

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
-----o0o-----

Ngô Thị Trang

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH VI KHUẨN LAM TẠI
MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG Ở VIỆT NAM VÀ ĐÁNH GIÁ
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG TIỀM NĂNG**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9420101.16

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

Luận án được hoàn thành tại:

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Nguyễn Đình Thắng
2. TS. Phạm Thị Lương Hằng

Phản biện: GS.TS. Bùi Thanh Tùng

Phản biện: PGS. TS. Trương Quốc Phong

Phản biện: PGS. TS. Hoàng Văn Tổng

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp ĐHQG chấm luận án tiến sĩ
hợp tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN
vào hồi:, ngày tháng năm 2026

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thư viện - Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

I. Bài báo đăng trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục ISI/SCOPUS: 03

1. Pham, H. T.L., **Ngo, T.T.**, Tran, T. V., Duong, T. A., Tran, L. D., Tran, A. T.T., Nguyen, V.T.H. & Nguyen, S. V. (2025) “Classification of Nostoc-like Morphology Cyanobacteria Isolated from Paddy Soil into *Aliinostoc*, *Aulosira* and *Desmonostoc*”. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1581725. doi: 10.3389/fmicb.2025.1581725 (Tạp chí Q1; impact factor: 4,5)
2. **Trang, N. T.**, Bich-Loan, N. T., Kien, K. T., Thanh, N. L., Luong Hang, P. T., & Dinh Thang, N. (2025) Extract of *Scytonema bilaspurens* NK13 strongly exhibits anticancer activities on cervical cancer HeLa cells. *Applied Phycology*, 6 (1), 210-222. (Tạp chí Q2, impact factor: 3,0)
3. **Ngo, T. T.**, Nguyen, B. L. T., Duong, T. A., Nguyen, T. H. T., Nguyen, T. L., Kieu, K. T., Do, M.H.T., Nguyen, S.V., Nguyen, T.D. & Pham, H. L.T. (2022) Polyphasic evaluation and cytotoxic investigation of isolated cyanobacteria with an emphasis on potent activities of a *Scytonema* strain. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1025755. (Tạp chí Q1, impact factor: 6,0)

II. Bằng độc quyền sáng chế: 01

1. Phạm Thị Lương Hằng, **Ngô Thị Trang**, Nguyễn Thị Bích Loan, Nguyễn Đình Thắng (2023) “Chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư, kích hoạt sự chết của tế bào ung thư theo chương trình và kháng khuẩn”. Bằng độc quyền sáng chế, số 37732, Cục Sở hữu Trí tuệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, quyết định số 89837/QĐ-SHTT ngày 30/10/2023.

III. Báo cáo trình bày tại hội nghị quốc tế: 01

1. **Trang T. Ngo**, Hang T. L. Pham, Tuan A. Duong, Thu-Huyen T. Nguyen, Thang V. Tran, Thanh L. Nguyen, Lien T. Nguyen (2022) “Classification of cyanobacteria isolated in Hanoi based on polyphasic approach”. Presentation at 22nd Symposium of the International Association of Cyanophyte/Cyanobacteria Research, 14th - 18th August 2022, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

IV. Báo cáo đăng trong kỷ yếu hội nghị trong nước: 01

1. **Ngô Thị Trang**, Nguyễn Thị Thu Hà, Bùi Lê Đăng Minh, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trần Thị Thùy Anh, Phạm Thị Lương Hằng (2022) “Định danh và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của hai chủng vi khuẩn lam DL1 và DL12.” tr. 467- 473 in: Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2022, Đại học Tây Nguyên, Đak Lak, 4/11/2022, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 1390tr.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Vi khuẩn lam thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm có khả năng quang tự dưỡng, đã xuất hiện trên trái đất từ 3,8 tỉ năm trước. Chúng đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái tự nhiên nhờ khả năng quang hợp tạo oxy, cố định nitơ và sinh tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như khả năng gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống oxy hóa, ... Trong những năm gần đây, vi khuẩn lam trở thành đối tượng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sinh học, dược học, nông nghiệp bền vững và nhiên liệu sinh học.

Mặc dù vậy, một trong những thách thức lớn trong nghiên cứu vi khuẩn lam hiện nay là hạn chế trong việc xác định danh pháp khoa học của chúng. Các phương pháp phân loại truyền thống dựa vào đặc điểm hình thái thường thiếu tính chính xác do hình thái của vi khuẩn lam dễ bị thay đổi dưới tác động của môi trường và các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Sự phát triển của sinh học phân tử hiện đại đã mở ra hướng tiếp cận mới giải quyết những hạn chế này. Phương pháp tiếp cận đa chiều (polyphasic approach) là phương pháp kết hợp dữ liệu hình thái, sinh thái và các chỉ thị phân tử (trình tự gen 16S rRNA, vùng ITS, các marker phân tử). Phương pháp này đã được chứng minh là công cụ hiệu quả và cần thiết trong phân loại vi khuẩn lam một cách chính xác và xác định được mối quan hệ tiến hóa giữa các đơn vị phân loại (taxon).

Việt Nam là quốc gia có nền nông nghiệp trồng lúa nước lâu đời với diện tích đất trồng lúa chiếm khoảng 22% diện tích cả nước tạo sinh cảnh thuận lợi cho sự phát triển của các loài vi khuẩn lam đặc biệt là vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm. Nhiều nghiên cứu trong nước thấy sự đa dạng của các loài vi khuẩn lam phân lập từ đất ruộng lúa. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu dừng lại ở mức mô tả hình thái mà ít đi sâu về định danh dựa trên phương pháp tiếp cận đa chiều. Mặt khác, giá trị về nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học do các chủng vi khuẩn lam bản địa sinh tổng hợp vẫn chưa được khai thác đầy đủ như tiềm năng của chúng. Điều này dẫn đến nguy cơ bỏ sót nhiều nguồn tài nguyên vi sinh vật quý giá có thể phục vụ trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, chế phẩm sinh học và giải pháp bền vững cho nông nghiệp và đặc biệt là ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển thuốc mới trong lĩnh vực y - dược.

Chính vì vậy, nghiên cứu sinh đã thực hiện đề tài **“Nghiên cứu định danh vi khuẩn lam phân lập tại một số địa phương ở Việt Nam và đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng tiềm năng”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

✓ Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam tại một số địa phương ở Việt Nam.

✓ Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư của một số chủng vi khuẩn lam tiềm năng.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu tập trung vào việc định danh các chủng vi khuẩn lam dạng sợi phân lập từ mẫu đất ở các tỉnh/ thành phố Hà Nội, Hưng Yên, Thanh Hóa, Huế và Đắk Lắk dựa vào phương pháp tiếp cận đa chiều; đồng thời, đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn và hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết từ các chủng vi khuẩn lam đã phân lập để lựa chọn chủng tiềm năng phục vụ định hướng nghiên cứu và phát triển thuốc.

4. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam tại một số tỉnh/ thành phố ở Việt Nam.

Nội dung 2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn và hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết tổng số từ các chủng vi khuẩn lam đã phân lập.

Nội dung 3. Đánh giá cơ chế tác động của cao chiết của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 lên tế bào HeLa.

Nội dung 4. Phân tách và xác định thành phần hoạt chất ức chế tế bào HeLa trong cao chiết của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

* Ý nghĩa khoa học:

- Luận án cung cấp bằng chứng về tính đa dạng của vi khuẩn lam tại Việt Nam thông qua việc phân lập, định danh các chủng bằng phương pháp tiếp cận đa chiều; bổ sung nguồn dữ liệu quan trọng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn lam vào ngân hàng gen thế giới (GenBank) làm các trình tự tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo về vi khuẩn lam;

- Đồng thời luận án còn cung cấp dữ liệu mới về cơ chế tác động của cao chiết từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 trong tác động ức chế tế bào ung thư HeLa.

* Ý nghĩa thực tiễn: Nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng vi khuẩn lam bản địa trong phát triển dược liệu tự nhiên, đặc biệt là các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư, phục vụ nghiên cứu và sản xuất thuốc có nguồn gốc tự nhiên.

6. Những đóng góp mới của luận án

✓ Kết quả của luận án đã cung cấp cơ sở dữ liệu phân loại đến cấp độ loài của 34/50 chủng vi khuẩn lam ở Việt Nam theo phương pháp phân loại học hiện đại. Đồng thời, luận án đã phát hiện 16/50 chủng vi khuẩn lam chưa được đề xuất đến tên loài trong hệ thống phân loại của vi khuẩn lam. Kết quả này góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu mới về nguồn tài nguyên vi sinh vật bản địa ở Việt Nam và cập nhật trình tự đoạn gen 16S rRNA trong ngân hàng gen thế giới (GenBank).

- ✓ Kết quả của luận án đã chỉ ra hai chủng vi khuẩn lam có hoạt tính sinh học mạnh, trong đó chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 ức chế vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 14579 với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm và chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 thể hiện độc tính cao trên tế bào ung thư HeLa với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bên cạnh đó, phân đoạn F6 được phân tách từ dịch chiết tổng số của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 có khả năng ức chế tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ung thư có nguồn gốc từ vi khuẩn lam bản địa của Việt Nam.
- ✓ Kết quả của luận án đã làm sáng tỏ cơ chế gây chết của cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurense* NK13 lên dòng tế bào ung thư HeLa thông qua kích hoạt con đường apoptosis, làm dừng chu trình tế bào và ức chế khả năng di cư của tế bào HeLa. Đây là lần đầu tiên các hợp chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư của chi *Scytonema* được nghiên cứu tương đối đầy đủ về cơ chế tác động.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu chung về vi khuẩn lam

1.1.1. Đặc điểm cấu tạo tế bào

Vi khuẩn lam (VKL) là nhóm vi sinh vật nhân sơ xuất hiện từ 3,5 - 3,8 tỷ năm trước, có khả năng quang tự dưỡng. Tế bào của VKL có cấu trúc điển hình của sinh vật nhân sơ với đặc điểm không màng nhân, DNA không gắn histone, màng thylakoid chứa sắc tố quang hợp, ribosome 70S và thiếu một số bào quan như ti thể, thể golgi, mạng lưới nội chất. Thành tế bào VKL có cấu tạo tương tự thành tế bào vi khuẩn Gram âm nhưng lớp peptidoglycan dày hơn. Tế bào VKL gồm có ba loại là tế bào sinh dưỡng (vegetative), tế bào dị hình (heterocyst) và tế bào nghỉ (akinetete).

1.1.2. Đặc điểm hình thái và sự phân bố

VKL có hình thái đa dạng từ dạng đơn bào, tập đoàn và dạng sợi đa bào. Chúng được phân bố rộng rãi ở tất cả các môi trường được chiếu ánh sáng trên trái đất.

Chính sự đa dạng về hình thái đã góp phần giúp VKL thích nghi với nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Chúng được tìm thấy ở hầu hết các môi trường được chiếu sáng trên trái đất từ các thủy vực nước ngọt, nước mặn, nước lợ đến đất liền thậm chí ở cả những nơi có điều kiện vô cùng khắc nghiệt như sa mạc khô nóng, vùng cực lạnh hay suối nước nóng tới 72°C.

1.2. Phân loại vi khuẩn lam bằng phương pháp tiếp cận đa chiều

Vi khuẩn lam là nhóm vi sinh vật cổ có khả năng quang hợp, mang đặc điểm của cả sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn, khiến việc phân loại trở nên phức tạp. Các phương pháp truyền thống dựa vào hình thái thường thiếu

chính xác. Để khắc phục, Hoffman và cộng sự (2005) đề xuất phương pháp tiếp cận đa chiều, kết hợp dữ liệu hình thái, sinh thái và phân tử. Hiện nay, phương pháp tiếp cận đa chiều đã được các nhà phân loại học trên thế giới chấp nhận rộng rãi. Năm 2023, Strunecký và cộng sự đã xây dựng một hệ thống phân loại VKL chi tiết đến cấp độ chi. Theo hệ thống phân loại được đề xuất bởi Strunecký và cộng sự bao gồm 20 bộ và 65 họ.

