

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC

THIẾT KẾ TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP
GÂY ĐỘT BIẾN MẤT GEN *ncsB3* TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES*
CARZINOSTATICUS ATCC15944 VÀ KIỂM TRA HOẠT TÍNH
SINH HỌC CỦA CHỦNG ĐỘT BIẾN

Mã số: ĐH2013-TN07-03

Chủ nhiệm đề tài: TS Vũ Thị Thu Hằng

THÁI NGUYÊN, 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC

**THIẾT KẾ TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP
GÂY ĐỘT BIẾN MẤT GEN *ncsB3* TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES
CARZINOSTATICUS* ATCC15944 VÀ KIỂM TRA HOẠT TÍNH
SINH HỌC CỦA CHỦNG ĐỘT BIẾN**

Mã số: ĐH2013-TN07-03

Chủ nhiệm đề tài: Vũ Thị Thu Hằng
Người tham gia thực hiện:

- GS.TS Jae Kyung Sohng
- TS Tạ Thị Thu Thủy
- TS Nguyễn Thị Ngọc Hà
- CN Nông Thị Thu
- ThS Nguyễn Văn Thắng

Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài
(ký, họ tên, đóng dấu)

THÁI NGUYÊN NĂM 2019

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	viii
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU	7
1.1. Tổng quan về xạ khuẩn	7
1.1.1. Đặc điểm chung của xạ khuẩn.....	7
1.1.2. Sự hình thành chất kháng sinh từ xạ khuẩn	8
1.1.3. Kháng sinh enediyne	10
1.1.3.1. Phân loại các enediyne	10
1.1.3.2. Vai trò sinh học của enediyne	12
1.2. Neocarzinostatin.....	12
1.2.1. Cấu tạo hóa học của neocarzinostatin	12
1.2.1.1. NCS- chromophore	13
1.2.1.2. NCS-apoprotein.....	14
1.2.2. Các hướng nghiên cứu về sinh tổng hợp NCS	15
1.3. Kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng trong thiết kế vector chuyển gen.....	17
1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR: Polymerase Chain Reaction)	17
1.3.1.1. Kỹ thuật PCR từ DNA khuôn mẫu	17
1.3.1.2. Kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc	18
1.3.2. Phương pháp giải trình tự gen.....	18
1.3.3. Kỹ thuật tách dòng (cloning)	19
1.3.4. Kỹ thuật biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn.....	21
1.3.4.1. Biến nạp plasmid bằng phương pháp sốc nhiệt	21
1.3.4.2. Biến nạp plasmid bằng phương pháp xung điện.....	22
1.3.4.3. Biến nạp plasmid vào xạ khuẩn Sreptomycetes.....	22
1.3.5. Phương pháp tách DNA plasmid từ tế bào vi khuẩn.....	23
1.3.6. Phương pháp điện di trên gel agarose	23
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Vật liệu nghiên cứu	25

2.1.1. Chủng giống và môi trường nuôi cấy.....	25
2.1.2. Vector và các plasmid tái tổ hợp	25
2.1.3. Hóa chất.....	28
2.1.4. Tách chiết DNA và giải trình tự gen	28
2.2. Dụng cụ, thiết bị	28
2.2.1. Dụng cụ, thiết bị nuôi cấy	28
2.2.2. Dụng cụ, thiết bị pha chế môi trường nuôi cấy.....	28
2.2.3. Dụng cụ, thiết bị cho quá trình tách chiết và phân tích chất	28
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	29
2.3.1. Thời gian nghiên cứu.....	29
2.3.2. Địa điểm nghiên cứu	29
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	29
2.4.1. Các bước chính trong nghiên cứu.....	29
2.4.2. Sơ đồ nghiên cứu	30
2.4.3. Phương pháp gây đột biến mất gen ncsB3 bằng trao đổi chéo.....	32
2.5. Các kỹ thuật áp dụng thực hiện trong đề tài	34
2.5.1. Kỹ thuật khuếch đại gen PCR và ghép nối vào vector.....	34
2.5.2. Phương pháp tách DNA plasmid từ tế bào vi khuẩn.....	35
2.5.2.1. Nguyên tắc:	35
2.5.2.2. Cách tiến hành:.....	35
2.5.3. Phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn.....	36
2.5.4. Phương pháp nối DNA.....	37
2.5.5. Phương pháp điện di trên gel agarose	38
2.5.5.1. Nguyên tắc	38
2.5.5.2. Cách tiến hành.....	38
2.5.6. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose.....	39
2.5.7. Phương pháp tạo tế bào trần (protoplast)	39
2.5.8. Kỹ thuật chuyển vector vào tế bào trần.....	40

2.5.9. Phương pháp sàng lọc khuẩn lạc chuyển gen	41
2.5.10. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ xạ khuẩn	42
2.5.11. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh	43
2.5.12. Nuôi cấy xạ khuẩn và tách chiết NCS	44
2.5.13. Phân tích sản phẩm NCS	44
2.5.13.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)	44
2.5.13.2. Kỹ thuật ghép khối phổ ESI/MS	45
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN	46
3.1. Thiết kế tái tổ hợp mất gen ncsB3 ở chủng <i>S.carzinostaticus</i>	46
3.1.1. Kết quả PCR nhân đoạn gen upstream và downstream	46
3.1.1.1. Kết quả nhân đoạn upstream	46
3.1.1.2. Kết quả nhân đoạn downstream	47
3.1.2. Kết quả gắn upstream và downstream trong pGEM - T easy	47
3.1.3. Kết quả kiểm tra trình tự gen đoạn upstream và downstream	48
3.1.4. Kết quả tạo vector tái tổ hợp đột biến pKC-HP450	52
3.1.4.1. Kết quả gắn upstream vào vector pKC1139	52
3.1.4.2. Kết quả gắn downstream vào pKC-UP	52
3.1.4.3. Kết quả gắn gen <i>neo^r</i> vào pKC-UD	53
3.1.5. Kiểm tra độ nhạy với kháng sinh của <i>S.carzinostaticus</i>	54
3.1.6. Chuyển tổ hợp gen vào <i>S.carzinostaticus</i>	56
3.1.6.1. Tạo tế bào trần từ chủng <i>S.carzinostaticus</i>	56
3.1.6.2. Sàng lọc đột biến kép mất gen ncsB3	57
3.1.6.3. Chứng minh sự mất gen hoàn toàn ncsB3 trong chủng đột biến	59
3.1.7. Thiết kế tổ hợp bổ sung ncsB3 cho chủng đột biến	60
3.2. Kiểm tra hoạt tính sinh học chủng đột biến	60
3.2.1. Điều kiện nuôi cấy và tách chiết chất từ chủng đột biến	60
3.2.2. Phân tích sản phẩm tách chiết	61
3.2.2.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)	61

3.2.2.2. Kỹ thuật khối phổ (Mass spectrometry – ESI/MS).....	62
3.2.3. So sánh hoạt tính kháng khuẩn	63
Chương 4: KẾT LUẬN.....	65
Chương 5: KHUYẾN NGHỊ.....	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thiết kế các cặp môi cho phản ứng PCR trong nghiên cứu

Bảng 2.2. Chương trình phân tích chất bằng kỹ thuật HPLC

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của daunorubicin và idarubicin

Hình 1.2. Đại diện enediyne nhóm 9 phân tử C và nhóm 10 phân tử C_Toc487214510

Hình 1.3. Cấu tạo của neocarzinostatin

Hình 1.4. Sinh tổng hợp gốc naphthoic acid trong NCS

Hình 1.5. Mô tả các bước tiến hành và phương pháp phân tích cây chuyển gen

Hình 2.1. Sơ đồ vector pGEM - T Easy (3kb)

Hình 2.2. Sơ đồ vector pKC1139

Hình 2.3. Sơ đồ vector pIBR25

Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu

Hình 2.5. Sơ đồ đột biến mất đoạn gen *ncsB3*

Hình 2.6. Cơ chế của quá trình trao đổi chéo đơn

Hình 2.7. Cơ chế của quá trình trao đổi chéo kép

Hình 2.8. Phản ứng cắt của enzyme giới hạn

Hình 2.9. Phản ứng nối của enzyme ligase

Hình 3.1. Hình ảnh điện di DNA kết quả PCR của đoạn upstream

Hình 3.2. Hình ảnh điện di kết quả PCR của đoạn downstream

Hình 3.3. Hình ảnh điện di DNA upstream và downstream trong pGEM-T easy

Hình 3.4. Kết quả so sánh trình tự nucleotid đoạn upstream

Hình 3.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotid đoạn downstream

Hình 3.6. Hình ảnh điện di DNA của đoạn upstream trong pKC1139

Hình 3.7. Hình ảnh điện di DNA của đoạn upstream và downstream trong pKC1139

Hình 3.8. Hình ảnh điện di DNA của pKC-HP450 khi phân cắt bằng *XbaI*

Hình 3.9. Hình ảnh điện di DNA của pKC-HP450 khi phân cắt bằng ECoRI/HindIII

Hình 3.10. Kiểm tra độ nhạy kháng sinh của chủng *S.carzinostaticus*

Hình 3.11. Các khuẩn lạc phát triển trên đĩa thạch sau khi chuyển gen 36 giờ.

Hình 3.12. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa R2YE/Neo⁵⁰ và R2YE/Apr²⁰

Hình 3.13. Nuôi cấy khuẩn lạc trong môi trường lỏng R2YE/Neo⁵⁰, R2YE/Apr²⁰

Hình 3.14. Hình ảnh sản phẩm PCR với sự có mặt của gen kháng neomycin (*neo^r*) thay thế cho *ncsB3*

Hình 3.15. Hình ảnh điện di DNA khi phân cắt bằng XbaI/PstI

Hình 3.16. Sắc ký đồ HPLC phân tích sản phẩm tách tiết

Hình 3.17. Phân tích sản phẩm tách chiết từ chủng gốc bằng ESI/MS

Hình 3.18. Phân tích chất tách chiết từ chủng đột biến bằng kỹ thuật ESI/MS

Hình 3.19. Kiểm tra hoạt tính sinh học của các chất với chủng *M. Luteus*

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ
apoNCS	Neocarzinostatin apoprotein
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
ESI/MS	Mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>M.luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
NCS	Neocarzinostatin
NCS- chromophore	Neocarzinostatin chromophore
RNA	Ribonucleic Acid
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: **Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến**

- Mã số: **DH2013-TN07-03**

- Chủ nhiệm đề tài: TS Vũ Thị Thu Hằng

- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y – Dược Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

- Thời gian thực hiện: **2 năm (2013-2014)**

2. Mục tiêu:

2.1. *Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.*

2.1. *Kiểm tra hoạt tính sinh học của tái tổ hợp đột biến.*

3. Tính mới và sáng tạo:

Nghiên cứu này cung cấp thêm minh chứng vai trò của gen *ncsB3* trong con đường sinh tổng hợp naphthoic acid của kháng sinh neocarzinostatin, ngoài ra với kết quả nghiên cứu là bước đầu trong việc tạo ra các sản phẩm tương đồng từ xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp gây đột biến mất gen.

4. Kết quả nghiên cứu:

Thiết kế thành công chủng xạ khuẩn đột biến gây mất gen *ncsB3* từ chủng xạ khuẩn gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp thay thế gen.

Bước đầu đã kiểm tra và so sánh được hoạt tính sinh học của chất chiết tách từ chủng xạ khuẩn đột biến so với chủng xạ khuẩn gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.

5. Sản phẩm:

5.1. Sản phẩm khoa học:

- 1 bài báo đăng trên tạp chí sinh học của Hàn Quốc:

Vu Thi Thu Hang, Tae Jin Oh & Jae Kyung Sohng (2015), “Phân tích sản phẩm của chủng đột biến gen *ncsB3* - P450 hydroxylase từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *J.Biomolecule Reconstruction*, 12 (1-2), tr. 9-14.

- 1 bài báo đăng trên tạp chí công nghệ của Việt Nam:

Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Thị Hà, Tạ Thị Thu Thủy & Jae Kyung Sohng (2014), “Xác định môi trường tối ưu nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, 12 (126), tr. 41-44.

- Tham gia báo cáo poster tại 01 Hội thảo Quốc tế lần thứ nhất về ứng dụng Vi sinh học diễn ra tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Số poster: P0828-05.

Tiêu đề poster: Phân tích sản phẩm của chủng đột biến gen *ncsB3* - P450 hydroxylase từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944.

5.2. Sản phẩm đào tạo:

- Hướng dẫn khóa luận tốt nghiệp cho 01 sinh viên Đại học:

Vũ Thị Hà (2014), *Nghiên cứu quy trình nuôi cấy và tách chiết kháng sinh Neocarzinostatin từ chủng S.Cazinostaticus*, Khóa luận tốt nghiệp, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Thái Nguyên.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu:

Nghiên cứu sẽ còn tiếp tục thực hiện trong Labo để xác định hoạt tính của các sản phẩm tách chiết từ chủng đột biến. Sản phẩm sẽ được nghiên cứu thử nghiệm trên tế bào động vật để xác định hoạt tính của độc chất.

Ngày 10 tháng 7 năm 2019

Tổ chức chủ trì
(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài
(ký, họ và tên)

TS Vũ Thị Thu Hằng

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: **Constructing the recombinant of disruption *ncsB3* from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 and checking the bioactivity of mutant.**

Code number: **DH2013-TN07-03**

Coordinator: PhD Vu Thi Thu Hang

Implementing institution: Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

Duration: 2 years (from 2013 to 2014)

2. Objective(s):

2.1. *Constructing the recombinant by deleting *ncsB3* from *S.carzinostaticus* ATCC15944*

2.2. *Checking the bioactivity of mutant.*

3. Creativeness and innovativeness:

This research provided more the evidence to prove the role of *ncsB3* in the biosynthetic pathway of naphthoic acid moiety that consists of neocarzinostatin. Additionally, this results is the initial for engineering the analog of neocarzinostatin.

4. Research results:

We are succeeded in designing the recombinant that deleted *ncsB3* from *S.carzinostaticus* ATCC15944. The mutant strain was supposed to be the analogs of neocarzinostatin. The products were extracted from mutant strain by the same way to do with wild type strain, then checked the bioactivity to compare with NCS.

5. Products:

5.1. Science products

- One paper was published in Biology journal of Korea.

Vu Thi Thu Hang, Tae Jin Oh & Jae Kyung Sohng (2015), “Analysis the product of deletion *ncsB3* - P450 hydroxylase from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *J.Biomolecule Reconstruction*, N^o1-2 (Vol12), pp 9-14.

- One paper was published in Biotechnology of Vietnam

Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Thị Hà, Tạ Thị Thu Thủy & Jae Kyung Sohng (2014), “Determined the opiminisom to culture *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *Biotechnology of Vietnam*, N^o126 (Vol12), pp 41-44.

5.2. Training products:

- Guided an undergradutated student:

Vu Thi Ha (2014), The study of culture and isolation *Neocarzinostatin* from *S.Cazinostaticus*, Undergraduated thesis, Thai Nguyen University of Medicine & Pharmacy.

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results:

This research will be continued in Laboratory to determine the activity of products isolated from the mutant. Futher doing they will be checked the toxic on the animal cells.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Neocarzinostatin (NCS), là kháng sinh thuộc nhóm kháng sinh tự nhiên enediyne và được tách chiết từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 [28], NCS là kháng sinh được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm kháng sinh enediyne.

NCS-chromophore là một phần cấu tạo nên NCS có khả năng ức chế sự tổng hợp DNA dẫn đến sự giáng hoá DNA trong tế bào [29], vì vậy NCS được ứng dụng trong điều trị một số bệnh ung thư do khả năng chống lại sự nhân lên ác tính của các tế bào non.

Cấu trúc hoá học của NCS-chromophore rất dễ bị thay đổi dưới tác nhân nhiệt độ cao, tia cực tím và đặc biệt là pH cao. Kháng sinh enediyne thuộc nhóm kháng sinh có hoạt tính sinh học mạnh nhất và nổi bật nhất đối với tế bào ung thư. Tuy nhiên, đối lập với hoạt tính chống ung thư nổi bật, các sản phẩm enediyne tự nhiên ít được sử dụng trên lâm sàng vì độc tính muôn của chúng[3] ,[47],[50],[53].

Một trong những phương pháp làm giảm tác dụng phụ của NCS là sử dụng kỹ thuật protein trong việc thay đổi mô hình vị trí gắn của chromophore để tạo ra thuốc khác (sản phẩm đồng đẳng của enediyne) cũng có hoạt tính sinh học tương tự enediyne nhưng ít các tác dụng phụ hơn[11], [13], [35]. Những sản phẩm đồng đẳng của enediyne nói chung hay những đồng đẳng của NCS nói riêng phần nào đã làm giảm được độc lực của chúng. Việc tạo ra được các sản phẩm như vậy rất cần thiết cho lâm sàng và nó cũng là xu hướng nghiên cứu trong lĩnh vực enediyne [35],[47].

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy sau khi loại bỏ cytochrome P450 có khả năng tạo ra các chất đồng phân mới hoặc làm tăng sản lượng các chất [13],[16],[34],[41],[43]. Bản đồ gen của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 đã được công bố với tổng chiều dài gần 130 kb [36], trong đó chức năng sinh học của các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp kháng sinh NCS ngày

càng được nghiên cứu làm sáng tỏ [49], [36], [12], [37], [24]. Trong hệ gen của chủng *S.carzinostatus* ATCC15944, *ncsB3* là gen được chứng minh là cytochrome P-450 hydroxylase, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gốc naphthoic acid của NCS [24].

Với xu hướng nghiên cứu tạo sản phẩm mới làm giảm tác dụng phụ trên lâm sàng của NCS, chúng tôi tiến hành đề tài “Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gene *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến” với 2 mục tiêu sau:

1. Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.

2. Kiểm tra hoạt tính sinh học của tái tổ hợp đột biến.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về xạ khuẩn

1.1.1. Đặc điểm chung của xạ khuẩn

Xạ khuẩn (Actinomycetales) là nhóm vi sinh vật đơn bào hay vi khuẩn thật. Tên xạ khuẩn-actinomycete- bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp “actys” (tia) và “mykes” (nấm) và ban đầu xạ khuẩn được coi là nấm nhỏ vì chúng sinh trưởng giống với nấm. Phần lớn xạ khuẩn là các tế bào Gram (+), hoại sinh, có cấu tạo sợi phân nhánh. Mạng lưới phân nhánh của thể sợi thường phát triển ở cả bề mặt cơ chất rắn (tạo thành hệ sợi khí sinh) lẫn bên trong tạo thành hệ sợi cơ chất [6]. Đa số xạ khuẩn sinh bào tử, bào tử rất khác nhau về hình dạng và kích thước. Đây là một trong những đặc điểm để phân loại.

Xạ khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên: trong đất, trong nước ao hồ, nước biển, một phần trong bùn, lớp trầm tích và trong các chất hữu cơ khác. Xạ khuẩn được nghiên cứu một cách sâu sắc vì chúng có ý nghĩa quan trọng trong tự nhiên: tích cực tham gia vào các quá trình chuyển hóa nhiều hợp chất trong đất, trong nước, chúng có vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất của tự nhiên. Chúng sản sinh ra nhiều sản phẩm trao đổi chất quan trọng khác nên đã được dùng để sản xuất nhiều loại enzym như: protease, amilase, cellulase, glucoizomerase, vitamin và các axit hữu cơ. Những đặc điểm quan trọng bậc nhất của xạ khuẩn là khả năng sinh chất kháng sinh, trong đó 60-70% xạ khuẩn phân lập được từ đất có khả năng này [1].

Trong số khoảng 8000 chất kháng sinh hiện đã được biết đến trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn [2]. Đây là kết quả của quá trình đối kháng giữa các vi sinh vật và thúc đẩy quá trình tiến hóa của xạ khuẩn.

Nhìn chung, nhiệt độ ôn hòa 25-30°C và pH trung tính là các điều kiện tối ưu cho xạ khuẩn phát triển. Mặc dầu vậy, nhiều loài đã được phân lập ở các môi trường khắc nghiệt ví dụ như *Arthrobacter ardleyensis* ưa lạnh được

phân lập từ trầm tích hồ ở Nam cực có thể sống ở nhiệt độ 0°C [9] và *Nocardiopsis alkaliphila* được phân lập từ đất sa mạc ở Ai Cập có thể sống ở pH 9.5-10 [26].

Xạ khuẩn thường được chia thành hai loại: *Streptomyces* và không phải *Streptomyces* (non-*Streptomyces*). Chi xạ khuẩn được biết nhiều nhất là *Streptomyces*, với khoảng 500 loài. *Streptomyces* đặc biệt nhiều trong đất nơi chúng phân hủy hoại sinh rất nhiều các chất hữu cơ bằng các enzyme ngoại bào. Một phần rất lớn các chất kháng sinh được sử dụng hiệu quả trong điều trị có nguồn gốc từ các loài *Streptomyces* trong đó được biết đến nhiều nhất là streptomycin, erythromycin và tetracycline.

1.1.2. Sự hình thành chất kháng sinh từ xạ khuẩn

Chất kháng sinh là sản phẩm trao đổi chất bậc hai, thông thường được hình thành ở cuối pha sinh trưởng, trong pha cân bằng. Ở xạ khuẩn, sinh tổng hợp chất kháng sinh có quan hệ nghịch với sự hình thành bào tử, đó là điểm cần lưu ý trong khi nghiên cứu sinh tổng hợp chất kháng sinh từ xạ khuẩn.

Trong số 8000 chất kháng sinh đã biết đến trên thế giới thì hơn 45% là do xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh ra, chỉ hơn 21% là của nấm [2]. Chi *Streptomyces* là chi được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm xạ khuẩn, với 500 loài đã được miêu tả, chi này có nhiều loài có khả năng sinh chất kháng sinh, một trong những loại kháng sinh rất quan trọng là streptomycin do *Streptomyces griseus* sinh ra. Khả năng sinh kháng sinh là kết quả của quá trình đối kháng giữa các vi sinh vật và thúc đẩy quá trình tiến hóa của xạ khuẩn.

