

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY mang gen mã hoá protein PigI tái tổ hợp thuần khiết về mặt sinh học, sản xuất ra hợp chất prodigiosin có khả năng ức chế tế bào ung thư và một số loài nấm gây bệnh.

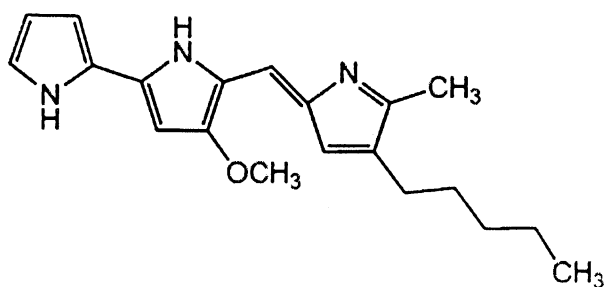
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Serratia sp. là một loài vi khuẩn phân bố rộng rãi trong nhiều tầng sinh quyển như: đất, nước, thực vật và động vật. Trong chi *Serratia*, loài *Serratia marcescens* được quan tâm do có khả năng tiết ra nhiều loại protein ngoại bào như nucleaza, proteaza, chitinaza cũng như các loại hợp chất thứ cấp khác như serrawettin, oxydine A, glycolipid surfactant và đặc biệt là prodigiosin. Đây là hợp chất có năng chống lại một số dòng tế bào ung thư như Jurkat T, H460, MCF7 (Bảng 1) (Hejazi và Falkiner, 1997). Ngoài ra, một số chủng *S. marcescens* được chứng minh có khả năng kích thích sinh trưởng của thực vật, cũng như có khả năng kí sinh gây bệnh trên các loài côn trùng gây hại (Pineda-Castellanos và cộng sự, 2015).

Gần đây, ở Việt Nam, một số nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu khả năng ứng dụng của vi khuẩn *Serratia marcescens* trong việc kháng lại các loại vi khuẩn và côn trùng gây hại. Nguyễn Hoài Hương và Nguyễn Hoàng Anh Kha (2015) đã đánh giá khả năng diệt sâu khoang *Spodoptera litura* bằng chủng vi khuẩn *S. marcescens* SH1 cũng như sắc tố prodigiosin và thu được các kết quả khả quan. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của các chủng *Serratia marcescens* phân lập ở Việt Nam cũng đã được chứng minh (Đỗ Thị Tuyên và cộng sự, 2017; Nguyễn Sỹ Lê Thanh và cộng sự, 2014; Nguyễn Sỹ Lê Thanh và Lê Đình Quyền, 2015). Tuy nhiên, các nghiên cứu nhằm cải biến các chủng *S. marcescens* nhằm tăng khả năng sản xuất prodigiosin ứng dụng trong y học chưa được tiến hành. Hiện nay, hướng nghiên cứu cải biến các chủng vi khuẩn để phục vụ sản xuất các hợp chất thứ cấp đã được áp dụng phổ biến trên thế giới. Chủng *Streptomyces coelicolor* đột biến đã cho hoạt tính prodigiosin tăng gấp 12 lần so với chủng đại (Liu và cộng sự, 2017). Bên cạnh đó, nhóm gen chịu trách nhiệm tổng hợp prodigiosin của vi khuẩn *S. marcescens* đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *Pseudomonas putida* cho phép chúng có thể tổng hợp prodigiosin ứng dụng trong công nghiệp với năng suất lên tới 94 mg/l.

Prodigiosin, còn được gọi là sắc tố đỏ, là một chất chuyển hoá alkaloid thứ cấp có công thức hoá học $C_{20}H_{25}N_3O$ (5((3-methoxy-5-pyrrol-2-ylidene-pyrrol-2-ylidene)-

metyl)-2-methyl-3-pentyl-1H-pyrrole) (hình 1), có khối lượng phân tử khoảng 323,4Da. Prodigiosin có cấu tạo gồm 3 vòng tripyrrole, không tan trong nước, tan vừa trong alcohol và ether, tan tốt trong một số dung môi như cloroform, metanol, axetonitril và DMSO. Trong điều kiện thông thường, prodigiosin dễ bị phân huỷ bởi ánh sáng. Bên cạnh đó, ở các điều kiện axit pH, prodigiosin có màu đỏ, khi chuyển sang môi trường kiềm, sắc tố của prodigiosin chuyển sang màu vàng cam.



Cấu trúc phân tử của Prodigiosin

Đặc tính sinh học quý báu của prodigiosin có thể được thể hiện ở những tính chất sau:

a, Hoạt tính kháng khuẩn:

Prodigiosin có khả năng kháng nấm phổ rộng và tác dụng kháng khuẩn đã được khẳng định bằng những nghiên cứu được công bố của các tác giả trong những năm 1960 và 1970 (Gerber, 1975; Castro và cộng sự, 1967). Từ giữa những năm 1970, hoạt tính kháng khuẩn của prodigiosin tinh khiết tách chiết từ vi khuẩn đã được công bố nhiều (Bảng 2). Phổ kháng khuẩn của prodigiosin phụ thuộc vào cấu trúc của prodigiosin. Ở nồng độ từ 10 – 100mg/ml, prodigiosin có thể kháng cả hai loại vi khuẩn gram âm và gram dương. Đặc tính kháng khuẩn của prodigiosin chủ yếu dựa trên khả năng ngăn chặn sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn, chống lại các loài vi khuẩn gây ô nhiễm như *Alteromonas* sp., *Gallionella* sp. và vi khuẩn lam (Priya và cộng sự, 2013). Prodigiosin chiết xuất từ *S. marcescens* CMST07 có khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học của *Alteromonas* sp. ở nồng độ 10mg/ml và prodigiosin 100µg/cm² bề mặt ảnh hưởng đến khả năng bám dính vào kính của *Balanus amphitrite*.

