



(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)



1-0042153

(51)^{2021.01} C12R 1/465; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2022-04398

(22) 13/07/2022

(45) 25/12/2024 441

(43) 26/09/2022 414

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

(72) Trần Thị Phương Thảo (VN); Nguyễn Kim Nữ Thảo (VN); Trần Văn Sung (VN);
Phạm Thị Ninh (VN); Nguyễn Thị Dung (VN); Ngô Văn Hiếu (VN); Huỳnh Thị
Ngọc Ni (VN); Hồ Ngọc Anh (VN); Nguyễn Hồng Minh (VN).

(54) CHŨNG XẠ KHUẨN STREPTOMYCES ALBONIGER VH19-A121 ĐƯỢC
PHÂN LẬP VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP HOẠT CHẤT CÓ TIỀM
NĂNG KHÁNG VI KHUẨN LAO

(57) Sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân
lập có khả năng tổng hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao trên cơ sở phân lập
với nền là chủng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108. Chủng xạ khuẩn
Streptomyces alboniger VH19-A121 có khả năng sinh tổng hợp ra hợp chất obscurolit B_{2β}
và hợp chất chartreusin có hoạt tính sinh học tiềm năng cho phép phát triển thuốc kháng vi
khuẩn lao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và vi sinh vật ứng dụng, cụ thể là sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập có khả năng ức chế vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis*, mở ra tiềm năng phát triển hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao và quy trình lên men sản xuất hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao bởi chủng xạ khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lao là một bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* gây ra và thường ảnh hưởng đến phổi. Mặc dù đã có vacxin kháng lao và các công cụ chẩn đoán bệnh hiện đại cũng như có phác đồ điều trị hiệu quả, nhưng lao kháng thuốc là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất với 1,5 triệu ca tử vong và 9 triệu ca nhiễm mới được báo cáo hàng năm.

Có nhiều nỗ lực nghiên cứu nhằm phát triển các thuốc điều trị, đặc biệt là các thuốc điều trị chủng lao đa kháng thuốc và siêu kháng thuốc. Tuy nhiên, sự lây lan của lao kháng thuốc và sự biến đổi nhanh chóng của vi khuẩn lao luôn là thách thức lớn đối với việc kiểm soát và điều trị bệnh. Do vậy, việc tìm kiếm các loại kháng sinh mới, các nguồn chất hóa học mới là vấn đề được quan tâm hàng đầu.

Xạ khuẩn được biết đến là nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh lớn nhất. Từ những năm 1940, các hoạt chất có nguồn gốc từ xạ khuẩn cũng như các dẫn xuất của chúng đã đóng vai trò chính trong sự phát triển của các liệu pháp kháng lao. Streptomycin là một trong những hợp chất kháng lao đầu tiên được phát hiện từ loài xạ khuẩn *Streptomyces griseus* và ngày nay vẫn được sử dụng rộng rãi để điều trị lao kháng thuốc (Schatz et al., 1944; Hinshaw et al., 1945). Tiếp theo phải kể đến là rifampicin, một loại kháng sinh chủ yếu dùng để điều trị lao hiện nay. Rifampicin là một kháng sinh bán tổng hợp từ rifamycin, một hợp chất được tách chiết lần đầu tiên từ *Streptomyces mediterranei* vào năm 1959 (Sensi, 1983). Trong một nghiên cứu gần đây, Chen và cộng sự đã phát hiện được hai hợp chất có hoạt tính kháng lao rất đáng quan tâm là actinomycin X2 và actinomycin D từ loài *Streptomyces* sp. MS449 (Chen et al.,

2012). Năm 2015, Mullooney và cộng sự đã nghiên cứu trên xạ khuẩn hiếm *Micromonospora maritima* B026 và tách chiết thành công hai hợp chất kháng lao là diazaquinomycin H và diazaquinomycin J (Mullooney et al., 2015). Một chủng *Micromonospora* sp. khác là RJA4480 phân lập từ mẫu trầm tích biển Đông Bắc Thái Bình Dương cũng chứa hợp chất sporalactam B có khả năng ức chế chọn lọc và mạnh đối với *Mycobacterium tuberculosis* (William et al., 2017).

Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng tổng hợp các hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao thường được thực hiện thông qua chủng mô hình *Mycobacterium smegmatis*. *Mycobacterium smegmatis* thường được sử dụng trong các nghiên cứu sàng lọc thuốc chống lao do đặc tính sinh trưởng nhanh, không gây bệnh và phù hợp với nhiều phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 1 (Grzelak et al., 2019). Các nghiên cứu phân lập nhằm tìm ra chủng vi sinh có đặc tính ức chế sự phát triển của mô hình *Mycobacterium smegmatis* cho phép thu được các chủng có khả năng tạo ra các hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao tiềm năng. Việt Nam có hệ sinh thái rất đặc thù và được đánh giá là một trong những khu vực đa dạng sinh học cao của thế giới nên tiềm năng phát hiện các hợp chất kháng lao từ xạ khuẩn bản địa là rất lớn. Đã có nhiều nghiên cứu nhằm phân lập các chủng xạ khuẩn, tuy nhiên vẫn chưa thu được chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng chủng mô hình *Mycobacterium smegmatis* hiệu quả và ổn định để làm tiền đề vững chắc trong việc phát triển các hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Do đó, vẫn có nhu cầu phân lập và phát triển các chủng vi sinh vật hữu ích, đặc biệt là các chủng xạ khuẩn có khả năng sản sinh ra các hoạt chất ức chế sự phát triển của *Mycobacterium smegmatis* mạnh để có khả năng thu được các hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao tiềm năng nhằm cung cấp các dược chất đáp ứng yêu cầu về dược liệu cho ngành công nghiệp dược, đặc biệt là lĩnh vực chất kháng sinh để chống lại vi khuẩn lao kháng thuốc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập có khả năng sản sinh ra hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, cho phép phát triển nguồn dược liệu trên cơ sở nuôi cấy vi sinh vật. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tiềm

năng kháng vi khuẩn lao bằng chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, trong đó chủng xạ khuẩn này có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1, có khả năng tổng hợp hoạt chất obscurolit B_{2β} và chartreusin có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, chủng xạ khuẩn này thể hiện khả năng kháng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* với vòng kháng khuẩn lên tới 15mm và có số lưu giữ VH19-A121 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị chủng xạ khuẩn hoạt hóa bằng cách cấy chủng xạ khuẩn gốc *Streptomyces alboniger* VH19-A121 có số lưu VH19-A121 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội vào môi trường thạch YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, agar 16g/l trong 3 ngày ở 30°C thu chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 hoạt hóa;

b) lên men sản xuất bằng cách cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được hoạt hóa vào môi trường lỏng YS bao gồm bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong 5 ngày thu được dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121; và

c) thu hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao bằng cách tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 ở tốc độ 4000 vòng/phút thu phần sinh khối và phần dịch nuôi cấy;

phần dịch nuôi cấy được chiết phân đoạn với EtOAc ba lần, mỗi lần 4 giờ sau đó gộp chung các phân đoạn EtOAc và dịch nuôi cấy rồi cất loại dung môi thu phần cặn EtOAc và cặn dịch nuôi cấy, phần cặn EtOAc được phân tách trên cơ sở chọn các phân đoạn hiện màu bằng sắc ký bản mỏng với thuốc thử H₂SO₄ 10% bằng cách lần lượt nhồi phần cặn EtOAc này lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 100%, sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:CH₂Cl₂ với hệ dung môi rửa giải thay đổi theo tỷ lệ từ 98:2 đến 1:1 (theo thể tích) và cuối cùng tinh chế trên cột silicagel với hệ dung

môi rửa giải CH_2Cl_2 /axeton thay đổi từ 9:1 đến 8:2 (theo thể tích), sau khi loại dung môi thu được hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ ở dạng chất rắn màu vàng;

phần sinh khối được ngâm chiết trong dung môi metanol 90% ba lần, mỗi lần 4 giờ, sau khi ly tâm, phần dịch được cất loại dung môi thu được phần cặn chiết sinh khối, phần cặn chiết sinh khối này được gộp chung với phần cặn dịch nuôi cấy thu được ở trên và được phân tách hai lần bằng cách nhồi lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 90% thu phân đoạn hiện màu trên sắc ký bản mỏng với thuốc thử H_2SO_4 10%, cuối cùng tinh chế trong cùng điều kiện với dung môi rửa giải là metanol 100%, sau khi loại dung môi, thu được hợp chất chartreusin tinh sạch màu vàng xanh; và

gộp chung hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ với hợp chất chartreusin thu được hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao ở dạng bột màu vàng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là đặc điểm hình thái tế bào của chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, trong đó (A) là ảnh chụp các khuẩn lạc của các chủng phân lập phát triển trên bề mặt môi trường thạch, (B) là ảnh chụp khuẩn lạc chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, và (C) là ảnh chụp khuẩn lạc chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 với khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis*.

