



(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)



2-0003014

(51) **C12N 1/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00434

(22) 13/11/2020

(67) 1-2020-06612

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/05/2022 410

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Lã Thị Huyền (VN); Nguyễn Thị Đà (VN); Nguyễn Trọng Linh (VN); Nguyễn Thị
Thư (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP ĐỂ SẢN XUẤT POLYHYDROALKANOAT (PHA) TỪ
CHŨNG *BACILLUS MEGATERIUM* PPSPHAC5/L TÁI TỔ HỢP MANG GEN PHAC
MÃ HOÁ PROTEIN PHAC CỦA PHA SYNTHAZA

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tái tổ hợp để sản xuất polyhydroalkanoat (PHA) từ
chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hóa protein phaC
của PHA synthaza. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus*
megaterium pPSPHAC5/ tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hóa protein phaC của PHA
synthaza tăng cường sinh tổng hợp polyhydroalkanoat, trong đó trình tự nucleotit của đoạn
gen *phaC* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 1092bp mã hóa 362 axit amin
của protein PhaC có trọng lượng khoảng 40kDa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi sinh vật tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hóa cho protein PhaC của PHA synthaza tăng cường khả năng tổng hợp polyhydroxyalkanoat (PHA) của chủng gốc *Bacillus megaterium* DV01 phân lập tại Việt Nam. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tái tổ hợp để sản xuất PHA từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

PHA là một trong những loại nhựa sinh học được nghiên cứu nhiều nhất dự kiến sẽ thay thế một số loại nhựa hóa học ngày nay, do tính chất phân hủy sinh học, nhựa nhiệt dẻo và cơ học của chúng như tính linh hoạt, tính đàn hồi, ... (Lee et al., 2008; Nielsen et al., 2017). Đây là một họ các biopolyester được tích lũy nội bào trong các vi sinh vật khác nhau vì vậy nó cũng rất đa dạng về mặt cấu trúc (Steinbu et al., 1995; Desmet et al., 1983; Gao et al., 2011), có tính chất cơ học tương tự như nhựa dựa trên hóa dầu, với lợi thế bổ sung là hoàn toàn phân hủy sinh học (Mumtaz, 2010). Các polyesters ái tạo này có thể được sản xuất bởi các vi sinh vật khác nhau để đáp ứng với các điều kiện nuôi cấy khác nhau như: dư thừa cacbon, hoặc hạn chế nitơ, lưu huỳnh, phosphat hoặc oxy... nhằm cung cấp năng lượng dự trữ bảo vệ tế bào khỏi tình trạng đói dinh dưỡng và điều kiện khắc nghiệt (Prieto et al., 2016). Một số vi khuẩn Gram âm và Gram dương (khoảng hơn 55 chi) đã được sử dụng để sản xuất PHA (Doi, 1990; Ng and Sudesh, 2016).

Các loài có khả năng sản xuất và tích lũy PHA có thể được tìm thấy trong môi trường đa dạng, từ các trầm tích biển (với các chi: *Vibrio*, *Beneckea*, và *Paracoccus* (López-Cortés et al. 2010)), với môi trường đất (như *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus* spp., *Cupriavidus necator*, và *Pseudomonas* spp.) hoặc thậm chí có thể được tìm thấy có mặt ở một số loài có điều kiện nuôi cấy cực đoan như các loài *Haloferax*, *Halococcus*, *Halobacterium*, *Halorubrum*, và *Haloarcula* (Legat et al., 2010; Poli et al., 2011; Kumar et al., 2013).

Hiện nay, có một số vi khuẩn Gram âm và Gram dương (khoảng hơn 55 chi) đã được sử dụng để nghiên cứu và sản xuất PHA (Doi, 1990; Ng and Sudesh, 2016). Trong

số các loại vi khuẩn sản xuất PHA khác nhau, *Cupriavidus necator* (trước đây có tên là *Wautingia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* hoặc *Hydrogenomonas eutropha*) đã thu hút được sự chú ý nhiều nhất nhờ khả năng phát triển trên các nguồn cacbon khác nhau (Bhubalan et al., 2010; Devi-Nair et al., 2013).

Vi khuẩn Gram âm trước đây được biết đến khả năng tích lũy cao PHA và được ứng dụng để sản xuất thương mại tuy nhiên do chúng có chứa lớp lipopolysaccharit (LPS) trong vách tế bào nên sẽ lẫn trong quá trình tinh sạch PHA đồng thời chúng có các đặc tính kháng nguyên (do sự hiện diện của nội độc tố) dẫn đến phản ứng miễn dịch cơ thể (Liu et al., 2014; Liu et al., 2014). Ngược lại, vi khuẩn Gram dương không có lớp LPS này và do đó có thể được sử dụng cho việc sản xuất các polyme sinh học đặc biệt cho các ứng dụng y sinh. Trong số vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương, *Bacillus* spp. được quan tâm chú ý nhằm sử dụng sản xuất PHA thương mại ứng dụng trong mục đích y tế (Kumar et al., 2013). Bên cạnh tính an toàn, *Bacillus* là ứng cử viên thích hợp bởi chúng có điều kiện lên men không quá nghiêm ngặt, khả năng tổng hợp cũng như hiệu quả thu hồi PHA là cao và chi này cho thấy có sự đa dạng về cấu trúc cũng như khả năng tổng hợp PHA của các loài trong cùng chi không giống nhau.

Trong số các nguồn đường dùng cho lên men thì glucoza là cơ chất thích hợp nhất cho tổng hợp PHB (một loại PHA) của *B. megaterium* (López et al., 2012; Naranjo et al. 2013) sau đó đến fructoza cho một số loài thuộc chi *Bacillus* spp. khác (Thirumala et al. 2010; López et al., 2012). Narayanan và Ramana đã nghiên cứu ảnh hưởng của glucoza và pepton về sản xuất PHB và quá trình hình thành bào tử của *Bacillus mycoides*. Nhằm đánh giá ảnh hưởng của sự hình thành bào tử đối với sản xuất PHB tối đa và cho thấy chúng có ảnh hưởng không đáng kể (Naranjo et al., 2013; Narayanan and Ramana. 2012; Thirumala et al., 2010). Một số vi sinh vật có thể tích lũy nhiều hơn một loại polyme, điều kiện môi trường nuôi cấy và cơ chế sinh tổng hợp ảnh hưởng lên hàm lượng polyme tích lũy còn nguồn cơ chất C xác định loại polyme được tổng hợp (Dawes & Senior., 1973).