b, Hoạt tính kháng nấm

Hoạt tính kháng một số loại nấm gây bệnh của prodigiosin cũng đã được xác định đối với một số loài như *Coccidioides immitis* (Williams và Hearn, 1967). Một số chi nấm được cho là mẫn cảm với prodigiosin bao gồm: *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* và *Histoplasma*. Những nghiên cứu gần đây tập trung vào việc xác định tiềm năng ứng dụng prodigiosin như một hoạt chất kháng nấm. Prodigiosin-L-1 có hiệu quả đối với *Trichophyton* phân lập trên các bệnh

nhân có triệu chứng lâm sàng của bệnh nấm chân. Một số nghiên cứu cho thấy, prodigiosin cũng có thể ứng dụng để kháng nấm bệnh hại cây trồng.

c, Hoạt tính kháng tế bào ung thư của prodigiosin

Khả năng kháng ung thư hiện đang là hướng nghiên cứu chính về prodigiosin. Nhìn chung, prodigiosin đã được thử nghiệm *in vitro* trên hơn 60 dòng tế bào ung thư với nồng độ ức chế trung bình 2 μ M và ức chế tăng sinh tế bào lympho T. Những phát hiện liên quan đến cơ chế kháng ung thư và đặc tính ức chế miễn dịch của prodigiosin đang là chủ đề của nhiều nghiên cứu (de Grenu và cộng sự, 2011; Furstner, 2003; Montaner và Pérez-Tomás, 2003; Perez-Tomas và cộng sự, 2003; Perez-Tomas và Vinas, 2010; Williamson và cộng sự, 2007)

Prodigiosin có hoạt tính kháng ung thư thông qua cơ chế gây chết theo chu trình đặc hiệu trong các tế bào ung thư (Chang và cộng sự, 2011; Williamson và cộng sự, 2007). Bên cạnh đó, Prodigiosin cũng có hiệu quả với các dòng tế bào đa kháng thuốc (Elahian và cộng sự, 2013). Tùy thuộc vào mỗi dòng tế bào, prodigiosin tác động lên các mục tiêu với các cơ chế khác nhau để kích hoạt chu trình tự chết tế bào (Chang và cộng sự, 2011; Williamson và cộng sự, 2007). Ở các nồng độ dưới ngưỡng gây độc, prodigiosin ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư bằng cách kích thích ngừng chu kỳ tế bào. Prodigiosin cũng có thể chèn vào ADN gây đứt gãy đoạn ADN và làm chết tế bào (Melvin và cộng sự, 2000). Khi đạt nồng độ gây độc, prodigiosin ngăn chặn con đường truyền tín hiệu thông qua protein kinaza (MAPK) hoặc kiểm soát con đường tín hiệu gây chết ty thể tế bào dẫn đến sự chết theo chu trình của tế bào ung thư. Prodigiosin tương tác với ba phân họ của MAPK: C-Jun kinaza N-terminal, p38 và ERKs góp phần vào sự chết tế bào được lập trình của tế bào ung thư. Nhìn chung, hoạt tính kháng ung thư cũng như cơ chế kháng ung thư của prodigiosin đã được làm sáng tỏ.

Bảng 1. Hoạt tính kháng ung thư *in vitro* của prodigiosin từ vi khuẩn trên dòng tế bào ung thư người

Hợp chất	Loại mô/dòng tế bào	TLTK
Prodigiosin	Ung thư bạch cầu ở người/U937, Jurkat-T, NSO	Montaner and Perez-Tomas (2002)
	Ung thư phổi ở người/A549, NCI-H460	Llagostera và cộng sự (2003)
	Ung thư vú ở người/MCF-7,	Soto-Cerrato và cộng

	MDA-MB-231	sự (2004, 2007), Monge và cộng sự (2007)
	U nguyên bào thần kinh ở người/LAN-1, IMR-2, SH- SYSY	Francisco và cộng sự (2007)
	Ung thư Đại tràng ở người/HT29, DLD-1	Montaner and Perez- Tomas (2001)
Undecylprodigiosin	Ung thư vú ở người/BT-20, MCF-7, MDA-MB-231	Ho và cộng sự (2007)
	Ung thư phổi ở người/A549	Liu và cộng sự (2005)
Metacycloprodigiosin	Ung thư phổi ở người/A549, SPCA4	Liu và cộng sự (2005)
Cycloprodigiosin	Ung thư vú ở người/MDA- MB-231	Yamamoto và cộng sự (2000a, 2002)
	Ung thư bạch cầu ở người/HL- 60	Yamamoto và cộng sự (2000b)

Chính vì những đặc tính nêu trên, việc tìm kiếm hoặc tạo ra các chủng vi khuẩn *Serratia* sp. có khả năng tổng hợp prodigiosin cao là cần thiết để có thể ứng dụng hợp chất này trong cuộc sống. Tuy nhiên, các chủng *Serratia* sp. đã phân lập được hiện nay tại Việt Nam chưa đem lại năng suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là để giải quyết các vấn đề nêu trên, để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY được cải biến mang gen mã hoá protein PigI tái tổ hợp sản xuất hợp chất prodigiosin có khả năng ức chế tế bào ung thư và một số loài nấm, vi khuẩn gây bệnh.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY được cải biến từ chủng *Serratia* sp. SM mang vectơ pET22b tái tổ hợp có chứa cấu trúc Lac promoter – *pigI*, trong đó trình tự gen *pigI* được tách từ chủng *Serratia* sp. M5. Kết quả cải biến thu được chủng *Serratia* sp. HVQY có hàm lượng prodigiosin cao gấp 1,46 lần so với chủng trước cải biến. Chủng *Serratia* sp. SM và

chủng *Serratia* sp. M5 được cung cấp bởi Phòng Công nghệ sinh học Enzyme - Viện Công nghệ sinh học.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hợp chất prodigiosin được tổng hợp từ chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY tái tổ hợp này, có khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư và nấm gây bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. A. Kết quả khuếch đại trình tự vùng Lac_promoter và vùng gen *pigI*; B. LacP_ *pigI*: Sản phẩm nối của hai đoạn Lac_promoter và gen *pigI*. 1: Gen *pigI*; 2: Vùng Lac_promoter; 3: Sản phẩm nối Lac promoter_ *pigI*; M: Ladder 1 kb plus (thermo fisher)

Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE (A) và Western blot (B) kiểm tra khả năng biểu hiện của protein *pigI* tái tổ hợp ở các chủng *Serratia* sp. mang gen tái tổ hợp và chủng ban đầu *Serratia* sp. SM; I1, I3: Chủng *Serratia* sp. mang cấu trúc Lac promoter_ *pigI*; E: Chủng *Serratia* sp. SM.

Hình 3. Kết quả sắc kí bản mỏng phát hiện prodigiosin ở các chủng đã biến nạp. E: Chủng *Serratia* sp. SM không chuyển gen; I1, I3: Các dòng vi khuẩn chuyển cấu trúc Lac promoter – *pigI*; C: Chất chuẩn prodigiosin

Hình 4. Kết quả định tính, định lượng prodigiosin ở các chủng đã biến nạp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Đường màu xanh: Prodigiosin tách từ chủng *Serratia* sp. HVQY; Đường màu đen: Prodigiosin chuẩn 0,5 µg/ml - Sigma

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY mang gen *pigI* tái tổ hợp có khả năng tổng hợp hoạt chất sinh học prodigiosin có khả năng ức chế một số loại tế bào ung thư, nấm và một số loại vi khuẩn.

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. M5 được tách chiết ADN và nhân dòng trình tự gen *pigI*. Trình tự Lac promoter được nhân dòng từ vector thương mại pUC19 (NEB). Sản phẩm nối của 2 trình tự sẽ được chèn vào vector pET22b ở vị trí giữa hai điểm cắt HindIII và XhoI, tiến hành chọn dòng trên chủng thương mại *E. coli* DH10B, đọc trình tự và tách chiết dòng mang trình tự nêu trên.

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM được làm khả biến xung điện theo phương pháp được mô tả như sau: 1 khuẩn lạc thuần của chủng được nuôi trong 2ml môi trường LB trong điều kiện lắc 200rpm/30°C qua đêm. Hôm sau, 1ml dịch nuôi được chuyển sang 50ml môi trường LB mới trong bình tam giác 250ml, nuôi lắc trong điều kiện 200rpm/30°C trong 6 giờ. Sau đó, dịch nuôi tế bào được cấy trong đá trong 15

phút để tế bào ngừng sinh trưởng. Sinh khối tế bào được thu bằng cách ly tâm 5000 rpm/15 phút/4°C, loại bỏ toàn bộ môi trường nuôi. Sau đó tế bào được hoà lại trong 50 ml nước Deion lạnh, ủ đá 15 phút và ly tâm 10000 rpm/15 phút/4°C. Đổ bỏ toàn bộ dung dịch, thấm khô. Bước rửa nước được lặp lại 3 lần. Cuối cùng, tế bào được hoà lại trong dung dịch Glyxerol 15% lạnh sao cho OD giá trị 20/ml. Chia tế bào vào các ống eppendorf đã được làm lạnh, mỗi ống 100 µl dịch khuẩn và bảo quản ở -80°C.

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM sau khi làm khả biến xung điện sẽ được chuyển plasmid pET22b mang cấu trúc Lac promoter – *pigI* ở vị trí đa tách dòng (multicloning site) được gắn theo chiều 5' trình tự nhận biết enzym HindIII - Lac promoter – *pigI* – trình tự nhận biết enzym XhoI 3' bằng phương pháp xung điện. Điều kiện bắn được thực hiện như sau: 1µg plasmid được trộn vào ống tế bào, búng nhẹ và ủ đá trong 10 phút; cuvet điện được làm lạnh trước trong đá; chuyển tế bào vào cuvet điện, gõ nhẹ cho tan bọt khí và bắn với điều kiện 2500V, 400Ω, 25µF; tế bào sẽ được phục hồi trong 1ml môi trường LB, nuôi lắc 30°C trong 3 giờ. Chủng *Serratia* sp. SM sau khi biến nạp sẽ được cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp. Chủng *Serratia* mọc trong môi trường kháng sinh sẽ được kiểm tra bằng cách tách chiết plasmid, điện di và cắt enzym giới hạn tương ứng để kiểm tra plasmid chèn vào. Tiếp đó, tế bào được nuôi trên môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh cho đến khi giá trị OD đạt 0,6. 1mM IPTG được sử dụng để cảm ứng biểu hiện và dịch khuẩn tiếp tục được nuôi trong điều kiện 30°C trong 6 tiếng. Dịch khuẩn thu được sẽ được chia làm 2, một nửa tiến hành tách thu sinh khối khuẩn, phá tế bào thu protein tổng số để điện di SDS-PAGE, Western Blot nhằm kiểm tra khả năng biểu hiện protein, nửa còn lại được sử dụng để tách chiết prodigiosin để tiến hành đo hàm lượng và chạy sắc kí bản mỏng. Kết quả sàng lọc chủng *Serratia* sp. tái tổ hợp đã thu được dòng mang cấu trúc tái tổ hợp có khả năng sản xuất prodigiosin cao hơn 1,46 lần so với chủng đại. Chủng này được đặt tên là chủng *Serratia* sp. HVQY.

