

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CHƯƠNG TRÌNH NC PT&ƯD CÔNG NGHỆ SINH HỌC KC04/11-15
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

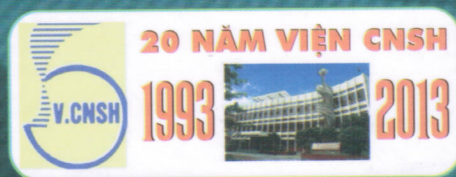
BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

**HỘI NGHỊ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2013
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2013**

**TRUNG TÂM HỘI NGHỊ QUỐC GIA, HÀ NỘI
27 THÁNG 9 NĂM 2013**

Quyển 1:

**Công nghệ gen, Công nghệ Enzyme và Hóa sinh,
Công nghệ sinh học Y - Dược, Công nghệ sinh học Động vật**



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ

286	SÀNG LỌC VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG ACTINOPLANES VÀ STREPTOMYCES SẢN XUẤT CHẤTỨC CHẾ MEN α -GLUCOSIDASE. Bạch Hoàng Mi, Nguyễn Thị Nguyệt, Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi, Đỗ Thị Tuyên	383
291	TỐI ƯU HÓA CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN TÍNH KÉO ĐÚT CỦA MÀNG CHITOSAN ĐƯỢC THU NHẬN TỪ VỎ TÔM. Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Minh Nguyệt	388
296	NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA VÀ ỨC CHẾ COX-2, INOS CỦA AMINOETHYL-CHITOOIGOSACHARIDES. Ngô Đại Nghiệp, Đinh Minh Hiệp	393
302	KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH ENZYME UREASE TRÊN CHITOSAN. Lê Thị Mỹ Ngọc, Huỳnh Ngọc Oanh	398
308	NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN SINH TỔNG HỢP ACARBOSE Ở ACTINOPLANES sp. KCTC-9161. Nguyễn Thị Nường, Đỗ Thị Tuyên, Lê Thanh Hoàng, Quyền Đình Thi	403
313	NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH MỘT SỐ ENZYME THỦY PHÂN THEO KỸ THUẬT CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEA). Huỳnh Ngọc Oanh	407
318	THU NHẬN VÀ TINH SẠCH GLUCOAMYLASE TỪ ASPERGILLUS KAWASAKI VÀ THỬ NGHIỆM THỦY PHÂN TINH BỘT SỐNG. Võ Việt Phi	412
322	STUDY ON WHITE PEPPERCORN PRODUCTION BY VISCOZYME®_L AND PECTINEX ULTRA® SP _L. Le Hong Phu, Le Thi Hong Tuyet, Le Nguyen Quynh Tram, Ngo Huynh The Hai	417
327	PHÂN LẬP VÀ KIỂM TRA MỘT SỐ HOẠT TÍNH ENZYME CỦA CÁC DÒNG VI KHUẨN LACTIC TRONG SẢN PHẨM MẮM CHUA CÁ SẠC. Trần Minh Phúc, Đỗ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Hữu Hiệp	421
331	TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA CHITINASE TỪ NẤM LECANICILLIUM LECANII 43H. Nguyễn Hữu Quân, Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi, Phạm Thị Huyền	426
336	NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH LACCASE THỎ TRÊN GIÁ THỂ ĐỂ LOẠI PHENOL VÀ MÀU THUỐC NHUỘM. Nguyễn Nguyên Quang, Đinh Thị Thu Hằng, Phạm Lê Anh, Nguyễn Thị Lan Anh, Đặng Thị Cẩm Hà	431
341	THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ LOÀI GIUN ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH THỦY PHÂN FIBRIN TẠI VIỆT NAM. Lê Đình Quyền, Lý Thị Bích Thủy, Đỗ Thị Tuyên, Vũ Thị Bích Ngọc, Trần Thị Thanh Bình, Quyền Đình Thi	436
346	TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME PROTEASE ƯA NHIỆT TỪ CHỦNG XẠ KHUẨN STREPTOMYCES PHAEOLUTEICROMATOGENS X598. Trần Thị Lệ Quyên, Đào Thị Lương, Trịnh Thành Trung, Trịnh Văn Anh, Dương Văn Hợp	441
350	SỬ DỤNG ENZYME LÀM GIẢM NẶNG LƯỢNG NGHIÊN BỘT GIẤY- NGHIÊN CỨU PHÒNG THÍ NGHIỆM. Nguyễn Thị Xuân Sâm, Tô Kim Anh, Cao Văn Sơn, Đặng Thị Thu	445
354	NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG HỖN HỢP CÁC ENZYME CELLULASE, XYLANASE VÀ LIPASE CHO KHỬ MỰC GIẤY BẢO TÁI CHẾ. Cao Văn Sơn, Lương Thị Hồng, Phí Quyết Tiến	450
358	SỬ DỤNG PECTATE LYASE TÁI TỔ HỢP LOẠI PECTIN TRÊN VẢI BÔNG THỎ. Lê Trọng Tài, Đỗ Thị Thu Hằng, Võ Hoài Bắc, Lê Văn Trường	455
363	NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN CHỦNG VI RÚT PHỤC VỤ SẢN XUẤT VẮC-XIN PHÒNG BỆNH HOẠI TỬ THẦN KINH CHO CÁ MÚ NUÔI TẠI VIỆT NAM. Phạm Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Hiền, Bùi Thị Hải Hòa, Phạm Công Hoat, Nguyễn Quang Linh	459
368	ĐA HÌNH PROTEIN TRONG MỘT SỐ LOẠI DỊCH CHOC DÒ VÀ GIỚI HẠN PHÁT HIỆN XÉT NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN NHÂM THAY THẾ CHO XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH. Vũ Xuân Tạo, Lương Thị Hồng Vân, Nguyễn Gia Bình	464
373	NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ XÚC TÁC THÔNG QUA CẤU TRÚC TINH THỂ CỦA FabB – ENZYME CỦA VI KHUẨN GÂY BẠC LÁ LÚA. Đoàn Thị Ngọc Thanh	469
378	ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CHARACTERIZATION OF CRUDE BACTERIOCIN PRODUCED BY MARINE BACTERIA ISOLATED FROM VIETNAM. Nguyen Thi Hai Thanh, Nguyen Thi Hong Mai, Nguyen Van Duy	474
383	TỐI ƯU CÁC ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP ENZYME BETA-GALACTOSIDASE TÁI TỔ HỢP TỪ LACTOBACILLUS REUTERI BIỂU HIỆN TRONG VẬT CHỦ LACTOBACILLUS PLANTARUM WCFS1. Nguyễn Tiến Thành, Đặng Thị Kiều Trang, Alexie Barey, Phạm Mai Lan, Nguyễn Thị Hiền	479

THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ LOÀI GIUN ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH THỦY PHÂN FIBRIN TẠI VIỆT NAM

Lê Đình Quyền¹, Lý Thị Bích Thủy¹, Đỗ Thị Tuyên¹, Vũ Thị Bích Ngọc¹, Trần Thị Thanh Bình², Quyền Đình Tín¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học sư phạm Hà Nội

TÓM TẮT

Lumbrokinase là một nhóm các enzyme thủy phân fibrin tách chiết từ giun đất. Các enzyme này không những có tác dụng tiêu hóa trực tiếp các sợi fibrin, vừa có khả năng hoạt hoá plasminogen thành plasmin - enzyme thủy phân được fibrin của cơ thể. Vì vậy, lumbrokinase có thể được sử dụng để điều trị bệnh tắc nghẽn mạch máu. Để phục vụ nghiên cứu sản xuất lumbrokinase từ giun đất, chúng tôi tiến hành "Thu thập và định danh một số loài giun đất có hoạt tính thủy phân fibrin tại Việt Nam" nhằm tìm nguồn gen mã hóa lumbrokinase từ các loài giun đất thu thập ở các vùng xung quanh khu vực Hà Nội như Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Ninh Bình. 22 mẫu giun thu thập được xác định hoạt tính thủy phân fibrin, phân loại bằng phương pháp xác định hình thái và phân tích sinh học phân tử dựa trên trình tự gen mã hóa cytochrome C oxidase I và 16S rRNA. Kết quả cho thấy 3 mẫu giun có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất là mẫu giun *Pheretima elongata* (Bắc Ninh), *Perionyx excavatus* (Đông Anh) và *Pheretima nimia* (Thường Tín) có hoạt tính lần lượt là 11,06 U/mg, 9,8 U/mg và 6,73 U/mg.