1.2.1. Phân loại dựa vào đặc điểm hình thái và siêu cấu trúc tế bào

1.2.2. Phân loại dựa vào đặc điểm sinh thái

1.2.3. Phân loại dựa vào trình tự gen

1.2.4. Phân loại dựa vào mối quan hệ phát sinh chủng - loại

1.3. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi khuẩn lam

Đến năm 2019, hơn 1.630 hợp chất thứ cấp đã được phân lập từ vi khuẩn lam, thuộc 260 họ hợp chất và thể hiện 14 loại hoạt tính sinh học, nổi bật là hoạt tính gây độc tế bào (cytotoxicity), gây chết (lethality activity) và kháng khuẩn (antibacterial activity). Đến năm 2024, số hợp chất phát hiện từ VKL ghi nhận được đã tăng lên gần 3.200 hợp chất. Nhiều hợp chất đã được phát triển thành thuốc điều trị ung thư, kháng virus và kháng sinh thế hệ mới, cho thấy tiềm năng của vi khuẩn lam trong lĩnh vực dược phẩm.

1.4. Ứng dụng của vi khuẩn lam trong lĩnh vực dược phẩm

Vi khuẩn lam có nhiều ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường, cung cấp nguồn dinh dưỡng và phân bón cho cây trồng, năng lượng sinh học, nhờ khả năng thích nghi, sinh trưởng nhanh và nuôi cấy đơn giản. Bên cạnh đó, chúng còn là nguồn tổng hợp nhiều hợp chất sinh học quý, tiềm năng cung cấp nguồn nguyên liệu cho ngành công nghệ dược, mỹ phẩm.

1.5. Các nghiên cứu về vi khuẩn lam ở Việt Nam

1.5.1. Các nghiên cứu về đa dạng vi khuẩn lam

Các nghiên cứu phân loại VKL tại Việt Nam bắt đầu từ thập niên 1960. Hệ thống phân loại VKL đầu tiên được đề xuất bởi Dương Đức Tiến và cộng sự (1996) đã ghi nhận 262 loài và dưới loài thuộc 61 chi từ môi trường đất ruộng lúa và nước ngọt. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu phân loại dựa vào đặc điểm hình thái. Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học đã áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại trong phân loại VKL ở Việt Nam, giúp phân loại chính xác và phát hiện nhiều loài mới, tiêu biểu như định danh loài mới *Aliinostoc vietnamicum* phân lập từ đất rừng ở Vườn Quốc gia Cát Tiên.

1.5.2. Các nghiên cứu về hoạt chất sinh học từ vi khuẩn lam

Bên cạnh đó, VKL còn được các nhà khoa học quan tâm nhiều nhờ tiềm năng ứng dụng trong xử lý nước thải, cải tạo đất nông nghiệp hay sản xuất các hợp chất sinh học giá trị cao, bao gồm khả năng kháng khuẩn, kháng nấm và chống ung thư.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bốn mươi bảy chủng vi khuẩn lam được phân lập từ đất ruộng lúa, đất ven sông ở Hà Nội (kinh độ 21°00'N - 21°14'N, vĩ độ 105°37'E - 105°51'E), Thanh Hóa (kinh độ 19°43'N - 20°27'N, vĩ độ 105°12'E - 105°50'E) và Hưng Yên (20°20'N kinh độ và 106°15'E).

Bên cạnh đó, ba chủng DL1, DL12 và PM3 đã có trong bộ sưu tập chủng giống VKL của nhóm nghiên cứu. Chủng DL1, DL12 được phân lập bởi Võ Hành và cộng sự (2006) từ mẫu đất trồng lúa và đất trồng bông tỉnh Đắk Lắk [7]; chủng PM3 được phân lập từ đất ruộng lúa huyện Phú Vang, TP. Huế bởi PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

2.1.2. Chủng vi khuẩn kiểm định

Bốn chủng vi khuẩn thử nghiệm dùng trong nghiên cứu gồm: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

2.1.3. Dòng tế bào

Năm dòng tế bào HeLa ATCC CCL-2 (ung thư cổ tử cung), A549 CCL-185 (ung thư phổi), OVCAR-8 ATCC CVCL-1629 (ung thư vú), HaCaT ATCC CVCL-0038 (tế bào tạo sừng da người), HEK293 ATCC CRL-1573 (Tế bào thận phôi người) được cung cấp bởi PTN nuôi cấy Tế bào động vật (Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học). Các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoặc RPMI 1640 bổ sung 10% huyết thanh thai bò, 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin trong tủ nuôi cấy tế bào duy trì ở 37°C và 5% CO₂.

2.2. Hóa chất, thiết bị

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Các phương pháp phân lập và phân loại vi khuẩn lam

2.3.1.1. Phương pháp thu mẫu vi khuẩn lam

2.3.1.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn lam

2.3.1.3. Quan sát và phân tích hình thái

2.3.1.4. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

2.3.1.5. Xây dựng cây phát sinh chủng - loại

2.3.2. Các phương pháp nuôi sinh khối và thu cao chiết tổng số

2.3.2.1. Nuôi và thu sinh khối vi khuẩn lam

2.3.2.2. Tách chiết và thu cao chiết tổng số

2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính và cơ chế tác động

- 2.3.3.1. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn
- 2.3.3.2. Đánh giá độc tính tế bào
- 2.3.3.3. Xác định tỷ lệ tế bào chết theo con đường apoptosis
- 2.3.3.4. Xác định điểm dừng chu trình tế bào
- 2.3.3.5. Đánh giá khả năng di cư của tế bào ung thư
- 2.3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện của các gen
- 2.3.4. Các phương pháp phân tách và xác định thành phần hoạt chất
 - 2.3.4.1. Chiết phân lớp lỏng - lỏng
 - 2.3.4.2. Phân tách các chất bằng sắc ký cột
 - 2.3.4.3. Sắc ký mỏng (TLC)
 - 2.3.4.4. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)
 - 2.3.4.5. Phân tích thành phần hoạt chất bằng LC-HRMS

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam

3.1.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn lam

Đề tài đã phân lập được 47 chủng vi khuẩn lam thuần khiết từ mẫu đất ruộng lúa, đất cát ven sông ở các tỉnh/ thành phố Hà Nội, Hưng Yên, Thanh Hóa. Các chủng này được nuôi giữ trong môi trường BG11 để định danh dựa theo phương pháp tiếp cận đa chiều bằng cách phân tích đặc điểm hình thái trên kính hiển vi quang học và trình tự đoạn gen 16S rRNA.

3.1.2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn lam

Đặc điểm hình thái của 47 chủng VKL đã phân lập và 3 chủng đã có trong bộ sưu tập được đánh giá dựa trên hình dạng, màu sắc chuỗi, kích thước, hình dạng của tế bào sinh dưỡng, tế bào nghỉ và tế bào dị hình dưới kính hiển vi quang học. Kết quả cho thấy hình thái của 50 chủng VKL này được chia thành 3 nhóm khác nhau. Trong đó, nhóm I bao gồm 41 chủng VKL dạng thẳng không phân nhánh; nhóm II gồm có 3 chủng VKL dạng sợi phân nhánh giả và nhóm III bao gồm 6 chủng VKL dạng sợi phân nhánh thật.

3.1.3. Phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lam

3.1.3.1. Khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

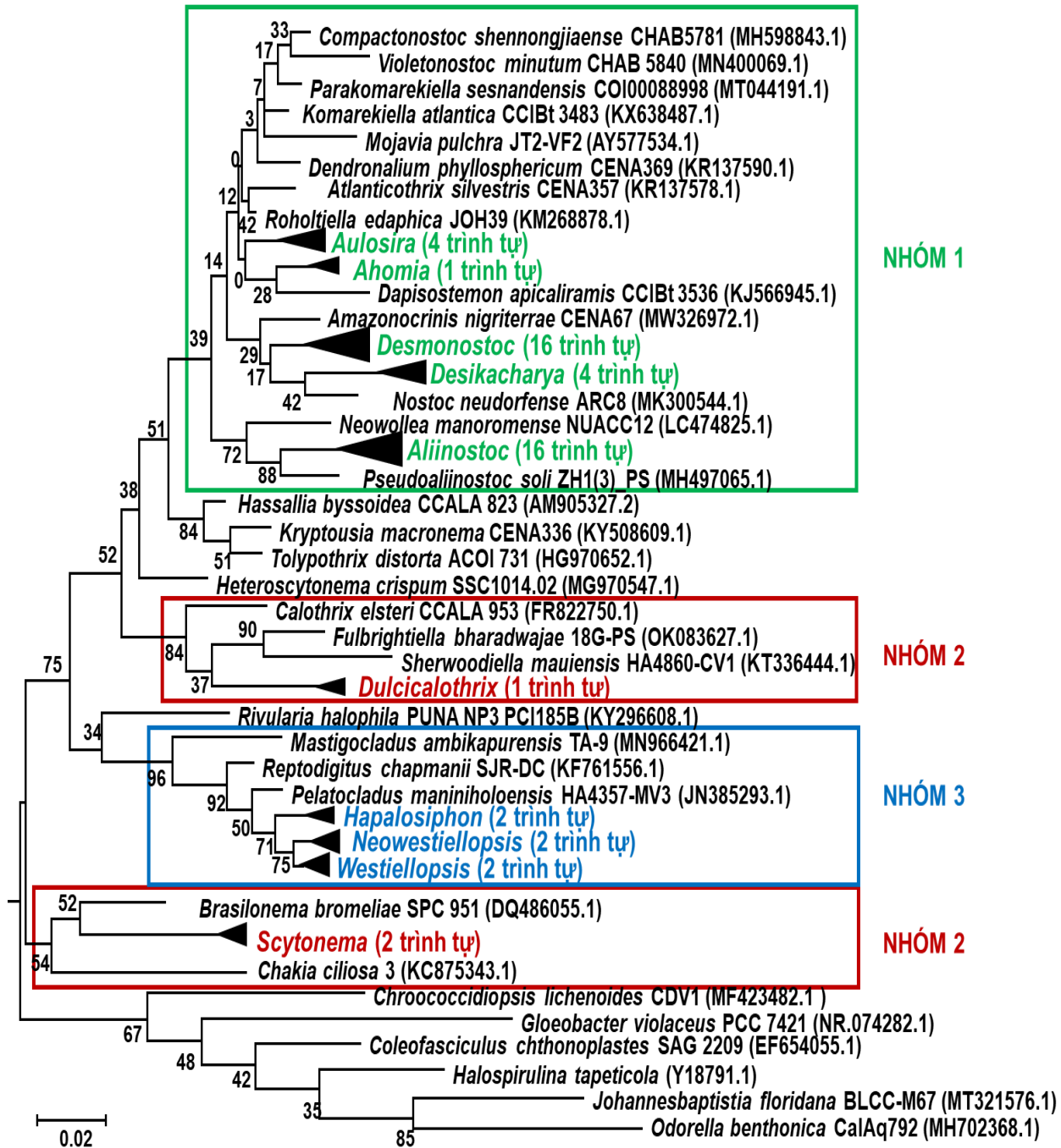
50 chủng VKL được tách chiết DNA tổng số và khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi đặc hiệu 2F/ 6R.

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của 50 chủng VKL trong nghiên cứu cho thấy, đoạn gen 16S rRNA của các chủng thu được đều có kích thước xấp xỉ 1000 bp với băng sáng, nét (Phụ lục 4). Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty First Base (Malaysia). Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của mỗi chủng được trích xuất và phân tích bằng phần mềm SnapGen Viewer cho kích thước khoảng 950 bp (Phụ lục 5).

Kết quả thu được đáp ứng được các tiêu chuẩn cần thiết về kích thước và khối lượng thông tin phù hợp của đoạn gen 16S rRNA để xây dựng cây phát sinh chủng - loại và đánh giá mức độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng VKL trong nghiên cứu so với các chủng tham chiếu trên cơ sở dữ liệu của GenBank.

3.1.3.2. Mối quan hệ tiến hóa của các chủng vi khuẩn lam

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của 50 chủng vi khuẩn lam được căn chỉnh, giống hàng trình tự để đánh giá tỷ lệ phần trăm tương đồng so với nhau.



Hình 3.6. Vị trí 3 nhóm hình thái trên cây phát sinh chủng - loại
 Nhóm I: các chủng vi khuẩn lam dạng không phân nhánh; nhóm II: các chủng VKL dạng phân nhánh giả; nhóm III: các chủng VKL dạng phân nhánh thật

Kết quả về vị trí tiến hóa của các nhóm trên cây phát sinh chủng - loại cho thấy 50 chủng vi khuẩn lam trong nghiên cứu được xếp vào 10 chi, trong đó nhóm I gồm 5 chi là *Aulosira* (4 chủng), *Ahomia* (1 chủng), *Desmonostoc* (16 chủng), *Desikacharya* (4 chủng) và *Aliinostoc* (16 chủng); nhóm II gồm 2 chi là *Dulcicalothrix* (1 chủng), *Scytonema* (2 chủng); nhóm III gồm 3 chi là *Hapalosiphon* (2 chủng), *Neowestiellopsis* (2 chủng), *Westiellopsis* (2 chủng) (Hình 3.6).