Hình 2 là biểu đồ kết quả đo phổ ^1H -NMR của hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 3 là biểu đồ kết quả đo phổ ^1H -NMR của hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 4 là biểu đồ phổ COSY của hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 5 là biểu đồ phổ HMBC của hợp chất obscurolit $\text{B}_{2\beta}$ trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 6 là biểu đồ phổ NOESY của hợp chất obscurolit B_{2β} trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 7 là phổ (-)-ESI-MS của hỗn hợp hợp chất chartreusin trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 8 là biểu đồ phổ ¹H-NMR của hợp chất chartreusin trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 9 là biểu đồ phổ ¹³C-NMR của hợp chất chartreusin trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 10 là biểu đồ phổ COSY của hợp chất chartreusin trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Hình 11 là biểu đồ phổ HMBC của hợp chất chartreusin trong thử nghiệm xác định cấu trúc và đặc tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện sáng chế, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, tuyển chọn từ các mẫu đất ở các địa điểm khác nhau bao gồm tại rừng ngập mặn xã Phù Long, Hải Phòng, vườn quốc gia Cát Bà, Hải Phòng, suối Yên, chùa Hương, Hà Nội và vườn quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình. Các mẫu này được đựng riêng lẻ trong ống falcon 50 ml khử trùng và bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Các mẫu này được để khô tự nhiên trong khoảng từ 2 đến 3 ngày và nghiền nhỏ. Lấy 1 gam của mỗi mẫu và pha loãng tới nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , sau đó trải lên đĩa petri chứa môi trường phân lập, nuôi cấy ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong thời gian 14 ngày để thu khuẩn lạc.

Môi trường phân lập được sử dụng để phân lập các chủng xạ khuẩn bao gồm NaST21 (dung dịch A: 750 ml nước biển khử trùng, K_2HPO_4 1g, agar 16g; dung dịch B: 250 ml nước biển khử trùng, KNO_3 1g, $MgSO_4$ 1g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1g, $FeCl_3$ 0,2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g). Môi trường này được bổ sung axit nalidixic 20mg/l và cycloheximit 50 mg/l. Ngoài ra có thể sử dụng môi trường HV bao gồm axit humic 1g/l, $CaCO_3$ 0,02 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g/l, KCl 1,7 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05g/l, Na_2HPO_4 0,5g/l, vitamin B 5ml/l, agar 16g/l, được pha với nước cất, pH 7 bổ sung axit nalidixic 20mg/l và cycloheximit 50 mg/l.

Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong 7 ngày. Các khuẩn lạc được thu nhận và cấy trên môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, agar 16g/l và giữ ở lạnh sâu -80°C để bảo quản.

Các khuẩn lạc xạ khuẩn phân lập thu được từ các mẫu nuôi cấy ở trên được tuyển chọn nhằm thu được chủng có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên đĩa thạch. Cụ thể là các chủng xạ khuẩn sau khi phân lập được tuyển chọn bằng cách nuôi cấy trên môi trường thạch YS trong 7 ngày ở 30°C để xác định hoạt tính trên cơ sở ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis*.

Chủng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* được sử dụng làm chủng vi khuẩn nền để sàng lọc chủng xạ khuẩn ứng viên là chủng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108. Chủng vi khuẩn này được nuôi trên môi trường 219 lỏng bao gồm pepton 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, cao malt 5 g/l, axit casamino 5 g/l, cao thịt bò 2 g/l, glycerol 2 g/l, Tween 80 50 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l. Chủng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108 để sử dụng phân lập xạ khuẩn ứng viên được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ.

Sau khi nuôi cấy, dịch nuôi vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108 được bổ sung vào môi trường 219 thạch đã khử trùng với tỷ lệ 1% và đổ ra đĩa petri. Tiếp đó các thỏi thạch chứa khuẩn lạc của xạ khuẩn ứng viên có kích thước 5 mm được đặt lên

đĩa. Với các mẫu thử hoạt tính là dịch tách chiết thì tiến hành tạo các giếng trên đĩa thạch kiểm định bằng ống nhựa và nhỏ 50 µl mẫu vào các lỗ. Ủ đĩa ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch. Thu nhận những chủng có khuẩn lạc với đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất với hình thái và màu sắc khuẩn lạc rõ ràng. Các khuẩn lạc ứng viên có khả năng quan sát được sau từ 5 đến 7 ngày nuôi cấy trên môi trường YS ở 28°C. Hình thái chuỗi bào tử có thể quan sát được rõ ràng dưới kính hiển vi trên các lamên được cắm trên các đĩa nuôi cấy.

Trong số các chủng xạ khuẩn ứng viên phân lập bằng quy trình nêu trên, các tác giả đã chọn lựa được chủng xạ khuẩn có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất, chủng xạ khuẩn này được lưu giữ tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ VH19-A121.

Để định danh, tiến hành chiết ADN tổng số của chủng xạ khuẩn phân lập được và khuếch đại đoạn gen 16S rADN bằng cặp mồi sau:

27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG SEQ ID NO.2

1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT SEQ ID NO.3

Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra trên gel 1% agarosa được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và đọc trình tự. Trình tự của đoạn 16S rADN của chủng xạ khuẩn phân lập được được nêu trong SEQ ID NO.1 bao gồm 878 nucleotit. Sau khi so sánh với Ngân hàng gen cho thấy chủng xạ khuẩn thu được là chủng mới, có độ tương đồng về trình tự 16S với chủng gần gũi nhất là *Streptomyces alboniger* ATCC 12461 là 99,89%.

Chủng xạ khuẩn phân lập được theo sáng chế được lưu giữ tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ VH19-A121. Chủng này được gọi là chủng xạ khuẩn gốc *Streptomyces alboniger* VH19-A121 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 khi được nhân bằng cặp mồi đặc hiệu nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 này có khuẩn ty cơ chất màu nâu nhạt, màu sắc khuẩn ty khí sinh trắng xám có khả năng tạo khuẩn lạc, ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108 lên tới 11 mm cho thấy tiềm năng sản sinh hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao tốt. Chủng này được phân lập từ mẫu đất từ Vườn

quốc gia Cúc Phương, Việt Nam. Chủng xạ khuẩn gốc này được lưu giữ trong glycerol 20% ở -80°C.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị chủng xạ khuẩn hoạt hóa; b) lên men sản xuất; và c) thu hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao.

Trong bước chuẩn bị chủng xạ khuẩn hoạt hóa, chủng xạ khuẩn gốc có số lưu VH19-A121 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội được bảo quản ở nhiệt độ -80°C được tan đông. Sau khi tan đông, tiến hành cấy chủng xạ khuẩn gốc *Streptomyces alboniger* VH19-A121 giống gốc này vào môi trường YS để hoạt hóa. Môi trường YS này bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, agar 16g/l. Tiến hành nuôi cấy hoạt hóa chủng giống gốc này trong 3 ngày ở 30°C. Kết quả thu chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 hoạt hóa.

Trong bước lên men sản xuất, tiến hành cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 đã được hoạt hóa vào môi trường lên men đã khử trùng. Các kỹ thuật khử trùng môi trường lên men là đã biết và có thể thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Môi trường được sử dụng để lên men là môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong 4 ngày, thu được dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Trong bước thu hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 ở tốc độ 4000 vòng/phút thu phần sinh khối và phần dịch nuôi cấy. Phần sinh khối và phần dịch nuôi cấy này được tiến hành chiết xuất để thu được các hoạt chất mong muốn.

Phần dịch nuôi cấy thụ được sau khi ly tâm được chiết phân đoạn với EtOAc. Lượng EtOAc được sử dụng mỗi lần chiết bằng lượng dịch nuôi cấy. Tiến hành chiết xuất ba lần, mỗi lần 4 giờ. Sau đó tách các phân đoạn nước và phân đoạn EtOAc. Các phân đoạn này được gộp chung, thu được dịch chiết phân đoạn EtOAc và dịch nuôi cấy.

Các phần dịch này được cất loại dung môi, thu phần cặn EtOAc và cặn dịch nuôi cấy, tương ứng.

Phần cặn EtOAc được tiến hành phân tách trên cơ sở chọn các phân đoạn hiện màu bằng sắc ký bản mỏng với thuốc thử H_2SO_4 10%. Cụ thể, trong quá trình chiết, tiến hành kiểm tra các phân đoạn bằng cách sắc ký bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Các phân đoạn xuất hiện màu sẽ được thu hồi và gộp chung với nhau.

Tiến hành nhồi phần cặn EtOAc thu được ở trên lên cột sephadex LH-20. Tiến hành sắc ký với dung môi rửa giải metanol 100%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Thu phân đoạn có xuất hiện màu, sau khi loại dung môi thu phần bột. Phần bột thu được này tiếp tục được sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan: CH_2Cl_2 . Hệ dung môi rửa giải thay đổi theo tỷ lệ từ 98:2 đến 1:1 (theo thể tích). Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được phần bột. Quá trình này có thể lặp lại để thu được hoạt chất tinh khiết.

Cuối cùng, nhồi phần bột này lên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải CH_2Cl_2 /axeton thay đổi từ 9:1 đến 8:2 (theo thể tích). Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được hợp chất obscurolit B_{2β} tinh sạch màu vàng.

Phần dịch nước sau khi tách phân đoạn EtOAc ở trên được cô quay để thu được phần cặn nước.

Phần sinh khối thu được sau khi ly tâm được ngâm chiết trong metanol 90% (3 lần, mỗi lần 4 giờ trong 1 lít dung môi). Sau đó tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cặn chiết metanol.

Về bản chất của phần cặn nước và phần cặn chiết metanol là giống nhau, tiến hành gộp chung hai phần cặn thu được phần bột, phần bột này được phân tách sắc ký để thu thành phần hoạt tính tinh sạch.

Tiến hành nhồi phần bột lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 90%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được phần bột. Quá trình này có thể được lặp lại từ 1 đến 3 lần để thu được phần bột chứa thành phần hoạt tính mong muốn trên cơ sở sắc ký phát hiện bằng bản mỏng với thuốc thử là H_2SO_4 10%.