Polyhydroxyalkanoat (PHA) là polyeste được tổng hợp bởi một số vi sinh vật làm nguồn năng lượng dự trữ nhằm bảo vệ chúng có thể sống sót trong điều kiện bất lợi. Sự tích tụ PHA xảy ra chủ yếu trong điều kiện dư thừa cacbon và hạn chế chất dinh dưỡng khác (Anderson và Dawes 1990; Peña et al 2011, 2014.). Các polyme này không tan trong nước và chúng được lưu trữ trong tế bào chất dưới dạng các hạt (Legat et al. 2010).

Thành phần monome của PHA phụ thuộc chủ yếu vào các vi khuẩn và loại cacbon sử dụng cho sự tăng trưởng. PHA ngoài vai trò chức năng là nguồn dự trữ năng lượng, sự hiện diện của PHA trong tế bào chất đóng vai trò tăng sức đề kháng của vi sinh vật dưới các điều kiện sốc nuôi cấy như thay đổi pH, nhiệt độ và áp suất thẩm thấu, và khi vi sinh vật tiếp xúc với hóa chất độc hại. Các tính chất như khả năng bền nhiệt, khả năng phân hủy sinh học, và khả năng tương thích sinh học của PHA đã làm cho chúng trở thành đối tượng thu hút rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt trong lĩnh vực ứng dụng y sinh (Hazer et al 2012; Peña et al 2014; Leong et al. 2014). Với các đặc tính như khả năng phân hủy sinh học, tính tương thích sinh học cao đã đưa PHA trở thành nguồn nguyên liệu vô cùng giá trị, thân thiện môi trường đối với các ngành công nghiệp bao gói, dược, nông nghiệp, và công nghiệp thực phẩm (Zhang et al., 2019).

Poly-(R)-3-hydroxybutyrat (PHB) là một loại polyme thuộc nhóm PHA đầu tiên phát hiện và đã được nghiên cứu. Cho đến nay có hơn 155 loại monome đã được xác định là các thành phần của PHA (Nielsen et al., 2017). Chúng có thể được phân loại theo số lượng cacbon (C2 – C20), vị trí của hydroxyl nhóm [2, 3, 4, 5 và axit 6-hydroxycarboxylic (HA)], và các nhóm chức năng trong chuỗi bên, chẳng hạn như phenoxy, phenyl, benzyl, xyclohexyl, epoxy, thio, flo, brom, xyano, và các nhóm axetoxi. Thông thường, dựa vào cấu trúc hóa học của các monome có thể chia thành ba nhóm PHA đó là các PHA có chiều dài mạch ngắn (Short chain-length: SCL-PHA), với các monome bao gồm từ 3-5 nguyên tử cacbon, PHA có chiều dài mạch trung bình (medium chain-length: MCL-PHA) gồm các monome bao gồm 6-15 nguyên tử cacbon, và dạng thứ 3 là các PHA có chiều dài mạch dài (long-chain-length: LCL-PHA) với các monome có cấu trúc dài với trên 15 nguyên tử cacbon (Peña et al. 2014; Leong et al 2014; Choi et al., 2019). Dựa trên các thành phần của monome và trật tự sắp xếp của chúng, PHA có thể được phân thành: homopolyme bao gồm một monome lặp đi lặp lại; copolyme ngẫu nhiên của hai hay nhiều monome khác nhau như copolyme SCL, copolyme MCL, và SCL-MCL-PHA copolyme hoặc block copolyme: được hình thành từ ít nhất hai homopolyme khác nhau liên kết cộng hóa trị. Đại diện cho các loại này ở bao gồm PHB, poly (3-hydroxybutyrat-co-4-hydroxybutyrat) (P3HB4HB), poly (3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV), và poly (3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat) (PHBHHx), đã được tổng hợp ở cả chủng tự nhiên lẫn chủng tái tổ hợp. Việc cấu tạo thành phần như loại PHA cũng như tỷ lệ của các monome cũng gây

ảnh hưởng đến tính chất của PHA (Leong et al 2014) khi polyme đồng nhất của SCL-PHA như poly-3 P3HB hydroxybutyrat là vật liệu giòn và cứng, trong khi copolyme của MCL-PHA đã được cải thiện tính đàn hồi (Reddy et al. 2003).

Để có thể sản xuất PHA ở quy mô công nghiệp, các chủng sản xuất cần phải được cải tiến để nhằm giúp đạt mật độ tế bào cao trong thời gian nuôi cấy ngắn và tích lũy PHA với hàm lượng cao từ các cơ chất rẻ tiền, đơn giản. Có nhiều phương pháp được sử dụng trong đó bao gồm tạo chủng tái tổ hợp nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng sản xuất là bằng cách chuyển các gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình trao đổi chất nhằm tăng cường tác động đến quá trình sinh tổng hợp PHA của vi khuẩn.

Trong số các protein liên quan đến PHA, PHA synthaza là enzym chủ chốt chịu trách nhiệm về quá trình polymer hóa, ảnh hưởng đến thành phần monome, trọng lượng phân tử, và năng suất của PHA (Sim et al., 1997). Vì vậy, rất nhiều nghiên cứu đã tập trung tìm hiểu cơ chế trùng hợp và phát triển PHA synthaza. Như được đề cập ở trên, một trong những đặc điểm quan trọng của PHA synthaza là cho phép việc sử dụng một phổ rộng các cơ chất làm nguồn C thích hợp cho việc tổng hợp PHA. PHA synthaza có thể được phân loại thành bốn nhóm khác nhau dựa theo cấu hình tiểu đơn vị enzym và chiều dài bề mặt cacbon (Choi et al., 2019).