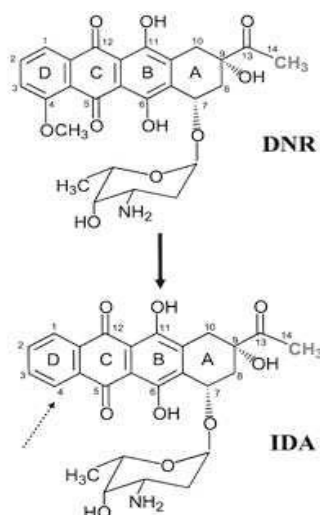
Đối với sinh tổng hợp chất kháng sinh từ xạ khuẩn, người ta thường mô tả hai pha: pha sinh trưởng (trophophase) - khuẩn ty sơ cấp phát triển nhanh; pha sinh tổng hợp (idiophase) - sinh trưởng chậm đôi khi xuất hiện quá trình tự tan của khuẩn ty và sinh tổng hợp chất kháng sinh mạnh.

Các hợp chất kháng sinh khác nhau của xạ khuẩn đã được nghiên cứu

đặc điểm gồm aminoglycoside, anthracyclin, glycopeptide, β -lactam, macrolides, nucleoside, peptide, polyene, polyeste, polyketide, actinomycin và tetracycline [20]. Các hợp chất này đã được sử dụng thành công làm thuốc diệt cỏ, thuốc chống ung thư, thuốc, các chất điều hòa miễn dịch và các chất chống ký sinh trùng [22].

Ở sinh vật bậc cao mỗi tế bào có chức năng nhất định được thực hiện trong mối liên hệ với các tế bào khác. Đôi khi, tế bào mất liên hệ với các tế bào xung quanh và phân chia một cách không ngừng để tạo thành cấu trúc gọi là khối u hay ung thư. Ung thư được điều trị bằng một trong ba liệu pháp hoặc kết hợp các liệu pháp gồm phẫu thuật để loại bỏ khối u, chiếu xạ để phá hủy chọn lọc các tế bào ung thư hoặc hóa trị liệu (dùng hóa chất). Nhiều chất hóa học dùng trong hóa trị liệu ung thư là các sản phẩm thứ cấp do vi sinh vật sinh ra do đó được gọi là kháng sinh chống/kháng khối u [8], [27], [42].

Một số nhóm kháng sinh đã được dùng trong điều trị ung thư có thể kể đến là anthracycline, actinomycin và bleomycin. Anthracycline được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư như ung thư máu, ung thư bạch huyết, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư bàng quang [19]. Một số chủng được cho là anthracycline là *Streptomyces coeruleorubidus* hoặc *Streptomyces peucetius*. Nhóm kháng sinh này cho đến nay được ghi nhận gồm daunorubicin (DNR), doxorubicin, epirubicin và idarubicin (IDA) (**Hình 1.1**). Daunorubicin và adriamycin gắn vào các cặp base do đó kìm hãm tổng hợp RNA và DNA. Mithramycin và chromomycin A3 kìm hãm tổng hợp RNA phụ thuộc DNA, Bleomycin tương tác và làm đứt gãy DNA [42], [8].



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của daunorubicin (DNR) và idarubicin (IDA)

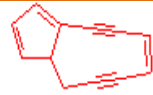
1.1.3. Kháng sinh enediyne

Rất nhiều sinh vật có khả năng sản xuất tự nhiên các hợp chất enediyne. Các kháng sinh enediyne tự nhiên là các sản phẩm trao đổi chất bậc hai được sinh ra chủ yếu bởi đất và vi sinh vật biển. Thực tế các enediyne là một trong những chất có khả năng kháng ung thư mạnh nhất được nghiên cứu. Các nhà nghiên cứu tập trung vào việc nghiên cứu hoạt tính của enediyne trong các lĩnh vực hóa học, sinh học, y học bởi cấu trúc phân tử đặc biệt của nó, hoạt tính sinh học và phương thức hoạt động mới lạ của nó [50].

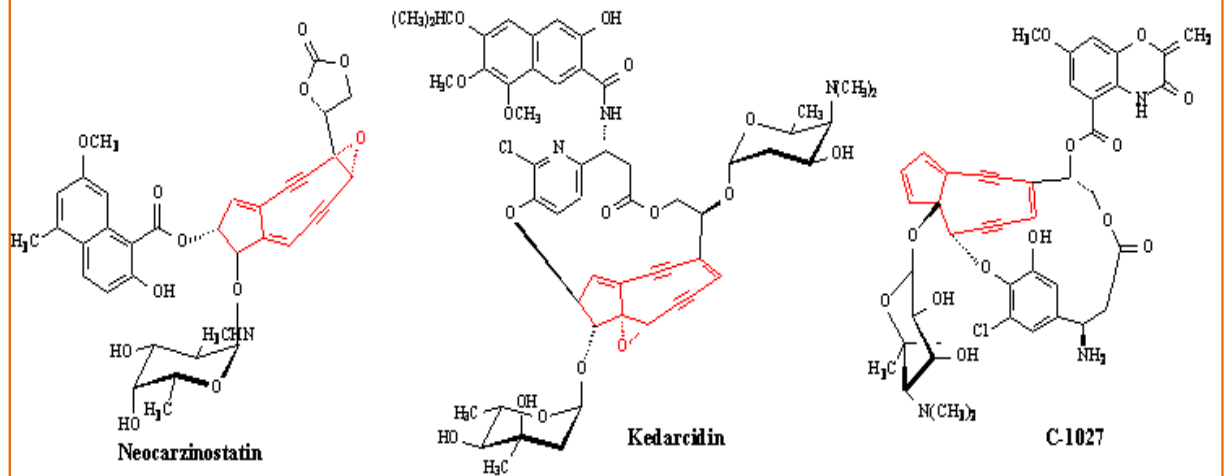
1.1.3.1. Phân loại các enediyne

Dựa vào sự hiện diện của nhân bicyclo[7.3.0] - dodecadienediyne hoặc bicyclo [7.3.1]- tridecadiynene, các chromophore enediyne tự nhiên được chia ra thành 2 nhóm: nhóm có 9 phân tử cacbon và nhóm có 10 phân tử cacbon. Nhóm có 9 phân tử cacbon hiện tại bao gồm neocarzinostatin, kedarcidin, C-1027, maduropeptin (**Hình 1.2**). Nhóm có 10 phân tử cacbon đại diện như calicheamicin, esperramicin A1.

Nhóm 9 C



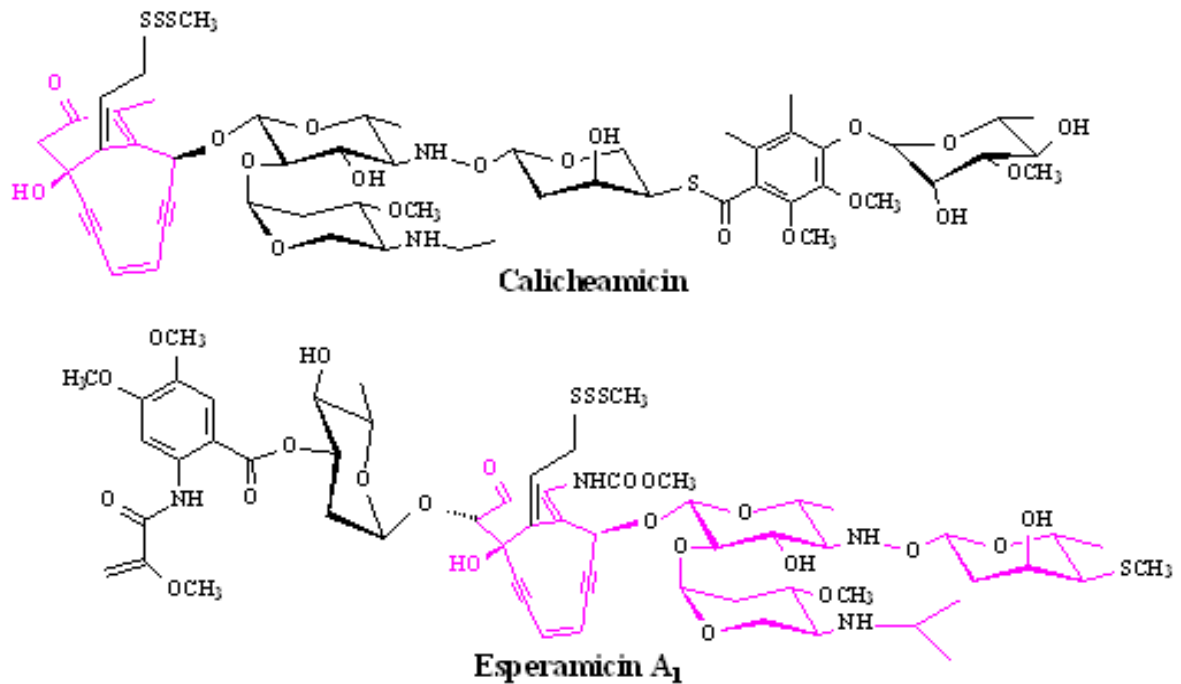
Bicyclo[7.3.0]decaenediyne



Nhóm 10 C



Bicyclo[7.3.1]tridecadienene core



Hình 1.2. Đại diện enediyne nhóm 9 phân tử C và nhóm 10 phân tử C

1.1.3.2. Vai trò sinh học của enediyne

Các enediyne nhận được sự quan tâm chú ý đặc biệt trong vòng hai thập kỷ gần đây không chỉ bởi cấu trúc đặc biệt mà còn bởi hoạt tính kháng sinh chống ung thư đáng chú ý của chúng [50], [48]. Thực tế các enediyne là một trong những chất có khả năng kháng ung thư mạnh nhất được nghiên cứu. Ví dụ, calicheamicin và shishijimicin A có hoạt tính chống ung thư mạnh gấp 4000 và 13000 lần so với thuốc chống ung thư adriamycin đang được sử dụng rộng rãi hiện nay. Các nghiên cứu cho thấy enediyne xen vào cấu trúc DNA của tế bào ung thư và phá hủy chúng [48].

Mặc dù hoạt tính chống ung thư của nhóm kháng sinh enediyne rất nổi bật, nhưng ứng dụng của chúng trên lâm sàng còn hạn chế do độc tính muộn của các sản phẩm enediyne [50], [53], [3]. Để vượt qua những khó khăn này, một số các enediyne biến đổi đã được chuẩn bị cho mục đích lâm sàng và hứa hẹn có những triển vọng tốt đẹp. Gregory và đồng nghiệp đã biến đổi esperamicin bằng chemotype enediyne, tất cả 3 đồng phân tổng hợp của esperamicin được chỉ ra rằng có ít độc tính hơn esperamicin A1 tự nhiên trên cả thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* [21]. Những mẫu phức hợp polymer của neocarzinostatin được phát triển vào năm 1994 để điều trị ung thư tế bào gan ở Nhật Bản dưới cái tên zinostatin stimaler (SMANCS) [38].

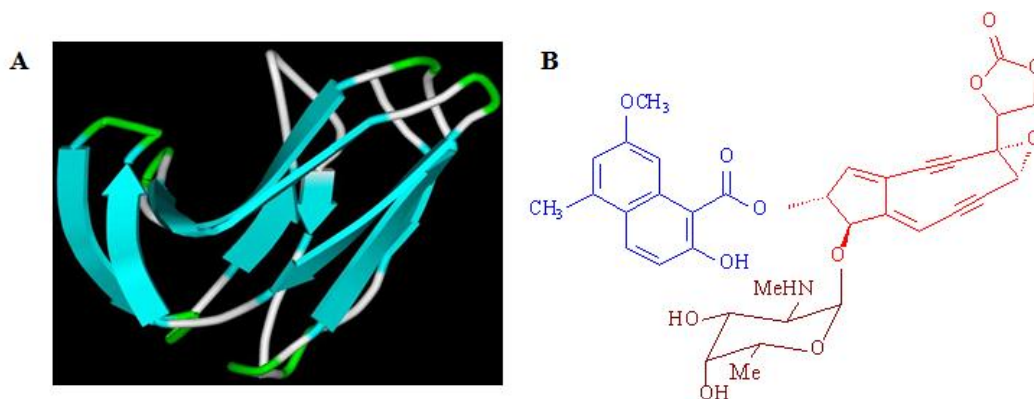
1.2. Neocarzinostatin

1.2.1. Cấu tạo hóa học của neocarzinostatin

Neocarzinostatin (NCS) là kháng sinh thuộc nhóm kháng sinh tự nhiên enediyne. NCS là một trong những kháng sinh được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm kháng sinh enediyne, chúng được tách chiết từ xạ khuẩn *S. carzinostaticus ATCC15944*. Kháng sinh này đã được xác định có khả năng ức chế tổng hợp DNA và làm giảm chất lượng của DNA trong tế bào [17].

NCS có cấu tạo gồm 2 phần: protein (NCS-apoprotein) và phần non-protein (NCS-chromophore) theo tỉ lệ 1:1 [15]. (**Hình 1.3**).

Các nghiên cứu cho thấy hoạt tính sinh học của NCS không phụ thuộc vào phần protein (apoprotein), mà nó phụ thuộc vào phần NCS - chromophore [44], [30].



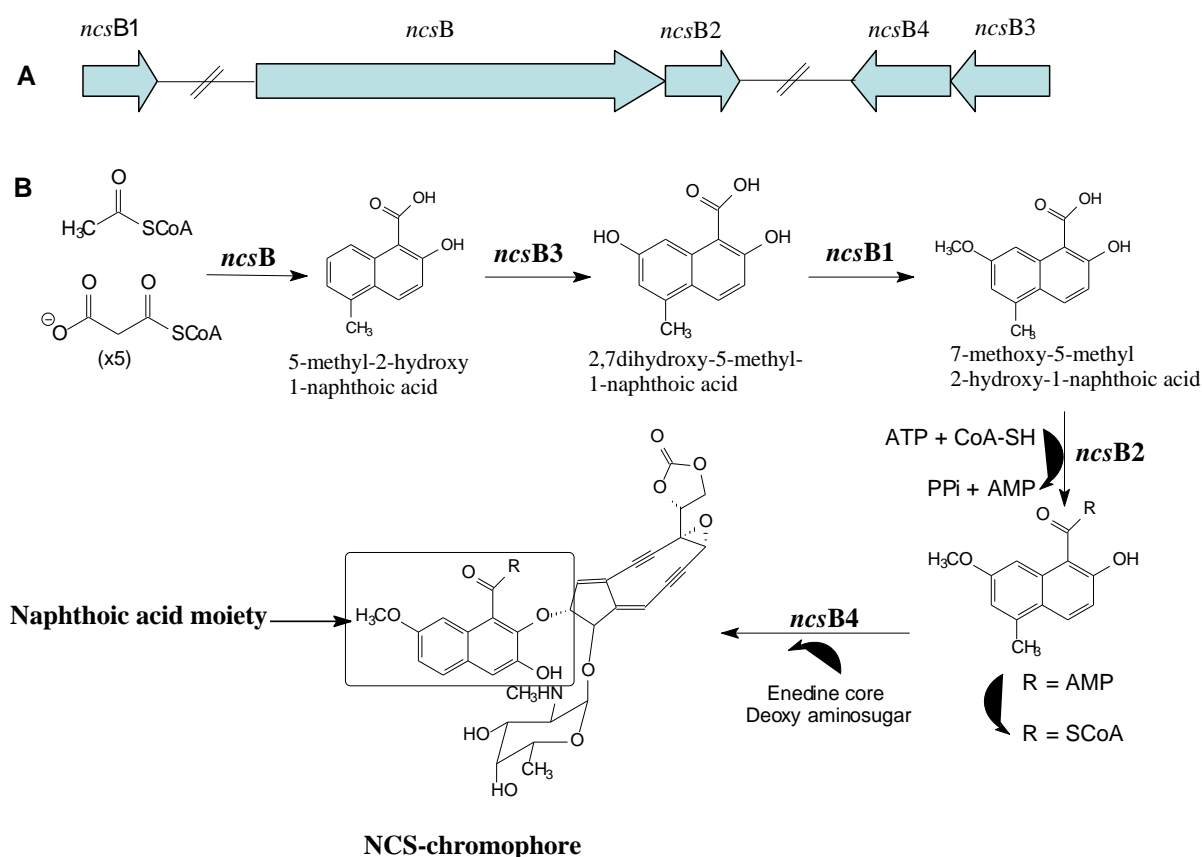
Hình 1.3. Cấu tạo của neocarzinostatin: (A) NCS-apoprotein; (B) NCS-chromophore

1.2.1.1. NCS- chromophore

Phần có hoạt tính sinh học trong NCS là NCS-chromophore (**Hình 1.3B**) nhưng cấu trúc hoá học của nó rất dễ bị thay đổi nếu không có phần bảo vệ của NCS-apoprotein (**Hình 1.3A**). NCS-chromophore có khả năng ức chế sự tổng hợp DNA dẫn đến sự giáng hoá DNA trong tế bào. Cấu tạo hoá học của NCS-chromophore được chia làm 3 phần: Gốc enediyne, gốc đường và gốc naphthoic acid.

Naphthoic acid trong NCS là vị trí để NCS-apoprotein gắn vào, đây là phần lợi hết sức quan trọng đã được các nghiên cứu chứng minh con đường sinh tổng hợp tạo ra NCS naphthoic acid [49], [36], [24].

NCS- chromophore đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính và độc tính tự nhiên của phức hợp. Công thức cấu tạo của NCS-chromophore có những liên kết kép nên có đặc tính không bền vững dưới tác động của nhiệt độ cao, tia cực tím và đặc biệt là pH cao. Nó có xu hướng nhận thêm hydro để tạo thành liên kết đơn.



Hình 1.4. (A) Các gen của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 tham gia sinh tổng hợp gốc naphthoic acid; (B) Con đường sinh tổng hợp gốc naphthoic acid trong NCS (ncsB: naphthoic acid synthase; ncsB1: O-methyltransferase; ncsB2: CoA ligase; ncsB3: P-450 hydroxylase).

1.2.1.2. NCS-apoprotein

NCS-apoprotein hay apoNCS (**Hình 1.3A**) là một protein có độ dài 11kDa gồm 113 aa [28]. Trong một nghiên cứu *in vitro* chứng minh rằng apoNCS có thể được thiết kế thành một phương tiện vận chuyển cho các loại thuốc mà không liên quan đến phần NCS-chromophore [10].

Để nghiên cứu độ bền kết cấu của apoNCS với một số chất làm biến tính, Christopher và cộng sự đã nghiên cứu độ bền kết cấu của apoNCS với một số chất làm biến tính bởi lưỡng sắc tròn và quang phổ cộng hưởng từ [10]. Kết quả kiểm tra cho thấy apoNCS là một protein ổn định và với cấu trúc bất thường của apoNCS chống lại tác nhân làm biến tính hóa học cho thấy tiềm năng của apoNCS như là một chất vận chuyển trong hệ thống phân phối thuốc [10].

NCS-apoprotein được nghiên cứu có tác dụng làm ổn định và vận chuyển hoạt tính sinh học của chromophore. Apoprotein đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính của thuốc bằng việc bảo vệ những chromophore không ổn định và giải phóng chromophore tới đích DNA [51],[52].

Bằng việc tăng biểu lộ gen apoprotein ở 2 kháng sinh enediyne neocarzinostatin và kedarcidin đã cho thấy xạ khuẩn kéo dài được thời gian sống hơn và sản lượng kháng sinh tăng lên so với lượng kháng sinh thu được từ chủng gốc [23].

Mặc dù có rất nhiều nghiên cứu về vai trò của apoprotein, tuy nhiên vai trò chính xác của nó vẫn cần tiếp tục nghiên cứu và tìm hiểu thêm.

1.2.2. Các hướng nghiên cứu về sinh tổng hợp NCS

Một trong những thành tựu của y học hiện đại là phát triển các chất kháng sinh và các chất kháng vi sinh vật khác. Tuy nhiên, rõ ràng là các vi sinh vật đã và đang phát triển tính kháng với các kháng sinh hiện có bằng các đột biến mới hoặc thay đổi thông tin di truyền [5]. Cần phải có các kháng sinh mới có tác dụng hiệu quả lên các vi khuẩn kháng thuốc, đặc biệt là các hợp chất chống khối u và ký sinh trùng. Tuy nhiên việc tìm kiếm các kháng sinh chống ung thư khó hơn nhiều so với các chất kháng khuẩn hay kháng nấm về mặt phương pháp và biểu hiện [42].

Bằng thử nghiệm dùng chất đồng vị đã chỉ ra rằng gốc naphthoic acid có nguồn gốc từ 1 chuỗi polyketide có 6 đơn vị acetate [25]. Dựa vào bản đồ gen của neocarzinostatin, Liu và CS đã chỉ ra rằng con đường sinh tổng

hợp cho gốc naphthoic acid có liên quan đến 4 gen khác nhau (**Hình 1.4**): *ncsB* (naphthoic acid synthase), *ncsB1* (*O*-methyltransferase), *ncsB2* (CoA ligase), *ncsB3* (cytochrome P450) [36]. Sthapit và CS khi clon *ncsB* và biểu lộ trên cả 2 chủng giống *S. lividans* TK24 and *S. coelicolor* YU105 thu được sản phẩm 2-hydroxy-5-methyl-1-naphthoic acid [49]. Mặc dù *ncsB1* cho thấy là enzyme gây methyl hóa trong gốc naphthoic acid (**2**) [37], tuy nhiên chức năng hydroxyl hóa của *ncsB3* tại vị trí carbon C-7 trong gốc naphthoic acid vẫn chưa được rõ ràng. Với việc chứng minh chức năng của *ncsB3* (*in vivo*) Do đó việc chứng minh con đường sinh tổng hợp của gốc naphthoic acid sẽ là cơ hội để tạo ra các sản phẩm mới tương đồng với NCS mà sản phẩm này lại ít độc tính hơn, bền vững hơn.

Bên cạnh tác dụng ưu việt của NCS đối với các tế bào ung thư nhưng do tác dụng phụ của nó nên xu hướng tạo ra các chất tương đồng với NCS nhưng làm giảm tổn thương của thuốc lên tế bào đích đã và đang được các nhà khoa học nghiên cứu áp dụng. Điều này đã được hiện thực hóa bằng cả phương pháp thay đổi cấu trúc hóa học protein của NCS [4] hay thay đổi liên kết đồng hóa trị đối với kháng thể đơn dòng mà từ đó nó có thể nhận ra glycoprotein trên bề mặt của tế bào ung thư đại tràng ở người [33].

