



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

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

(11)



1-0037732

(51)^{2020.01} C12N 1/12; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2021-06344

(22) 11/10/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 27/12/2021 405

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Phạm Thị Lương Hằng (VN); Ngô Thị Trang (VN); Nguyễn Thị Bích Loan (VN);
Nguyễn Đình Thắng (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN LAM SCYTONEMA SP. NK1313 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT GÂY ỨC CHẾ TĂNG SINH TẾ BÀO UNG THƯ, KÍCH HOẠT SỰ CHẾT CỦA TẾ BÀO UNG THƯ THEO CHƯƠNG TRÌNH VÀ KHÁNG KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung cung HeLa và gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8; có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình và làm dừng chu trình tế bào ở pha S/G₂; và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa ở Hà Nội có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư, kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình (apoptosis) và có hoạt tính kháng khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn lam và phương pháp phân loại

Vi khuẩn lam là nhóm sinh vật quang tự dưỡng giải phóng oxi với cơ chế quang hợp giống tảo và thực vật nên trước đây chúng được xếp vào ngành tảo với tên gọi là “tảo lam”. Theo đó, chúng được phân loại và đặt danh pháp khoa học theo hệ thống học thực vật được đề xuất bởi Gomont (1892) và Bornet & Flahault (1886 – 1888). Sau khi bản chất vi khuẩn của chúng được sáng tỏ như không có màng nhân, vật liệu di truyền không liên kết với protein histone, Rippka và cộng sự (1979) đã đề xuất đặt danh pháp khoa học của chúng theo hệ thống học vi khuẩn. Cả hai hệ thống phân loại này đều dựa trên các đặc điểm hình thái, trong đó sự phân loại theo theo hệ thống học thực vật vẫn được sử dụng phổ biến hơn trong một thời gian dài.

Tuy nhiên, sự phân loại chỉ dựa vào các đặc điểm hình thái ngày càng bộc lộ những điểm yếu do nhiều đặc điểm hình thái bị biến đổi khi vi khuẩn lam sống trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau, ranh giới để phân biệt sự sai khác về hình thái không đáng kể, phụ thuộc vào yếu tố chủ quan của người thực hiện nghiên cứu dẫn đến nhiều nhầm lẫn trong kết quả phân loại. Để khắc phục tình trạng này, Hoffmann và cộng sự (năm 2005) đã đề xuất phân loại vi khuẩn lam dựa trên phương pháp tiếp cận đa chiều (polyphasic approach) trong đó có kết hợp phân tích các đặc điểm di truyền, hình thái và sinh thái. Các đặc điểm di truyền như trình tự gen bảo thủ rARN 16S hay trình tự vùng gen

ITS (Internal transcribed spacer) nằm giữa gen rARN 16S và rARN 23S, cũng như trình tự gen *rbcL* (tổng hợp enzym Ribulose 1,5-bisphosphat carboxylaza) đặc trưng cho sinh vật quang tự dưỡng, trở thành những chỉ thị phân tử thiết yếu bên cạnh các trong tiêu chí truyền thống về đặc điểm hình thái tế bào/trichome trong các nghiên cứu phân loại vi khuẩn lam.

Sáng chế này đề cập đến chủng vi khuẩn lam NK1313 được phân loại dựa vào các đặc điểm hình thái với sự hình thành nhánh giả đặc trưng của vi khuẩn lam thuộc chi *Scytonema*. Trình tự đoạn gen rARN 16S và *rbcL* của chủng NK1313 cho thấy độ tương đồng cao (99,4 % - 99,8%) so với các trình tự tương ứng của chủng vi khuẩn lam *Scytonema bilaspurens* 10C_PS. Điều này chứng tỏ tính thống nhất trong việc phân loại chủng vi khuẩn lam NK1313 dựa trên cả tiêu chí đặc điểm hình thái và sinh học phân tử. Trong khi chưa có một chủng nào trong loài *Scytonema bilaspurens* đã được công bố về trình tự đoạn gene ITS, sáng chế này cũng lần đầu tiên công bố trình tự đoạn gen ITS của chủng vi khuẩn lam NK1313 nhằm cung cấp thêm dữ liệu về chỉ thị phân tử cho các nghiên cứu về hệ thống phân loại vi khuẩn lam nói chung.

Vi khuẩn lam và hoạt tính ức chế tế bào ung thư

Vi khuẩn lam là một loại vi khuẩn Gram âm được sử dụng để điều trị bệnh Gout và một số loại ung thư từ 1500 năm trước Công nguyên, tuy nhiên các nghiên cứu về hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ vi khuẩn lam mới được quan tâm nhiều từ năm 1982 bởi một nhóm nghiên cứu tại trường Đại học ở Hawaii. Cho đến nay, hơn 1630 phân tử thuộc 260 họ hợp chất đã được phân lập từ vi khuẩn lam thể hiện 14 loại hoạt tính khác nhau, bao gồm ức chế virus, ức chế enzym, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế tế bào ung thư.... Trong đó phổ biến nhất là hoạt tính ức chế tế bào ung thư với 110 họ chất, chiếm tới 30,4% các họ chất đã được phân lập từ vi khuẩn lam (theo Demay và cộng sự, 2019). Điều này chứng tỏ tiềm năng phát hiện và phát triển các thuốc điều trị ung thư từ nguồn hợp chất tự nhiên của vi khuẩn lam.

Thực tế, nhiều hợp chất tự nhiên từ vi khuẩn lam đã được nghiên cứu và phát triển thành thuốc điều trị ung thư được cơ quan quản lý thực phẩm và thuốc Hoa Kỳ (FDA) và

Cơ quan quản lý dược phẩm Châu Âu (EMA) cấp phép cho lưu hành trên thị trường hoặc đang trong các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng (bảng 1). Trong đó, nổi bật nhất là các hợp chất trong họ dolastatin được phát triển thành thuốc Brentuximab vedotin điều trị ung thư bạch huyết Hodgkin (theo Younes và cộng sự, 2010).

Bảng 1. Các giai đoạn thương mại hóa và phát triển chính của các hợp chất /thuốc ức chế ung thư có nguồn gốc từ vi khuẩn lam (theo Bajpai và cộng sự, 2018)

Tên thuốc/ hợp chất thiên nhiên	Loài vi khuẩn lam	Công ty sản xuất	Tình trạng sản phẩm sau khi được phê chuẩn bởi FDA/EMA
Brentuximab vedotin 63 (Adcetris ⁶³)	<i>Symploca</i> <i>hydroides</i> và <i>Lyngbya majuscula</i>	Seattle Genetics (Bothell, WA, USA)	Thương mại: thuốc kết hợp kháng thể
Cryptophycin 1	<i>Nostoc</i> sp GSV 224	Merck Pvt.	Thương mại
Glembatumumab vedotin	<i>Lyngbya</i> sp.	Celldex Therapeutics	Thuốc điều trị pha 2
DMMC (Cyclic depsipeptide)	<i>Lyngbya majuscula</i>	-	Tiền lâm sàng
Apratoxin A	<i>Lyngbya boulloni</i>	-	Tiền lâm sàng
Coibamide A	<i>Leptolyngbya</i> sp.	-	Tiền lâm sàng
Largazole	<i>Symploca</i> sp.	-	Tiền lâm sàng
Tasipeptins A-B	<i>Symploca</i> sp.	-	Tiền lâm sàng

Sự chết theo chương trình (apoptosis) gây ra bởi các hợp chất ức chế ung thư từ vi khuẩn lam

Các hợp chất ức chế ung thư thường gây chết tế bào theo hai cơ chế là hoại tử tế bào (necrosis) và kích hoạt sự chết theo chương trình (apoptosis). Necrosis xảy ra khi tế bào bị tổn thương do các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, giảm nồng độ oxi hoặc phơi nhiễm độc tố; từ đó dẫn đến tạo phản ứng viêm và huỷ hoại mô. Trong khi đó, apoptosis là diễn tiến sinh lý tự nhiên của tế bào do mỗi tế bào chỉ có một chu kỳ phát triển nhất định (thời gian sống nhất định), các tế bào không bị chết theo chương trình có thể dẫn đến sự hình thành khối u hoặc ung thư. Apoptosis là một trong các con đường chính kiểm soát sự sống/chết của tế bào, giúp duy trì sự cân bằng số lượng tế bào trong cơ thể đa bào, các tế bào sau khi đã hoàn thành chu kỳ phát triển sẽ bị phá huỷ một cách chủ động mà không ảnh hưởng đến hoạt động chức năng của cơ thể. Chính vì thế, các hợp chất tự nhiên có thể gây chết cho tế bào ung thư theo chương trình là đối tượng được quan tâm nghiên cứu và phát triển thành thuốc điều trị ung thư.

Sự chết theo chương trình được kích hoạt bởi một trong hai (hoặc cả hai) con đường nội sinh và ngoại sinh, dẫn tới hoạt hóa các enzyme caspaza có tác dụng phân giải ADN của tế bào dẫn đến gây chết tế bào (theo các tác giả Elmore, 2007; D'Arcy, 2019; Cavalcante và cộng sự, 2019). Một trong những dấu hiệu để nhận biết tế bào bị apoptosis là sự có mặt của phosphatidylserine trên bề mặt tế bào được phát hiện thông qua khả năng tạo liên kết với annexin V dung hợp với chất phát huỳnh quang (ví dụ: Propidium iodide - PI). Trong trạng thái bình thường của tế bào, phosphatidylserine chủ yếu nằm ở mặt trong của màng tế bào; khi tế bào bị apoptosis, cấu trúc màng tế bào bị thay đổi phosphatidylserin được bộc lộ ra và tạo liên kết với annexin V. Trên cơ sở đó, số lượng hay phần trăm tế bào đang trong quá trình apoptosis (phát tín hiệu huỳnh quang) được xác định nhờ sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy FACSCANTO (theo Schutte và cộng sự, 1998). Bên cạnh quá trình apoptosis, bất cứ một sự đình trệ nào trong các pha thuộc chu trình tế bào như pha G1 (khoảng trống thứ nhất), pha S (nhân đôi ADN), pha G2 (khoảng trống thứ hai) và pha M (phân chia tế bào) đều gây ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào (theo các tác giả Levine,

1997; Jeong và cộng sự, 2010; Al-Khalaf và cộng sự, 2013). Để xác định thời điểm làm dừng (bắt giữ) chu trình tế bào, các nhà khoa học dựa trên cơ sở phân tích sự thay đổi hàm lượng DNA (trong nhân tế bào) khi được nhuộm với chất huỳnh quang propidium iodide (PI). Khi phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy FACSCANTO, tín hiệu tín hiệu huỳnh quang càng mạnh chứng tỏ hàm lượng ADN càng cao, từ đó xác định được pha tương ứng trong chu trình tế bào ở mỗi tế bào (theo Darzynkiewicz và cộng sự, 2017). Vì vậy, việc tìm ra các hợp chất có khả năng bắt giữ bất kì một pha nào đó trong chu trình tế bào cũng là cơ sở khoa học quan trọng trong việc phát triển các thuốc điều trị ung thư.

Các nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy nhiều hợp chất từ vi khuẩn lam có khả năng gây chết tế bào ung thư theo con đường apoptosis với đặc trưng về thay đổi hình dạng tế bào và chia mảnh nhân; ngoài ra chúng còn làm rối loạn hoạt động chức năng của tế bào như làm dừng chu trình tế bào, phá vỡ cấu trúc thoi vô sắc, sai hỏng hoạt động chức năng của ty thể dẫn đến đứt gãy ADN, biến đổi hoạt tính của các họ protein kích hoạt sự chết theo chương trình như caspaza và Bcl-2... Chẳng hạn, các hợp chất cryptophycin 52, dolastatin 10, hectochlorin và lyngbyabellin có khả năng làm dừng chu trình tế bào ung thư ở pha G₂/M. Calothrixin A có khả năng làm dừng chu trình tế bào ung thư bạch cầu cả ở pha G₂/M và pha S (theo Khan và cộng sự, 2009). Các hợp chất lyngbyabellin, majusculamide, the aurilide swinholide làm đứt gãy vi sợi actin làm cản trở hoạt động phân chia tế bào. Các hợp chất symplostatin 1, cryptophycin 1 và glicomacrolide biselyngbyaside kích hoạt sự chết theo chương trình thông qua biến đổi hoạt động của protein caspaza – 3 (theo các tác giả Mooberry và cộng sự, 1997 và 2003; Yonezawa và cộng sự, 2012). Mặt khác, các hợp chất symplostatin 1, cryptophycin 52 và dolastatin 10 gây phosphoryl hóa protein Bcl-2 từ đó kích hoạt sự chết tế bào ung thư theo con đường apoptosis (theo Kalemkerian và cộng sự, 1999; Ali và cộng sự, 1998). Tất cả các hợp chất này đều đang được tập trung nghiên cứu để phát triển thành các liệu pháp điều trị ung thư mới.

