



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

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

(11)



2-0003300

(51) **C12N 1/00**
2020.01

(13) **Y**

-
- (21) 2-2021-00030 (22) 22/01/2021
(45) 25/08/2023 425 (43) 25/05/2021 398
(73) 1. Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
2. Học viện Quân y (VN)
160 Phùng Hưng, Hà Đông, Hà Nội
(72) Nguyễn Thuỳ Dương (VN); Đỗ Minh Trung (VN); Nguyễn Văn Thư (VN); Hoàng
Văn Lương (VN); Nguyễn Việt Trung (VN); Nguyễn Việt Lượng (VN); Hồ Anh Sơn
(VN); Trần Văn Khoa (VN); Trần Việt Tiến (VN); Nguyễn Tùng Linh (VN); Nguyễn
Văn Long (VN); Phạm Thê Tài (VN); Lê Thị Hồng Hạnh (VN); Đỗ Thị Tuyên (VN);
Đỗ Hải Quỳnh (VN); Nguyễn Bảo Anh (VN); Nguyễn Đăng Tôn (VN); Nguyễn Hải
Hà (VN); Nông Văn Hải (VN).
-

(54) **CHỦNG VI KHUẨN SERRATIA SP. HVQY-IGR MANG GEN MÃ HOÁ PROTEIN
PIGC TÁI TỔ HỢP**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR có chứa vector pET22b tái tổ hợp có mang cấu trúc Lac promoter - *pigC*. Cấu trúc này được xây dựng bằng cách nối sản phẩm khuếch đại vùng Lac promoter với gen *pigC* của chủng *Serratia* sp. SM; sau đó chèn vào vector pET22b. Vector này sau khi được chọn dòng trong *E. coli* sẽ được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM, tiến hành chọn dòng thu được chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR. Chủng này cho phép tổng hợp prodigiosin với hàm lượng cao hơn 1,04 lần so với chủng ban đầu trong cùng một điều kiện nuôi cấy. Hoạt chất prodigiosin thu được có thể ức chế một số dòng tế bào ung thư: Hep3B; MCF7; H460; Hep2 và kháng một số chủng nấm gây bệnh thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. Neoformans*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến việc cải biến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR mang gen mã hoá protein PigC tái tổ hợp thuần khiết về mặt sinh học, sản xuất ra hợp chất prodigiosin có khả năng ức chế tế bào ung thư và một số loài nấm gây bệnh.

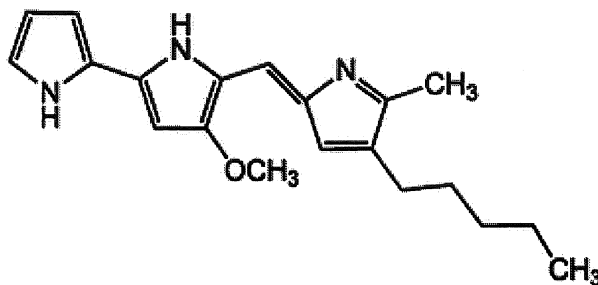
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *Pseudomonas putida* cho phép chúng có thể tổng hợp prodigiosin ứng dụng trong công nghiệp với năng suất lên tới 94 mg/l.

Prodigiosin, còn được gọi là sắc tố đỏ, là một chất chuyển hoá alkaloid thứ cấp có công thức hoá học $C_{20}H_{25}N_3O$ (5((3-methoxy-5-pyrrol-2-ylidene-pyrrol-2-ylidene)-methyl)-2-methyl-3-pentyl-1H-pyrrole) (hình 1), có khối lượng phân tử khoảng 323,4 Da. Prodigiosin có cấu tạo gồm 3 vòng tripyrrole, không tan trong nước, tan vừa trong alcohol và ether, tan tốt trong một số dung môi như chloroform, methanol, acetonitril và DMSO. Trong điều kiện thông thường, Prodigiosin dễ bị phân huỷ bởi ánh sáng. Bên cạnh đó, ở các điều kiện pH acid, prodigiosin có màu đỏ, khi chuyển sang môi trường kiềm, sắc tố của prodigiosin chuyển sang màu vàng cam



Cấu trúc phân tử của Prodigiosin

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

a, Hoạt tính kháng khuẩn:

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

màng sinh học của *Alteromonas* sp. ở nồng độ 10 mg/ml và prodigiosin 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bề mặt ảnh hưởng đến khả năng bám dính vào kính của *Balanus amphitrite*.

b, Hoạt tính kháng nấm

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

c, Hoạt tính kháng tế bào ung thư của prodigiosin

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

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

bào được lập trình của tế bào ung thư. Nhìn chung, hoạt tính kháng ung thư cũng như cơ chế kháng ung thư của prodigiosin đã được làm sáng tỏ.