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY trong sáng chế khác biệt ở chỗ: đây là chủng được phân lập từ Việt Nam, đồng thời mang plasmid tái tổ hợp có chứa cấu trúc Lac promoter – *pigI*. Chủng này có khả năng sinh tổng hợp prodigiosin được xác nhận bằng định tính và định lượng hoạt chất bằng phương pháp sắc kí bản mỏng, đo quang phổ và sắc ký lỏng hiệu năng cao. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của prodigiosin đã được kiểm tra trên các dòng tế bào ung thư người như ung thư gan Hep3B, ung thư tuyến giáp Hep2, ung thư vú MCF7, ung thư phổi H460, cũng như các loài nấm như nấm *Candida albicans* và nấm *C. neoforman*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích sáng chế, mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1. Xây dựng vector pET22b tái tổ hợp chứa cấu trúc Lac promoter - *pigI*

ADN từ chủng vi khuẩn *Serratia* sp. M5 được tách chiết sử dụng GeneJet Genomic ADN purification kit. Gen *pigI* được khuếch đại sử dụng kit Q5 2x Master mix theo tỉ lệ trình bày ở bảng 1 với cặp mồi đặc hiệu

pigI-F: ACACAGGAAACAGCTATGGCAACCTTCATTTACCGAT

pigI-R: AAAAACTCGAGTCGCGCATTACCTCGGACAA

chu kì phản ứng như sau: 98°C – 30 giây, 40 chu kỳ (98°C- 10 giây, 57°C- 15 giây, 72°C- 30 giây), 72°C- 5 phút, sau đó giữ ở 4°C.

Cấu trúc Lac promoter được khuếch đại bằng kit Q5 2x Master mix theo tỉ lệ trình bày ở bảng 1 với cặp mồi đặc hiệu

LacP-F: AAAAAAAGCTTCAGTGAGCGCAACGCAA;

LacP-R: AATGAAGGTTGCCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG

và chu kì phản ứng: 98°C – 30 giây, 40 chu kỳ (98°C- 10 giây, 57°C- 15 giây, 72°C- 10 giây), 72°C- 5 phút, sau đó giữ ở 4°C.

Bảng 1: thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	17
Q5 2x Master mix	25
Mồi xuôi (10 pmol)	2,5
Mồi ngược (10 pmol)	2,5
ADN khuôn	3
Tổng thể tích	50

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit GeneJet PCR purification. Phản ứng nối cấu trúc Lac promoter và *pigI* được thực hiện sử dụng phương pháp overlapping PCR sử dụng vùng chồng lấn dài 30 nu (Hình 2). Phản ứng overlapping PCR được thực hiện theo 2 bước.

Bước 1: Phản ứng nối 2 trình tự. Trình tự đoạn gen *pigI* và Lac promoter được nối với nhau sử dụng kit Q5 2x Master mix. Thành phần của phản ứng như sau

Bảng 2: thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
------------	---------------

H ₂ O	8
Q5 2x Master mix	10
gen <i>pigI</i>	1
Lac promoter	1
Tổng thể tích	20

Điều kiện phản ứng nối 2 đoạn trình tự 98°C – 30 giây, 40 chu kỳ (98°C- 10 giây, 72°C- 30 giây), 72°C- 5 phút.

Bước 2: Phản ứng tổng hợp cuối cùng sử dụng cặp môi có chứa vị trí nhận biết của enzyme HindIII và XhoI

LacP-HindIII-F: AAAAAAAAGCTTCAGTGAGCGCAACGCAA

pigI-XhoI-R: AAAAACTCGAGTCGCGCATTACCTCGGACAA

Thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 1 bên trên; chu kì phản ứng tổng hợp cuối cùng bao gồm: 98°C – 30 giây, 40 chu kỳ (98°C- 10 giây, 57°C- 15 giây, 72°C- 40 giây), 72°C- 5 phút. Sản phẩm được tiến hành tinh sạch bằng kit GeneJET gel extraction kit. Sau đó sản phẩm được cắt bằng 2 enzym HindIII và XhoI chèn vào vị trí tương ứng trên vector. Sản phẩm được biến nạp vào vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH10B và tiến hành chọn dòng. Dòng khuẩn lạc mang cấu trúc Lac promoter - *pigI* có trình tự được trình bày ở phần danh mục trình tự được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

Ví dụ 2. Chuẩn bị tế bào khả biến *Serratia* sp. SM

2 ml dịch tế bào nuôi qua đêm trong môi trường LB ở 30°C/200 rpm được tiếp giống với tỉ lệ 2% vào môi trường LB và nuôi lắc trong 6 giờ. Sau đó, bình nuôi được ngâm trong đá trong 15 phút để dừng sinh trưởng. Tế bào được thu sinh khối bằng cách ly tâm trong điều kiện 5000 rpm/15 phút/4°C. Tế bào sau đó được rửa 3 lần bằng H₂O deion lạnh và ly tâm trong điều kiện 10000 rpm/15 phút/4°C. Cuối cùng tế bào được hoà lại trong dung dịch làm tế bào khả biến có bổ sung glycerol 15% sao cho giá trị OD đạt 20 và chia vào các ống, mỗi ống 100 µl và bảo quản trong tủ -80°C.

Ví dụ 3. Biến nạp vector pET22b mang cấu trúc Lac promoter – *pigI* vào vi khuẩn *Serratia* sp. SM

Cấu trúc vector tái tổ hợp pET22b mang cấu trúc Lac promoter – *pigI* biến nạp vào chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM bằng phương pháp xung điện. 1 µg plasmid tái tổ hợp được trộn với 100 µl dịch tế bào khả biến và ủ đá trong 10 phút. Hỗn hợp tế bào và plasmid được chuyển sang cuvette điện đã làm lạnh và bắn xung điện ở điều kiện 2500 V, 400 Ω, 25 µF; sau đó được phục hồi trong 3 giờ trong 1 ml môi trường LB. Tế

bào sau khi phục hồi sẽ được cấy lên đĩa LB bổ sung ampicilin. Các dòng khuẩn lạc mọc trên môi trường được kí hiệu là I1 và I3 sẽ được tiến hành kiểm tra cấu trúc, khả năng biểu hiện *pigI* tái tổ hợp và khả năng sinh prodigiosin (Hình 3; Hình 4; Bảng 3). Trong đó dòng *Serratia* sp. I1 cho hàm lượng prodigiosin cao gấp 1,46 lần so với chủng ban đầu. Dòng *Serratia* sp. I1 cho kết quả biểu hiện prodigiosin tốt nhất được lựa chọn và đặt tên là *Serratia* sp. HVQY.

