màu của sắc tố hòa tan của chủng được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau được quan sát, các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

(2) Các đặc tính vi mô

Các sợi bào tử mềm và uốn lượn, dạng móc và xoắn ốc, bào tử hình trụ và hình bầu dục.

Bảng 1: Hình thái nuôi cấy của chủng WSJ-IA

Các đặc tính nuôi cấy	Thể sợi nấm khí sinh	Thể sợi nấm chất nền	Sắc tố hòa tan
Môi trường Czapek	cực ít, trắng	trắng hạt sen	không quan sát thấy
Môi trường glucoza asparagin	cực ít, trắng nhạt	nâu vàng	không quan sát thấy

Môi trường glyxerol asparagin	không có thể sợi nấm khí sinh	vàng hạt sen	không quan sát thấy
Môi trường tinh bột muối vô cơ	không có thể sợi nấm khí sinh	kaki nhạt	không quan sát thấy
Môi trường ISP-2	trắng	nâu đất	không quan sát thấy
Môi trường bột mì yến mạch	trắng	vàng ngà	không quan sát thấy
Môi trường Gause số 1	cực ít, trắng ngà	kaki nhạt	không quan sát thấy
Môi trường Santa	không có thể sợi nấm khí sinh	nâu hạt dẻ	không quan sát thấy

Chú thích: Môi trường Czapek: Đường mía: 30g, NaNO_3 3,0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, KCl 0,5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 1,0g, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=6,0-6,5.

Môi trường glucoza asparagin: Glucoza 10g, asparagin 0,5g, K_2HPO_4 0,5g, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=7,2 đến 7,4.

Môi trường glyxerol asparagin: Glyxerol 10g, asparagin 0,5g, K_2HPO_4 0,5g, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=7,2 đến 7,4.

Môi trường tinh bột muối vô cơ: Tinh bột hòa tan 10,0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0g, NaCl 1,0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0g, CaCO_3 2,0g, K_2HPO_4 1,0g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10mg, FeSO_4 10mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=7,2.

Môi trường ISP-2: Dịch chiết nấm men 4,0g, dịch chiết mạch nha 10,0g, glucoza 4,0g, agar 20,0g, nước cất 1,0l, pH=7,2-7,4.

Môi trường bột yến mạch: bột yến mạch 20,0g, dung dịch muối vết 1ml, agar 15g, nước cất 1,0l, pH=7,2, trong đó: dung dịch muối vết: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, 100ml nước cất.

Môi trường Gause số 1: tinh bột hòa tan 20,0g, KNO_3 1,0g, K_2HPO_4 0,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, NaCl 0,5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=7,2 đến 7,4.

Môi trường Santa: KH_2PO_4 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, axit xitric 2,0g, Sắt

(III) amoni xitrat 0,05 g, glyxerol 60 mL, Asparagin 4,0g, agar 15,0g, nước cất 1,0l, pH=7,4.

(3) Các đặc tính sinh hóa và sinh lý

A. Phát hiện quá trình sử dụng nguồn cacbon bởi vi chủng WSJ-IA trong các môi trường cơ bản được lựa chọn.

Môi trường cơ bản: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, K_2HPO_4 0,5g, nước cất 1,0l. Bổ sung từ 0,1% đến 0,5% nguồn cacbon cần đo vào trong môi trường cơ bản. Sau khi tiệt trùng, cấy môi trường với dịch huyền phù vi khuẩn, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C , cấy truyền ba lứa liên tiếp. Xác định quá trình sử dụng nguồn cacbon của chủng WSJ-IA theo trạng thái của quá trình sinh trưởng tế bào.

B. Đo quá trình sử dụng axit malonic trong môi trường cơ bản: Môi trường cơ bản: dịch chiết nấm men 1,0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0g, K_2HPO_4 0,6g, KH_2PO_4 0,4g, NaCl 2,0g, natri malonat 3,0g, bromothymol xanh da trời 0,025g, nước cất 1,0l, pH=7,0 đến 7,4. Sau khi khử trùng, cấy môi trường với dịch huyền phù vi khuẩn, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 1 đến 2 ngày, quá trình sử dụng axit malonic của vi khuẩn được chỉ ra khi môi trường chuyển màu từ xanh lá cây sang xanh da trời.