Sau khi xác định được vị trí của các nhóm trên cây phát sinh chủng - loại, trình tự đoạn gen 16S rRNA của từng chủng ở mỗi nhóm sẽ được phân tích chi tiết hơn trên các cây phát sinh chủng - loại riêng dựa trên phương pháp Maximun Likelihood với 1000 lần lặp lại để có thể xác định được danh pháp khoa học của từng chủng. Tổng kết lại, 50 chủng VKL trong nghiên cứu được phân loại vào 24 loài thuộc 10 chi. Trong đó có 34 chủng được định danh đến cấp độ loài thuộc 14 loài bao gồm *Aulosira laxa* CAVN2460, *Ahomia soli* CAVN2432, *Desmonostoc lechangense* CAVN5500, *D. meilinense* CAVN6212, *D. linckia* CAVN2522, *D. persicum* CAVN2440, *D. persicum* CAVN2441, *D. persicum* CAVN2442, *D. persicum* CAVN2503, *D. persicum* CAVN8233, *Aliinostoc magnakinetifex* CAVN2402, *A. magnakinetifex* CAVN2437, *A. magnakinetifex* CAVN2438, *A. magnakinetifex* CAVN2489, *A. magnakinetifex* CAVN8241, *A. magnakinetifex* CAVN9301, *A. magnakinetifex* CAVN8232, *A. catenatum* CAVN2434, *A. catenatum* CAVN2435, *A. catenatum* CAVN2436, *A. morphoplasticum* CAVN2501, *A. morphoplasticum* CAVN2502, *A. morphoplasticum* CAVN2512, *A. morphoplasticum* CAVN2439, *A. morphoplasticum* CAVN2463, *Dulcicalothrix necridiiformans* DL12, *Scytonema bilaspureense* DL1, *S. bilaspureense* NK13, *Neowestiellopsis persica* CAVN2505, *N. persica* CAVN4301, *Westiellopsis prolifica* CAVN2443, *W. prolifica* CAVN4303, *Hapalosiphon welwitschii* CAVN2404 và *Hapalosiphon welwitschii* MD2411. Bên cạnh đó, 16 chủng còn lại được xếp vào 10 loài mới, chưa xác định tên loài thuộc 4 chi là *Aulosira*, *Desmonostoc*, *Desikacharya* và *Aliinostoc* do thiếu trình tự tham khảo của các loài chuẩn.

3.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học từ các chủng vi khuẩn lam

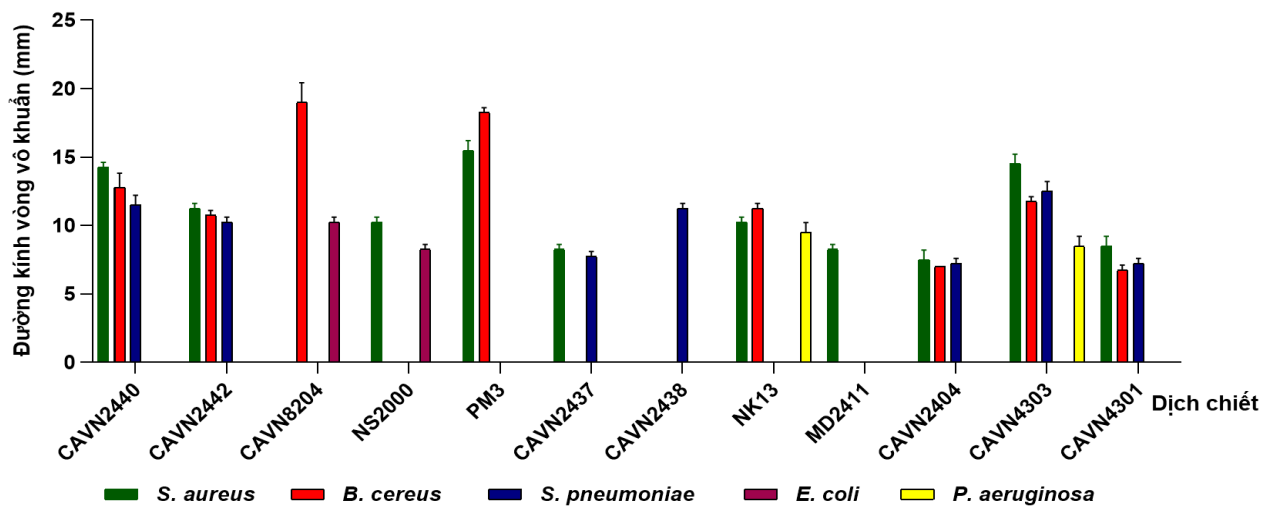
3.2.1. Hàm lượng sinh khối và cao chiết

Kết quả khối lượng sinh khối khô của 50 chủng VKL dao động từ 1.000 mg đến 2.200 mg, trong đó chủng CAVN2512 có sinh khối thấp nhất, còn chủng XN1103 thu được lượng sinh khối nhiều nhất.

3.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết

Cao chiết tổng số từ 50 chủng VKL được đánh giá khả năng ức chế đối với 5 chủng vi khuẩn gây bệnh trên người bao gồm *Bacillus cereus* ATCC

14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch ở hàm lượng 2 mg cao chiết tổng số/ đĩa giấy.



Hình 3.11. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng số từ 12 chủng VKL

Không hoạt tính: $D < 6\text{mm}$; *hoạt tính yếu:* $6\text{mm} \leq D < 10\text{mm}$;

Hoạt tính trung bình: $10\text{mm} \leq D < 15\text{mm}$; *Hoạt tính mạnh:* $D \geq 15\text{mm}$

Kết quả ở biểu đồ hình 3.11 chỉ ra rằng có 12 trong số 50 cao chiết thử nghiệm (tương ứng tỷ lệ 24%) thể hiện khả năng ức chế được ít nhất một chủng vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 6,8 đến 19,0 mm (Hình 3.11).

Trong số 12 cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn, cao chiết từ chủng *Westiellopsis prolifica* CAVN4303 có khả năng ức chế phổ rộng trên 4 chủng vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 8,5 - 14,5 mm. Cao chiết từ các chủng VKL thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn Gram dương mạnh hơn so với vi khuẩn Gram âm. Đáng chú ý là cao chiết từ chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 thể hiện hoạt tính ức chế mạnh nhất vi khuẩn *B. cereus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm.

3.2.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các cao chiết

Kết quả cho thấy trong số cao chiết tổng số từ 50 chủng VKL có 7 cao chiết thể hiện hoạt tính gây độc lên tế bào HeLa. Kết quả cho thấy có 7 cao chiết thể hiện hoạt tính gây độc lên tế bào HeLa, trong đó có 4 cao chiết tiềm năng là CAVN8204, NK13, CAVN4301, CAVN4303; 1 cao chiết ít tiềm năng (MD2411); 2 cao chiết không gây chết đáng kể tế bào HeLa (CAVN2440 và NS2000) và 43 cao chiết còn lại không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào HeLa ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3.6). Sau đó, các cao chiết tiềm năng và ít tiềm năng được lựa chọn để đánh giá độc tính trên tế bào HeLa bằng thử nghiệm MTT và xác định giá trị IC_{50} của cao chiết.

Bảng 3.6. Khả năng gây độc của cao chiết từ 7 chủng VKL lên tế bào HeLa

STT	Cao chiết	Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/ml}$)				Đánh giá
		1	10	50	100	
1.	NK13	++	+++	+++	+++	Tiềm năng
2.	CAVN4301	n/a	+	+++	+++	Tiềm năng
3.	CAVN4303	n/a	+	+++	+++	Tiềm năng
4.	CAVN8204	n/a	+	+++	+++	Tiềm năng
5.	MD2411	n/a	n/a	+	++	Ít tiềm năng
6.	CAVN2440	n/a	n/a	n/a	+	Không tiềm năng
7.	NS2000	n/a	n/a	n/a	+	Không tiềm năng

n/a: không tác động; +: < gây chết 10% tổng tế bào; ++: gây chết 10 - 60% tổng số tế bào; +++: gây chết > 60% tổng số tế bào

Cao chiết tổng số từ 5 chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204, *N. persica* CAVN4301, *W. prolifica* CAVN4303, *H. welwitschii* MD2411, *S. bilaspurensis* NK13 và Taxol (đôi chứng dương) được pha loãng ở các dải nồng độ thích hợp để đánh giá độc tính trên tế bào HeLa bằng phương pháp MTT. Kết quả cho thấy, cả 5 cao chiết đều gây độc cho tế bào HeLa với giá trị IC_{50} dao động từ 3,8 $\mu\text{g/ml}$ đến 91,1 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Giá trị IC_{50} của cao chiết từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa

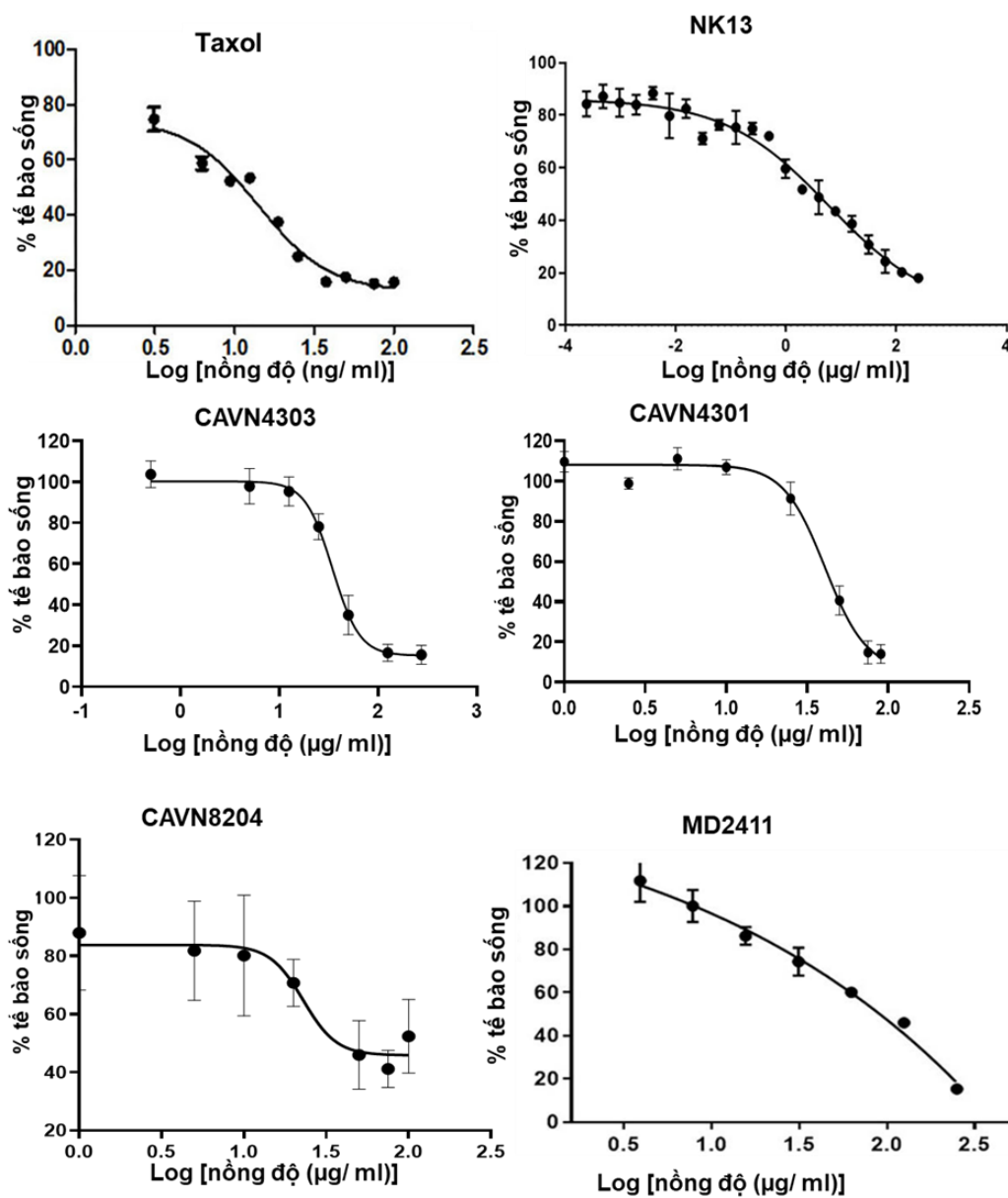
STT	Cao chiết	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Phân loại GSH
1.	Taxol	0,012 (14,05 nM)	Cat. 1
2.	NK13	3,8 \pm 0,7	Cat. 1
3.	CAVN4303	34,5 \pm 1,5	Cat. 2
4.	CAVN4301	40,7 \pm 1,4	Cat. 2
5.	CAVN8204	67,9 \pm 5,5	Cat. 3
6.	MD2411	91,1 \pm 5,7	Cat. 3