Nhóm I PHA synthaza bao gồm 1 tiểu đơn vị (PhaC) có khối lượng phân tử 60 – 65 kDa và xúc tác hình thành các polyme đồng hình và nhóm này có mặt trong *C. necator* and *Aeromonas* spp., (như: *A. caviae*, *A. hydrophila*, và *A. punctata*). Nhóm I chủ yếu xúc tác hình thành các scl – monome (C3-C5) và số ít mcl – monome (C6 – C16) (Yuan et al., 2001; Stubbe et al., 2003). PHA synthaza nhóm II chỉ bao gồm chỉ duy nhất protein PhaC có kích thước khoảng 60kDa được mã hóa bởi gen *phaC1* và *phaC2* và xúc tác hình thành homopolyme (Mezzolla et al., 2018; Qi et al., 2000). PhaC nhóm II có mặt trong các loài thuộc *Pseudomonas* như *P. putida* và *P. aeruginosa* (Mezzolla et al., 2018; Rehm et al., 2001)

Nhóm III PHA synthaza bao gồm hai dưới đơn vị khác nhau là PhaC (≈ 40 kDa) và PhaE (20 ÷ 40 kDa) được tìm thấy có mặt trong *Allochromatium vinosum* và *Desulfococcus multivorans* (Hai et al., 2004; Liebergesell et al., 2000). Nhóm III PHA synthaza sinh tổng hợp các scl – PHA và quá trình tổng hợp cần sự có mặt của cả PhaC và PhaE. PhaC của nhóm III có sự tương đồng 21 – 28% về trình tự với PhaC của PHA

synthaza nhóm I và nhóm II vì vậy nó được xem là dưới đơn vị xúc tác. Mặt khác, PhaE hiện nay vẫn chưa được biết rõ về chức năng cụ thể.

Nhóm IV PHA synthaza được biết bao gồm 2 dưới đơn vị PhaC (≈ 40 kDa) và PhaR (≈ 20 kDa) và để có thể hoạt động tổng hợp PHA thì nhóm này cần có sự có mặt của cả hai protein này (Tsuge et al., 2015; McCool and Cannon, 2001). Nhóm IV có thể tổng hợp chủ yếu là scl – PHA trên một phổ rộng cơ chất giống như nhóm I và nhóm III và hầu hết các loài thuộc chi *Bacillus* như *B. megaterium* và *B. cereus* thuộc nhóm này (Tsuge et al., 2015; McCool et al., 2001). Một số PHA có thể có khả năng lên men một phổ rộng cơ chất và từ đó có thể tổng hợp đồng thời cả scl và mcl – PHA như *Thiocapsa pfennigii*, *A. caviae*, *Pseudomonas* sp. 61-3, and *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 (Liebergesell et al., 1993; Fukui et al., 1997; Matsusaki et al., 1998).

Fukui và Cs (2002) đã tiến hành đưa gen mã hóa crotonyl-coenzym A (CoA) reductaza từ *Streptomyces cinnamonensis*, PHA synthaza và enoyl-CoA hydrataza đặc hiệu (R) từ *Aeromonas caviae* vào chủng đại *R. eutropha* có khả năng sinh tổng hợp PHA. Kết quả cho thấy chủng được cải biến di truyền mới tạo ra có khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-3HHx) với thành phần 3HHx là 1,5 mol % trên nguồn fructoza (T. Fukui et al, 2002).

Loo và Cs (2005) đã tạo dòng đột biến gắn gen PHA synthaza từ *Aeromonas caviae* vào *Wautersia eutropha* có khả năng tích lũy P(3HB-co-3HHx) tới 87% với hàm lượng 3HHx đạt 5 mol% khi sử dụng nguồn dầu cọ.

PHA synthaza của chủng *Bacillus megaterium* DV01 thuộc nhóm IV. Vì vậy việc lựa chọn can thiệp tăng cường biểu hiện gen *phaC* nhằm tăng cường hoạt động PHA synthaza của chủng này

Hiện nay ở Việt Nam có rất ít công trình nghiên cứu về polyhydroxyalkanoat (PHA) được công bố. Năm 2010, Thanh Mai và cs đã phân lập được chủng vi khuẩn V23-X1.1 và định danh đến loài *Bacillus cereus*. Chủng vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1-20 được nhóm nghiên cứu Viện Công nghệ sinh học sử dụng trong nghiên cứu sản xuất P(3HB) vào năm 2009. Gần đây, nhóm nghiên cứu của TS. Trần Hữu Phong, TS. Đoàn Văn Thước cũng nghiên cứu về PHA và các vi sinh vật sinh tổng hợp PHA tuy nhiên chưa có công bố về chủng tái tổ hợp nâng cao khả năng sinh tổng hợp PHA.

Để cải thiện năng suất sản xuất PHB, hoạt tính enzym tham gia trong con đường sinh tổng hợp PHB được gia tăng một cách đáng kể bằng cách khuếch đại gen *phaC*

trong con đường sinh tổng hợp PHB của chủng *Bacillus megaterium* DV01 và đưa vào vector tái tổ hợp sau đó lại biến nạp trở lại chủng gốc nhằm biểu hiện gen này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 chứa vector tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hóa protein phaC của PHA synthaza tăng cường sinh tổng hợp PHA giải quyết các hạn chế nêu ra ở trên.

Mục đích của sáng chế đề cập đến phân lập gen tham gia quá trình sinh tổng hợp PHA là gen *phaC* mã hóa cho PHA synthaza của chủng tự nhiên *Bacillus megaterium* DV01 sau đó đưa gen này biến nạp trở lại vào chủng này bằng vector tái tổ hợp nhằm tăng cường khả năng tổng hợp polyhydroxyalkanoat.

Cụ thể, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 mang vector tái tổ hợp chứa gen *phaC* mã hóa protein phaC của PHA synthaza tăng cường sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoat chủng chủ, trong đó trình tự nucleotit của đoạn gen *phaC* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 1092bp mã hóa 362 axit amin của protein PhaC có trọng lượng khoảng 40 kDa.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1: là hình ảnh mô tả điện di protein ảnh hưởng của nồng độ xyloza khác nhau của chủng tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 lên khả năng biểu hiện PhaC. Cột 2, 3, 4, 5, 6, 7 mẫu điện di protein chủng tái tổ hợp được nuôi trên môi trường có bổ sung xyloza hàm lượng 1,5; 5; 15; 30; 50 và 70 mg/ml. Cột 1 là thang protein chuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 mang gen *phaC* mã hóa protein phaC của PHA synthaza tăng cường sinh tổng hợp polyhydroxyalkanonat (PHA), trong đó trình tự nucleotit của đoạn gen *phaC* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 1092bp mã hóa 362 axit amin của protein PhaC có trọng lượng khoảng 40 kDa.