C. Đo quá trình sử dụng axit tartric trong môi trường cơ bản: Môi trường cơ bản: pepton 10,0g, NaCl 5,0g, natri tartrat 10,0g, bromothymol xanh da trời (0,2%) 12,5ml, nước cất 1,0l, khử trùng môi trường trước khi sử dụng. Đồng thời, chuẩn bị dung dịch bão hòa chứa chì axetat. Cấy môi trường với dịch huyền phù vi khuẩn, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 14 ngày. Bổ sung dung dịch chì axetat đẳng trương, quá trình sử dụng axit tartric của vi khuẩn được chỉ ra khi màu của môi trường chuyển sang màu vàng xanh lá cây với lượng nhỏ chì axetat kết tủa.

D. Hóa lỏng của gelatin: Môi trường cơ bản: pepton 5,0g, gelatin 100-150g, nước cất 1,0l, pH=7,2 đến 7,4, và khử trùng. Sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong thời gian từ 18 đến 24 giờ, cấy thủng dịch huyền phù vào môi trường gelatin bằng cách đưa, cùng thời điểm này thiết lập đối chứng không được cấy. Nuôi cấy các mẫu ở nhiệt độ 20°C trong tủ ủ trong thời gian 2, 7, 10, 14 và 30 ngày, quan sát quá trình sinh trưởng tế bào và quá trình hóa lỏng gelatin ở nhiệt độ phòng thấp hơn 20°C . Nếu các kết quả

cho thấy sự sinh trưởng của vi khuẩn, và không có thụt lún của bề mặt gelatin được quan sát thấy và sự đông cục của gelatin là ổn định, thì những dấu hiệu này có nghĩa là quá trình hóa lỏng gelatin là âm tính.

E. Phản ứng sữa: đun sôi sữa tươi và cho nó vào tủ lạnh qua đêm. Lấy sữa đã tách kem ở dưới, bổ sung 4ml dung dịch nước quỳ tím 2,5% (2,5g quỳ tím được ngâm trong 100ml nước cất qua đêm, tiếp đó được lọc), vào 100ml sữa tách kem, lần lượt bổ sung hỗn hợp này vào các ống nghiệm tới độ cao khoảng 4cm. Khử trùng các ống nghiệm và cấy chủng vi khuẩn, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 1, 3, 5, 7, 14 và 30 ngày. Các kết quả chỉ ra rằng sữa đã pepton hóa thành bánh.

F. Quá trình khử nitrat: Môi trường agar dinh dưỡng 1,0l, KNO₃ 1,0g, pH=7,0 đến 7,6. Phân phối 4-5ml môi trường ở trên vào mỗi ống nghiệm, tiếp đó khử trùng. Các chất thử Griess: a) hòa tan 0,5g axit sulfanilic trong 150ml axit axetic loãng (10%); b) hòa tan 0,1g-naphtyl amin trong 20ml nước cất và 150ml dung dịch axit axetic loãng (10%). Chất thử diphenylamin: hòa tan 0,5g diphenylamin trong 100 ml dung dịch axit sulfuric đặc, pha loãng bằng 20ml nước cất. Cấy chủng vào môi trường nitrat, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 1, 3, 5 ngày, bổ sung một lượng nhỏ thể nuôi cấy 1, 3, 5 ngày vào ống nghiệm sạch, bổ sung tương ứng từng giọt chất thử a) và b), màu của dung dịch chuyển sang màu đỏ chứng tỏ quá trình khử nitrat thành nitrit; bổ sung từng giọt chất thử diphenylamin, không quan sát thấy phản ứng màu xanh da trời.

G. Thử nghiệm tyrosinaza: cấy chủng trong môi trường Gause Số 1 lỏng ở nhiệt độ 28°C lần lượt trong thời gian 7, 9, 12 ngày, lấy 2ml dịch nuôi cấy làm mẫu, ly tâm và lấy phần dịch nổi, bổ sung vào 2ml đệm phosphat (pH=5,9) và 1ml dung dịch tyrosin 0,04%, giữ ở nhiệt độ 37°C, ủ trong thời gian 5 phút, không quan sát được phản ứng đỏ.