Cat. 1: $IC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$; *Cat. 2*: $5 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$;

Cat. 3: $50 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 300 \mu\text{g/ml}$

Theo hướng dẫn phân loại cấp độ gây độc của hợp chất của Hệ thống hài hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất (GHS) của Liên hiệp quốc thấy rằng cao chiết tổng số từ hai chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 và *H. welwitschii* MD2411 được xếp vào nhóm độc tính cấp 3 (mức độ gây độc trung bình) với giá trị IC_{50} lần lượt là 67,9 và 91,1 $\mu\text{g/ml}$; cao chiết từ 2 chủng *W. prolifica* CAVN4303, *N. persica* CAVN4301 được xếp vào nhóm độc tính cấp 2 (mức độ gây độc mạnh) với giá trị IC_{50} lần lượt đạt 34,5 và 40,7 $\mu\text{g/ml}$; đặc biệt cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 được xếp vào nhóm độc tính cấp 1 (mức độ gây độc cực mạnh) với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng

3.7). Đồng thời, theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cao chiết tổng số được đánh giá là có hoạt tính mạnh khi giá trị $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$, cho thấy cao chiết từ chủng *S. bilaspurense* NK13 (gọi tắt là cao chiết NK13) thể hiện độc tính tế bào cực mạnh lên tế bào HeLa. Đáng chú ý là biểu đồ đường cong đáp ứng liều của cao chiết từ chủng *S. bilaspurense* NK13 lên tế bào HeLa có xu hướng tương tự như Taxol (Hình 3.12).



Hình 3.12. Độc tính của cao chiết tổng số từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa

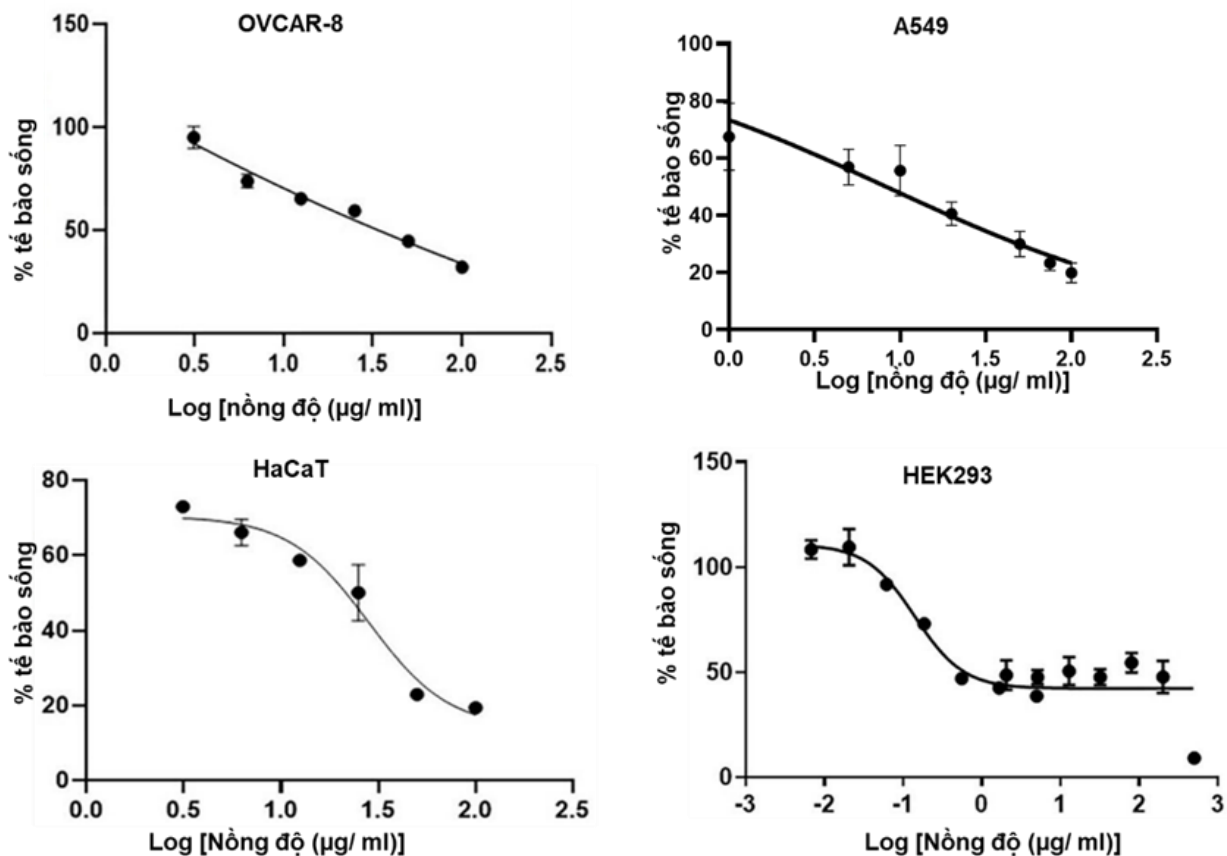
Sau đó, cao chiết NK13 được đánh giá độc tính trên 2 dòng tế bào ung thư OVCAR-8 (ung thư buồng trứng), A549 (ung thư phổi) và hai dòng tế bào thường là HaCaT và HEK293. Kết quả thấy rằng cao chiết NK13 đều gây độc trên cả 4 dòng tế bào ở cấp nguy cơ cấp 1 và nhóm nguy cơ cấp 2 theo thang phân loại của GHS với giá trị IC_{50} từ 0,6 đến 34,2 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3.8, Hình 3.13).

Bảng 3.8. Giá trị IC_{50} của cao chiết từ *S. bilaspurense* NK13 lên 5 dòng tế bào

Dòng tế bào	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Phân loại GSH
HeLa	$3,8 \pm 0,7$	Cat. 1
HEK293	$0,6 \pm 0,5$	Cat. 1
A549	$8,3 \pm 0,9$	Cat. 2
HaCaT	$21,6 \pm 3,2$	Cat. 2
OVCAR-8	$34,2 \pm 2,7$	Cat. 2

Cat. 1: $IC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$; Cat. 2: $5 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$;

Cat. 3: $50 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 300 \mu\text{g/ml}$

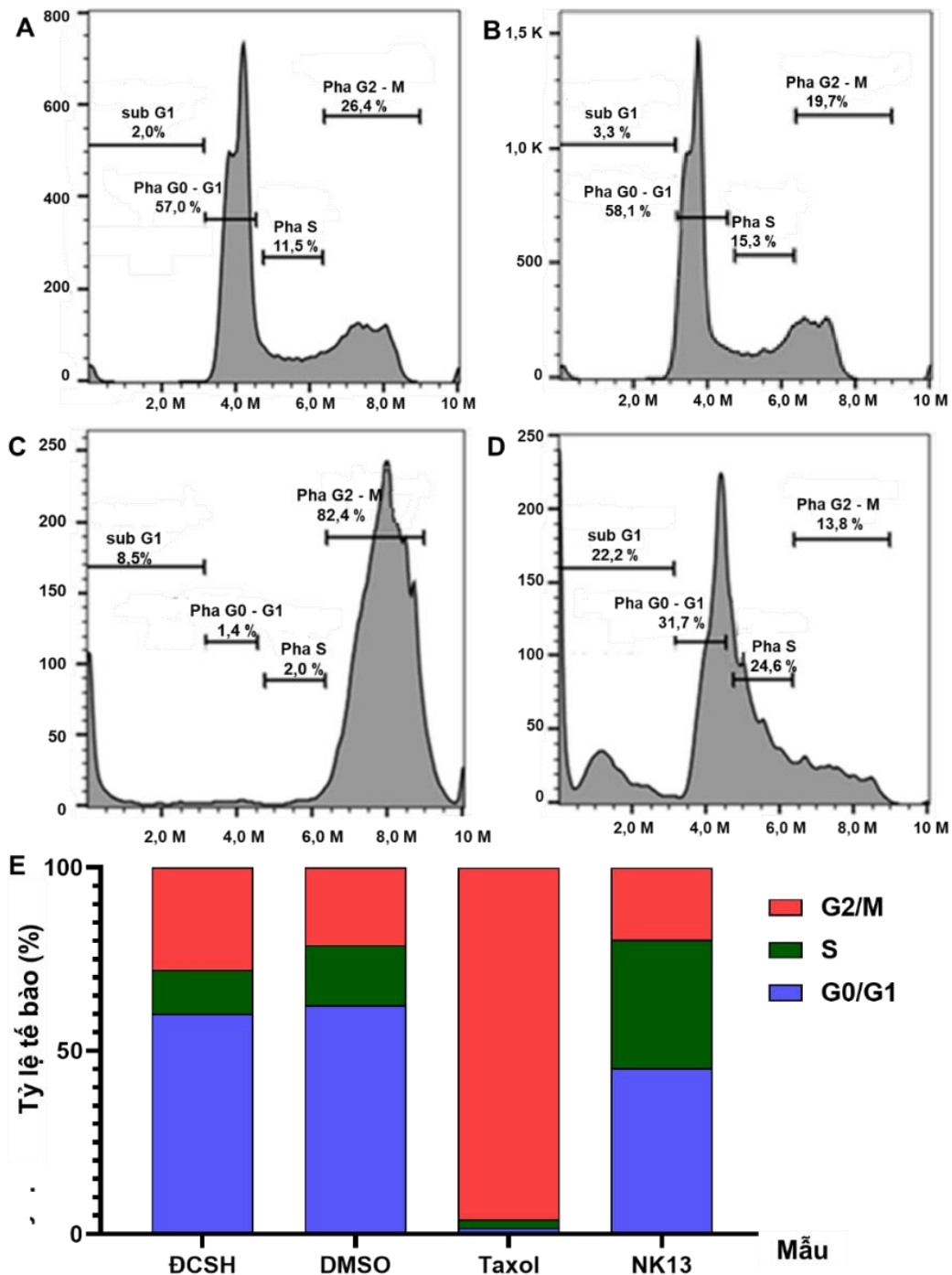


Hình 3.13. Độc tính của cao chiết NK13 lên 4 dòng tế bào

3.3. Cơ chế tác động của cao chiết NK13 lên tế bào HeLa

3.3.1. Tác động lên chu trình tế bào HeLa

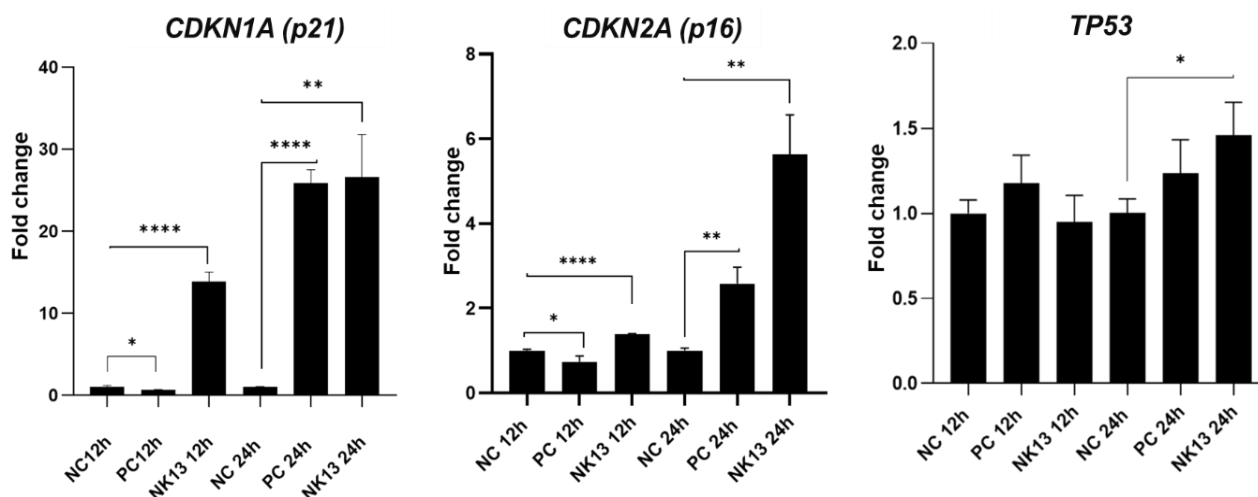
Cao chiết NK13 gây bất giữ chu kỳ tế bào rõ rệt tại pha S với tỷ lệ tế bào bị giữ lại ở pha này sau 48 giờ là 24,8%. Trong khi đó, tỷ lệ tế bào tại pha S ở các nhóm không xử lý (mẫu trắng), xử lý bằng DMSO 0,1% và ủ với Taxol lần lượt là 11,5%, 15,3% và 1,98% (Hình 3.14). Mặc dù sự tăng tỷ lệ tế bào ở giai đoạn sub-G1 không thể được sử dụng trực tiếp làm chỉ thị để xác định tế bào đang chết theo chương trình (apoptosis), nhưng kết quả này gợi ý khả năng quá trình apoptosis đang diễn ra.



