



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003013

(51) **C07K 14/46; A61K 38/16; A61P 31/04**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00433

(22) 04/12/2020

(67) 1-2020-07056

(45) 26/12/2022 417

(43) 27/06/2022 411

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

(72) Lã Thị Huyền (VN); Trần Mạnh Hải (VN); Nguyễn Thị Đà (VN); Nguyễn Trọng
Linh (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP SẢN XUẤT PEPTIT BREVININ TỪ DA ÉCH
SYLVIRANA GUENTHERI CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG UNG THƯ**

(57) Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư, trong đó peptit này là Brevinin chiết xuất từ da ếch *Sylvirana guentheri*. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri* có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư. Peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư này có tác dụng ức chế phổ rộng tốt đối với sự phát triển của vi khuẩn. Nó có thể được sử dụng cho các mục đích dược phẩm và mỹ phẩm, có triển vọng ứng dụng thị trường và có giá trị kinh tế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh dược, và đặc biệt liên quan đến một peptit Brevinin và các đồng phân của chúng có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư, và phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri* có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit kháng khuẩn là một loại peptit phân tử nhỏ có hoạt tính kháng khuẩn do sinh vật tạo ra trong các điều kiện môi trường nào đó và chúng có các đặc điểm là trọng lượng phân tử nhỏ, đa dạng và phổ kháng khuẩn rộng. Éch nhái là động vật lưỡng cư, da của chúng có chức năng hỗ trợ hô hấp, ẩm và tiếp xúc trực tiếp với môi trường nhiều các vi sinh vật bên ngoài. Để thích nghi với môi trường sống, các tuyến da bề mặt của ếch tiết ra hàng loạt peptit kháng khuẩn để chống lại sự xâm nhập của các mầm bệnh bên ngoài. Peptit kháng khuẩn của ếch có tác dụng ức chế rõ rệt đối với sinh vật nhân sơ bao gồm vi khuẩn Gram dương, vi khuẩn Gram âm, virus,... và cả trên nấm, tế bào ung thư,... nhưng ít có tác dụng đối với sinh vật nhân chuẩn hoặc không có tác dụng diệt rõ rệt. Đồng thời, peptit kháng khuẩn của ếch có đặc tính kháng khuẩn phổ rộng, tức là peptit kháng khuẩn có thể ức chế việc tiêu diệt các loại vi khuẩn khác nhau. Csordas và cộng sự. tìm thấy peptit kháng khuẩn Bominin trong chất tiết da của chim chuông châu Âu và bắt đầu nghiên cứu về peptit kháng khuẩn của ếch. Sau đó, Morikawa et al. phân lập được họ Brevinin-1 của peptit kháng khuẩn từ ếch Nhật Bản; Isaacson và cộng sự. thu được Japonicin từ ếch rừng Nhật Bản; Conlon đã phân lập bốn peptit kháng khuẩn họ Japonicin-2 từ da ếch nâu Trung Quốc. Peptit kháng khuẩn ếch có giá trị ứng dụng rất lớn và đã được chú ý trong y học và thực phẩm. Nó được kỳ vọng sẽ trở thành thể hệ thuốc kháng

khuẩn mới và phụ gia thực phẩm mới, nhằm giải quyết tình trạng kháng thuốc và tác dụng phụ của kháng sinh hiện nay.

Peptit kháng khuẩn của động vật ếch là một polypeptit phân tử nhỏ có trọng lượng phân tử nhỏ khoảng 4.000 Da, thường bao gồm 10 đến 50 gốc axit amin, tính kháng nguyên thấp, hòa tan trong nước tốt và có tính kiềm mạnh. Phân tử peptit kháng khuẩn của ếch chứa các axit amin kỵ nước như leucin và isoleucin, do đó có tính kỵ nước, đóng một vai trò quan trọng trong hoạt động kháng khuẩn và hoạt động tán huyết của peptit kháng khuẩn; nó cũng chứa arginin và lysin: các axit amin tích điện dương, và do đó là các polypeptit dương, đây là đặc điểm quan trọng ảnh hưởng đến cơ chế kháng khuẩn và kháng ung thư của các peptit kháng khuẩn. Peptit kháng khuẩn ếch có khả năng chịu nhiệt tốt, có khả năng chịu được pH và cường độ ion cao. Hầu hết các peptit kháng khuẩn có điểm đẳng điện khoảng 10. Ngoài ra, một số peptit kháng khuẩn còn có khả năng chống lại sự thủy phân bởi các enzym tiêu hóa như trypsin, pepsin và các loại tương tự.

Các hoạt tính sinh học của peptit kháng khuẩn ở ếch chủ yếu như sau: (1) Hoạt tính kháng khuẩn: peptit kháng khuẩn ở ếch có phổ kháng khuẩn rộng và có khả năng chống lại vi khuẩn Gram dương, vi khuẩn Gram âm và nấm. Brevinin-2 được phân lập từ da của loài ếch nhỏ có khả năng ức chế *Bacillus subtilis*, *Burkholderia*, *S. nước bọt*, *Aeromonas*, *C. faecalis*, và *Vibrio oxidans* giá trị MIC từ 3 đến 500 µg/mL. (2) Hoạt động kháng virus: Một số peptit kháng khuẩn của ếch đã được tìm thấy có hoạt tính kháng virus, đặc biệt là virus ARN và DNA. Ví dụ, Esculentin-2P được phân lập từ da của ếch Bão có thể ức chế hoạt động của virus ếch; Ngoài ra, peptit kháng khuẩn thu được từ da của loài ếch lá Nam Mỹ là Dermaseptin cũng có tác dụng ức chế virus herpes đáng kể. (3) Hoạt động chống khối u: Một số peptit kháng khuẩn của ếch cũng có hoạt tính chống khối u, và có thể hoạt động có chọn lọc trên các tế bào khối u mà không ảnh hưởng đến các tế bào bình thường của cơ thể, tức là có tác dụng nhắm mục tiêu vào các tế bào khối u. Ví dụ, Temporin L phân lập từ tiết da của ếch rừng châu Âu có thể trực tiếp gây chết tế bào khối u; peptit kháng khuẩn Maximin thu được từ kỳ nhông khổng lồ Trung Quốc có tác dụng