Cuối cùng, chuyển phần bột thu được này lên sắc ký với cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là metanol 100%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H_2SO_4 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi, thu được hợp chất chartreusin màu vàng xanh tinh sạch.

Gộp chung hợp chất obscurolit B_{2β} với hợp chất chartreusin thu được hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao ở dạng bột màu vàng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập, xác định hình thái, đặc tính và định danh chủng xạ khuẩn được phân lập

Tổng số 26 mẫu đất, trầm tích được thu thập ở các địa điểm khác nhau tại rừng ngập mặn xã Phù Long - Hải Phòng, vườn quốc gia Cát Bà - Hải Phòng, suối Yến - chùa Hương - Hà Nội và vườn quốc gia Cúc Phương - Ninh Bình. Tọa độ tại mỗi điểm lấy mẫu được ghi nhận trên máy định vị GPS. Các thông tin khác như nhiệt độ, độ ẩm, độ mặn cũng được đo bằng các máy chuyên dụng. Các mẫu được đựng riêng lẻ trong ống falcon 50 ml khử trùng và bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Các mẫu để được để khô tự nhiên trong 3 ngày và nghiền nhỏ. Lấy 1 gam mỗi mẫu và pha loãng tới nồng độ 10^{-3} , sau đó trải lên đĩa petri chứa môi trường thạch bao gồm NaST21 (dung dịch A: 750 ml nước biển khử trùng, K_2HPO_4 1g, agar 16g; dung dịch B: 250 ml nước biển khử trùng, KNO_3 1g, $MgSO_4$ 1g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1g, $FeCl_3$ 0,2g,

MgSO₄.7H₂O 0,1g). Môi trường này được bổ sung axit nalidixic 20mg/l và cycloheximit 50 mg/l. Ngoài ra có thể sử dụng môi trường HV bao gồm axit humic 1g/l, CaCO₃ 0,02 g/l, FeSO₄.7H₂O 0,01g/l, KCl 1,7 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,05g/l, Na₂HPO₄ 0,5g/l, vitamin B 5ml/l, agar 16g/l, được pha với nước cất, pH 7 bổ sung axit nalidixic 20mg/l và cycloheximit 50 mg/l.

Các đĩa thạch được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 14 ngày, thu các khuẩn lạc và cấy trên môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l. Kết quả thu được 135 chủng thuộc nhóm *Streptomyces* chiếm 74,6% và 46 chủng thuộc nhóm xạ khuẩn hiếm chiếm 25,4%. Tổng số 181 chủng này được phân lập, làm thuần và được giữ ở lạnh sâu -80°C để bảo quản trước khi tiến hành sàng lọc.

Để sàng lọc, các khuẩn lạc xạ khuẩn kích thước 4mm được cấy lên môi trường thạch bổ sung 1% dịch nuôi cấy vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108 trong môi trường 219 lỏng. Ủ đĩa ở 30°C trong 24 giờ và sàng lọc, lựa chọn những khuẩn lạc cho đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất.

Kết quả thu được 5 chủng có hoạt tính mạnh nhất với kích thước đường kính vòng kháng khuẩn từ 8 đến 11 mm, trong đó có 1 chủng có kích thước vòng kháng khuẩn mạnh nhất, lên tới 11 mm, các chủng còn lại có kích thước vòng kháng khuẩn đạt từ 8 đến 9 mm. Chủng có kích thước vòng kháng khuẩn lớn nhất này có nguồn gốc từ vườn quốc gia Cúc Phương có mã VH19-A121.

Đặc điểm hình thái tế bào của chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập được thể hiện trên Hình 1. Trong đó (A) là ảnh chụp các khuẩn lạc của các chủng phân lập phát triển trên bề mặt môi trường thạch. (B) là ảnh chụp khuẩn lạc xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập. (C) là ảnh chụp khuẩn lạc xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 với khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* với vòng vô khuẩn rộng và rõ ràng.

Để định danh chủng VH19-A121 thu được này, tiến hành giải trình tự đoạn gen 16S rADN.

ADN của chủng VH19-A121 được chiết và tinh sạch bằng kit thương mại của ANABIO Research & Development. PCR chuẩn để khuếch đại đoạn 16S rADN với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 đặc hiệu:

27F 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' SEQ ID. NO.2

1527R 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3' SEQ ID NO.3

Sản phẩm PCR được và giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động. Kết quả thu được trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, trình tự này được so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen của NCBI (GenBank). Kết quả cho thấy chủng VH19-A121 này thuộc loài *Streptomyces alboniger* có độ tương đồng với chủng gần nhất là *Streptomyces alboniger* ATCC 12461 là 99,89%.

Chủng *Streptomyces alboniger* VH19-A121 này được lưu Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ VH19-A121 ở -80°C.

Ví dụ 2. Lên men và thu nhận hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được lấy từ chủng gốc được bảo quản trong ống nghiệm được hoạt hóa bằng cách cấy vào môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, agar 16g/l trong 3 ngày ở 30°C thu chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 hoạt hóa.

Cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 đã được hoạt hóa này vào thiết bị lên men chứa môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 4 ngày thu được 50 lít dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121.

Chuyển toàn bộ 50 lít dịch nuôi cấy vào ly tâm phần dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 ở tốc độ 4000 vòng/phút thu được phần sinh khối và 40 lít dịch nuôi cấy.

Phần dịch nuôi cấy (40 lít) được chiết phân đoạn với EtOAc ba lần, mỗi lần 4 giờ, cùng thể tích. Sau đó tách phân đoạn, gộp chung các phân đoạn EtOAc và cất loại dung môi thu được 6,2 g cặn EtOAc.

Nhồi phần cặn EtOAc này lên cột sephadex LH-20, tiến hành sắc ký với dung môi rửa giải metanol 100%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được 3,4 g bột.

Phần bột thu được này được đưa lên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:CH₂Cl₂ với hệ dung môi rửa giải thay đổi theo tỷ lệ từ 98:2 đến 1:1 (theo thể tích). Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được 30 mg bột.

Cuối cùng, nhồi phần bột này lên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/axeton thay đổi từ 9:1 đến 8:2 (theo thể tích). Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được 3,7 mg hỗn hợp chất rắn màu vàng. Phần bột này được ký hiệu VTBE1.

Phần dịch nước sau khi tách phân đoạn EtOAc ở trên được cô quay thu được 10,2 g cặn nước.

Phần sinh khối được ngâm chiết trong metanol 90% (3 lần, mỗi lần 4 giờ trong 1 lít dung môi). Sau đó tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được 7,0 g cặn chiết metanol.

Gộp chung 10,2 g cặn nước và 7,0 g cặn chiết thu được 17,2 g bột chiết, tiến hành nhồi lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 90%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được 0,1 g bột.

Tiếp tục nhồi 0,1 g bột này lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 90%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi thu được 101 mg bột. Phần bột này tiến hành chạy sắc ký một lần trong cùng điều kiện, thu được 32 mg bột.

Cuối cùng, chuyển phần bột này lên sắc ký với cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là metanol 100%. Kiểm tra và thu nhận phân đoạn khi xuất hiện màu trên bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck 60F254, có độ dày 0,2 mm với thuốc thử H₂SO₄ 10% hơi

trên ngọn lửa. Sau khi loại dung môi, thu được 5,6 mg hỗn hợp chất rắn màu vàng xanh. Phần chất rắn này được ký hiệu 121CN02.

Tổng khối lượng của chất rắn VTBE1 và 121CN02 thu được là 9,3 mg. Các chất rắn này được đưa đi xác định thành phần và cấu trúc cũng như xác định hoạt tính sinh học.

Ví dụ 3. Xác định cấu trúc và đặc tính của các hoạt chất thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121

Hai hợp chất dạng bột rắn VTBE1 và 121CN02 thu được từ Ví dụ 2 được đưa đi phân tích để xác định cấu trúc.

+ Dữ liệu xác định cấu trúc và đặc tính của hợp chất VTBE1

Hợp chất VTBE1 ở dạng bột, màu vàng. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất VTBE1 được thể hiện trên Hình 2. Kết quả này cho thấy đây là một hợp chất khung obscurolit. Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hệ A_2B_2 vòng thơm ở δ_{H} 6,67 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6'), 7,73 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'), hai tín hiệu của một nối đôi olefin dạng trans với J lớn tại δ_{H} 5,64 (1H, ddq, $J = 15,5, 8,0, 2,0$ Hz, H-7), 5,88 (1H, dd, $J = 15,0, 7,0$ Hz, H-6), bốn tín hiệu của proton vòng butyrolacton tại δ_{H} 2,44 (1H, dd, $J = 18,0, 3,5$ Hz, $\text{H}_{\text{a}}-2$), 3,18 (1H, dd, $J = 18,0, 7,5$ Hz, $\text{H}_{\text{b}}-2$), 4,35 (1H, m, H-4) và 4,41 (1H, m, H-3). Ngoài ra, xuất hiện tín hiệu của proton methyl tại δ_{H} 1,74 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-8), 1 tín hiệu của nhóm hydroxyl tại δ_{H} 4,60 (brs), và 1 tín hiệu của nhóm aldehyt tại δ_{H} 9,77 (1H, s).

Kết quả phổ ^{13}C -NMR của hợp chất VTBE1 được thể hiện trên Hình 3. Kết quả trên Hình 3 cho thấy đây là một hợp chất có khung obscurolit bao gồm tín hiệu của 6 nguyên tử C của vòng benzen, 1 liên kết đôi olefin tại δ_{C} 128,2 (C-6) và 131,4 (C-7), 1 nhóm methylen tại δ_{C} 36,3 (C-2) một nhóm methyl tại δ_{C} 17,8, (C-8), nhóm cacbonyl δ_{C} 174,9 (C-1) và δ_{C} 190,3, (C-7').