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

Hợp chất	Loại mô/dòng tế bào	TLTK
Prodigiosin	Ung thư bạch cầu ở người/U937, Jurkat-T, NSO	Montaner and Perez-Tomas (2002)
	Ung thư phổi ở người/A549, NCI-H460	Llagostera et al. (2003)
	Ung thư vú ở người/MCF-7, MDA-MB-231	Soto-Cerrato et al. (2004, 2007), Monge et al. (2007)
	U nguyên bào thần kinh ở người/LAN-1, IMR-2, SH-SY5Y	Francisco et al. (2007)
	Ung thư Đại tràng ở người/HT29, DLD-1	Montaner and Perez-Tomas (2001)
Undecylprodigiosin	Ung thư vú ở người/BT-20, MCF-7, MDA-MB-231	Ho et al. (2007)
	Ung thư phổi ở người A549	Liu et al. (2005)
Metacycloprodigiosin	Ung thư phổi ở người/A549, SPCA4	Liu et al. (2005)
Cycloprodigiosin	Ung thư vú ở người/MDA-MB-231	Yamamoto et al. (2000a, 2002)
	Ung thư bạch cầu ở người/HL-60	Yamamoto et al. (2000b)

Chính vì những đặc tính nêu trên, việc tìm kiếm hoặc tạo ra các chủng vi khuẩn *Serratia* sp. có khả năng tổng hợp prodigiosin cao là cần thiết để có thể ứng dụng hợp

chất này trong cuộc sống. Tuy nhiên, các chủng *Serratia* sp. đã phân lập được hiện nay tại Việt Nam chưa đem lại năng suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR được cải biến mang gen mã hoá protein PigC tái tổ hợp sản xuất hợp chất prodigiosin có khả năng ức chế tế bào ung thư và một số loài nấm, vi khuẩn gây bệnh.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR được cải biến từ chủng *Serratia* sp. SM mang vector pET22b tái tổ hợp có chứa cấu trúc Lac promoter – *pigC*, trong đó trình tự gen *pigC* được tách từ chủng *Serratia* sp. M5. Kết quả cải biến thu được chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR có hàm lượng prodigiosin cao gấp 1,04 lần so với chủng trước cải biến. Chủng *Serratia* sp. SM và chủng *Serratia* sp. M5 được cung cấp bởi Phòng Công nghệ sinh học Enzym - Viện Công nghệ sinh học.

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Hình 1 là hình ảnh điện di A. Kết quả khuếch đại trình tự vùng Lac_promoter và vùng gen *pigC*; B. LacP_ *pigC*: Sản phẩm nối của hai đoạn Lac_promoter và gen *pigC*; M: Ladder 1kb (Thermo fisher)

Hình 2 là hình ảnh kết quả điện di SDS-PAGE (A) và Western blot (B) kiểm tra khả năng biểu hiện của protein *pigC* tái tổ hợp ở các chủng *Serratia* sp. mang gen tái tổ hợp và chủng ban đầu *Serratia* sp. SM; 1: Chủng *Serratia* sp. SM; 2: Chủng *Serratia* sp. mang cấu trúc Lac promoter_ *pigC*.

Hình 3 là hình ảnh kết quả sắc ký bản mỏng phát hiện prodigiosin ở các chủng đã biến nạp. E: Chủng *Serratia* sp. SM không chuyển gen; C2, C4: Các dòng vi khuẩn chuyển cấu trúc Lac promoter – *pigC*; C: Chất chuẩn prodigiosin

Hình 4 Là đồ thị thể hiện kết quả định tính, định lượng prodigiosin ở các chủng đã biến nạp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Đường màu xanh: Prodigiosin tách

từ chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR; Đường màu đen: Prodigiosin chuẩn 0,6 µg/ml - Sigma

Mô tả chi tiết sáng chế

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

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

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM được làm khả biến xung điện theo phương pháp được mô tả như sau: 1 khuẩn lạc thuần của chủng được nuôi trong 2 ml môi trường LB trong điều kiện lắc 200 rpm/30°C qua đêm. Hôm sau, 1 ml dịch nuôi được chuyển sang 50 ml môi trường LB mới trong bình tam giác 250 ml, nuôi lắc trong điều kiện 200 rpm/30°C trong 6 giờ. Sau đó, dịch nuôi tế bào được cấy trong đá trong 15 phút để tế bào ngừng sinh trưởng. Sinh khối tế bào được thu bằng cách ly tâm 5000 rpm/15 phút/4°C, loại bỏ toàn bộ môi trường nuôi. Sau đó tế bào được hoà lại trong 50 ml nước Deion lạnh, ủ đá 15 phút và ly tâm 10000 rpm/15 phút/4°C. Đổ bỏ toàn bộ dung dịch, thấm khô. Bước rửa nước được lặp lại 3 lần. Cuối cùng, tế bào được hoà lại trong dung dịch Glycerol 15% lạnh sao cho OD giá trị 20/ml. Chia tế bào vào các ống eppendorf đã được làm lạnh, mỗi ống 100 µl dịch khuẩn và bảo quản ở -80°C.

Chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM sau khi làm khả biến xung điện sẽ được chuyển plasmid pET22b mang cấu trúc Lac promoter – *pigC* ở vị trí multicloning site được gắn theo chiều 5' trình tự nhận biết enzym *HindIII* - Lac promoter – *pigC* – trình tự nhận biết enzym *XhoI* 3' bằng phương pháp xung điện. Điều kiện bắn được thực hiện như sau: 1 µg plasmid được trộn vào ống tế bào, bung nhẹ và ủ đá trong 10 phút; cuvette điện được làm lạnh trước trong đá; chuyển tế bào vào cuvette điện, gõ nhẹ cho tan bọt khí và bắn với điều kiện 2500 V, 400 Ω, 25 µF; tế bào sẽ được phục hồi trong 1ml môi trường LB, nuôi lắc 30°C trong 3 giờ. Chủng *Serratia* sp. SM sau khi biến nạp sẽ được cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp. Chủng

Serratia mọc trong môi trường kháng sinh sẽ được kiểm tra bằng cách tách chiết plasmid, điện di và cắt enzym giới hạn tương ứng để kiểm tra plasmid chèn vào. Tiếp đó, tế bào được nuôi trên môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh cho đến khi giá trị OD đạt 0,6. 1 mM IPTG được sử dụng để cảm ứng biểu hiện và dịch khuẩn tiếp tục được nuôi trong điều kiện 30°C trong 6 tiếng. Dịch khuẩn thu được sẽ được chia làm 2, một nửa tiến hành tách thu sinh khối khuẩn, phá tế bào thu protein tổng số để điện di SDS-PAGE, Western Blot nhằm kiểm tra khả năng biểu hiện protein, nửa còn lại được sử dụng để tách chiết prodigiosin để tiến hành đo hàm lượng và chạy sắc kí bản mỏng. Kết quả sàng lọc chủng *Serratia* sp. tái tổ hợp đã thu được dòng mang cấu trúc tái tổ hợp có khả năng sản xuất prodigiosin cao hơn 4% so với chủng đại. Chủng này được đặt tên là chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1: Chuẩn bị tế bào khả biến *Serratia* sp. SM

2ml dịch tế bào nuôi qua đêm trong môi trường LB ở 30°C/200 rpm được tiếp giống với tỉ lệ 2% vào môi trường LB và nuôi lắc đến khi đạt OD yêu cầu. Sau đó, bình nuôi được ngâm trong đá trong 15 phút để dừng sinh trưởng. Tế bào được thu sinh khối và rửa 3 lần bằng dung dịch làm tế bào khả biến lạnh và ly tâm trong điều kiện 5000 rpm/15 phút/4°C. Cuối cùng tế bào được hoà lại trong dung dịch làm tế bào khả biến có bổ sung glycerol 10% sao cho giá trị OD đạt 20 và chia vào các ống, mỗi ống 100 µl và bảo quản trong tủ -80°C.

Ví dụ 2: Biến nạp vector pET22b mang cấu trúc Lac promoter – *pigC* và biến nạp vào vi khuẩn *Serratia* sp. SM

Cấu trúc Lac promoter và gen *pigC* được khuếch đại độc lập sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Phản ứng nối giữa đoạn trình tự mã hoá Lac promoter và *pigC* được thực hiện bằng phản ứng overlapping PCR sử dụng vùng chồng lấn dài khoảng 30 nucleotit (Hình 1). Phản ứng tổng hợp cuối cùng sử dụng cặp mồi có chứa vị trí nhận biết của enzym *Hind*III và *Xho*I. Sản phẩm được tiến hành chèn vào vị trí tương ứng trên vector. Sản phẩm được biến nạp vào vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH10B và tiến hành chọn dòng. Dòng khuẩn lạc mang cấu trúc Lac promoter - *pigC* có trình tự được trình bày ở phần danh mục trình tự được lựa chọn để tiến hành biến nạp vào chủng vi khuẩn *Serratia* sp. SM. bằng phương pháp sung điện. Các dòng khuẩn lạc mọc trên môi trường được kí hiệu là C2 và C4 sẽ được tiến hành kiểm tra cấu trúc, khả năng biểu hiện *pigC* tái tổ hợp và khả năng sinh prodigiosin (Hình 2; Hình 3; Bảng 2). Trong đó dòng *Serratia* sp. C4 cho hàm lượng prodigiosin cao hơn 4% so với chủng ban đầu. Dòng *Serratia* sp. C4 cho kết quả biểu hiện prodigiosin tốt nhất được lựa chọn và đặt tên là *Serratia* sp. HVQY-IGR.

