



(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)



2-0004342

(51) **C12N 15/00; C12Q 1/68**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00143

(22) 12/11/2021

(67) 1-2021-07238

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/07/2022 412A

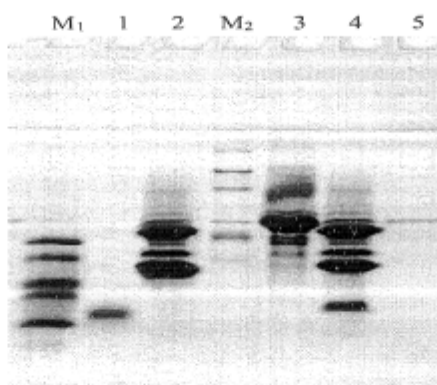
(73) Viện sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà
Nội

(72) Lã Thị Huyền (VN); Nguyễn Thị Đà (VN); Nguyễn Trọng Linh (VN); Nguyễn Thu
Trang (VN); Trần Mạnh Hải (VN); Chu Hoàng Hà (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT PEPTIT BREVININ TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG
KHÁNG KHUẨN ĐỂ ỨNG DỤNG THAY THẾ KHÁNG SINH**

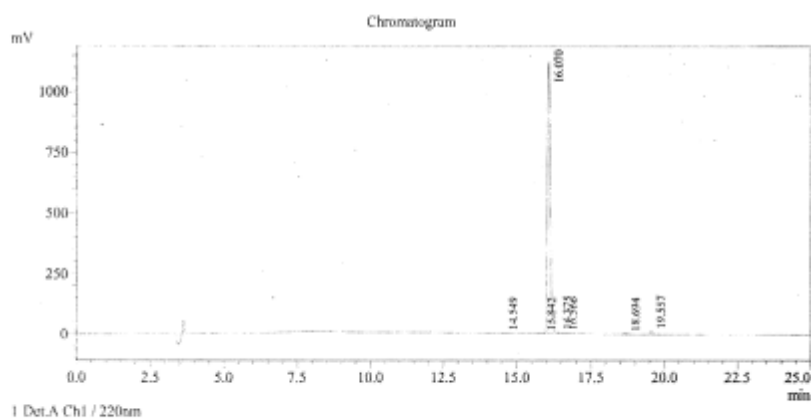
(21) 2-2025-00143

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp có khả năng kháng khuẩn mạnh trong đó quy trình được thực hiện bao gồm 5 bước: a) Tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin; b) Tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hoá cho peptit Brevinin; c) Tạo chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hoá cho peptit Brevinin; d) Biểu hiện và thu protein dung hợp chứa peptit Brevinin; e) Tinh sạch protein dung hợp chứa peptit Brevinin; và f) Cắt thu peptit Brevinin. Các peptit thu được có hoạt tính kháng lại các vi sinh vật gây bệnh mạnh.



Hình 1. Ảnh điện di thu nhận peptit brevinin được cắt từ các protein dung hợp và loại bỏ các protein khác sử dụng cột Ni-resin

M1: marker peptide; 1: Mẫu peptide Brevinin tái tổ hợp sau tinh sạch; 2: Mẫu bám trên cột Niken-resin; M2: Marker protein; 3: mẫu không cắt; 4: mẫu protein dung hợp cắt với factor Xa; 5: mẫu protein dung hợp không cắt lượng nhỏ