Chi Scytonema và hoạt tính sinh học

Chi *Scytonema* thuộc họ Scytonemataceae, bộ Nostocales, lớp vi khuẩn lam, ngành vi khuẩn lam. Về đặc điểm hình thái, các chủng vi khuẩn lam thuộc chi này thường tạo nhánh giả đơn hoặc nhánh giả kép. Các trichome đẳng cực, hình trụ, không phân hóa ở phần gốc và phần đỉnh được bao bọc trong lớp màng nhày dày. Phần cuối của mỗi nhánh hình trụ hoặc hơi phình to với tế bào đầu sợi thuôn tròn; phần giữa của trichome có các tế bào hình trụ với vách ngăn mờ. Tế bào sinh dưỡng thường có chiều ngang (từ 8,6 μm – 9,1 μm) lớn hơn chiều dọc (4,9 μm – 7,6 μm). Tế bào dị hình đơn độc ở giữa sợi, hiếm khi xuất hiện thành cặp với chiều ngang khoảng 8,7 μm – 9,7 μm và chiều dọc khoảng 7,8 μm – 15,2 μm . Tế bào nghỉ chưa được phát hiện ở chi vi khuẩn lam này. Các tế bào phân chia theo hướng vuông góc với sợi (trichome), thường xảy ra ở vùng phân chia cuối mỗi sợi. Vi khuẩn lam thuộc chi *Scytonema* sinh sản bằng cách hình thành tảo đoạn được tách ra ở phần cuối của mỗi sợi. Các tảo đoạn này tăng số lượng tế bào ở cả hai đầu tạo thành các sợi đẳng cực mới.

Một số loài đại diện trong chi *Scytonema* bao gồm: *Scytonema belizensis*, *Scytonema crispum*, *Scytonema hofmanni*, *Scytonema kaernbachii*, *Scytonema pachmarhiense*, *Scytonema bilaspureense*... Tuy nhiên, các chỉ thị phân tử của các loài vi khuẩn lam này chưa được công bố nhiều trong Genbank, ngoại trừ trình tự rARN 16S và *rbcL* của các loài *Scytonema pachmarhiense* và *Scytonema bilaspureense*, đặc biệt là trình tự ITS chỉ mới được công bố ở loài *Scytonema pachmarhiense*.

Trong sáng chế này, lần đầu tiên chúng tôi đề cập đến chủng vi khuẩn lam NK1313 thuộc chi *Scytonema* có đặc điểm mới là các tế bào dị hình xuất hiện thành cặp ở giữa sợi và đơn độc ở đầu sợi. Đồng thời, các trình tự mới của đoạn gen rARN 16S, *rbcL* và ITS của chủng vi khuẩn lam NK1313 cũng lần đầu tiên được phát hiện và công bố.

Vi khuẩn lam thuộc chi *Scytonema* cũng có khả năng sản xuất nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó bao gồm scytovirin có hoạt tính kháng virus, scytoscalarol có hoạt tính kháng khuẩn, laxaphycin hoạt tính kháng nấm, scyptolin A và B có hoạt tính ức chế enzym elastaza của tuyến tụy, mycosporine – like amino axit (MAA) và scytonemin

có khả năng hấp thụ tia UV (theo các tác giả D'Agostino và cộng sự, 2018; Hainila và cộng sự, 2020). Các hợp chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư bao gồm scytophycin, tolytoxin, nostodione A và scytonemide A và B (Patterson và cộng sự, 1993 và 1994; Shim và cộng sự, 2008; Crunic và cộng sự, 2010). Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào công bố về hoạt tính ức chế tế bào của các cao chiết hay hợp chất thiên nhiên từ các chủng vi khuẩn lam cùng bậc phân loại (loài) với chủng vi khuẩn lam NK1313. Sáng chế này lần đầu tiên đề cập đến cơ chế tác động ức chế tế bào ung thư cổ tử cung HeLa bởi các hoạt chất được tổng hợp từ chủng vi khuẩn lam NK1313 theo con đường apoptosis, khả năng làm dừng chu trình của tế bào ung thư ở giai đoạn S/G₂ và khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa chứa đoạn gen rARN 16S có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1, đoạn gen *rbcL* có trình tự được nêu trong SEQ ID NO.2 và đoạn gen ITS có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 3; và có các đặc tính sau:

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa với chỉ số IC₅₀ là 3,6 µg/mL và gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với chỉ số IC₅₀ là 34,2 µg/mL khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol;

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình và làm dừng chu trình tế bào ở pha S/G₂; và

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 10mm khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được phân lập được từ mẫu đất thu tại ruộng lúa ở Đông Anh, Hà Nội, Việt Nam.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng NK1313 trên môi trường BG0.

Fig. 2. thể hiện hình thái tế bào của chủng NK1313 nuôi trong môi trường BG0 (a, b, c) và trong môi trường BG11 (d, e). TH và IH: lần lượt là các tế bào dị hình ở đầu sợi và giữa sợi; FB: vị trí xuất hiện phân nhánh giả; Ve: tế bào sinh dưỡng; Sh: màng nhày bao quanh sợi; Ho: tảo đoạn.

Fig. 3. thể hiện kết quả sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số bởi mỗi xuôi 2F và mỗi ngược 6R thông qua điện di trên gel agarosa 1% (M-marker; (-) đối chứng âm không có vi sinh vật; 1- NK1313).

Fig. 4. thể hiện kết quả sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng NK1313 bởi cặp mỗi xuôi 5F và mỗi ngược 1R thông qua điện di trên gel agarosa 1% (M-marker; (-) đối chứng âm không có vi sinh vật; 2- NK1313; các giếng 1, 3 đến 8 là các mẫu vi khuẩn lam khác).

Fig. 5. thể hiện kết quả sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng NK1313 bởi cặp mỗi *rbcLF/rbcLR* thông qua điện di trên gel agarosa 1% (M-marker; (-) đối chứng âm không có vi sinh vật; 2- NK1313; các giếng 1, 3, 4 là các mẫu vi khuẩn lam khác).

Fig. 6. thể hiện vị trí của chủng vi khuẩn lam vi khuẩn lam NK1313 trên cây phát sinh chủng loài khi phân tích gen *rARN 16S*.

Fig. 7. thể hiện vị trí của chủng vi khuẩn lam vi khuẩn lam NK1313 trên cây phát sinh chủng loài khi phân tích gen *rbcL*.

Fig. 8. thể hiện đường cong ức chế của cao chiết metanol NK1313 lên tế bào HeLa (a), tế bào OVCAR-8 (c); đường cong ức chế của đối chứng dương paclitaxel tương ứng lên dòng tế bào HeLa (b) và tế bào OVCAR-8 (d).

Fig. 9. thể hiện tác dụng của cao chiết metanol NK1313 lên quá trình apoptosis của tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Phần trăm tế bào ở các giai đoạn khác nhau (tế bào chết necrosis – Q1, apoptosis muộn – Q2, apoptosis sớm – Q3 và tế bào sống – Q4) khi phân tích bằng FACSCANTO với tế bào đối chứng âm – NC (a), tế bào đối chứng dương – PC (b) và tế bào được ủ với cao chiết metanol NK1313 (c); Phần trăm tế bào đi vào giai đoạn apoptosis ở trong các điều kiện khác nhau (d).

Fig. 10. thể hiện tác động của cao chiết đến thời điểm dừng chu trình tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Trong đó: chu trình tế bào đối chứng âm – NC (a); chu trình tế bào đối chứng

đương – PC (b); chu trình tế bào được ủ với cao chiết NK1313 (c); Phần trăm tế bào ở các pha khác nhau trong chu trình tế bào của các nhóm đối chứng âm (NC), đối chứng dương (PC) và nhóm ủ với cao chiết (NK1313).

Fig. 11. thể hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*; (-): đối chứng âm (metanol); 3: cao chiết NK1313; 1, 2, 4 – 9: là các mẫu cao chiết khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa đã thu hoạch ở Đông Anh, Hà Nội, trong đó chủng này chứa đoạn gen rARN 16S có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1, đoạn gen *rbcL* có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đoạn gen ITS có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3; và có các đặc tính sau:

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa với chỉ số IC_{50} là 3,6 $\mu\text{g/mL}$ và gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với chỉ số IC_{50} là 34,2 $\mu\text{g/mL}$ khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol;

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình và làm dừng chu trình tế bào ở pha S/G2; và

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 10mm khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol.

Các đặc tính của chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 sẽ được mô tả chi tiết như dưới đây.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn lam NK1313

Mẫu đất bề mặt của ruộng lúa (đã thu hoạch) được thu và bảo quản trong ống nhựa vô trùng. Tại phòng thí nghiệm, mẫu đất được hoà tan trong môi trường dinh dưỡng khoáng BG0 (thiếu nitrat) và cấy rìa lên đĩa thạch petri chứa BG0 để chọn lọc các chủng vi khuẩn quang tự dưỡng. Sau 2 tuần nuôi cấy ở điều kiện ánh sáng 20 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, các đĩa Petri đã xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh lam đặc trưng. Các khuẩn lạc được quan sát ở kính hiển quang học với độ phóng đại 40X để chọn lọc khuẩn lạc chỉ chứa một loại dạng sợi

khuẩn lam và cấy trải sang đĩa Petri tiếp theo. Quá trình cấy chuyển được lặp lại 5 lần cho đến khi thu được khuẩn lạc chứa các sợi đồng đều về kích thước và đồng nhất về hình dạng tế bào trong các sợi. Khuẩn lạc này được cấy chuyển sang lọ thủy tinh 10 mL chứa môi trường nuôi cấy lỏng có nitrat (BG11) nhằm làm tăng tốc độ sinh trưởng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong quá trình phân lập này. Môi trường được dùng trong quá trình chọn lọc và phân lập được đề cập ở đây là môi trường dinh dưỡng khoáng BG0 có các thành phần dinh dưỡng đa lượng như sau: MgSO_4 (0,075 g/L); $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,027 g/L); axit citric (0,006 g/L); Na-EDTA (0,001 g/L); Na_2CO_3 (0,02 g/L); K_2HPO_4 (0,031 g/L); Sắt amoni citrat (0,006 g/L).

Dung dịch dinh dưỡng vi lượng được pha trong 100 mL nước cất gồm các thành phần: H_3BO_3 (6,1 mg); $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (22,3 mg); $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (28,7 mg); $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg); $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (1,25 mg).

K_2HPO_4 và Sắt amoni citrat được hòa tan trong 2 mL nước cất (gọi là dung dịch A). Các nguyên tố dinh dưỡng đa lượng còn lại được hoà tan trong 100 mL nước cất, thêm 1 mL dung dịch vi lượng sau đó bổ sung nước cất lên đến thể tích 998 mL tạo thành dung dịch B. Dung dịch A và B được hấp khử trùng riêng rẽ ở 121°C trong 15 phút, sau khi nguội được trộn vào nhau để có được 1L Môi trường BG0.

Môi trường nuôi sinh khối BG11 là môi trường BG0 có bổ sung thêm thành phần đa lượng NaNO_3 với hàm lượng 15g vào dung dịch B trước khi hấp khử trùng để thu được 1L môi trường BG11.

Kết quả đã phân lập được chủng vi khuẩn lam quang tự dưỡng NK1313. Sự phân loại sơ bộ chủng vi khuẩn lam NK1313 được dựa vào hình thái khuẩn lạc trên môi trường thạch (Fig. 1) và hình thái tế bào/sợi (Fig. 2). Mô tả chi tiết, khuẩn lạc có đường kính từ 2-5 mm, với khối màu xanh lam đậm ở trung tâm và sợi nhỏ mọc lan ra xung quanh. Sợi của chủng vi khuẩn lam này gồm các tế bào sinh dưỡng xếp nối tiếp và được bao bọc bởi lớp màng nhầy mỏng. Nhánh giả hình thành đơn độc hoặc thành từng cặp giữa 2 sợi tiếp xúc với nhau. Các tế bào sinh dưỡng có hình chữ nhật, kích thước chiều ngang ($5,2\text{ }\mu\text{m} - 7,1\text{ }\mu\text{m}$) lớn hơn chiều dọc ($5,5\text{ }\mu\text{m} - 6,7\text{ }\mu\text{m}$) với vách ngăn mờ giữa 2 tế bào cạnh nhau. Tế bào

đầu sợi thuần nhon, đôi khi chiều dọc lớn hơn chiều ngang. Khi sống trong môi trường BG0, sợi vi khuẩn lam có thêm tế bào dị hình (chuyên hoá cho chức năng cố định nitơ khí quyển) ở đầu sợi hoặc giữa sợi, đôi khi xuất hiện hai tế bào dị hình cạnh nhau ở giữa sợi. Các tế bào dị hình chữ nhật với có chiều dọc (8,3 μm – 12,7 μm) lớn hơn chiều ngang (6,7 μm – 8,2 μm). Chủng NK1313 sinh sản bằng cách hình thành tảo đoạn ở phần đầu sợi. Hình dạng tế bào sinh dưỡng, tế bào dị hình và kiểu phân nhánh giả của các sợi của chủng NK1313 mang đặc trưng của chi vi khuẩn lam *Scytonema* (theo Komarek, 2014).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn lam NK1313 bằng cách xác định trình tự đoạn gen rARN 16S, *rbcL* và ITS; trong đó gen rARN 16S và ITS là các trình tự các nucleotit có tính bảo thủ cao - đặc trưng cho loài còn gen *rbcL* mã hoá enzym ribulose 1,5-bisphosphat carboxylaza tham gia vào pha tối của quang hợp - đặc trưng cho các sinh vật quang tự dưỡng. Trước hết, đoạn gen rARN 16S và ITS được khuếch đại thông qua ba lần PCR với 3 cặp mồi đặc hiệu. Lần PCR thứ nhất sử dụng mồi xuôi 2F (5'-GGG GGA TTT TCC GCA ATG GG-3') và mồi ngược 1R (5'-CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC-3') với mục đích nhân cả đoạn gen rARN 16S và ITS có kích thước 1600 bp. Lần thứ 2 là nhân đoạn gen rARN 16S bằng mồi xuôi 2F và mồi ngược 6R (5'-GAC GGG CCG GTG TGT ACA-3'). Lần thứ 3 là nhân đoạn gen ITS bằng mồi xuôi 5F (5'-TGTACACACCGGCCCGTC-3') và mồi ngược 1R. Đoạn gen *rbcL* được nhân lên bằng mồi xuôi *rbcLF* (5'-GAC TTC ACC AAA GAY GAC GAA AAC AT-3') và mồi ngược *rbcLR* (5'-GAA CTC GAA CTT RAT YTC TTT-3'). Các điều kiện thực hiện nhân đoạn gen rARN 16S là kiến thức thông thường trong lĩnh vực xác định trình tự và các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể thực hiện được một cách dễ dàng.