Bảng 3. Kết quả so sánh hàm lượng prodigiosin giữa chủng *Serratia* sp. SM ban đầu và chủng *Serratia* sp. HVQY chứa cấu trúc biểu hiện

Chủng	Hàm lượng prodigiosin tổng số (mg)	Tỉ lệ prodigiosin thu được so với chủng tự nhiên
<i>Serratia</i> sp. SM	5,38	1
<i>Serratia</i> sp. dòng I1	7,86	1,46
<i>Serratia</i> sp. dòng I3	6,87	1,27

Ví dụ 4. Nhân nuôi *Serratia* sp. HVQY

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY sau khi được chọn lọc sẽ được lên nuôi lỏng trong 50 môi trường bột vùng 2%, lắc 200 rpm, cảm ứng bằng IPTG và nuôi biểu hiện trong 3 ngày ở 28°C. Sau đó dịch nuôi sẽ được sử dụng để tiến hành tách chiết prodigiosin.

Ví dụ 5. Phân tích hoạt chất prodigiosin có trong dịch khuẩn *Serratia* sp. HVQY

Dịch nuôi vi khuẩn được chiết bằng hỗn hợp etyl axetat + 1% HCl theo tỉ lệ 1:1 (v/v). Các mẫu được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng TLC với hệ dung môi toluene: etyl axetat = 3:7 (v/v), sử dụng chất prodigiosin chuẩn làm đối chứng. Hàm lượng prodigiosin trong mẫu thô được đo bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 535 nm. Dịch chiết prodigiosin sau khi tinh sạch (Hình 5) được sử dụng để đánh giá tác dụng lên một số dòng tế bào ung thư người: tế bào ung thư gan Hep3B, tế bào ung thư tuyến giáp Hep2, tế bào ung thư vú MCF7, tế bào ung thư phổi H460 với giải nồng độ từ 0,5 – 10 µg/ml. Kết quả cho thấy giá trị IC₅₀ ở các ngưỡng nồng độ 5,5 µg/ml; 6,53 µg/ml; 2,9 µg/ml; 4,6 µg/ml lần lượt với các dòng tế bào Hep3B; MCF7; H460; Hep2 (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả đánh giá khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư của prodigiosin (IC₅₀)

Nồng độ	% ức chế tế bào			
	Hep3B	MCF7	H460	Hep2
10	23,7	34,6	3,0	28,8

8	24,8	43,9	3,0	26,9
6	25,1	54,6	8,8	29,9
4	41,8	56,3	55,3	38,9
2	45,7	56,2	61,2	67,8
1	60,2	60,6	63,8	82,0
0,5	67,4	78,2	73,0	83,9
IC ₅₀	5,5	6,53	2,9	4,6

Dịch chiết prodigiosin được đánh giá khả năng kháng một số chủng nấm gây bệnh thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. neoformans*. Kết quả cho thấy giá trị nồng độ ức chế tối thiểu đối với nấm *C. albicans* giao động trong khoảng 2 – 4 µg/ml và với nấm *C. neoformans* nằm trong khoảng 1 – 2 µg/ml. Giá trị nồng độ ức chế hoàn toàn của prodigiosin đối với 2 loài nấm trên lần lượt là 4 – 8 µg/ml và 2 – 4 µg/ml (bảng 5)

Bảng 5. Kết quả đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế hoàn toàn của prodigiosin đối với một số chủng nấm thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. neoformans*.

TT	Chủng thí nghiệm	Nguồn gốc	Loài nấm	MIC (µg/ml)	Ức chế hoàn toàn (µg/ml)
1	ATCC®90028	Chủng quốc tế	<i>C. albicans</i>	2	8
2	N376	Máu/Việt Nam	<i>C. albicans</i>	2	4
3	N378	Máu/Việt Nam	<i>C. albicans</i>	4	8
4	N383	Máu/Việt Nam	<i>C. albicans</i>	2	4
5	ATCC®90113	Chủng quốc tế	<i>C. neoformans</i>	1	2
6	N1040	Dịch não tủy/Việt Nam	<i>C. neoformans</i>	1	2
7	N1042	Dịch não tủy/Việt Nam	<i>C. neoformans</i>	2	4

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Tạo ra chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY mang cấu trúc gen Lac promoter - *pigI* tái tổ hợp trong vector pET22b, tạo ra chất prodigiosin có sản lượng gấp 1,46 lần so với chủng ban đầu. Hợp chất prodigiosin thu được có khả năng ức chế tế bào ung thư Hep3B; MCF7; H460; Hep2 và kháng các chủng nấm gây bệnh thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. Neoformans*.