Hình 2. Kết quả chạy HPLC mẫu peptit Brevinin tái tổ hợp

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, y dược, mỹ phẩm và thực phẩm, cụ thể là sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp và chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) thuần khiết về mặt sinh học mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa Brevinin tạo ra từ quy trình này. Quy trình theo sáng chế đề tạo ra chủng vi sinh vật tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa Brevinin có khả năng kháng khuẩn mạnh từ đó sản xuất ra peptit Brevinin để tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các peptit kháng khuẩn là các peptit có khả năng tiêu diệt vi sinh vật, cấu trúc chung của chúng thường chứa ít hơn 100 gốc axit amin (khoảng từ 12 đến 50 axit amin), tích điện dương từ 0 tới +7 và tỉ lệ % kỵ nước 31-70% (Kumar et al., 2020). Các peptit kháng khuẩn được sản xuất bởi nhiều nguồn khác nhau bao gồm côn trùng, lưỡng cư, da gai, giáp xác, thực vật, động vật có vú, vi khuẩn, nấm và cá. Theo công bố trên ngân hàng dữ liệu có hơn 2800 AMPs từ các sinh vật khác nhau đã được nghiên cứu và xác định trình tự, hoạt tính bao gồm 297 AMP từ vi khuẩn, 2 từ vi khuẩn cổ, 7 từ nguyên sinh động vật, 13 từ nấm, 343 từ các loài thực vật, và 2145 từ động vật trong đó 973 peptit từ da ếch (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Số lượng công bố và các dữ liệu cập nhật trên ngân hàng về các peptit từ ếch rất lớn và tăng nhanh chóng qua các năm. Peptit kháng khuẩn AMPs hay còn được gọi là peptit bảo vệ vật chủ HDPs (host defense peptits) có mặt ở tất cả các loài từ vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật và con người. AMPs là một thành phần của miễn dịch bẩm sinh và tham gia đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu nhằm bảo vệ cơ thể vật chủ khỏi sự tấn công các mầm bệnh vi sinh vật và tăng cường miễn dịch. Trong khi hướng phát triển các loại kháng sinh mới đang trong tình trạng bế tắc, peptit kháng khuẩn nổi lên như một nguồn kháng sinh tự nhiên lý tưởng. Peptit kháng khuẩn đã được chứng minh là có phổ tác dụng rộng, có khả năng tiêu diệt được cả vi khuẩn Gram âm,

Gram dương, virus có vỏ và cả tế bào ung thư trong cơ thể. Ngày nay, bằng tiên bộ của công nghệ sinh học, hàng ngàn loại peptit kháng khuẩn tái tổ hợp đã được tạo ra dựa trên các cấu trúc của các peptit kháng khuẩn tự nhiên. Điều này khiến cho dữ liệu trong ngân hàng peptit kháng khuẩn ngày càng trở lên phong phú và góp phần thúc đẩy các nghiên cứu sâu hơn về tương tác giữa các peptit kháng khuẩn với các mầm bệnh vi sinh vật và các loại tế bào ung thư để nhanh chóng thay thế kháng sinh truyền thống và hỗ trợ điều trị ung thư.

Các peptit được tiết từ da ếch rất đa dạng đặc biệt là các peptit có tính chất tác động thần kinh và các peptit phân giải tế bào hay các AMP, các peptit ức chế hoạt động của enzym. Các nhà nghiên cứu gọi chúng là các peptit kháng sinh AMP do tác động của chúng lên một loạt các vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên có những nghiên cứu dùng thuật ngữ “cytolytic peptit” thay cho AMP vì một số peptit này hoạt động như các chất chống ung thư, kháng vi rút, điều hòa miễn dịch và chống tiểu đường (Conlon and Mechkarska, 2014). Các đặc tính sinh học của các peptit hoạt động bảo vệ các tác động khác nhau đã thu hút sự chú ý nhiều hơn một phần vì sự quan tâm của ngành dược phẩm trong việc sử dụng da lưỡng cư là nguồn hợp chất rất phong phú cho việc phát hiện thuốc. Một số họ peptit kháng khuẩn đã được phân lập từ lưỡng cư như Brevinins, esculentins, japonicins, nigrocins, palustrins, ranacyclin, aureins, caerin, citropin, magainins, temporins, bombinin, phylloseptin, parkerins, jingdongins, medusins, limnonectins và hylaranins đã được nghiên cứu rộng rãi. Ở vùng nhiệt đới, đặc biệt là ở các khu rừng nhiệt đới châu Á, các peptit bảo vệ vật chủ hiệu quả đã giúp ếch tồn tại trong môi trường của chúng và đạt được sự đa dạng phong phú. Những peptit đã được phân lập cho thấy một mức độ biến đổi rất lớn - ngay cả trong một chi, các loài khác nhau tạo ra các chất tiết đa dạng. Những khác biệt này có thể là do môi trường sống cụ thể của từng loài và cách thích nghi của chúng.