ức chế rõ ràng các tế bào khối u ở nồng độ rất nhỏ. (4) Hoạt động tán huyết: Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số peptit kháng khuẩn của ếch có khả năng làm tan các tế bào máu của động vật có vú, chẳng hạn như peptit Brevinin-1 của ếch khổng lồ Nhật Bản có khả năng ly giải tế bào máu. Trong số đó, tính kỵ nước cao, tính xoắn và cấu trúc lưỡng tính của peptit kháng khuẩn quyết định đặc tính tan máu của peptit kháng khuẩn. (5) Các hoạt động khác: Peptit kháng khuẩn của ếch cũng có hoạt tính chống động vật nguyên sinh, chống hoạt động của tinh trùng, độc tính với phôi thai, thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương, điều hòa hóa học và kích hoạt miễn dịch, tham gia vào quá trình điều hòa miễn dịch, giúp tăng tiết insulin, giảm lượng đường trong máu và các tác dụng khác. Chuỗi peptit dermaseptin kháng khuẩn thu được từ da của loài ếch lá Nam Mỹ có tác dụng ức chế đáng kể Plasmodium. Các peptit kháng khuẩn Maximin1 và Maximin 3 thu được từ da của kỳ nhông khổng lồ Trung Quốc có hoạt tính hãm tinh trùng đáng kể đối với tinh trùng người bình thường. Ở nồng độ peptit kháng khuẩn 100µg/mL, peptit kháng khuẩn và tinh trùng được giữ trong 30 phút, 80% Mất hoạt tính của tinh trùng. Peptit kháng khuẩn Magainin-2-amide của *Xenopus laevis* có độc tính đáng kể đối với phôi và có thể gây chết phôi ở động vật có vú. Ngoài ra, cũng có những nghiên cứu về peptit kháng khuẩn của ếch có thể đẩy nhanh quá trình chữa lành vết thương. Các peptit kháng khuẩn của ếch tiềm năng có trọng lượng phân tử nhỏ, đặc tính kháng khuẩn phổ rộng, không gây độc và tác dụng phụ trên các tế bào và mô bình thường của con người, đã được chú ý rộng rãi trong y học và thực phẩm. Một mặt, do việc sử dụng rộng rãi thuốc kháng sinh, các chủng kháng thuốc đã thay đổi, thậm chí xuất hiện các siêu vi khuẩn, và các peptit kháng khuẩn không dễ sinh ra kháng thuốc, và nó được kỳ vọng sẽ trở thành một loại thuốc kháng khuẩn mới. Ngoài ra, các peptit kháng khuẩn của ếch có tác dụng chống tinh trùng, chống khối u và làm nhanh lành vết thương, làm cho peptit kháng khuẩn ở ếch trở thành một loại thuốc lâm sàng tiềm năng khác với thuốc kháng khuẩn. Mặt khác, peptit kháng khuẩn của ếch có thể được sử dụng làm chất bảo quản an toàn và không độc hại cho việc bảo quản thực phẩm, do đó thay thế các chất bảo quản hóa học có tác dụng phụ độc hại. Tuy nhiên, do hạn chế về

tài nguyên thiên nhiên và không đủ công nghệ, peptit kháng khuẩn cần được nghiên cứu và thăm dò thêm để có thể tiến hành sản xuất công nghiệp quy mô lớn.

Gần đây, nhóm của Giáo sư Teng Lirong (Trung Quốc) đã khám phá các tuyến sản xuất tốt nhất để chiết xuất, tách, tinh chế và điều chế trong thí nghiệm, và đã phát triển thành công các sản phẩm kháng khuẩn của các peptit kháng khuẩn *Rana sylvestris*. Teng Lirong cho biết, chất chống peptit của *Rana sylvestris* có tác dụng ức chế mạnh các vi sinh vật gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* và virus. Nó cũng có khả năng chống axit và kiềm, chịu nhiệt độ cao và khả năng chống chịu. Thuốc, tác dụng nhanh, không dư lượng, không có tác dụng phụ độc hại đối với tế bào bình thường của con người. Nó đã hình thành một loạt các sản phẩm chống vi khuẩn trên da, chăm sóc chân, sức khỏe sinh sản, chăm sóc kháng khuẩn và các sản phẩm khác.

Công bố Patent CN110183528A của Liu Quan Trung Quốc đề cập tới peptit mới từ ếch *Xarwnin*, loại ếch cây Nga Mỹ có tác dụng kháng khuẩn và loại bỏ gốc tự do cũng như đề cập tới phương pháp tách peptits từ da ếch bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp. Sáng chế mã số CN1043874 công bố peptit Brevinin-2CE từ ếch rừng Trung Quốc biến đổi các vị trí B2-N26-V5K và ứng dụng trong y dược. Sáng chế mã số CN110205336A của Lin Jinglian cập nhật đến peptit tái tổ hợp Brevinin-2GUb gắn vào các vectơ pET và biểu hiện trong *E.coli*, tinh sạch và cắt bằng enzym *enterokinaza*. Các patent đều đã đề cập đến một số peptit Brevinin từ da ếch và các ứng dụng, các phương pháp sản xuất từ da ếch tự nhiên, từ tái tổ hợp nhưng mỗi sáng chế đều có hạn chế nhất định: thu từ tự nhiên thì rất khó khăn về nguồn mẫu và phương pháp phức tạp do đó phương pháp tái tổ hợp là một phương pháp có ưu điểm hơn là dễ dàng sản xuất với quy mô lớn, tuy nhiên sáng chế CN110205336A sản xuất peptit ở *E.coli* sẽ hạn chế vì chủng gram âm này có nội độc tố, có thể sẽ phức tạp trong việc tinh chế và ảnh hưởng tới sản phẩm, không thể ứng dụng được chế phẩm thô.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất peptit từ da của ếch *Sylvirana guentheri* Việt Nam cùng các đồng phân của chúng có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư cũng như phương pháp sản xuất và ứng dụng trong dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm giải quyết các hạn chế nêu ra ở trên.