H. Thử nghiệm amylaza: cấy chủng vào trong môi trường BPA, với 0,2% agar tinh bột hòa tan, nuôi cấy trong thời gian từ 2 đến 5 ngày ở nhiệt độ 28°C. Sau khi khuẩn lạc được hình thành rõ ràng trong các đĩa agar, nhỏ giọt dung dịch iot (iot 1,0g, KI 2,0g, 300ml nước cất) lên trên đĩa. Quá trình hình thành vòng tròn trong suốt quanh khuẩn lạc mà không có sự thay đổi về màu sắc cho thấy quá trình thủy phân

tinh bột.

Các đặc tính sinh hóa và sinh lý của chủng WSJ-IA được thể hiện trong Bảng 2.

2. Phân tích các đặc tính hệ thống phân tử của WSJ-IA

(1) Trình tự gen rADN 16S:

rADN 16S là một phần của ribosom vi khuẩn, nó là trình tự ADN trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn, mà chịu trách nhiệm mã hóa rARN. Bởi vì nó có tính bảo thủ di truyền cao, trình tự của nó thường được công nhận là một trong các đặc tính của phân loại học phân tử vi khuẩn.

Các môi rADN 16S sau được sử dụng: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (trình tự SEQ ID NO.12).

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút; ở mỗi 25 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,5 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút để thu được trình tự 1393 bp (trình tự SEQ ID NO.1), xem Bảng 1.

Bảng 2: Các đặc tính sinh hóa và sinh lý của chủng WSJ-IA

Các đặc tính	Kết quả	Các đặc tính	Kết quả	Các đặc tính	Kết quả
Sử dụng nguồn cacbon		Sử dụng nguồn cacbon (tiếp theo)		Sử dụng nguồn cacbon (tiếp theo)	
glucoza	+	trehaloza	+	natri gluconat	+
manozza	+	fructoza	-	natri malat	+
manitol	-	xyloza	-	natri suxinat	+
lactoza	-	riboza	-	natri malonat	+w
galactoza	+	synanthrin	-	natri tactrat	+
socboza	-	salixin	+		
socbierit	-	amygdalin	-		
maltoza	+	euonymol	-	các đặc tính sinh hóa	
sacaroza	-	erythritol	-	hóa lỏng gelatin	-

melibioza	-	myoinosito	-	phản ứng sữa	pepton hóa
melezitoza	-	glyxerol	+	phản ứng khử nitrat	+
ramnoza	-	tinh bột	+	tyrosinaza	-
raffinoza	-	glycogen	+	Amylaza	+
Chú thích +: dương tính; -: âm tính; +w: dương tính yếu					

Bảng 3: So sánh trình tự gen rADN 16S của WSJ-IA với vi khuẩn đã biết

STT	Chủng tương tự	Độ tương đồng%	Số seri NBRC	Số seri NCBI
1	<i>Streptomyces flavidovirens</i>	99,353	13039(T)	AB184270
2	<i>Streptomyces albidochromogenes</i>	99,353	101003(T)	AB249953
3	<i>Streptomyces helveticus</i>	99,281	13382(T)	AB184367
4	<i>Streptomyces chryseus</i>	99,281	NRRL B-12347(T)	AY999787

Ngoài ra, sáng chế đã xác định các trình tự của năm gen giữ nhà sau thường được sử dụng trong phân loại học phân tử của *Streptomyces*, *atpD* *gyrB*, *rpoB*, *recA* và *trpB* trong chủng WSJ-IA. Các gen này là gen mã hóa protein và sao chép đơn lẻ. Chúng có cấu trúc ổn định, không có khoảng trống hoặc xếp chồng giữa các gen này. Do đó, các kết quả trình tự có thể được sử dụng trực tiếp để thực hiện quá trình so sánh chủng khác loài dựa trên mức nucleotit – cũng như axit amin, để xác định thêm về tình trạng phân loại của WSJ-IA.

(2) Gen giữ nhà

A. Trình tự gen *atpD*

Gen *atpD* là tiểu phần của ATP synthaza. Nó có tính ổn định cao và thường gặp trong các loài vi sinh vật, do đó, nó thích hợp để làm chỉ thị phân tử đối với quá trình phân loại dòng mầm. Trong sáng chế các đoạn môi sau được sử dụng

5'-GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC-3' (trình tự SEQ ID NO.13)

5'-GTGAACTGCTTGGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA -3' (trình tự SEQ ID NO.14)

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn để tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút; ở mỗi 28 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 63°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,0 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ tiếp đó 72°C trong thời gian 10 phút để thu được trình tự gen 680 bp (trình tự SEQ ID NO.2), xem Bảng 2.