Họ Brevinin: tên Brevinin xuất phát từ loài *Rana brevipoda porsa*, nay được phân loại lại là *Pelophylax porosus*, và họ peptit này chứa nhiều peptit có liên quan về cấu trúc từ các loài ếch Ranidae có nguồn gốc Châu Á và Bắc Mỹ, các peptit này được gọi là Brevinin-1. Bên cạnh đó, ba peptit pipinins được phân lập từ *L. pipiens*

đã được xác định trước đó cũng là các đại diện cho Brevinin. Một số peptit đặc biệt có bốn axit amin bị xóa bỏ, dẫn đến chúng ban đầu bị nhầm lẫn là ranalexins, mặc dù có cấu trúc tương tự với Brevinin-1 (Conlon et al., 2009). Ngoài ra, các peptit liên quan đến mellitin và một số peptit dị vòng (Conlon et al., 2006, 2006) cũng được phân loại là Brevinin-1. Tuy nhiên, vì những peptit này không có liên kết disulfide đặc trưng nên chúng có thể được phân loại lại thành các peptit giống như mellitin (König et al., 2015). Peptit Brevinin-2 bị giới hạn ở các loài ếch Ranidae Châu Âu. Tuy nhiên, một số peptit cắt ngắn từ *Lithobates septentrionalis* (Bevier et al., 2004) và *Lithobates virgatipes* có thể đại diện cho các peptit Brevinin-2 từ ếch nhái *ranidae* ở Bắc Mỹ. Cầu disulfit đầu C của peptit Brevinin-2 có chiều dài biến thiên (4-6 gốc) làm cho nó không đồng nhất bằng Brevinin-1. Một số peptit Brevinin-1 có thể được phân loại lại thành các peptit giống mellitin (MLPs), một nhóm AMP đã được phân lập ban đầu từ *R. temporaria* và sau đó là từ 5 con ếch Nhật Bản - *Rana tagoi*, *Babina* (Trước đây là *Rana*) *okinavana*, *Rana tsushimensis*, *Rana sakuraii* và *Rana japonica* - cũng như *Rana arvalis*, có nguồn gốc ở Châu Âu và Châu Á. Tất cả những peptit mạch hở này chứa 21-23 axit amin và xuất hiện trong các loài thuộc nhóm *Rana temporaria Eurasian* (ếch nâu) (König et al., 2015).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp và chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) thuần khiết về mặt sinh học mang gen mã hóa peptit Brevinin có khả năng kháng khuẩn.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp có khả năng kháng khuẩn mạnh, trong đó quy trình bao gồm các bước:

a) Tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách xác định trình tự cADN mã hoá peptit Brevinin trên cơ sở trình tự peptit nêu trong SEQ ID NO.1 và tiến hành tổng hợp hoá học tạo gen mã hoá cho peptit Brevinin, trong đó gen mã hoá Brevinin bao gồm 2 sợi đơn có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; sau đó 1 - 10 μ M các sợi đơn có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3

được trộn với nhau và xử lý nhiệt 95 - 100°C trong 5 - 10 phút, sau đó hạ từ từ nhiệt độ xuống nhiệt độ phòng 10 - 30 phút để thu được gen mã hoá cho peptit Brevinin;

b) Tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách gắn gen mã hoá cho peptit Brevinin ở bước a) vào vector biểu hiện pET-32a(+) đã mở vòng với các enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I dưới tác dụng của enzym *T4-ligaza*, phản ứng ở 22°C, trong 3 giờ, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt, tiến hành nuôi khuẩn lạc và tách plasmit chứa vector tái tổ hợp pET-32a(+)/Brevinin;

c) Tạo chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách biến nạp plasmit mang vector pET-32a(+)/Brevinin thu được ở bước b) vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3), nuôi trong môi trường LB có bổ sung ampicillin 100 µg/mL, nuôi lắc ở 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8;

d) Biểu hiện và thu protein dung hợp chứa peptit Brevinin bằng cách hút 1mL dịch nuôi cấy thu được ở bước c) và bổ sung IPTG 0,1 mM, lắc với tốc độ 100 - 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 25 - 37°C, kéo dài 5 đến 20 giờ, sau đó thu sinh khối tế bào từ dịch nuôi cấy bằng cách ly tâm ở 4000 - 5000 v/ph khoảng 20 - 40 phút,