Hình 3.14. Tác động của cao chiết NK13 lên chu trình tế bào HeLa
 Tỷ lệ tế bào HeLa trong các pha của chu trình tế bào ở mẫu ĐCSH (A), ủ với DMSO 0,1% (B), ủ với Taxol nồng độ 13,5 ng/ml (C), ủ với cao chiết NK13 ở nồng độ 3,8 µg/ml (D); so sánh tỷ lệ tế bào trong các pha G0/G1, S và G2/M giữa các mẫu (E)

Kết quả phân tích mức độ phiên mã của các gen điều hòa chu trình tế bào thấy rằng mức độ biểu hiện của các gen *CDKN1A* (*p21*) và *CDKN2A* (*p16*) tăng lên đáng kể ở thời điểm 12 giờ và 24 giờ sau khi tế bào ủ với cao chiết NK13 ở nồng độ 3,8 µg/ml tương ứng lần lượt 12 lần và 1,5 lần (tại thời điểm 12 giờ) và 27 lần và 5,7 lần (tại thời điểm 24 giờ) so với mẫu tế bào ủ với

DMSO 0,1% (đối chứng âm - NC). Trong khi đó, mức độ biểu hiện của gen *TP53* không có sự khác biệt ở thời điểm 12 giờ giữa nhóm tế bào xử lý với cao chiết NK13 và tế bào xử lý với DMSO; tuy nhiên, sau 24 giờ, mức độ biểu hiện của gen *TP53* ở mẫu tế bào ủ với cao chiết NK13 tăng 1,4 lần so với mẫu đối chứng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả đánh giá về tỷ lệ tế bào HeLa bị bắt giữ các pha của chu trình tế bào. Qua đó có thể chứng minh cao chiết NK13 có tác động điều hòa chu kỳ tế bào thông qua việc kích hoạt các gen ức chế tăng sinh như gen *CDKN1A* (*p21*) và *CDKN2A* (*p16*) (Hình 3.15). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện của gen *TP53* giữa các thời điểm và giữa các tác nhân xử lý cũng cho thấy khả năng cao chiết NK13 có thể điều hòa chu kỳ tế bào thông qua cơ chế riêng biệt, có thể không hoàn toàn phụ thuộc vào p53 trong giai đoạn đầu (pha S).



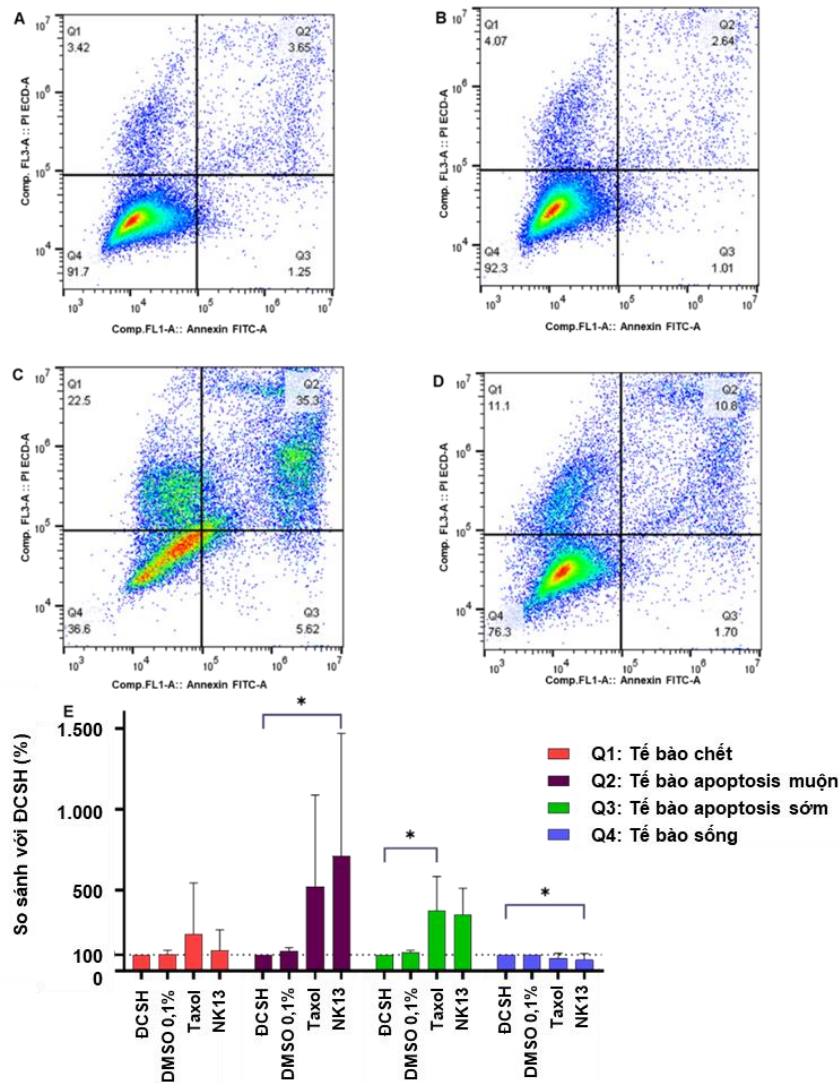
Hình 3.15. Mức độ biểu hiện gen điều hòa chu trình tế bào HeLa

NC: đối chứng âm; PC: Taxol 1,8 ng/ml (Đối chứng dương);

*, **, *** mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$; $0,01$; $0,001$

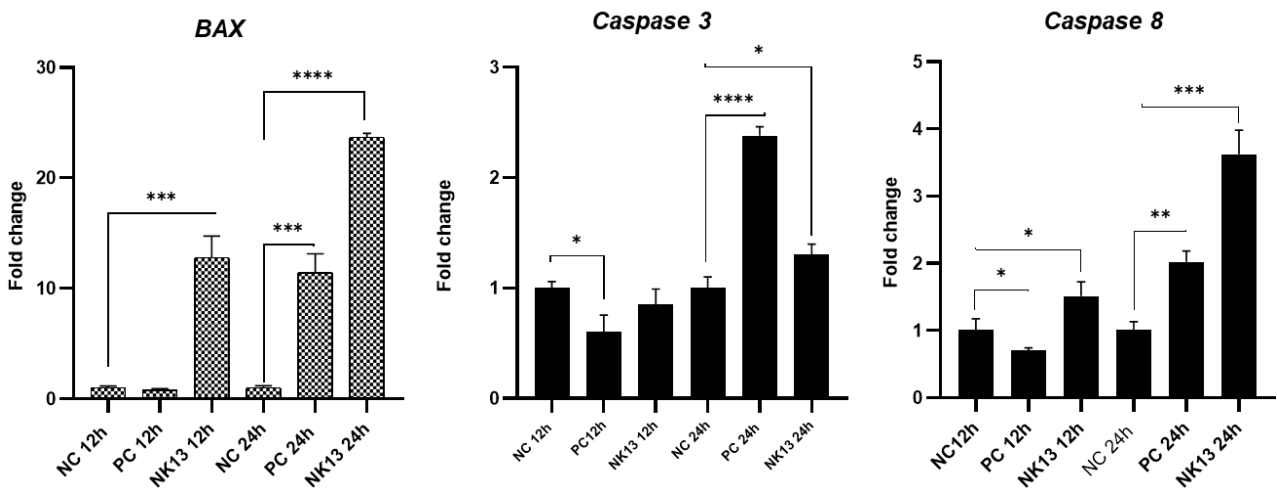
3.3.2. Tác động lên con đường apoptosis của tế bào HeLa

Cao chiết NK13 được đánh giá là có hiệu quả gây nên sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$. Tỷ lệ tế bào bị hoại tử (Q1), tế bào trong pha apoptosis muộn (Q2), apoptosis sớm (Q3) và tế bào sống (Q4) của tế bào HeLa khi được ủ với cao chiết NK13 lần lượt là 11,1%, 10,8%, 1,7% và 76,3%. Cao chiết NK13 thể hiện tác động gây ra sự chết theo chương trình (apoptosis) chủ yếu ở giai đoạn apoptosis muộn (Q2) với tỷ lệ tế bào HeLa chết tăng gấp 3 và 4 lần so với nhóm tế bào không xử lý (đối chứng trắng) và nhóm tế bào ủ DMSO 0,1% (đối chứng âm). Bên cạnh đó, Taxol lại thể hiện tác động gây apoptosis mạnh trên tế bào HeLa ở cả giai đoạn apoptosis sớm và apoptosis muộn đặc biệt, tỷ lệ tế bào ở pha apoptosis muộn cao hơn lần lượt là 3,2; 13,1 và 9,8 lần so với các mẫu tế bào ủ với cao chiết NK13, DMSO 0,1% và không xử lý (Hình 3.16).



Hình 3.16. Tác động của cao chiết NK13 lên con đường apoptosis của tế bào HeLa
*A: Không xử lý; B: tế bào được ủ với DMSO 0,1% (ĐC âm); C: Taxol nồng độ 13,5 ng/ml; D: Cao chiết NK13 nồng độ 3,8 µg/ml; E: So sánh tỷ lệ tế bào chết ở các giai đoạn khi ủ với cao chiết NK13 so với mẫu đối chứng, * mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$*

Mức độ biểu hiện của các gen *BAX*, *CASPASE-3*, *CASPASE-8* điều hòa con đường apoptosis của tế bào HeLa đều tăng khi được ủ với cao chiết NK13 và sự tăng biểu hiện này có xu hướng phụ thuộc vào thời gian ủ mẫu. Tại thời điểm 12 giờ sau khi ủ mẫu, mức phiên mã của các gen *BAX*, *CASPASE-3*, *CASPASE-8* tăng lần lượt 12,5; 0,9; 1,42 và 1,36 lần so với nhóm tế bào xử lý với DMSO 0,1% (đối chứng âm). Đến thời điểm 24 giờ, mức độ phiên mã các gen này tăng lên lần lượt là 23,2; 1,26; 3,75 và 2,68 lần so với mẫu đối chứng; và gấp 1,5 đến gần 2 lần so với thời điểm 12 giờ (Hình 3.16). Đáng chú ý là cao chiết NK13 đã kích hoạt con đường chết theo chu trình của tế bào HeLa chủ yếu thông qua việc kích hoạt gen *BAX* và *CASPASE-8* ở thời điểm 12 giờ (Hình 3.17). Điều đó cho thấy cao chiết NK13 gây ngừng chu kỳ tế bào ở giai đoạn sớm (tại pha S).