Đặc điểm thứ nhất của chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hóa protein phaC của PHA synthaza là có thể tăng cường sinh tổng hợp polyhydroxybutyrat (hay còn gọi là PHB) là một loại polyme thuộc nhóm PHA.

Gen *phaC* mã hóa cho protein PhaC của PHA synthaza tham gia trong quá trình sinh tổng hợp PHA có thể được đưa vào vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 bằng cách sử dụng phương pháp thông thường đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vectơ tái tổ hợp biểu hiện protein PhaC tạo thành bằng cách đưa gen *phaC* mã hóa cho protein PhaC vào vectơ pPSP6; và đưa vectơ tái tổ hợp này vào vi khuẩn *Bacillus megaterium* để tạo ra chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1. Vectơ tái tổ hợp biểu hiện protein xúc tác quá trình sinh tổng hợp polyhydroxyalkanonat có thể được tạo ra bằng phương pháp thông thường, ví dụ, gắn trình tự của gen *phaC* vào vectơ thích hợp bằng cách sử dụng enzym giới hạn.

Chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* theo giải pháp hữu ích bao gồm chủng tái tổ hợp tăng năng suất sản xuất polyhydroxyalkanonat và chủng gốc. Ví dụ về các chủng này bao gồm chủng tái tổ hợp tăng cường biểu hiện gen *phaC* chủng tự nhiên *Bacillus megaterium* có khả năng sinh tổng hợp polyhydroxyalkanonat phân lập ở Việt Nam.

Để thu PHA, chủng tái tổ hợp và chủng tự nhiên đề cập trong giải pháp hữu ích có thể được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy hai pha và lên men theo pháp nuôi cấy mẻ như môi trường nuôi cấy mẻ, môi trường nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng.

Môi trường nuôi cấy cần dùng phải đáp ứng yêu cầu của các chủng cụ thể theo cách thích hợp. Nguồn cacbon hữu ích có thể bao gồm hydrat cacbon như glucoza, sacaroza, tinh bột và chất béo như dầu đậu tương, mỡ cá. Các hợp chất này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng hỗn hợp. Nguồn nitơ hữu ích có thể bao gồm các hợp chất chứa nitơ hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết thịt, dịch ủ phế phụ phẩm thủy sản, hoặc các hợp chất vô cơ như amoni sunphat. Nguồn nitơ có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng hỗn hợp. Nguồn phospho hữu ích để nuôi cấy được sử dụng trong giải pháp hữu ích có thể bao gồm kali dihydro phosphat hoặc đinatri hydro phosphat hoặc các muối chứa natri và kali tương ứng. Môi trường nuôi cấy cũng phải chứa muối kim loại như magie sulfat và một số các thành phần vi lượng khác như canxi clorua, kẽm sunphat, mangan clorua, axit boric, coban clorua, đồng clorua niken clorua và natri molipdat cũng có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Các hợp chất nêu trên có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy liên tục hoặc nuôi cấy mẻ theo cách thích hợp trong quá trình nuôi cấy.

Để kiểm soát trị số pH của môi trường nuôi cấy, các hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit hoặc hợp chất axit như axit cloric hoặc axit sulfuric, được ưu tiên

sử dụng. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 45°C, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 28°C đến 40°C. Môi trường nuôi cấy được tiếp tục duy trì cho đến khi đạt tới lượng polyhydroxyalkanonat tối đa mong muốn tạo thành. Thời gian cần thiết để đạt tới lượng tối đa này thường nằm trong khoảng từ 10 giờ đến 168 giờ.

Điểm khác biệt của chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp trong giải pháp hữu ích là được tạo thành từ chủng gốc tự nhiên được phân lập tại Việt Nam bằng cách biến nạp thêm vectơ tái tổ hợp pPSP6 có mang trình tự đoạn gen *phaC* mã hóa cho PHA synthaza tham gia trong quá trình tổng hợp PHA của chủng chủ *Bacillus megaterium*. Ở Việt Nam, chưa có một công bố nào về gen *phaC* có khả năng tăng cường sinh tổng hợp và tích lũy PHA tính đến nay. Đoạn gen có kích thước 1092 bp mã hóa cho một trình tự 362 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử khoảng 40 kDa. Khi biến nạp vào vật chủ thì protein này thể hiện rõ vai trò khi làm tăng hàm lượng PHA đạt được lên 2 – 7 mg/ml dịch nuôi cấy. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 bản địa trong sản xuất PHA.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tái tổ hợp để sản xuất polyhydroalkanoat (PHA) từ chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hoá protein phaC của PHA synthaza bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 trong bằng cách hoạt hoá trên môi trường Luria Bertani (LB) lỏng sau đó chuyển ra các ống thạch nghiêng chứa môi trường khoáng 1 gồm các thành phần (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02); $\text{NH}_4\text{Fe(III)xitrat}$ (0,05); cao nấm men (5); pepton (5) glucoza (10);
- b) phân lập và tách dòng gen *phaC* vào vectơ pJET1.2/blunt để tạo thành plasmit tái tổ hợp tách dòng tái tổ hợp bằng cách:

tách ADN nhiễm sắc thể từ chủng *Bacillus megaterium* DV01 thu được ở bước

- a), sau đó khuếch đại đoạn mang gen *phaC* bằng PCR sử dụng cặp mồi For1-PhaC/Rev1-PhaC (5'-ATGGCAATTCCTTACGTGCAAGA-3' và 5'-TTATTAGAGCGTTTTTC-3');

gắn đoạn mang gen *phaC* vào vector tách dòng pJET1.2/blunt để tạo thành plasmid tái tổ hợp pJET1.2-*phaC* sau đó biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α ; sau đó kiểm tra và xác định trình tự của đoạn gen *phaC* thu được;

c) tạo vector biểu hiện tái tổ hợp pPSPHAC chứa gen *phaC* bằng cách:

khuếch đại đoạn gen *phaC* thu được ở bước b) bằng cách sử dụng cặp mồi được thiết kế bổ sung vị trí cắt của enzym cắt giới hạn SphI và SpeI, có trình tự là For2/PhaC-SpeI: GGTGTGTACTAGTATGGCAATTCCTTACG và Rev2/PhaC-SphI: CGCTTCGCATGCTTATTTAGAGCGTTTT;