e) Tinh sạch protein dung hợp chứa peptit Brevinin bằng cách huyền phù hóa sinh khối tế bào thu được ở bước d) trong dung dịch đệm liên kết Native Binding Buffer, bổ sung lysozym rồi ủ trên đá 30 phút và siêu âm để phá tế bào trong 20 phút siêu âm 15s, nghỉ 20s ở cường độ cao, ly tâm dịch sau siêu âm ở 7500 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi, đưa dịch nổi này lên cột đã được nhồi 2 mL gel NTA resin, cột được rửa với 8 mL dung dịch đệm rửa Native Wash Buffer, 30 mM Imidazol, pH 8, thổi cột bằng 5 mL dung dịch đệm thổi Native Elution Buffer, pH 8 sau đó thu các phân đoạn chứa protein dung hợp Brevinin tinh sạch; và

f) Cắt thu peptit Brevinin từ protein dung hợp thu được ở bước d) bằng enzym proteaza bằng cách cho dịch protein dung hợp Brevinin tinh sạch được thẩm tích với dung dịch đệm cắt Factor Xa Cleavage buffer 1X, dung dịch được bổ sung enzym Factor Xa Solution 1U/µL theo tỷ lệ 10U/µL cho 1 mg protein, ủ ở nhiệt

độ 22 - 25°C trong 16 giờ, sau đó chuyển sản phẩm sau khi được cắt với enzym lên cột Niken-resin thu dịch đi qua chứa peptit Brevinin tái tổ hợp.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin (bước a), trong trình tự gen sẽ có trình tự cắt của các proteaza: Factor Xa (yếu tố Xa), legumain, enterokinaza.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập tới chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector pET-32a(+)/Brevinin tái tổ hợp chứa gen mã hoá cho peptit Brevinin được tạo ra từ quy trình nêu trong khía cạnh thứ nhất, trong đó gen mã hoá Brevinin bao gồm 2 sợi đơn có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là Hình thái khuẩn lạc của chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector pET-32a(+)/Brevinin trên môi trường LB đặc

Hình 2 là Ảnh cắt protein dung hợp Brevinin bằng vector Factor Xa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh hoạ để hiểu rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất peptit Brevinin và chủng *E.coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá cho peptit Brevinin thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp, trong đó quy trình gồm các bước: a) Tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin; b) Tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hoá cho peptit Brevinin; c) Tạo chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hoá cho peptit Brevinin; d) Biểu hiện và thu protein dung hợp chứa peptit Brevinin; e) Tinh sạch protein dung hợp chứa peptit Brevinin; và f) Cắt thu peptit Brevinin.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) thuần khiết về mặt sinh học mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa peptit Brevinin, peptit tạo ra có khả năng kháng khuẩn cao, gen mã hóa peptit Brevinin này có trình tự 02 mạch đơn được nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3.

Trình tự peptit Brevinin của chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) được nêu trong SEQ ID NO.1 như sau:

FAKWAFKWLKK (SEQ ID NO.1)

Gen mã hóa Brevinin được gắn vào vector pET32a(+), khi biểu hiện tạo ra protein Brevinin tái tổ hợp dung hợp với protein TrX trong vector pET32a(+) bằng cách sử dụng phương pháp thông thường đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và đạt mức độ biểu hiện protein dung hợp Brevinin trên 60%.

Vector tái tổ hợp biểu hiện protein Brevinin tạo thành bằng cách đưa gen mã hóa Brevinin đã được tách dòng trong *E. coli* DH5α vào vector pET32a(+) và sau đó biến nạp trong *E. coli* BL21 (DE3) để tạo ra chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET32a(+)/Brevinin. Vector tái tổ hợp biểu hiện protein Brevinin có hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư có thể được tạo ra bằng phương pháp thông thường, ví dụ, gắn trình tự của gen mã hóa cho Brevinin vào vector thích hợp bằng cách sử dụng enzym giới hạn.

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) theo giải pháp hữu ích bao gồm chủng tái tổ hợp có khả năng tổng hợp Brevinin và chủng gốc. Ví dụ về các chủng này bao gồm chủng tái tổ hợp có khả năng biểu hiện peptit kháng khuẩn, kháng ung thư Brevinin có trình tự gen được phân lập từ loài ếch Việt Nam.

Để thu Brevinin, chủng tái tổ hợp đề cập trong giải pháp hữu ích có thể được nuôi cấy trên môi trường thích hợp và có bổ sung chất cảm ứng với thời gian và điều kiện nuôi cấy đã được khảo sát kỹ lưỡng.