Từ khóa: COI, fibrin, giun đất, lumbrokinase, 16S rRNA

MỞ ĐẦU

Tắc nghẽn mạch (thrombosis) là tình trạng ứ đọng mạch máu với cục máu đông, có thể dẫn tới nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ, cả hai đều dẫn tới tử vong cao ở người (Liu, Ge, 2002; Kunamneni *et al.*, 2007). Fibrin là một protein được tạo thành từ fibrinogen trong quá trình đông máu của cơ thể và là thành phần chính của cục máu đông. Trong cơ thể có hơn 20 enzyme tham gia vào quá trình đông máu, trong khi chỉ có một enzyme plasmin có thể phá vỡ cục máu. Khi plasmin phân cắt fibrin sẽ tạo ra một số phần tan được giúp làm tan cục máu đông. Cách điều trị tốt nhất để điều trị chứng nghẽn mạch là tiêm trực tiếp vào tĩnh mạch một enzyme có khả năng chuyển hóa plasminogen thành plasmin hoặc sử dụng một loại enzyme có khả năng thủy phân trực tiếp fibrin. Để điều trị bệnh nhân mãn tính, người ta có thể sử dụng theo con đường uống các loại enzyme này (Innerfield, 1960; Yan *et al.*, 2010).

Lumbrokinase là một nhóm các enzyme thủy phân fibrin tách chiết từ giun đất. Các enzyme này không những có tác dụng thủy phân trực tiếp các sợi fibrin mà còn có khả năng hoạt hoá plasminogen thành plasmin có tác dụng thủy phân được fibrin của cơ thể (Yuan *et al.*, 2006). Hiện nay việc sử dụng lumbrokinase tách ra từ giun đất để điều trị tắc nghẽn mạch máu và bệnh tim mạch đang ngày càng được quan tâm (Jin *et al.*, 2000; Trần, Nguyễn, 2003; Thái, Nguyễn, 2004; Yan *et al.*, 2010). Ưu điểm lớn nhất của lumbrokinase thủy phân fibrin từ giun đất là có thể hấp thụ qua đường ruột vào máu. Khi vào trong máu, enzyme này vừa có tác dụng hoạt hóa hệ thống thủy phân fibrin, vừa có hoạt tính plasmin tiêu tan trực tiếp fibrin. Đây chính là những cơ sở của các nghiên cứu ứng dụng enzyme thủy phân fibrin từ giun đất làm thuốc uống chữa bệnh tim mạch (Fan *et al.*, 2001).

Việc nghiên cứu và sử dụng các thuốc làm tan các cục máu đông để điều trị huyết khối và các rối loạn huyết khối trên mạch nhờ công nghệ sinh học đã được bắt đầu từ cuối những năm 1980. Sử dụng các kỹ thuật hiện đại của công nghệ gen và protein, các gen mã hóa lumbrokinase đã và đang được phân lập và tách dòng làm nguyên liệu sản xuất lumbrokinase tái tổ hợp làm tan cục máu đông một cách đặc hiệu, với giá thành hạ và độ tinh sạch cao đáp ứng những nhu cầu cấp bách của thực tiễn (Pennica *et al.*, 1983; Li, An, 2002; Bhopale, Nanda, 2005). Việt Nam là nước có khí hậu nóng ẩm, thích hợp cho nhiều loài giun đất phát triển nên có số lượng rất lớn các loài giun đất (Lê Văn Triền, 1995). Vì đó có tiềm năng rất lớn trong khai thác các loài giun đất có hoạt tính thủy phân fibrin cao cũng như nguồn gen lumbrokinase quý từ các mẫu giun đó. Hiện nay, trong phân loại và định danh các loài giun đất thường định danh bằng đặc điểm hình thái (Blakemore, 2006) và bằng sinh học phân tử sử dụng cặp mồi 16S rRNA (Antonia *et al.*, 2007), COI (Folmer *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành thu thập các mẫu giun đất từ các tỉnh và thành phố ở Việt Nam, khảo sát khả năng thủy phân fibrin cũng như sử dụng cặp mồi 16S rRNA và 2 cặp mồi COI để tiến hành định danh các loài giun đất có hoạt tính thủy phân fibrin thu thập tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng giống

Các mẫu giun đất được thu thập từ các tỉnh Bắc Ninh, Thái Nguyên, Ninh Bình, Nam Định, huyện Đông Anh, Thường Tín, Gia Lâm-Hà Nội.