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen rARN 16S từ ADN tổng số của chủng NK1313 (Fig. 3) đã được xác định trình tự có kích thước 969 nucleotit (SEQ ID NO:1) và có mức độ tương đồng 99,8% với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS (mã kí hiệu gen KT222810 trong GenBank). Mối quan hệ phát sinh chủng - loài của chủng NK1313 với một số chủng vi khuẩn lam khác đã được xây dựng và thể hiện trên Fig. 6.

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rbcL* từ ADN tổng số của chủng NK1313 (Fig. 5) đã được xác định trình tự có kích thước 794 nucleotit (SEQ ID NO:2) và có mức độ tương

đồng 99,4% với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema bilaspurense* 10C-PS (mã ký hiệu gen KT222811 trong GenBank). Mối quan hệ phát sinh chủng-loài của chủng NK1313 với một số chủng vi khuẩn lam khác dựa trên trình tự gen *rbcL* đã được xây dựng và thể hiện trên Fig. 7.

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen ITS từ ADN tổng số của chủng NK1313 (Fig. 4) đã được xác định trình tự có kích thước 536 nucleotit (SEQ ID NO:3). Tuy nhiên, trình tự đoạn gen này được so sánh với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema pachmarhiense* 10A1_PS (mã ký hiệu gen MH260366 trong GenBank) cho kết quả độ tương đồng là 87%.

Trên cơ sở độ tương đồng 99,8% và 99,4 % về trình tự gen 16S ARN và *rbcL* của chủng NK1313 so với 2 gen tương ứng của chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS cùng với đặc điểm hình thái tế bào/sợi đã chứng tỏ chủng NK1313 có quan hệ gần gũi với chủng vi khuẩn lam *Scytonema bilaspurense* 10C-PS và được đặt tên là *Scytonema* sp. NK1313.

Tên chủng “NK1313”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Scytonema* sp. NK1313 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Scytonema* sp. NK1313 phân lập được lưu giữ tại Bộ môn Hoá sinh và Sinh học phân tử, Khoa Sinh học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

B. Phân tích khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư

Chủng NK1313 sau khi được phân lập và định danh được nuôi và thu sinh khối khô để khảo sát khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (được nuôi trong môi trường DMEM) và tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 (được nuôi trong môi trường RPMI-1640). Các môi trường nuôi tế bào ung thư đều được bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) và 1% dung dịch kháng sinh Penicillin/Streptomycin (ở hàm lượng 10 000 đơn vị Penicillin G và 10 mg Streptomycin trong 1 mL dung dịch).

Trước hết, chủng vi khuẩn lam NK1313 được nuôi trong môi trường BG11 (có thành phần như đã mô tả ở trên) trong thời gian 6 tuần. Sinh khối tươi được thu bằng cách ly tâm với tốc độ 4000 vòng/10 phút/20 °C rồi đông khô để loại bỏ nước bề mặt và trong tế bào để thu được sinh khối khô. Sau đó, 5g sinh khối khô được thấm ướt trong dung môi metanol 99,8% (Merck- Germany) và nghiền nhỏ trong cối sứ trong 5 phút thành hỗn hợp đồng nhất.

Hỗn hợp này được siêu âm 30 phút và ngâm lắ 30 phút trong bình tam giác chứa 200 mL dung môi metanol 99,8% trước khi được ly tâm để thu được dịch nổi. Phần cặn tiếp tục được chiết rút hai lần lặp lại trong 200 mL dung môi metanol 99,8%, kết quả thu được 600 mL dịch chiết metanol. Toàn bộ dịch chiết này được loại dung môi bằng máy cất quay chân không kết hợp với sấy ở 40 °C và thu được 0,4 g cao chiết metanol của chủng NK1313 sau đây được gọi là cao chiết NK1313. Thuật ngữ “cao chiết NK1313”, “cao chiết metanol” hoặc “cao chiết metanol NK1313” trong phạm vi bản mô tả này, được sử dụng để chỉ hỗn hợp các chất có trong sinh khối khô của chủng *Scytonema* sp. NK1313 đã được hòa tan trong metanol bằng phương pháp mô tả ở trên.

Tế bào tế bào ung thư cổ tử cung HeLa được nuôi trong đĩa 96 giếng bằng môi trường DMEM và ủ với cao chiết NK1313 sau 24 giờ nuôi cấy. Cao chiết NK1313 được bổ sung ở 9 nồng độ trong khoảng từ 0,06 đến 168,0 µg/mL. Còn tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 và ủ với cao chiết NK1313 ở 6 nồng độ từ 3,125 đến 100,0 µg/mL sau 24 nuôi trong đĩa 96 giếng. Đối chứng dương là hợp chất kháng ung thư paclitaxel, còn đối chứng âm là dung môi DMSO dùng để hoà tan cao chiết. Kết thúc 48h ủ mẫu với mỗi loại tế bào, dung dịch MTT ở đồng độ 5 mg/mL được bổ sung vào mỗi giếng tế bào để tạo các tinh thể màu xanh – tím trong các tế bào sống sót theo mô tả của Nguyễn và cộng sự (2021). Giá trị OD ở bước sóng 570 nm được đọc trên máy ELISA dùng để xác định tỷ lệ sống/chết của tế bào. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi dòng tế bào. Các giá trị OD hiển thị được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 8 để xác định chỉ số IC₅₀. Đây là giá trị nồng độ của cao chiết mà có khả năng ức chế 50% tế bào ung thư.

Kết quả cho thấy, cao chiết NK1313 có khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa và tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với chỉ số IC₅₀ tương ứng là 3,6 µg/mL và 34,2 µg/mL. Đường cong đáp ứng liều của cao chiết NK1313 thể hiện tương tự với đường cong đáp ứng liều của thuốc điều trị ung thư paclitaxel (Fig. 8). Theo tiêu chuẩn của viện nghiên cứu ung thư Hoa Kỳ, một cao chiết được đánh giá là có hoạt tính ức chế ung thư khi chỉ số IC₅₀ đạt giá trị nhỏ hơn hoặc bằng 20,0 µg/mL; trong nghiên cứu này của chúng tôi cho thấy hoạt tính ức chế của cao chiết metanol lên dòng tế bào ung thư HeLa

đạt 3,6 $\mu\text{g/mL}$, tức là cao hơn 5 lần so với tiêu chuẩn của viện nghiên cứu ung thư Hoa Kỳ. Điều này chứng tỏ chủng NK1313 có khả năng sinh tổng hợp hợp chất có khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung rất mạnh, có tiềm năng phát triển thành sản phẩm thương mại.

C. Phân khả năng gây chết tế bào ung thư HeLa theo con đường chết theo chương trình (apoptosis)

Thí nghiệm được thiết kế với 3 nhóm: nhóm đối chứng âm (NC) là các tế bào ung thư HeLa được ủ với dung môi DMSO dùng để hoà tan cao chiết, nhóm đối chứng dương (PC) là tế bào được ủ với chất ức chế ung thư thương mại paclitaxel ở nồng độ 13,5 nM và nhóm tế bào được ủ với cao chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 $\mu\text{g/mL}$. Sau khi được nhuộm với phức hợp annexin V và chất phát huỳnh quang PI, phần trăm tế bào trong ở trong các tình trạng khác nhau bao gồm: giai đoạn tế bào hoạt tử (necrosis) ở góc phần tư Q1, giai đoạn apoptosis muộn (late apoptosis) ở góc phần tư Q2, giai đoạn apoptosis sớm (early apoptosis) ở góc phần tư Q3, và tế bào sống bình thường ở góc phần tư Q4 đã được phân tích bằng máy FACSCANTO (Fig. 9a, 9b, 9c). Kết quả thí nghiệm cho thấy dịch chiết metanol chủng NK1313 ở nồng độ 3,6 $\mu\text{g/mL}$ làm tăng số tế bào HeLa bị apoptosis lên 1,5 lần, trong khi đó thuốc điều trị ung thư paclitaxel (đối chứng dương) ở nồng độ 13,5 nM có khả năng làm tăng số tế bào HeLa bị apoptosis lên 3 lần (Fig. 9d). Kết quả này cho thấy khả năng phát triển các hợp chất có trong sinh khối khô của chủng NK1313 thành các thuốc trong điều trị ung thư tiềm năng thông qua khả năng kích hoạt con đường apoptosis trên tế bào ung thư cổ tử cung HeLa.

D. Phân tích khả năng bắt giữ chu trình tế bào ung thư HeLa

Thí nghiệm được thiết kế với 3 nhóm: nhóm đối chứng âm (NC) là các tế bào ung thư HeLa được ủ với dung môi DMSO dùng để hoà tan cao chiết NK1313, nhóm đối chứng dương (PC) là tế bào được ủ với chất ức chế ung thư thương mại paclitaxel ở nồng độ 13,5 nM và nhóm tế bào được ủ với cao chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả phân tích bằng máy đếm tế bào dòng chảy FACSCANTO cho thấy phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và G₂/M trong nhóm đối chứng âm (NC) lần lượt là 64,1%; 14,8% và 18,6% (Fig. 10a); và phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và G₂/M trong nhóm đối chứng dương (PC) lần lượt là 26,1%; 28,5% và 45,4% (Fig. 10b); trong khi đó phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và

G₂/M trong trường hợp được ủ với cao chiết NK1313 lần lượt là 61,5%; 27,6% và 8,1% (Fig. 10c).

Kết quả phân tích cho thấy cao chiết NK1313 có khả năng bắt giữ chu trình tế bào ung thư HeLa tại pha S/G₂, với phần trăm tế bào HeLa trong pha S/G₂ cao gấp gần 2 lần so với phần trăm tế bào đối chứng âm ở trong pha này (Fig. 10d): Đây là một kết quả rất ấn tượng, thể hiện tiềm năng ứng dụng các hợp chất có trong sinh khối khô của chủng NK1313 trong ức chế tế bào ung thư cổ tử cung. Trong khi đó, paclitaxel thể hiện khả năng bắt giữ chu trình tế bào ở cả hai pha S/G₂ và G₂/M, với phần trăm tế bào bị bắt giữ trong pha S/G₂ và G₂/M cao gấp lần lượt 2 lần và 2,4 lần so với phần trăm tế bào đối chứng âm ở trong hai giai đoạn này do paclitaxel là một thuốc điều trị ung thư hiệu quả, với nhiều cơ chế tác dụng đã được chứng minh.

E. Phân tích khả năng kháng vi khuẩn S. aureus

Cao chiết NK1313 được hoà tan lại trong dung môi metanol 99,8% và đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *S. aureus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách trộn 100 µL vi khuẩn (mật độ 10⁶ CFU/ml) vào 15 mL môi trường LB thạch cải tiến ở 45°C và rót ra đĩa Petri. Các đĩa giấy (đã tẩm 2 mg cao chiết trong 50 µL dung môi metanol) và đĩa giấy làm đối chứng âm (tẩm 50 µL dung môi metanol), sau khi đã loại dung môi được đặt lên bề mặt đĩa thạch và ủ trong 3h ở 4°C. Tiếp theo, đĩa thử hoạt tính được giữ trong tủ ẩm 37°C trong 18 h rồi nhuộm vi khuẩn với iodonitrotetrazolium chloride (INT). Kết quả cho thấy, cao chiết NK1313 ở hàm lượng 2 mg/đĩa giấy có khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* gây bệnh ở người với đường kính vòng vô khuẩn là 10 mm (được minh hoạ ở Fig. 11). Như vậy, có thể kết luận chủng vi khuẩn lam NK1313 có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế vi khuẩn Gram dương *S. aureus*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn NK1313

Mẫu đất bề mặt (2 cm x 2 cm) của ruộng lúa (đã thu hoạch) được thu và bảo quản trong ống nhựa vô trùng và đem về phòng thí nghiệm để nuôi làm giàu vi khuẩn lam trong vòng 24h. Mẫu đất được hoà tan trong môi trường dinh dưỡng khoáng BG0 (thiếu nitrat) và cấy ria lên đĩa thạch petri chứa BG0 để chọn lọc các chủng vi khuẩn quang tự dưỡng có khả

năng cố định nitơ, đồng thời hạn chế các chủng vi khuẩn phổ biến khác mọc trên bề mặt đĩa thạch. Sau 2 tuần nuôi cấy ở điều kiện ánh sáng $20 \mu\text{mol. m}^{-2} .\text{s}^{-1}$, các đĩa Petri đã xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh lam đặc trưng. Từng khuẩn lạc được quan sát ở kính hiển quang học với độ phóng đại 40X để chọn lọc khuẩn lạc chỉ chứa một loại dạng sợi khuẩn lam và cấy trải tiếp sang đĩa Petri chứa BG0. Quá trình cấy chuyển được lặp lại 5 lần để đảm bảo thu được các khuẩn lạc độ thuần về mặt hình thái khi quan sát dưới kính hiển vi quang học. Khuẩn lạc chứa sợi (trichome) tạo các phân nhánh giả và hình dạng tế bào như được thể hiện trong Fig. 2a, 2d được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn lam NK1313.