Môi trường nuôi cấy cần dùng phải đáp ứng yêu cầu của các chủng cụ thể theo cách thích hợp. Nguồn dinh dưỡng nitơ hữu cơ được cung cấp từ trypton, cao men cùng với Natri và Clo được cung cấp qua muối NaCl và các chất này được sử dụng

ở dạng hỗn hợp trong môi trường nuôi cấy. Để kiểm soát trị số pH của môi trường nuôi cấy, các hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit hoặc hợp chất axit như axit cloric hoặc axit sulfuric, được ưu tiên sử dụng. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 45°C, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 28°C đến 37°C. Môi trường nuôi cấy được tiếp tục duy trì cho đến khi đạt tới lượng Brevinin tối đa mong muốn tạo thành. Thời gian lên men thu sinh khối sau khi bổ sung chất cảm ứng từ 5 - 24h.

Điểm khác biệt của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pET32a+/Brevinin thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là: Đây là chủng tái tổ hợp tạo thành từ chủng BL21 (DE3) có sử dụng đoạn gen mã hóa cho 01 peptit Brevinin tự nhiên được phân lập từ loài ếch thu thập tại Việt Nam bằng cách biến nạp thêm vector tái tổ hợp pET32a(+). Ở Việt Nam, chưa có một công bố nào về gen mã hóa cho Brevinin của các loài ếch tính đến nay. Khi biến nạp vào vật chủ thì protein này đã biểu hiện thành công với 100% tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang gen có hiệu quả biểu hiện trên 60% và thu được protein tái tổ hợp có độ tinh sạch đạt > 80%.

Gen mã hóa Brevinin được gắn vào vector pET32a(+), khi biểu hiện tạo ra protein Brevinin tái tổ hợp dung hợp với protein TrX trong vector pET32a(+). Peptit Brevinin được cắt từ protein dung hợp Brevinin bằng enzym Factor Xa.

Chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pET32a(+)/Brevinin thuần khiết về mặt sinh học nêu trong giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào động vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm KHCVN ở các điều kiện khác nhau như: trong điều kiện lạnh sâu -80°C, -20°C và đông khô.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1

Tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin: dựa trên trình tự peptit của Brevinin được nêu trong SEQ ID NO.1, tiến hành tổng hợp hoá học tạo gen mã hoá cho peptit Brevinin, gen mã hoá Brevinin bao gồm 2 sợi đơn (oligonucleotit) có trình tự nêu

trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3. Trộn 1,2 μ L mỗi đoạn oligonucleotit với 7,6 μ L H₂O, biến tính 95 °C, 5 phút. Để ở nhiệt độ phòng 10-15 phút. Sau đó đặt vào đá chuẩn bị thực hiện phản ứng nối ghép gen.

Ví dụ 2

Cắt vector pET-32a(+) bằng enzym cắt giới hạn

Vector pET-32a(+) được cắt đồng thời bằng hai enzyme cắt giới hạn BamHI và XhoI. Thành phần phản ứng cắt gồm 16 μ L vector, 2.5 μ L BamHI, 2.5 μ L XhoI, 4 μ L Buffer 10x, 15 μ L H₂O. Ủ phản ứng ở 37°C trong 2-3 giờ. Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng kit tinh sạch Qiagen, thu lại 40 μ L vector đã mở vòng. Sản phẩm tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel agarosa 1%.

Ví dụ 3

Gắn gen mã hóa Brevinin vào vector pET-32a(+) sau khi cắt

Thể tích phản ứng gắn nối 10 μ L gồm 3 μ L gen, 5 μ L vector pET-32a(+), 1 μ L T4 ligaza buffer, 1 μ L enzym T4 DNA ligaza. Ủ phản ứng ở 22°C, trong 3 giờ. Sau đó, sản phẩm ghép nối gen được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Mỗi loại gen peptit chọn 5 khuẩn lạc trắng tiến hành nuôi và tách plasmit. Điện di kiểm tra kết quả trên gel agarosa.