Hoạt tính sinh học của NCS hay các enediyne khác phụ thuộc rất nhiều vào phần chromophore. Sáng kiến tạo ra các sản phẩm được có cấu trúc tương tự như các enediyne tự nhiên bằng phương pháp thay đổi phần chromophore trong quá trình chuyển hóa được các nhà khoa học quan tâm rất nhiều và đã đạt được những thành công nhất định như khi gây đột biến mất gen halogenase (*sgcC3*), monooxygenase (*sgcC*) và methyltransferase (*sgcD4*) của chủng *S. globisporus* đã tạo ra sản phẩm tương ứng như deschloro-C-1027, deshydroxyl-C-1027 và desmethyl-C-1027 [31]. Các sản phẩm này đều có khả năng làm bẻ gãy các cầu nối giữa 2 chuỗi DNA giống như sản phẩm gốc C-1027 tuy nhiên chúng lại không có khả năng bẻ gãy chuỗi xoắn kép

DNA như sản phẩm gốc C-1027. Điều đáng quan tâm là từ sự thay đổi nhỏ trong cấu tạo của C-1027 dường như đã có thể dẫn đến cơ chế tổn thương DNA khác đi và điều này gợi ý phương thức đáp ứng khác của tế bào [7].

1.3. Kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng trong thiết kế vector chuyển gen

1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR: Polymerase Chain Reaction)

1.3.1.1. Kỹ thuật PCR từ DNA khuôn mẫu

Phương pháp PCR được Kary Mullis và cộng sự công bố tháng 10 năm 1985, tạo ra bước nhảy vọt của sinh học phân tử và kỹ thuật gen. Phương pháp này cho phép khuếch đại, tạo ra lượng lớn các bản sao của một đoạn DNA dưới tác dụng của enzym DNA polymerase..

Thành phần tham gia vào phản ứng PCR gồm có: một đoạn DNA khuôn, mồi (primer), các nucleotit tự do (dNTP), enzym DNA polymerase, Mg^{2+} . Mồi (primer) là các đoạn oligonucleoit ngắn khoảng 14-35 nucleotit có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn (tạo nhóm 3' OH tự do, cần thiết cho phản ứng polyme hóa). Mồi trong phản ứng PCR gồm 1 mồi xuôi F (forward) và một mồi ngược R (revert), đoạn DNA được nhân lên là đoạn được giới hạn bởi cặp mồi này. Phản ứng PCR dựa trên cơ sở tính chất biến tính, hồi tính của DNA và nguyên lý tổng hợp DNA. Nó là một chuỗi các phản ứng liên tục, gồm nhiều chu kỳ kế tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba giai đoạn:

- Giai đoạn biến tính: ở nhiệt độ cao $90-95^{\circ}C$, các liên kết hydro của DNA bị phá vỡ, DNA chuyển từ dạng sợi kép thành sợi đơn. Người ta căn cứ vào đặc điểm của DNA khuôn để xác định nhiệt độ biến tính phù hợp. Giai đoạn này thường kéo dài 1 đến 2 phút.

- Giai đoạn gắn mồi: các mồi bắt cặp với mạch đơn DNA khuôn ở các đầu 3' theo nguyên lý Chargaff, giai đoạn này diễn ra ở khoảng nhiệt độ từ $40-70^{\circ}C$. Thời gian gắn mồi thường kéo dài từ 30 giây đến 1 phút.

- Giai đoạn tổng hợp: enzym DNA polymerase xúc tác hoạt động tổng hợp gắn thêm các nucleotit vào cuối đoạn mồi, các mồi được kéo dài trên cơ

sở bắt cặp với mạch khuôn theo nguyên lý Chargaff tạo nên các mạch đơn DNA mới, đây còn được gọi là giai đoạn polymer hóa. Giai đoạn này có thể kéo dài từ 30 giây đến vài phút, tùy thuộc vào kích thước đoạn DNA cần tổng hợp. Nhiệt độ thường sử dụng cho giai đoạn tổng hợp là 72°C.

Một phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ liên tục, sản phẩm được tạo ra ở chu kỳ trước lại làm khuôn cho chu kỳ tiếp theo nên số lượng bản sao tạo thành tăng theo cấp số nhân. Với N sợi khuôn ban đầu sau n chu kỳ sẽ có $N \times 2^n$ sợi DNA được nhân lên. Một phản ứng PCR thường được thực hiện từ 20-40 chu kỳ.

1.3.1.2. Kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp để xác định tế bào vi khuẩn có mang gen mong muốn như phương pháp colony-PCR, cắt plasmid bằng các enzyme giới hạn hoặc PCR từ plasmid. Trong đó phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc cho phép phát hiện nhanh khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp mong muốn. Phương pháp này có ưu điểm là nhanh, ít tốn kém và đơn giản. Hiện nay, kỹ thuật này được ứng dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu sinh học phân tử.

Nguyên tắc của kỹ thuật colony-PCR dựa trên nguyên tắc kỹ thuật PCR, chỉ khác ở khâu lấy mẫu DNA được thay bằng DNA plasmid giải phóng từ khuẩn lạc. Tại nhiệt độ cao (94 - 95°C), màng tế bào vi khuẩn bị phá vỡ, giải phóng plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp này sẽ làm khuôn cho phản ứng PCR nhân gen bằng cặp mồi đặc hiệu.

1.3.2. Phương pháp giải trình tự gen

Từ năm 1975, một số phương pháp giải trình tự gen đã được phát minh:

- Phương pháp giải trình tự gen bằng enzyme hay phương pháp Dideoxy của Frederick Sanger [46].

- Phương pháp giải trình tự gen theo phương pháp hóa học [40].

Cả hai phương pháp này đã đánh dấu bước ngoặt lớn trong lịch sử phát triển của bộ môn sinh học hiện đại. Ngày nay, rất nhiều máy giải trình tự gen

tự động đều dựa trên nguyên tắc chính của phương pháp giải trình tự gen của Sanger.

Nguyên lý của phương pháp Sanger: sử dụng các dideoxynucleotide (ddNTP) không có nhóm 3'-OH ở phân tử đường làm cho các dNTPs tự do sẽ không gắn được vào đầu C-3' do không hình thành được liên kết phosphodiester. Do vậy khi DNA polymerase xúc tác cho việc kéo dài chuỗi polynucleotide khi gặp ngẫu nhiên các ddNTP thì quá trình tổng hợp dừng lại, tạo nên các đoạn polynucleotide sẽ có chiều dài khác nhau. Nếu chia làm 4 phản ứng với việc bổ sung 1% các loại ddNTP (riêng biệt) khi chạy điện di sẽ được 4 giếng điện di khác nhau. Các băng DNA xác định nhờ việc gắn đồng vị phóng xạ vào môi hoặc vào các dideoxy và thực hiện kỹ thuật xạ ký tự ghi.

Khi giải trình tự hiện nay người ta thường dùng các máy tự động với việc đánh dấu huỳnh quang mỗi loại dideoxynucleotide bằng một fluochrome (chất huỳnh quang) có màu khác nhau. Như vậy các mạch DNA đơn sinh ra trong ống phản ứng cũng được đánh dấu huỳnh quang. Các vạch điện di của các mạch đơn này khi đi qua một chùm tia sáng laser sẽ phát sáng lên và tạo tín hiệu truyền về máy tính. Phần mềm máy tính sẽ tự động giải trình tự giữ liệu từ gel điện di và cho hình ảnh kết quả giải trình tự. Do vậy có thể giải trình tự mẫu nghiên cứu chỉ trong 1 phản ứng (1 giếng điện di) thay vì cho 4 phản ứng riêng biệt như phương pháp của Sanger.

1.3.3. Kỹ thuật tách dòng (cloning)

Kỹ thuật tách dòng là một công cụ hữu hiệu được sử dụng trong kỹ thuật di truyền và là bước khởi nguồn cho các kỹ thuật sau này. Mục đích của việc tách dòng là nhằm thu được một lượng lớn bản sao của trình tự gen quan tâm. Đầu tiên, DNA ngoại lai được nối vào một vector nhằm tạo ra DNA tái tổ hợp. Vector sử dụng là plasmid thích ứng của vi khuẩn *E. coli*. Sau đó vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào chủ và tế bào chủ được nuôi trong môi trường thích hợp để nhân vi khuẩn lên nhiều lần. Tế bào chủ ở đây là vi

khuẩn *E. coli*. Cuối cùng qua các bước tách chiết DNA người ta sẽ thu được một lượng lớn plasmid tái tổ hợp.

Các nhân tố như vector, tế bào chủ có thể thay đổi nhưng tiến trình tách dòng nói chung được tiến hành qua 4 bước: xử lý DNA cần tạo dòng, tạo vector tái tổ hợp, biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào chủ, chọn dòng.

- Xử lý DNA cần tạo dòng: DNA cần tạo dòng được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được làm sạch để thu được phân đoạn DNA có kích thước như mong muốn, loại bỏ các mồi và các thành phần khác trong phản ứng PCR. Bước này nhằm tạo điều kiện cho bước chọn dòng được thực hiện một cách nhanh chóng và hiệu quả, tránh những plasmid tái tổ hợp có kích thước không mong muốn.

- Tạo vector tái tổ hợp: Vector tái tổ hợp được tạo ra bằng cách gắn gen quan tâm (đoạn DNA cần tạo dòng) vào vector tách dòng. Thông thường sau khi chạy PCR với enzym Taq polymerase, enzym này được gắn thêm một nucleotit là Adenin vào đầu 3' của đoạn gen được nhân lên. Lợi dụng tính chất này các nhà khoa học đã thiết kế các thế hệ vector tách dòng mang một nucleotit là Thymin ở đầu 5' của vector đã được mở vòng sẵn tại PCS (polycloning site - vùng nhân đôi trong điểm cắt). Hiện nay, có rất nhiều vector tách dòng có đặc tính này như: pCR[®]2.1 – TOPO, pGEM[®] - T easy Vector tách dòng và DNA cần tạo dòng được trộn chung với một tỷ lệ nhất định với sự xúc tác của enzym T4 ligase, DNA được gắn vào vector theo nguyên tắc bổ sung A- T tại vị trí mở vòng.

- Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào chủ: Trong quá trình gắn gen vào vector sẽ hình thành nên các vector tái tổ hợp khác nhau. Bước này nhằm mục đích sử dụng bộ máy của tế bào chủ để sao chép vector tái tổ hợp thành một lượng lớn bản sao. Tùy mục đích sử dụng, người ta sẽ chọn tế bào chủ *E. coli* hay tế bào nấm men.

- Chọn dòng: Chọn lọc vi khuẩn tái tổ hợp theo hai cách thông dụng: chọn lọc theo phương pháp kháng sinh (kanamycin, ampicillin...) nhằm loại trừ các tế bào vi khuẩn không được biến nạp và các loại vi khuẩn nhiễm tạp khác và chọn lọc theo phản ứng với cơ chất (X - gal) nhằm loại trừ các vi khuẩn có mang vector nhưng không có đoạn gen được chèn vào.

1.3.4. Kỹ thuật biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn

1.3.4.1. Biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn E. coli bằng phương pháp sốc nhiệt (Phương pháp tạo tế bào khả biến)

*Nguyên lý: Vi khuẩn *E. coli* sau khi xử lý với CaCl_2 sẽ làm cho màng tế bào trở nên khả nạp giúp cho DNA xâm nhập tế bào *E. coli* dễ dàng hơn. Giai đoạn sốc nhiệt kế tiếp (42°C trong 60 giây) để kích thích sự chuyển của phân tử plasmid vào trong tế bào. Môi trường dưỡng chất được thêm vào sau đó cho phép tế bào hồi phục và plasmid tiến hành sao mã, phiên mã và dịch mã tạo nên các protein tương ứng.

Biến nạp ở vi khuẩn được mô tả lần đầu tiên bởi Frederick Griffith vào năm 1928 trong thí nghiệm nổi tiếng của ông về cái gọi là “nguyên lý biến nạp”. Sau đó những nghiên cứu về kỹ thuật biến nạp tiếp tục được phát triển và hoàn thiện, trong đó kỹ thuật biến nạp vào tế bào vi khuẩn với CaCl_2 và sốc nhiệt [39].

Hiệu quả của việc biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố trong đó đặc biệt quan trọng là tế bào chủ. Để việc biến nạp trở nên dễ dàng thì tế bào chủ phải trở nên khả biến. tế bào vi khuẩn sử dụng trong kỹ thuật gen với mục đích tiếp nhận và làm tế bào chủ cho plasmid nhân lên được gọi là tế bào khả biến. *E. coli* được xem là loại tế bào chủ thích ứng nhất hiện nay. Để tạo tế bào khả biến sử dụng cho biến nạp, người ta ngâm các tế bào trong dung dịch CaCl_2 lạnh trong đá, khi đó các tế bào sẽ trở nên khả biến.

Kỹ thuật biến nạp bằng sốc nhiệt được thực hiện như sau: bổ sung DNA plasmid vào tế bào khả biến, ủ trong đá 15-30 phút. Sau đó tạo một sốc nhiệt ngắn (42°C trong khoảng 30-45 giây), khi đó DNA quan tâm sẽ đi vào trong tế bào khả biến. Tiếp theo vi khuẩn sẽ được đặt lại vào đá khoảng 5 phút, rồi được đem nuôi lắc trong môi trường LB lỏng ở 37°C từ 15 đến 20 phút. Sau đó các tế bào được cấy lên môi trường chọn lọc để nhân lên các tế bào mang đoạn DNA quan tâm.

Trong quá trình biến nạp chỉ có một phần nhỏ các plasmid được biến nạp, tuy nhiên đây vẫn là một kỹ thuật biến nạp quan trọng, nó có thể tạo ra tới 10^9 các tế bào biến nạp (tức thể biến nạp) khi đưa 1 microgam DNA vào thí nghiệm.

*1.3.4.2. Biến nạp plasmid vào tế bào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện*

Kỹ thuật biến nạp DNA plasmid vào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện là phương pháp biến nạp có hiệu quả cao đồng thời rút ngắn thời gian thí nghiệm. Tế bào được đặt trong một xung điện ngắn, xung điện này làm xuất hiện những lỗ tạm thời trên màng tế bào, khi đó những phân tử DNA có thể đi vào bên trong tế bào.

*1.3.4.3. Biến nạp plasmid vào xạ khuẩn *Sreptomycetes sp.* theo phương pháp tạo tế bào trần (protoplast)*

Protoplast (tế bào trần) là các tế bào trong đó có thành tế bào được loại bỏ và màng tế bào chất là lớp ngoài cùng nhất trong tế bào. Protoplast có thể thu được bằng enzyme lytic cụ thể để loại bỏ vách dung hợp.

Tế bào trần có thể được tạo ra bằng nhiều cách: từ dịch huyền phù tế bào, tế bào mô sẹo hoặc từ mô tươi nguyên trạng như lá qua tác động của các enzym; Pectinase phân hủy pectin, cellulase phân hủy hemicellulose. Các tế bào trần nếu để trên môi trường dinh dưỡng thì sau 5-10 ngày sẽ tạo vách tế bào và phân chia. Các tế bào trần, thậm chí khác loài, có thể kết hợp với nhau tạo tế bào lai và quá trình này gọi là sự dung hợp tế bào trần.

Phương pháp tạo tế bào trần ở xạ khuẩn *Streptomyces* lần đầu tiên được mô tả bởi Kieser và cộng sự [32].

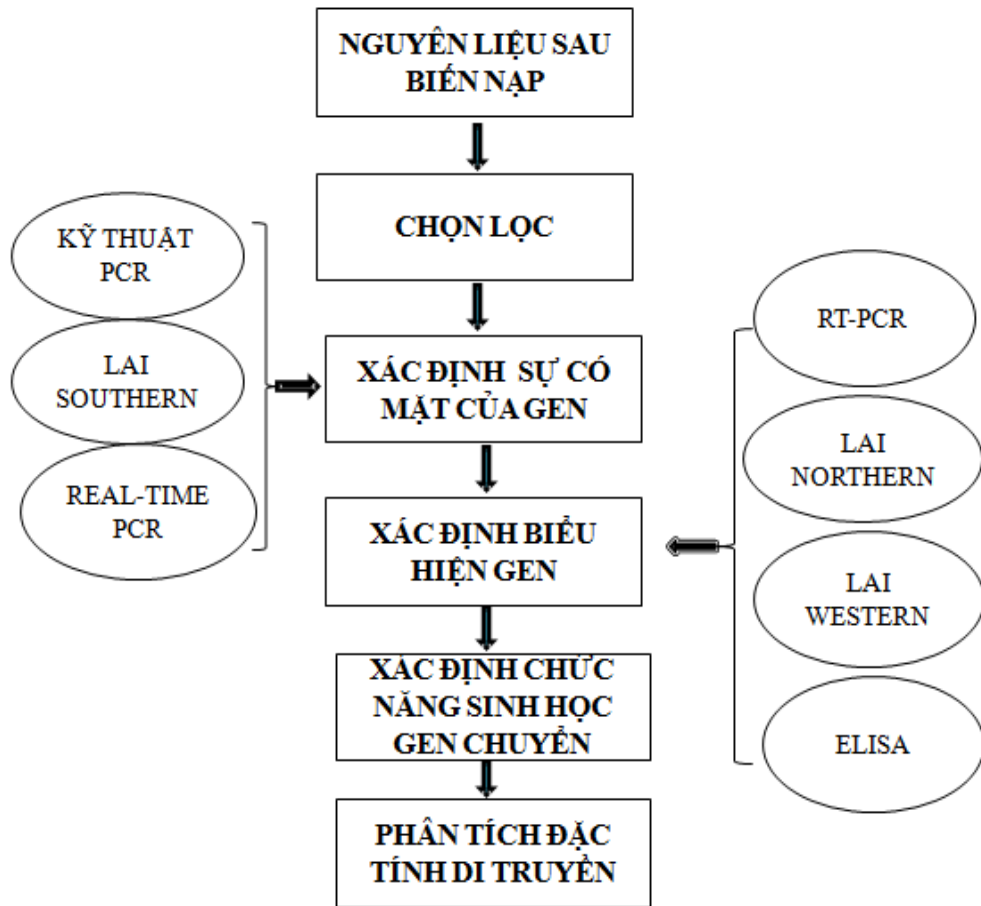
1.3.5. Phương pháp tách DNA plasmid từ tế bào vi khuẩn

Màng tế bào vi khuẩn bị phá vỡ bởi các tác nhân phá màng. Sau khi màng tế bào bị vỡ, dưới tác dụng của SDS protein của tế bào sẽ bị biến tính. Nhờ vậy mà DNA sẽ tránh được sự phân hủy của Dnase. Mặt khác, sự bổ sung dung dịch Solution II với nồng độ kiềm cao ở giai đoạn đầu của quá trình tách chiết, làm cho DNA của genome và DNA của plasmid bị biến tính. Sau đó trung hòa nhanh bằng dung dịch Solution III, cấu trúc của DNA sẽ được phục hồi nhanh chóng. DNA của bộ gen có kích thước lớn nên khó phục hồi cấu trúc hơn so với DNA của plasmid. Vì vậy DNA của plasmid sẽ nằm ở phần dịch nổi sau khi ly tâm, protein của tế bào và DNA của bộ gen sẽ bị tủa xuống. Như vậy ta có thể tách plasmid ra khỏi tế bào chủ mà không bị lẫn DNA của bộ gen.

1.3.6. Phương pháp điện di trên gel agarose

Dựa vào đặc tính cấu trúc của DNA, dưới tác động của điện trường, các phân tử DNA (thường tích điện âm) khác nhau về kích thước, điện tích, mức độ cuộn xoắn và dạng phân tử (mạch thẳng hay mạch vòng) sẽ di chuyển qua hệ mạng của gel từ cực âm (cathode) sang cực dương (anode) với tốc độ di chuyển khác nhau. Vì vậy, chúng dần dần tách nhau ra trên trường điện di, qua đó người ta có thể thu thập và phân tích được từng phân đoạn DNA hoặc gen riêng rẽ. Trên điện trường các phân đoạn DNA có kích thước càng nhỏ càng có tốc độ di chuyển trên điện trường nhanh hơn. Sau khi điện di kết thúc, các phân tử DNA có thể quan sát thấy nhờ sử dụng chất nhuộm là ethidium bromide, chất này sẽ phát huỳnh quang dưới tia tử ngoại (UV) khi gắn với DNA cho phép phát hiện vị trí và kích thước các đoạn DNA trên gel.

Tóm lại: Thiết kế vector chứa gen cần nghiên cứu và chuyển gen đó vào tế bào chủ mong muốn trải qua các bước tiến hành có thể tóm tắt theo sơ đồ sau



Hình 1.5. Mô tả các bước tiến hành và phương pháp phân tích cây chuyển gen

Chương 2

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. *Chủng giống và môi trường nuôi cấy*

- Chủng xạ khuẩn, vi khuẩn được cung cấp bởi Viện nghiên cứu khoa học sự sống (Trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc) và bảo quản tại Khoa Công nghệ sinh học - Viện Đại học Mở Hà Nội.

- Chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 là chủng hoang dại sản sinh ra kháng sinh neocarzinostatin (NCS), được dùng làm tế bào thể nhận trong chuyển dạng gen. Môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn này là môi trường dịch lỏng R2YE và đĩa thạch R2YE (để lưu giống), môi trường N-Z amine để thu hoạch NCS.

- 2 chủng *E. coli* được sử dụng trong đề tài:

+ *E. coli* XL1-Blue được sử dụng làm vật chủ trong tách dòng gen, nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani (LB) đơn thuần.

+ Chủng *E. coli* ET12567 mang plasmid pUZ8002 được dùng làm tế bào thể cho trong tiếp hợp gen, sàng chọn lọc trong môi trường LB có chứa 3 loại kháng sinh: kanamycine (Km), tetracycline (Ter) và chloramphenicol (Cm).

- Chủng *Micrococcus luteus* ATCC9341 được sử dụng để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944.

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E.coli* cũng như *Micrococcus luteus* là Luria - Bertani (LB).