cắt gen *phaC* và vector pPSP6 bằng enzym cắt giới hạn SphI và SpeI sau đó gắn gen *phaC* vào vector pPSP6 để tạo thành cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp pPSPHAC chứa gen *phaC* có trình tự được nêu trong SEQ ID NO.1 với kích thước 1092 bp mã hoá cho protein *phaC* gồm 362 axit amin với trọng lượng khoảng 40kDa;

d) biến nạp vector biểu hiện pPSPHAC chứa gen *phaC* ở bước c) vào tế bào vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 để tạo thành chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp bằng phương pháp tế bào trần;

e) nuôi cấy sinh khối tế bào và thu nhận polyhydroalkanoat (PHA) từ chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp thu được ở bước d) bằng cách:

chủng nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB sau đó hút bổ sung 5% (v/v) bổ sung vào môi trường khoáng, nuôi lắc ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 72 – 120 giờ;

thu sinh khối tế bào bằng ly tâm và rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphat, pH 7,2; sau đó được hòa lại trong đệm này và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng ở mức công suất 140W, quay và dừng sau mỗi 10 giây trong 15 phút;

tiếp tục bổ sung dung dịch etanol/axeton tỷ lệ 1:1 và ngâm ủ khoảng 2h và chuyển dịch tế bào sang ống thủy tinh có nút xoáy và bổ sung cloroform, xoáy chặt nắp và tiến hành lắc 3 - 4h để PHA được hòa tan hoàn toàn;

sau đó thu pha chứa cloroform chuyển ra ống thủy tinh mới, dịch cloroform chứa polyhydroalkanoat (PHA) được bổ sung metanol lạnh với lượng 5-8 lần thể tích và để trong tủ -20°C trong ít nhất 30 phút sau đó ly tâm thu cặn PHA;

tiếp tục bổ sung etanol 70% và ly tâm lặp lại 2 lần để loại dung môi và thu cặn PHA sau đó sấy khô ở 50°C để thu được polyhydroalkanoat (PHA).

Chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 nêu trong giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào động vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở các điều kiện khác nhau như: trong điều kiện lạnh sâu -80°C, -20°C và đông khô.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1

Hoạt hóa chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01.

Chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 bảo quản trong glyceryl ở tủ -20°C được hoạt hóa trên môi trường LB sau đó cấy chuyển ra các ống thạch nghiêng chứa môi trường khoáng 1, nuôi ở 37°C trong 24 giờ sau đó thu chủng và bảo quản ở 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Môi trường cơ bản cho nuôi cấy các chủng vi sinh vật là môi trường Luria Bertani (môi trường LB lỏng, g/l): Pepton: 10; Cao men: 5; NaCl: 5; độ pH=7-7.2, môi trường LB đặc: LB lỏng có bổ sung thạch hàm lượng 15 g/l (Sambrook & Russell, 2001).

Chủng DV01 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất và lưu trữ trong bộ sưu tập giống phòng công nghệ tế bào động vật được hoạt hóa trên môi trường LB lỏng. Hút 50 µl dịch chủng bảo quản ở -20°C bổ sung vào 5ml môi trường LB sau đó nuôi ở điều kiện 30 - 37°C, lắc 100-150 vòng/ phút trong thời gian 24 đến 48 giờ.

Ví dụ 2

Quan sát khả năng tích lũy polyhydroxyalkanoat (PHA)

Chủng được nuôi theo ví dụ 1 sau đó chủng được xác định khả năng sinh tổng hợp, tích lũy PHA bằng cách nuôi chuyển sang môi trường khoáng nghèo dinh dưỡng N, P có bổ sung Nile Blue A hàm lượng 5-15µg/ml. Chủng được nuôi từ 48 đến 120 giờ và sau đó được chụp kính hiển vi huỳnh quang. Quan sát phát hiện các tế bào phát quang màu cam đỏ là các chủng có khả năng tích lũy polyhydroxybutyrat (PHB).

Ví dụ 3

Môi trường và điều kiện nuôi cấy chủng thu polyhydroxyalkanoat.

Chủng nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB sau đó hút bổ sung 5% (v/v) bổ sung vào môi trường khoáng 1, nuôi lắc trong 12 - 24h sau đó ly tâm thu chủng và bổ sung sinh khối vào môi trường khoáng 1 và tiếp tục nuôi cấy qua đêm sau đó chuyển sang

môi trường khoáng 2 và nuôi để thu PHA. Nuôi cấy lắc thu PHA được thực hiện trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường khoáng 2, nuôi cấy ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian lắc tối đa cho các nghiên cứu là 72 – 120 giờ. Các môi trường để nuôi cấy bao gồm:

Khoáng 1: Môi trường nuôi cấy chủng cho lên men pha 1 được xác định là môi trường khoáng cơ bản (Rodriguez-Contreras et al. 2013) với một số cải tiến các thành phần (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02); $\text{NH}_4\text{Fe(III)xitrat}$ (0,05); cao nấm men (5); pepton (5) glucoza (10).

Khoáng 2: là môi trường lên men Pha 2 thu PHA (g/l) với các thành phần $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{NH}_4\text{Fe(III)xitrat}$ (0,05); glucoza (10); axit citric (1); vi lượng (2 ml). Dung dịch vi lượng 0,1ml với các thành phần(mg/L): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3; H_3BO_3 , 30; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.

Khoáng 3. Môi trường cho lên men lượng lớn thu PHA (g/l)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3); KH_2PO_4 (3,8); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7,3), glucoza (10 – 20); vi lượng: 0,5ml/L.

Khoáng 4. Môi trường cho lên men thu PHA từ phụ phẩm cá Môi trường nhân giống (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); dịch chiết phụ phẩm cá (2 - 20ml)

Môi trường lên men (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3); KH_2PO_4 (3,8); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7,3), mỡ cá (10 – 20), glucoza (1-3); vi lượng: 0,5ml/L.

Ví dụ 4

Phân lập gen, tách dòng và xác định trình tự ADN của gen *phaC* của chủng *Bacillus megaterium* DV01.