Mục đích của sáng chế là phát triển một peptit Brevinin kháng khuẩn mới được phân lập từ da của ếch *Sylvirana guentheri* Việt Nam và phương pháp sản xuất ra peptit này dưới dạng tái tổ hợp với nhiều lần lặp lại trong một phân tử và ứng dụng chúng trong mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm. Peptit kháng khuẩn do sáng chế đề xuất có độ dài là 24 axit amin, và trình tự của chúng là FLGALFKVASKLVPA AICSFSKKC có trọng lượng phân tử là 2,53 KDa, điểm đẳng điện là 10,35 và liên kết disulfua giữa trình tự axit amin thứ 18-24. Sáng chế cung cấp thêm việc sử dụng peptit kháng khuẩn trong các thí nghiệm kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư. Cụ thể, peptit kháng khuẩn theo sáng chế có tác dụng ức chế đáng kể đối với *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* gây bệnh, *Klebsiella pneumonia* (ATCC) cho thấy rằng peptit kháng khuẩn phổ rộng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và có nhiều ứng dụng hơn. Peptit có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy mạnh: ung thư dạ dày AGS, ung thư phổi A549, ung thư đại tràng HCT116, ung thư máu Jurkat, HL60. Ngoài ra, peptit kháng khuẩn theo sáng chế về cơ bản không bị tán huyết và ảnh hưởng ít lên sự phát triển của tế bào lành, có triển vọng ứng dụng tốt để điều chế dược phẩm.

Cụ thể, sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư bao gồm:

- peptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO.1 tách từ da ếch *Sylvirana guentheri*, có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư cao.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới ADN mã hoá cho đoạn peptit điểm 1

bao gồm 217 cặp bazơ nitơ trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO.2 .

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới đoạn trình tự ADN mã hoá cho peptit số 1 lặp lại 6 lần trong trình tự số 3.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư bao gồm các bước sau:

(1) Chèn trình tự SEQ ID NO.3 vào vector pStrepHis1525 chứa LipA, đuôi His và vị trí phân cắt của pepsin để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp;

(2) Vector biểu hiện tái tổ hợp thu được ở bước (1) được biến nạp vào *Bacillus megaterium* để thu được chủng biểu hiện tái tổ hợp;

(3) Chủng được tái tổ hợp thu được ở bước (2) được cảm ứng để biểu hiện, ly tâm thu dịch, rửa lại bằng muối amôn sunphát và được hoà lại trong PBS và sắc ký ái lực strep hoặc ion niken để thu được một protein dung hợp;

(4) Protein dung hợp thu được ở bước (3) được thẩm tách dựa trên dung dịch đệm phân hủy pepsin, và sau đó protein dung hợp thẩm tách được phân cắt với pepsin, và sau đó cho qua sắc ký ái lực ion niken và strep, dịch thu được cô đặc để thu Brevinin tinh sạch cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là Kết quả nhân bản gen mã hoá cho các peptit từ cADN tách từ da ếch *Sylvirana guentheri*. Đường chạy M là chỉ thị ADN, đường chạy 1,2,3 là các mẫu nhân bản gen mã hoá cho các peptit từ 3 mẫu cADN của ếch *Sylvirana guentheri*. Kết quả cho thấy chỉ mẫu 3 có băng sản phẩm rõ ràng hơn trong vùng khoảng 217bp. Khả năng mẫu 3 đã nhân bản được các gen mã hoá cho các peptit.

Hình 2 là Hình ảnh điện di kết quả chọn dòng plamit pSrepHis mang gen 6xBrevinin8.13 bằng phương pháp PCR khuôn lạc. Đường chạy M là chỉ thị ADN, đường chạy 1,2,3,4 lần lượt là các mẫu PCR từ vector pStrepHis gốc, khuôn lạc 1, 2 và 3. Kết quả cho thấy đường chạy 3, 4 lên băng có kích thước bằng tổng kích thước gen mã hoá cho peptit lắp lại và phần vector, do đó khả năng khuôn lạc 2 và 3 đã mang vector tái tổ hợp pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis

Hình 3 là kết quả biến nạp vector tái tổ hợp pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis vào chủng *Bacillus megaterium*

Hình 4 là kết quả phân tích HPLC của peptit Brevinin sau khi tinh sạch và cắt với pepsin

Hình 5 là Kết quả thử nghiệm ức chế sự phát triển tế bào ung thư phổi A549 của peptit Brevinin 8.13, giá trị IC₅₀ là 31,6 μ M

Hình 6 là Kết quả thử nghiệm ức chế sự phát triển tế bào ung thư dạ dày AGS của peptit Brevinin 8.13, giá trị IC₅₀ là 7,5 μ M

Hình 7 là Kết quả thử nghiệm ức chế sự phát triển tế bào ung thư đại tràng HCT116 của peptit Brevinin 8.13, giá trị IC₅₀ là 9,2 μ M

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây có dựa vào các hình vẽ kèm theo, các hình vẽ này nhằm mục đích minh họa các phương án của sáng chế mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư bao gồm:

- peptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO. 1.