Bảng 2. Kết quả so sánh hàm lượng prodigiosin giữa chủng *Serratia* sp. SM ban đầu và chủng *Serratia* sp. HVQY chứa cấu trúc biểu hiện

Chủng	Hàm lượng prodigiosin tổng số (mg)	Tỉ lệ prodigiosin thu được so với chủng tự nhiên
<i>Serratia</i> sp. SM	5,38	1
<i>Serratia</i> sp. dòng C2	5,43	1,01
<i>Serratia</i> sp. dòng C4	5,58	1,04

Ví dụ 3: Nhân nuôi *Serratia* sp. HVQY-IGR

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

Ví dụ 4: Phân tích hoạt chất prodigiosin có trong dịch khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR

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

Bảng 3. Kết quả đánh giá khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư của prodigiosin (IC₅₀)

Nồng độ	% ức chế tế bào			
	Hep3B	MCF7	H460	Hep2
10	23,7	34,6	3,0	28,8
8	24,8	43,9	3,0	26,9
6	25,1	54,6	8,8	29,9
4	41,8	56,3	55,3	38,9
2	45,7	56,2	61,2	67,8
1	60,2	60,6	63,8	82,0
0.5	67,4	78,2	73,0	83,9
IC ₅₀	5,5	6,53	2,9	4,6

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

Bảng 4. Kết quả đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế hoàn toàn của prodigiosin đối với một số chủng nấm thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. neoformans*.

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

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Tạo ra chủng vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR mang cấu trúc gen Lac promoter - *pigC* tái tổ hợp trong vector pET22b, tạo ra chất prodigiosin có sản lượng hơn 4% so với chủng ban đầu. Hợp chất prodigiosin thu được có khả năng ức chế tế bào ung thư Hep3B; MCF7; H460; Hep2 và kháng các chủng nấm gây bệnh thuộc 2 loài *C. albicans* và *C. Neoformans*.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu tham khảo tiếng Việt

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

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

1. Chawrai SR, Williamson NR, Mahendiran T, Salmond GP, Leeper FJ (2012) Characterisation of PigC and HapC, the prodigiosin synthetases from *Serratia* sp. and *Hahella chejuensis* with potential for biocatalytic production of anticancer agents. *Chem Sci* 3(2): 447-454.
2. Chawrai SR, Williamson NR, Salmond GP, Leeper FJ (2008) Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues—exploring the substrate specificity of PigC. *Chem Commun* (16): 1862-1864.

3. Darshan N, Manonmani H (2015) Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* 52(9): 5393-5407.
4. Diaz-Ruiz C, Montaner B, Perez-Tomas R (2001) Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol Histopathol* 16(2): 415-421.
5. Domröse A, Klein AS, Hage-Hülsmann J, Thies S, Svensson V, Classen T, Pietruszka J, Jaeger K-E, Drepper T, Loeschcke A (2015) Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front Microbiol* 6: 6972.
6. Harris AK, Williamson NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Foulds I, Simonsen HT, Leeper FJ, Salmond GP (2004) The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* 150(11): 3547-3560.
7. Klein AS, Domröse A, Bongen P, Brass HU, Classen T, Loeschcke A, Drepper T, Laraia L, Sievers S, Jaeger K-E (2017) New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol* 6(9): 1757-1765.
8. Liu P, Zhu H, Zheng G, Jiang W, Lu Y (2017) Metabolic engineering of *Streptomyces coelicolor* for enhanced prodigiosins (RED) production. *Sci China Life Sci* 60(9): 948-957.
9. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 131(3): 585-593.
10. Neupane S, Finlay RD, Alstrom S, Goodwin L, Kyrpides NC, Lucas S, Lapidus A, Bruce D, Pitluck S, Peters L, Ovchinnikova G, Chertkov O, Han J, Han C, Tapia R, Detter JC, Land M, Hauser L, Cheng JF, Ivanova N, Pagani I, Klenk HP, Woyke T, Hogberg N (2012a) Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* strain AS12. *Stand Genomic Sci* 6(2): 165-173.
11. Neupane S, Finlay RD, Kyrpides NC, Goodwin L, Alström S, Lucas S, Land M, Han J, Lapidus A, Cheng J-F, Bruce D, Pitluck S, Peters L, Ovchinnikova G, Held B, Han C, Detter JC, Tapia R, Hauser L, Ivanova N, Pagani I, Woyke T, Klenk H-P, Högberg N (2012) Complete genome sequence of the plant-associated *Serratia plymuthica* strain AS13. *Stand Genomic Sci* 7(1): 22-30.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Học viện Quân y

<120> CHỦNG VI KHUẨN *SERRATIA* SP. HVQY-IGR MANG GEN MÃ HOÁ PROTEIN PIGC TÁI TỔ HỢP

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> SEQ ID NO:1

<211> 3009

<212> ADN

<213> *Serratia* sp.