B. Trình tự gen *gyrB*

gyrB là tiểu phần của enzym 4 chuỗi ADN gyraza, nó thuộc về topoisomeraza ADN loại II của sinh vật nhân sơ. Nó điều hòa cấu trúc liên kết ADN bằng tác động cắt và gắn lại ADN của nó, nó có một số mối liên hệ với sự kháng của một số chủng vi khuẩn tạo ra kháng sinh, và có độ ổn định và tính phổ biến cao ở các loài vi sinh vật, do đó, nó thích hợp để đánh dấu phân tử trong quá trình phân loại phát sinh loài. Do đó, trình tự của nó thường được công nhận là một trong các đặc tính của phân loại học phân tử vi khuẩn.

Các đoạn môi sau được sử dụng trong sáng chế:

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn để tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút làm; ở mỗi 28 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,5 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút để thu được trình tự 1177 bp (trình tự SEQ ID NO.3), xem Bảng 3.

C. Trình tự gen *rpoB*

rpoB là tiểu phần b của ARN polymeraza, nó thường có mặt trong *Streptomyces*.

Các đoạn môi được sử dụng trong sáng chế:

5'- GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC-3' (trình tự SEQ ID

NO.15)

5'-CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA -3' (trình tự SEQ ID NO.16)

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn, tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút; ở mỗi 28 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,3 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút để thu được trình tự 870bp (trình tự SEQ ID NO.4), xem Bảng 4.

D. Trình tự gen recA

RecA là recombinaza, nó đóng vai trò quan trọng trong quá trình tái tổ hợp tương đồng ADN và sửa chữa ADN hư hại. Sự có mặt của RecA là yếu tố quan trọng để đảm bảo độ ổn định ADN hệ gen của chủng, do đó, trình tự của nó thường được công nhận là một trong các đặc tính của phân loại học phân tử vi khuẩn.

Các đoạn môi được sử dụng trong sáng chế:

5'- CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC -3' (trình tự SEQ ID NO.17)

5'- GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG -3'(trình tự SEQ ID NO.18)

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn, tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút; ở mỗi 28 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,0 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút để thu được trình tự 701bp (trình tự SEQ ID NO.5), xem Bảng 5.

E. Trình tự gen trpB:

Gen trpB mã hóa tryptophan synthaza mà liên quan đến quá trình chuyển hóa chính của *Streptomyces*, gen này được coi là có tính đặc hiệu loài của chủng, trình tự của nó thường được công nhận là một trong các đặc tính của phân loại học phân tử vi khuẩn.

Các đoạn mồi được sử dụng trong sáng chế:

5'- GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA -3'
(trình tự SEQ ID NO.19)

5'- TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC -3'
(trình tự SEQ ID NO.20)

Sử dụng ADN tổng của chủng vi khuẩn WSJ-IA làm khuôn, tiến hành PCR, quy trình là: làm biến tính trước ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 1 phút; ở mỗi 28 chu kỳ, làm biến tính ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 66°C trong thời gian 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1,0 phút; tiếp đó, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút thu được trình tự 611bp (trình tự SEQ ID NO.6), xem Bảng 6.

Các kết quả trong Bảng 3 và 4 chỉ ra rằng không có sự thống nhất hoàn toàn giữa rADN 16S và 5 trình tự gen giữ nhà của chủng vi khuẩn WSJ-IA, và các trình tự gen của các chủng đã biết, vì thế có thể kết luận rằng WSJ-IA có thể là loài mới của *Streptomyces*.