Đặc điểm thứ nhất của peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư theo phương án này là peptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO. 1 Peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri*, có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư cao. Peptit Brevinin kháng khuẩn mới của ếch Việt Nam được phân lập từ da của ếch *Sylvirana guentheri* có độ dài là 24 axit amin, và trình tự của chúng là FLGALFKVASKLVPAACSFSSKKC có trọng lượng phân tử là 2,53 KDa, điểm đẳng điện là 10,35 và liên kết disulfua giữa trình tự axit amin thứ 18-24.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư trong đó:

- ADN mã hoá cho đoạn peptit điểm 1 bao gồm 217 cặp bazơ nitơ trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO. 2. Đoạn trình tự mã hoá cho peptit ở điểm 1 được tách dòng từ ếch *Sylvirana guentheri* bao gồm cả peptit tín hiệu và vùng đệm.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư trong đó:

- đoạn trình tự ADN mã hoá cho peptit số 1 lặp lại 6 lần trong trình tự số 3

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư trong đó:

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập tới peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư trong đó:

- Phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit sử dụng trình tự SEQ ID NO.3 trong điểm 3 hợp bao gồm các bước sau:

(1) Chèn trình tự SEQ ID NO.3 vào vectơ pStrepHis1525 chứa LipA, đuôi His và vị trí phân cắt của pepsin để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp;

(2) Vectơ biểu hiện tái tổ hợp thu được ở bước (1) được biến nạp vào *Bacillus megaterium* để thu được chủng biểu hiện tái tổ hợp;

(3) Chủng được tái tổ hợp thu được ở bước (2) được cảm ứng để biểu hiện, ly tâm thu dịch, rửa lại bằng muối amon sulfat và được hoà lại trong PBS và sắc ký ái lực strep hoặc ion niken để thu được một protein dung hợp;

(4) Protein dung hợp thu được ở bước (3) được thẩm tách dựa trên dung dịch đệm phân hủy pepsin, và sau đó protein dung hợp thẩm tách được phân cắt với pepsin, và sau đó cho qua sắc ký ái lực ion niken và strep, dịch thu được cô đặc để thu Brevinin tinh sạch cao.

Phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri* có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư bao gồm các bước:

- (i) Tạo vectơ chứa trình tự mã hóa Brevinin lặp lại:

- Vectơ pStrepHis1525 được mở vòng bằng enzym *Bam*HI và *Xma*I;

- Chèn trình tự gen mã hóa Brevinin lặp lại chứa 6xBrevinin có trình tự SEQ ID NO: 3 vào vectơ pStrepHis1525 chứa LipA, đuôi His và vị trí phân cắt của pepsin sử dụng enzym lipaza T4, thu vectơ pStrepHis-SPlipA-STREP-

6x(ALBrevinin)-AL-6xHis, trong đó gen mã hóa Brevinin được tách từ da ếch *Sylvirana guentheri* có trình tự trong SED ID NO: 1;

(ii) Tạo chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis:

- Nuôi *B. megaterium* trong môi trường Paris (Brockmeier, 2006) đến khi $OD_{580} = 1$, thu dịch nuôi cấy, trong đó môi trường Paris (Brockmeier, 2006) có thành phần: K_2HPO_4 60 mM; KH_2PO_4 40 mM, Trisodium axetat 3 mM; Kali glutamat 20 mM; Fe(III)- NH_4 -xitrat 2,2 mg/l; Axit casamino 0,1% (khối lượng); Glucoza 1% (khối lượng); Tryptophan 20 mg/l; $MgSO_4$ 3 mM;

- chuyển 0,5 ml dịch nuôi cấy vào các ống ly tâm 1,5ml và bổ sung 0,1 – 1 μ g vectơ pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis, ủ từ 1-3 giờ ở 37°C, thu *B. megaterium* biến nạp;

- sau đó cấy trải *B. megaterium* biến nạp trên đĩa thạch LB có kháng sinh tetracyclin và nuôi ở 37°C qua đêm, thu *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis;

(iii) Nuôi cấy *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis thu protein tái tổ hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis:

- nuôi cấy *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis trong 50 mL môi trường LB có chứa kháng sinh tetracyclin, nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C qua đêm, thu dịch nuôi cấy cấp 1;

- cho dịch nuôi cấy cấp 1 vào 5L môi trường lỏng LB có chứa kháng sinh tetracyclin theo tỷ lệ 1:100 (thể tích:thể tích), nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C cho tới khi $OD_{600}=0,3-0,6$, cảm ứng với xyloza nồng độ cuối cùng đạt 0,5% trong 20 giờ ở nhiệt độ 25°C, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút thu môi trường nuôi cấy;

- bổ sung 20 g amonium sunfat, hoà tan và ủ ở 4°C qua đêm;

- ly tâm 13.000 vòng/phút thu cặn, hoà lại trong dung dịch đệm chứa 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% glycerol (khối lượng), 20 mM imidazol, pH=

8,5, và thu dịch nổi phía trên bằng ly tâm, thu được protein tái tổ hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis;

(iv) Tinh chế thu peptit Brevinin:

- protein dung hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis thu được từ bước (iii) được đặt trong đệm cắt pepsin chứa 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 3 mM GSH (glutathion khử), thẩm tích trong 24 giờ trong glutathion, pH= 8,0, bổ sung lượng pepsin 2U trên mỗi mg protein dung hợp, thực hiện cắt với pepsin ở 25°C trong 24 giờ, thu protein dung hợp sau cắt pepsin;

- protein dung hợp sau cắt pepsin được tinh chế bằng sắc ký ái lực ion niken và cột strep, thu peptit Brevinin vẫn tồn tại trong dung dịch không bám với cột;

- cô đặc dung dịch peptit Brevinin thu được bằng ống ly tâm màng 3 kDa và được thẩm tích với đệm PBS ở 4°C, thu được peptit Brevinin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau đây.