Tài liệu tham khảo*Tài liệu tham khảo tiếng Việt*

1. Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Lê Đình Quyền, Vũ Trọng Lượng, Đỗ Thị Tuyên, Vũ Thị Ngọc, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Quyền Đình Thi (2014). Phân lập, định danh chủng vi sinh vật màu đỏ sinh tổng hợp hoạt chất prodigiosin ứng dụng hỗ trợ điều trị ung thư. *Tạp chí y học Việt Nam*. Số đặc biệt (421); 120-124
2. Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Lê Đình Quyền, Đỗ Thị Tuyên, Vũ Trọng Lượng, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Quyền Đình Thi (2014). Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và tinh sạch sơ bộ hợp chất prodigiosin từ dịch lên men chủng *Serratia marcescens* M10. *Hội thảo nghiên cứu và phát triển các sản phẩm tự nhiên lần thứ IV*, Đà Lạt, 14-15/11/2014; 335-346
3. Lê Đình Quyền, Vũ Trọng Lượng, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2014) Khảo sát khả năng sinh tổng hợp sắc tố đỏ prodigiosin của một số chủng vi sinh vật phân lập tại Việt Nam. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thanh niên lần thứ XIII, Năm 2014*: 206- 212
4. Vũ Trọng Lượng, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Thị Hồng Nhung (2015). Nghiên cứu tách chiết, tinh sạch và đánh giá hoạt tính của hoạt chất chống khuẩn và chống nấm prodigiosin từ chủng *Serratia marcescens* M6. *Tạp chí y học Việt Nam*. Số đặc biệt (433); 190-195
5. Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Lê Đình Quyền (2015) Tinh sạch và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của sắc tố đỏ prodigiosin từ *Serratia marcescens*. *Tạp chí sinh học* 37(1se):210-216

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

1. Chawrai SR, Williamson NR, Mahendiran T, Salmond GP, Leeper FJ (2012) Characterisation of PigC and HapC, the prodigiosin synthetases from *Serratia* sp. and *Hahella chejuensis* with potential for biocatalytic production of anticancer agents. *Chem Sci* 3(2): 447-454.
2. Chawrai SR, Williamson NR, Salmond GP, Leeper FJ (2008) Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues—exploring the substrate specificity of PigC. *Chem Commun* (16): 1862-1864.
3. Darshan N, Manonmani H (2015) Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* 52(9): 5393-5407.

4. Diaz-Ruiz C, Montaner B, Perez-Tomas R (2001) Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol Histopathol* 16(2): 415-421.
5. Domröse A, Klein AS, Hage-Hülsmann J, Thies S, Svensson V, Classen T, Pietruszka J, Jaeger K-E, Drepper T, Loeschcke A (2015) Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front Microbiol* 6:972.
6. Harris AK, Williamson NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Foulds I, Simonsen HT, Leeper FJ, Salmond GP (2004) The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* 150(11): 3547-3560.
7. Klein AS, Domröse A, Bongen P, Brass HU, Classen T, Loeschcke A, Drepper T, Laraia L, Sievers S, Jaeger K-E (2017) New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol* 6(9): 1757-1765.
8. Liu P, Zhu H, Zheng G, Jiang W, Lu Y (2017) Metabolic engineering of *Streptomyces coelicolor* for enhanced prodigiosins (RED) production. *Sci China Life Sci* 60(9): 948-957.
9. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 131(3): 585-593.
10. Neupane S, Finlay RD, Alstrom S, Goodwin L, Kyrpides NC, Lucas S, Lapidus A, Bruce D, Pitluck S, Peters L, Ovchinnikova G, Chertkov O, Han J, Han C, Tapia R, Detter JC, Land M, Hauser L, Cheng JF, Ivanova N, Pagani I, Klenk HP, Woyke T, Hogberg N (2012a) Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* strain AS12. *Stand Genomic Sci* 6(2): 165-173.
11. Neupane S, Finlay RD, Kyrpides NC, Goodwin L, Alström S, Lucas S, Land M, Han J, Lapidus A, Cheng J-F, Bruce D, Pitluck S, Peters L, Ovchinnikova G, Held B, Han C, Detter JC, Tapia R, Hauser L, Ivanova N, Pagani I, Woyke T, Klenk H-P, Högberg N (2012) Complete genome sequence of the plant-associated *Serratia plymuthica* strain AS13. *Stand Genomic Sci* 7(1): 22-30.

12. Neupane S, Högberg N, Alström S, Lucas S, Han J, Lapidus A, Cheng J, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S (2012) Complete genome sequence of the rapeseed plant-growth promoting *Serratia plymuthica* strain AS9. *Stand Genomic Sci* 6: 54–62 .
13. Rahul S, Chandrashekhar P, Hemant B, Bipinchandra S, Mouray E, Grellier P, Satish P (2015) In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitol Int* 64(5): 353-356.
14. Sambrook J, Russell DW, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
15. Suryawanshi RK, Patil CD, Koli SH, Hallsworth JE, Patil SV (2017) Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage. *Nat Prod Res* 31(5): 572-577.
16. Tomás P, Ricardo E, Montaner B (2003) Effects of the proapoptotic drug prodigiosin on cell cycle-related proteins in Jurkat T cells. *Histol Histopathol* 2003, vol. 18, num. 2, p. 379-385
17. Wang Z, Li B, Zhou L, Yu S, Su Z, Song J, Sun Q, Sha O, Wang X, Jiang W (2016) Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(46): 13150-13155.
18. Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RA, Goldet G, Slater H, Woodley L, Leeper FJ, Salmond GP (2005) Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 56(4): 971-989.
19. Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A, Kamata K, Hirata H, Yamamoto A, Kano H, Seki T (1999) Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* 30(4): 894-902.
20. Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D (2005) Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. *Biochem Pharmacol* 69(3): 407-414.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY có khả năng tổng hợp prodigiosin mang vector pET22b tái tổ hợp chứa cấu trúc Lac promoter – PigI có trình tự SEQ ID NO: 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Học viện Quân y
Viện Nghiên cứu hệ gen

<120> Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY mang gen mã hoá protein PigI tái tổ hợp

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 1638

<212> ADN

<213> *Serratia* sp.