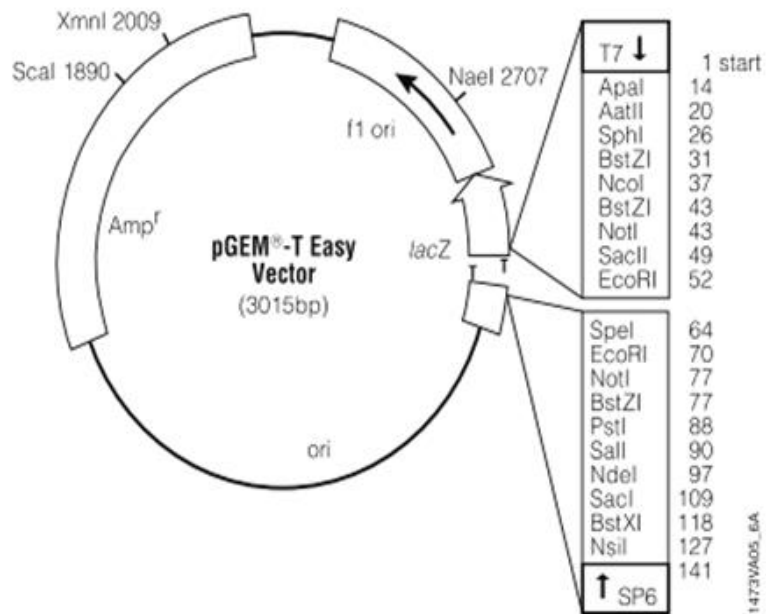
2.1.2. *Vector và các plasmid tái tổ hợp*

- Vector pGEM-T easy (Promega, USA) dùng trong chuyển sản phẩm PCR và giải trình tự đoạn DNA đã được tách dòng (**Hình 2.1**).

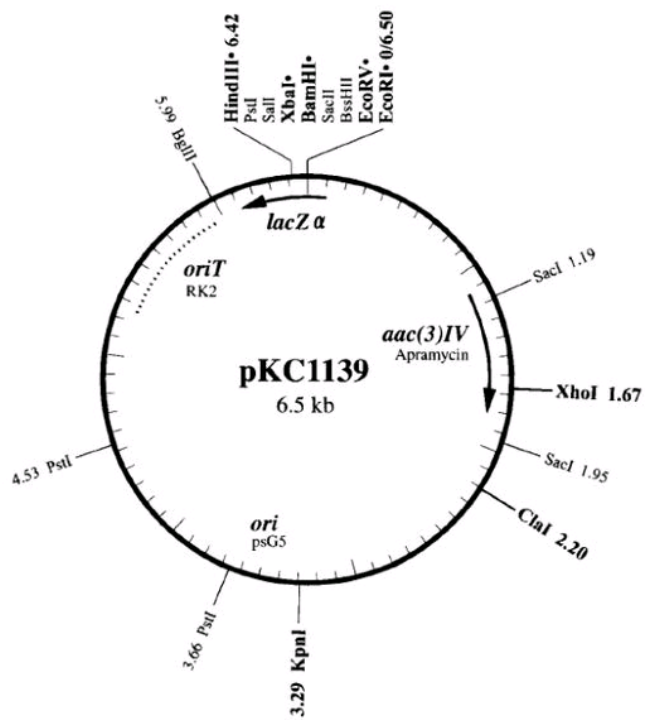
- pKC1139 là vector được dùng để chuyển gen gây đột biến (**Hình 2.2**).

- pIBR25 là vector được dùng để biểu lộ gen và chuyển dạng vào xạ khuẩn (**Hình 2.3**).

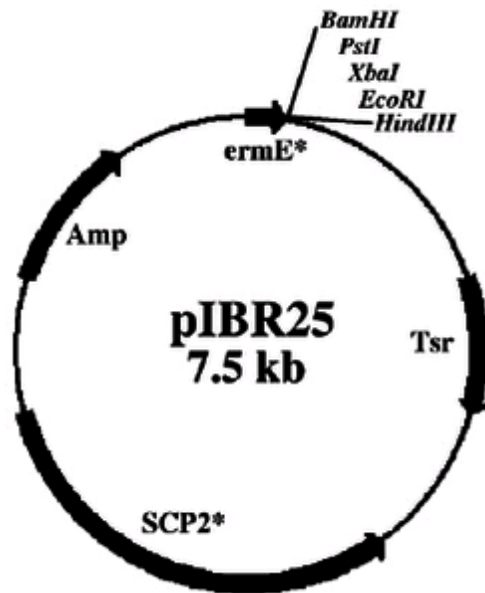
- Plasmid chứa tổ hợp đột biến có tên gọi pKC-HP450 .
- Plasmid chứa *ncsB3* trong vector pIBR25 có tên gọi pIB3.
- Plasmid pFDNEO-S modified có chứa đoạn gen kháng neomycine (*neo^r*), vector pKC1139 và pIBR25 được cung cấp bởi Viện nghiên cứu khoa học sự sống (Trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc).



Hình 2.1. Sơ đồ vector pGEM - T Easy (3kb)



Hình 2.2. Sơ đồ vector pKC1139 (6.5kb)



Hình 2.3. Sơ đồ vector pIBR25 (7.5kb)

2.1.3. Hóa chất

- Các hóa chất dùng để pha chế môi trường nuôi cấy vi khuẩn, tách chiết DNA hoặc dùng cho các kỹ thuật cơ bản trong nghiên cứu được đề cập trong phần Phụ lục.

- Kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm ampicillin, apramycin, neomycin, chloramphenicol và tetracycline được mua của hãng hóa chất Sigma (Mỹ).

- Các enzyme giới hạn được dùng trong nghiên cứu mua tại công ty Takara (Nhật Bản).

- Các cặp mồi dùng cho phản ứng PCR được mua của hãng Genotech (Daejeon, Hàn Quốc).

2.1.4. Tách chiết DNA và giải trình tự gen

- Phương pháp tách chiết DNA thực hiện theo qui trình chuẩn [32], [45].

- Kiểm tra trình tự DNA của các gen được gửi đến công ty Genotech, Hàn Quốc.

2.2. Dụng cụ, thiết bị

2.2.1. Dụng cụ, thiết bị cho quá trình nuôi cấy

- Bình thủy tinh vô khuẩn 250ml dùng cho nuôi cấy xạ khuẩn, *E.coli*.

- Buồng nuôi cấy vô trùng.

- Nồi nuôi cấy (fermentor) loại 5 lít.

2.2.2. Dụng cụ, thiết bị cho pha chế môi trường nuôi cấy

- Cân phân tích

- Nồi khử trùng

- Máy chuẩn độ pH

2.2.3. Dụng cụ, thiết bị cho quá trình tách chiết và phân tích chất

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc

- Tủ sấy

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High-performance liquid chromatography)

- Máy phân tích khối phổ ESI/MS (Electrospray Ionisation/Mass Spectrometry).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.3.1. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 01/2013 đến tháng 12/2014

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

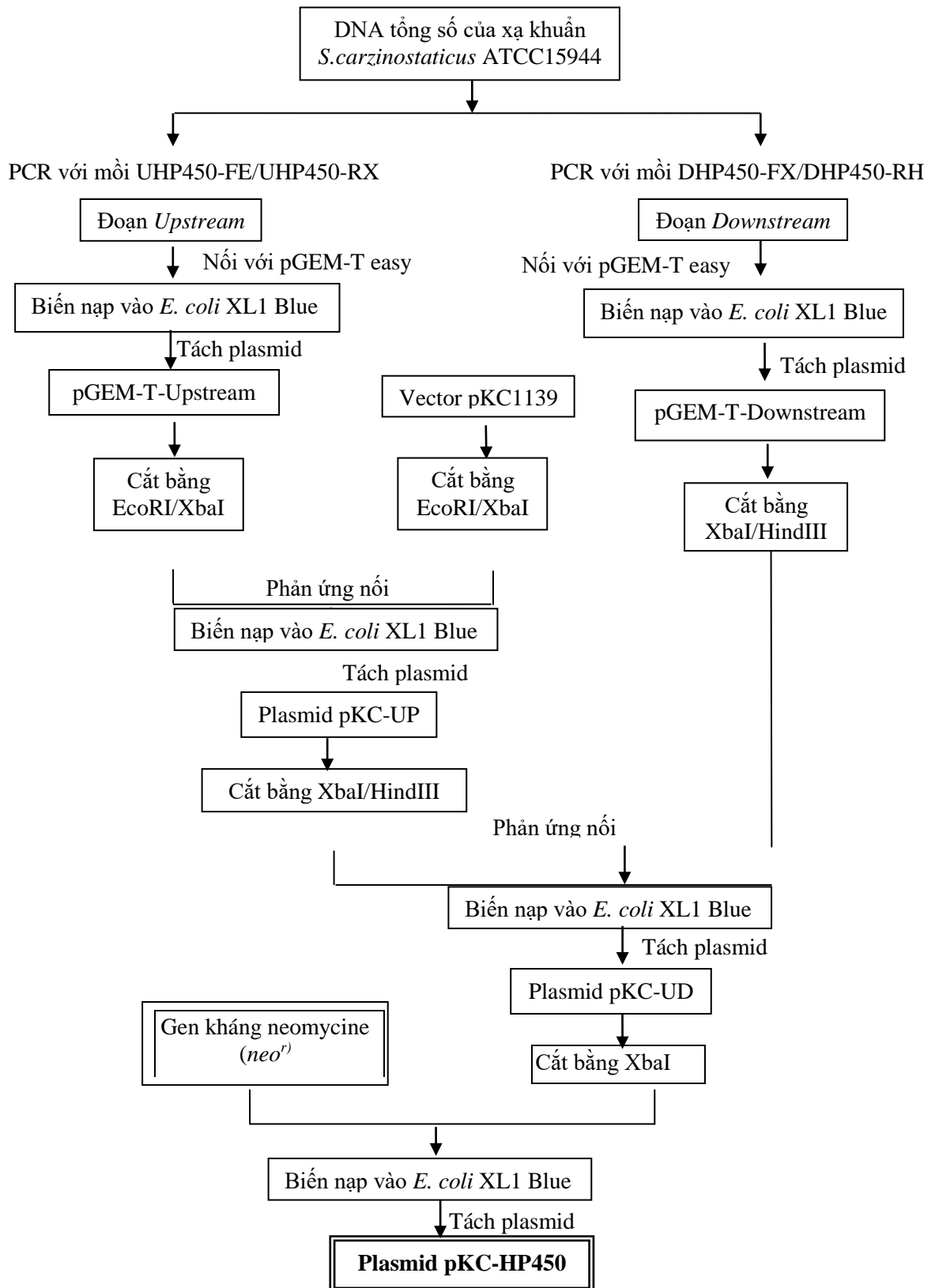
Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội kết hợp với Khoa khoa học sự sống, trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

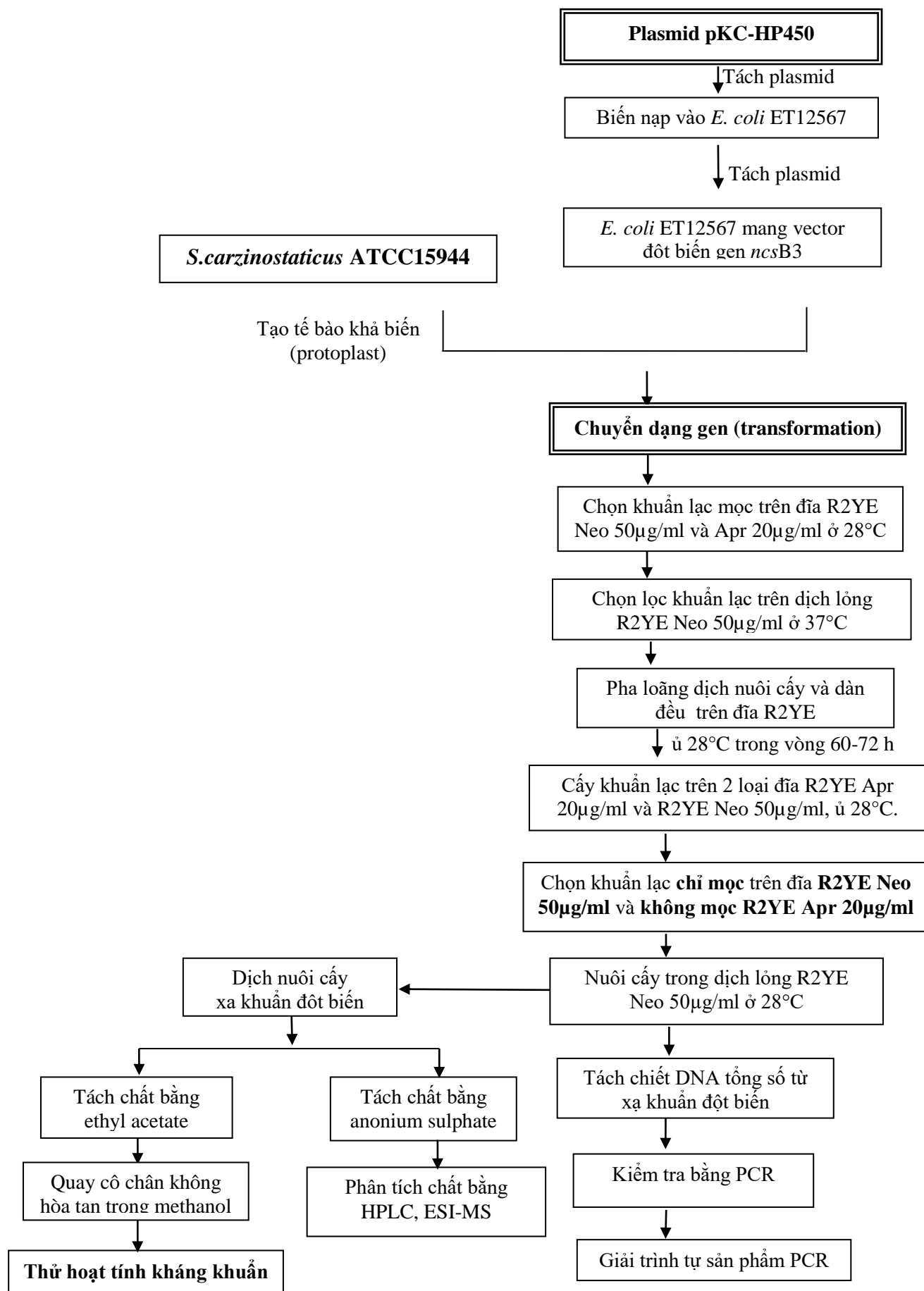
2.4.1. Các bước chính trong nghiên cứu

- Bước 1: Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR và tách dòng
- Bước 2: Nối gen vào các vector pGEM-T Easy, pKC1139
- Bước 3: Chuyển gen (DNA plasmid của tổ hợp đột biến) vào tế bào trần của xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944.
- Bước 4: Sàng lọc khuẩn lạc đột biến kép.
- Bước 5: Chứng minh chủng đột biến và phân tích chất tách chiết từ chủng đột biến

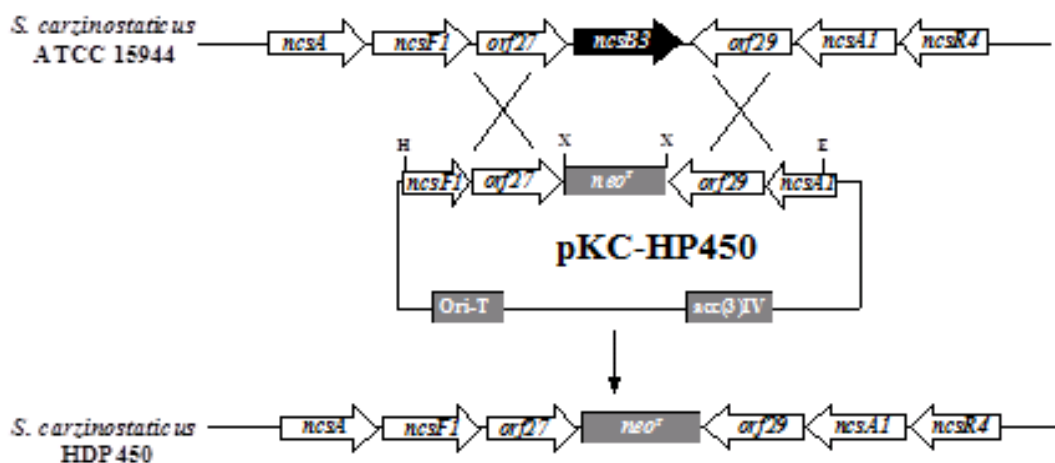
2.4.2. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.4. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



2.4.3. Phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* bằng trao đổi chéo.

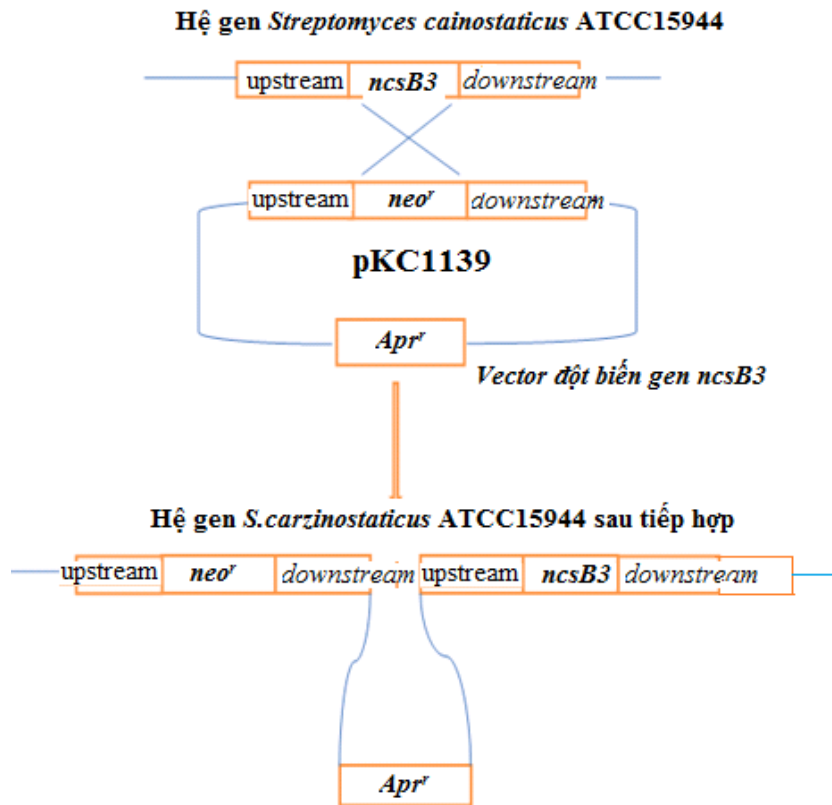


Hình 2.5. Sơ đồ đột biến mất đoạn gen *ncsB3*

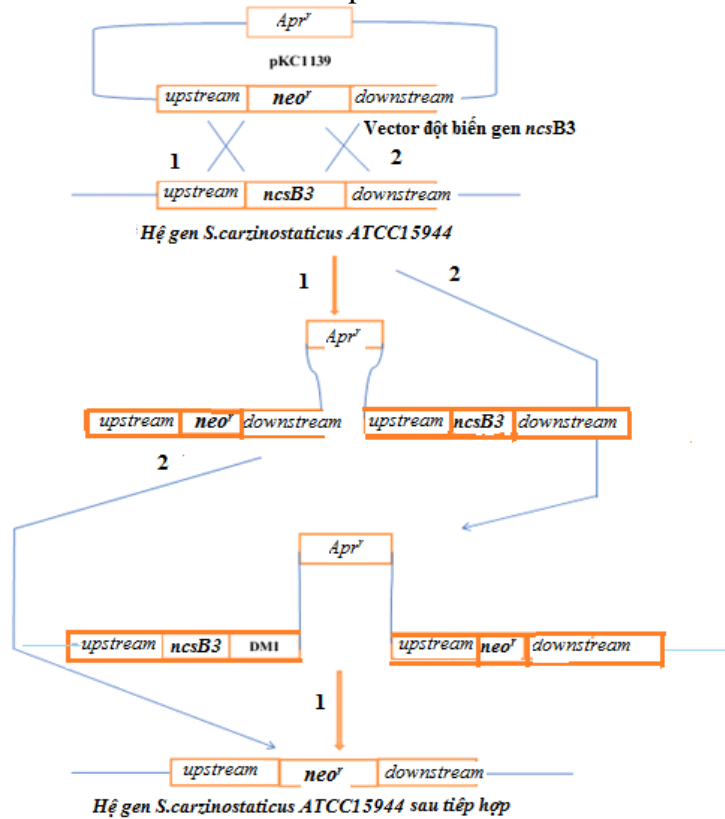
Gen *ncsB3* là một trong các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp NCS với chức năng là P450-hydroxylase để chuyển 5-methyl-2-hydroxy-1-naphthoic acid thành 2,7-dihydroxy-5-methyl-1-naphthoic acid, đó là gốc naphthoic acid của NCS. Gây đột biến làm mất *ncsB3* khỏi bộ gen của chủng gốc *S.carzinostaticus* bằng phương pháp tạo trao đổi chéo đoạn DNA tương đồng (homologous recombinant).

Vector pKC1139 là vector dung để gây đột biến và đi kèm là gen kháng neomycin (*neo^r*) có độ dài ~1kb [14] để thay thế *ncsB3* tạo ra tái tổ hợp mới với tên gọi pKC-HP450 (**Hình 2.5**), tái tổ hợp này được trao đổi chéo đoạn tương đồng và loại bỏ gen *ncsB3* khỏi genome của chủng gốc *S.carzinostaticus*.

Tái tổ hợp pKC-PH450 được chuyển vào tế bào chủng gốc bằng phương pháp tế bào trần (protoplast) trong môi trường có chứa PGE để tạo tế bào tái tổ hợp. Sau đó các tế bào này được sàng lọc qua một số thế hệ để nuôi ở nhiệt độ 37°C, vì vector pKC1139 là vector bị tiêu hủy tại nhiệt độ 37°C. Như vậy rất nhanh chóng tạo quá trình chuyển gen kháng neomycin (*neo^r*) vào hệ gen của chủng gốc.



Hình 2.6. Cơ chế của quá trình trao đổi chéo đơn



Hình 2.7. Cơ chế của quá trình trao đổi chéo kép

2.5. Các kỹ thuật áp dụng thực hiện trong đề tài

2.5.1. Kỹ thuật khuếch đại gen PCR (Polymerase chain reaction) và ghép nối vào vector

Phản ứng PCR, phản ứng nối gen trong nghiên cứu được thực hiện theo quy trình và công thức được hướng dẫn trong tài liệu chuẩn [45].

Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được tóm tắt trong **Bảng 2.1**. Phần gạch chân in đậm là điểm cắt của enzyme giới hạn.