Để có thể thu sinh khối tế bào cho thí nghiệm này, chủng nghiên cứu được nuôi qua đêm trên môi trường LB sau đó ly tâm thu sinh khối và tiến hành tách chiết ADN tổng số. Ly tâm thu sinh khối tế bào trong 5 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút. Tế bào được hòa tan đều trong hỗn hợp dung dịch A và được ủ ở 37°C trong 1h. Sau khi ủ, bổ sung 100 μl NaCl 5M rồi trộn đều. Sau bước này, 80 μl dung dịch CTAB/NaCl được bổ sung, trộn đều và mẫu được ủ trong 10 phút ở 65°C. Bổ sung 2 lần thể tích (v/v) dung dịch cloroform: rượu isoamyl alcohol 24:1), đảo đều và ly tâm thu pha nổi phía trên sang eppendoff mới, tiếp tục lặp lại bước này lần 2. ADN được thu bằng cách tạo kết tủa với

isopropanol (0,6 thể tích (v/v)) trong khoảng 1h ở -20°C và được rửa lại bằng 500µl ethanol (70%). ADN được rửa, làm khô và hòa tan trong 100 µl TE. Dịch chứa ADN được bảo quản ở -20°C để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo (Ausubel et al., 2003). Trình tự gen *phaC* có nguồn gốc từ *Bacillus megaterium* được bộc lộ một cách rõ ràng. Thông tin về gen *phaC* có nguồn gốc từ *Bacillus megaterium* có thể thu được từ ngân hàng gen. Dựa trên trình tự được thông báo, cặp đoạn mỗi đặc hiệu của gen *phaC* được mô tả For1-PhaC/Rev1-PhaC (5'-ATGGCAATTCCTTACGTGCAAGA- 3'; và 5'-TTATTTAGAGCGTTTTTC-3'). ADN nhiễm sắc thể tách từ chủng *Bacillus megaterium* DV01 được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại gen *phaC* bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mỗi For1-PhaC / Rev1-PhaC (5'-ATGGCAATTCCTTACGTGCAAGA-3'; và 5'-TTATTTAGAGCGTTTTTC-3'). Phản ứng PCR được thực hiện theo các phương pháp chuẩn được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001). Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 1100bp. Phân đoạn ADN được gắn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pJET1.2 - phaC. Khuẩn lạc được dự đoán có mang vector tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicilin nồng độ 70 µg/ml và tách ADN plasmit để kiểm tra sự có mặt của gen. ADN plasmit tái tổ hợp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR và xử lý với enzym giới hạn. Trình tự gen *phaC* được xác định trên máy xác định trình tự ADN tự động và các số liệu được xử lý trên phần mềm xử lý trình tự Chromas, MEGA 6.0. Trình tự nucleotide của gen *phaC* được phân tích đã xác định đoạn gen *phaC* có kích thước 1100bp mã hóa protein phaC của PHA synthaza PhaC gồm trình tự 362 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 40kDa.

Ví dụ 5

Cấu trúc vector biểu hiện protein PhaC.

Gen *phaC* được khuếch đại bằng cặp mỗi đặc hiệu 2 được thiết kế dựa trên trình tự gen *phaC* đã xác định ở ví dụ 4 có thiết kế bổ sung điểm cắt enzym giới hạn Sph-I và Spe-I có trình tự mỗi For2/PhaC-SpeI: GGTGTGTACTAGTATGGCAATTCCTTACG và Rev2/PhaC-SphI: CGCTTCGCATGCTTATTTAGAGCGTTTT. Gen *phaC* và vector pPSP6 được phân cắt tại bằng cách sử dụng các enzym giới hạn SphI và SpeI. Sản phẩm vector sau khi cắt bằng enzym giới hạn được gắn gen *phaC* được cắt bằng hai enzym tương ứng tạo nên cấu trúc vector pPSPHAC chứa gen *phaC* thu được ở ví dụ 4.

Ví dụ 6

Cảm ứng biểu hiện gen *phaC* trong chủng *Bacillus megaterium* DV01.

Vectơ tái tổ hợp pPSPHAC được thực hiện theo ví dụ 4 được biến nạp vào tế bào *Bacillus megaterium* DV01 bằng phương pháp tế bào trần. Sản phẩm biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung tetraxylin 6,5 µg/ml, 37°C trong khoảng 20-24h; sau đó được kiểm tra bằng lựa chọn khuẩn lạc nhân nuôi trên môi trường LB kháng sinh tetraxylin 5 - 10 µg/ml ở 37°C trong khoảng 16-20h, lắc 120 vòng/phút. Những khuẩn lạc mang vectơ tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường khoáng có bổ sung tetraxylin 5 -10 µg/ml, chất cảm ứng là xyloza hàm lượng 1,5-70mg/ml, ở nhiệt độ 30 - 45°C trong 24 - 168 giờ. Khả năng biểu hiện protein PhaC trong chủng *B. megaterium* DV01 tái tổ hợp ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau được kiểm tra trên gel polyacrylamit 12,5% (Hình 1). Kết quả thu được protein tái tổ hợp có trọng lượng phân tử khoảng 40 kDa và lượng PHA tích lũy có hàm lượng 2 – 6,5 mg/ml. Chủng *Bacillus megaterium* DV01 tái tổ hợp tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hoá protein phaC của PHA được đặt tên là *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1.

Ví dụ 7

Phương pháp thu nhận PHA.

Bước 1: Sinh khối tế bào sau nuôi được thu bằng ly tâm và rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphat, pH 7,2 sau đó được hòa lại trong 0,5ml đệm này và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng ở mức công suất 140W, quay và dừng sau mỗi 10 giây trong 15 phút.

Bước 2, bổ sung 2ml dung dịch etanol/axeton tỷ lệ 1:1 và ngâm ủ khoảng 2h.

Bước 3, chuyển dịch tế bào sang ống thủy tinh có nút xoáy và bổ sung 5ml cloroform, xoáy chặt nắp và tiến hành lắc 3 - 4h để PHA được hòa tan hoàn toàn sau đó thu pha chứa cloroform chuyển ra ống thủy tinh mới.

Bước 4, dịch cloroform chứa PHA được bổ sung metanol lạnh với thể tích bằng 5 - 8 thể tích và để trong tủ -20°C trong ít nhất 30 phút sau đó ly tâm thu cặn PHA. Sau đó bổ sung ethaol 70% ly tâm lặp lại 2 lần để loại dung môi. Cặn được sấy khô 50°C sau đó thu PHA cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ví dụ 8

Xác định hàm lượng PHB (một loại polyme thuộc nhóm PHA) thu nhận được từ sinh khối tế bào.