Hình 3.17. Mức độ biểu hiện của gen điều hòa con đường apoptosis của tế bào HeLa

NC: đối chứng âm; PC: Taxol 1,8 ng/ml (Đối chứng dương);

*, **, *** mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$; $0,01$; $0,001$

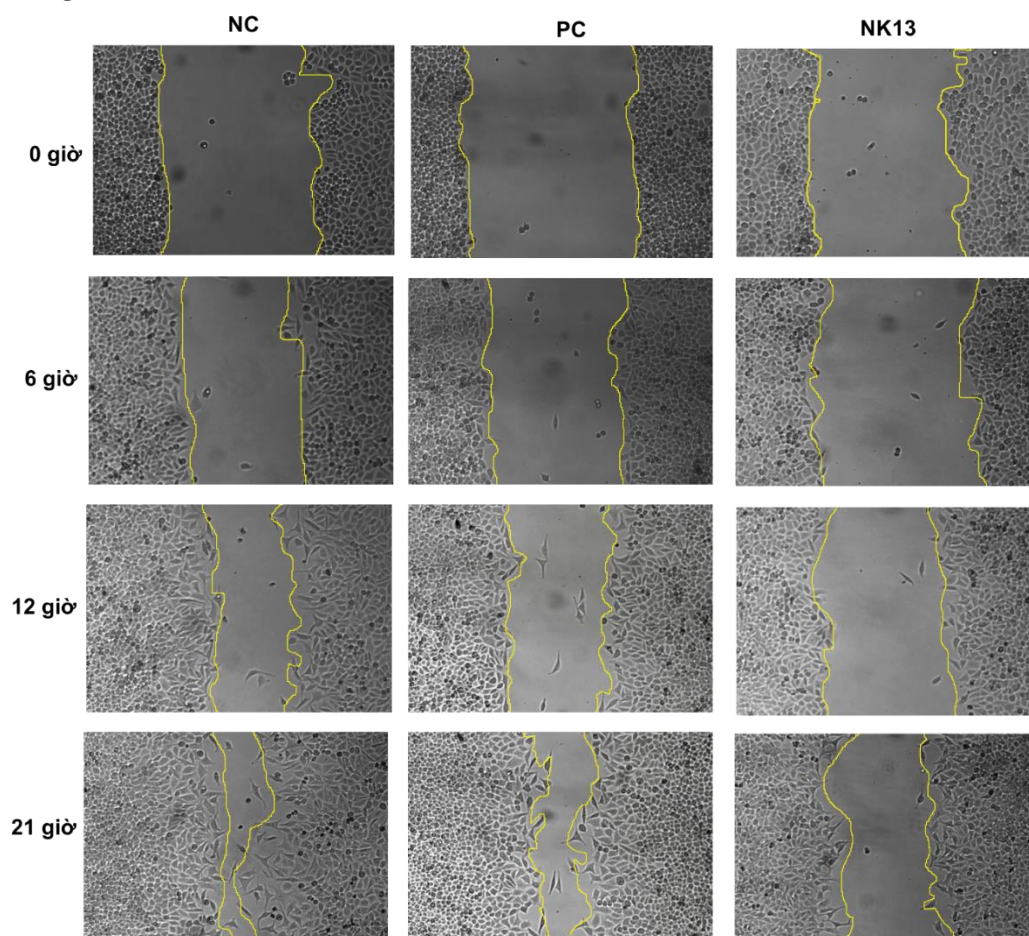
Các kết quả trên cho thấy cao chiết NK13 có khả năng kích hoạt con đường apoptosis của tế bào HeLa theo cả hai cơ chế nội sinh và ngoại sinh, thông qua việc tăng biểu hiện của các gen điều hòa kích hoạt con đường chết theo chương trình của tế bào. Tuy nhiên, cao chiết NK13 cho thấy tác động rõ ràng hơn lên con đường apoptosis nội sinh thể hiện qua sự gia tăng rất mạnh về mức độ phiên mã của gen *BAX* - một gen đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt con đường apoptosis nội sinh của tế bào.

3.3.3. Tác động ức chế khả năng di cư của tế bào HeLa

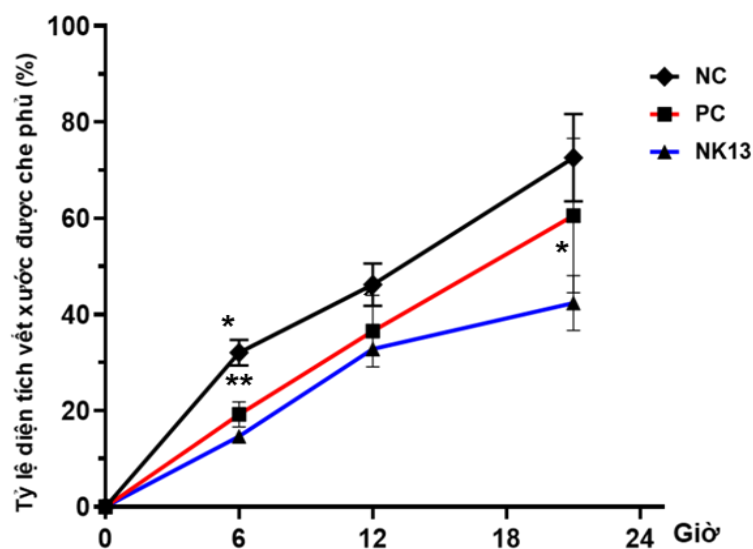
Cao chiết NK13 đã ức chế đáng kể khả năng xâm lấn của tế bào HeLa. Tại thời điểm 6 giờ, 12 giờ và 21 giờ, vùng diện tích vết xước được che phủ bởi tế bào HeLa khi ủ với cao chiết NK13 nhỏ hơn lần lượt 2,1; 1,4 và 1,7 lần so với mẫu đối chứng âm. Đáng chú ý là hiệu quả ức chế sự di cư tế bào của tế bào HeLa khi được ủ với cao chiết NK13 tốt hơn so với mẫu tế bào ủ với Taxol (đối chứng dương - PC) thể hiện ở diện tích tế bào HeLa di cư nhỏ hơn khoảng 1,4 lần so với mẫu đối chứng dương tại thời điểm 21 giờ (Hình 3.18; 3.19).

Mức độ biểu hiện gen *Integrin-1 β* và *N-cadherin* ở các tế bào HeLa được ủ với cao chiết NK13 đã giảm đáng kể sau 6 giờ và 12 giờ. Từ đó dẫn đến sự giảm biểu hiện của các phân tử tín hiệu FAK, PI3K và AKT (Hình 3.20). Đáng chú ý, tế bào sau 6 giờ ủ với cao chiết NK13 thì mức phiên mã của các gen *Integrin-1 β* , *N-cadherin*, *FAK*, *PI3K* và *AKT* chỉ còn lần lượt là 50%, 30%, 70%, 50% và 60% so với nhóm đối chứng âm. Trong khi đó, mức độ biểu hiện của gen *Integrin-1 α* không bị ảnh hưởng. Đặc biệt, hiệu quả ức chế này vẫn được duy trì đến thời điểm 12 giờ sau xử lý với dịch chiết. Điều đó cho thấy tác động ổn định của cao chiết NK13 trong việc ức chế biểu hiện

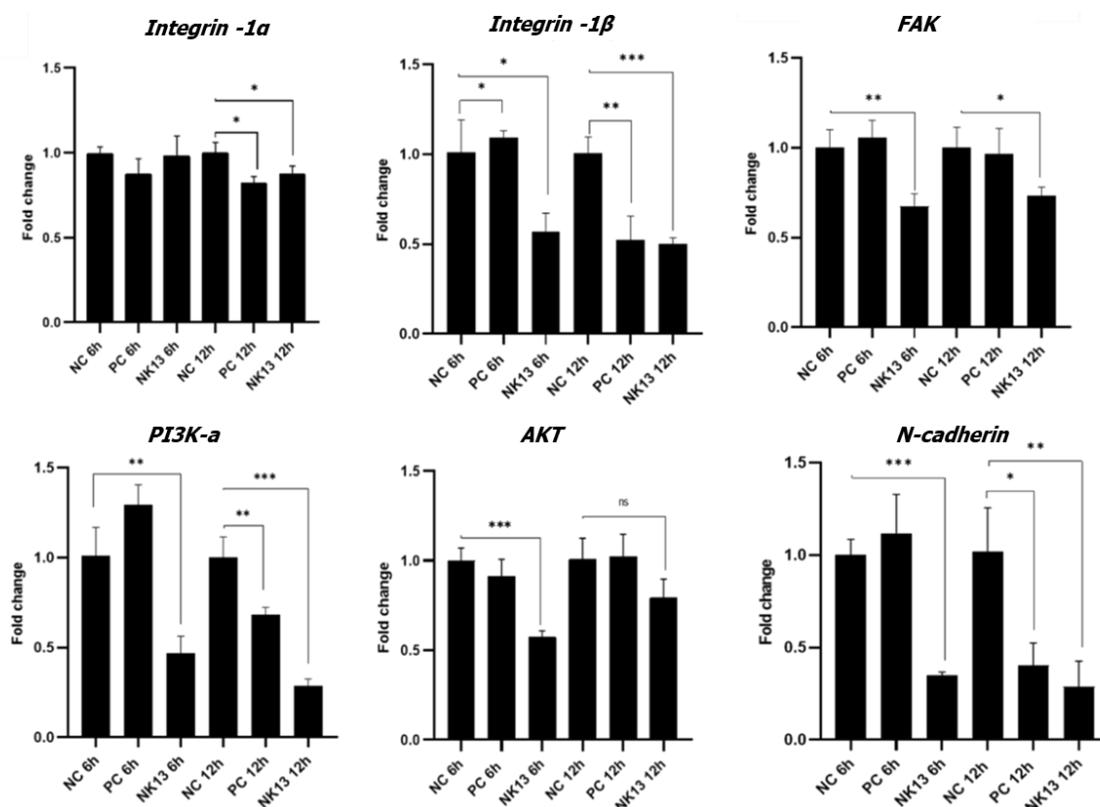
các gen này. Do đó, kết quả nghiên cứu này cung cấp thêm thông tin đáng chú ý về cơ chế tín hiệu trong việc ức chế sự xâm lấn của tế bào HeLa bởi cao chiết NK13.



Hình 3.18. Tác động của cao chiết NK13 lên khả năng di cư của tế bào HeLa
 NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)



Hình 3.19. Biểu đồ so sánh diện tích tế bào HeLa di cư
 NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)
 *, ** mức độ tin cậy với giá trị P < 0,05; 0,01



Hình 3.20. Mức độ biểu hiện các gen điều hòa quá trình di cư của tế bào HeLa
 NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)

3.4. Phân tách hoạt chất ức chế tế bào Hela từ cao chiết tổng số NK13

3.4.1. Phân tách thành phần cao chiết NK13 bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng

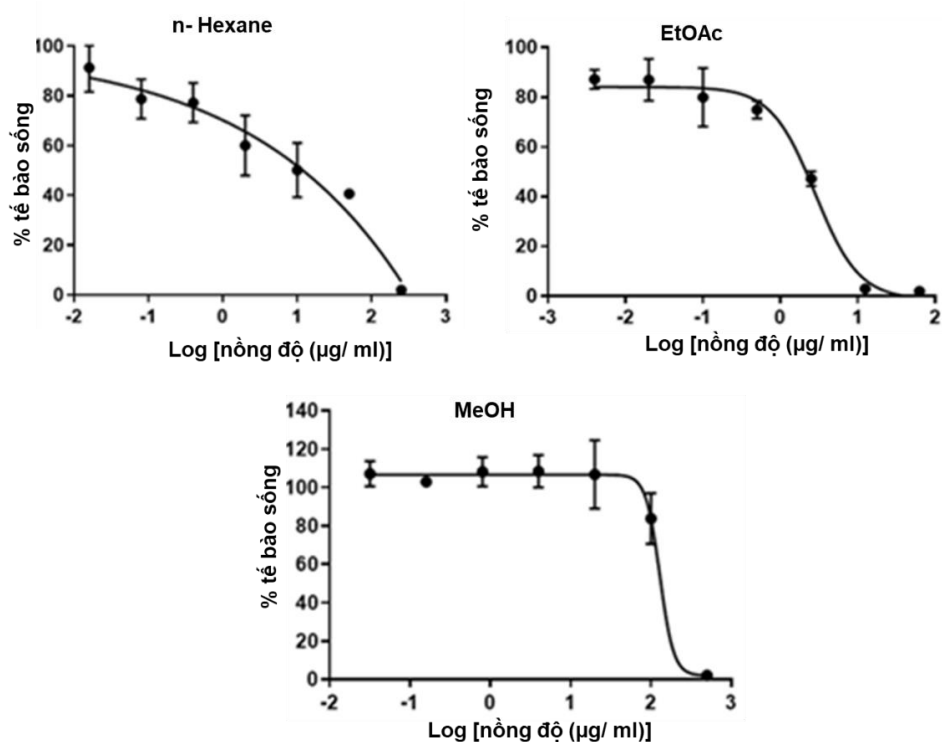
90 g sinh khối khô chủng *S. bilaspurens* NK13 được chiết 4 lần trong hỗn hợp dung môi EtOAc và MeOH (tỷ lệ 1:1, v/v) thu được 13,9 g cao chiết tổng số (gọi tắt là cao chiết NK13). Cao chiết NK13 được phân tách trong các dung môi có độ phân cực tăng dần để thu được 4 phân đoạn n-Hex, EtOAc, MeOH và H₂O với hàm lượng và hiệu suất tách chiết thể hiện ở bảng 3.9. Sau đó, ba phân đoạn này được đánh giá độc tính trên tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Kết quả cho thấy, phân đoạn EtOAc và n-Hex có khả năng ức chế rất mạnh với dòng tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ lần lượt là 2,2 và 12,0 µg/mL, trong khi phân đoạn MeOH lại thể hiện tính ức chế yếu đối với tế bào HeLa dựa theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) (Hình 3.21).