Bảng 2.1. Thiết kế các cặp môi cho phản ứng PCR trong nghiên cứu

Tên môi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Enzyme giới hạn
UHP450-FE	ATT <u>GAATTC</u> CCCCGTACACGGGCGGCGG	<i>EcoRI</i>
UHP450-RX	GGCCGGT <u>TCTAGA</u> CCACTCGACCATGCC	<i>XbaI</i>
DHP450-FX	ATT <u>TCTAGA</u> CTCGGTCATGGACACAACCTC	<i>XbaI</i>
DHP450-RH	GGAA <u>AAGCTT</u> CGCCAACCGGACCAGGTC	<i>HindIII</i>
P450-FX	ACAT <u>TCTAGA</u> AGGAGGATGTGCCCTTAC	<i>XbaI</i>
P450-RP	AGT <u>CTGCAGT</u> CACCGGGCGAGAG	<i>PstI</i>

- Hỗn hợp phản ứng PCR (50 µl)

Thành phần	Lượng phản ứng
Buffer	5.0 µl
ADN khuôn (100 ng/µl)	1.0 µl
Môi xuôi (100 ng/µl)	1.0 µl
Môi ngược (100 ng/µl)	1.0 µl
<i>Taq</i> ADN Polymerase	1.0 µl
Nucleotide	1.0 µl
H ₂ O	40 µl
Tổng thể tích	50 µl

- Chương trình cho phản ứng PCR.

Nhiệt độ tách khuôn:	94°C	Thời gian:	30 giây
Nhiệt độ gắn môi:	68°C	Thời gian:	1 phút

Nhiệt độ kéo dài:	55°C-68°C	Thời gian:	1 phút
Số chu kỳ:	30 chu kỳ		
Nhiệt độ kết thúc	4°C		

Để đánh giá và kiểm tra sản phẩm PCR, DNA sau khi được tạo thành sau phản ứng PCR được chuyển vào vector pGEM-T easy (Promega, USA), đây là vector chuyên dùng để chuyển sản phẩm PCR và dùng giải trình tự. Trình tự PCR sau giải trình tự được so sánh với trình tự gen đã được đăng ký tại ngân hàng gen thế giới bằng sử dụng phần mềm BLAST để so sánh độ chính xác của sản phẩm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2.5.2. Phương pháp tách DNA plasmid từ tế bào vi khuẩn

2.5.2.1. Nguyên tắc:

Màng tế bào vi khuẩn bị phá vỡ bởi các tác nhân phá màng. Sau khi màng tế bào bị vỡ, dưới tác dụng của SDS protein của tế bào sẽ bị biến tính. Nhờ vậy mà DNA sẽ tránh được sự phân hủy của Dnase. Mặt khác, sự bổ sung dung dịch Solution II với nồng độ kiềm cao ở giai đoạn đầu của quá trình tách chiết, làm cho DNA của genome và DNA của plasmid bị biến tính. Sau đó trung hòa nhanh bằng dung dịch Solution III, cấu trúc của DNA sẽ được phục hồi nhanh chóng. DNA của bộ gen có kích thước lớn nên khó phục hồi cấu trúc hơn so với DNA của plasmid. Vì vậy DNA của plasmid sẽ nằm ở phần dịch nổi sau khi ly tâm, protein của tế bào và DNA của bộ gen sẽ bị tủa xuống. Như vậy ta có thể tách plasmid ra khỏi tế bào chủ mà không bị lẫn DNA của bộ gen.

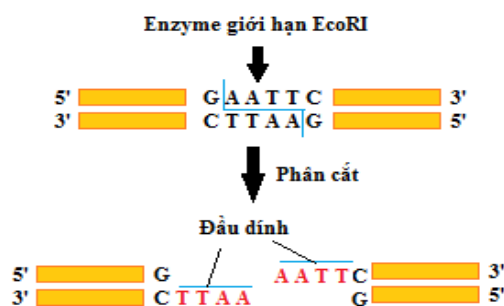
2.5.2.2. Cách tiến hành:

- Nuôi cấy tế bào vi khuẩn *E. coli* mang DNA plasmid cần tách chiết trong 3ml môi trường LB lỏng trong ống falcon 15 có bổ sung kháng sinh thích hợp, để ủ ấm 37°C, lắc 200 rpm, từ 12-16 giờ đến khi OD₆₀₀ đạt 1-2.
- Ly tâm thu sinh khối tế bào ở 6000 rpm, 10 phút, 4°C. Bỏ dịch nuôi.
- Cho 200µl Solution I, vortex cho tế bào tan đều.

- Bổ sung 200µl Solution II, lắc nhẹ nhàng trộn đều dung dịch để thành tế bào tan hết, đến khi dung dịch có màu trong suốt.
- Bổ sung 200µl Solution III, lắc nhẹ nhàng tới khi xuất hiện kết tủa trắng.
- Ly tâm ở 4°C, 6000 rpm trong 10 phút. Dùng pipet hút dịch chuyển sang ống eppendorf 2ml đáy vuông sạch, bỏ phần kết tủa.
- Bổ sung 600µl resin, lắc đều.
- Chạy cột binding column, lắp vào máy hút chân không.
- Rửa cột 2 lần bằng cồn 70% để lạnh 4°C. Mỗi lần dùng 1ml cồn.
- Đem cột ly tâm ở 4°C, 10000 rpm, trong 10 phút để loại cồn.
- Chuyển cột sang ống eppendorf mới, bổ sung 20µl dung dịch đệm TE, để 1 phút.
- Ly tâm 10.000 rpm, 10 phút ở 4°C.
- Thu dịch chứa DNA, chạy điện di kiểm tra.

2.5.3. Phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn

Enzyme giới hạn là những enzyme có khả năng nhận biết đoạn trình tự nucleotide đặc hiệu trên các phân tử DNA và cắt cả 2 sợi DNA bổ sung tại các vị trí đặc thù.



Hình 2.8. Phản ứng cắt của enzyme giới hạn

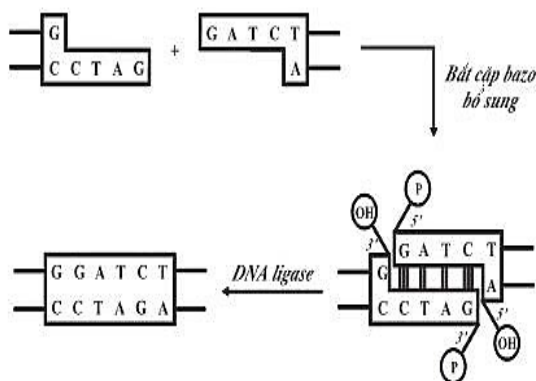
Phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn được thực hiện bằng với tổng thể tích phản ứng là 5µl, thực hiện phản ứng trong ống eppendorf ở 37°C trong vòng 60 phút. Công thức phản ứng như sau:

Thành phần	Lượng phản ứng
Buffer	1.0 μ l
Enzyme 1	1.0 μ l
Enzyme 2	1.0 μ l
DNA plasmid	1.0 μ l
Nước cất	1.0 μ l

Thực hiện phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 1%, với hiệu điện thế 80V, trong 30 phút để kiểm tra.

2.5.4. Phương pháp nối DNA

Phản ứng nối được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase. DNA ligase là một enzyme xúc tác các phản ứng nối hai mảnh DNA bằng cách tạo cầu nối phosphodiester giữa đầu 5' (PO_4) và đầu 3' (OH) của hai nucleotide đứng cạnh nhau. Thường dùng enzyme T4 DNA ligase.



Hình 2.9. Phản ứng nối của enzyme ligase

Thành phần của phản ứng nối:

Vector	1 μ l
Insert DNA	3 μ l
T4 DNA Ligase (Takara)	1 μ l
2X Rapid Ligation Buffer (Takara)	5 μ l
Tổng phản ứng :	20 μl

Thực hiện phản ứng ở 16°C qua đêm, chạy điện di kiểm tra.

2.5.5. Phương pháp điện di trên gel agarose

2.5.5.1. Nguyên tắc

Dựa vào đặc tính cấu trúc của DNA, dưới tác động của điện trường, các phân tử DNA (thường tích điện âm) khác nhau về kích thước, điện tích, mức độ cuộn xoắn và dạng phân tử (mạch thẳng hay mạch vòng) sẽ di chuyển qua hệ mạng của gel từ cực âm (cathode) sang cực dương (anode) với tốc độ di chuyển khác nhau. Vì vậy, chúng dần dần tách nhau ra trên trường điện di, qua đó người ta có thể thu thập và phân tích được từng phân đoạn DNA hoặc gen riêng rẽ. Trên điện trường các phân đoạn DNA có kích thước càng nhỏ càng có tốc độ di chuyển trên điện trường nhanh hơn. Sau khi điện di kết thúc, các phân tử DNA có thể quan sát thấy nhờ sử dụng chất nhuộm là ethidium bromide, chất này sẽ phát huỳnh quang dưới tia tử ngoại (UV) khi gắn với DNA cho phép phát hiện vị trí và kích thước các đoạn DNA trên gel [18].

2.5.5.2. Cách tiến hành

- Cân 0,3g agarose cho vào 30ml TAE 1X ở nhiệt độ phòng, khuấy đều và cho vào lò vi sóng 3 phút để làm nóng chảy gel.
- Làm nguội gel xuống 50 – 55°C, thêm 3µl ethidium bromide, lắc đều rồi đổ vào khuôn gel đã lắp lược, để thạch dày khoảng 0,75 – 1 cm.
- Khi gel nguội, tháo lược, đặt khuôn gel vào bể điện di và đổ đệm TAE 1X vào khay gel sao cho đệm cao hơn mặt gel khoảng 2 – 5mm.
- Lấy 2µl dung dịch nạp mẫu (loading buffer) cho mỗi mẫu cần điện di, lấy mẫu cần điện di (thể tích tùy thuộc vào nồng độ mẫu) trộn đều với dung dịch nạp mẫu, lấy toàn bộ dung dịch vừa trộn nạp vào giếng.
- Đậy nắp bể điện di, cắm điện cực, điện di với hiệu điện thế 85 – 100 V, thời gian 30 phút.
- Sau khi điện di xong, soi gel dưới ánh sáng UV để xem kết quả.

2.5.6. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose

**Cách tiến hành [18]*

- Mẫu gel agarose có chứa băng DNA quan tâm được cắt ra và cho vào ống eppendorf 2ml đáy vuông sạch.
- Bổ sung 600 μ l Guanidine thiocyanate 6M, lắc đều, làm nóng ở 60°C để hòa tan hoàn toàn.
- Tiếp đó thêm 600 μ l dung dịch resin, lắc đều và đưa vào chạy cột binding column với máy hút chân không.
- Cột được rửa hai lần, mỗi lần sử dụng 1 ml cồn lạnh 70°, sau đó đem cột ly tâm 10.000 rpm, ở 4°C trong 10 phút.
- Chuyển cột sang ống eppendorf mới, bổ sung 20 μ l TE buffer, để 1-2 phút rồi đem ly tâm 10.000 rpm trong 10 phút ở 4°C, thu dung dịch chứa DNA đã tinh sạch.

2.5.7. Phương pháp tạo tế bào trần (protoplast) từ *S.carzinostaticus* ATCC15944

Dựa theo phương pháp của [32], tạo “tế bào trần” từ chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 được tiến hành theo các bước như sau:

- Chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 được nuôi cấy trong bình nón dành riêng nuôi cấy xạ khuẩn với 50ml môi trường nuôi cấy R2YE, nhiệt độ 28°C. Sau 48 giờ toàn bộ sản phẩm nuôi cấy thu được sẽ đem ly tâm loại bỏ phần dịch, thu lấy phần sợi của xạ khuẩn để chuẩn bị cho kỹ thuật tạo tế bào trần.
- Phần sợi xạ khuẩn sẽ được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm P-buffer pha với 10.3% sucrose. Sau đó phần xạ khuẩn vừa được rửa sạch sẽ cho dung dịch đệm P-buffer pha với lysozyme (37°C) vào nhằm phá vỡ màng tế bào của xạ khuẩn khi đó gọi là “tế bào trần”.
- Dùng bông thấm nước vô khuẩn để lọc bỏ phần vỏ cũng như các thành phần không được ly giải và thu lọc phần “tế bào trần” bằng ly tâm ở 4°C, sau đó rửa “tế bào trần” thu được bằng dung dịch đệm P-buffer lạnh. Cứ 125 μ l “tế bào trần” được xử lý bằng 0.1 mM aurintricarboxylic acid (ATA) trong

vòng 10 phút, sau đó cho 12-15µl DNA của plasmid tách ra từ pKC-HP450. Ngay sau đó cho 200 µl PEG 20-50% (polyethylene glycol 1000, Merck-shuchardt) vào hỗn hợp trên. Ly tâm rất nhanh (30'') và nhẹ nhàng loại bỏ PEG đang nổi ở phía trên. Phần còn lại là "tế bào trần" sẽ được dàn đều trên các đĩa thạch R2YE, các đĩa này sẽ được để trong tủ ấm vô khuẩn 28°C trong vòng 20 giờ. Khi các khuẩn lạc non bắt đầu xuất hiện, tiến hành phủ lên trên bề mặt các đĩa thạch R2YE nói trên bằng aga 0,3% pha với 50 µg/ml neomycin và 20 µg/ml apramycin). Các đĩa thạch chứa các "tế bào trần" trên tiếp tục được để ở tủ ấm vô khuẩn với nhiệt độ là 28°C cho đến khi nào xuất hiện các khuẩn lạc thì tiến hành sàng lọc.

2.5.8. Kỹ thuật chuyển vector vào tế bào trần

Kỹ thuật chuyển vector vào tế bào trần là kỹ thuật chuyển trực tiếp vector vào tế bào đã được sử lý loại bỏ lớp thành tế bào của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944, thực hiện trong môi trường có buffer đặc biệt chứa PEG (polyethylene glycin) được tiến hành theo phương pháp của Kieser [32].

- Chủng vi khuẩn *E.coli* ET12567 mang vector đột biến gen *ncsB3* (pKC-HP450) được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB có bổ sung 5 loại kháng sinh: Km, Cm, Ter, Neo, Apr ở 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0.6, ta tiến hành thu dịch nuôi. Tách plasmid DNA của tổ hợp trên chuẩn bị cho các bước tiếp theo.

- Lấy 100µl dung dịch tế bào trần vào ống nghiệm 1,5 ml (ependoff) đã khử trùng.

- Trộn lẫn với 20 µl dung dịch chứa DNA plamid tái tổ hợp đột biến (pKC-HP450) và 200 µl PEG từ 20-50%.

- Trộn đều và ly tâm ống nghiệm trong 1 phút.

- Loại bỏ phần dịch nổi và thêm vào 100 µl P buffer.

- Cấy trải mẫu thí nghiệm trên 02 đĩa thạch R2YE, đồng thời cấy trải 100 µl tế bào trần làm đối chứng.

- Nuôi trong tủ ẩm vô khuẩn với nhiệt độ 28°C và trong thời gian từ 16 - 24 giờ.

- Khi có khuẩn lạc chấm rất nhỏ phủ kháng sinh Apramycin với nồng độ từ 50 - 100 µl/ml để nhận tế bào đã được chuyển gen.

2.5.9. Phương pháp sàng lọc khuẩn lạc chuyển gen

Việc tiến hành nuôi cấy những khuẩn lạc sau tiếp hợp trên các môi trường thích hợp một vài thế hệ sẽ tạo ra sự đa dạng di truyền thông qua quá trình trao đổi chéo, sự tái tổ hợp của các gen trong tế bào vi khuẩn, từ đó giúp chọn lọc được những dòng khuẩn lạc mang đặc điểm mong muốn.

Các bước của quá trình sàng lọc được thực hiện như sau:

- Sau khi phủ aga có chứa kháng sinh neomycine và apramycine lên đĩa thạch R2YE, những khuẩn lạc mọc trên môi trường trên sẽ tiếp tục được cấy truyền 3 – 4 thế hệ trên môi trường lỏng R2YE có bổ sung Neo 50µg/ml, ở nhiệt độ 37°C.

- Dịch nuôi cấy được pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , và 10^{-6} sau đó dàn đều lên các đĩa R2YE không chứa kháng sinh. Các đĩa được ủ ở tủ ẩm 28°C trong vòng 60-72 giờ. Sau đó lấy ngẫu nhiên khoảng 400-500 khuẩn lạc được mọc riêng rẽ đem cấy vào 2 loại đĩa riêng biệt là R2YE với 50µl/ml neomycine và R2YE với 20µl/ml apramycine.

- Những khuẩn lạc nào mọc được trên đĩa thạch R2YE với 50µl/ml neomycine nhưng không mọc được ở thạch R2YE với 20µl/ml apramycine sẽ được lựa chọn và kết luận tạm thời những khuẩn lạc này mang gen tái tổ hợp, đã thực hiện trao đổi chéo kép với vector đột biến gen *ncsB3*. Những khuẩn lạc phát triển trên cả hai môi trường chứng tỏ hệ gen của xạ khuẩn ko có hiện tượng trao đổi chéo hoặc xảy ra trao đổi chéo đơn.

- Những khuẩn lạc có thể mang gen double crossing over sẽ tiếp tục được nuôi cấy để thực hiện các nghiên cứu chứng minh tiếp theo.

2.5.10. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ xạ khuẩn

**Nguyên tắc:* Rửa tế bào bằng lysis buffer, phá vỡ thành tế bào của xạ khuẩn nhờ lysozyme. Loại bỏ protein khỏi DNA nhờ các enzyme proteinase K. Phân tách các thành phần của tế bào sau khi phá vỡ thành ba pha nhờ dung dịch đệm phenol :chloroform (1:1), pha trên cùng chứa nucleic acid, pha giữa là protein kết tủa, pha dưới cùng chứa cặn tế bào. Tiếp đó, loại bỏ RNA bằng Rnase. Sau cùng, DNA được tủa bằng ethanol, được làm khô và hòa tan trong đệm TE buffer.

**Cách tiến hành*

- Dịch nuôi cấy tế bào xạ khuẩn sau 4 – 5 ngày (50ml) đem ly tâm tốc độ 6000 rpm trong 10 phút để thu tế bào.
- Hòa tan sinh khối tế bào trong 15 ml lysis buffer (TE25S), vortex đều và ly tâm 6000 rpm trong 10 phút. Thực hiện rửa tế bào hai lần với lysis buffer.
- Hòa tan tế bào trong 10 – 15 ml lysis buffer. Bổ sung lysozyme với nồng độ cuối cùng là 5 mg/ml, ủ ở 37°C trong 2 giờ.
- Với mỗi mẫu xạ khuẩn thêm 2 ml EDTA 0.5M và 12µl proteinase K , lắc đều nhẹ nhàng và ủ ở 37°C trong 10 phút.
- Thêm 3 – 5 ml SDS 10%, lắc nhẹ và để ở 37°C trong 10 phút, sau đó cho vào nước đá.
- Thêm 2 – 5ml CH₃COOK 5M, để 15 phút trong nước đá.
- Bổ sung phenol-chloroform với thể tích bằng thể tích dịch trong ống, đảo đều, ly tâm 6000 rpm ở 4°C trong 10 phút.
- Sau khi ly tâm thấy trong ống xuất hiện 3 pha, dùng pipet hút dịch nổi phía trên sang ống falcon mới. Tiếp đó bổ sung phenol-chloroform với thể tích bằng thể tích dịch trong ống, đảo đều và ly tâm ở 4°C 6000 rpm.
- Sau khi ly tâm thấy dịch trong ống phân 2 lớp, tiến hành hút dịch nổi phía trên sang ống mới. Bổ sung chloroform với thể tích bằng một nửa thể tích dịch trong ống, đảo đều và ly tâm 6000 rpm ở 4°C trong 10 phút.

- Hút phần dịch nổi bên trên sang ống mới, tiếp tục bổ sung chloroform với thể tích bằng một nửa thể tích dịch trong ống, đảo đều và ly tâm.
- Hút dịch trên sang ống mới, bổ sung Rnase 50 μ g/ml và ủ ở 37°C trong 1 giờ.
- Bổ sung isoamyl alcohol và ethanol với tỷ lệ thể tích dịch trong ống: isoamyl alcohol: ethanol = 1:0.8:2.5, đảo nhẹ nhàng thấy xuất hiện kết tủa sợi DNA.
- Dùng que thủy tinh khuấy nhẹ trong ống, DNA sẽ bám lên que.
- Đưa que nhúng lần lượt vào 3 ống eppendorf có chứa ethanol để rửa DNA, sau đó DNA được đưa vào ống eppendorf mới và đợi một thời gian để khô DNA.
- Cuối cùng bổ sung TE buffer.

2.5.11. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh

**Nguyên lý:* Mẫu thử được đặt lên lớp thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, kháng sinh từ mẫu thử khuếch tán vào môi trường thạch sẽ ức chế sự phát triển của vi sinh vật kiểm định tạo vòng kháng khuẩn.

**Tiến hành*

- Chuẩn bị đĩa petri đã cấy vi sinh vật kiểm định: Vi sinh vật kiểm định được sử dụng là vi khuẩn *M.luteus* ATCC9341, tiến hành cấy *M.luteus* ATCC9341 vào môi trường canh thang (LB) lỏng, nuôi lắc ở 37°C từ 12 – 16 giờ đến khi tạo hỗn dịch vi sinh vật kiểm định có nồng độ 10^7 - 10^8 tế bào/ml. Đưa dịch nuôi cấy vào môi trường LB chứa 1,5% agar đã được hấp tiệt trùng và để nguội đến 40°C, với tỷ lệ thể tích giống/thể tích môi trường thạch là 5/200. Lắc đều để vi sinh vật kiểm định phân tán đều vào môi trường và đổ vào hộp petri. Nuôi cấy chủng tụ cầu vàng *Micrococcus luteus* trong môi trường lỏng Luria - Bertani (LB) ở nhiệt độ 37°C trong vòng 4 - 6h. Khi mật độ vi khuẩn phát triển tốt (OD=0.6), lấy 200 μ l dịch nuôi cấy tụ cầu vàng đem dàn đều trên môi trường thạch LB. Đặt khoanh giấy lọc có đường kính 6mm

được tẩm một 5µl chất chiết suất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 và chủng xạ khuẩn đột biến vào khoanh giấy thấm đã được khử trùng. Để đĩa thạch có chứa các thành phần trên vào tủ ấm 37°C trong vòng 12-16h.

- Đánh giá kết quả: Hoạt tính kháng sinh được xác định qua đường kính của vòng vô khuẩn.

2.5.12. Nuôi cấy xạ khuẩn và tách chiết kháng sinh neocarzinostatin

Nuôi cấy xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 và chủng đột biến ở môi trường R2YE và N- Z amin ở nhiệt độ 28°C, có lắc 220 RPM/phút, trong vòng 5 ngày.

Từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944, dùng amonium sulphate ở nồng độ bão hòa 40% để tách chiết NCS chromophore [23]

2.5.13. Phân tích sản phẩm NCS

Sản phẩm thu được từ quá trình tách chiết dịch nuôi cấy xạ khuẩn *S. carzinostaticus* sẽ được phân tích bằng các kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), phương pháp khối phổ (Mass spectrometry – ESI/MS), kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC- MS).

2.5.13.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

HPLC được sử dụng cột phân tích có model Mightysil RP-18 GP (5µm x 250nm x 4.6 nm, Kanto Tokyo, Nhật Bản), tốc độ dòng chảy là 0.5 ml/phút, UV tại bước sóng 320nm.

Cụ thể chương trình hoạt động của HPLC cho phân tích chất như sau:

Bảng 2.2. Chương trình phân tích chất bằng kỹ thuật HPLC

Thời gian (phút)	Hóa chất A (Methanol/Acetonitrile = 50:1)	Hóa chất B (H₂O/HOAc = 50:1)
0-15	50%	50%
15-25	5%	95%
25-30	5%	95%
30-35	0%	0%

2.5.13.2. Kỹ thuật ghép khối phổ ESI/MS

Phương pháp khối phổ là một kỹ thuật dùng để đo đặc tỉ lệ khối lượng trên điện tích của ion chất cần phân tích và xác định các hợp chất chưa biết bằng cách dựa vào khối lượng của phân tử hợp chất.

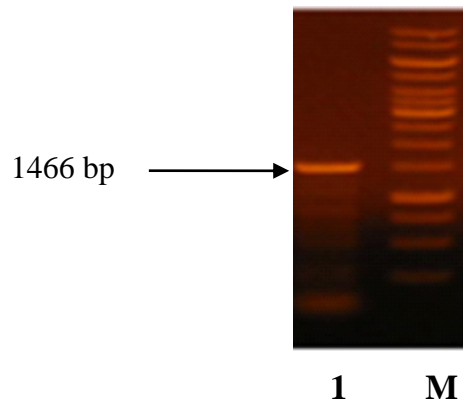
Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thiết kế tái tổ hợp mất gen *ncsB3* ở chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944

3.1.1. Kết quả PCR nhân đoạn gen upstream và downstream của *ncsB3*

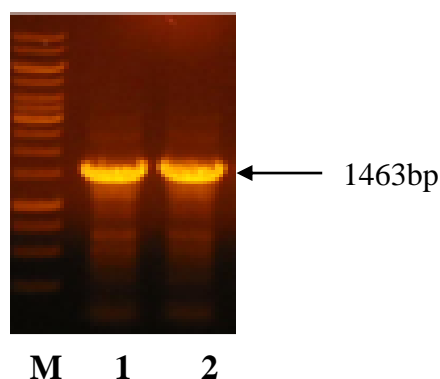
3.1.1.1. Kết quả nhân đoạn upstream của *ncsB3*



Hình 3.1. Hình ảnh điện di DNA kết quả PCR của đoạn upstream *ncsB3* trong đó (1) là sản phẩm PCR (~1,5kb); (M) là thang chuẩn DNA (10kb).

DNA tổng số được tách từ chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 được sử dụng làm khuôn mẫu trong phản ứng PCR để nhân đoạn gen upstream với cặp môi UHP450-FE/UHP450-RX (Bảng 2.1). Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng gần 1.5kb (Hình 3.1) phù hợp với chiều dài của đoạn gen quan tâm upstream là 1466 bp. Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm PCR là đặc hiệu và đủ hàm lượng cho mục đích tách dòng gen.

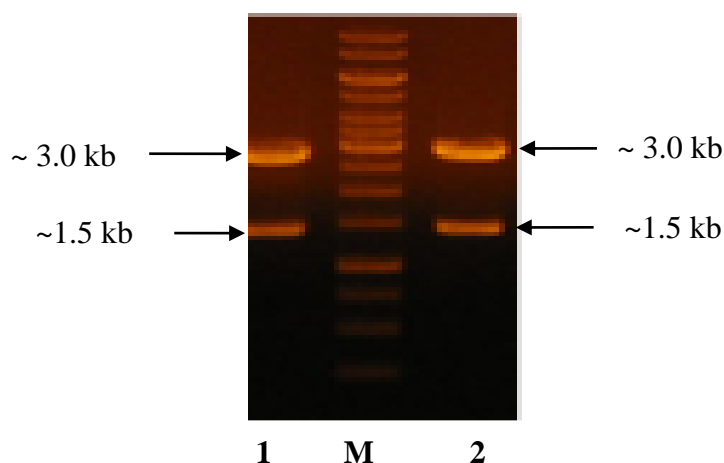
3.1.1.2. Kết quả nhân đoạn downstream của *ncsB3*



Hình 3.2. Hình ảnh điện di kết quả PCR của đoạn downstream *ncsB3* trong đó (1) và (2) là sản phẩm PCR (~1,5kb); M là thang chuẩn DNA (10kb).

Tương tự khi nhân đoạn downstream cũng dùng DNA tổng số được tách từ chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 làm khuôn mẫu trong phản ứng PCR với cặp môi DHP450-FX/DHP450-RH (Bảng 2.1). Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng gần 1.5kb (Hình 3.2) phù hợp với chiều dài của đoạn gen quan tâm downstream là 1463 bp. Sản phẩm PCR là đặc hiệu và đủ hàm lượng cho mục đích tách dòng gen.

3.1.2. Kết quả gắn upstream và downstream trong *pGEM - T easy*



Hình 3.3. Hình ảnh điện di DNA của upstream (1) và downstream (2) được gắn vào *pGEM-T easy* khi phân cắt bằng *EcoRI/XbaI* (1); *XbaI/HindIII* (2); (M) là thang chuẩn DNA (10kb).

Sau khi chạy PCR sản phẩm được tinh sạch thu đoạn gen *upstream* và *downstream*. Thực hiện phản ứng nối đoạn gen *upstream* và đoạn gen

downstream vào vector pGEM-T Easy. Taq DNA polymerase có hoạt tính terminal transferase, thêm deoxyadenosine (A) vào đầu 3' của sản phẩm PCR. Hệ thống vector pGEM-T Easy được thiết kế mang một thymidine (T) ở đầu 3' của cả hai bên. T nhô ra ở vị trí gắn tăng hiệu quả của quá trình nối bằng cách ngăn chặn việc tự đóng vòng của vector và cung cấp một đầu T tương thích với đầu A của sản phẩm PCR. Nhờ vậy, phản ứng nối dễ xảy ra.

Plasmid tái tổ hợp được tạo ra từ phản ứng nối sẽ được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XL1 Blue bằng phương pháp sốc nhiệt, nuôi cấy trong môi trường LB chứa Amp 100µg/ml, Xgal và IPTG ở 37°C để chọn lọc.

Tiến hành lựa chọn khuẩn lạc màu trắng mọc trên môi trường chọn lọc, trong đó khuẩn lạc 1 là khuẩn lạc được chuyển vector có chứa đoạn gen *upstream*, khuẩn lạc 2 là khuẩn lạc được chuyển vector chứa đoạn gen *downstream*. Tách plasmid và chạy điện di kiểm tra, tiến hành đọc trình tự.

Vector pGEM-T Easy có kích thước ~ 3kb, đoạn gen *upstream* và đoạn gen *downstream* đều có kích thước ~ 1.5kb. Kết quả điện di DNA được tách chiết từ 2 khuẩn lạc và phân cắt bằng các cặp enzyme giới hạn xuất hiện 2 băng vạch 1.5kb (tương ứng với chiều dài của đoạn gen *upstream*; *downstream*) và 3kb (tương ứng với chiều dài của vector pGEM-T Easy) khi phân cắt bằng EcoRI/XbaI (khuẩn lạc 1) và phân cắt bằng XbaI/HindIII (**Hình 3.3**). Điều đó cho thấy đã biến nạp thành công plasmid tái tổ hợp pGEM-T-*upstream* và plasmid tái tổ hợp pGEM-T-*downstream* vào tế bào *E. coli* XL1 Blue. Plasmid DNA được gửi đi kiểm tra xác định trình tự gen.

3.1.3. Kết quả kiểm tra trình tự gen đoạn *upstream* và *downstream*

Chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự sản phẩm PCR đoạn *upstream* và *downstream* từ kết quả giải trình tự với trình tự sản phẩm PCR phân tích từ Genbank bằng phần mềm ClustalW2, kết quả cho thấy hai mẫu được gửi đi kiểm tra trình tự có độ tương đồng trên 95% so với trình tự đoạn gen được công bố trên ngân hàng gen (**Hình 3.4** và **Hình 3.5**). Điều đó khẳng định

thêm về kết quả PCR của đoạn *upstream* và *downstream* trong chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944.

Sequence Alignment

CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

```
sequence1      ATTGAATTCCCCGTACACGGGCGGTGGGCCGGGGAATCCTCGACACAGGAGGCCTCGGCC
sequence2      -----CCCCGTACACGGGCGGCGGGCCGGGGAATCCTCGACACAGGAGGCCTCGGCC
                *****

sequence1      CGCTTCGACGTTCCTGTTGGGACGCTCGGGAACCCTCTCGAACGTACCCAGCCACGCCCGG
sequence2      CGCTTCGACGTTCCTGTTGGGACGCTCGGGAACCCTCTCGAACGTACCCAGCCACGCCCGG
                *****

sequence1      AGGGCGCGTCGGGGCCGCGTCGCCGGCGTGGGGTCTTCGGGAGTCGCGAACGGCGCCCTC
sequence2      AGGGCGCGTCGGGGCCGCGTCGCCGGCGTGGGGTCTTCGGGAGTCGCGAACGGCGCCCTC
                *****

sequence1      CCCTGCGTCGAATCCCTAGCCGGCACGGGCTGACGGTGCCCGGGCGTCACGGTTTCGGCC
sequence2      CCCTGCGTCGAATCCCTAGCCGGCACGGGCTGACGGTGCCCGGGCGTCACGGTTTCGGCC
                *****

sequence1      TGAGGGCCCCGAGGATGATGTGCTCGCGGATTCGGGTGGCAGGAGCATGCGCGTGC GGGT
sequence2      TGAGGGCCCCGAGGATGATGTGCTCGCGGATTCGGGTGGCAGGAGCATGCGCGTGC GGGT
                *****

sequence1      AGCGGCCGAGTCGACCATGCCGGTGCAGGTCCGCCAAGCCCAGAAGCAGTCGGCAAGTG
sequence2      AGCGGCCGAGTCGACCATGCCGGTGCAGGTCCGCCAAGCCCAGAAGCAGTCGGCAAGTG
                *****

sequence1      GACCAGCGTCTCGACAGCGATCTTCGGCAGCAGCGCGTGAGGGATGGAACCGTACCGGTC
sequence2      GACCAGCGTCTCGACAGCGATCTTCGGCAGCAGCGCGTGAGGGATGGAACCGTACCGGTC
                *****

sequence1      GTTGATGATCGCGTCGTAGACACACGAGGGCGCCATGGACTCGAACGCCTGCCAGGCAGG
sequence2      GTTGATGATCGCGTCGTAGACACACGAGGGCGCCATGGACTCGAACGCCTGCCAGGCAGG
                *****

sequence1      GTGCTGCTTGAACCTCTCCAGCGTCTCGTCCGTATGAACTTGACGATTTCTTGCCGAA
sequence2      GTGCTGCTTGAACCTCTCCAGCGTCTCGTCCGTATGAACTTGACGATTTCTTGCCGAA
                *****

sequence1      GAGGGTCACCGCCTCTTCGCGGGCGGTCCCTCGGCGAGGAGCGCCTTCAACCGGTTCGACCTC
sequence2      GAGGGTCACCGCCTCTTCGCGGGCGGTCCCTCGGCGAGGAGCGCCTTCAACCGGTTCGACCTC
                *****

sequence1      GTCACCGTTGAGCGGGGGCGAGGAGTACGGCGGTTCGTAGAGCCCCAGTTTCGCCATGGG
sequence2      GTCACCGTTGAGCGGGGGCGAGGAGTACGGCGGTTCGTAGAGCCCCAGTTTCGCCATGGG
                *****

sequence1      GACGCCGGCCGCCGCGGCATGGATGGCGATCATGCCGCCGCTGCAGTTGGCGAAGACGTG
sequence2      GACGCCGGCCGCCGCGGCATGGATGGCGATCATGCCGCCGCTGCAGTTGGCGAAGACGTG
                *****

sequence1      GCCCGGTTCCCCGATGGCGTCGAGCACGGCGACCAGGTCCCTCGACCTCACGGTCGATCGT
sequence2      GCCCGGTTCCCCGATGGCGTCGAGCACGGCGACCAGGTCCCTCGACCTCACGGTCGATCGT
                *****

sequence1      GTACTGCTCCGGGTCCCCGTAGCCGCTACCCCCACGGCCGCGGCATCGTAGTTGAACAC
sequence2      GTACTGCTCCGGGTCCCCGTAGCCGCTACCCCCACGGCCGCGGCATCGTAGTTGAACAC
                *****
```

```

sequence1      CGTGAACTGCTGGGACAGGCTCGGGGCGAGCGGTGTGAACATGGCCTTGTCTGTTGAGCCC
sequence2      CGTGAACTGCTGGGACAGGCTCTGGGCGAGCGGTGTGAACATGGCCTTGTCTGTTGAGCCC
*****

sequence1      GCCCCGATGATGACGACGGGCGGGCCGCTTCCCGACTTCTCGTAGGCGATCGTGGTGCC
sequence2      GCCCCGATGATGACGACGGGCGGGCCGCTTCCCGACTTCTCGTAGGCGATCGTGGTGCC
*****

sequence1      GTCGGCCGACACCACGGTCTCGACCGGGAGGTCACGCGGTCCCGCGTAGTCGTCGCCAG
sequence2      GTCGGCCGACACCACGGTCTCGACCGGGAGGTCACGCGGTCCCGCGTAGTCGTCGCCAG
*****

sequence1      GGGCAACCCGCCTCCCACGACTCCGGCTTCGGCCGTTGCTGCTGATTCCACCATCGGCAG
sequence2      GGGCAACCCGCCTCCCACGACTCCGGCTTCGGCCGTTGCTGCTGATTCCACCATCGGCAG
*****

sequence1      TCTCCTTGATACGAGGGTTACGTCGCCCCGGCGGTCCGCGCGCATCGGCGAACGGCGCGG
sequence2      TCTCCTTGATACGAGGGTTACGTCGCCCCGGCGGTCCGCGCGCATCGGCGAACGGCGCGG
*****

sequence1      CGCGACGGGCATGGTCGAGTGGTCTAGACCGGCC
sequence2      CGCGACGGGCATGGTCGAGTGGTTCGGCGCCGCC
*****

```

Hình 3.4. Kết quả so sánh trình tự nucleotid đoạn upstream từ Genbank (sequence1) và từ sản phẩm PCR được tinh sạch (sequence2).

Sequence Alignment

CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

```

sequence1      ATTTCTAGACTCGGTCATGGACACAACCTCCAGCAGGGTCTGTTGTAGCGGAACAGGCGT
sequence2      -----AGCCTCGGTCATGGACACAACCTCCAGCAGGGTCTGTTGTAGCGGAACAGGCGT
          * * * * *
sequence1      CAGGCGGCTTTCGGCGGCTGAAGACGCAGGAGGGGCCCACTGGGCACGCGGCAGGCGC
sequence2      CAGGCGGCTTTCGGCGGCTGAAGACGCAGGAGGGGCCCACTGGGCACGCGGCAGGCGC
*****

sequence1      CGGTGCACGCCGGTGCGGGCGGCTCGATCGTTGTTACGCTAGCCTCACGGCCCGTCCAC
sequence2      CGGTGCACGCCGGTGCGGGCGGCTCGATCGTTGTTACGCTAGCCTCACGGCCCGTCCAC
*****

sequence1      GGCGTCTTCCTGGTTGCGGAGAGCGGGGCCGAGGCGGGTGTCTCTGGTGTGCTCGACA
sequence2      GGCGTCTTCCTGGTTGCGGAGAGCGGGGCCGAGGCGGGTGTCTCTGGTGTGCTCGACA
*****

sequence1      GGTAGTCGGCGGCAGCTGTGACATGCCTGGGCCCGCGCGGTGTTTCGTCCGCGGGGCC
sequence2      GGTAGTCGGCGGCAGCTGTGACATGCCTGGGCCCGCGCGGTGTTTCGTCCGCGGGGCC
*****

sequence1      CAGGTGTGTGTGGAGTGGGTGAGGAACTCATGACTCCGACGTTGTTGCCGTGGGGTCA
sequence2      CAGGTGTGTGTGGAGTGGGTGAGGAACTCATGACTCCGACGTTGTTGCCGTGGGGTCA
*****

sequence1      GTGAAGACGGCGATACGCCGGCAGGGGTGTCTGCGGCGGCATCTTCAGGAGCTGCCG
sequence2      GTGAAGACGGCGATACGCCGGCAGGGGTGTCTGCGGCGGCATCTTCAGGAGCCGCCG
*****

sequence1      AGCTTCTCCGCCTGCGCGAGGGCTGCCTCGACGTCGGCAACCGGGAAATAGGGAACGACC
sequence2      AGCTTCTCCGCCTGCGCGAGGGCTGCCTCGACGTCGGCAACCGGGAAATAGGGAACGACC
*****

sequence1      CCGACATACGGGCTCTCGGGGCCGGCCTGACCGATTCCCTCCGAGGGCGGGCCGTCCCCG
sequence2      CCGACATACGGGCTCTCGGGGCCGGCCTGACCGATTCCCTCCGAGGGCGGGCCGTCCCCG
*****

```

```

sequence1      GAGCCCACCATGGCATAGGTGTCGTCCAGGGCATTGATCGTCCAGCC-AAGATTTCTTGG
sequence2      GAGCTCACCATGGCATAGGTGTCGTCCAGGGCATTGATCGTCCAGCCGAGATTTCTTGG
*****

sequence1      TAGAAAGCCCGCGTCTGGGACGAGTCAGGGTGGAGATGT---ACCAGCCAGGCACGGCG
sequence2      TAGAAAGCCCGCGTCTGGGACGAGTCAGGGTGGAGATGTGGAACCAGCCAGGCACGGCG
*****

sequence1      GGAAAATGGTCTTTTTTTTTTCGTTTGCCATGTTACACCGTACACAGCCGAGATCTG
sequence2      GGAAAATGGTCTTTTTTTTTTCGTTTGCCATGTTACACCGTACACAGCCGAGATCTG
*****

sequence1      CCGAGCAACCCGGACTTGCCACAGTTGATGGAAATGCTTCCATTCCATCTCTTGTATGT
sequence2      CCGAGCAACCCGGACTTGCCACAGTTGATGGAAATGCTTCCATTCCATCTCTTGTATGT
*****

sequence1      TTCCGAAACTGCCGGACAATCCGGGTGAGCGCGTCTGGGCCACGATCTCGGAGGTCGGGT
sequence2      TTCCGAAACTGCCGGACAATCCGGGTGAGCGCGTCTGGGCCACGATCTCGGAGGTCGGGT
*****

sequence1      CGCGCAGTGCCGGTCCACCCGTTTCGAAGAGCGCCATGATCAGGACACCCGCTGATGATTA
sequence2      CGCGCAGTGCCGGTCCACCCGTTTCGAAGAGCGCCATGATCAGGACACCCGCGATGATCA
*****

sequence1      TCAGCGCTGCTCCCACCCGGAAGGCCAGGACATAACCCGACGTCACTGCGGTCTCGACGG
sequence2      TCAGCGCTGCTCCCACCCGGAAGGCCAGGACATAACCCGACGTCACTGCGGTCTCGACGG
*****

sequence1      GGACACCGGCCTGGATCTCACTGGTGGTGTACCGGATGGCCAGAGGTACCAGAACGGCGA
sequence2      GGACACCGGCCTGGATCTCACTGGTGGTGTACCGGATGGCCAGAGGTACCAGAACGGCGA
*****

sequence1      GCCCAGGGCTCCTCCAATCTGCTGCATGGTGTCTGGACGCCGAGGCAGGCTTGAGT
sequence2      GCCCAGGGCTCCTCCAATCTGCTGCATGGTGTCTGGACGCCGAGGCAGGCTTGAGT
*****

sequence1      TCTGGTCGGTGACCTGGTGGAGGGCGGCGCTCGTCGCGGCCGGCATGGTGGCGCCCGGA
sequence2      TCTGGTCGGTGACCTGGTGGAGGGCGGCGCTCGTCGCGGCCGGCATGGTGGCGCCCGGA
*****

sequence1      ATACGCCGAACACGACCATTCCCGGCAGGATCCCCCGGCATAGCGAGTGTGACATCGA
sequence2      ATACGCCGAACACGACCATTCCCGGCAGGATCCCTCCGGCATAGCGAGTGTGACATCGA
*****

sequence1      CCGTGCTCGTCAGCAGCAGTCCGATCCCGGCGCCGATGAAGCCCATCGCCACGACCGCCC
sequence2      CCGTGCTCGTCAGCAGCAGTCCGATCCCGGCGCCGATGAAGCCCATCGCCACGACCGCCC
*****

sequence1      GCACTCCGATGCGCGGGGTGAGCGCGGTCCCCACCCCGATGCCGATACCGATGCCGAATC
sequence2      GCACTCCGATGCGCGGGGTGAGCGCGGTCCCCACCCCGATGCCGATACCGATGCCGAATC
*****

sequence1      CGAGGGGAGGTACGCCAGGCCGGTCTCGAGCGGCGAGTACATCAGCACGTGCTGCTCGA
sequence2      CGAGGGGAGGTACGCCAGGCCGGTCTCGAGCGGCGAGTACTTACGACGTGCTGCTCGA
*****

sequence1      ACAACGTCAGGATGAAGGTGTACGAGATGAACGCCGCCATGAAGAACAGGGAGGTCAGGT
sequence2      ACAACGTCAGGATGAAGGTGTACGAGATGAACGCCGCCATGAAGAACAGGGAGGTCAGGT
*****

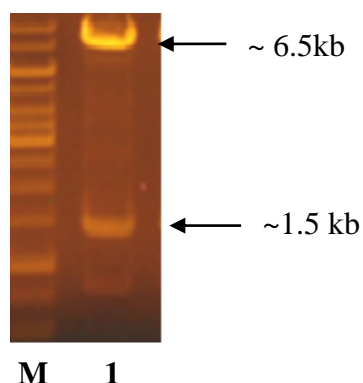
sequence1      TGATGACCGACCTGGTCCGGTTGGCGAAGCTTTC
sequence2      TGATGACCGACCTGGTCCGGTTGGCGAAG-----
*****

```

Hình 3.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotid đoạn downstream từ Genbank (sequence1) và từ sản phẩm PCR được tinh sạch (sequence2).