Ví dụ 4

Tạo chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector pET32a(+) biểu hiện peptit Brevinin

Để thực hiện biến nạp vector pET-32a(+)/Brevinin vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt đầu tiên chọn ngẫu nhiên một khuẩn lạc chứa Brevinin dung hợp cho vào mỗi lọ 2ml LB bổ sung ampicillin 100 μ g/mL, nuôi lắc qua đêm. Sau đó, cấy chuyển 2% dịch nuôi tế bào qua đêm sang môi trường LB mới có bổ sung ampicillin 100 μ g/mL. Nuôi lắc ở 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8. Hút ra 1ml dịch môi trường, sau đó tế bào được cảm ứng với IPTG 0,1 mM/ml, nuôi ở 37°C, 120 vòng/phút để biểu hiện protein dung hợp. Thu mẫu cảm ứng sau 3h, 5h và 20h. Ly tâm thu sinh khối tế bào. Sản phẩm sẽ được kiểm tra bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE (Lemli và cộng sự).

Ví dụ 5

Chuẩn bị dung dịch tế bào chứa peptit kháng khuẩn Brevinin tái tổ hợp để tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với Ni-NTA resin

Thu sinh khối tế bào từ 50 mL môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở 4000 - 5000 v/ph khoảng 20 - 40 phút. Huyền phù hóa sinh khối tế bào trong 8 mL dung dịch đệm liên kết Native binding buffer, bổ sung 4 mg lysozyme ủ trên đá 30 phút và siêu âm để phá tế bào trong 20 phút (siêu âm 15s, nghỉ 20s) ở cường độ cao. Ly tâm dịch sau siêu âm ở 7500 v/ph, 10 phút để thu dịch nổi và chuyển sang ống falcon sạch sau đó bảo quản ở -20 °C

Ví dụ 6

Chuẩn bị cột Ni-NTA Agarosa

Huyền phù hóa hạt Ni-NTA Agarosa trong lọ bằng cách đảo trộn và đập nhẹ tay vào lọ và hút 2 ml dung dịch resin đưa lên cột tinh sạch cho dung dịch resin chảy qua cột hoàn toàn (khoảng 5- 10 phút). Bổ sung 6ml nước cất khử trùng và huyền phù hóa resin bằng cách đảo trộn cột và đập nhẹ cột vào tay và để dung dịch resin chảy hoàn toàn qua cột sau đó bổ sung 6ml dung dịch đệm liên kết Native Binding Buffer lên cột. Huyền phù hóa resin bằng cách đảo trộn cột hoặc đập nhẹ tay vào cột. Để dung dịch chảy hoàn toàn qua cột (5-7) phút.

Ví dụ 7

Quy trình tinh sạch

Bổ sung dịch siêu âm phá vỡ tế bào lên cột tinh sạch. Đảo đều cột trong 30-60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, cố định cột theo chiều thẳng đứng, để dịch chảy hoàn toàn qua cột. Rửa cột với 8 mL dung dịch đệm rửa Native Wash Buffer, 30 mM Imidazol, pH 8.0, huyền phù hóa resin trong dung dịch đệm, sau đó để dịch chảy qua cột. Thu 1ml dịch chảy qua cột giữ ở 4°C cho điện di kiểm tra trên gel Tricin SDS-PAGE. Rửa 4 lần. Thôi cột bằng 7ml dung dịch đệm thôi Native Elution Buffer, pH 8,0, thu 1ml/phân đoạn, thu 6 phân đoạn và kiểm tra bằng phương pháp điện di Tricin SDS-PAGE cùng với mẫu sau cảm ứng chưa tinh sạch.