Chủng *E. coli* DH10B từ bộ sưu tập giống do Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết: cao nấm men, Peptone, NaCl và Fibrinogen (Merck Bio), agar (Việt Nam), proteinase K, DNA cloning kit, *Xho*I, *Xba*I và T4 ligase từ Fermentas.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi	Sản phẩm (~bp)	Tài liệu tham khảo
MS_F	5'- CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3'	625	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
MS_R	5'- CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T - 3'		
COI_1490	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'	715	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)
COI_2198	5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'		
COI_E	5'- TAT ACT TCT GGG TGT CCG AAG AAT CA - 3'	685	

Phương pháp

Thu thập giun đất

Giun đất được thu thập từ các địa điểm khác nhau ở các tỉnh, thành phố tại Việt Nam, các mẫu giun đất có đại sinh dục hoàn thiện được rửa trong ethanol 30% và bảo quản trong ethanol 95%. Phần mô đuôi dùng để tách chiết DNA tổng số, phần đầu cùng với đại sinh dục của con giun dùng để phân loại bằng hình thái.

Phương pháp thử hoạt tính enzyme thủy phân fibrin trên đĩa thạch

Hoạt tính thủy phân fibrin được xác định bằng phương pháp đĩa fibrin theo Astrup và Mullertz (1951): ở mỗi đĩa petri đường kính 10 cm cho 15 ml dung dịch fibrinogen tinh khiết trong NaCl 0,9% (nồng độ 0,2%) được ngưng kết bằng 210 đơn vị dung dịch thrombin có nồng độ 100 IU/ml. Chú ý đặt đĩa cho phẳng và đổ dung dịch cho thật đều. Để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để fibrin được đông tụ hoàn toàn. Hút 10µl dung dịch enzyme (chiết từ mẫu sinh khối giun đất) nhỏ thành giọt cách đều nhau lên bề mặt đĩa fibrin, ủ ở 37°C. Khi đông tụ, đĩa fibrin có màu trắng đục, do đó các vùng fibrin không phân trở nên trong suốt sẽ dễ dàng được quan sát thấy. Sau 1-3 giờ, đo đường kính và tính diện tích của vòng phân ứng (yêu cầu vòng phản ứng phải tròn). Mỗi mẫu được lặp lại ít nhất 3 lần để lấy giá trị trung bình. Hoạt tính thủy phân fibrin được xác định dựa vào đường chuẩn plasmin.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen

Chiết tổng số từ các mẫu giun đất thu thập được tách chiết theo phương pháp chuẩn thường quy. Mồi khuếch đại là đặc hiệu cho phân đoạn 16S rRNA và phân đoạn COI, chúng tôi sử dụng cặp mồi trong đoạn COI bởi vì nó là trong số các gen mã hóa protein bảo thủ nhất trong hệ gen ty thể của động vật (Brown, 1985) và được nhiều tác giả trên thế giới công nhận (Folmer *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2007). Quy trình PCR được thực hiện trên máy PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Đức). Hỗn hợp phản ứng PCR 25 µl gồm: 0,5 µl DNA (~100 ng); 1 µl mồi xuôi (10 pmol), 1 µl mồi ngược (10 pmol); 2,5 µl MgCl₂ (25 mM); 2,5 µl đệm 10x PCR; 2 µl dNTP (2,5 mM); 0,25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl). Chế độ chạy: 95°C/4'; 35x (94°C/45"; 54°C/45"; 72°C/1'); 72°C/10', bảo quản sản phẩm khuếch đại ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel agarose 0,8% với thang DNA chuẩn (Sigma, Mỹ).