Ví dụ 1: Tách dòng gen mã hoá peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri*

Vì gen trong mỗi loài ếch có thể có nhiều loại peptit khác nhau và peptit của ếch *Sylvirana guentheri* Việt Nam chưa được nghiên cứu, mỗi nhân bản được thiết kế dựa trên trình tự đã công bố, các đoạn mồi P1 (SEQ ID NO.4) và P2 (SEQ ID NO.5) được thiết kế và đặt tổng hợp. Tiếp theo, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi P1 và P2 và cADN của ếch *Sylvirana guentheri* làm khuôn với chu kỳ bao gồm các phản ứng ở nhiệt độ 94°C trong 3 phút, 49°C trong 45 giây và 72°C trong 1 phút, chu trình được thực hiện 30 lần. Kết quả là, thu được một đoạn khuếch đại dài khoảng 217 bp. Đoạn ADN này được tách dòng trong plasmit pCR2.1 bằng cách sử dụng "Kit tách dòng TA" do Invitrogen sản xuất, chọn dòng để thu được gen mã hoá cho peptit Brevinin 8.13. Sau đó, xác định trình tự nucleotit của đoạn được tách dòng.

Ví dụ 2: Tạo vector tái tổ hợp pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis

Theo trình tự gen mã hoá Brevinin lắp lại được tổng hợp và gắn trong vector PUC47 bởi Công ty Genscript (Mỹ), tối ưu mã biểu hiện trong *Bacillus*, 2 đầu gắn sẵn vị trí cắt của enzym *Bam*HI và *Xma*I. Vector pStrepHis cũng được mở vòng với 2 enzym này. Các mẫu được điện di trên gel agarosa 1% (w/v) để thu được đoạn gen chứa 6xBrevinin với kích thước khoảng 495 bp, và đoạn gen đã được tinh sạch thu hồi. Sau đó, đoạn gen Brevinin thu hồi được chèn vào vector pStrepHis dưới tác dụng của enzym T4 ligaza ; sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α , pcR kiểm tra khuẩn lạc với cặp mồi có trình tự số 4 và 5. Sản phẩm phản ứng PCR khuẩn lạc được điện di trên gel agarosa 1% (w/v).

KẾT QUẢ: Như trong Hình 2, các dòng 2 và 3 với kích thước chính xác (khoảng 500 bp) đã được giải trình tự và xác định các plasmit tái tổ hợp dòng 1 và 2 đã được giải trình tự chính xác, và vector biểu hiện tái tổ hợp pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis đã được tạo thành công.

Ví dụ 3: Tạo chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* (B.megaterium) mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis

Tế bào khả biến của *B. megaterium* được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường Paris (Brockmeier, 2006) với thành phần: K₂HPO₄ (60 mM); KH₂PO₄ (40 mM), Trisodium axetat (3 mM); Kali glutamat (20 mM); Fe(III)-NH₄-xítat (2,2 mg/l); Axit casamino (0,1%); Glucoza (1%); Tryptophan (20 mg); MgSO₄ (3 mM).

Phương pháp này được thực hiện theo Brockmeier (2006) đưa plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn ở giai đoạn pha log. Cụ thể: nuôi *B.megaterium* DV01 trên môi trường Paris đến khi OD₅₈₀ = 1, chuyển 0,5 ml dịch nuôi cấy vào các ống ly tâm 1,5ml và bổ sung 0,1 – 1 μ g DNA plasmid pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis và ủ từ 1-3 h ở 37°C sau đó cấy trải trên đĩa LB + kháng sinh và nuôi ở 37°C qua đêm.

Kết quả thu được các khuẩn lạc riêng rẽ (Hình 3). Các khuẩn lạc này tiếp tục được *Kiểm tra có mang các plasmid* pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis hay không bằng cách tách plasmid: Các khuẩn lạc được nuôi cấy qua đêm (16 – 20 h) trên môi trường LB chứa kháng sinh tetracyclin, sau đó tiến hành ly tâm 6000 v/p, 10 phút, loại dịch thu sinh khối tế bào. Tách plasmid bằng kit tách QIAGEN. DNA được thu lại trong 50 µl TE và điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và cắt kiểm tra với với enzym giới hạn *Bam*HI và *Xma*I.

Phản ứng cắt enzym giới hạn được thực hiện với *Bam*HI và *Xma*I (New England Biolab) với thành phần như sau: 3 µl plasmid; 1 µl dung dịch đệm thông minh, 0,5 µl *Bam*HI; 0,5 µl *Xma*I và H₂O đủ 10 µl. Phản ứng cắt ở 37°C trong 2h, điện di kiểm tra sản phẩm cắt. Kết quả đã khẳng định được chủng *B. megaterium* đã mang plasmid pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis

Ví dụ 4: Biểu hiện protein SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis

Nuôi cấy *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis các tế bào biến nạp trong môi trường LB có chứa kháng sinh, nuôi lắc 250 v/ph ở nhiệt độ 25°C; 37°C cho tới khi OD_{600nm} = 0,3; 0,6; 1. Cảm ứng với xylozơ nồng độ cuối cùng đạt 0,25%; 0,5% và 1%; thu mẫu sau 6h, 24h. Ly tâm thu môi trường nuôi cấy.