Cấu trúc của hợp chất VTBE1 được khẳng định dựa trên cơ sở kết hợp dữ liệu các phổ 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Dữ liệu phổ COSY chỉ ra tương tác giữa H-2' (δ_{H} 6,67)/H-3' (δ_{H} 7,73), H-5' (δ_{H} 7,73)/H-6' (δ_{H} 6,67) và H-2 (δ_{H} 2,44, 3,18)/H-3 (δ_{H} 4,41), H-3 (δ_{H} 4,41)/H-4 (δ_{H} 4,35), H-4 (δ_{H} 4,35)/H-5 (δ_{H} 4,32), H-5 (δ_{H}

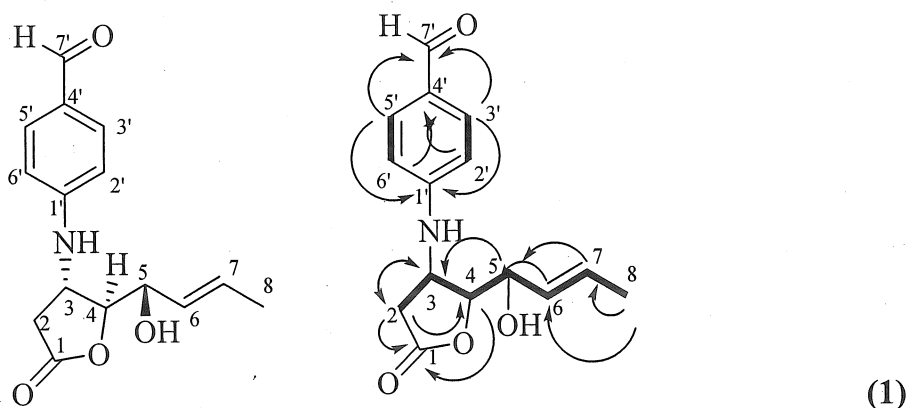
4,32)/H-6 (δ_H 5,88), H-6 (δ_H 5,88)/H-7 (δ_H 5,64) và H-7 (δ_H 5,64)/H-8 (δ_H 1,78) (Hình 3).

Phổ HMBC chỉ ra tương tác H-2 (δ_H 2,44, 3,18), H-3 (δ_H 4,41), H-4 (δ_H 4,35)/C-1 (δ_C 174,9), H-2 (δ_H 2,44, 3,18)/C-3 (δ_C 51,1), H-2 (δ_H 2,44, 3,18)/C-4 (δ_C 87,4) cho thấy liên kết trong vòng butyrolacton (Hình 4).

Tương tác giữa H-6 (δ_H 5,88), H-7 (δ_H 5,64)/C-5 (δ_C 73,1), H-8 (δ_H 1,78)/C-6 (δ_C 131,4), C-7 (δ_C 128,2) cho thấy liên kết trong nhóm allylic alcohol. Tương tác H-5 (δ_H 4,32)/C-3 (δ_C 51,1) chứng tỏ vòng butyrolacton được nối với nhóm allylic alcohol tại vị trí C-4. Ngoài ra, phổ HMBC còn chỉ ra tương tác H-3' (δ_H 7,73), H-5' (δ_H 7,73)/C-1' (δ_C 150,9), C-7' (δ_C 190,3) và H-2' (δ_H 6,70), H-6' (δ_H 6,70)/C-4' (δ_C 128,2) cho thấy vị trí thế para của nhóm andehyt vào vòng benzen (Hình 5).

Ngoài ra, phổ NOESY cũng cho tương tác giữa H-4 (δ_H 4,35)/H-5 (δ_H 4,32), H-5 (δ_H 4,32)/H-7 (δ_H 5,64), chứng tỏ proton của carbon C-4, C-5 và C-7 nằm cùng phía với nhau và định hướng α so với mặt phẳng phân tử. Do đó nhóm -OH ở vị trí β (Hình 6).

Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo (Michael Ritzau et al, 1993) cho phép kết luận hợp chất VTBE1 là hợp chất obscurolit B_{2 β} có tên theo IUPAC là 4-(((2*S*,3*S*)-2-((*S*,*E*)-1-hydroxybut-2-en-1-yl)-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)amino)benzaldehyde ứng với công thức phân tử là C₁₅H₁₇NO₄ và có cấu trúc (1) và với dữ liệu phổ NMR tổng hợp trong Bảng 1 sau:



Bảng 1: Số liệu phổ NMR của hợp chất VTBE1 (obscurolit B_{2 β})

Vị trí	VTBE1 (Obscurolit B _{2β})
--------	--

	δ_H (ppm) (500 MHz; $CDCl_3$)	δ_C (ppm) (125 MHz; $CDCl_3$)
1		174,9
2	2,44 (<i>dd</i> , $J=18,0$; 3,5)	36,3
H _a H _b	3,18 (<i>dd</i> , $J=18,0$; 7,5)	
3	4,41 (<i>m</i>)	51,1
4	4,35 (<i>m</i>)	87,4
5	4,32 (<i>m</i>)	73,1
6	5,88 (<i>dd</i> , $J=15,0$; 7,0)	128,2
7	5,64 (<i>ddq</i> , $J=15,5$; 8,0; 2,0)	131,4
8	1,78 (<i>d</i> , $J=6,5$)	17,8
1'		150,9
2'	6,67 (<i>d</i> , $J=8,5$)	112,7
3'	7,73 (<i>d</i> , $J=8,5$)	132,4
4'		128,2
5'	7,73 (<i>d</i> , $J=8,5$)	132,4
6'	6,67 (<i>d</i> , $J=8,5$)	112,7
7'	9,77 (<i>s</i>)	190,3
5-OH	4,60 (<i>brs</i>)	

Các hợp chất thuộc khung γ -butyrolacton được coi là hormon điều chỉnh quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* cũng như tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng sinh từ xạ khuẩn *Streptomyces*. Hợp chất obscurolit B_{2 β} được phân lập lần đầu tiên từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces vitidocbtomogenes* vào năm 1993.

+ Dữ liệu xác định cấu trúc và đặc tính của hợp chất 121CN02

Hợp chất 121CN02 ở dạng bột, màu vàng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất này được thể hiện trên Hình 8. Kết quả này cho thấy hợp chất này cho pic ion phân tử tại m/z 639,1 $[M-H]^-$.

Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 121CN02 cho thấy cấu trúc của nó bao gồm pentacyclic aromatic bilacton và một disaccharit. Phổ 1H -NMR xuất hiện 4 tín hiệu kép của proton aromatic tại δ_H 7,41 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-10), 7,44 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-17), 7,51 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-16), 8,19 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-8) và một tín hiệu ba của proton aromatic tại δ_H 7,61 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, H-9). Ngoài ra, xuất hiện 1 tín hiệu đơn

của nhóm methyl tại δ_H 2,81 (3H, s, H-19) và tín hiệu singlet của nhóm hydroxyl tại δ_H 11,63 (Hình 7).

Trong vùng đường, xuất hiện tín hiệu của 2 monosaccharide bao gồm 10 tín hiệu của proton oxymethine tại δ_H 3,30 (1H, dd, $J = 10,0, 3,0$ Hz, H-9'), 3,78 (1H, m, H-4'), 3,84 (1H, m, H-8'), 3,87 (1H, m, H-10'), 3,88 (1H, m, H-3'), 4,27 (1H, m, H-2'), 5,33 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1', H-anomer), 5,70 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-7', H-anomer), δ_H 3,92 (1H, m, H-5'), 4,22 (1H, q, $J = 6,0$ Hz, H-11'), hai tín hiệu của proton methyl tại δ_H 1,38 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-6'), 1,44 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-12') và một tín hiệu của proton methoxy tại δ_H 3,36 (3H, s, H-13') (Hình 8).

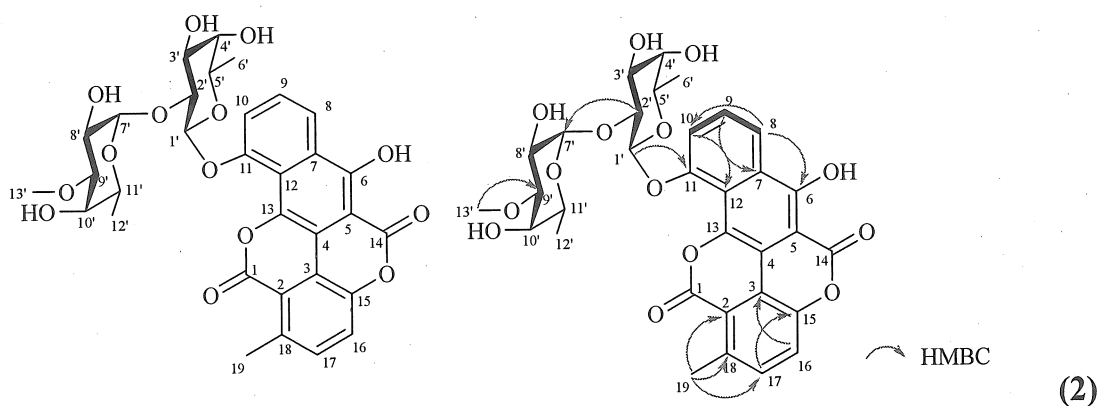
Phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy hợp chất 121CN02 gồm 2 thành phần chính là aglycone thơm và 1 disaccharit bao gồm 32 tín hiệu carbon. Trong đó, có 3 tín hiệu của nhóm methyl δ_C 16,4 (C-12'), 16,5 (C-6'), 22,2 (C-19), 1 nhóm methoxy tại δ_C 57,0 (C-13'), 15 carbon methine trong đó có 10 carbon hydroxyl methine thuộc vùng đường tại δ_C 67,1 (C-11'), 67,6 (C-8'), 68,1 (C-10'), 70,9 (C-5'), 71,0 (C-3'), 73,1 (C-4'), 80,1 (C-9'), 82,3 (C-2'), 98,9 (C-1', C-anomer), 101,4 (C-7', C-anomer) và năm carbon methine thuộc vùng vòng thơm tại 115,2 (C-10), 118,4 (C-8), 120,9 (C-16), 127,8 (C-9), 133,0 (C-17) cùng với 11 carbon bậc bốn thuộc vòng thơm tại δ_C 96,6 (C-5), 109,0 (C-4), 117,7 (C-2), 119,0 (C-12), 119,8 (C-3), 126,9 (C-7), 138,5 (C-13), 140,2 (C-18), 146,5 (C-15), 153,1 (C-11), 157,3 (C-6), 2 cacbonyl lactone tại δ_C 159,2 (C-1), 164,7 (C-14). Các dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C đã gợi ý hai đơn vị đường trong hợp chất 121CN02 bao gồm đường D-fucose và D-digitalose (Hình 9).