<220>

<221> CDS

<222> 117..1616

<223> /transl_table=11

<400> 1

cgcaattaat gtgagtttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc
60

ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagct atg
119

Met
1

gca acc ttc att tca ccg ata ctg gag gcc ctg ttc cgg cac gcc cgc
167

Ala Thr Phe Ile Ser Pro Ile Leu Glu Ala Leu Phe Arg His Ala Arg
5 10 15

caa gcg ccg gaa agc acc gct ctg ctg tgc ggc gat cgg cgc tgg agc
215

Gln Ala Pro Glu Ser Thr Ala Leu Leu Cys Gly Asp Arg Arg Trp Ser
20 25 30

tat cgt cgc ctg gcc gat cgc gcc tgc atg atg gcg gcg gcg ctg cga
263

Tyr Arg Arg Leu Ala Asp Arg Ala Cys Met Met Ala Ala Ala Leu Arg
35 40 45

cat gcc ggg tta aag cag cag gcc gtg ctg ctc aac ctg cag aaa ggg
311

His Ala Gly Leu Lys Gln Gln Ala Val Leu Leu Asn Leu Gln Lys Gly
50 55 60 65

ccc gac gcc gtc gcc gcc atg tac gca tgt tgg ctg agc ggc aac cac
359

Pro Asp Ala Val Ala Ala Met Tyr Ala Cys Trp Leu Ser Gly Asn His
70 75 80

tat gtc cct atc gat ttc agc caa ccg acg gcg cgc atc gaa cgc att
407

Tyr Val Pro Ile Asp Phe Ser Gln Pro Thr Ala Arg Ile Glu Arg Ile
85 90 95

atc gcc gcc gcc tca ccc gcg ctg atc gtc gat gag ggc tgg ttg agc
455

Ile Ala Ala Ala Ser Pro Ala Leu Ile Val Asp Glu Gly Trp Leu Ser
100 105 110

gcg ctc gat ggc cgc acc gat ctc gat ggc gcc tgg ccg gaa gcg atc
503

Ala Leu Asp Gly Arg Thr Asp Leu Asp Gly Ala Trp Pro Glu Ala Ile
115 120 125

gcc gcg ctc ggc tcc ccc ctc gcc gcc att ctc tat act tca ggc tcc
551

Ala Ala Leu Gly Ser Pro Leu Ala Ala Ile Leu Tyr Thr Ser Gly Ser
130 135 140 145

aca ggc acc ccg aaa ggg gtg caa atc acc cat gac atg ctg acg ttt
599

Thr Gly Thr Pro Lys Gly Val Gln Ile Thr His Asp Met Leu Thr Phe
150 155 160

ttc atc ggc tgg gcc gtc agc gat acg caa ctg acg gcg cgc gac gtg
647

Phe Ile Gly Trp Ala Val Ser Asp Thr Gln Leu Thr Ala Arg Asp Val
165 170 175

ctg gcc aat cat gcc agt ttc gcc ttt gat ctg agc acc ttc gat ctg
695

Leu Ala Asn His Ala Ser Phe Ala Phe Asp Leu Ser Thr Phe Asp Leu
180 185 190

ttc gcc ggc gtt tgc gcc ggc gcc gcg acc tgg atc gtg cgc gaa gat
743

Phe Ala Gly Val Cys Ala Gly Ala Ala Thr Trp Ile Val Arg Glu Asp
195 200 205

gaa cag aaa gat tgc cag gct ctc gtt cgc gga ttg caa acg cac ggc
791

Glu Gln Lys Asp Cys Gln Ala Leu Val Arg Gly Leu Gln Thr His Gly
210 215 220 225

gtc act ctg tgg tac agc gtg cct tcg att tta gcc atg ctg gaa aag
 839
 Val Thr Leu Trp Tyr Ser Val Pro Ser Ile Leu Ala Met Leu Glu Lys
 230 235 240

agc gcg ttg ctg gcg cca tcg acg gtg aaa acg ctg cgc cag gtc acg
 887
 Ser Ala Leu Leu Ala Pro Ser Thr Val Lys Thr Leu Arg Gln Val Thr
 245 250 255

ttc gcc ggt gag cct tat ccg gcc gcc gcg ctg agg cgt ctg gtt gcg
 935
 Phe Ala Gly Glu Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Leu Arg Arg Leu Val Ala
 260 265 270

cat ctg ccg gcc cgg tgc cgc gtc agc aac tgg tat ggc ccg acg gaa
 983
 His Leu Pro Ala Arg Cys Arg Val Ser Asn Trp Tyr Gly Pro Thr Glu
 275 280 285

acc aat gtc tgc acc gcc tac gcg ctg gat cga acg cag ttg gcg acg
 1031
 Thr Asn Val Cys Thr Ala Tyr Ala Leu Asp Arg Thr Gln Leu Ala Thr
 290 295 300 305

ctg gag cag atc ccc atc ggc cat ccg ttg ccc ggc ttg acg gcg cag
 1079
 Leu Glu Gln Ile Pro Ile Gly His Pro Leu Pro Gly Leu Thr Ala Gln
 310 315 320

ttg gtc gat gaa cag ggg cgc ctg cag ccg att gac ggt acg ccg ggc
 1127
 Leu Val Asp Glu Gln Gly Arg Leu Gln Pro Ile Asp Gly Thr Pro Gly
 325 330 335

cga cgc gga gaa ttg ctg atc ggc ggg ccg tgc gtg acc ccc ggc tac
 1175
 Arg Arg Gly Glu Leu Leu Ile Gly Gly Pro Cys Val Thr Pro Gly Tyr
 340 345 350

agc aac gtc gcc tca tcg cgg caa gcg caa tgg cat ccg cgc caa tgt
 1223
 Ser Asn Val Ala Ser Ser Arg Gln Ala Gln Trp His Pro Arg Gln Cys
 355 360 365

cac gcg acc ggc gac tgg gtg gag acg acg gcg aat ggg ctg gtc tac
 1271
 His Ala Thr Gly Asp Trp Val Glu Thr Thr Ala Asn Gly Leu Val Tyr
 370 375 380 385