Phương pháp nhân dòng và giải trình tự

Sản phẩm PCR cấu bằng các cặp mồi đặc hiệu được chèn vào pJET1.2 blunt tạo thành plasmid tái tổ hợp nhân dòng trong *E. coli* DH10B. Hỗn hợp phản ứng nối ghép 20µl (4 µl sản phẩm PCR; 2 µl đệm 10x T4 ligase; 2 µl vector pJET1.2 blunt; 2 µl T4 ligase; 10 µl H₂O) được ủ qua đêm ở 22°C. 5 µl dịch nối ghép được ủ với tế bào khả biến *E. coli* DH10B (đã xử lý bằng CaCl₂) trong 30 phút và sốc nhiệt 45 giây ở 42°C. Dịch biến nạp được bổ sung 250 µl LB lỏng, lắc 1 giờ ở 200 rpm và trải trên đĩa thạch bổ sung 0,1% ampicillin. Đĩa thạch ủ qua đêm ở 37°C. Khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được nuôi trong môi trường LB lỏng. Plasmid được tách chiết, kiểm tra gen chèn và làm khuôn cho đọc trình tự gen. Plasmid tái tổ hợp tinh sạch theo phương pháp chuẩn, dùng làm khuôn chạy PCR để đọc trình tự trên máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer. Phần mềm DNASTar và BLAST được sử dụng để tìm và so sánh trình tự nucleotide trong GenBank.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu thập các mẫu giun đất từ một số tỉnh, thành phố tại Việt Nam.

Để thu thập được 22 mẫu giun đất từ các vùng xung quanh khu vực Hà Nội như Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên và Ninh Bình. Các mẫu giun có đại sinh dục hoàn thiện được thu thập, đánh dấu và được chia làm 2 phần, một phần được bảo quản trong cồn 95% để phục vụ phân loại bằng hình thái và sinh học phân tử. Một phần được dùng để thử hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa thạch.



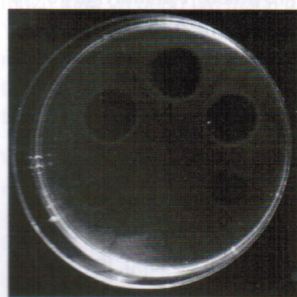
Hình 1. Đặc điểm hình thái của một số mẫu giun đất thu thập từ một số tỉnh, thành phố tại Việt Nam (A: TTK6 (Thuờng Tín); B: HNDA (Đông Anh); C: BNQ2 (Bắc Ninh))

Thử hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa thạch của các mẫu giun đất thu thập

Các mẫu giun thu thập cũng được nghiền bằng máy nghiền đồng thể, ly tâm thu dịch chiết và thử hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy, trong các mẫu giun đất thu thập được mẫu giun đất BNQ2 (Bắc Ninh), HNDA (Đông Anh) và TTK6 (Thuờng Tín) có khả năng thủy phân fibrin tốt nhất (Bảng 2, Hình 2) và có hoạt tính tương ứng là 11,06 U/mg, 9,8 U/mg và 6,73 U/mg.

Bảng 2. Hoạt tính thủy phân fibrin của các mẫu giun thu thập được

Stt	Tên mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Hoạt tính thủy phân fibrin (U/mg)
1	BNQ1	Bắc Ninh	0
2	BNQ2	Bắc Ninh	11,06 ± 2,93
3	BNQ3	Bắc Ninh	0
4	HTQ1	Hà Tây	0
5	HTQ2	Hà Tây	0
6	TTK1	Thuờng Tín – Hà Nội	2,1 ± 0,01
7	TTK2	Thuờng Tín – Hà Nội	1,53 ± 0,55
8	TTK3	Thuờng Tín – Hà Nội	4,8 ± 1,1
9	TTK4	Thuờng Tín – Hà Nội	0
10	TTK5	Thuờng Tín – Hà Nội	0
11	TTK6	Thuờng Tín – Hà Nội	6,73 ± 0,26
12	LBT1	Long Biên – Hà Nội	4,5 ± 0,46
13	HNDA	Hà Nội	9,8 ± 2,5
14	HNH1	Hà Nội	0
15	HNH2	Hà Nội	1,96 ± 0,14
16	TNM1	Thái Nguyên	0
17	TNM2	Thái Nguyên	1,21 ± 0,12
18	TNQ1	Thái Nguyên	1,57 ± 0,01
19	NBH1	Ninh Bình	1,02 ± 1
20	NBH2	Ninh Bình	0
21	HDH1	Hà Đông – Hà Nội	1,3 ± 0,01
22	HDH2	Hà Đông – Hà Nội	0