Cấu trúc của hợp chất trên được khẳng định dựa trên cơ sở kết hợp dữ liệu các phổ COSY, HSQC, HMBC và NOESY. Dữ liệu phổ COSY chỉ ra tương tác giữa H-8 (δ_H 8,19)/H-9 (δ_H 7,61), H-9 (δ_H 7,61)/H-10 (δ_H 7,41) trên vòng thơm. Sự liên kết giữa các proton trong vòng đường được khẳng định bằng tương tác H-4' (δ_H 3,78)/H-3' (δ_H 3,88), H-3' (δ_H 3,88)/H-2' (δ_H 4,27), H-2' (δ_H 4,27)/H-1' (δ_H 5,33), H-7' (δ_H 5,70)/H-8' (δ_H 3,84), H-8' (δ_H 3,84)/H-9' (δ_H 3,30), H-9' (δ_H 3,30)/H-10' (δ_H 3,87) trên phổ COSY (Hình 10).

Phổ HMBC chỉ ra tương tác H-19 (δ_H 2,81)/C-2 (δ_C 117,7), C-18 (δ_C 140,2), C-17 (δ_C 133,0), H-17 (δ_H 7,44)/C-15 (δ_C 146,5), H-16 (δ_H 7,51)/C-3 (δ_C 119,8), H-8 (δ_H 8,19)/C-6 (δ_C 157,3), C-10 (δ_C 115,2), H-9 (δ_H 7,61)/C-7 (δ_C 126,9), H-10 (δ_H 7,41)/C-12 (δ_C 119,0) cho thấy liên kết trong vòng thơm. Tương tác H-1' (δ_H 5,33)/C-11 (δ_C 153,1) cho thấy đường D-fucose được nối với aglycone thơm tại vị trí C-1'. Tương tác

H-2' (δ_H 4,27)/C-7' (δ_C 101,4) cho thấy digitalose được nối với đường fucose tại vị trí C-2' (Hình 11).

Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất 121CN02 là hợp chất chartreusin có công thức theo IUPAC là 10-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-dihydroxy-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4,5-dihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-6-hydroxy-1-methylbenzo[*h*]chromeno[5,4,3-*cde*]chromene-5,12-dione. Hợp chất chartreusin này có công thức phân tử là $C_{32}H_{32}O_{14}$ và có cấu trúc (2) với dữ liệu phổ NMR tổng hợp trong Bảng 2 sau:



Bảng 2: Số liệu phổ NMR của hợp chất 121CN02 (Chartreusin)

Vị trí	121CN02 (chartreusin)	
	δ_H (ppm) (500 MHz; $CDCl_3$)	δ_C (ppm) (125 MHz; $CDCl_3$)
1		159,2
2		117,7
3		119,8
4		109,0
5		96,6
6		157,3
7		126,9
8	8,19 (d, $J = 8,0$)	118,4
9	7,61 (d, $J = 8,5$)	127,8
10	7,41 (d, $J = 8,0$)	115,2
11		153,1
12		119,0
13		138,5

14		164,7
15		146,5
16	7,51 (d, $J = 8,0$)	120,9
17	7,44 (d, $J = 8,5$)	133,0
18		140,2
19	2,81 (s)	22,2
1'	5,33 (d, $J = 7,5$)	98,9
2'	4,27 (m)	82,3
3'	3,88 (m)	71,0
4'	3,78 (m)	73,1
5'	3,92 (m)	70,9
6'	1,38 (d, $J = 6,5$)	16,5
7'	5,70 (d, $J = 4,5$)	101,4
8'	3,84 (m)	67,6
9'	3,30 (dd, $J = 10,0; 3,0$)	80,1
10'	3,87 (m)	68,1
11'	4,22 (q, $J = 6,0$)	67,1
12'	1,44 (d, $J = 6,5$)	16,4
13'	3,36 (s)	57,0

Chartreusin là một benzochromenone glycosit lần đầu tiên được phân lập từ loài *Streptomyces chartreusis* trong quá trình sàng lọc các tác nhân kháng khuẩn chống lại *Mycobacterium tuberculosis*. Chartreusin là chất chống khối u mạnh bằng cách liên kết với ADN và phá vỡ sợi đơn ADN.

Ví dụ 4: Đánh giá hoạt tính của hỗn hợp thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121

Mycobacterium smegmatis sống hoại sinh phát triển nhanh trong điều kiện thiếu oxy cho thấy tình trạng hoạt động và các đặc điểm rất giống với các đặc điểm được thể hiện bởi mầm bệnh *Mycobacterium smegmatis*. *Mycobacterium smegmatis* chết nhanh chóng khi chuyển đột ngột từ điều kiện hiếu khí sang kỵ khí. Những kết quả này cho thấy *Mycobacterium smegmatis* có thể xem như một mô hình hữu ích để sàng lọc hoạt tính kháng lao mà không gây lây lan mầm bệnh.

Hỗn hợp được sử dụng để đánh giá là hỗn hợp thu được từ Ví dụ 2 (TN). Trong đó hỗn hợp này được pha loãng đến nồng độ 10 µg/ml và thử nghiệm trên đĩa nuôi cấy

vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis*, đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn theo đường kính vô khuẩn theo kỹ thuật chuẩn.

Kết quả thu được cho thấy hỗn hợp này có hoạt tính kháng vi khuẩn *M. smegmatis* mạnh với đường kính vòng kháng khuẩn lên tới 15 mm. Kết quả này cho thấy hoạt tính kháng lao tiềm năng cho phép chống lại dòng vi khuẩn lao *M. tuberculosis*. Đây là tiền đề để phát triển được phẩm kháng vi khuẩn gây bệnh lao.

Ngoài ra, để đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh, tiến hành kiểm định trên ba chủng gram dương *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, 3 chủng gram âm *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, và một chủng nấm *Candida albican*. Kết quả thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của hỗn hợp theo sáng chế

Vi khuẩn	TN ($\mu\text{g/ml}$)		Ampicillin ($\mu\text{g/ml}$)	Cefotaxim ($\mu\text{g/ml}$)	Nystatin ($\mu\text{g/ml}$)
	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,54 $\pm$ 0,25	128	0,004 $\pm$ 0,0003	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	1,08 $\pm$ 0,07	8	0,075 $\pm$ 0,006	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	7,49	>128	1,0 $\pm$ 0,008	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	>128	>128	0,075 $\pm$ 0,006	-	-
<i>Escherichia coli</i>	>128	>128	0,15 $\pm$ 0,001	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	>128	9,6 $\pm$ 0,68	-	-
<i>Candida albican</i>	>128	>128	-	-	2,8 $\pm$ 0,02

Kết quả cho thấy hỗn hợp theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn gram dương triển vọng với các giá trị IC₅₀ trên các chủng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum* lần lượt là 4,54 $\pm$ 0,25, 1,08 $\pm$ 0,07 và 7,49 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, hỗn hợp này không thể hiện hoạt tính ức chế chủng gram âm được thử và nấm *Candida albican*. Các hoạt chất thử nghiệm Cefotaxim và Nystatin không có tác dụng đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm, ngoại trừ Ampicillin. Kết quả này cho thấy hỗn hợp theo sáng chế cũng có tác dụng trên vi khuẩn, nhưng hiệu quả không bằng đối với ampicillin.

Để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư, tiến hành thử nghiệm hỗn hợp thu được từ Ví dụ 2 trên dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HEP-

G2), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF-7). Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

STT	Tên mẫu	IC ₅₀ (µg/ml)			
		KB	Hep-G2	Lu-1	MCF-7
1	TN	5,27±0,25	0,5±0,08	5,30±0,31	28,8±0,63
2	Ellipticin	0,30±0,05	0,35±0,05	0,43±0,05	0,58±0,05

Kết quả cho thấy hỗn hợp TN thử nghiệm cho thấy thể hiện hoạt tính tiềm năng nhất trên dòng tế bào ung thư gan với giá trị IC₅₀ là $0,5 \pm 0,08$ µg/ml. Trên hai dòng tế bào ung thư KB và Hep-G2, hợp chất này cũng thể hiện hoạt tính kháng tế bào ung thư đầy triển vọng với giá trị IC₅₀ lần lượt là $5,27 \pm 0,25$ µg/ml và $5,30 \pm 0,31$ µg/ml. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng tế bào ung thư vú ở mức độ trung bình với giá trị IC₅₀ là $28,8 \pm 0,63$ µg/ml. Đối chứng là Ellipticin với các giá trị lần lượt $0,30 \pm 0,05$ µg/ml, $0,35 \pm 0,05$ µg/ml và $0,43 \pm 0,05$ µg/ml.