Dựa vào hình thái tế bào và trichome của chủng vi khuẩn lam thu được trên môi trường thạch BG0, chủng NK1313 có thể được xếp vào chi *Scytonema* (Komarek, 2014).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn lam NK1313 bằng cách xác định trình tự đoạn gen rARN 16S theo phương pháp PCR lồng với hai cặp mồi 2F/1R và 2F/6R nhằm làm tăng tính đặc hiệu của sản phẩm PCR.

- Chủng NK1313 được nuôi trong BG11 và thu sinh khối trong giai đoạn đang tăng trưởng (sau 2 tuần nuôi cấy) bằng phương pháp ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 8 phút. Sinh khối tươi được trộn đều trong 400 μL đệm TE (có thành phần là 10mM Tris HCl pH 8, 0,1mM EDTA) và ly tâm ở 13000 vòng/ phút trong 5 phút để loại muối. ADN của chúng được tách theo quy trình như sau: i) Bổ sung 200 μL đệm Edwards (200 mM Tris; pH 8,0; 200mM NaCl; 25 mM EDTA và 0,5% SDS) vào ống eppendorf chứa 50 mg sinh khối tươi và vortex trong 15 phút, sau đó thêm 300 μL đệm Edwards và vortex tiếp 5 trong phút để phá vỡ thành tế bào; ii) Ủ ở 100°C trong 10 phút để giải phóng ADN; iii) Ly tâm ở 13000 vòng/ phút/ 4°C trong 5 phút rồi hút 400 μL dịch nổi sang một ống eppendorf mới; iv) Protein được loại bỏ bằng cách bổ sung 400 μL PCI (Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol - 25:24:1, v/v), đảo nhẹ mẫu trong 5 phút để tránh đứt gãy ADN, sau đó ly tâm 13.000 vòng/ 4°C trong 5 phút, thu 350 μL dịch nổi (pha trên cùng) vào ống eppendorf mới; v) Protein được loại bỏ hoàn toàn bằng cách thêm 350 μL chloroform vào dung dịch, đảo nhẹ rồi ly tâm ở 13000 vòng/phút/ 4°C trong 5 phút, thu dịch 300 μL dịch nổi vào ống eppendorf mới; vi) Bổ sung 300 μL isopropanol vào ống

eppendorf, đảo nhẹ 5-6 lần và giữ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút để rửa ADN; vii) Ly tâm ở 13000 vòng/ phút/4°C trong 5 phút để thu rửa ADN; viii) Bổ sung 500 µL etanol 70%, đảo nhẹ 2-3 lần rồi ly tâm ở 13000 vòng/ phút/ 4°C trong 5 phút để làm sạch và rửa ADN; ix) Làm khô ADN ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và hoà tan lại trong 100 µL H₂O và bảo quản ở - 20 °C.

Các cặp mồi được sử dụng để định danh chủng vi khuẩn là hai cặp mồi 2F/1R và 2F/6R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen rARN 16S ở vi khuẩn lam (Theo Boyer và cộng sự, 2001). Quá trình nhân đoạn gen rARN 16S được thực hiện qua 2 phản ứng chuỗi PCR liên tiếp; trong đó, ADN tổng số (tách từ tế bào vi khuẩn lam) được sử dụng cho lần PCR thứ nhất với cặp mồi 2F/1R; sản phẩm PCR lần thứ nhất được sử dụng để làm khuôn cho lần PCR thứ 2 với cặp mồi 2F/6R. Trình tự của các mồi này như sau:

Mồi xuôi 2F: 5'-GGG GGA TTT TCC GCA ATG GG-3'

Mồi ngược 1R: 5'-CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC-3'

Mồi ngược 6R: 5'-GAC GGG CCG GTG TGT ACA-3'

ADN thu được từ chủng vi khuẩn lam được thực hiện nhân đoạn gen dài bao gồm cả gen rARN 16S và đoạn ITS bằng phương pháp PCR (PCR lần thứ nhất) với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng (µL):

Hỗn hợp phản ứng 2X (master mixes) hãng GoTaq®:	15,0 µL
Mồi xuôi (10 pM):	1,0 µL
Mồi ngược (10 pM):	1,0 µL
ADN khuôn:	1,0 µL
H ₂ O khử ion:	12,0 µL
Tổng thể tích:	30 µL

Chu trình nhiệt:

- Bước 1: 95 °C (2 phút)
- Bước 2: 95 °C (20 s)
- Bước 3: 56 °C (20 s)

Bước 4: 72 °C (1 phút 30 s)

Bước 5: Lặp lại 40 lần từ bước 2 đến bước 4

Bước 6: 72 °C (10 phút)

Bước 7: Bảo quản ở - 20 °C

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen rARN 16S từ ADN tổng số của chủng được đã được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1% (đã bổ sung 1 μ L thuốc nhuộm redsafe trong 15 mL agarosa), trong thời gian 25 phút, hiệu điện thế 100 V. Sau đó, bản gel được soi dưới tia tử ngoại (UV) và chụp ảnh. Độ dài của sản phẩm PCR được nhân lên bằng cặp mồi 2F/1R có kích thước 1600 bp. Sản phẩm PCR này được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR lần 2 với cặp mồi 2F/6R và các thành phần phản ứng (ngoại trừ mồi ngược) cũng như chu trình nhiệt giống như phản ứng PCR lần thứ nhất. Sản phẩm PCR lần thứ hai được kiểm tra trên gel agarosa 1% cho thấy kích thước tương ứng với đoạn gen rARN 16S và được thể hiện trên Fig. 3.

Sản phẩm nhân đoạn gen rARN 16S được gửi sang hãng 1st BASE, Singapo để xác định trình tự nucleotit theo phương pháp của Sanger. Sử dụng các phần mềm Bioedit và Mega7 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn lam NK1313.

Trình tự gen rARN 16S của chủng NK1313 có kích thước 969 nucleotit được xác định như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Trình tự đoạn gen rARN 16S của chủng NK1313 có mức độ tương đồng 99,8% với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS (mã kí hiệu gen KT222810 trong Genbank). Mối quan hệ phát sinh chủng-loài của chủng NK1313 với một số chủng vi khuẩn lam dựa trên trình tự gen rARN 16S đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 6.

Bên cạnh đoạn gen rARN 16S, đoạn gen *rbcL* và ITS cũng được nhân lên và xác định trình tự nhằm cung cấp thêm các đặc điểm sinh học phân tử của chủng NK1313.

ADN thu được từ chủng vi khuẩn lam được thực hiện nhân đoạn gen *rbcL* đặc hiệu cho sinh vật quang tự dưỡng với cặp mồi xuôi *rbcLF* (5'-GAC TTC ACC AAA GAY GAC GAA AAC AT-3') và mồi ngược *rbcLR* (5'- GAA CTC GAA CTT RAT YTC TTT-3'). Ngoài trừ cặp mồi *rbcLF/rbcLR* được sử dụng thay thế, các thành phần phản ứng khác và

chu trình nhiệt được thực hiện giống như phương pháp PCR lần thứ nhất. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa 1% cho thấy kích thước tương ứng với đoạn gen *rbcL* và được thể hiện trên Fig. 5. Sản phẩm nhân đoạn gen *rbcL* được gửi sang hãng 1st BASE (Singapo) để xác định trình tự nucleotit theo phương pháp của Sanger. Trình tự gen *rbcL* của chủng NK1313 có kích thước 794 nucleotit được xác định như nêu trong SEQ ID NO: 2.

Trình tự đoạn gen *rbcL* của chủng NK1313 có mức độ tương đồng 99,4% với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS (mã kí hiệu gen KT222811 trong Genbank). Mối quan hệ phát sinh chủng-loài của chủng NK1313 với một số chủng vi khuẩn lam dựa trên trình tự gen *rbcL* đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 7.

Sản phẩm PCR lần thứ nhất cũng được dùng làm khuôn để nhân đoạn gen ITS với cặp mồi bằng mồi xuôi 5F (5'- TGTACACACCGGCCCGTC-3') và mồi ngược 1R với thành phần phản ứng (trừ mồi xuôi) và chu trình nhiệt giống phản ứng PCR lần thứ nhất. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa 1% cho thấy kích thước tương ứng với đoạn gen ITS và được thể hiện trên Fig. 4. Sản phẩm nhân đoạn gen ITS được gửi sang hãng 1st BASE (Singapo) để xác định trình tự nucleotit theo phương pháp của Sanger. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen ITS từ ADN tổng số của chủng NK1313 đã được xác định trình tự có kích thước 536 nucleotit. Tuy nhiên, do thiếu trình tự tham chiếu của đoạn gen ITS từ chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS trong Genbank nên trình tự đoạn gen này được so sánh với trình tự tương ứng của chủng *Scytonema pachmarhiense* 10A1_PS (mã ký hiệu gen MH260366) cho kết quả độ tương đồng là 87%. Trình tự đoạn gen ITS của chủng NK1313 được xác định như nêu trong SEQ ID NO: 3. Đây là dữ liệu mới, bổ sung thêm đặc điểm về sinh học phân tử cho các chủng vi khuẩn lam gần gũi với chủng *Scytonema bilaspurense* 10C_PS.

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái tế bào, sợi (trichome) và so sánh trình tự gen ARN 16S và gen *rbcL* thì chủng NK1313 thuộc chi *Scytonema* và được đặt tên là *Scytonema* sp. NK1313.

Ví dụ 2: Chuẩn bị cao chiết metanol từ sinh khối khô của chủng NK1313 (cao chiết NK1313)

Chủng vi khuẩn lam NK1313 được nuôi trong môi trường BG11 (có thành phần như đã mô tả ở trên) bằng cách dùng pipett thủy tinh hút 5 mL huyền phù chủng NK1313 ($OD_{740} = 1$) vào mỗi bình tam giác (thể tích 500 mL) chứa 250 mL môi trường BG11. Các bình nuôi này được đặt trong chu kỳ chiếu 14 giờ sáng: 10 giờ tối, với cường độ $30 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sau 6 tuần, sinh khối được thu bằng cách ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút/20 °C trong 10 phút và làm khô bằng phương pháp đông khô. Quá trình đông khô được thực hiện bằng cách đặt sinh khối tươi trong tủ - 80 °C trong 48 giờ rồi chuyển sang tủ hút chân không để làm thăng hoa hơi nước ở bề mặt và bên trong tế. Sau đó, 5g sinh khối khô được thấm ướt trong dung môi metanol 99.8% (Merck- Germany) và nghiền nhỏ trong cối sứ trong 5 phút thành hỗn hợp đồng nhất. Hỗn hợp này được bổ sung 200 mL dung môi metanol 99.8% và chuyển sang bình tam giác (thể tích 500 mL) để siêu âm 30 phút rồi ngâm lắc tiếp 30 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút/20 °C trong 8 phút để thu dịch dịch nổi; phần cặn tiếp tục được chiết rút hai lần nữa trong 200 mL metanol 99.8% với việc lặp lại các bước siêu âm-lắc-ly tâm. Kết quả thu được 600 mL dịch nổi từ 3 lần tách chiết chứa các chất hòa tan từ sinh khối khô được gọi là dịch chiết metanol. Dịch chiết này được loại dung môi bằng máy cất quay chân không kết hợp với sấy ở 40 °C để thu được 0,4 g cao chiết metanol của chủng NK1313 sau đây gọi là cao chiết NK1313. Cao chiết này chứa các hoạt chất sinh học thu được từ sinh khối khô của chủng vi khuẩn lam NK1313.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng ức chế tăng sinh dòng tế bào ung thư bởi cao chiết NK1313

Tế bào tế bào ung thư cổ tử cung HeLa hoặc tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 được nuôi trong đĩa 96 giếng nhưng trong hai loại môi trường khác nhau. Trong đó, tế bào ung thư cổ tử cung HeLa được nuôi trong môi trường DMEM (PAN – Biotech, Đức) và được ủ với 9 nồng độ cao chiết metanol trong khoảng từ 0,06 $\mu\text{g/mL}$ đến 168,0 $\mu\text{g/mL}$; còn tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 được nuôi trong môi trường RPMI-1640 (Sigma – Aldrich, Mỹ) và ủ với 6 nồng độ cao chiết metanol trong khoảng từ 3,125 $\mu\text{g/mL}$ đến 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Các môi trường nuôi trước khi sử dụng nuôi cấy đều được bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) và 1% dung dịch kháng sinh Penicillin/Streptomycin (ở hàm lượng 10 000 đơn vị Penicillin G và 10 mg Streptomycin trong 1 mL dung dịch) với thành phần như sau:

Thành phần	DMEM – P0404515	RPMI-1640
	(g/L)	(g/L)
<u>Chất dinh dưỡng vô cơ</u>		
CaCl ₂	0,2	-
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	-	0,1
MgSO ₄	0,04884	0,09766
Fe(NO ₃) ₃ × 9 H ₂ O	0,0001	-
KCl	0,4	0,4
NaCl	6,4	6,0
NaHCO ₃	3,7	2,0
Na ₂ HPO ₄	0,10869	0,8
<u>Các axit amin</u>		
L-Arginin × HCl	0,084	0,2
L-Asparagin × H ₂ O	-	0,05
axit L-Aspartic	-	0,02
L-Cystin × 2 HCl	0,06258	0,0652
axit L-Glutamic	-	0,02
L-Glutamin	0,87	0,3
Glycin	0,03	0,01
L-Histidin × HCl	0,042	0,015
Hydroxy-L-Prolin	-	0,02
L-Isoleucin	0,1048	0,05
L-Leucin	0,1048	0,05
L-Lysin × HCl	0,1462	0,04
L-Methionin	0,03	0,015
L-Phenylalanin	0,066	0,015

L-Prolin	-	0,02
L-Serin	0,042	0,03
L-Threonin	0,0952	0,02
L-Tryptophan	0,016	0,005
L-Tyrosin $\times 2 \text{ Na} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,10379	0,02883
L-Valin	0,0936	0,02
<u>Các vitamin</u>		
D-Biotin	-	0,0002
Choline chloride	0,004	0,003
axit folic	0,004	0,001
myo-Inositol	0,007	0,0035
Niacinamit	0,004	0,001
axit D-Pantothenic (hemicacium)	0,004	0,00025
Pyridoxal $\times \text{HCl}$	0,004	0,001
Riboflavin	0,0004	0,0002
Thiamin $\times \text{HCl}$	0,004	0,001
Vitamin B ₁₂	-	0,000005
<u>Các thành phần khác</u>		
D-Glucoza	6,4	2,0
HEPES	-	4,77
Phenol red $\times \text{Na}$	0,015	0,0053

Đối chứng dương là các tế bào được ủ với hợp chất ức chế ung thư paclitaxel, còn đối chứng âm là các tế bào được ủ với dung môi DMSO dùng để hoà tan cao chiết NK1313. Quá trình đánh giá hoạt tính được thực hiện trong 4 ngày liên tục theo quy trình sau:

Ngày thứ nhất – Gieo tế bào ung thư vào đĩa 96 giếng: i) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong bình nuôi gốc (T25); ii) Rửa tế bào hai lần với đệm PBS 1X; iii) Bổ sung 1mL trypsin để tách rời tế bào với nhau và

tách khỏi bề mặt đáy của bình T25; iv) Bỏ sung 2 mL môi trường nuôi cấy để bất hoạt trypsin; v) Hút 20 μ L huyền phù tế bào ra để kiểm tra số lượng bằng cách sử dụng buồng đếm dưới kính hiển vi soi ngược; vi) Ly tâm để thu tế bào ở thu tế bào ở tốc độ 4000 vòng/phút/25 °C trong 10 phút; vii) Bỏ sung 200 μ L huyền phù chứa 5×10^3 tế bào vào mỗi giếng; viii) Đặt đĩa 96 giếng trong tủ ẩm 37 °C chứa 5% CO₂ và độ ẩm 90% trong 24h.

Ngày thứ hai – Ủ tế bào ung thư với cao chiết NK1313: i) Bỏ sung 50 μ L mỗi nồng độ dịch chiết vào ba giếng tế bào liên tiếp, các giếng đối chứng âm bỏ sung DMSO ở nồng độ 0,5%; ii) Ủ tế bào trong 48h ở 37 °C, 5% CO₂ và độ ẩm 90%.

Ngày thứ 4 – Xác định tỷ lệ sống sót của tế bào bằng thuốc thử MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide): i) Hoà tan MTT bằng đệm PBS 1X ở nồng độ 0,5 mg/mL; ii) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong mỗi giếng; iii) Rửa tế bào hai lần với đệm PBS 1X; iv) Bỏ sung 200 μ L dung dịch MTT vào mỗi giếng; v) Đặt đĩa 96 giếng này trong 4 giờ ở 37 °C, 5% CO₂ và độ ẩm 90%; vi) Loại bỏ dung dịch MTT và bỏ sung 100 μ L DMSO vào mỗi giếng để hoà tan tinh thể xanh – tím trong tế bào sống sót; vii) Đo độ hấp thụ ở 2 bước sóng 570nm and 690 nm; viii) Xác định tỷ lệ sống sót của tế bào theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ tế bào sống (\%)} = \frac{(A_{570} - A_{690}) \text{ của mỗi giếng thí nghiệm}}{\text{giá trị trung bình } [(A_{570} - A_{690}) \text{ của đối chứng âm}]} \times 100\%$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi dòng tế bào. Các giá trị OD hiển thị được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 8 để xác định chỉ số IC₅₀. Kết quả cho thấy, cao chiết NK1313 chứa hoạt chất có khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa và tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với chỉ số IC₅₀ lần lượt là 3,6 μ g/mL và 34,2 μ g/mL.

Ví dụ 4: Đánh giá khả năng gây chết tế bào ung thư HeLa theo con đường apoptosis bởi cao chiết NK1313

Tế bào ung thư cổ tử cung HeLa được nuôi trong bình nhựa T25, môi trường DMEM (có thành phần như mô tả ở trên) và được ủ với cao chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 μ g/mL (tại giá trị IC₅₀). Đối chứng dương là tế bào ủ với hợp chất kháng ung thư paclitaxel, còn đối chứng âm là tế bào ủ với DMSO. Quy trình đánh giá khả năng gây chết tế bào theo con

đường apoptosis được thực hiện giống nhau ở các nhóm đối chứng dương, đối chứng âm và nhóm tế bào ủ với dịch chiết metanol NK1313 trong 3 ngày liên tục như theo sau:

Ngày thứ nhất – Gieo tế bào ung thư vào bình T25: i) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong bình nuôi gốc (T75); ii) Rửa tế bào hai lần với đệm PBS 1X; iii) Bổ sung 4 mL trypsin để tách rời tế bào với nhau và tách khỏi bề mặt đáy của bình T75; iv) Bổ sung 10 mL môi trường nuôi cấy để bất hoạt trypsin; v) Hút 20 μ L huyền phù tế bào ra để kiểm tra số lượng bằng cách sử dụng buồng đếm và kính hiển vi; vi) Ly tâm để thu tế bào ở thu tế bào ở tốc độ 1200 vòng/phút/25 °C trong 5 phút; vii) Bổ sung 7 mL huyền phù chứa 5×10^5 tế bào vào bình T25; viii) Đặt bình nuôi T25 trong tủ ẩm 37 °C chứa 5% CO₂ và độ ẩm 90% trong 24 giờ.

Ngày thứ hai – Ủ tế bào ung thư với dịch chiết metanol NK1313/paclitaxel/DMSO: i) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong bình nuôi (T25); ii) Rửa tế bào một lần với đệm PBS 1X; iii) Bổ sung 7 mL môi trường có chứa dịch chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 μ g/mL (tại giá trị IC₅₀), đối chứng dương là tế bào ủ với paclitaxel ở nồng độ 13nM (tại giá trị IC₅₀), đối chứng âm là tế bào ủ với DMSO ở nồng độ dùng để hòa tan cao chiết metanol NK1313; iv) Ủ các nhóm tế bào đã được xử lý với dịch chiết/paclitaxel/DMSO trong 24h ở 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm 90%.

Ngày thứ 3 – Xác định khả năng gây chết tế bào ung thư HeLa theo con đường apoptosis sử dụng kit chứa annexin V và chất nhuộm huỳnh quang PI (Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry, Invitrogen, Mỹ) bằng cách thực hiện lần lượt các bước sau:

Bước 1 - Thu tế bào: i) hút dịch nuôi từ bình T25 vào các ống falcol 15 vô trùng để thu các tế bào chết (bong ra khỏi bề mặt đáy); ii) Rửa bằng 3 mL PBS 1X và trộn cùng với phần dịch nổi vừa thu; iii) thêm 1 mL trypsin và bình T25 để để tách rời tế bào với nhau và tách khỏi bề mặt đáy; iv) Bất hoạt trypsin bằng 4 mL môi trường sau khi toàn bộ tế bào đã tách khỏi đáy bình nuôi; v) Đếm số lượng tế bào trong 20 μ L (dịch nổi/huyền phù tế bào thu từ phần bám vào đáy bình T25) bằng cách sử dụng buồng đếm hồng cầu và kính hiển vi sau khi nhuộm tế bào với trypan blue, từ đó xác định số lượng tế bào sống/chết trong từng phần; vi) Thu tế bào tổng số (từ phần dịch nổi và phần huyền phù tế bào bám đáy)

bằng cách ly tâm ở 1200 vòng/phút/25 °C trong 5 phút; vii) Rửa tế bào tổng số thu được bằng PBS 1X lạnh.

Bước 2. Chuẩn bị đệm liên kết annexin 1X (Ví dụ, đối với ~ 10 phản ứng cần 1 mL đệm liên kết annexin 5X vào 4 mL nước khử ion).

Bước 3. Chuẩn bị dung dịch PI 100 µg/mL bằng cách pha loãng 5 µL dung dịch gốc PI 1 mg/mL vào trong 45 µL đệm liên kết annexin 1X.

Bước 4. Ly tâm lại các tế bào đã rửa sạch (ở bước 1), loại bỏ phần nổi phía trên và hòa phần cặn tế bào trong đệm liên kết annexin 1X với nồng độ ~ 1×10^6 tế bào/mL.

Bước 5. Thêm 5 µL Alexa Fluor® 488 annexin V và 1 µL dung dịch PI 100 µg/mL (đã chuẩn bị ở bước 3) cho mỗi 100 µL huyền phù tế bào. Dùng giấy bạc để bọc từng ống thí nghiệm.

Bước 6. Ủ tế bào ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

Bước 7. Sau thời gian ủ, thêm 400 µL đệm liên kết annexin 1X, trộn nhẹ nhàng bằng pipet và giữ mẫu trên đá.

Bước 8. Phân tích các tế bào đã được nhuộm màu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (flow cytometry). Độ phát xạ huỳnh quang được đo ở bước sóng 530 nm và 575 nm (hoặc tương đương) với bước sóng kích thích là 488 nm. Xác nhận kết quả đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách xem kết quả số lượng tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang sử dụng bộ lọc thích hợp cho fluorescein (FITC) và Phycoerythrin (PE).

Kết quả thí nghiệm cho thấy cao chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 µg/mL làm tăng số tế bào HeLa bị apoptosis lên 1,5 lần, trong khi đó thuốc điều trị ung thư paclitaxel (đối chứng dương) ở nồng độ 13,5 nM có khả năng làm tăng số tế bào HeLa bị apoptosis lên 3 lần (Fig. 9d). Kết quả này cho thấy chủng NK1313 đã sinh tổng hợp các hợp chất có khả năng phát triển thành thuốc điều trị ung thư cổ tử cung HeLa thông qua khả năng kích hoạt con đường apoptosis ở tế bào ung thư.

Ví dụ 5: Đánh giá khả năng làm dừng chu trình tế bào bởi cao chiết NK1313

Tế bào ung thư cổ tử cung HeLa được nuôi trong bình nhựa T25, môi trường DMEM (có thành phần như mô tả ở trên) và được ủ với cao chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 µg/mL (tại giá trị IC₅₀). Đối chứng dương là tế bào ủ với hợp chất kháng ung thư paclitaxel, còn

đối chứng âm là tế bào ủ với DMSO. Quy trình đánh giá khả năng gây chết tế bào theo con đường apoptosis được thực hiện giống nhau ở các nhóm đối chứng dương, đối chứng âm và nhóm tế bào ủ với dịch chiết metanol NK1313 trong 3 ngày liên tục như theo sau:

Ngày thứ nhất – Gieo tế bào ung thư vào bình T25: i) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong bình nuôi gốc (T75); ii) Rửa tế bào hai lần với đệm PBS 1X; iii) Bổ sung 4 mL trypsin để tách rời tế bào với nhau và tách khỏi bề mặt đáy của bình T75; iv) Bổ sung 10 mL môi trường nuôi cấy để bất hoạt trypsin; v) Hút 20 μ L huyền phù tế bào ra để kiểm tra số lượng bằng cách sử dụng buồng đếm và kính hiển vi; vi) Ly tâm để thu tế bào ở thu tế bào ở tốc độ 1200 vòng/phút/25 °C trong 5 phút; vii) Bổ sung 7 mL huyền phù chứa 5×10^5 tế bào vào bình T25; viii) Đặt bình nuôi T25 trong tủ ẩm 37 °C chứa 5% CO₂ và độ ẩm 90% trong 24 giờ.

Ngày thứ hai – Ủ tế bào ung thư với cao chiết NK1313/paclitaxel/DMSO: i) Kiểm tra hình dạng của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và loại bỏ môi trường trong bình nuôi (T25); ii) Rửa tế bào một lần với đệm PBS 1X; iii) Bổ sung 7 mL môi trường có chứa dịch chiết NK1313 ở nồng độ 3,6 μ g/mL (tại giá trị IC₅₀), đối chứng dương là tế bào ủ với paclitaxel ở nồng độ 13 nM (tại giá trị IC₅₀), đối chứng âm là tế bào ủ với DMSO ở nồng độ dùng để hòa tan cao chiết metanol NK1313; iv) Ủ các nhóm tế bào đã được xử lý với dịch chiết/paclitaxel/DMSO trong 24h ở 37 °C, 5% CO₂ và độ ẩm 90%.