Khả năng tích lũy PHB của chủng được xác định bằng phương pháp crotonic Lượng PHA trong một mẫu được lấy có thể được xác định bằng phương pháp đo quang phổ bằng cách chuyển đổi PHA thành axit crotonic khi xử lý với axit sulfuric. Dung dịch chuẩn axit crotonic được chuẩn bị với các nồng độ tăng dần khác nhau. Độ hấp thụ của axit crotonic được đo ở bước sóng 235 nm từ đó xác định được phương trình chuẩn có dạng $y = ax + b$. Trong nghiên cứu này, tế bào chủng nghiên cứu sau khi nuôi trên môi trường thu PHB sau 24 – 120h được thu bằng phương pháp ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 5000 vòng/phút (v/p) trong 15 phút sau đó loại bỏ dịch thu sinh khối (dịch nổi được chia vào các ống fancel 50ml) và rửa sinh khối 2 lần với nước cất để loại bỏ thành phần khoáng của môi trường. Sau đó đóng nhẹ nắp ống fancel đưa vào lò vi sóng quay đều đều đặn ở 140W trong vòng 8-10 phút (10-30 giây 1 lần) để phá vỡ tế bào. Sau đó bổ sung thêm dung dịch ethanol : axeton theo tỷ lệ 1:1, trộn đều sinh khối, ủ trong 1 – 10 giờ rồi tiến hành ly tâm ở tốc độ 5000 v/p, 15 phút. Bổ sung thêm lượng cloroform phù hợp và tiến hành lắc 80 - 200 vòng/phút (v/p) ở 30°C trong thời gian phù hợp. Hút 10 - 200 μ l dịch cloroform chứa PHB đã được hòa tan sau đó bổ sung lượng H₂SO₄ 98% phù hợp và đun 100°C trong 10 đến 60 phút để toàn bộ PHB trong dung dịch được chuyển thành axit crotonic có màu nâu. Dung dịch sau đun được để nguội rồi tiến hành đo mật độ quang (optical density) OD tại bước sóng 235nm. Mẫu chuẩn được sử dụng là PHB (sigma) được hòa tan trong cloroform với hàm lượng 8ml/ml sau đó tính các nồng độ thích hợp để dựng đường chuẩn. Kết quả xác định hàm lượng PHB trong dung dịch được xác định theo phương trình xây dựng được. Mẫu đối chứng chuẩn là cloroform + H₂SO₄ và được xử lý như quy trình trên.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên phân lập tại Việt Nam được tách gen *phaC* và biến nạp vector tái tổ hợp mang chính gen của chủng chủ vào chủng tự nhiên ban đầu được tách tạo nên chủng tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1. Phương pháp theo sáng chế góp phần tạo ra chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hoá protein phaC của PHA synthaza mà có khả năng sản xuất hàm lượng polyhydroalkanoat (PHA) tăng cao đáng kể so với chủng tự nhiên ban đầu.

Mặc dù các mô tả nêu trên chứa nhiều chi tiết cụ thể, chúng không được coi là giới hạn về phương án thực thi sáng chế, mà chỉ nhằm mục đích minh họa một số phương án thực thi được ưu tiên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tái tổ hợp để sản xuất polyhydroalkanoat (PHA) từ chủng *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp mang gen *phaC* mã hoá protein phaC của PHA synthaza bao gồm các bước:

a) chuẩn bị chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 trong bằng cách hoạt hoá trên môi trường Luria Bertani (LB) lỏng sau đó chuyển ra các ống thạch nghiêng chứa môi trường khoáng 1 gồm các thành phần (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02); $\text{NH}_4\text{Fe(III)xitrat}$ (0,05); cao nấm men (5); pepton (5) glucoza (10);

b) phân lập và tách dòng gen *phaC* vào vector pJET1.2/blunt để tạo thành plasmid tái tổ hợp tách dòng tái tổ hợp bằng cách:

tách ADN nhiễm sắc thể từ chủng *Bacillus megaterium* DV01 thu được ở bước a), sau đó khuếch đại đoạn mang gen *phaC* bằng PCR sử dụng cặp mồi For1-PhaC/Rev1-PhaC (5'-ATGGCAATTCCTTACGTGCAAGA-3' và 5'-TTATTTAGAGCGTTTTTC-3');

gắn đoạn mang gen *phaC* vào vector tách dòng pJET1.2/blunt để tạo thành plasmid tái tổ hợp pJET1.2-phaC sau đó biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α ; sau đó kiểm tra và xác định trình tự của đoạn gen *phaC* thu được;

c) tạo vector biểu hiện tái tổ hợp pPSPHAC chứa gen *phaC* bằng cách:

khuếch đại đoạn gen *phaC* thu được ở bước b) bằng cách sử dụng cặp mồi được thiết kế bổ sung vị trí cắt của enzym cắt giới hạn SphI và SpeI, có trình tự là For2/PhaC-SpeI: GGTGTGTACTAGTATGGCAATTCCTTACG và Rev2/PhaC-SphI: CGCTTCGCATGCTTATTTAGAGCGTTTT;

cắt gen *phaC* và vector pPSP6 bằng enzym cắt giới hạn SphI và SpeI sau đó gắn gen *phaC* vào vector pPSP6 để tạo thành cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp pPSPHAC chứa gen *phaC* có trình tự được nêu trong SEQ ID NO.1 với kích thước 1092 bp mã hoá cho protein *phaC* gồm 362 axit amin với trọng lượng khoảng 40kDa;

d) biến nạp vector biểu hiện pPSPHAC chứa gen *phaC* ở bước c) vào tế bào vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 để tạo thành chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp bằng phương pháp tế bào trần;

e) nuôi cấy sinh khối tế bào và thu nhận polyhydroalkanoat (PHA) từ chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* pPSPHAC5/1 tái tổ hợp thu được ở bước d) bằng cách:

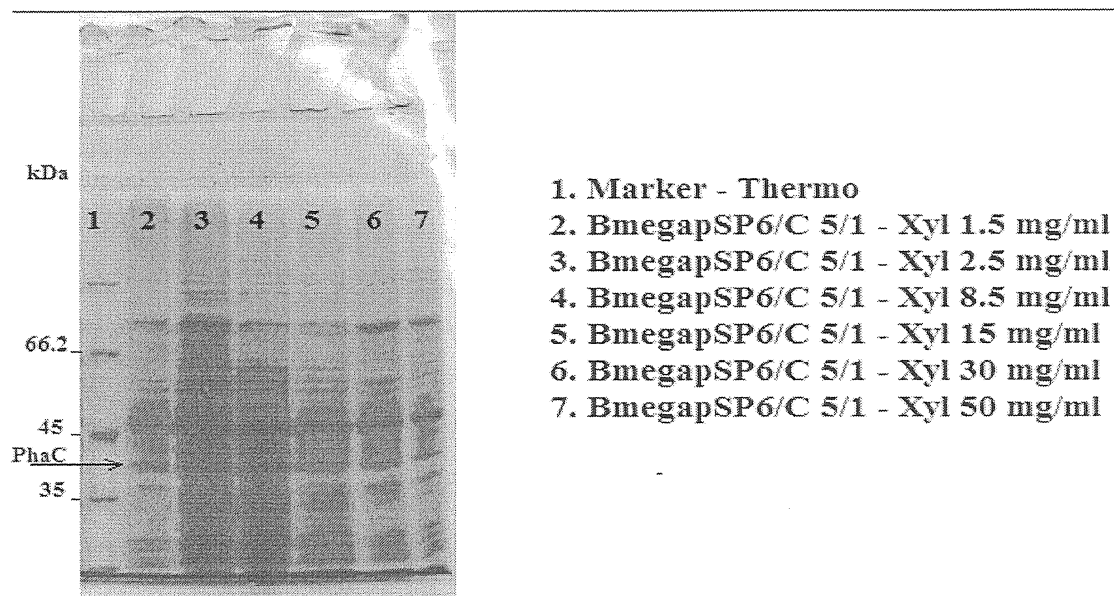
chúng nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB sau đó hút bổ sung 5% (v/v) bổ sung vào môi trường khoáng, nuôi lắc ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 72 – 120 giờ;

thu sinh khối tế bào bằng ly tâm và rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphat, pH 7,2; sau đó được hòa lại trong đệm này và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng ở mức công suất 140W, quay và dừng sau mỗi 10 giây trong 15 phút;

tiếp tục bổ sung dung dịch etanol/axeton tỷ lệ 1:1 và ngâm ủ khoảng 2h và chuyển dịch tế bào sang ống thủy tinh có nút xoáy và bổ sung cloroform, xoáy chặt nắp và tiến hành lắc 3 - 4h để PHA được hòa tan hoàn toàn;

sau đó thu pha chứa cloroform chuyển ra ống thủy tinh mới, dịch cloroform chứa polyhydroalkanoat (PHA) được bổ sung metanol lạnh với lượng 5-8 lần thể tích và để trong tủ -20°C trong ít nhất 30 phút sau đó ly tâm thu cặn PHA;

tiếp tục bổ sung etanol 70% và ly tâm lặp lại 2 lần để loại dung môi và thu cặn PHA sau đó sấy khô ở 50°C để thu được polyhydroalkanoat (PHA).



Hình 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>Viện Công nghệ sinh học

<120>PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP ĐỂ SẢN XUẤT POLYHYDROALKANOAT (PHA) TỪ CHỦNG BACILLUS MEGATERIUM PPSPHAC5/1 TÁI TỔ HỢP MANG GEN PHAC MÃ HOÁ PROTEIN PHAC CỦA PHA SYNTHAZA

<160> 1

<210> 1

<211> 1092

<212> ADN

<213> Bacillus megaterium

<400> 1

```

ATGGTGGCAA TTCCTTACGT GCAAGAGTGG GAAAAATTAA TCAAATCAAT GCCAAGTGAA 60
TATAAAAGTT CTGCAAGACG TTTTAAGCGT GCATATGAAA TTATGACAAC AGAAGCGGAA 120
CCGGAAGTTG GATTAACACC AAAAGAGGTT ATTTGGAAAA AGAACAAAGC GAAATTATAC 180
CGCTATACGC CAGTAAAAGA TAACCTGCAT AAAACACCAA TCTTACTCGT ATATGCATTG 240
ATCAATAAAC CGTATATTTT GGATTTAACA CCTGGAAACA GCCTTGTTGA ATACTTATTA 300
AACCGCGGTT TTGACGTGTA TTTGCTTGAC TGGGGAACTC CTGGGCTTGA AGACAGCAAT 360
ATGAAGCTAG ATGATTATAT TG TAGATTAT ATTCCAAAAG CGGCGAAAAA GGTGCTGCGC 420
ACTTCTAAAT CTCCTGATTT GTCTGTTCTT GGT TACTGCA TGGGCGGAAC CATGACATCT 480
ATTTTTGCTG CATTAAATGA AGACTTGCCG ATTA AAAACT TAATTTTTAT GACAAGTCCA 540
TTTGATTTTT CGGATACAGG TTTATACGGA GCATTCCCTAG ACGATCGCTA CTTTAATTTA 600
GATAAAGCAG TAGATACATT CGGAAACATC CCTCCAGAGA TGATTGACTT TGGAAACAAG 660
ATGTTAAAC CAATCACGAA TTTCTACGGT CCATATGTAA CGTTGGTGGA TCGTTCGGAA 720
AATCAGCGTT TTGTTGAAAG CTGGAAGCTC ATGCAAAAGT GGGTTGCTGA CGGCATCCCA 780
CTTGCTGGTG AAGCTTATCG TCAGTGGATT CGTGATTTCT ATCAACAAAA CAAATTAATC 840
AATGGTGAAC TTGAAGTTCT CGGACGCAAA GTAGATTGTA AAAATATTAA AGCTAATATT 900
TTAAACATTG CTGCTAGCCG TGATCATATT GCGATGCCGC ATCAAGTGGC AGCTTTAATG 960
GACGCTGTTT CAAGTGAAGA TAAAGAGTAT AAATTGTTGC AAACAGGTCA CGTATCTGTT 1020
GTATTTGGTC CAAAAGCAGT GAAGGAAACA TATCCTTCAA TCGGCGATTG GCTAGAAAAA 1080
CGCTCTAAAT AA 1092

```