Ví dụ 8

Cắt thu peptit Brevinin từ protein dung hợp thu được bằng enzym proteaza bằng cách cho dịch protein dung hợp Brevinin tinh sạch được thẩm tích với dung dịch đệm cắt Factor Xa Cleavage buffer 1X, dung dịch được bổ sung enzym Factor Xa Solution 1 U/ μ L theo tỷ lệ 10U/ μ L cho 1 mg protein, ủ ở nhiệt độ 22 - 25°C trong 16 giờ, sau đó chuyển sản phẩm sau khi được cắt với enzym lên cột Niken-resin thu dịch đi qua chứa peptit Brevinin tái tổ hợp.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) chứa vectơ pET32a(+)/Brevinin thuần khiết về mặt sinh học là chủng tái tổ hợp đầu tiên tại Việt Nam có mang gen mã hóa cho peptit kháng khuẩn Brevinin động vật từ ếch được biểu hiện trong vi khuẩn và khi biến nạp vào vật chủ thì protein này đã biểu hiện thành công với 100% tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang gen có hiệu quả biểu hiện trên 60% và thu được protein tái tổ hợp có độ tinh sạch đạt > 80%. Brevinin có hoạt tính tiêu diệt vi khuẩn phổ rộng, bao gồm cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương được kiểm tra trong đó đặc biệt có cả các chủng có gen kháng kháng sinh. Nồng độ ức chế tối thiểu (μ g/ml) của peptit này đối với các chủng gây bệnh lần lượt là 93,9 (*A. baumannii* TBDV); 11,3 (*K. pneumonia* TBDV); 10,9 (*P. aeruginosa* TBDV); 21,9 (*E. coli* TBDV). Đối với chủng vi khuẩn Gram dương kháng kháng sinh được sử dụng là *S. aureus* TBDV peptit này có nồng độ ức chế tối thiểu là 12,8 (μ g/ml). Với các dòng tế bào ung thư Jurkat, HL60, AGS và HepG2, peptit này có tác dụng ức chế một số dòng tế bào ở nồng độ cao > 100 μ M.

Mặc dù các mô tả nêu trên chứa nhiều chi tiết cụ thể, chúng không được coi là giới hạn về phương án thực thi sáng chế, mà chỉ nhằm mục đích minh họa một số phương án thực thi được ưu tiên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất peptit Brevinin tái tổ hợp có khả năng kháng khuẩn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Tổng hợp gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách xác định trình tự cADN mã hoá peptit Brevinin trên cơ sở trình tự peptit nêu trong SEQ ID NO.1 và tiến hành tổng hợp hoá học tạo gen mã hoá cho peptit Brevinin, trong đó gen mã hoá Brevinin bao gồm 2 sợi đơn có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; sau đó 1 - 10 μ M các sợi đơn có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 được trộn với nhau và xử lý nhiệt 95 - 100°C trong 5 - 10 phút, sau đó hạ từ từ nhiệt độ xuống nhiệt độ phòng 10 - 30 phút để thu được gen mã hoá cho peptit Brevinin;

b) Tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách gắn gen mã hoá cho peptit Brevinin ở bước a) vào vector biểu hiện pET-32a(+) đã mở vòng với các enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I dưới tác dụng của enzym *T4-ligaza*, phản ứng ở 22°C, trong 3 giờ, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt, tiến hành nuôi khuẩn lạc và tách plasmit chứa vector pET-32a(+)/Brevinin;

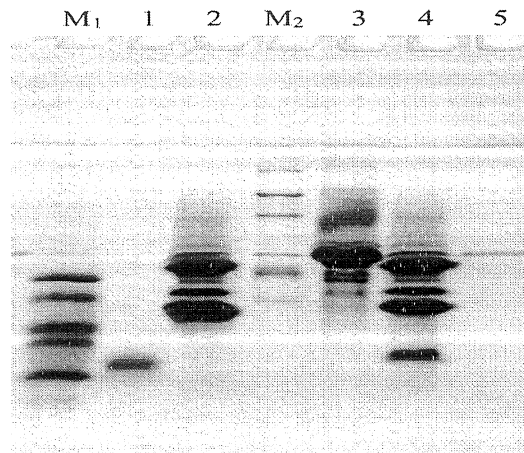
c) Tạo chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hoá cho peptit Brevinin bằng cách biến nạp plasmit mang vector pET-32a(+)/Brevinin thu được ở bước b) vào tế bào khả biến *E.coli* BL21 (DE3), nuôi trong môi trường LB có bổ sung ampicillin 100 μ g/mL, nuôi lắc ở 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8;

d) Biểu hiện và thu protein dung hợp chứa peptit Brevinin bằng cách hút 1mL dịch nuôi cấy thu được ở bước c) và bổ sung IPTG 0,1 mM, lắc với tốc độ 100 - 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 25 - 37°C, kéo dài 5 đến 20 giờ, sau đó thu sinh khối tế bào từ dịch nuôi cấy bằng cách ly tâm ở 4000 - 5000 v/ph khoảng 20 - 40 phút,

e) Tinh sạch protein dung hợp chứa peptit Brevinin bằng cách huyền phù hóa sinh khối tế bào thu được ở bước d) trong dung dịch đệm liên kết Native Binding Buffer, bổ sung lysozym rồi ủ trên đá 30 phút và siêu âm để phá tế bào trong 20 phút siêu âm 15s, nghỉ 20s ở cường độ cao, ly tâm dịch sau siêu âm ở 7500 vòng/phút