Bảng 4: Các so sánh giữa các trình tự gen giữ nhà của WSJ-IA với vi khuẩn đã biết

Chú thích: *S*: *Streptomyces*

Gen	Các chủng tương tự		độ tương đồng%		Số seri ngân hàng gen	
	Các nucleotit	Các axit amin	Các nucleotit	Các axit amin	Các nucleotit	Các axit amin
<i>atpD</i>	<i>S.griseus</i> <i>subsp. griseus</i> NBRC13350	<i>S.griseus</i> <i>subsp. griseus</i> NBRC13350	96	99	AP009493	YP00182367 5C13350
<i>gyrB</i>	<i>S.spiroverticilla</i> <i>tus</i>	<i>S.spiroverticilla</i> <i>atus</i>	93	94	AB014337	AB072882
<i>rpoB</i>	<i>S.avermitilis</i> MA-4680	<i>S.avermitilis</i> MA-4680	94	93	BA000030	NP_826091
<i>recA</i>	<i>S.avermitilis</i> MA-4680	<i>S.avermitilis</i> MA-4680	91	95	BA000030	NP_823668
<i>trpB</i>	<i>S.griseus</i> <i>subsp.griseus</i> NBRC13350	<i>S.flavogriseus</i> ATCC 33331	92 17	99	AP009493	ZP_05806307

Ví dụ 3: Xác định độ chuẩn lên men quy mô thí điểm của chủng vi khuẩn WSJ-IA.

Chủng WSJ-IA được nuôi cấy trong môi trường nghiêng được mô tả ở ví dụ 2 ở nhiệt độ 28°C trong thời gian từ 7 đến 10 ngày, mẫu nuôi cấy ở trên được mức để cấy vào môi trường hạt giống (bột bánh đậu xanh 1,5%, tinh bột 3,0%, NaCl 0,4%, CaCO₃ 0,5%, pepton cá 0,3%, KH₂PO₄ 0,05%), được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 48 giờ ở bước A, tiếp đó chuyển sang bước B để nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 24 giờ, tiếp đó chuyển sang thùng hạt giống 50l, nuôi cấy trong 36 giờ, và tiếp đó chuyển vào thùng lên men 2 tấn để nuôi cấy trong môi trường hạt giống (môi trường nuôi cấy: glucoza 0,5%, tinh bột 6,0%, bột men 0,5%, thịt cá 2,0%, NH₄NO₃ 0,6%, NaCl 1,0%, CaCO₃ 0,5%, KH₂PO₄ 0,05%, MgSO₄ 0,1%), quá trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ 28°C để nuôi cấy trong thời gian 96 giờ. Phần nổi của dịch lên men được lấy làm mẫu, pha loãng bằng đệm phosphat có pH=7,8 đến 8,0 chứa 3% NaCl. *Bacillus* [CGMCC(B)63501] được sử dụng làm vi khuẩn thử nghiệm để xác định độ chuẩn lên men bằng cách sử dụng phương pháp đường cong chuẩn theo Chinese Pharmacopoeia 2010 ed. II, Appendix XI trong môi trường sau: polypepton 0,6%, bột chiết thịt bò 0,15%, bột nhão chiết nấm men 0,6%, glucoza 0,2%, agar 1,5-2,0%, với axetyl spiramycin làm đối chứng. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần để có được độ chuẩn lên men WSJ-IA trung bình là 1160µg/ml, so sánh với quá trình lên men bằng chủng WSJ-2 chứa gen đơn ist cho độ chuẩn trung bình là 280µg/ml (Bảng 5).

Ví dụ 4: Xác định hiệu suất sản phẩm của thành phần isovaleryl spiramycin I lên men bằng chủng WSJ-IA.

Dịch lên men có được ở ví dụ 3 được lấy làm mẫu, pH của dịch lên men được điều chỉnh đến 8,5, dịch này được chiết bằng thể tích tương đương của etyl axetat, và dịch chiết etyl axetat được cô đến khô, được hòa tan trong metanol. Dung dịch được tách bằng cách sử dụng cột Kromasil C18 (4,5 mm×150mm, 5µm); pha động: metanol: dung dịch natri dihydro phosphat (53:47 thể tích/thể tích); bước sóng phát hiện: 231nm; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; nhiệt độ cột 25°C; kích cỡ mẫu: 10-20µl.