Bảng 3.9. Khối lượng, hiệu suất chiết, độc tính trên tế bào HeLa của 4 cao chiết

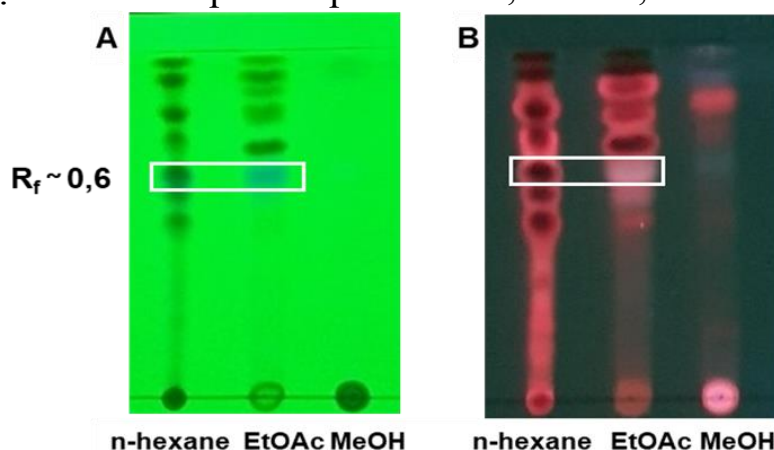
STT	Phân lớp	KL (g)	Hiệu suất chiết (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Phân loại GHS
1	n-Hex	7,1	51,1	12,0 ± 1,1	Cat. 2
2	EtOAc	2,3	16,5	2,2 ± 0,4	Cat. 1
4	MeOH	3,9	32,4	133,2 ± 2,1	Cat. 3
5	H ₂ O	0,6	4,3	-	-

Cat. 1: IC₅₀ < 5 µg/ml; Cat. 2: 5 µg/ml < IC₅₀ < 50 µg/ml;

Cat. 3: 50 µg/ml < IC₅₀ < 300 µg/ml



Hình 3.21. Độc tính của 3 phân lớp n-hexane, EtOAc, MeOH lên tế bào HeLa



Hình 3.22. Sắc ký đồ TLC của ba cao chiết n-hexane, EtOAc, MeOH quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và bước sóng 365nm (B)

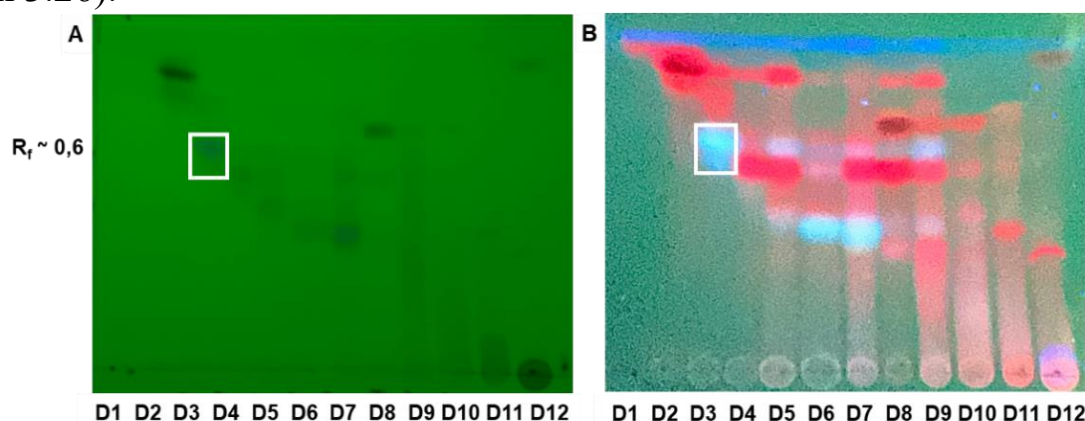
Cao chiết EtOAc và n-hexane thể hiện hoạt tính gây độc mạnh trên dòng tế bào HeLa dựa theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI) với giá trị IC_{50} lần lượt là 2,2 và 12,0 $\mu\text{g/ml}$; tiếp theo là cao chiết MeOH thể hiện độc tính trung bình trên dòng tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 133,2 $\mu\text{g/ml}$, trong khi đó phân lớp H_2O không gây độc cho tế bào HeLa (Bảng 3.9; Hình 3.21). Theo phân loại GHS, cao chiết EtOAc được xếp vào nhóm độc tính cấp 1; cao chiết n-hexane và MeOH lần lượt được xếp vào nhóm độc tính cấp 2 và cấp 3 [UN, 2023].

Kết quả sắc ký đồ TLC của 3 cao chiết khi quan sát ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm thấy rằng số lượng vết chất có xu hướng giảm dần trong những cao chiết có độ phân cực tăng dần, trong đó cao chiết n-hexane có

nhều vết chất nhất cho thấy dung môi này đã hòa tan được phần lớn hợp chất thứ cấp trong cao chiết NK13. Ngoài ra, cao chiết n-hexane và EtOAc xuất hiện vết chất màu tím và màu trắng sáng ở vị trí R_f khoảng 0,6 trên sắc ký đồ TLC khi quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm (Hình 3.22).

3.4.2. Phân tách thành phần hoạt chất bằng sắc ký cột thủy tinh

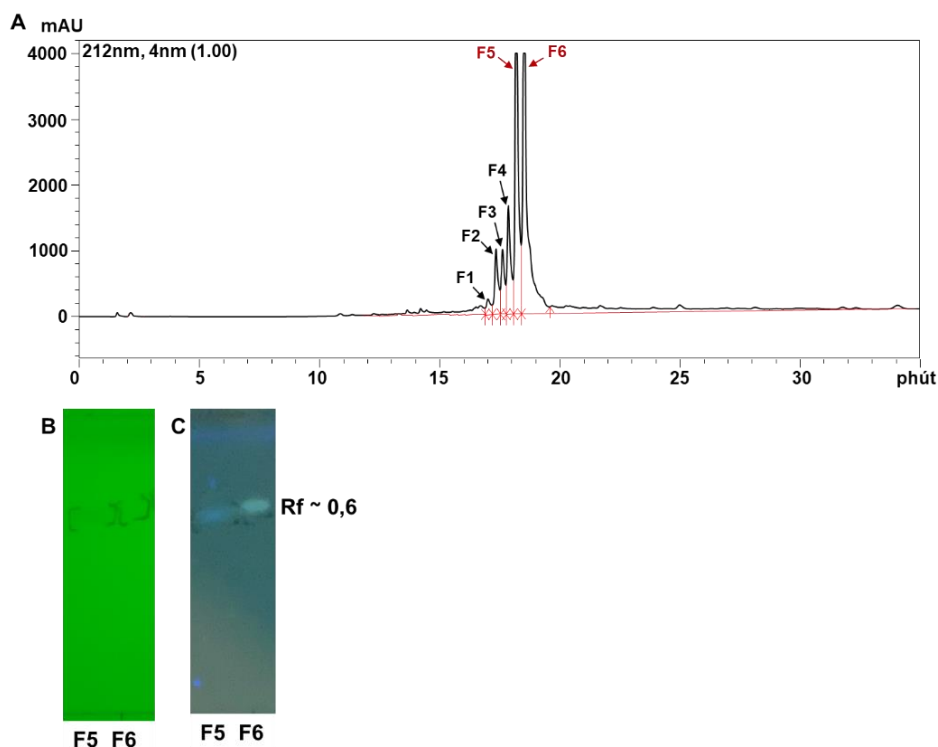
Phân đoạn n-Hexane và EtOAc có độc tính rất mạnh trên dòng tế bào HeLa được lựa chọn để tiếp tục phân tách hợp chất có mặt bằng màu tím tại chỉ số R_f khoảng 0,6 bằng phương pháp sắc ký cột thủy tinh sử dụng pha tĩnh là silica gel và sephadex LH-20. Các phân đoạn rửa giải được phân tích thành phần, vị trí các băng chất bằng sắc ký bản mỏng (TLC). Các phân đoạn có sự tương đồng nhau về thành phần và vị trí các băng chất quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm sẽ được gộp lại. Sau đó các phân đoạn sẽ được loại bỏ dung môi và xác định hàm lượng. Kết quả thu được phân đoạn D3 có hàm lượng 33 mg xuất hiện băng màu tím ở vị trí R_f khoảng 0,6 và ít tạp chất. Vì vậy, phân đoạn này được sử dụng để tinh sạch hợp chất chứa vết chất màu tím ở bước sóng 254 nm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Hình 3.26).



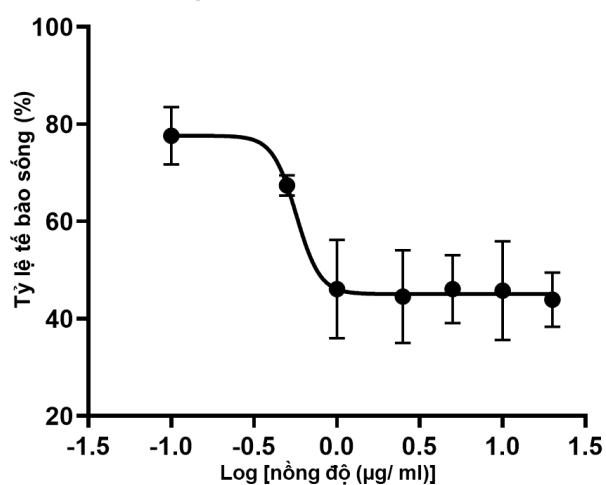
Hình 3.26. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (D1 - D12) từ phân đoạn BC₀ quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và 365 nm (B)

3.4.3. Kết quả tinh sạch phân đoạn D3 bằng phương pháp HPLC

Dựa vào sắc ký đồ HPLC, các hợp chất chính trong phân đoạn D3 được quan sát tốt nhất ở bước sóng 212 nm (hình 3.27A). Kết quả cho thấy đã thu được 6 phân đoạn sau rửa giải ký hiệu là F1 - F6, trong đó phân đoạn F5, F6 được rửa giải ở thời gian lưu 18,0 - 18,4 và 18,4 - 18,8 cho đỉnh cao nhất với hàm lượng tương ứng là 1,7 và 2,4 mg (bảng 3.17). Điều đó chỉ ra rằng, đây là hai hợp chất chính có trong phân đoạn D3. Sau đó, phân đoạn F5 và F6 được phân tích thành phần bằng chất bằng TLC. Kết quả trên sắc ký đồ TLC cho thấy hợp chất chứa băng màu tím và băng màu trắng sáng ở vị trí $R_f = 0,6$ xuất hiện ở cả hai phân đoạn F5, F6 khi quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm (hình 3.27 B, C).