Hình 2. Hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa của một số mẫu giun đất thu thập (1: ĐC âm; 2: TNQ1; 3: BNQ2; 4: HNDA; 5: TTK6 và TTK3)

Định danh các mẫu giun đất thu thập

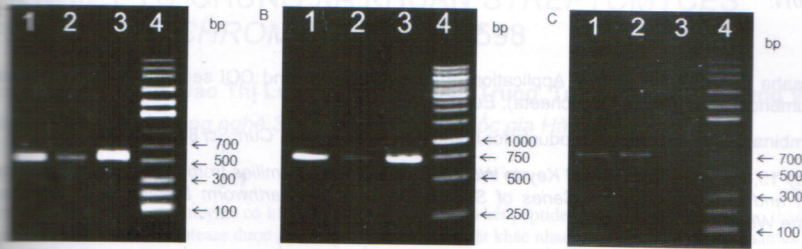
Mẫu giun đất BNQ2 (Bắc Ninh), HNDA (Đông Anh) và TTK6 (Thuờng Tín) có khả năng thủy phân fibrin tốt nhất được lựa chọn để tiến hành định danh, mẫu giun bảo quản trong cồn 95% được gửi sang Bộ môn Động vật học, Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm Hà Nội phân loại theo đặc điểm hình thái kết quả thu được trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định danh một số loài giun đất bằng đặc điểm hình thái

Mẫu giun đất thu thập	Tên loài	Địa điểm lấy mẫu
BNQ2	<i>Pheretima elongata</i>	Gia Bình, Bắc Ninh
HNDA	<i>Perionyx excavatus</i>	Đông Anh, Hà Nội
TTK6	<i>Pheretima robusta</i>	Thuờng Tín, Hà Nội

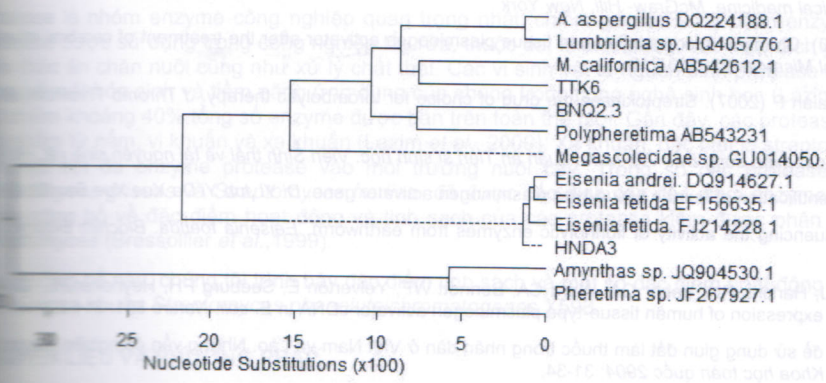
Các mẫu giun trên cũng được tiến hành tách chiết DNA tổng số để phân loại theo phương pháp sinh học phân tử.

Chúng tôi tiến hành chạy PCR với các cặp mồi 16S rRNA và phân đoạn COI cho sản phẩm khuếch đại đúng như kích thước tính toán, kết quả điện di không tạp nhiễm, các băng vạch sản phẩm PCR rõ ràng (Hình 3).