Hàm lượng của thành phần isovaleryl spiramycin I trong dịch lên men được tính bằng cách sử dụng các kết quả HPLC (Fig. 3). Các kết quả từ 3 thử nghiệm chỉ ra rằng, việc lên men bằng chủng WSJ-IA và chủng WSJ-2 chứa monogen ist, hàm lượng trung bình tổng của thành phần isovaleryl spiramycin I lần lượt là 12,061% và 7,088%. Sau khi lên men theo ví dụ 3, độ chuẩn lên men của hai chủng được đo bằng phân tích vi sinh, và sản phẩm được phân tích bằng cách sử dụng HPLC (Fig. 3). Theo các diện tích đỉnh HPLC thu được, thành phần isovaleryl spiramycin I được tạo ra bằng hai chủng này được so sánh, tỷ lệ của isovaleryl spiramycin I so với spiramycin được tạo ra từ hai chủng này, lần lượt được tính. Các kết quả chỉ ra rằng việc đưa gen ist-acyB2 đã làm gia tăng độ chuẩn lên men của WSJ-IA lên 414%, hàm lượng của isovaleryl spiramycin I tạo ra được gia tăng lên 170,2%, trong khi đó, sự tạo ra spiramycin giảm tương ứng. Điều này làm gia tăng tỷ lệ giữa hàm lượng isovaleryl spiramycin I và hàm lượng spiramycin lên 218% (Bảng 5).

Sáng chế đề xuất chủng có thể tạo ra isovaleryl spiramycin I chứa gen ist-acyB2, trong điều kiện lên men nhất định. Chủng này làm gia tăng quá trình tạo ra isovaleryl spiramycin I với hệ số 1,7, và làm gia tăng độ chuẩn lên men với hệ số 4,14 khi so sánh với chủng chỉ chứa gen ist.

Bảng 5: So sánh độ chuẩn lên men bằng cách sử dụng các chủng WSJ-IA và WSJ-2 và hàm lượng thành phần.

Chủng	độ chuẩn lên men ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích đỉnh Spiramycin (%)	Diện tích đỉnh Isovaleryl spiramycin I (%)	Isovaleryl spiramycin I / spiramycin (%)
WSJ-2	1. 260	1.61,146	1. 6,980	1. 11,42
	2. 280	2. 63,756	2. 7,150	2. 11,21
	3. 300	3. 62,223	3. 7,134	3. 11,47
	trung bình 280	trung bình 62,375	trung bình 7,088	trung bình 11,36
WSJ-IA	1. 1040	1. 47,825	1. 10,956	1. 22,91
	2. 1250	2. 48,982	2. 13,013	2. 26,57
	3. 1190	3. 49,527	3. 12,214	3. 24,66
	trung bình 1160	trung bình 48,778	trung bình 12,061	trung bình 24,72

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Streptomyces* được thiết kế gen WSJ-IA và được lưu giữ với số hiệu lưu giữ CGMCC 3942.
2. Phương pháp sản xuất isovaleryl spiramycin I, phương pháp này bao gồm bước thu hồi isovaleryl spiramycin I từ dịch lên men được tạo ra bằng cách nuôi cấy chủng *Streptomyces* được thiết kế gen theo điểm 1 trong môi trường nuôi cấy.