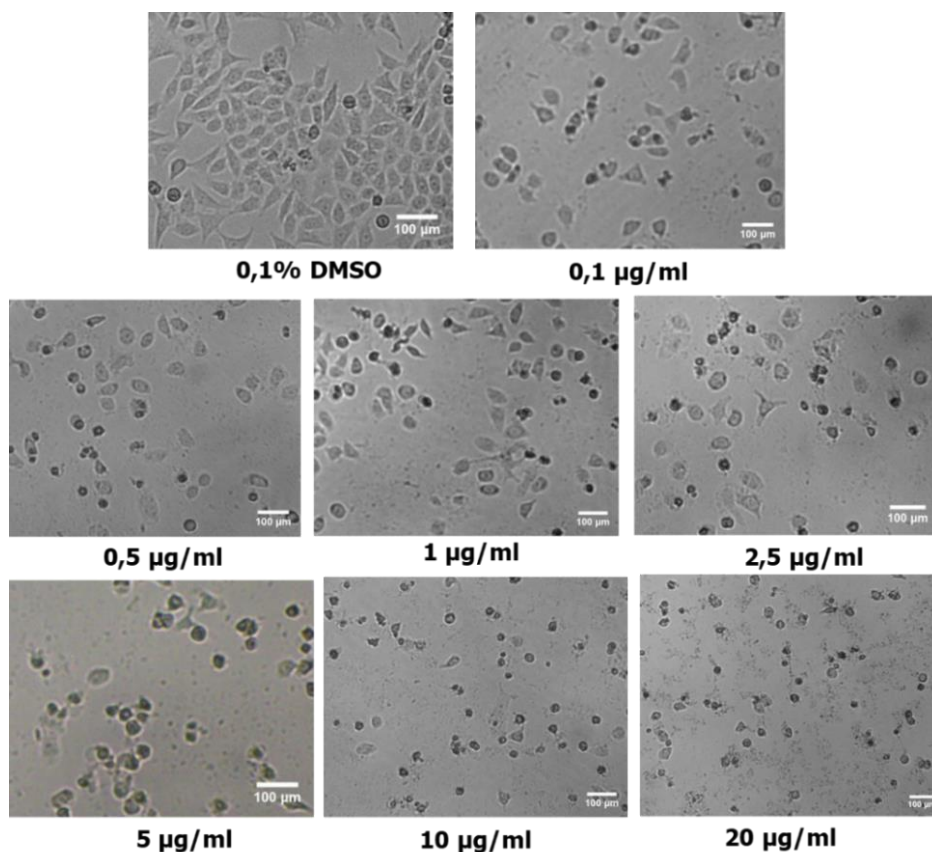


Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn D3 (A) và TLC của phân đoạn F5, F6 (B, C) quan sát ở bước sóng 212 nm (A); 254 nm (B), 365 nm (C)



Hình 3.18. Độc tính của phân đoạn F6 lên tế bào HeLa

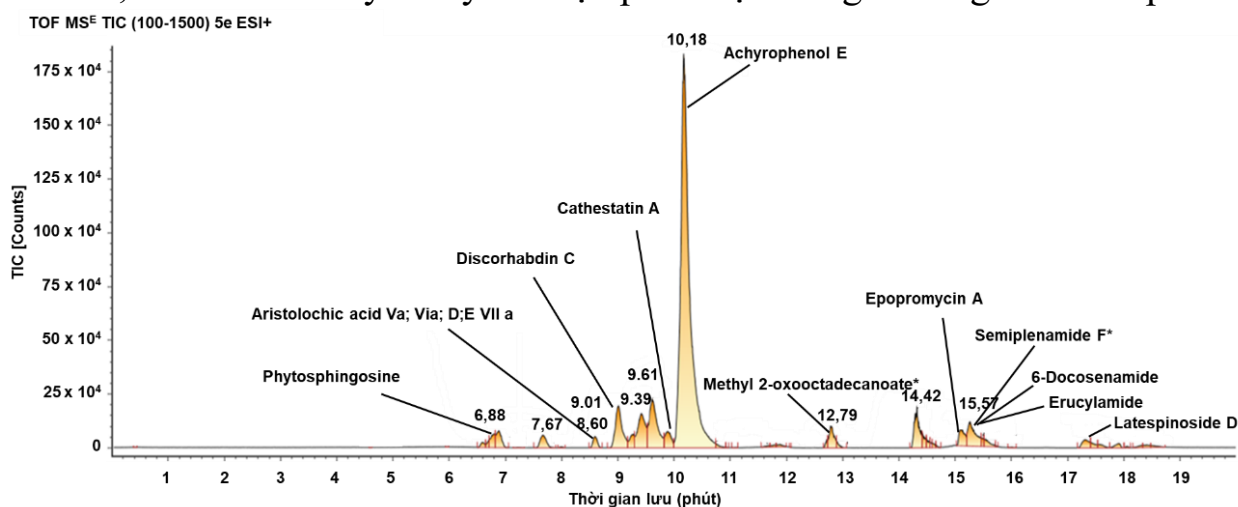
Kết quả cho thấy, phân đoạn F6 ức chế tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,5 $\mu\text{g/ml}$, được xếp vào nhóm độc tính cấp 1 theo thang phân loại của GHS (Hình 3.28). Đồng thời quan sát dưới kính hiển vi thấy rằng hình thái của tế bào HeLa khi ủ với phân đoạn F6 ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ đã bị thay đổi hình dạng, khoảng 30% - 40% tế bào bị co cụm, ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh của chúng (Hình 3.29). Bên cạnh đó, tỷ lệ sống sót của tế bào duy trì từ 43% đến 45% ở khoảng nồng độ từ 1,0 đến 20 $\mu\text{g/ml}$; cho thấy rằng phân đoạn F6 có thể ức chế quá trình phân bào của tế bào mà không gây chết tế bào trong khoảng nồng độ này.



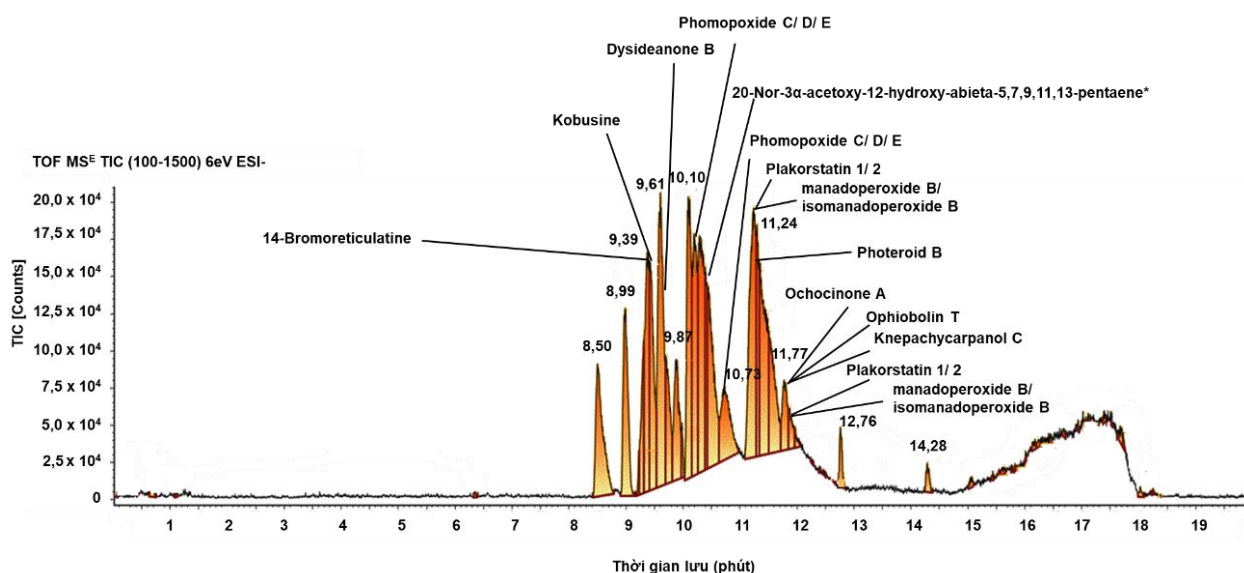
Hình 3.29. Tác động của phân đoạn F6 lên hình thái tế bào HeLa

3.4.4. Phân tích thành phần hoạt chất trong phân đoạn F6 bằng LC-HRMS

Kết quả sắc ký đồ tổng ion (TIC) ở Hình 3.30 và 3.31 chỉ ra rằng các đỉnh sắc ký có cường độ tín hiệu mạnh chủ yếu tập trung trong khoảng thời gian từ 8,5 - 11,5 phút ở chế độ ion hóa dương, trong đó đỉnh sắc ký ở 10,18 phút có cường độ tín hiệu mạnh nhất, phản ánh sự hiện diện của một hoặc một số hợp chất chiếm tỷ lệ chính trong phân đoạn F6. Trong khi đó, ở chế độ ion hóa âm, các đỉnh sắc ký chủ yếu được phát hiện trong khoảng từ 9 - 12 phút.



Hình 3.30. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$
* biểu thị hợp chất được phân lập từ vi khuẩn lam



Hình 3.31. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa $[M+H]^-$
 * biểu thị hợp chất được phân lập từ vi khuẩn lam

Những khối lượng điện tích (mass-to-charge, m/z) có cường độ tín hiệu (TIC) lớn hơn 10^4 sẽ được phân tích để xác định KLPT đo được. Kết quả đo phổ khối lượng cho thấy có 46 KLPT đo được (Observed masses) ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$ và 28 KLPT đo được ở chế độ ion hóa $[M+H]^-$ trong phân đoạn F6 (Bảng 3.15 và 3.16). Các hợp chất trong phân đoạn F6 được xác định dựa vào KLPT đo được (observed mass) và so sánh với cơ sở dữ liệu <http://dnp.chemnetbase.com/> và <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> cập nhật vào tháng 10 năm 2025. Kết quả ở Bảng 3.15 và 3.16 chỉ ra rằng, phân đoạn F6 gồm có 46 và 28 hợp chất chính được phát hiện lần lượt ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$ và $[M+H]^-$. Các hợp chất này thuộc nhiều nhóm chất như lipopeptide, phospholipid, polyketide/alkaloid, hợp chất chứa nhóm halogen, diterpenoid, glycoside chứa lưu huỳnh, trong đó có 20 hợp chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào được phát hiện từ những loài sinh vật khác như bọt biển, nấm men, thực vật,...; có 3 hợp chất Methyl 2-oxooctadecanoate; Semiplenamamide F và 20-Nor-3 α -acetoxy-12-hydroxy-abieta-5,7,9,11,13-pentaene đã được phát hiện ở các loài vi khuẩn lam khác như *Arthrospira platensis*, *Lyngbya semiplena*, *Microcoleus lacustris*. Vì vậy có thể dự đoán trong phân đoạn F6 có chứa những hoạt chất gây độc tế bào chưa từng được ghi nhận ở vi khuẩn lam.

KẾT LUẬN

1. Đã định danh đến cấp độ loài của 34 chủng vi khuẩn lam trong số 50 chủng phân lập tại một số địa phương ở Việt Nam thuộc 14 loài: *Aulosira laxa*; *Ahomia soli*; *Desmonostoc lechangense*; *D. meilinense*; *D. persicum*; *Aliinostoc magnakineticifex*; *A. catenatum*; *A. morphoplasticum*; *Dulcicalothrix necridiiformans*; *Scytonema bilaspurense*; *Neowestielloopsis persica*; *Westielloopsis prolifica* và *Hapalosiphon welwitschia*; 16 chủng còn lại được định danh đến cấp độ chi thuộc 4 chi là *Aulosira*, *Desmonostoc*, *Desikacharya* và *Aliinostoc*, trong đó chúng thuộc 10 loài chưa được đặt tên trong hệ thống vi khuẩn lam.
2. Đã phát hiện được cao chiết tổng số của 12 trong 50 chủng vi khuẩn lam có hoạt tính kháng khuẩn, trong đó cao chiết từ chủng CAVN8204 ức chế mạnh vi khuẩn *Bacillus cereus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm. Cao chiết của 7 trong số 12 chủng vi khuẩn lam này thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư, trong đó cao chiết của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 thể hiện độc tính mạnh trên tế bào ung thư HeLa với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$.
3. Cao chiết tổng số từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 có khả năng gây chết tế bào ung thư cổ tử cung HeLa thông qua kích hoạt apoptosis, gây ngừng chu kỳ tế bào tại pha S (theo cơ chế không phụ thuộc p53) và ức chế quá trình di cư (với sự điều hòa biểu hiện của các gen *BAX*, *CASP*, *CDKN*, *N-cadherin*, *Integrin*, *FAK*, *PI3K*, *AKT*). Đồng thời, đã phân tách được 2,4 mg phân đoạn F6 từ 13,9 g cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurense* NK13 ức chế mạnh tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,5 $\mu\text{g/ml}$.

KIẾN NGHỊ

- ✓ Tinh sạch và xác định cấu trúc cấu tạo của hoạt chất trong phân đoạn F6 của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).
- ✓ Đánh giá cơ chế tác động của các chất tinh sạch trong phân đoạn F6 lên tế bào ung thư HeLa.