<220>

<221> CDS

<222> 289..2979

<223> /transl_table=1

<400> 1

```

cctctagaat aattttgttt aactttaaga aggagatata catatgaaat acctgctgcc      60
gaccgctgct gctggctctgc tgctcctcgc tgcccagccg gcgatggcca tggatatcgg      120
aattaattcg gatccgaatt cgagctccgt cgacaagctt cagtgcgcgc aacgcaatta      180
atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta      240
tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagct atg aat cct      297
                                   Met Asn Pro
                                   1

acc ctg gtg gtt gaa ctt tcc ggc gat aaa acg ctg gaa ccc cat cgc      345
Thr Leu Val Val Glu Leu Ser Gly Asp Lys Thr Leu Glu Pro His Arg
      5              10              15

ctg ggc ggc aaa gcc cat tcg ttg aat cat ttg att cag gcg ggc ttg      393
Leu Gly Gly Lys Ala His Ser Leu Asn His Leu Ile Gln Ala Gly Leu
      20              25              30              35

ccg gtg ccg ccg gcg ttt tgc atc acc gcg cag gct tac cgg cag ttt      441
Pro Val Pro Pro Ala Phe Cys Ile Thr Ala Gln Ala Tyr Arg Gln Phe
              40              45              50

atc gaa ttc gcc gtg ccg gga gcg ctg ctc gac acg ggc gcg ccg ggc      489
Ile Glu Phe Ala Val Pro Gly Ala Leu Leu Asp Thr Gly Ala Pro Gly
              55              60              65

```

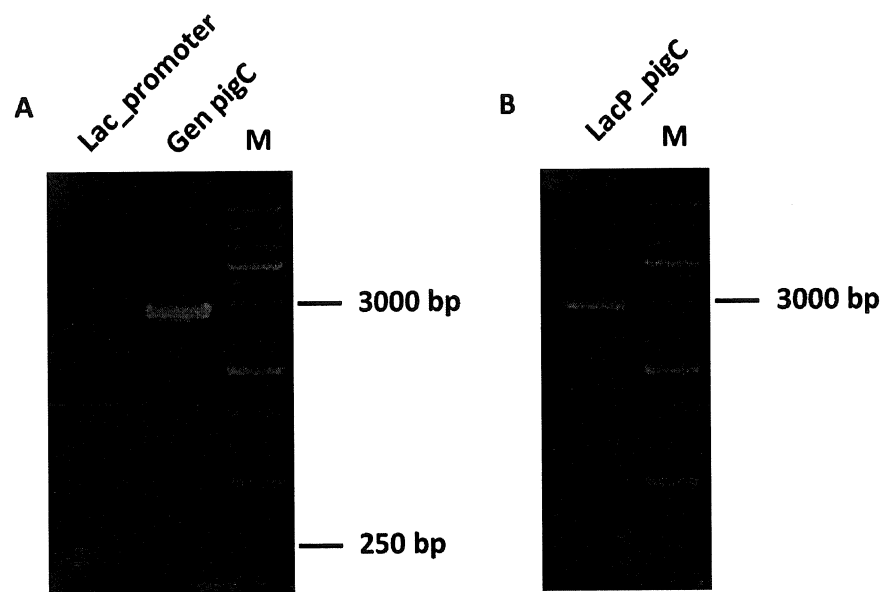
aac gtg cgc gat atg att ttg agc acc gcc atc ccc gcc ccg ctc gat Asn Val Arg Asp Met Ile Leu Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Leu Asp 70 75 80	537
ctg gcg atc cgt cac gcc tgc aaa cag ttg ggc gac ggc gcc tcg ctc Leu Ala Ile Arg His Ala Cys Lys Gln Leu Gly Asp Gly Ala Ser Leu 85 90 95	585
gcc gtg cgc tct tcg gcg ctg gaa gaa gac ggc ctg acc cac tct ttc Ala Val Arg Ser Ser Ala Leu Glu Glu Asp Gly Leu Thr His Ser Phe 100 105 110 115	633
gcc ggg caa tac gac act tac ctg cac gtg cgc ggg gat gac gag gtg Ala Gly Gln Tyr Asp Thr Tyr Leu His Val Arg Gly Asp Asp Glu Val 120 125 130	681
gtg cgc aag gtg caa tcc tgc tgg gcg tcg ctc tgg gcg gaa cgc gcc Val Arg Lys Val Gln Ser Cys Trp Ala Ser Leu Trp Ala Glu Arg Ala 135 140 145	729
gcc cag tat agc cgg aca tcg gcg gcg cag agc gat atc gcc gtc gtc Ala Gln Tyr Ser Arg Thr Ser Ala Ala Gln Ser Asp Ile Ala Val Val 150 155 160	777
ttg caa atc atg gtg gat gca gac gcc gcc ggc gtc atg ttt acc caa Leu Gln Ile Met Val Asp Ala Asp Ala Ala Gly Val Met Phe Thr Gln 165 170 175	825
gat ccg ctg aca ggc gat gcc aac cac atc gtc atc gac agc tgc tgg Asp Pro Leu Thr Gly Asp Ala Asn His Ile Val Ile Asp Ser Cys Trp 180 185 190 195	873
ggg ctg ggg gaa ggc gtg gtc tcc gga cag gtc acc acc gac agc ttc Gly Leu Gly Glu Gly Val Val Ser Gly Gln Val Thr Thr Asp Ser Phe 200 205 210	921
att ttg gat aag gcg agc ggc gag atc cgc gag cgg caa att cgt cac Ile Leu Asp Lys Ala Ser Gly Glu Ile Arg Glu Arg Gln Ile Arg His 215 220 225	969
aaa ccg cac tat tgc caa cgc gat ccg cag gga cgg gtc acg ctg ctg Lys Pro His Tyr Cys Gln Arg Asp Pro Gln Gly Arg Val Thr Leu Leu 230 235 240	1017
caa acg cct gaa gtc agg cga gac gcc ccc agc cta acc ccg gaa cag Gln Thr Pro Glu Val Arg Arg Asp Ala Pro Ser Leu Thr Pro Glu Gln 245 250 255	1065
ctg caa cag ctt gcc agg ctg gcc agg caa acg cgg atg att tac ggc Leu Gln Gln Leu Ala Arg Leu Ala Arg Gln Thr Arg Met Ile Tyr Gly 260 265 270 275	1113