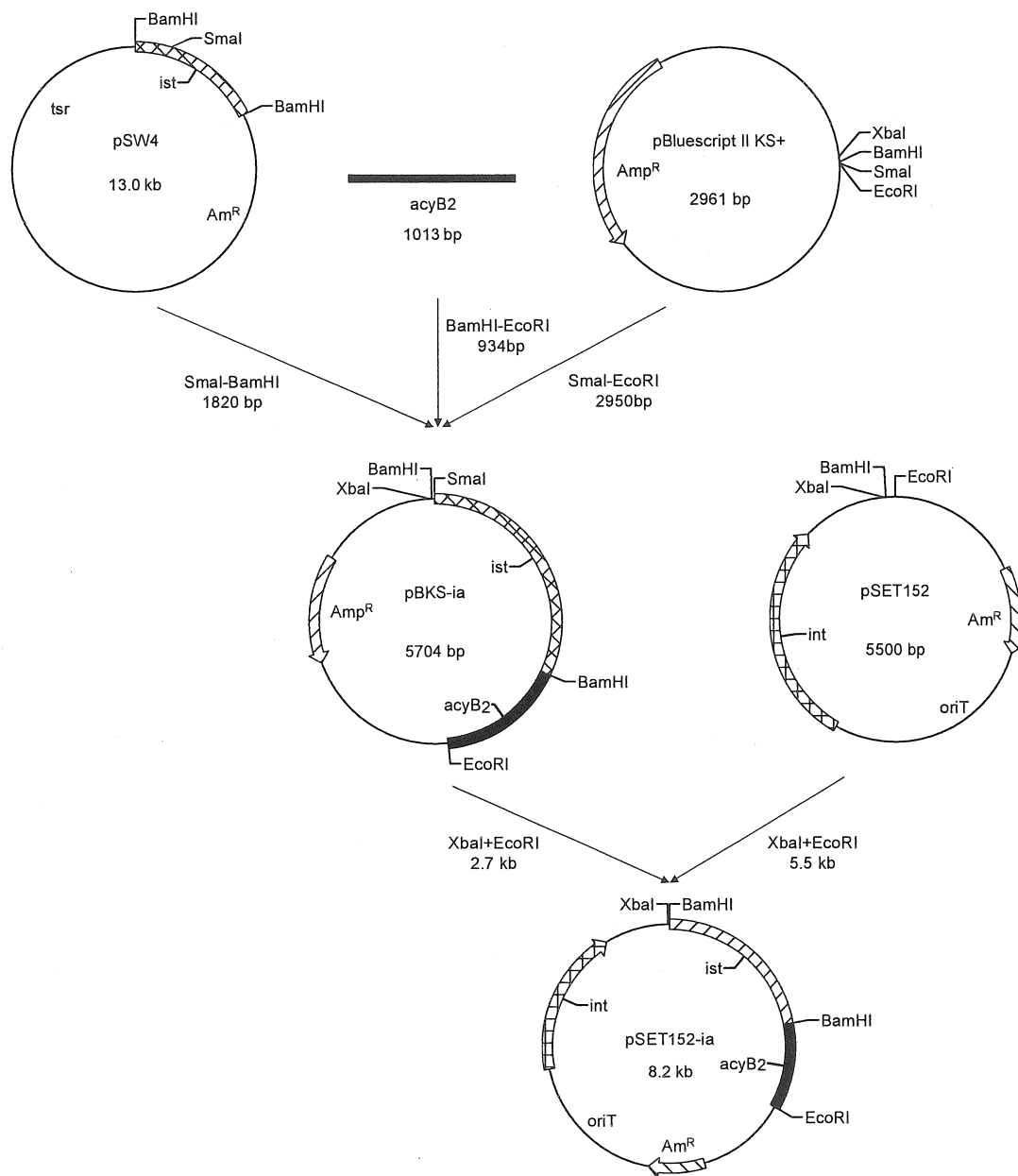


Fig. 1

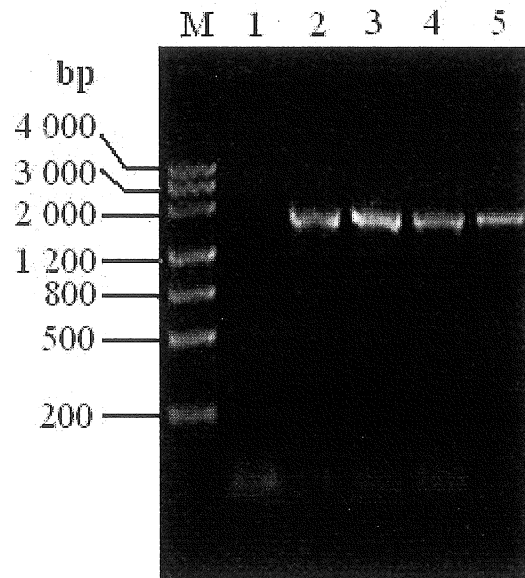