Ngày thứ 3 – Xác định khả năng làm dừng chu trình tế bào ung thư HeLa sử dụng PI (Propidium Iodide) của Thermo Fisher Scientific bằng cách thực hiện lần lượt các bước sau:

Bước 1- Thu tế bào: i) Loại bỏ dịch nuôi ở bình T25; ii) Rửa 2 lần bằng 5 mL PBS 1X; iii) thêm 1 mL trypsin vào bình T25 để tách rời tế bào với nhau và tách khỏi bề mặt đáy; iv) Bất hoạt trypsin bằng 4 mL môi trường sau khi toàn bộ tế bào đã tách khỏi đáy bình nuôi; v) Đếm số lượng tế bào trong 20 μ L dịch huyền phù thu từ phần bám vào đáy bình T25 bằng cách sử dụng buồng đếm hồng cầu và kính hiển vi sau khi nhuộm tế bào với trypan blue, từ đó xác định số lượng tế bào sống trong bình T25; vi) Thu tế bào tổng số (từ phần dịch nổi và phần huyền phù tế bào bám đáy) bằng cách ly tâm ở 1200 vòng/ phút/25 °C trong 5 phút; vii) Rửa tế bào tổng số thu được bằng PBS 1X lạnh.

Bước 2. Cố định tế bào với 1 mL etanol lạnh 70% bằng cách thêm từng giọt etanol lạnh vào cụm tế bào và trộn đều bằng pipet để làm tách rời các tế bào được cố định.

Bước 3. Cố định tế bào trong thời gian 30 phút ở 4 °C.

Bước 4. Thu cặn tế bào bằng cách ly tâm 12000 vòng/ phút/25 °C trong 5 phút (cẩn thận loại bỏ phần dịch nổi).

Bước 5. Rửa các tế bào hai lần bằng PBS 1X (thu tế bào sau mỗi lần rửa bằng cách ly tâm 12000 vòng/phút/25 °C trong 5 phút).

Bước 6. Sử dụng ARNaza để loại bỏ RNA để đảm bảo rằng chỉ DNA được nhuộm màu với PI bằng cách thêm trực tiếp 50 µL dung dịch ARNaza A vào phần tế bào thu được ở bước 5.

Bước 7. Bổ sung 400 µL dung dịch chứa 50 µg PI trong 1 mL PBS 1X vào một lượng tương ứng 10^6 tế bào đã được hòa trong dung dịch ARNaza (ở bước 6) và trộn đều bằng pipet.

Bước 8. Ủ hỗn hợp 10 phút ở nhiệt độ phòng (25 °C).

Bước 9. Phân tích mẫu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (flow cytometry). Độ phát xạ huỳnh quang được đo ở bước sóng 617 nm (hoặc tương đương) với bước sóng kích thích là 535 nm. Xác nhận kết quả đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách xem kết quả số lượng tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang sử dụng bộ lọc thích hợp cho Phycoerythrin (PE).

Kết quả phân tích bằng máy đếm tế bào dòng chảy FACSCANTO cho thấy phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và G₂/M trong nhóm đối chứng âm (NC) lần lượt là 64,1%; 14,8% và 18,6% (Fig. 10a); và phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và G₂/M trong nhóm đối chứng dương (PC) lần lượt là 26,1%; 28,5% và 45,4% (Fig. 10b); trong khi đó phần trăm tế bào ở pha G₁, S/G₂ và G₂/M trong trường hợp có xử lý với dịch chiết NK1313 lần lượt là 61,5%, 27,6% và 8,1% (Fig. 10c). Với tỷ lệ phần trăm tế bào HeLa trong pha S/G₂ cao gấp gần 2 lần so với tỷ lệ phần trăm tế bào đối chứng âm ở trong pha này (Fig. 10d), chứng tỏ cao chiết NK1313 chứa hoạt chất có khả năng bắt giữ chu trình tế bào ung thư HeLa tại pha S/G₂.

Ví dụ 6: Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh S. aureus

Cao chiết NK1313 được hoà tan lại trong metanol ở nồng độ 40 mg/mL để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn *S. aureus*. Vi khuẩn *S. aureus* được nuôi trong môi trường LB cải tiến, lắc 150 vòng/phút, ở 37°C trong 18h và được đo độ đục tế bào ở bước sóng 600 nm đạt giá trị $OD_{600} = 1$. Môi trường LB cải tiến có thành phần như sau: cao nấm men (5g/L); casein (5g/L); NaCl (10g/L); aga - thạch (12g/L).

Trước hết, 50 μ L dịch chiết metanol được tẩm lên các đĩa giấy (đường kính 6 mm) và được làm bay hơi hoàn toàn dung môi trong tủ cấy vô trùng trong thời gian 2 h. Đối chứng âm là các đĩa giấy tẩm 50 μ L dung môi metanol rồi cũng được loại dung môi theo cách tương tự. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách trộn 100 μ L vi khuẩn gây bệnh (mật độ 10^6 CFU/mL) vào 15 mL môi trường LB thạch cải tiến (ở 45 °C) và rót ra đĩa petri. Các đĩa giấy chứa cao chiết hoặc đối chứng âm được đặt lên bề mặt đĩa thạch (sau khi đã đông) và ủ trong 3h ở 4 °C. Sau đó, đĩa thử petri được giữ trong tủ ấm 37°C trong 18h để vi khuẩn phát triển. Vi khuẩn trong đĩa petri sẽ hiện màu hồng-cam khi được nhuộm với iodonitrotetrazolium chloride (INT), vùng trong suốt quanh đĩa giấy (vòng vô khuẩn) thể hiện vùng hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết. Đường kính vòng vô khuẩn (bao trùm cả đường kính đĩa giấy) được đo và ghi lại. Kết quả cho thấy, cao chiết NK1313 ở hàm lượng 2 mg/đĩa giấy có khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* gây bệnh ở người với đường kính vòng vô khuẩn là 10 mm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung cung HeLa và gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với hoạt tính ức chế cao, đồng thời có thể gây kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình và làm dừng chu trình tế bào ở pha S/G₂. Điều này cho thấy chủng vi khuẩn lam NK1313 theo sáng chế rất có tiềm năng trong việc phát triển các hoạt chất trong sinh khối khô chủng này thành dạng dược phẩm thương mại ứng dụng trong điều trị ung thư.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu tại ruộng lúa chứa đoạn gen rARN 16S có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1, đoạn gen *rbcL* có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đoạn gen ITS có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3; và có các đặc tính sau:

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa với chỉ số IC_{50} là 3,6 $\mu\text{g/mL}$ và gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 với chỉ số IC_{50} là 34,2 $\mu\text{g/mL}$ khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol;

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây kích hoạt sự chết tế bào ung thư HeLa theo chương trình và làm dừng chu trình tế bào ở pha S/G₂; và

có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 10mm khi sinh khối khô của chủng này được hòa tan trong dung môi metanol.