gcg gaa ctg gat atc gaa tgg gcg gtg aaa gac gat cgc gtg tgg ctc	1161
Ala Glu Leu Asp Ile Glu Trp Ala Val Lys Asp Asp Arg Val Trp Leu	
280 285 290	
ctg cag gcg cgg ccg atc acc acg cag gcc aaa ccg gtt cag atg ctt	1209
Leu Gln Ala Arg Pro Ile Thr Thr Gln Ala Lys Pro Val Gln Met Leu	
295 300 305	
tac gcc aac ccg tgg gaa agc gat ccg gcg atc aag gaa cgg gcc ttt	1257
Tyr Ala Asn Pro Trp Glu Ser Asp Pro Ala Ile Lys Glu Arg Ala Phe	
310 315 320	
ttc tcc cga atg gac acc ggc gag atc gtc acc ggc ttg atg acg ccg	1305
Phe Ser Arg Met Asp Thr Gly Glu Ile Val Thr Gly Leu Met Thr Pro	
325 330 335	
ctg ggg ctg tcg ttt tgc cag ttc tac caa aag cat att cat ggc ccg	1353
Leu Gly Leu Ser Phe Cys Gln Phe Tyr Gln Lys His Ile His Gly Pro	
340 345 350 355	
gcg atc aaa acc atg ggg ctg gcg gat atc ggc gat tgg cag att tat	1401
Ala Ile Lys Thr Met Gly Leu Ala Asp Ile Gly Asp Trp Gln Ile Tyr	
360 365 370	
atg ggg tat ttg caa ggc tac gtc tat ctg aat atc tcc gga tcg gcc	1449
Met Gly Tyr Leu Gln Gly Tyr Val Tyr Leu Asn Ile Ser Gly Ser Ala	
375 380 385	
tac atg ctc cgc caa tgc ccg ccc acc cgc gac gaa atg aag ttc acg	1497
Tyr Met Leu Arg Gln Cys Pro Pro Thr Arg Asp Glu Met Lys Phe Thr	
390 395 400	
acc cgc tac gcc acc gcc gat atc gat ttc agc ggg tac aaa aac ccc	1545
Thr Arg Tyr Ala Thr Ala Asp Ile Asp Phe Ser Gly Tyr Lys Asn Pro	
405 410 415	
tat ggc ccc ggc gta cag gga tgg gct tat ctc aag agc gcc tgg cat	1593
Tyr Gly Pro Gly Val Gln Gly Trp Ala Tyr Leu Lys Ser Ala Trp His	
420 425 430 435	
tgg ctg aaa cag cag agg cat aac ctg cgc agc gcc ggc gcg acc gtc	1641
Trp Leu Lys Gln Gln Arg His Asn Leu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Val	
440 445 450	
gat gcc atg atc gcc ctg cgc cag cgc gag acg cgc cgc ttt ctg gcg	1689
Asp Ala Met Ile Ala Leu Arg Gln Arg Glu Thr Arg Arg Phe Leu Ala	
455 460 465	
ctg gat ctg acc acc atg acg cat cag gag ctg gag cgg gaa ctc agc	1737
Leu Asp Leu Thr Thr Met Thr His Gln Glu Leu Glu Arg Glu Leu Ser	
470 475 480	
cgc atc gac ggt tac ttc ctc gac agc tgc gcc gcc tat atg ccc ttc	1785
Arg Ile Asp Gly Tyr Phe Leu Asp Ser Cys Ala Ala Tyr Met Pro Phe	
485 490 495	