3.1.4. Kết quả tạo vector tái tổ hợp đột biến pKC-HP450

3.1.4.1. Kết quả gắn upstream vào vector pKC1139

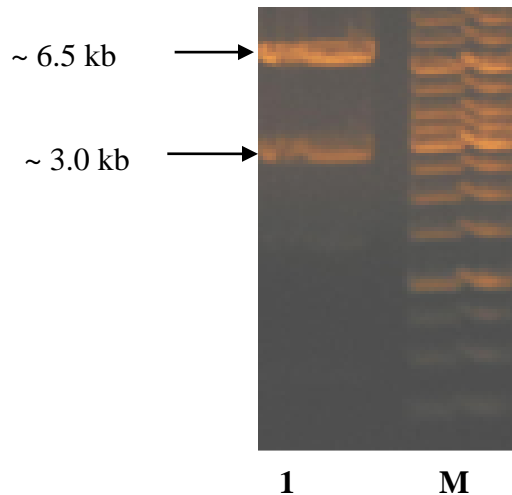


Hình 3.6. Hình ảnh điện di DNA của đoạn upstream (~1.5kb) được chuyển vào vector pKC1139 (~6.5 kb) khi phân cắt bằng *EcoRI/XbaI* (**1**); (**M**) là thang chuẩn DNA (10kb).

Plamid DNA được tinh sạch của đoạn *upstream* (~1.5kb) được gắn vào vector pKC1139 (~6.5kb) tại vị trí *EcoRI/XbaI* và chuyển vào chủng *E.coli* XL1-Blue. Các khuẩn lạc được lựa chọn ngẫu nhiên để nuôi cấy, tách plasmid DNA và kiểm tra sự có mặt của đoạn *upstream* trong vector pKC1139. Kết quả kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *EcoRI/XbaI* cho thấy có 2 vạch điện di có kích thước 1.5kb và 6.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *upstream* và pKC1139 (**Hình 3.6**). Điều đó cho thấy đoạn *upstream* đã được biến nạp thành công vào vector pKC-1139 vào tế bào *E. coli* XL1 Blue, tổ hợp này gọi tên pKC-UP.

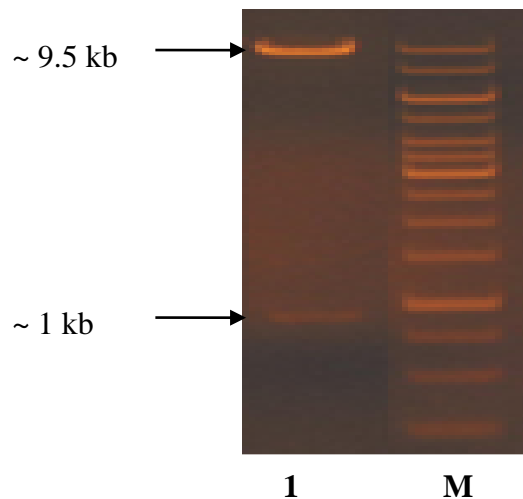
3.1.4.2. Kết quả gắn downstream vào pKC-UP

Plasmid DNA của pKC-UP được tinh sạch và gắn thêm đoạn *downstream* được đặt tên pKC-UD với kích thước ước tính khoảng 9.5kb và được chuyển vào *E.coli* XL1-Blue. Kết quả kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *XbaI/HindIII* cho thấy có 2 vạch điện di có kích thước 3.0kb và 6.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *upstream*, *dowstream* và pKC1139 (**Hình 3.7**). Điều đó cho thấy đoạn *downstream* đã được biến nạp thành công vào pKC-UP và vào tế bào *E. coli* XL1 Blue. *E. coli* ET12567.



Hình 3.7. Hình ảnh điện di DNA của đoạn *upstream* và *downstream* (~3kb) đã được chuyển vào vector pKC1139 (~6.5 kb) khi phân cắt bằng XbaI/HindIII (**1**); (**M**) là thang chuẩn DNA (10kb).

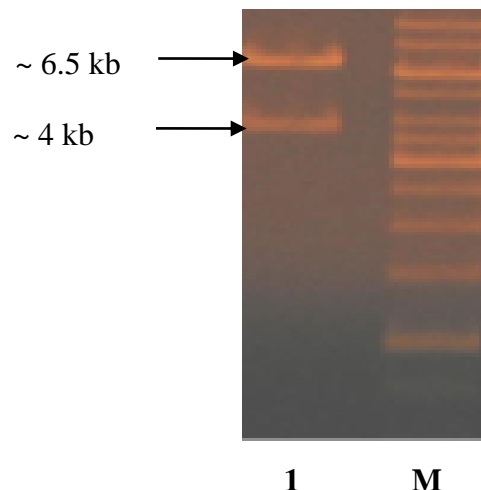
3.1.4.3. Kết quả gắn gen *neo^r* vào pKC-UD



Hình 3.8. Hình ảnh điện di DNA của pKC-HP450 gồm đoạn *upstream*, *downstream*, pKC1139 (9.5 kb) và *neo^r* (~1 kb) khi phân cắt bằng XbaI (**1**); (**M**) là thang chuẩn DNA (10kb).

Plasmid DNA của pKC-UD được tinh sạch và gắn thêm đoạn gen kháng neomycine (*neo^r*) và gọi tên pKC-HP450 (*upstream*, *dowstream*, *neo^r* và pKC1139) với kích thước ước tính khoảng 10.5kb và được chuyển vào *E.coli* XL1-Blue. Kết quả kiểm tra bằng enzyme giới hạn XbaI cho thấy có 2 vạch điện di với kích thước 1.0kb và 9.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *neo^r* và pKC-UD (**Hình 3.8**).

Để khẳng định thêm tổ hợp các gen *upstream*, *downstream*, *neo^r* đã gắn vào vector pKC1139 đúng vị trí cần thiết, cặp enzyme giới hạn *EcoRI/HindIII* được sử dụng để phân cắt pKC-HP450. Qua hình ảnh điện di cho thấy xuất hiện 2 vạch băng với kích thước 6.5kb và 4kb tương ứng với kích thước của pKC1139 và kích thước của tổ hợp 3 gen *upstream*, *downstream* và *neo^r* (**Hình 3.9**).

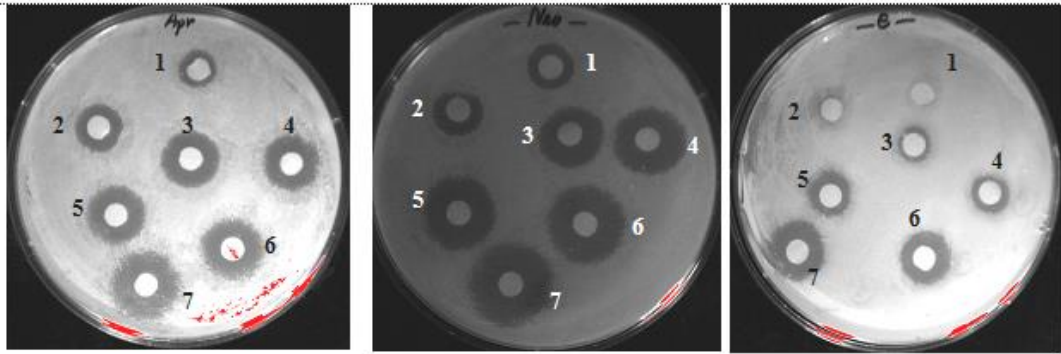


Hình 3.9. Hình ảnh điện di DNA chứng tỏ sự có mặt của đoạn *upstream*, *downstream* và *neo^r* (~4 kb) và pKC1139 (~6.5 kb) khi phân cắt bằng *EcoRI/HindIII* (**1**); **M** là thang chuẩn DNA (10kb).

Qua kết quả ở **Hình 3.8** và **Hình 3.9** khẳng định chúng tôi đã biến nạp thành công vector đột biến gen *ncsB3* (pKC-HP450) vào tế bào *E. coli* XL1 Blue.

3.1.5. Kiểm tra độ nhạy với kháng sinh của *S.carzinostaticus* ATCC15944

Để lựa chọn được khả năng kháng kháng sinh với chủng gốc, chúng tôi đã dùng 3 loại kháng sinh là neomycin, apramycin và erythromycin để kiểm tra độ nhạy của chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944. Dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* sau 72 giờ được thu hoạch và dàn đều trên 3 đĩa thạch môi trường R2YE. Với mỗi đĩa kiểm tra độ nhạy của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 với một trong 3 loại kháng sinh (neomycin, apramycin, và erythromycin) ở các nồng độ khác nhau (1µg/ml; 3 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 12 µg/ml và 15 µg/ml) .



1: 1µg/ml 2: 3µg/ml 3: 5µg/ml 4: 7,5 µg/ml
 5: 10 µg/ml 6: 12 µg/ml 7: 15 µg/ml

Hình 3.10. Kiểm tra độ nhạy kháng sinh của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 với các nồng độ khác nhau của 3 loại: apramycin, neomycin và erythromycin.

Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 rất nhạy cảm với 3 loại kháng sinh đã được chọn mặc dù ở nồng độ kháng sinh ở mức rất thấp 1µg/ml (**Hình 3.10**). Với kết quả kiểm tra này chúng tôi đã khẳng định rằng trong tế bào của xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 không có gen kháng kháng sinh neomycin (*neo'*) cũng như gen kháng 2 loại kháng sinh apramycin và erythromycin. Điều đó có nghĩa là khi nuôi cấy chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 thì chủng xạ khuẩn này sẽ không thể sinh trưởng trong môi trường có chứa kháng sinh neomycin và ngược lại nếu trong tế bào có chứa gen *neo'*, tế bào sẽ sinh trưởng được trong môi trường chứa neomycin. Tương tự như vậy đối với apramycin và erythromycin.

Từ kết quả nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng neomycin làm kháng sinh kiểm định và lựa chọn đột biến. Nếu tế bào đã bị gây đột biến mất gen *ncsB3* và được thay thế bằng *neo'* thì chủng đột biến này sẽ tồn tại trong môi trường có kháng sinh neomycin; kháng sinh apramycin được chọn làm kháng sinh để sàng lọc đột biến kép.

3.1.6. Chuyển tổ hợp gen vào *S.carzinostaticus* ATCC15944

3.1.6.1. Tạo tế bào trần từ chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944

Chuyển gen vào tế bào xạ khuẩn là một công việc hết sức khó khăn đòi hỏi phải khảo sát các điều kiện thích hợp nhất có ảnh hưởng đến sự chuyển gen như: các điều kiện vi sinh vật, nồng độ lysozyme ủ và thời gian xử lý, nồng độ PEG thêm vào khi chuyển gen, nồng độ kháng sinh phủ bề mặt đĩa chuyển gen để lựa chọn khuẩn lạc đã được chuyển thành công.

Để tìm được điều kiện phù hợp cho sự thành công tạo tế bào tái tổ hợp các thí nghiệm khảo sát về các yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất đến hiệu suất chuyển gen đó là: Thời gian ủ lysozim để loại bỏ lớp thành tế bào (petidoglycon) từ 30 đến 70 phút; nồng độ PEG xúc tác cho quá trình chuyển gen từ 10 đến 50% và nồng độ kháng sinh phủ bề mặt đĩa chuyển gen từ 10 đến 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Qua kết quả khảo sát tìm các điều kiện thích hợp nhất để chuyển gen vào tế bào xạ khuẩn cho thấy thời gian xử lý lysozim trong 30 phút là thích hợp nhất để cho được số tế bào trần có tỷ lệ sống cao và có thể là tế bào khả biến thích hợp.

Với nồng độ kháng sinh neomycin được xác định là 50 $\mu\text{g/ml}$ để với các mẫu chuyển gen để lựa chọn các khuẩn lạc đã thành công (chủng tự nhiên *S.carzinostaticus* ATCC15944 bị ức chế không phát triển được). Tương tự như vậy với nồng độ PEG thích hợp là 30% và với nồng độ kháng sinh phủ lên đĩa chuyển gen là tỷ lệ tế bào đã được nhận vector tái tổ hợp (tế bào tái tổ hợp đạt cao nhất). Các khuẩn lạc đã mọc tốt sau chuyển gen 36 giờ (**Hình 3.11**).



Hình 3.11. Các khuẩn lạc phát triển trên đĩa thạch sau khi chuyển gen 36 giờ.

3.1.6.2. Sàng lọc đột biến kép mất gen *ncsB3*

Để lựa chọn ra được khuẩn lạc có đột biến kép mất hoàn toàn *ncsB3*, các khuẩn lạc được lựa chọn sẽ được nuôi cấy trong môi trường dịch R2YE bổ sung 50 $\mu\text{g/ml}$ neomycin và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Các sợi xạ khuẩn được pha loãng với các nồng độ $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ và $1/10^6$ sau đó dàn đều trên đĩa thạch R2YE không có kháng sinh và ủ ở tủ ẩm vô khuẩn 28°C.

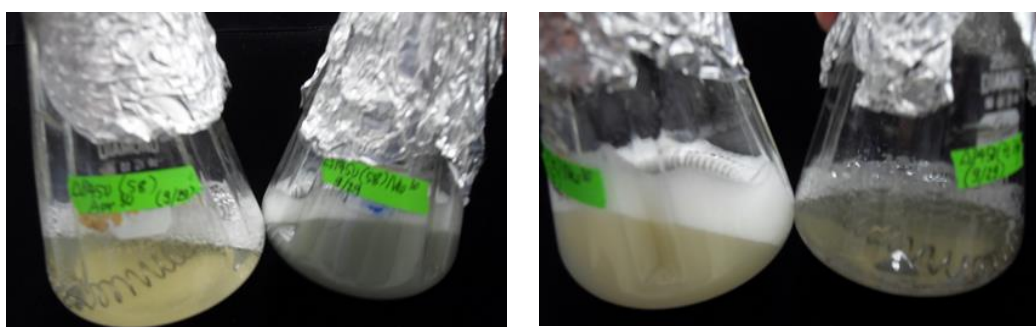
Sau khoảng 60-72 giờ xuất hiện các khuẩn lạc tiến hành lấy ngẫu nhiên khoảng 500 khuẩn lạc cấy đồng thời trên 2 môi trường khác nhau là đĩa thạch R2YE bổ sung 50 $\mu\text{g/ml}$ neomycin và đĩa thạch R2YE bổ sung 20 $\mu\text{g/ml}$ apramycin (R2YE/Neo⁵⁰, R2YE/Apr²⁰) (**Hình 3.12**). Khuẩn lạc nào có cả gen kháng neomycin và gen nhạy cảm với apramycin (*neo^r.apr^s*) sẽ là các khuẩn lạc tiềm năng cho việc lựa chọn chủng đột biến kép mất gen *ncsB3* hoàn toàn trong genome.



Hình 3.12. Các khuẩn lạc được cấy riêng rẽ trên đĩa R2YE/Neo⁵⁰ và R2YE/Apr²⁰

Trong số khoảng hơn 500 khuẩn lạc được lựa chọn ngẫu nhiên và nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch ở cả 2 loại đĩa (R2YE/Neo⁵⁰, R2YE/Apr²⁰). Ở thế hệ thứ 5 đã phát hiện ra 2 khuẩn lạc phát triển rất tốt ở môi trường R2YE/Neo⁵⁰ nhưng không mọc trong môi trường R2YE/Apr²⁰.

Khi nuôi cấy 2 khuẩn lạc này ở trong môi trường lỏng R2YE có kháng sinh với nồng độ tương ứng cũng thu được kết quả tương tự, đó là chúng đột biến chỉ sinh trưởng trong môi trường có chứa neomycine 50μg/ml và không phát triển trong môi trường có chứa apramycine 20μg/ml (**Hình 3.13**).



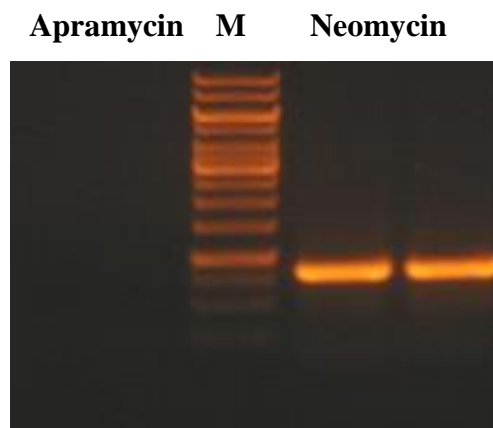
Apr 20μg/ml Neo 50μg/ml Neo 50μg/ml Apr 20μg/ml

Hình 3.13. Hai khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường lỏng R2YE/Neo⁵⁰, R2YE/Apr²⁰

Điều đó chứng tỏ rằng trong genome của chủng đột biến đã chứa gen kháng kháng sinh neomycine (*neo^r*) và không còn vector pKC1139 nữa. Để khẳng định sự thành công của chủng đột biến chúng tôi dùng kỹ thuật PCR để kiểm tra kết quả của thí nghiệm.

3.1.6.3. Chứng minh sự mất gen hoàn toàn *ncsB3* trong chủng đột biến

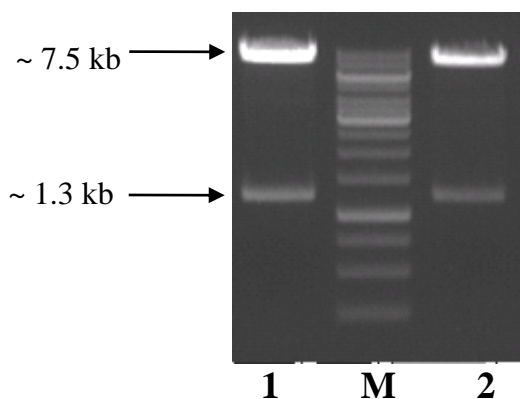
Hai khuẩn lạc được giả định là chủng đột biến mất gen *ncsB3* được nuôi cấy để tách DNA tổng số và được làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Khi sử dụng cặp mồi của gen kháng neomycin (*neo^r*) và cặp mồi của gen kháng apramycin (*apr^r*) (**Bảng 2.1**) cho thấy sản phẩm PCR chỉ xuất hiện ở cặp mồi của gen kháng neomycin (~1kb) tuy nhiên không thấy sản phẩm PCR đối với cặp mồi thiết kế cho gen kháng apramycine (**Hình 3.14**). Điều này chứng tỏ gen *neo^r* đã được chèn vào genome của chủng *S.carzinostaticus* trong khi đó gen kháng apramycin (*apr^r*) đã biến mất khỏi chủng đột biến hay nói một cách khác vector pKC1139 đã bị loại bỏ khỏi genome của chủng đột biến. Điều đó chứng tỏ chủng đột biến tạo thành đã mất hoàn toàn *ncsB3* và thay thế bởi gen kháng neomycin (*neo^r*).



Hình 3.14. Hình ảnh sản phẩm PCR với sự có mặt của gen kháng neomycin (*neo^r*) thay thế cho *ncsB3*

3.1.7. Thiết kế tổ hợp bổ sung *ncsB3* cho chủng đột biến *S.carzinostaticus* HDP450

Với mục đích kiểm tra sau khi bổ sung trở lại gen đột biến *ncsB3* và chuyển tổ hợp gen đó vào chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 để kiểm tra và so sánh với sản phẩm thu được tách chiết từ chủng gốc và chủng đột biến. Chúng tôi biểu lộ *ncsB3* trong vector pIBR25, đây là vector dùng để biểu lộ trong *Streptomyces*, tổ hợp mới tạo ra có tên gọi pIB3 (8.8kb). Sau đó tổ hợp này được chuyển vào chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 theo phương pháp tạo tế bào trần. Các khuẩn lạc được nuôi cấy, tách chiết DNA để kiểm tra xem sự có mặt của vector pIBR cũng như gen *ncsB3* hay không? Trong đó có 2 khuẩn lạc được lựa chọn đã cho thấy sự có mặt của gen *ncsB3* với kích thước khoảng 1.3kb và sự có mặt của vector pIBR25 với kích thước khoảng 7.5kb khi được phân cắt bằng *XbaI/PstI* (**Hình 3.15**).



Hình 3.15. Hình ảnh điện di DNA của *ncsB3* (~1.3 kb) và pIBR25 (~7.5 kb) khi phân cắt bằng *XbaI/PstI* (1 và 2); M là thang chuẩn DNA (10kb).

3.2. Kiểm tra hoạt tính sinh học chủng đột biến

3.2.1. Điều kiện nuôi cấy và tách chiết chất từ chủng đột biến

Điều kiện và môi trường nuôi cấy cho chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 được áp dụng tương tự như đối với chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944. Lúc đầu chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 được nuôi cấy trong môi trường lỏng R2YE ở nhiệt độ 28°C trong vòng 48 giờ, sau

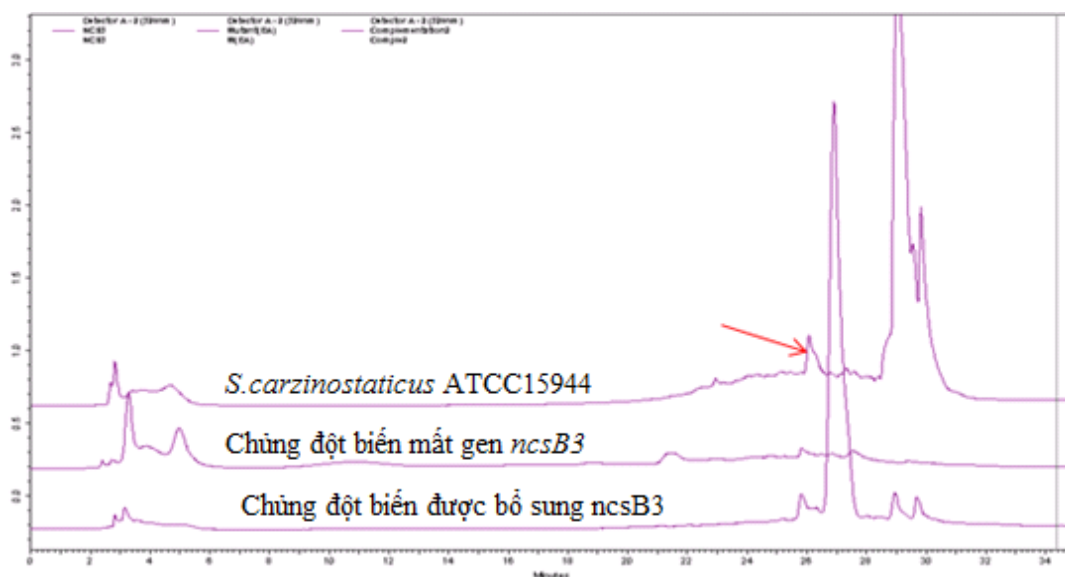
đó dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường lỏng N-Z amin cũng ở điều kiện nhiệt độ tương tự như trên nuôi cấy trong vòng 72 giờ thì thu hoạch chất.