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR từ DNA một số mẫu giun đất thu thập từ một số tỉnh, thành phố tại Việt Nam bằng cặp mồi 16S rRNA (A), LCOI_1490 với HCOI_2198 (B) và LCO_1490 với COI_E (C) (1: BNQ2; 2: HNDA; 3: TTK6; 4: Marker)

Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA và COI của 3 mẫu đều cho kết quả tốt với peak rõ ràng và được BLAST trên NCBI để so sánh độ tương đồng với các trình tự gen đã công bố trên Genbank. Kết quả thu được mẫu giun đất BNQ2 có độ tương đồng cao nhất với loài *Polypheretima* có mã số trên Genbank là AB543231.1, mẫu giun đất HNDA có độ tương đồng 98% với loài *Eisenia fetida* có mã số trên Genbank là EF156635.1, mẫu giun đất TTK6 có độ tương đồng cao nhất với loài *Metaphire californica* có mã số trên Genbank là AB562412.1



Hình 4. Cây phát sinh loài tổng quát của 3 loài giun đất thu thập có hoạt tính thủy phân fibrin với các trình tự công bố trên Genbank

Định danh theo đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử của các loài giun thu thập được cho thấy kết quả bằng kỹ thuật sinh học phân tử vẫn còn nhiều hạn chế, đa số các mẫu chỉ định danh đến loài mà ít mẫu định danh đến dưới loài. Điều này có thể là do giun đất là sinh vật bậc cao có bộ gen phức tạp và có nhiều điểm tương đồng giữa các loài có quan hệ gần. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi sử dụng phương pháp sinh học phân tử, các loài giun *Perionyx excavatus*, *Perionyx excavatus* và *Pheretima robusta* có độ tương đồng cao nhất lần lượt tương ứng với *Pheretima robusta*, *Eisenia fetida* và *Metaphire californica*. Kết quả định danh bằng hình thái và định danh bằng sinh học phân tử cho kết quả chưa đồng nhất, cần có những nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện. Tuy nhiên, việc kết hợp định danh bằng hình thái với phương pháp sinh học phân tử có thể nâng cao tính chính xác của việc định danh của các loài giun đất đã biết cũng như các loài giun đất mới phát hiện. Từ việc định danh các loài giun bằng phương pháp sinh học phân tử, chúng tôi đặc biệt chú ý tới loài giun *Perionyx excavatus* do loài giun này có độ tương đồng cao nhất với loài giun *Eisenia fetida* – loài giun có enzyme lumbrokinase đã được nghiên cứu và công bố (Dong et al., 2004). Vì vậy, loài giun *Perionyx excavatus* sẽ là một trong số các loài giun được chọn lựa để tách dòng gen mã hóa enzyme lumbrokinase.

Chúng tôi đã thu thập được 22 mẫu giun đất từ các vùng xung quanh khu vực Hà Nội như: Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Nam Định. Các mẫu giun thu thập được xác định hoạt tính thủy phân fibrin, phân loại bằng phương pháp xác định hình thái và phương pháp sinh học phân tử dựa trên trình tự gen mã hóa cytochrome C oxidase I và 16S rRNA. Kết quả cho thấy 3 mẫu giun có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất được định danh bằng hình thái là mẫu giun *Perionyx excavatus* (Bắc Ninh), *Perionyx excavatus* (Đông Anh) và *Pheretima robusta* (Thường Tín) có hoạt tính lần lượt là 10,6 U/mg, 9,8 U/mg và 6,73 U/mg. Trong các loài giun phân lập được, chúng tôi chú ý nhất đến loài giun *Perionyx excavatus* và loài giun *Perionyx excavatus*. Đây có thể là nguồn gen mã hóa lumbrokinase từ các loài giun đất để sử dụng để nghiên cứu sản xuất lumbrokinase tái tổ hợp làm thuốc chống tác nghẽn mạch máu.

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ của chương trình chương trình KH&CN trọng điểm cấp nhà nước KC04/11-1, Nghiên cứu phát triển ứng dụng Công nghệ sinh học, đề tài: "Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất lumbrokinase tái tổ hợp làm thuốc phòng chống tắc nghẽn mạch" Bộ Khoa học và Công nghệ, 2012-2014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Antonia AP, Ga'bor C, Michael W, Csaba C, Victor VP (2007). Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *Eur J Soil Biol*: 1-10.

Bhopale GM, Nanda RK (2005). Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Curr Sci* **89**: 614-622.

Blakemore RJM (2006). "Retrieved May 15, 2012 (2006) *Revised Key to Worldwide Earthworm Families from Blakemore plus Families of Criodrilidae (including Biwadriidae) and Octochaetidae". A Series of Searchable Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World.*

Brown WM (1985). The mitochondrial genome of animals. 95-130.