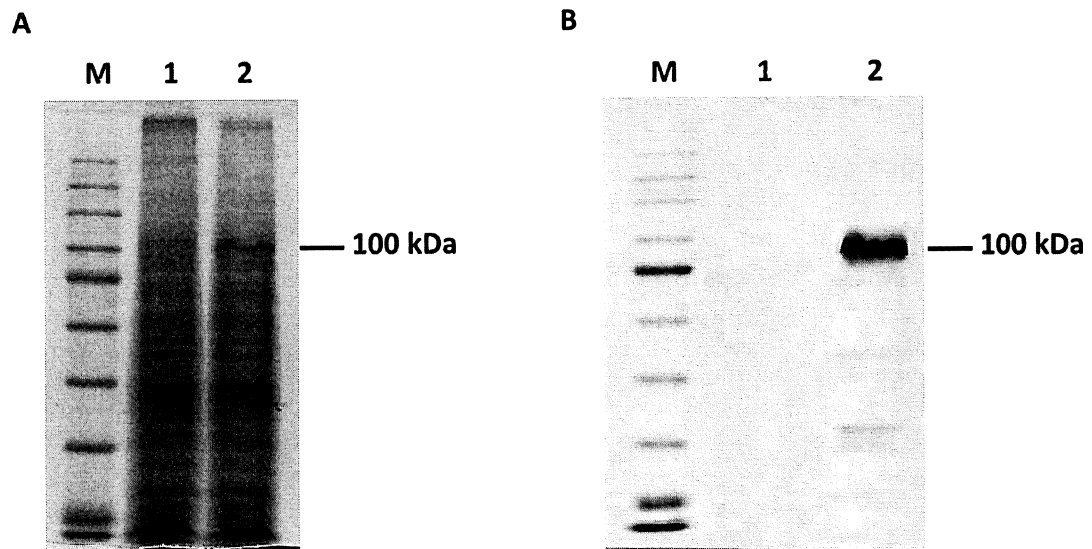
ttc ctt cag tcg ttc gcg ctc tac gat gcg ctg gcg ctg acc tgc gaa	1833
Phe Leu Gln Ser Phe Ala Leu Tyr Asp Ala Leu Ala Leu Thr Cys Glu	
500 505 510 515	
cgt tac ctc aaa ggc cgc ggc aac gga ttg caa aat cgc atc aag gcg	1881
Arg Tyr Leu Lys Gly Arg Gly Asn Gly Leu Gln Asn Arg Ile Lys Ala	
520 525 530	
tcg atg aac aac ctg cgc acc atc gaa gtc acg ctg ggc att ctc agc	1929
Ser Met Asn Asn Leu Arg Thr Ile Glu Val Thr Leu Gly Ile Leu Ser	
535 540 545	
ctg gtg gag acg gtc aat cgt caa ccg gcg ttg aag gcc gtg ttc gag	1977
Leu Val Glu Thr Val Asn Arg Gln Pro Ala Leu Lys Ala Val Phe Glu	
550 555 560	
cga cac agc gca cag gaa ctg gtc acc gtc ctg ccc acc gat ccc gaa	2025
Arg His Ser Ala Gln Glu Leu Val Thr Val Leu Pro Thr Asp Pro Glu	
565 570 575	
tcg cgc gcc ttc tgg caa agc gac ttc agc gcc ttc ctg ttc gag ttc	2073
Ser Arg Ala Phe Trp Gln Ser Asp Phe Ser Ala Phe Leu Phe Glu Phe	
580 585 590 595	
ggc gcc cgt ggc cgc cag gag ttc gaa ttg agt ctt ccg cgc tgg aac	2121
Gly Ala Arg Gly Arg Gln Glu Phe Glu Leu Ser Leu Pro Arg Trp Asn	
600 605 610	
gac gat ccc agc tac ctg ctg caa gtg atg aaa atg tat ctg caa cat	2169
Asp Asp Pro Ser Tyr Leu Leu Gln Val Met Lys Met Tyr Leu Gln His	
615 620 625	
ccg gtg gat ctg cac acg aaa ctg cgg gaa aca gag cgg ctg cgc cat	2217
Pro Val Asp Leu His Thr Lys Leu Arg Glu Thr Glu Arg Leu Arg His	
630 635 640	
gaa gac agc gcg acg ctg ctt aaa gcg atg ccc tgg ttt ggc cgg atg	2265
Glu Asp Ser Ala Thr Leu Leu Lys Ala Met Pro Trp Phe Gly Arg Met	
645 650 655	
aag ctg aag ttc atc acc aag ctg tat ggc gtg atg gcc gaa cgc cgc	2313
Lys Leu Lys Phe Ile Thr Lys Leu Tyr Gly Val Met Ala Glu Arg Arg	
660 665 670 675	
gaa gcg acc cgg cca acc ttc gtc acc gaa acc tgg ttc tac cgc cgc	2361
Glu Ala Thr Arg Pro Thr Phe Val Thr Glu Thr Trp Phe Tyr Arg Arg	
680 685 690	
atc atg ttg gaa gtg ctg cgg cgc ctg gag gcg caa ggc ctg gtc aaa	2409
Ile Met Leu Glu Val Leu Arg Arg Leu Glu Ala Gln Gly Leu Val Lys	
695 700 705	
cag gcc gat ctg ccc tat gtg gac ttc gag cgc ttc cgc gcg ttt atg	2457
Gln Ala Asp Leu Pro Tyr Val Asp Phe Glu Arg Phe Arg Ala Phe Met	
710 715 720	