Dịch nuôi cấy thu được tách chiết theo phương pháp tương tự như chủng xạ khuẩn gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 và sản phẩm được phân tích theo các kỹ thuật dưới đây.

3.2.2. Phân tích sản phẩm tách chiết

3.2.2.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Sản phẩm tách chiết từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 cũng như chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 và chủng *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với chương trình đã được thiết lập (Chương 2).

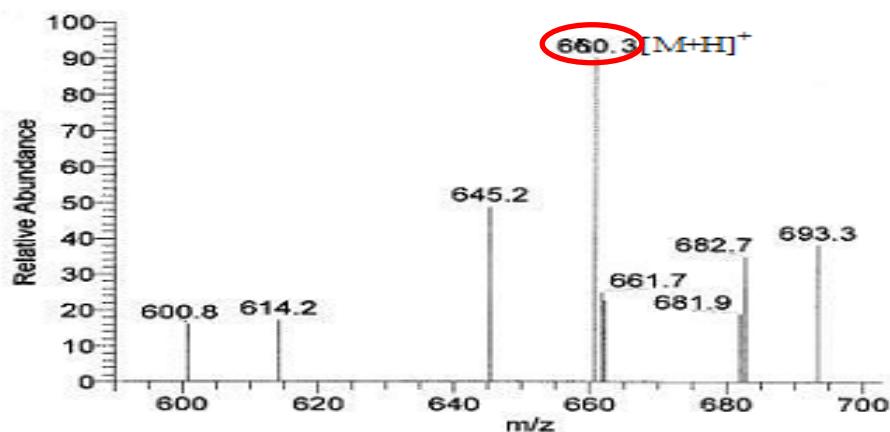


Hình 3.16. Sắc ký đồ HPLC phân tích sản phẩm tách chiết từ các chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944, *S.carzinostaticus* HP450 (chủng đột biến mất gen *ncsB3*) và *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 (chủng đột biến được bổ sung lại *ncsB3*)

Qua kết quả sắc ký đồ HPLC (**Hình 3.16**) cho thấy ở thời điểm phút thứ 26 không quan sát thấy NCS-chromophore ở chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 trong khi đó tại cùng thời điểm 26 phút NCS-chromophore quan sát rất rõ ở chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 và chủng xạ khuẩn bổ sung lại *ncsB3* (*S.carzinostaticus* HP450/pIB3). Điều đó

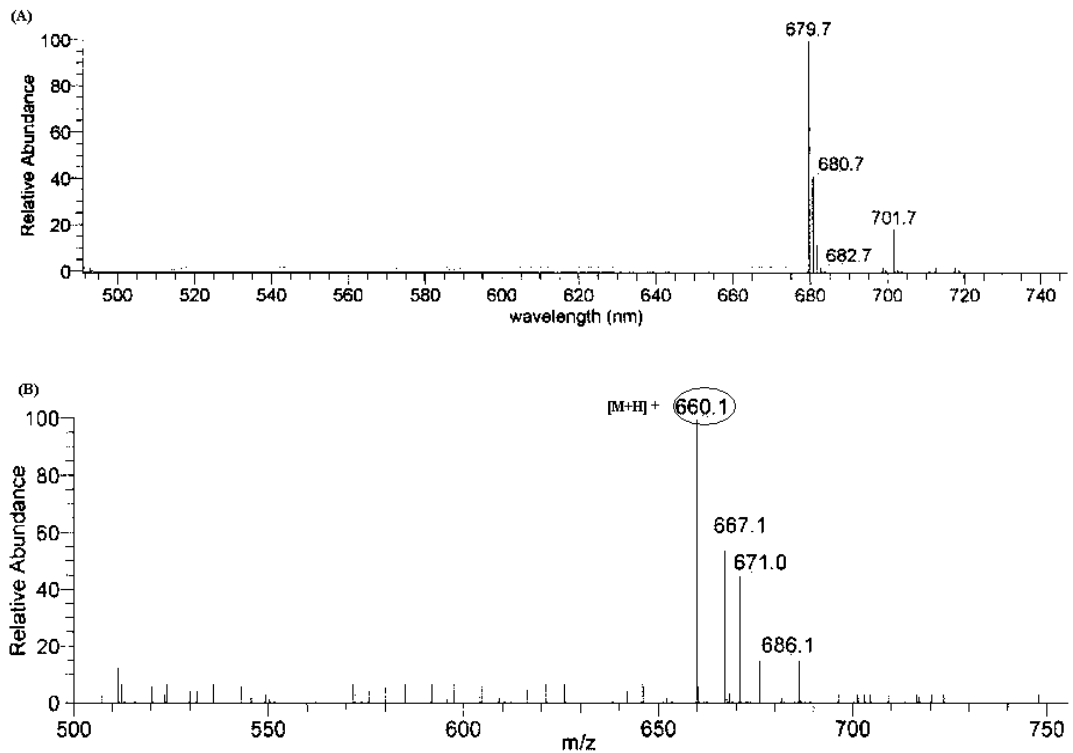
cho thấy khả năng khi gây đột biến mất gen *ncsB3* đã không tạo ra được NCS-chromophore, *ncsB3* là gen đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp naphthoic acid cũng như NCS-chromophore; hoặc chủng xạ khuẩn gây đột biến mất gen *ncsB3* đã tạo ra sản phẩm khác do vậy không còn đặc hiệu để apo-NCS bám vào. Một điều rất ngạc nhiên quan sát thấy ở chủng xạ khuẩn đột biến khi được bổ sung *ncsB3* trở lại, ngoài việc NCS-chromophore peak xuất hiện chúng tôi còn thấy xuất hiện một peak khác rất cao không quan sát thấy ở chủng xạ khuẩn gốc cũng như chủng xạ khuẩn đột biến .

3.2.2.2. Kỹ thuật khối phổ (Mass spectrometry – ESI/MS)



Hình 3.17. Phân tích sản phẩm tách chiết thu được từ *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp khối phổ ESI/MS

NCS-chromophore được tách chiết từ chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 có khối lượng m/z $[M+H]^+ = 660$ (**Hình 3.17**). Để xác định liệu NCS-chromophore có mặt ở chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 cũng như chủng đột biến đã được bổ sung *ncsB3* (*S.carzinostaticus* HDP450/pIB3) hay không? Các chất sau tách chiết từ các chủng trên được phân tích bằng kỹ thuật ESI/MS, chúng tôi không thấy khối lượng tương ứng với khối lượng của NCS-chromophore m/z $[M+H]^+ = 660$ (**Hình 3.18A**). Tuy nhiên ở chủng xạ khuẩn khi bổ sung *ncsB3* vào chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 thì sản phẩm NCS-chromophore lại được tạo ra (**Hình 3.18B**).



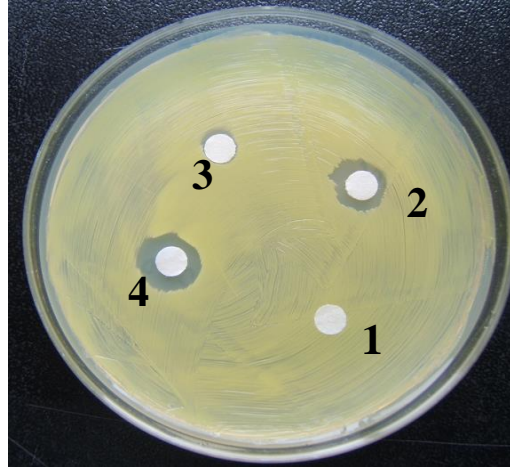
Hình 3.18. Phân tích chất tách chiết được từ các chủng (A) *S.carzinostaticus* HDP450; (B) *S.carzinostaticus* HDP450/pIB3 bằng kỹ thuật ESI/MS.

Với kết quả phân tích chất bằng kỹ thuật sắc ký lỏng trên cao HPLC và kỹ thuật khối phổ ESI/MS cho thấy chủng xạ khuẩn gây đột biến mất gen *ncsB3* đã không tạo ra NCS-chromophore trong khi chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 cũng như chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 đều thu được chất này.

3.2.3. So sánh hoạt tính kháng khuẩn

Chất chiết tách từ 3 chủng xạ khuẩn được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn với chủng *Micrococcus luteus*. Kết quả cho thấy trong khi chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 có hoạt tính kháng khuẩn với *Micrococcus luteus* thì chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 không có hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn này. Hoạt tính kháng

khuẩn sẽ xuất hiện trở lại ở chủng xạ khuẩn khi bổ sung trở lại *ncsB3* vào chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 (**Hình 3.19**).



Hình 3.19. Kiểm tra hoạt tính sinh học của các chất với chủng *M. Luteus* (1): Methanol; (2): NCS tách từ chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944; (3): chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450; (4): chủng đột biến bổ sung *ncsB3* *S.carzinostaticus* HP450/pIB3.

Qua kết quả kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của chủng đột biến càng có thêm bằng chứng cho thấy khi gây đột biến mất gen *ncsB3* sẽ không tạo ra NCS-chromophore do vậy hoạt tính sinh học kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Micrococcus luteus* cũng không còn nữa. Vậy các chất tạo ra ở chủng xạ khuẩn đột biến còn có tác dụng với các tế bào ung thư như chủng gốc hay không? Điều này còn phải được tiếp tục nghiên cứu trong thời gian tới đây.

Chương 4: KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu “Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gene *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến” chúng tôi đã rút ra được kết luận sau:

1. Thiết kế thành công tái tổ hợp đột biến gen *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944.

- Genome của chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 đã được gây mất gen *ncsB3* và thay thế bởi gen kháng neomycine (*neo^r*) với độ dài gần 1kb. Sau đó sử dụng vector pKC1139 là vector rất nhạy cảm với nhiệt độ trên 40°C và có gen kháng apramycin (*apr^r*) để mang tổ hợp gen đột biến.

- Tổ hợp đột biến có tên gọi pKC-HP450 được chuyển vào chủng vi khuẩn *E.coli* XL1 Blue và *E. coli* ET12567.

- Tổ hợp mang gen đột biến được chuyển vào chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp chuyển dạng nguyên hình thông qua tế bào trần.

- Các khuẩn lạc được sàng lọc để chọn lọc được chủng đột biến kép mất gen *ncsB3* hoàn toàn trong genome của *S.carzinostaticus* ATCC15944.

- Kháng định tính chính xác của chủng đột biến thu được qua quá trình sàng lọc.

2. Bước đầu qua kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng xạ khuẩn đột biến cho thấy:

- NCS-chromophore không quan sát thấy ở chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 qua phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng trên cao HPLC và kỹ thuật khối phổ ESI/MS.

- Chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 không có tính kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Micrococcus luteus*.

Chương 5: KHUYẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi đưa ra một số khuyến nghị sau:

1. Thử nghiệm các phương pháp khác để tách chiết và phân tích chất thu được từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450.
2. Kiểm tra hoạt tính của chất tách chiết từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 đối với tế bào ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty (2001), *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. Lê Gia Hy (1994), *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm cây gây bệnh đạo ôn và thối rễ phân lập ở Việt Nam*, Luận án phó tiến sĩ khoa học Sinh học, Viện CNSH, Trung tâm KHTN và CN Quốc Gia, Hà Nội.

TIẾNG ANH

3. Ajoy B (2008), “Enediynes and related structures in medicinal and biorganic chemistry”. *Curr Top Med Chem*, **8**: pp. 435-435.
4. Andrew, GM., Scott, BC., Byoung, MK (1994), “DNA Cleavage by Neocarzinostatin Chromophore. Establishing the Intermediacy of Chromophore-Derived Cumulene and Biradical Species and Their Role in Sequence-Specific”, *J.Am.Chem.Soc*, **116**, pp. 1670-1682.
5. Arnold L.D., Sergio S. (2009), “Microbial drug discovery: 80 years of progress”, *J.Antibiotics*, **62**, pp. 5-16.
6. Ashutosh K. (2008), *Pharmaceutical Microbiology*, New Age International (P) Ltd, pp. 89-101.
7. Beerman, T.A., Gawron, LS., Shin. S., Shen. B., McHugh, M.M (2009), “C-1027, a radiomimetic enediyne anticancer drug, preferentially targets hypoxic cells”, *Cancer Res.* **69(2)**: pp. 593-8.
8. Carlo O., Carmen M., Jose A.S. (2009), “Antitumor compounds from marine actinomycetes”, *Marine Drugs*, **97**, pp. 210 – 248.
9. Chen M., Xiao X., Wang P., Zeng X., Wang F. (2005), “*Arthrobacter ardleyensis* sp. nov. isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment”, *Arch Microbiol*, **183**, pp. 301-305.

10. Christopher G. Sudhahar, Der-Hang Chin (2006), “aponeocarzinostatin- A superior drug carrier exhibiting unusually high endurance against denaturants”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, pp. 3543–3552.
11. Chung, L., Liu, L., Patel, S., Carney, J. R., Reeves, C.D. (2001), “Deletion of *rapQONML* from the Rapamycin Gene Cluster of *Streptomyces hygroscopicus* Gives Production of the 16-*O*-Desmethyl-27-desmethoxy Analog” *J. Antibiot.*, **54**, pp. 250-356.
12. Cooke, H., Zhang, J., Griffin, MA., Nonaka, K., Van Lane., and Shen, B (2007), “Characterization of NcsB2 as a promiscuous naphthoic acid/Coenzyme A ligase integral to the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic neocarzinostatin”, *JACS*, **129**, pp. 7728-7729.
13. Cryle, M.J., Matovic, N.J., De, V.J.J (2003), “Products of cytochrome P450 (BioI) (CYP107H1)-catalyzed oxidation of fatty acids”, *Org Lett*, **5(18)**: pp. 3341-4.
14. Denis, F., R. Brzezinski (1991), “An improved aminoglycoside resistant gen cassette for use in grame-negative bacteria and *Streptomyces*”, *FEMS Microbiol Lett*, **65**, pp. 261-264.
15. Edo, K., Mizugaki, M., Koide, Y., Seto, H., and Ishida, N (1985), “The structure of neocarzinostatin chromophore possessing a novel bicyclo[7.3.0] dodecadiyne system”, *Tetrahedron Lett*, **26**, pp. 331-340.
16. Feyereisen, R. (1999), “Insect P450 enzymes” *Annu. Rev. Entomol.*, **44**, pp. 507-533.
17. Galat A, Goldberg IH (1990), “Molecular models of neocarzinostatin damage of DNA: analysis of sequence dependence in 5'GAGCG:5'CGCTC”, *Nucleic Acids Res*; **18(8)**: pp. 2093-9.
18. George P.R (2008), *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 3rd edition, Springer.

19. Gewirtz D.A. (1999), "A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochem Pharmacol*, **57**, pp. 727 – 741.
20. Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski, M. (1988), *Actinomycetes in biotechnology*, Academic Press, London, pp.1-32.
21. Gregory, P.R., Daniel, R.M., John, F.K., Stephen, W.M., William, C.R., Wyle, S., Nada, Z. (1994) "Synthesis and biological activity of modified enediyne chemotypes", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **4**, pp.711-714.
22. Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., Hutchinson, C. R (1994), "Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase", *Gene*, **151 (1-2)**, pp. 1-10.
23. Hang, V.T.T., Kim, T.S., Oh T.J., Sohng, J.K (2011) "Influence of apoproteins for enediyne production", *Biotechnology and Bioprocess engineering*, **16**, pp. 462-469.
24. Hang, V.T.T., Oh T.J., Yamaguchi, T., Sohng, J.K (2010) "In vivo characterization of NcsB3 to establish the complete biosynthesis of the naphthoic acid moiety of the neocarzinostatin chromophore", *FEMS Microbiol Lett*, pp. 1–7.
25. Hensens, O.D., Giner, J.L., Goldberg, I.H. (1989) "Biosynthesis of NCS Chrom A, the chromophore of the antitumor antibiotic neocarzinostatin" *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, pp. 3295–3299.
26. Hozzein W.N., Li W.J., Ali M.I.A., Hammouda O., Mousa A.S., Xu L.H., Jiang C.L. (2004), "*Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, **54**, pp. 247-252.
27. Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, Ohta, T., Omura, S. (1999), "Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*", *PROC. NATL. ACAD. SCI*, **96(17)**, pp. 9509-9514.

28. Ishida, N.; Miyazaki, K.; Kumagai, M.; Rikimaru, M (1965), “Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight”, *J. Antibiot.*, **18**, pp. 68-76.
29. Kappen L.S., Goldberg, I.H (1985), “Activation of neocarzinostatin chromophore and formation of nascent DNA damage do not require molecular oxygen”, *Nucleic Acids Res*, **13**, pp. 1637 –1648.
30. Kappen, L.S., M.A. Napier, I.H. Goldberg (1980), “Roles of chromophore and apo-protein in neocarzinostatin action”, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **77**: pp. 1970–1974.
31. Kennedy, DR., Ju, J., Shen, B., Beerman, T.A (2007), “Designer enediynes generate DNA breaks, interstrand cross-links, or both, with concomitant changes in the regulation of DNA damage responses”, *Proc. Natl. Acad. Sci* **104(45)**: pp. 17632-7.
32. Kieser, T., Bibb, MJ., Buttner M.J., and Hopwood, DA (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich.
33. Kitamura, K., Miyagaki, T., Yamaoka, N., Tsurumi, H., Noguchi, A *et al* (1993), “The role of monoclonal antibody A7 as a drug modifier in cancer therapy”, *Cancer Immunol Immunother*; **36(3)**: pp. 177-84.
34. Lamb, D.C., Ikeda, H., Nelson, D. R., Ishikawa, J., Skaung, T., Jackson, C (2003), “Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, *Biochem Biophys Res Commun*, **307(3)**: pp. 610-9.
35. Lepiniec, M.V., Magali, N., Elisabeth, A., Philippe, M., Michel, D. (2002) “Key interactions in neocarzinostatin, a protein of the immunoglobulin fold family”, *Protein Engineering.*, **15**, pp. 861–869.
36. Liu, W., Nonaka, K., Nie, L., Zhang, J., Ben Shen *et al* (2005), “The neocarzinostatin biosynthetic gen cluster from *Streptomyces carzinostaticus*

ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases”. *Chem. Biol*, 12, pp. 293-302.

37. Luo, Y., Lin, Zhang, S.J., Cooke, H., Bruner, S., and Shen, B (2008), “Regiospecific *O*-methylation of naphthoic acids catalyzed by NcsB1, an *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic neocarzinostatin”, *JBC paper*, 283(21), pp. 14694-702.

38. Maeda, H. (2001) “SMANCS and polymer- conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy”, *Adv. Drug. Delivery. Rev.*, 46, pp. 169- 185.

39. Mandel M, Hinga (1970) “Calcium-dependent bacteriophage DNA infection”, *J Mol Biol*, 53(1): pp. 159-62.

40. Maxam A.M and Gilbert W (1977), “A new method for sequencing DNA”. *PROC. NATL. ACAD. SCI*, **74**: pp. 560–564.

41. Mingot, J.M., Penavalva, M.A., Fernandez, J.M. (1999) “Disruption of *phacA*, an *aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction”, *J. Bio. Chem.*, **274**, pp. 14545–14550.

42. Nduka O. (2007), *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Science, Enfield, USA, pp. 429 – 453.

43. Omura, S., Waterman, M.R., Kelly, S. L. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, pp. 610-619.

44. Povirk, L.F., Goldberg, I.H. (1980) “Binding of the nonprotein chromophore of neocarzinostatin to deoxyribonucleic acid”, *Biochemistry*, 19, pp. 4773- 4780.

45. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T (1989), *Molecular cloning - a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

46. Sanger, F.; Coulson, A.R (1975), "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase", *Journal of Molecular Biology* **94** (3): pp. 441–448.
47. Shen, B., Liu, W., and Nonaka, K (2003), "Enediyne natural products: biosynthesis and prospects towards engineering novel antitumor agents", *Curr. Med. Chem.*, **10**, pp. 2317-2325.
48. Smith, A.L., Nicolaou, K.C (1996), "Enediyne antibiotics", *J. Med. Chem.*, **39**, pp. 2103-2117.
49. Sthapit, B., Oh, T.J., Lamichhane, R., Liou, K., and Sohng, J.K (2004), "Neocarzinostatin naphthoate synthase: An unique iterative type I PKS from neocarzinostatin producer *Streptomyces carzinostaticus*", *FEBS Lett*, **566**, pp. 201-206.
50. Thorson J.S., Shen, B., Whitwam, R.E., Liu, W., Li, Y., Ahlert, J. (1999) "Enediyne biosynthesis and self- resistance: A progress report". *Bioorganic Chemistry*, **27**, pp. 172- 188.
51. Urbaniak, M. D., Bingham, J. P., Hartley, J. A., Woolfson, D. N., and Caddick, S. (2004), "Design and synthesis of a nitrogen mustard derivative stabilized by apo-neocarzinostatin" *J. Med.Chem*, **47**, pp. 4710-4715.
52. Urbaniak, M. D., Muskett, F. W., Finucane, M. D., Caddick, S., and Woolfson, D. N (2002), "Solution structure of a novel chromoprotein derived from apo-neocarzinostatin and a synthetic chromophore", *Biochemistry*, **41(39)**, pp. 11731-11739.
53. Zhen, Y.S, Ming, X.Y., Yu, B., Otani, T., Saito, H., Yamada, Y. (1989) "A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027. Antitumor activity", *J. Antibiot.*, **42**, pp.1294-1298.