Như vậy hỗn hợp TN theo sáng chế ngoài hoạt tính kháng vi khuẩn lao vượt trội còn cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cũng như có khả năng ức chế một số tế bào ung thư, mặc dù hoạt tính không mạnh bằng các hoạt chất chuyên biệt. Điều này cho thấy phổ rộng của hỗn hợp TN được thử nghiệm theo sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập theo sáng chế thể hiện là chủng có hiệu suất sinh tổng hợp hai hoạt chất có tác dụng kháng vi khuẩn lao cao, 50 lít môi trường nuôi cấy ban đầu, sơ bộ đã chiết tách và thu được 3,7 mg hoạt chất obscurolit B_{2β} và 5,6 mg hoạt chất chartreusin tinh sạch. Chủng *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập theo sáng chế là tiền đề cho phép sản xuất hoạt chất để phát triển được phẩm kháng vi khuẩn lao, đặc biệt là vi khuẩn lao kháng thuốc.

Từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, đã phân lập được hai hợp chất có hoạt tính sinh học mạnh là hợp chất obscurolit B_{2β} có tên theo IUPAC là 4-(((2*S*,3*S*)-2-((*S*,*E*)-1-hydroxybut-2-en-1-yl)-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)amino)benzaldehyt và hợp chất chartreusin có tên theo IUPAC là 10-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-dihydroxy-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4,5-dihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-

yl)oxy)-6-hydroxy-1-methylbenzo[*h*]chromeno[5,4,3-*cde*]chromene-5,12-dione. Đây là tiền đề quan trọng và là cơ sở khoa học chứng minh khả năng phát triển chất kháng sinh từ chủng xạ khuẩn được phân lập theo sáng chế.

Kết quả sơ bộ cho thấy hoạt tính kháng vi khuẩn lao trên chủng vi khuẩn *M. smegmatis* của dịch sinh khối chủng xạ khuẩn *S. alboniger*. Kết quả cho thấy sinh khối của chủng *S. alboniger* có hoạt tính kháng lao tiềm năng với đường kính kháng khuẩn vượt trội, lên tới 11 mm, trong khi các chủng khác chỉ cho đường kính kháng khuẩn cao nhất chỉ đạt 9 mm. Đây là lần đầu tiên hoạt tính kháng lao của chủng xạ khuẩn *S. alboniger* được xác định.

Đã đánh giá hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis* của cho thấy chúng thể hiện hoạt tính kháng *M. smegmatis* tiềm năng với đường kính kháng khuẩn lên tới 15 mm.

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của hỗn hợp hoạt chất thu được trên ba chủng gram dương, 3 chủng gram âm *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và một chủng nấm *Candida albican*. Kết quả cho thấy hỗn hợp hoạt chất thu được từ chủng xạ khuẩn theo sáng chế thể hiện hoạt tính kháng cả 3 chủng gram dương *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum* với giá trị IC_{50} lần lượt là $4,54 \pm 0,25$, $1,08 \pm 0,07$ và $7,49 \mu\text{g/ml}$. Đặc biệt, hỗn hợp này có giá trị $MIC = 8$ trên chủng *Bacillus subtilis* cao hơn giá trị MIC của kháng sinh Ampicillin cho thấy tiềm năng rất lớn hướng tới việc nghiên cứu sản xuất kháng sinh. Hợp chất này không thể hiện hoạt tính ức chế chủng gram âm và nấm *Candida albican*.

Ngoài ra, kết quả đánh giá cũng cho thấy hoạt tính gây độc tế bào của hoạt chất thu được từ chủng xạ khuẩn theo sáng chế trên 4 dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư phổi (Lu) khá tốt. Kết quả cho thấy hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất trên dòng tế bào ung thư gan với giá trị IC_{50} là $0,5 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập, trong đó chủng xạ khuẩn này có trình tự 16S ADN nêu trong SEQ ID NO.1, có khả năng tổng hợp hoạt chất obscurolit B_{2β} và chartreusin có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, chủng xạ khuẩn này thể hiện khả năng kháng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* với vòng kháng khuẩn lên tới 15mm và có số lưu giữ VH19-A121 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội.

2. Quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị chủng xạ khuẩn hoạt hóa bằng cách cấy chủng xạ khuẩn gốc *Streptomyces alboniger* VH19-A121 có số lưu VH19-A121 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội vào môi trường YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, agar 16g/l trong 3 ngày ở 30°C thu chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 hoạt hóa;

b) lên men sản xuất bằng cách cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được hoạt hóa vào môi trường lỏng YS bao gồm cao nấm men 2g/l, tinh bột 10g/l, sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong 5 ngày thu được dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121; và

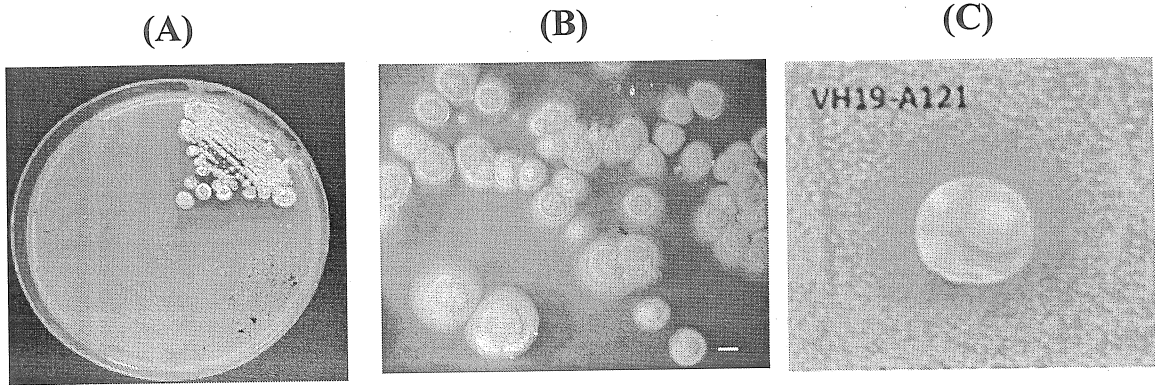
c) thu hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao bằng cách tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy chứa sinh khối xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 ở tốc độ 4000 vòng/phút thu phần sinh khối và phần dịch nuôi cấy;

phần dịch nuôi cấy được chiết phân đoạn với EtOAc ba lần, mỗi lần 4 giờ sau đó gộp chung các phân đoạn EtOAc và dịch nuôi cấy rồi cất loại dung môi thu phần cặn EtOAc và cặn dịch nuôi cấy, phần cặn EtOAc được phân tách trên cơ sở chọn các phân đoạn hiện màu bằng sắc ký bản mỏng với thuốc thử H₂SO₄ 10% bằng cách lần lượt nhồi phân cặn EtOAc này lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 100%, sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:CH₂Cl₂ với hệ dung môi rửa giải thay đổi theo tỷ lệ từ 98:2 đến 1:1 (theo thể tích) và cuối cùng tinh chế trên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/axeton thay đổi từ 9:1 đến 8:2 (theo thể tích), sau khi loại dung môi thu được hợp chất obscurolit B_{2β} ở dạng chất rắn màu vàng;

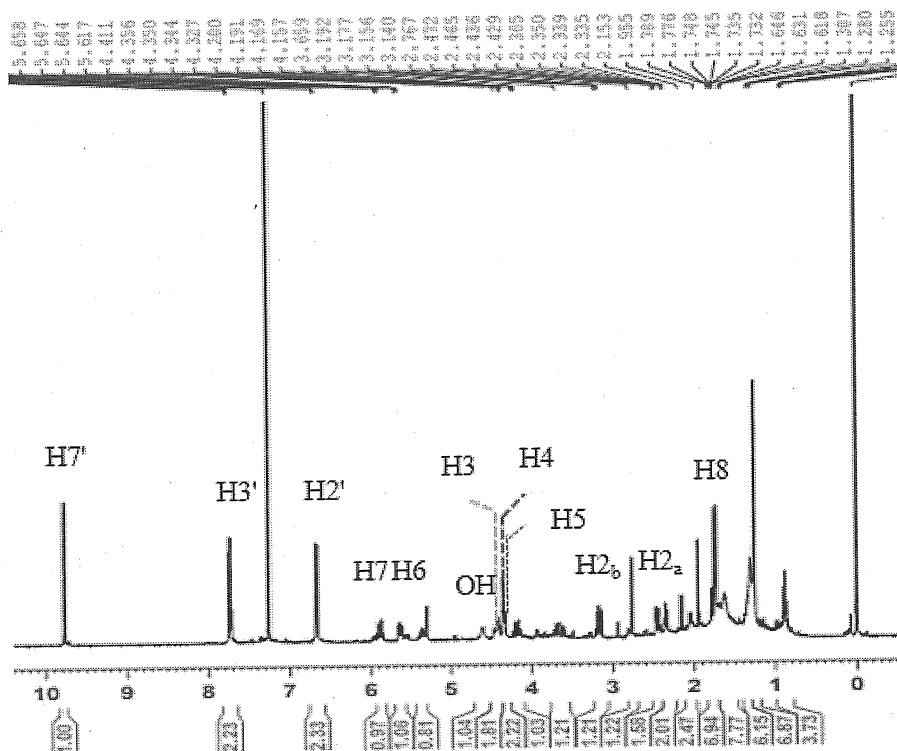
phần sinh khối được ngâm chiết trong dung môi metanol 90% ba lần, mỗi lần 4 giờ, sau khi ly tâm, phần dịch được cất loại dung môi thu được phần cặn chiết sinh khối, phần cặn chiết sinh khối này được gộp chung với phần cặn dịch nuôi cấy thu được ở trên và được phân tách hai lần bằng cách nhồi lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol 90% thu phân đoạn hiện màu trên sắc ký bản mỏng với thuốc thử H_2SO_4 10%, cuối cùng tinh chế trong cùng điều kiện với dung môi rửa giải là metanol 100%, sau khi loại dung môi, thu được hợp chất chartreusin tinh sạch màu vàng xanh; và

gộp chung hợp chất obscurolit B_{2β} với hợp chất chartreusin thu được hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao ở dạng bột màu vàng.