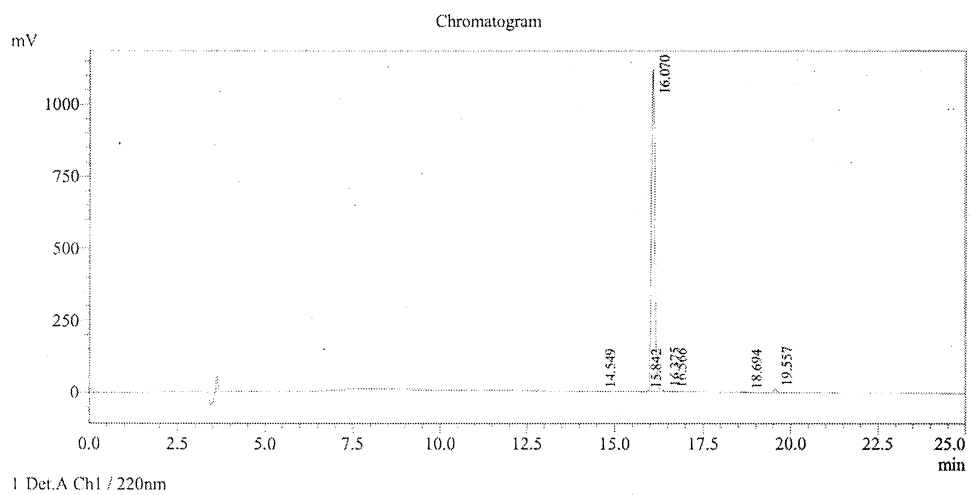
trong 10 phút để thu dịch nổi, đưa dịch nổi này lên cột đã được nhồi 2 mL gel NTA resin, cột được rửa với 8 mL dung dịch đệm rửa Native Wash Buffer, 30 mM Imidazol, pH 8, thổi cột bằng 5 mL dung dịch đệm thổi Native Elution Buffer, pH 8 sau đó thu các phân đoạn chứa protein dung hợp Brevinin tinh sạch; và

f) Cắt thu peptit Brevinin từ protein dung hợp thu được ở bước d) bằng enzym proteaza bằng cách cho dịch protein dung hợp Brevinin tinh sạch được thẩm tích với dung dịch đệm cắt Factor Xa Cleavage buffer 1X, dung dịch được bổ sung enzym Factor Xa Solution 1 U/ μ L theo tỷ lệ 10U/ μ L cho 1 mg protein, ủ ở nhiệt độ 22 - 25°C trong 16 giờ, sau đó chuyển sản phẩm sau khi được cắt với enzym lên cột Niken-resin thu dịch đi qua chứa peptit Brevinin tái tổ hợp.



Hình 1. Ảnh điện di thu nhận peptit brevinin được cắt từ các protein dung hợp và loại bỏ các protein khác sử dụng cột Ni-resin

M1: marker peptide; 1: Mẫu peptide Brevinin tái tổ hợp sau tinh sạch; 2: Mẫu bám trên cột Niken-resin; M2: Marker protein; 3: mẫu không cắt, 4: mẫu protein dung hợp cắt với factor Xa; 5: mẫu protein dung hợp không cắt lượng nhỏ



Hình 2. Kết quả chạy HPLC mẫu peptit Brevinin tái tổ hợp

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> QUY TRÌNH SẢN XUẤT PEPTIT BREVININ TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN ĐỂ ỨNG DỤNG THAY THẾ KHÁNG SINH

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 11

<212> Protein

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit

<220>

<222>

<223>

<400> 1

FAKWAFKWLKK

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen mã hoá cho peptit Brevinin sợi có nghĩa

<220>

<222>

<223>

<400> 2

GATCCATTGAAGGTCGTTTCCTGAAATGGCTCTTTAAATGGGCGAAAAAGTAA

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen mã hoá cho peptit Brevinin sợi đối nghĩa

<220>

<222>

<223>

<400> 3

TCGATTACTTTTTCGCCCATTTAAGAGCCATTCAGGAAACGACCTTCAATG