Tủa protein trong dịch nuôi cấy với amonium sulfat: Bổ sung 600mg amonium sulfat vào 1,5 ml ủ lắc 4°C trong 2h. Ly tâm tốc độ 13000v/p 30 phút ở 4°C. Loại dịch nổi, ly tâm lại 1 phút, loại bỏ hoàn toàn dịch ly tâm. Thêm 10 µl urea 8M (pha trong Tris-HCl, pH7.5) và 5 µl dung dịch đệm SDS để hoà tan protein. Ly tâm nhẹ và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Sau đó điện di kiểm tra mẫu trên SDS – PAGE 12,5%. Chạy điện di với cường độ dòng điện là 40 mA, đến khi chất màu cách đáy bản gel khoảng 1 mm thì dừng lại và nhuộm với dung dịch CBB (Coomassie brilliant blue R-250).

Kết quả: Các tế bào cho thấy các dải protein đích rõ ràng cho thấy rằng protein dung hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis đã được biểu

hiện thành công ở tế bào *Bacillus megaterium*. Năng suất của protein dung hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis cao nhất ở 20°C trong 20 giờ. Do đó, nhiệt độ tối ưu để cảm ứng sự biểu hiện của protein dung hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis là 16°C.

Ví dụ 5: Tinh sạch protein dung hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis bằng sắc ký ái lực ion niken

Dòng tế bào trong ví dụ 5 được cấy vào 50 mL môi trường lỏng LB và được nuôi cấy ở 37°C qua đêm với tốc độ 220 vòng/ phút. Sau đó, dung dịch được cấy vào 5L môi trường lỏng LB (chứa kháng sinh tetracyclin) theo tỷ lệ 1: 100 (v/v), và được nuôi cấy ở 37°C, 220 vòng/phút. Khi OD600 = 0,3-0,6, cảm ứng với xylozơ. Nồng độ cuối cùng là 0,5% và thu mẫu sau 20 giờ trong máy lắc ở 25°C.

Sau khi kết thúc biểu hiện, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch và bổ sung 20g amonium sunfat hoà tan ở 4°C qua đêm. Ly tâm 13000 v/p thu cặn hoà lại trong dung dịch đệm (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% glycerol, 20 mM imidazol, pH 8,5), và phần nổi phía trên được thu thập bằng cách ly tâm, tiếp theo là tinh chế ion niken pro bằng sắc ký, thu phần đi qua mẫu lỏng và trước và sau khi tinh chế mẫu để phát hiện SDS-PAGE.

Kết quả cho thấy protein tái tổ hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis đã được tinh chế và rửa giải thành công với 250, 500 mM imidazole, và trọng lượng phân tử protein phù hợp với kích thước lý thuyết.

Ví dụ 6: Phân cắt protein dung hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis với pepsin và tinh chế bằng sắc ký ái lực ion niken

Protein dung hợp SPLipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis thu được trong Ví dụ 5 được đặt trong đệm cắt pepsin (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 3Mm GSH (glutathione khử), thẩm tích trong 24 giờ trong glutathione, pH 8,0, lượng pepsin 2U trên mỗi mg protein dung hợp được cắt ở 25°C trong 24 giờ.

Protein dung hợp sau khi cắt với pepsin được tinh chế bằng sắc ký ái lực ion niken và cột strep, 6xHis và Strep được liên kết lại với cột niken và cột

strep peptit Brevinin được vẫn tồn tại trong dung dịch không bám với cột. Sau đó peptit được cô đặc bằng ống ly tâm màng 3 kDa và được thẩm tích với đệm PBS ở 4°C. Peptit Brevinin được phân tích HPLC.

Kết quả: Hình 4 protein dung hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis đã được tinh chế thành công bằng cách cắt với enzym pepsin. Strep và 6xHis được liên kết lại với cột niken và rửa giải với 500 mM imidazole. Brevinin được thu lại, và trọng lượng phân tử của Brevinin phù hợp với kích thước lý thuyết.

Ví dụ 7: Ước chế sự phát triển của tế bào ung thư bằng polypeptit Brevinin

Thử nghiệm hoạt tính trên tế bào của peptit được xác định theo phương pháp MTT và MTS. 5 dòng tế bào ung thư được dùng là: ung thư gan HepG2, ung thư dạ dày (AGS), ung thư đại trực tràng (HCT116), ung thư máu (Jurkat, HL60) và dòng tế bào thường nguyên bào sợi (NBS).

Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng có mật độ 10^4 tế bào/giếng, với môi trường nuôi cấy chứa 10% FBS và 1% P/S, ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được xử lý với peptit tại các nồng độ khác nhau. Sau 72 giờ, 10 μ L dung dịch MTT hoặc MTS được bổ sung vào mỗi giếng trong điều kiện tránh sáng. Sau 4 giờ, lượng tế bào sống sót được xác định dựa trên chỉ số đo tại các bước sóng: 570nm với MTT và 490nm với MTS. Mỗi thử nghiệm có độ lặp lại ba lần.

Kết quả: Như trong Hình 7, sử dụng dung dịch làm việc chuẩn 0 ng / mL làm mẫu trắng, vẽ đường cong chuẩn của hàm lượng insulin, công thức tuyến tính là $Y = 0,2684X - 0,0447$, $R^2 = 0,9976$, cho biết đường cong chuẩn của hàm lượng insulin thành công rút ra, có thể được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo để xác định tính toán hàm lượng insulin.

Ví dụ 8: Ước chế sự phát triển của tế bào vi sinh vật gây bệnh

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal Inhibition Concentration, MIC) của peptit được xác định bằng phương pháp pha loãng đa nồng độ (micro-dilution method) lần lượt theo dải 1,89; 3,78; 7,56; 15,125; 31,25; 62,5; 125 µg/mL.

Các chủng vi khuẩn *E.coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 16 - 18 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm.