Dong GQ, Yuan XL, Shan YJ, Zhao ZH, Chen JP, Cong YW (2004). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic enzyme-3 from earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim Biophys Si (Shanghai)* **36**: 303-308.

Fan Q, Wu C, Li L, Fan R, Wu C, Hou QM, He RQ (2001). Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme *Biotin* *Lumbricus rubellus*. *Biochim Biophys Acta* **1526**: 286-292.

Folmer, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**(5): 294-299.

Huang J, Xu Q, Suna JZ, Tang LG, Su ZY (2007). Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* **51**: 301-309.

Innerfield I (1960) *Enzymes in clinical medicine*. McGraw-Hill, New York

Jin L, Jin H, Zhang G, Xu G (2000). Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. *Clin Hemorheol Microcirc* **23**: 213-218.

Kunamneni A, Abdelghani TT, Ellaiah P (2007). Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* **15**: 9-23.

Lê Văn Triển (1995). *Khu hệ giun đất miền đông Bắc Việt Nam. Luận án Tiến sĩ sinh học. Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật*. Hà Nội.

Li ZL, An J (2002). Cloning and identification of human tissue-type plasminogen activator gene. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **22**: 224-226.

Liu XH, Ge F (2002). Factors influencing the activity of fibrinolytic enzymes from earthworm. *Eisenia foetida*. *Biochim Biophys Acta* **1525**

Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Galloway DV, Collen D (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**: 214-221.

Thái TB, Nguyễn VC (2004). Vấn đề sử dụng giun đất làm thuốc trong nhân dân ở Việt Nam và Lào. Những vấn đề nghiên cứu trong khoa học sự sống. *Báo cáo Khoa học toàn quốc 2004*: 31-34.

Trần THT, Nguyễn TGH (2003). Nghiên cứu một số tác dụng dược lý của Địa long để ứng dụng điều trị bệnh tăng huyết áp. *Tạp chí Dược học* **325**: 17-19.

Yan XM, Kim CH, Lee CK, Shin JS, Cho H, Sohn UR (2010). Intestinal absorption of fibrinolytic and proteolytic Lumbrokinase extract from earthworm, *Eisenia andrei*. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**: 71-75.

Yuan X, Cao C, Shan Y, Zhao Z, Chen J, Cong Y (2006). Expression and characterization of earthworm *Eisenia foetida* lumbrokinase in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol* **36**(3): 273-279.

COLLECTION AND CLASSIFICATION OF SOME EARTHWORM SPECIES WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY IN VIETNAM

Le Dinh Quyen¹, Ly Thi Bich Thuy¹, Do Thi Tuyen¹, Vu Thi Bich Ngoc¹, Tran Thi Thanh Binh², Quyen Dinh Tai²

¹VietNam Academy Science and Technology
²HaNoi National University of Education

SUMMARY

Lumbrokinase is a group of some fibrinolytic enzymes extracted from earthworms. These enzymes can not only hydrolyze fibrin directly but also activate plasminogen to plasmin-the active fibrinolytic enzyme of the body. Thus, lumbrokinase can be used for the treatment of thrombosis. In order to exploit the genetic resource of Vietnam for the study on the production of recombinant lumbrokinase, earthworms from several areas near Ha Noi, such as Bac Ninh, Thai Nguyen, Ha Noi and Ninh Binh were collected. Twenty two earthworm samples were screened based on the fibrinolytic activity and then classified by using morphological analysis, 16S rRNA gene-based and cytochrome C oxidase I (COI) gene-based molecular analysis method. The results showed that earthworms possess the highest fibrinolytic activity belonging to three species: *Pheretima elongata* (Bắc Ninh), *Perionyx excavatus* (Đông Anh) and *Pheretima robusta* (Thường Tín) with the activity of 11,06 U/mg, 9,8 U/mg and 6,73 U/mg, respectively.

Keywords: COI, earthworm, fibrinolytic, lumbrokinase, 16S rRNA
 * Author for correspondence: Tel: 043 7568260; Email: quyen@ibt.ac.vn