cgc ggc cgg ctg gac gac atg gtg aaa atc aac ggc tac cgg gtg gaa
1319

Arg Gly Arg Leu Asp Asp Met Val Lys Ile Asn Gly Tyr Arg Val Glu
390 395 400

ttg ggt gag att gaa tcg atc ctt cat cac cat ccc tcg gtc agc cag
1367

Leu Gly Glu Ile Glu Ser Ile Leu His His His Pro Ser Val Ser Gln
405 410 415

gcc gca ctg tat gtc gag ctc ggc gag ctg aag caa aga ctg atc gcc
1415

Ala Ala Leu Tyr Val Glu Leu Gly Glu Leu Lys Gln Arg Leu Ile Ala
420 425 430

gtg atc acc ctc cat ccc ggc gcg ctc cgc ccc aac ctg ctg gag ctc
1463

Val Ile Thr Leu His Pro Gly Ala Leu Arg Pro Asn Leu Leu Glu Leu
435 440 445

aag cag ttc ctg cag ccc agg ctg ccc gcc tat atg ctc ccc agc caa
1511

Lys Gln Phe Leu Gln Pro Arg Leu Pro Ala Tyr Met Leu Pro Ser Gln
450 455 460 465

ctg gtg gtc gcc gac agt ctg ccc acc aat gcc aac ggc aag gtg gac
1559

Leu Val Val Ala Asp Ser Leu Pro Thr Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp
470 475 480

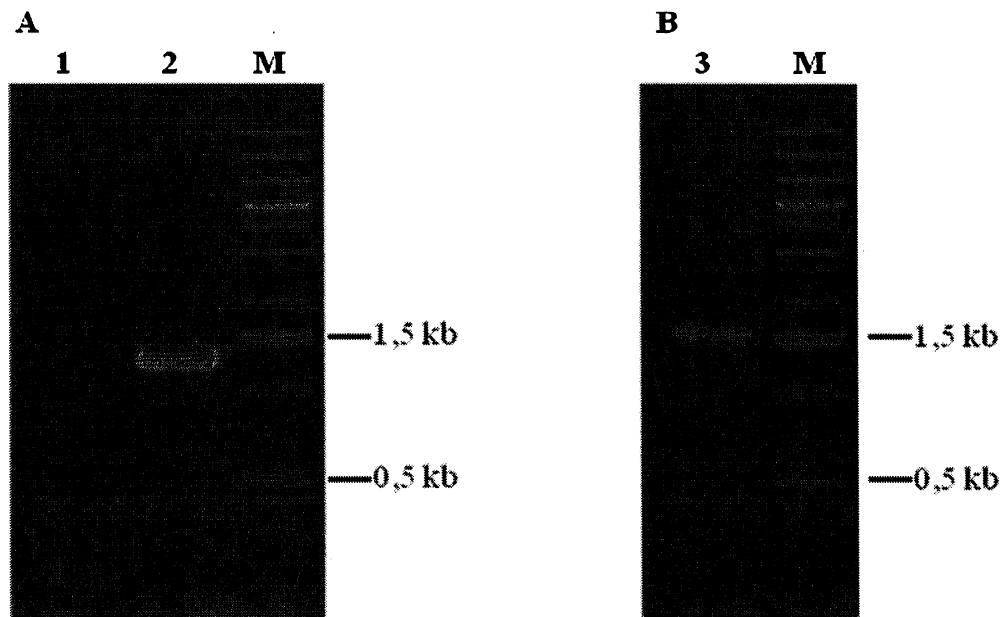
aga gga cgt ttg tcc gag gtg aat gcg cga ctc gag cac cac cac cac
1607

Arg Gly Arg Leu Ser Glu Val Asn Ala Arg Leu Glu His His His His
485 490 495

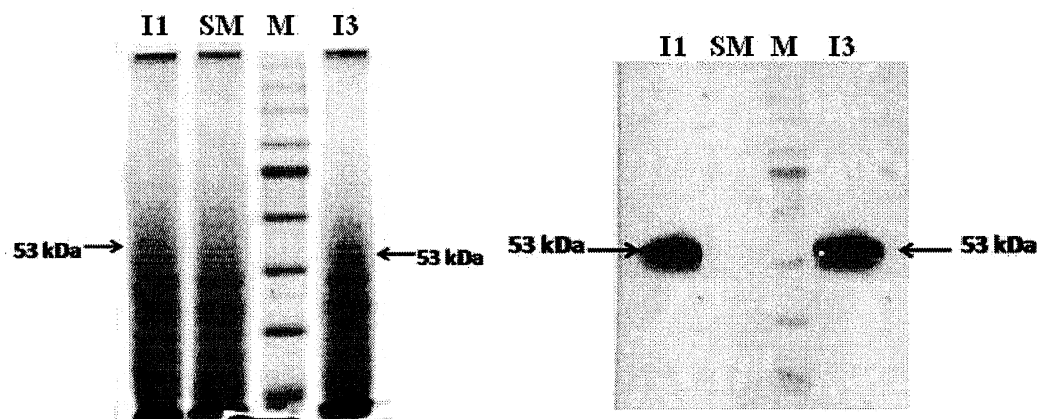
cac cac tga gatccggctg ctaacaaagc cc
1638

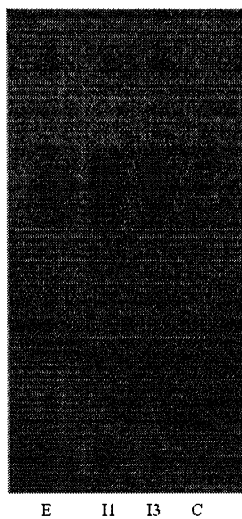
His His

Hình 1



Hình 2



Hình 3**Hình 4**