Sau khi nuôi cấy qua đêm, chọn ngẫu nhiên khuẩn lạc đưa vào ống nghiệm chứa 5 ml môi trường LB và điều chỉnh sao cho có khoảng 10^6 CFU/ml. Sau đó, nhỏ lần lượt 50µl vào từng giếng trên tổng số 96 giếng chứa sẵn peptit pha loãng có nồng độ khác nhau. Các giếng này sẽ được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Với mỗi chủng, một nồng độ được lặp lại 2 lần.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất peptit có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư có tác dụng kháng khuẩn tốt và khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư từ da của ếch *Sylvirana guentheri* và phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit này. Peptit kháng khuẩn có tác dụng ức chế phổ rộng tốt đối với sự phát triển của vi khuẩn. Nó có thể được sử dụng cho các mục đích dược phẩm và mỹ phẩm, có triển vọng ứng dụng thị trường tuyệt vời và giá trị kinh tế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri* có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư bao gồm các bước:

(i) Tạo vector chứa trình tự mã hóa Brevinin lắp lại:

- Vector pStrepHis1525 được mở vòng bằng enzym *Bam*HI và *Xma*I;

- Chèn trình tự gen mã hóa Brevinin lắp lại chứa 6xBrevinin có trình tự SEQ ID NO: 3 vào vector pStrepHis1525 chứa LipA, đuôi His và vị trí phân cắt của pepsin sử dụng enzym lipaza T4, thu vector pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis, trong đó gen mã hóa Brevinin được tách từ da ếch *Sylvirana guentheri* có trình tự trong SED ID NO: 1;

(ii) Tạo chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis:

- Nuôi *B. megaterium* trong môi trường Paris (Brockmeier, 2006) đến khi $OD_{580} = 1$, thu dịch nuôi cấy, trong đó môi trường Paris (Brockmeier, 2006) có thành phần: K_2HPO_4 60 mM; KH_2PO_4 40 mM, Trisodium axetat 3 mM; Kali glutamat 20 mM; Fe(III)- NH_4 -xitrat 2,2 mg/l; Axit casamino 0,1% (khối lượng); Glucoza 1% (khối lượng); Tryptophan 20 mg/l; $MgSO_4$ 3 mM;

- chuyển 0,5 ml dịch nuôi cấy vào các ống ly tâm 1,5ml và bổ sung 0,1 – 1 μ g vector pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis, ủ từ 1-3 giờ ở 37°C, thu *B. megaterium* biến nạp;

- sau đó cấy trải *B. megaterium* biến nạp trên đĩa thạch LB có kháng sinh tetracyclin và nuôi ở 37°C qua đêm, thu *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis;

(iii) Nuôi cấy *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis thu protein tái tổ hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis:

- nuôi cấy *B. megaterium* mang pStrepHis-SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis trong 50 mL môi trường LB có chứa kháng sinh tetracyclin, nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C qua đêm, thu dịch nuôi cấy cấp 1;

- cho dịch nuôi cấy cấp 1 vào 5L môi trường lỏng LB có chứa kháng sinh tetracyclin theo tỷ lệ 1:100 (thể tích:thể tích), nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C cho tới khi $OD_{600}=0,3-0,6$, cảm ứng với xyloza nồng độ cuối cùng đạt 0,5% trong 20 giờ ở nhiệt độ 25°C, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút thu môi trường nuôi cấy;

- bổ sung 20 g amonium sunfat, hoà tan và ủ ở 4°C qua đêm;

- ly tâm 13.000 vòng/phút thu cặn, hoà lại trong dung dịch đệm chứa 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% glycerol (khối lượng), 20 mM imidazol, pH= 8,5, và thu dịch nổi phía trên bằng ly tâm, thu được protein tái tổ hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis;

(iv) Tinh chế thu peptit Brevinin:

- protein dung hợp SPlipA-STREP-6x(ALBrevinin)-AL-6xHis thu được từ bước (iii) được đặt trong đệm cắt pepsin chứa 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 3 mM GSH (glutathion khử), thẩm tích trong 24 giờ trong glutathion, pH= 8,0, bổ sung lượng pepsin 2U trên mỗi mg protein dung hợp, thực hiện cắt với pepsin ở 25°C trong 24 giờ, thu protein dung hợp sau cắt pepsin;

- protein dung hợp sau cắt pepsin được tinh chế bằng sắc ký ái lực ion niken và cột strep, thu peptit Brevinin vẫn tồn tại trong dung dịch không bám với cột;

- cô đặc dung dịch peptit Brevinin thu được bằng ống ly tâm màng 3 kDa và được thẩm tích với đệm PBS ở 4°C, thu được peptit Brevinin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> Phương pháp tái tổ hợp sản xuất peptit Brevinin từ da ếch *Sylvirana guentheri* có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư

<160> 5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> *Sylvirana guentheri*

<400> 1

1 FLPVLRVAA KVGPAVFCAI TNKC

<210> 2

<211> 217

<212> ADN

<213> *Sylvirana guentheri*

<400> 2

1 ATGTTACCT TGAAGAAATC CCTGTTACTC CTTTCTTCC TTGGAACCAT CAACTTATCT
61 TTCTGCGAGG AAGAGAGAAA TGCTGATGAG GAAGAAAGAA GAGATGATCC CGATAAAATG
121 GATGCTGAAG TGCAAAAACG ATTTTGGGA GCGTTGTTCA AGGTGGCTTC TAAATTAGTA
181 CCAGCAGCTA TTTGTTTATT TTCTAAAAAA TGGTGAA