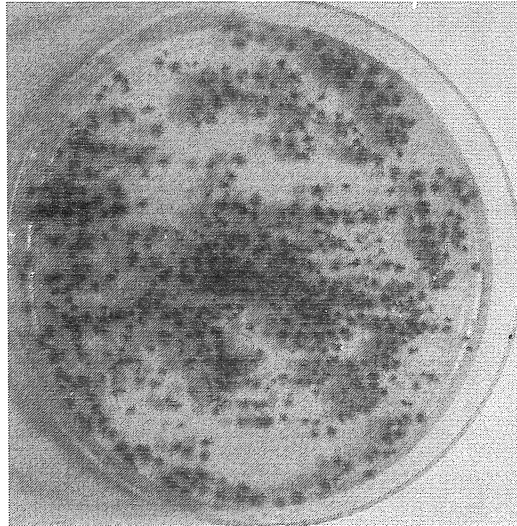


Fig. 1

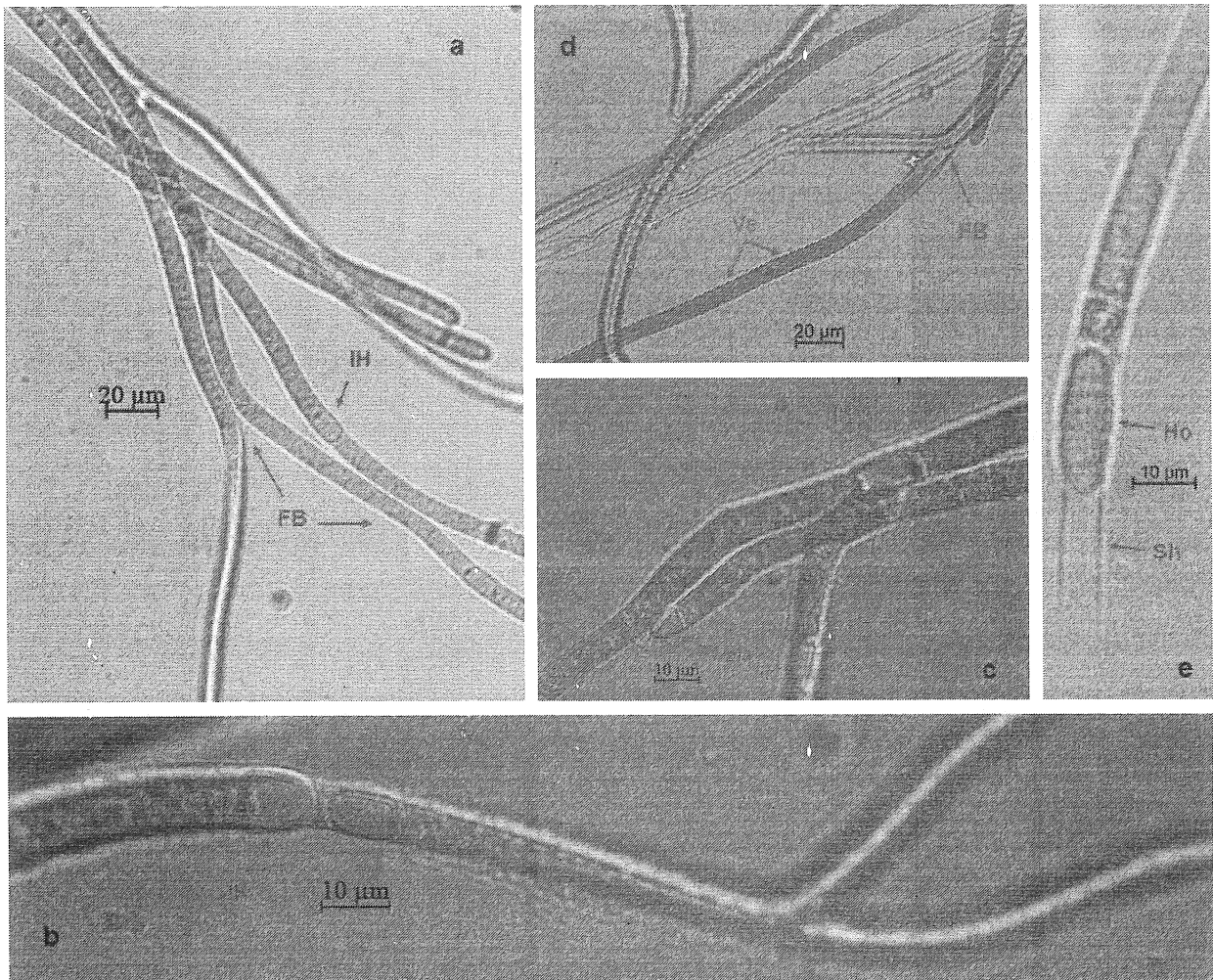


Fig. 2

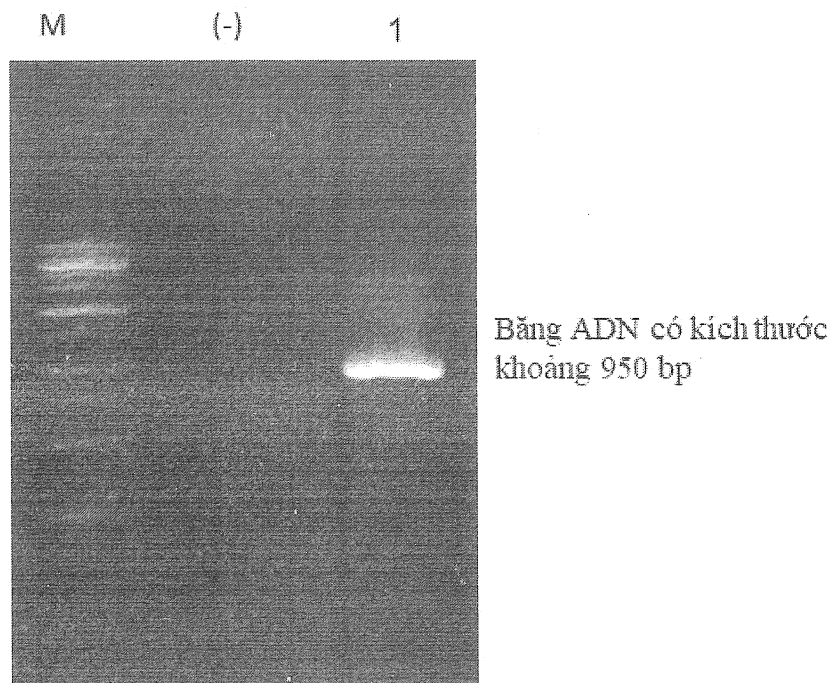


Fig. 3

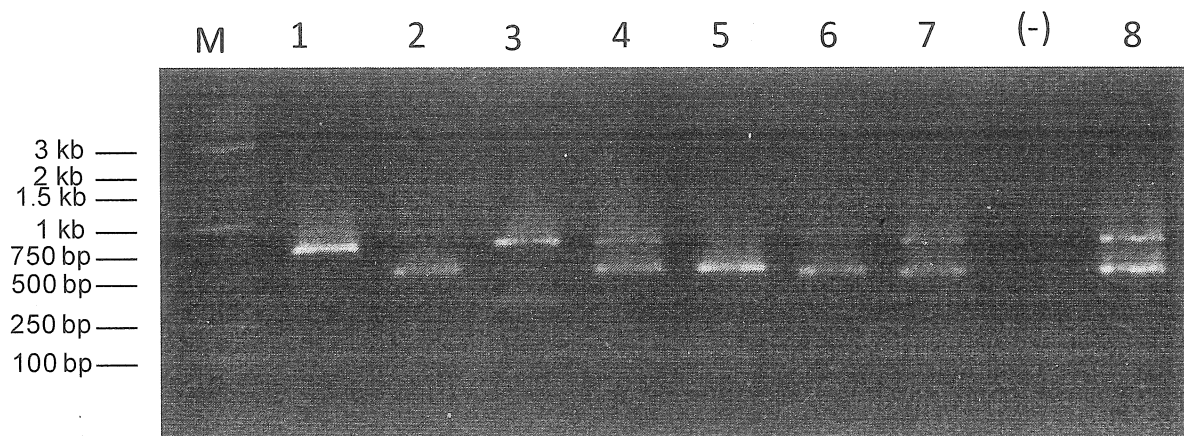
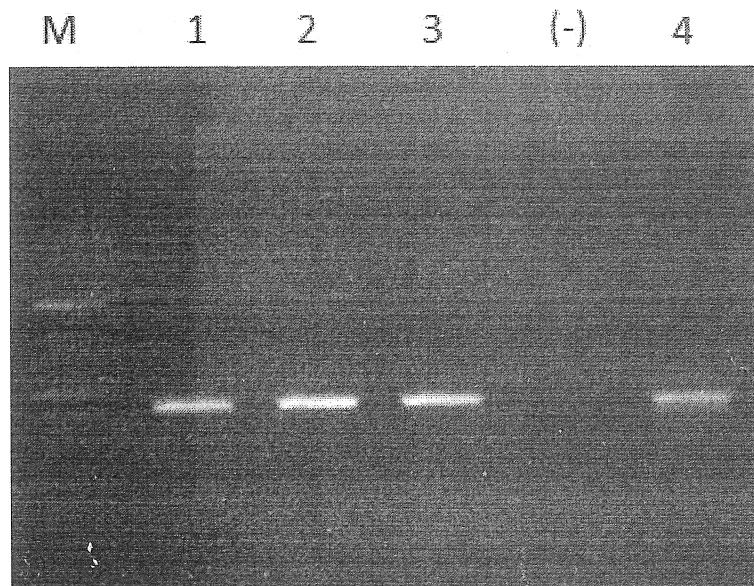


Fig. 4



Băng ADN có kích thước
khoảng 800 bp

Fig. 5.