HÌNH 1



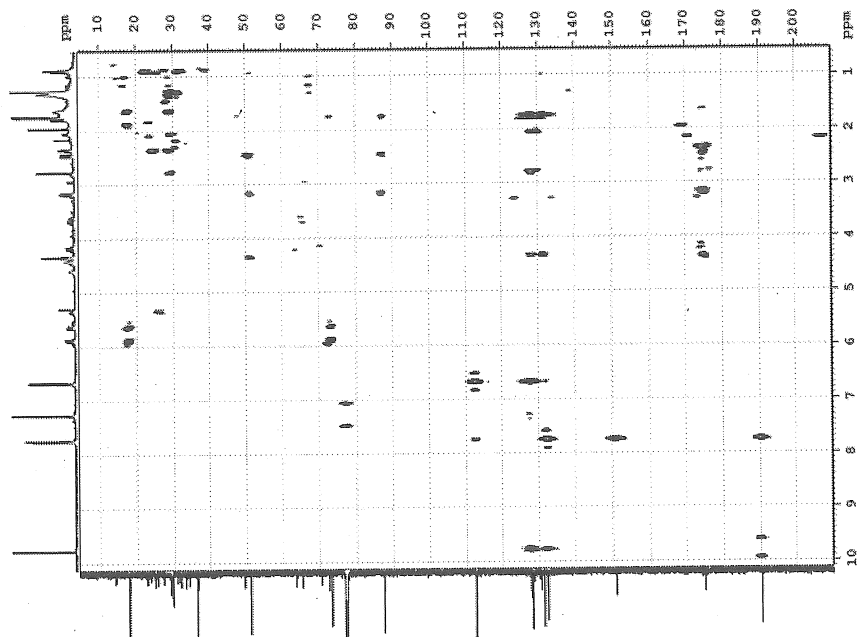
HÌNH 2



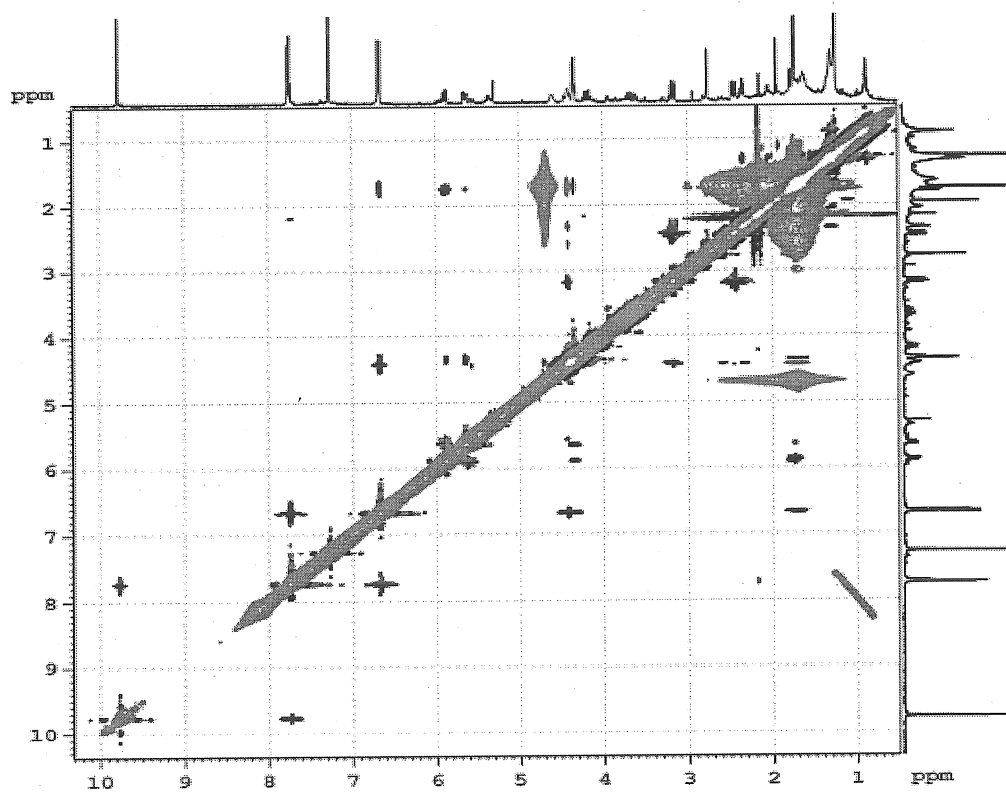
42153

3/6

HÌNH 5



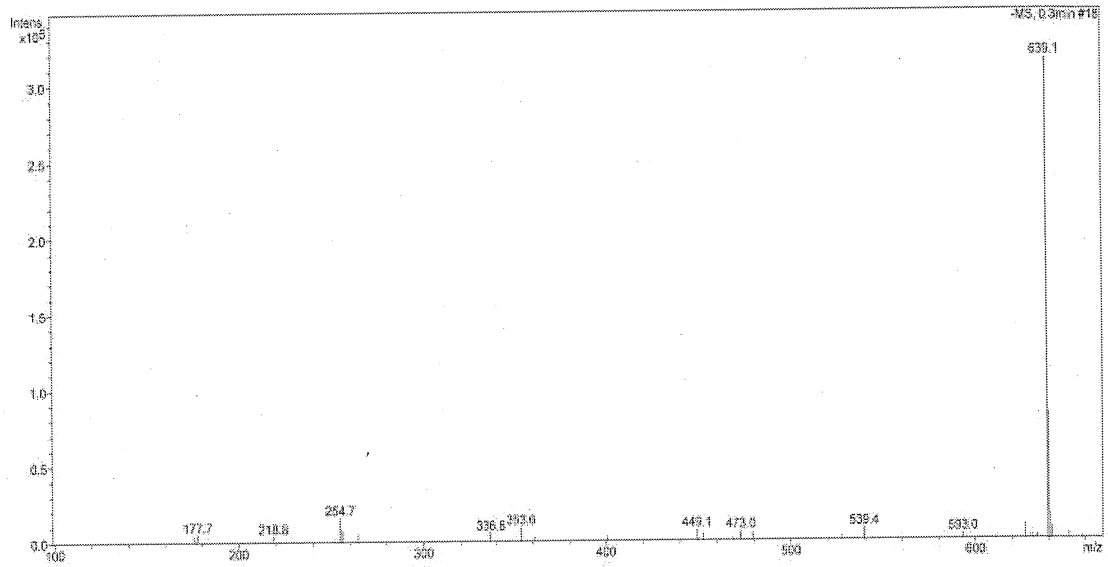
HÌNH 6



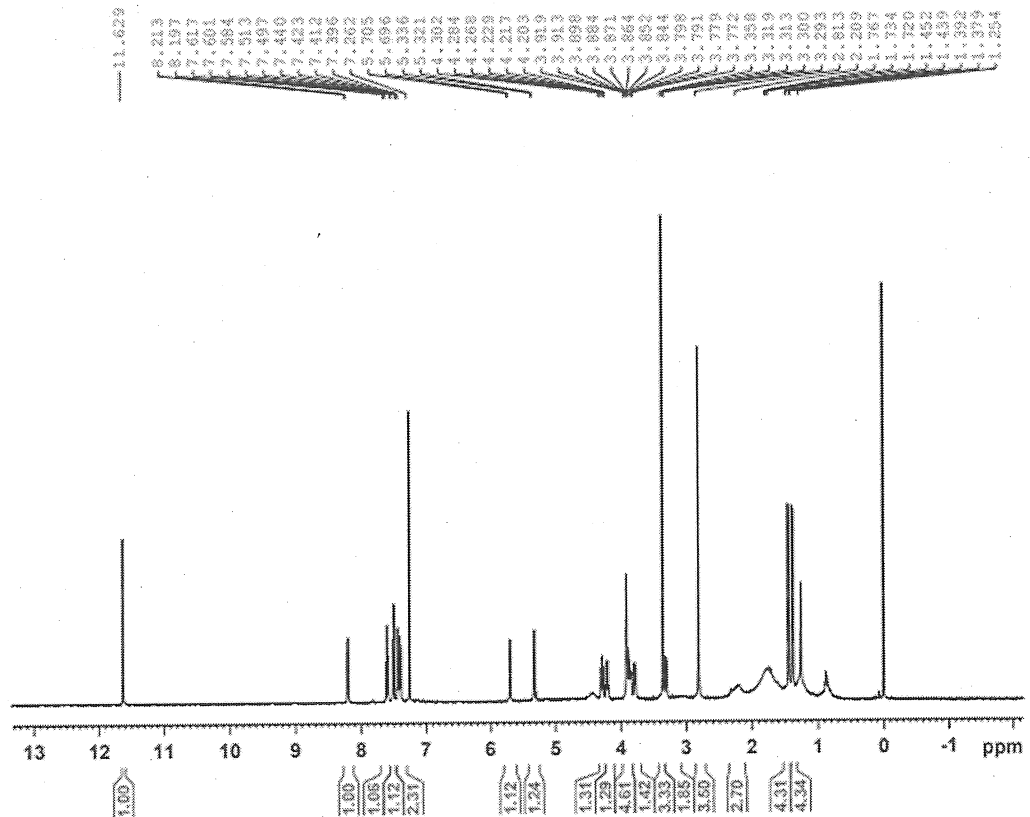
42153

4/6

HÌNH 7



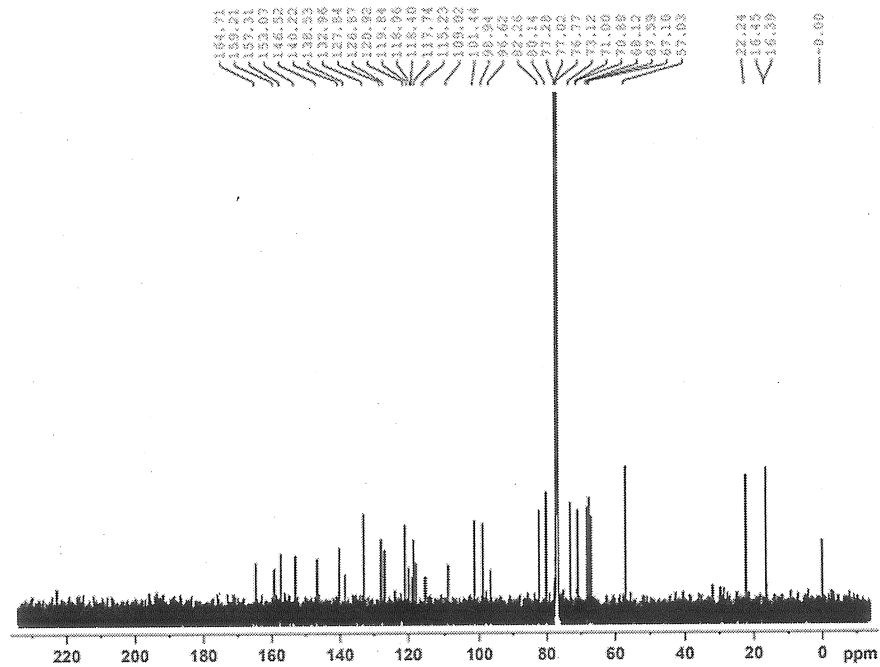
HÌNH 8



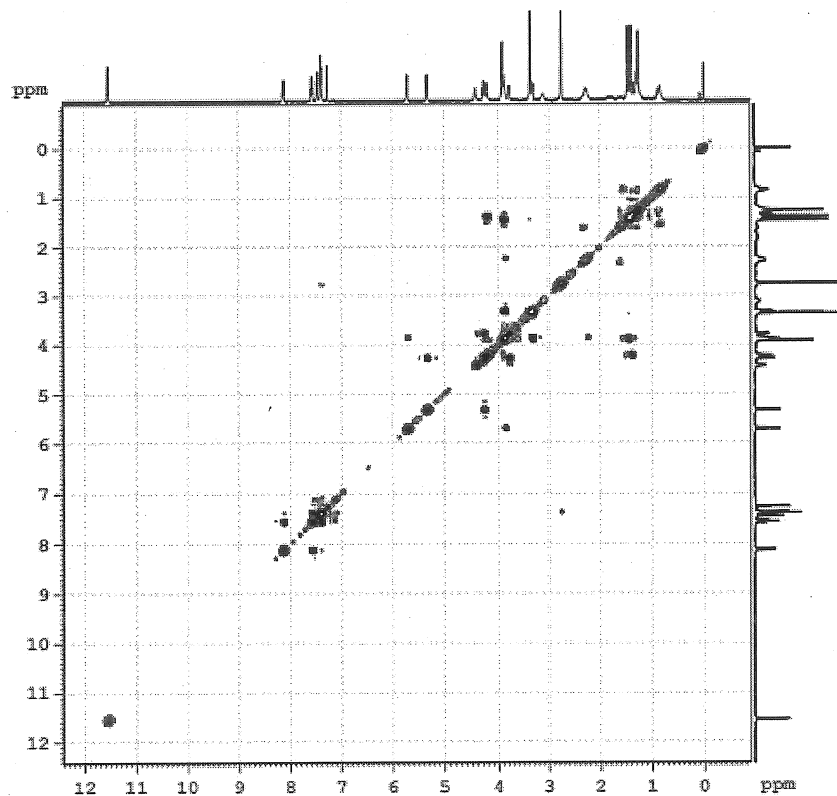
42153

5/6

HÌNH 9



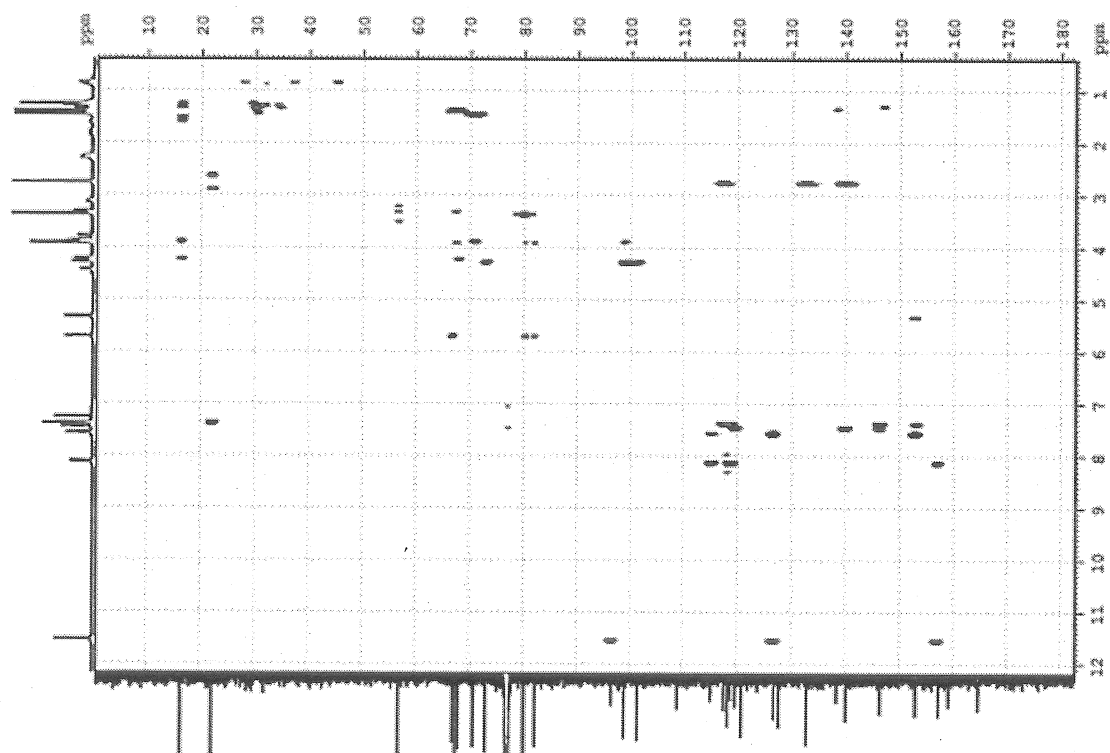
HÌNH 10



42153

6/6

HÌNH 11



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Hóa học-Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam
 <120> Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 được phân lập và quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tiềm năng kháng vi khuẩn lao

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 878

<212> ADN

<213> *Streptomyces alboniger* VH19-A121

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGGGCAATC TGCCCTTCAC TCTGGGACAA GCCCTGGAAA	60
CGGGGTCTAA TACCGGATAA CACTTCCACT CTCCTGGGTG GAGGTTAAAA GCTCCGGCGG	120
TGAAGGATGA GCGCGCGGCC TATCAGCTTG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC CAAGGCGACG	180
ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GGCGACCGGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC	240
CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCGACGCC	300
GCGTGAGGGA TGACGGCCTT CGGGTTGTAA ACCTCTTTCA GCAGGGAAGA AGCGAAAGTG	360
ACGGTACCTG CAGAAGAAGC GCCGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG	420
GCGCAAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT AAAGAGCTCG TAGGCGGCTT GTCACGTCGG	480
GTGTGAAAGC CCGGGGCTTA ACCCGGGGTC TGCATTCGAT ACGGGCTAGC TAGAGTGTGG	540
TAGGGGAGAT CGGAATTCCT GGTGTAGCGG TGAAATGCGC AGATATCAGG AGGAACACCG	600
GTGGCGAAGG CGGATCTCTG GGCCATTACT GACGCTGAGG AGCGAAAGCG TGGGGAGCGA	660
ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGGTG GGAAGTAGGT GTTGGCGACA	720
TTCCACGTCG TCGGTGCCGC AGCTAACGCA TTAAGTTCCC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC	780
AAGGCTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CAGCGGAGCA TGTGGCTTAA	840
TTTCACGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAAGG CTTGACAT	878

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 3

42153

GGTTACCTTGTTACGACTT