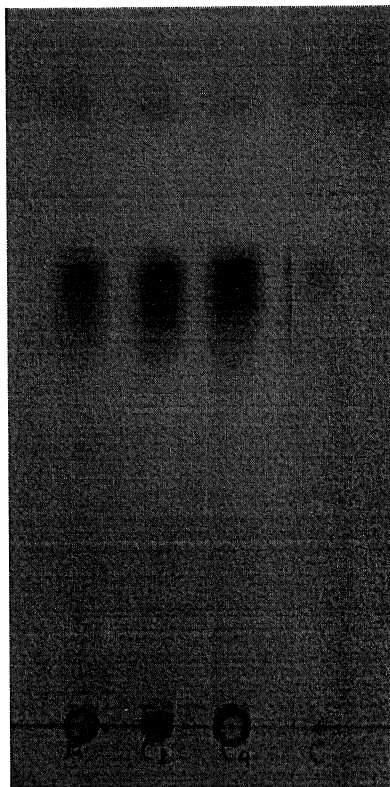
gcg ggg gaa ctg tcg gcg cag gag gcg ttc gcc gcc gat ctg atc gag Ala Gly Glu Leu Ser Ala Gln Glu Ala Phe Ala Ala Asp Leu Ile Glu 725 730 735	2505
cgc aat cgc cac cag cat ctg ctg aac ctg cat gcg gaa gag ccg ccg Arg Asn Arg His Gln His Leu Leu Asn Leu His Ala Glu Glu Pro Pro 740 745 750 755	2553
atg gcg atc gtc ggg ggg tat cag ccc agg atg aaa gcc ccc acg gcg Met Ala Ile Val Gly Gly Tyr Gln Pro Arg Met Lys Ala Pro Thr Ala 760 765 770	2601
gaa aac gcc gcc ggc atg ctg tcc ggc ctg gcg gcc agc ccc ggc aaa Glu Asn Ala Ala Gly Met Leu Ser Gly Leu Ala Ala Ser Pro Gly Lys 775 780 785	2649
gtg gtg gcg aag gcg cgc gtc atc acc gat ctg ctg gcg cag gcc ggc Val Val Ala Lys Ala Arg Val Ile Thr Asp Leu Leu Ala Gln Ala Gly 790 795 800	2697
gag ctg cag ccc aac gaa atc ctg gtg gcg cgc ttt acc gac gcc agc Glu Leu Gln Pro Asn Glu Ile Leu Val Ala Arg Phe Thr Asp Ala Ser 805 810 815	2745
tgg acc ccg ctc ttc gcg ctg gcg gcg ggc atc gtc acc gat atc ggc Trp Thr Pro Leu Phe Ala Leu Ala Ala Gly Ile Val Thr Asp Ile Gly 820 825 830 835	2793
tcc gcg ctg tcc cac agc tgc atc gtc gca cgc gaa ttc ggc atc ccc Ser Ala Leu Ser His Ser Cys Ile Val Ala Arg Glu Phe Gly Ile Pro 840 845 850	2841
gcg gcg gtc aat ctc aag aac gcc acc cag ctg atc aac agc ggc gac Ala Ala Val Asn Leu Lys Asn Ala Thr Gln Leu Ile Asn Ser Gly Asp 855 860 865	2889
acc ttg att ctc gac ggc gac agc ggg acg gtc att att caa cgc gga Thr Leu Ile Leu Asp Gly Asp Ser Gly Thr Val Ile Ile Gln Arg Gly 870 875 880	2937
gaa cgt gcc gat ggc ctc gag cac cac cac cac cac tga Glu Arg Ala Asp Gly Leu Glu His His His His His His 885 890 895	2979
gatccggctg ctaacaaagc ccgaaagaag	3009

Hình 1



Hình 2



Hình 3**Hình 4**