Fig. 2

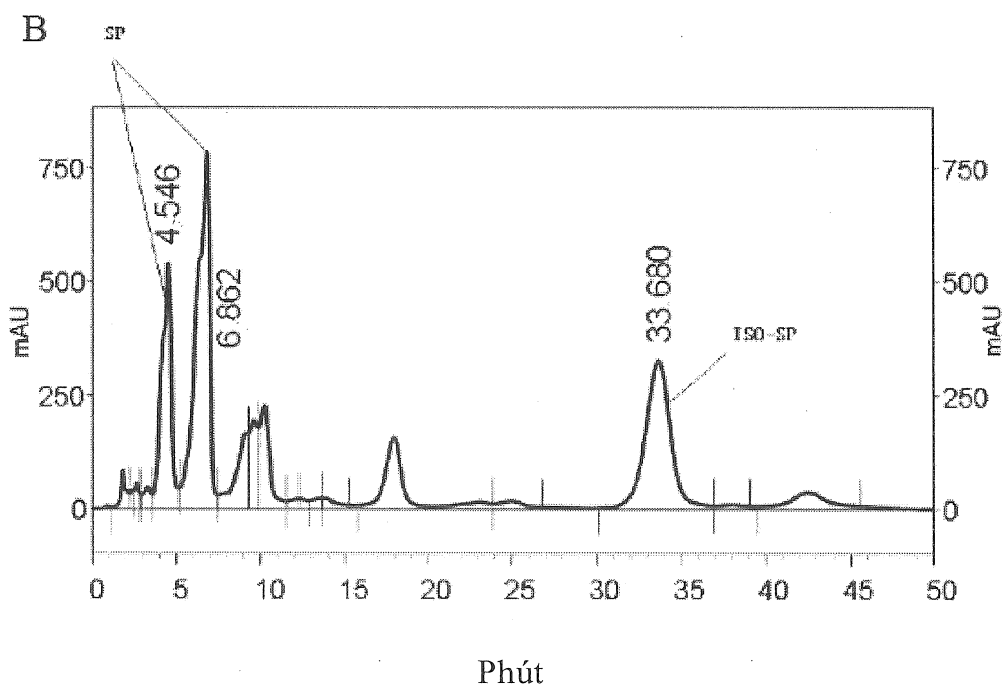
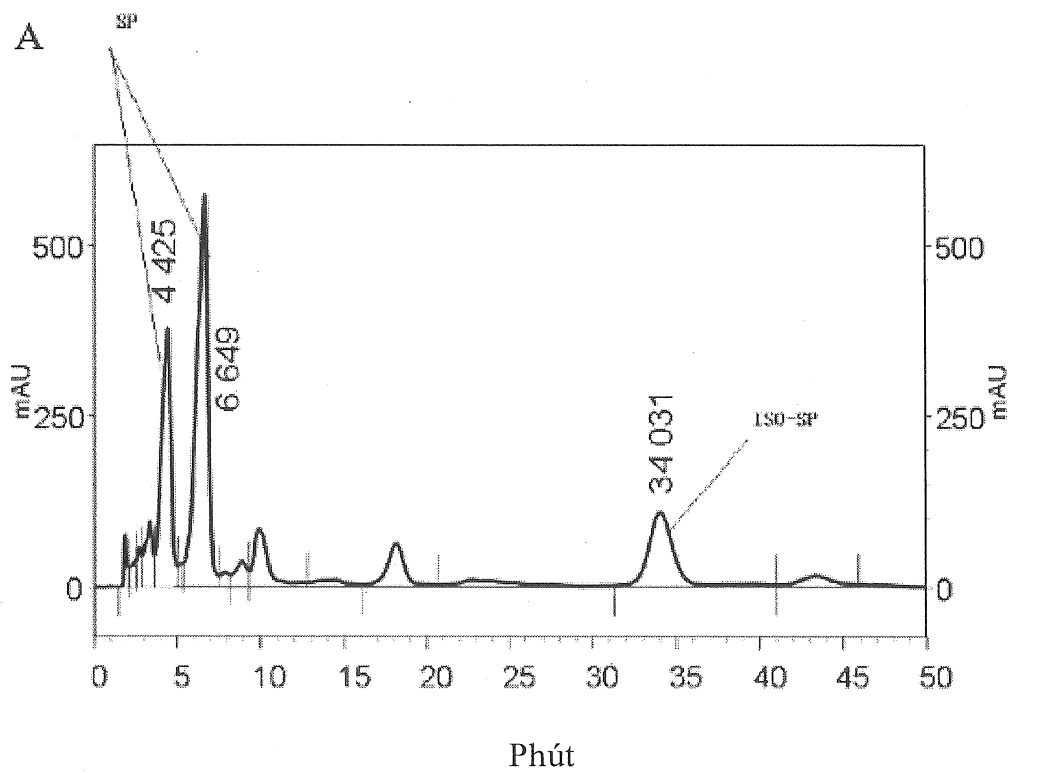


Fig. 3