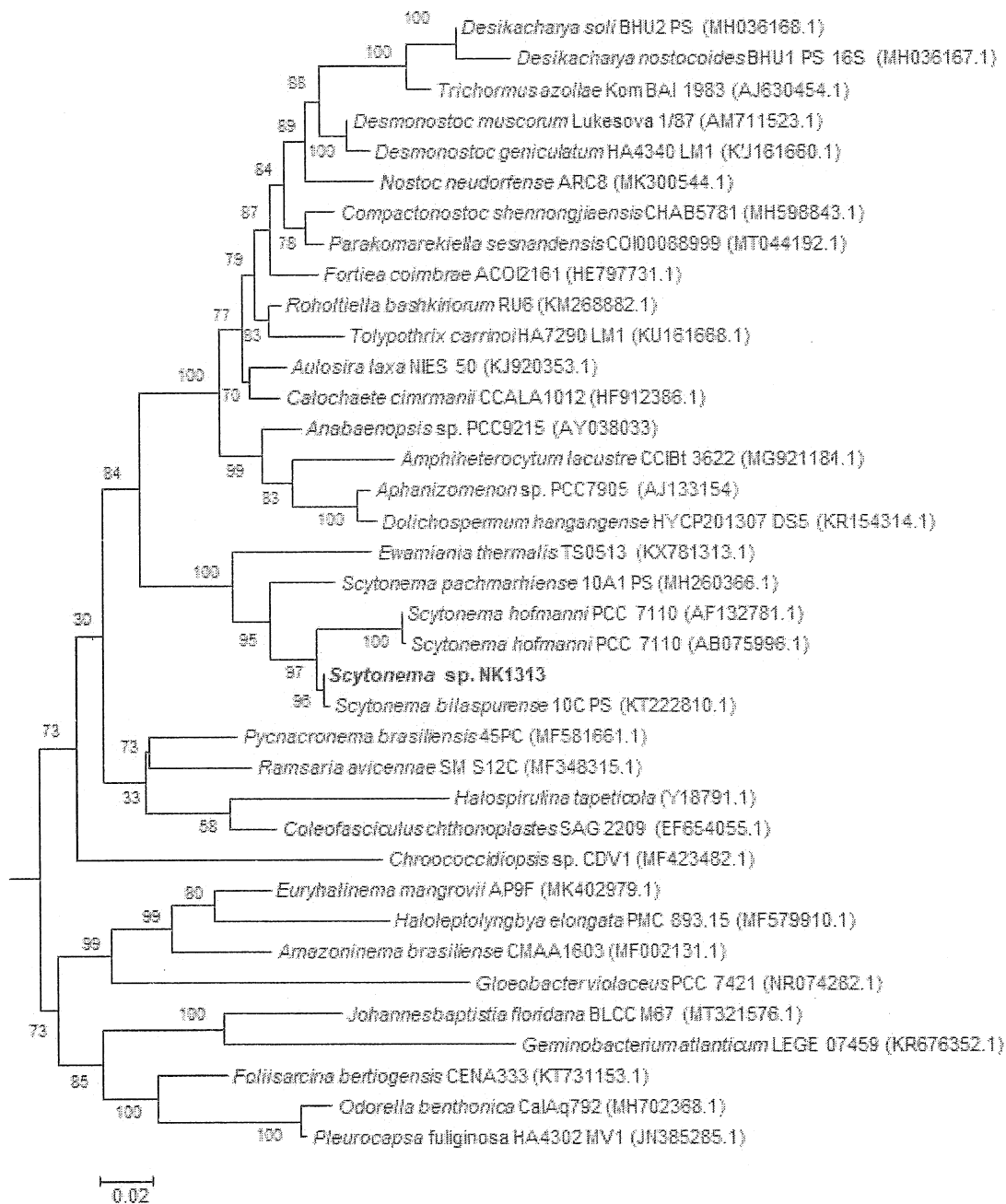


Fig. 6

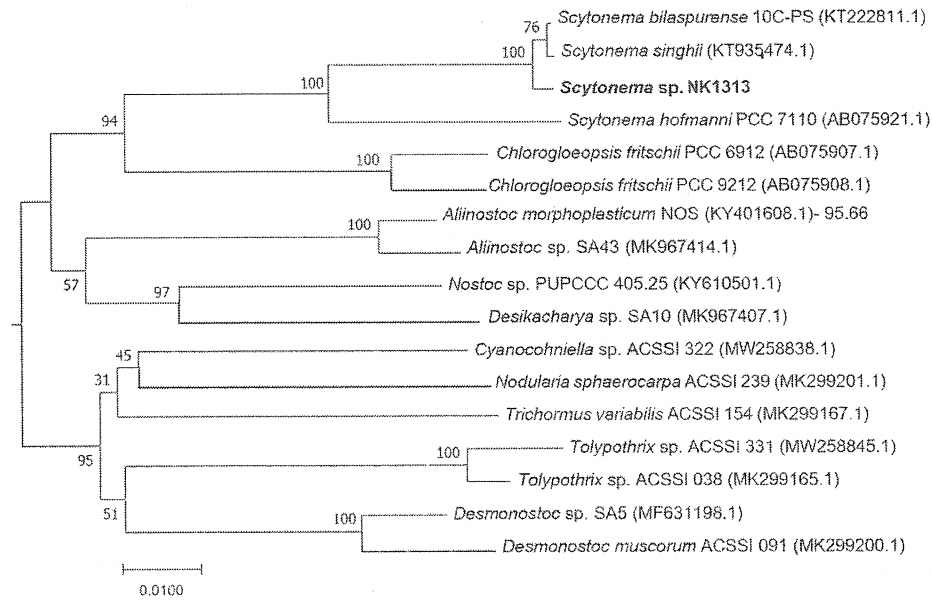


Fig. 7

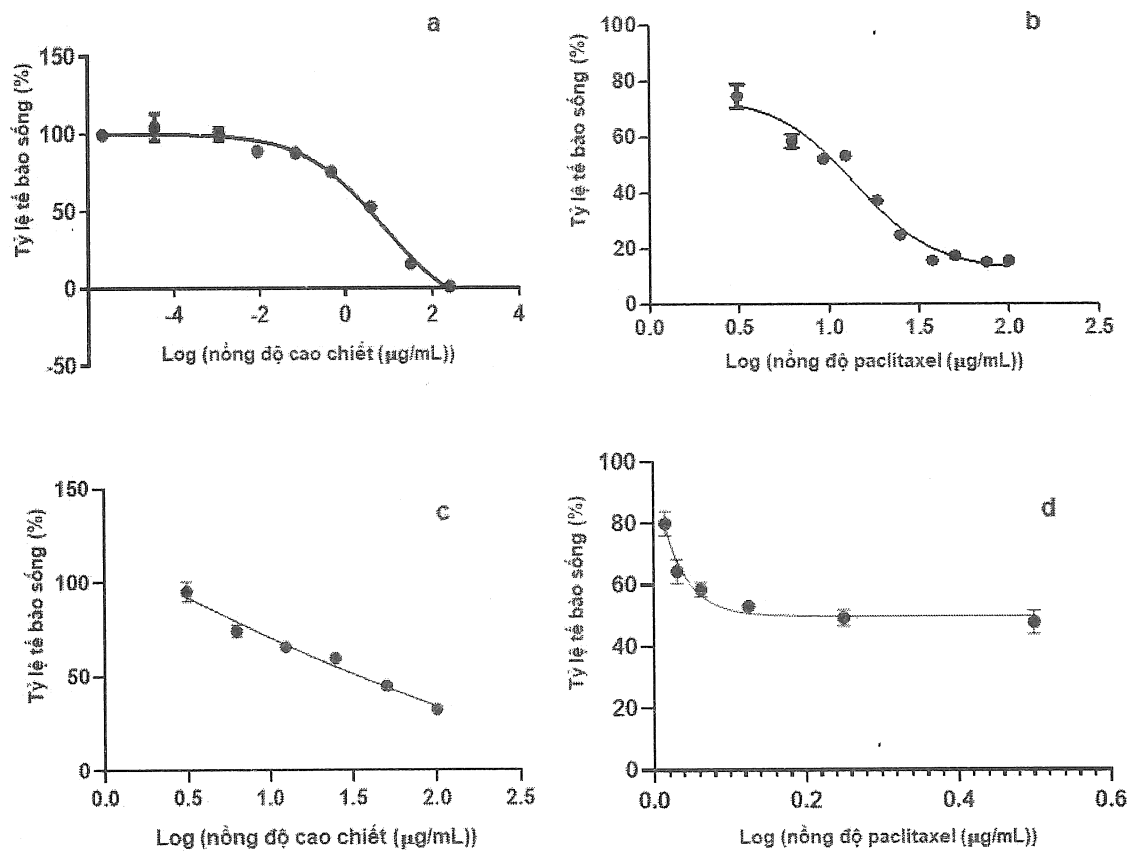


Fig. 8

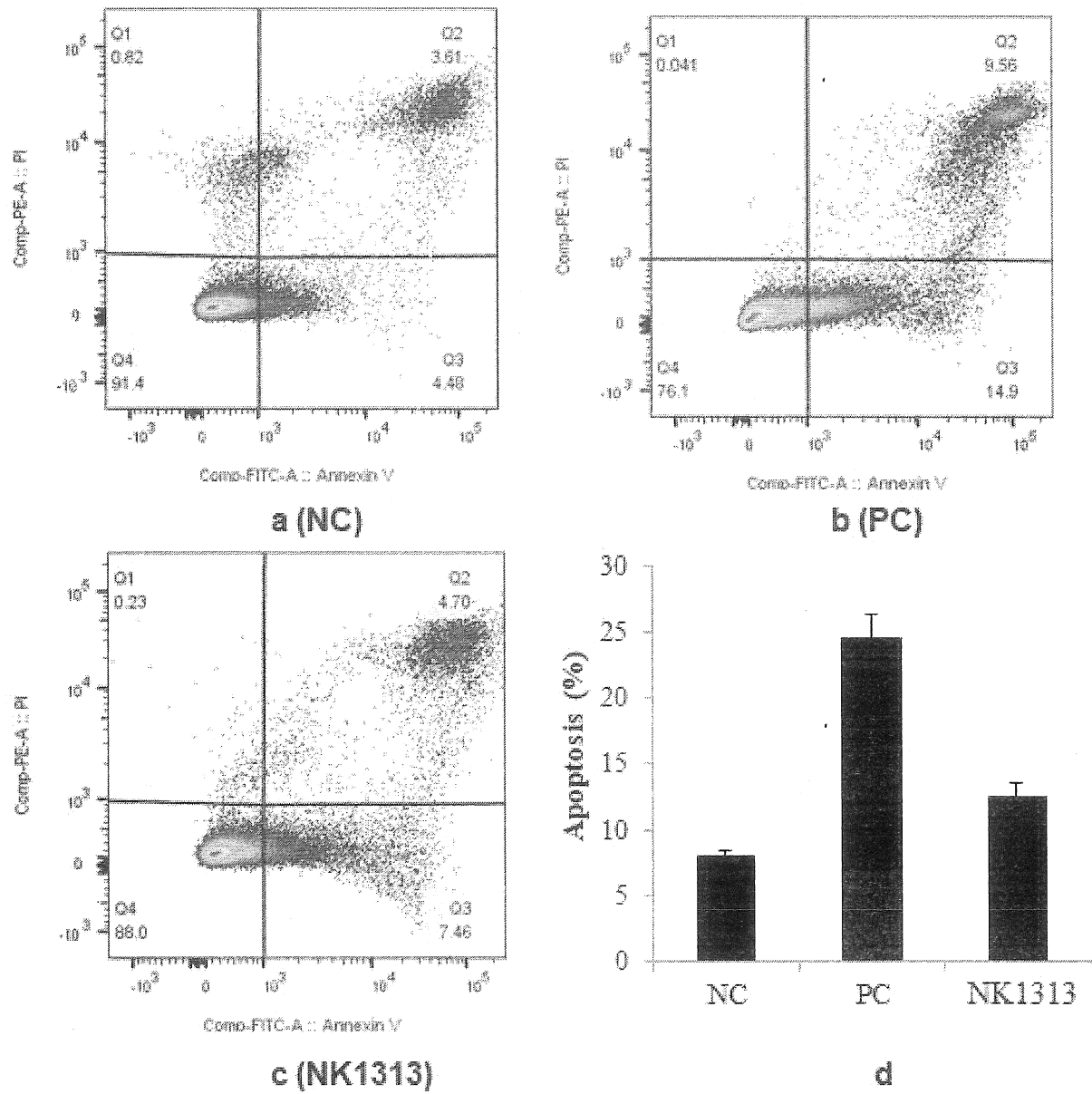


Fig. 9

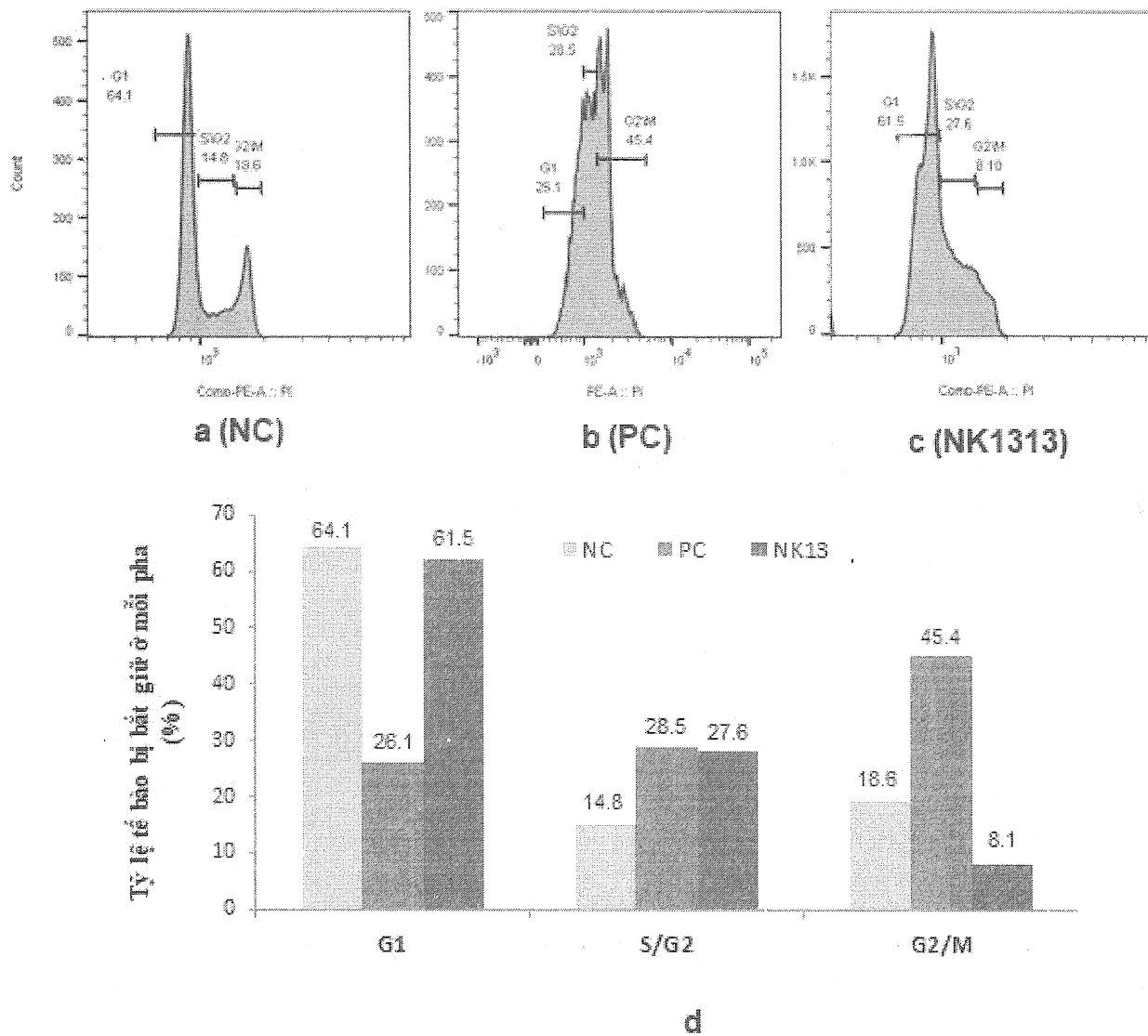


Fig. 10

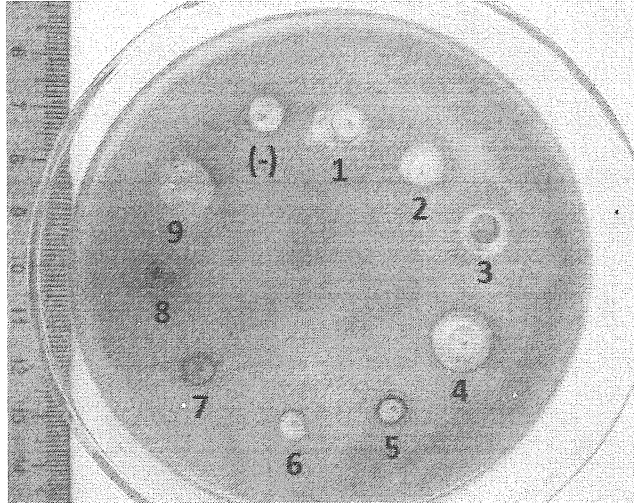


Fig. 11

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> Chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư, kích hoạt sự chết của tế bào ung thư theo chương trình và kháng khuẩn

<160> 3

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 969

<212> ADN

<213> *Scytonema* sp.

<223> Trình tự rARN 16S

<400> 1

```
GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG CTCTTGGGTT GTAACCTCTT TTCTCAGGGA 60
ATAATAAGTT GAAGGTACCT GAGGAATAAG CATCGGCTAA CTCCGTGCCA GCAGCCGCGG 120
TAATACGGAG GATGCAAGCG TTATCCGGAA TGATTGGGCG TAAAGCGTCC GCAGGTGGTT 180
TATCAAGTCT GCTGTCAAAG CGTCTGGCTT AACTAGATAA AGGCAGTGGA AACTGAGAGA 240
CTGGAGTATG GTAGGGGTAG AGGGAATTCC CGGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATCGG 300
GAAGAACACC GGTGGCGAAA GCGCTCTGCT GGACCATAAC TGACACTGAG GGACGAAAGC 360
TAGGGGAGCG AATGGGATTA GATACCCAG TAGTCCTAGC CGTAAACGAT GGATACTAGG 420
CGTTACGCGT ATCGACCCGC GTAGTGCCGG AGCCAACGCG TTAAGTATCC CGCCTGGGGA 480
GTACGCACGC AAGTGTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGTA 540
TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGG CTTGACATGT CGCGAATCTC 600
TCTGAAAGGA GAGAGTGCCT TAGGGAGCGC GAACACAGGT GGTGCATGGC TGTCGTCAGC 660
TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTCGTA CTTAGTTGCC 720
ATCATTAAGT TGGGAACCTCT AAGAAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG 780
ACGTCAAGTC AGCATGCCCC TTACGTCCTG GGCTACACAC GTACTACAAT GCTGTGGACA 840
GAGGGCAGCA AGCTAGTGAT AGCAAGCAAA TCTCACAAAC CACGGCTCAG TTCAGATCGC 900
AGGCTGCAAC TCGCCTGCGT GAAGGTGGAA TCGCTAGTAA TTGCAGGTCA GCATACTGCA 960
GTGAATTCG                                     969
```

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 794

<212> ADN

<213> *Scytonema* sp.

<223> Trình tự đoạn gen *rbcL*

<400> 2

```
GATGACGAAA ACATTAAGTC CGCACCATTG CAACGCTGGC GCGATCGCTT CTTGTTTGTA 60
GCGGATGCTA TTGCCAAGTC ACAAGCAGAA ACTGGTGAAA TCAAAGGTCA CTACCTCAAC 120
GTTACTGCTC CAACCTGCGA AGAAATGCTG AAGCGGGCTG AGTTTGCTAA AGAACTCAAG 180
ATGCCTATCA TCATGCACGA CTACCTAACA GCAGGTTTCA CTGCTAACAC CACATTGGCT 240
CGTTGGTGTC GTGACAACGG TTTGTTGCTC CACATTACCC GCGCTATGCA CGCTGTGATC 300
GACCGTCAAA AGAACCACGG TATCCACTTC CGTGTGTTTG CTAAAGCACT GCGTATGTCT 360
GGTGGTGACC ACATCCACAC CGGAACCGTA GTAGGTAAAG TAGAAGGCGA TCGCGCAATC 420
ACAATGGGAT TTGTTGACTT GTTGCGTGAA AACTACGTCG AGCAAGACAA GTCTCGCGGT 480
ATCTACTTTA CCCAAGACTG GGCTTCTATG CCTGGAGTTA TGGCAGTTGC TTCTGGTGGT 540
ATCCACGTAT GGCACATGCC AGCACTGGTA GAAATCTTTG GTGATGACTC CGTACTGCAG 600
TTCGGTGGTG GAACCCTAGG ACACCCATGG GGTAATGCAC CTGGTGCTAC CGCTAACCGT 660
GTTGCTCTTG AAGCATGTAT CCAAGCTCGT AACGAAGGTC GCAACTTGGC TCGTGAAGGT 720
AACGACGTTA TCCGCGAAGC AGCTAAGTGG TCTCCTGAAT TGGCAGCTGC TTGCGAACTG 780
TGGAAGAAAA TCAG                                     794
```

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 536

<212> ADN

<213> Scytonema sp.

<223> Trình tự đoạn gen ITS

<400> 3

```

GTACACACCG GCCCGTCACA CCATGGAAGC TGGTAGTGCC CGAAGTCGTT ACTCTAACTT 60
TTCGGAGAGG AGGATGCCGA AGGCAGGACT GGTGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
CCGTACCGGA AGGTGTGGCT GGATCACCTC CTTTTAGGGA GACCAACTAA ATTATGAATG 180
ATGAATGGTG AATGATGAAT TCGGAAAATG AGAATTCATG ATTCATAATT AAGAATTCAT 240
AATTTGAGAC ATCCCAGGTC GTGCGAGGTA AAGAAAATTG GCTTTCAAAC TAGTGTGGGT 300
TCGGAAAAAA AACTCAAATG CGTTGATGAG CCGTAAAGCC ATCAAGGGAA GAAATTCAGC 360
AACTTGAAAC CGAGAGGAAC AAGACTGCTG GAAATCTCCA GCCAGAACCT TGAAAACCTGC 420
ATAGAAAAGC GAAAGTAACT AAAGGCAATA AGTTAATAGC CATTAGCTAT TAGCTTATAG 480
CGTAAATAGT GGTCAAGAGA AGAAGGGCTC ATGGTGGATA CCTAGGCACA CAGAGA      536

```