<210> 3

<211> 495

<212> ADN

<213> Tổng hợp

<400> 3

1 CCCGGGGGAT CCTTCCTGAA GTGGCTGTTT AAGTGGGCGA AAAAAGTGGT TCCGGCGGCG
61 ATTTGCAGCT TTAGCAAGAA ATGCGCGCTG TTCTGAAGT GGCTGTTTAA ATGGGCGAAG
121 AAGCTGGTGC CGGCGGCGAT TTGCAGCTTC AGCAAGAAAT GCGCGCTGTT CCTGAAATGG
181 CTGTTCAAAT GGGCGAAGAA ACTGGTTCCG GCGGCGATTT GCAGCTTTAG CAAGAAATGT
241 GCGCTGTTCC TGAAGTGGTT ATTCAAGTGG GCGAAGAAGC TGGTGCCGGC GGCGATTTGC
301 AGCTTTAGCA AGAAATGTGC ACTGTTCTTG AAGTGGTTGT TCAAGTGGGC GAAGAAACTG
361 GTTCCGGCGG CGATTTCAG CTTTAGCAAG AAATGTGCTC TGTTCTGAA GTGGCTTTTT
421 AAATGGGCGA AGAAAGTGGT TCCGGCGGCG ATTTGCAGCT TTAGCAAGAA GTGCGCGCTG
481 CATGCTTAAC CCGGG

<210> 4

<211> 21

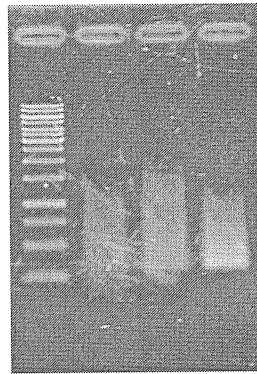
<212> ADN

<213> Tổng hợp

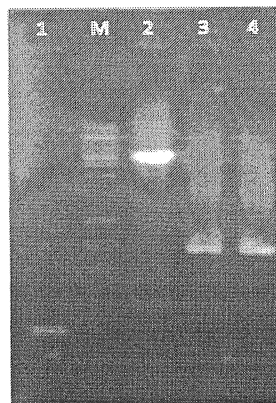
<400> 4

1 ATGTTACCT TRAAGAAAWC C

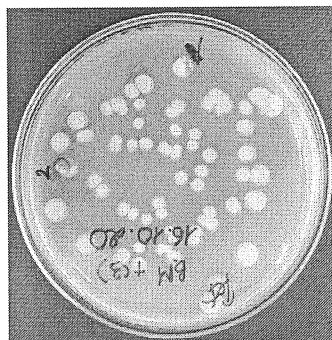
<210> 5
<211> 15
<212> ADN
<213> Tổng hợp
<400> 5
1 TTTTTTTTTT TTTT



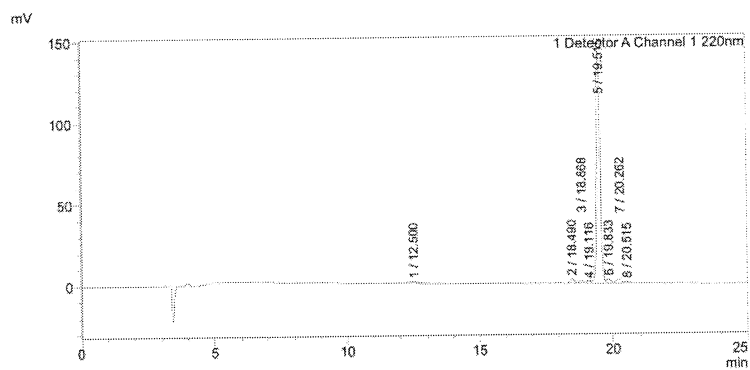
Hình 1



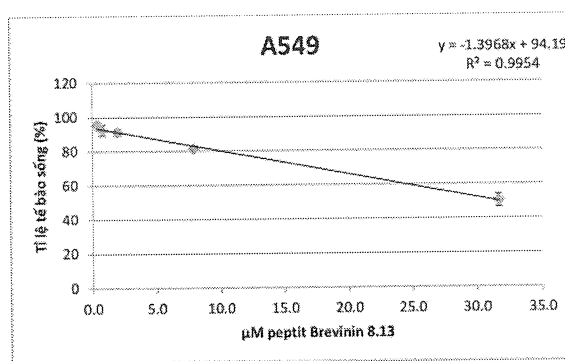
Hình 2



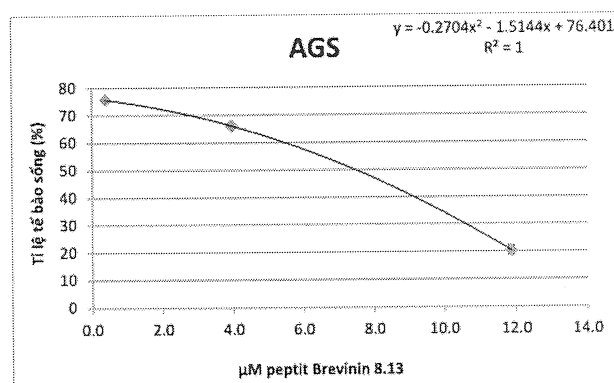
Hình 3



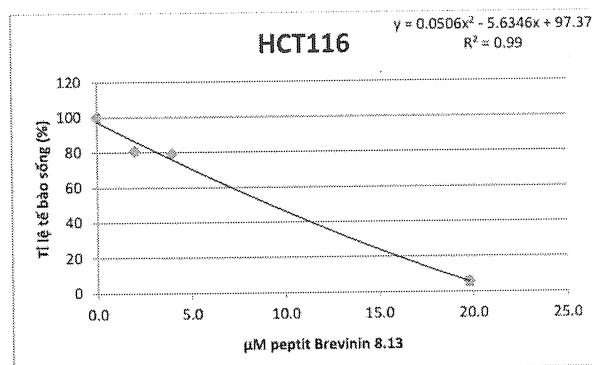
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7