

NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PEPTIDE BREVININ-1EMA TÁI TỔ HỢP TRONG VI KHUẨN *E. COLI*

LÃ THỊ HUYỀN, TẠ THỊ LOAN,
TRẦN THỊ THANH HƯƠNG, NGUYỄN TRỌNG LINH,
TRẦN MẠNH HẢI, NGUYỄN THU TRANG, NGUYỄN THỊ ĐÀ
Viện Công nghệ Sinh học, VAST

TÓM TẮT

Brevinin là một trong những peptide kháng khuẩn phổ biến nhất, bao gồm 2 họ: brevinin-1 (khoảng 24 aa) và brevinin 2 (khoảng 33-34 aa). Thành viên đầu tiên của siêu họ peptide này được phát hiện vào năm 1992. Họ brevinin được phân lập từ da của *Rana brevipoda porsa* và đã được chứng minh khả năng tiêu diệt vi sinh vật bao gồm chống lại vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và các chủng nấm gây bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các sợi oligonucleotide tổng hợp để tạo gen mã hóa cho brevinin-1EMA. Gen được gắn vào vector pET-22b(+) tạo vector tái tổ hợp và được biểu hiện peptide brevinin-1EMA trong vi khuẩn *E.coli* BL21 (DE3). Kết quả chúng tôi đã biểu hiện thành công peptide brevinin-1EMA tái tổ hợp, khảo sát các điều kiện biểu hiện peptide này, khẳng định bằng western blot và tinh sạch để phục vụ cho các nghiên cứu trong lĩnh vực y học.

Từ khóa: brevinin, peptide, kháng khuẩn, brevinin-1EMA.

SUMMARY

CLONING AND EXPRESSION OF RECOMBINANT BREVININ-1EMA IN ESCHERICHIA COLI SYSTEM

Brevinin peptide is one of the most common antibiotics, including 2 groups: brevinin-1 (approximately length of 24 residues) and brevinin-2 (approximately length of 33-34 residues). The first member of this superfamily was discovered in 1992. Brevinin peptides were isolated from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*, and could fight against fungus, Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this study, we designed oligonucleotides which could detect gene encoding brevinin-1EMA. Thus, the gene was inserted into vector pET-22b(+). This recombinant DNA would express

gene was inserted into vector pET-22b(+). This recombinant DNA would express brevinin-1EMA peptide in *E.coli* BL21 (DE3). The results showed that recombinant brevinin-1EMA was successfully expressed. In addition, the conditions in peptide expression was examined for medical application.

Keywords: brevinin, peptide, antibiotics, brevinin-1EMA.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Peptide kháng khuẩn (Antimicrobial peptides-AMPs) hay còn được gọi là peptide bảo vệ vật chủ HDPs (host defense peptides) có mặt ở tất cả các loài từ vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật và con người. Theo cơ sở dữ liệu về peptide kháng khuẩn (APD), tính đến nay bao gồm 3250 peptide kháng khuẩn từ 6 giới (365 vi khuẩn / kháng sinh peptide từ vi khuẩn, 5 từ vi khuẩn cổ, 8 từ nguyên sinh động vật, 21 từ nấm, 360 từ thực vật và 2409 từ động vật và một số peptide tổng hợp.

Dựa vào mức độ tương đồng về độ tích điện, trình tự, chức năng và cấu trúc không gian, AMPs được chia thành các nhóm chính (Brogden, 2005): Nhóm peptide là phân đoạn của các protein lớn hơn, nhóm peptide tích điện âm và nhóm peptide tích điện dương. Trong đó, nhóm peptide tích điện dương là nhóm lớn nhất.

Dựa vào đặc điểm về cấu trúc cuộn gấp, các peptide kháng khuẩn tự nhiên có cấu trúc bậc hai đa dạng gồm: xoắn α , phiến β với 2 hoặc nhiều liên kết disulfide, kẹp tóc hoặc vòng với 1 liên kết disulfide duy nhất, β trải rộng. Hầu hết các AMPs được tìm thấy cho đến nay thì cấu trúc xoắn α và phiến β phổ biến hơn, trong đó cấu trúc xoắn α được nghiên cứu nhiều nhất. Về mặt chức năng, chúng được phân loại là các peptide kháng vi rút, kháng khuẩn, kháng nấm và chống ký sinh trùng, kháng ung thư,... (Bahar A.A. 2013; Narayana J.L., 2015).

Các AMPs có các tính chất đặc trưng làm cho chúng trở thành ứng cử viên tiềm năng cho ứng dụng điều trị như chúng có cơ chế hoạt động riêng biệt, hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng, hiệu quả cao hơn ở nồng độ thấp, độ đặc hiệu với

Chịu trách nhiệm: Lã Thị Huyền
Email: lahuyenibt@gmail.com
Ngày nhận: 14/9/2020
Ngày phản biện: 20/10/2020
Ngày duyệt bài: 09/11/2020

mục tiêu, xu hướng kháng thuốc thấp, có khả năng phân hủy sinh học, kích thước nhỏ hơn và tác dụng kết hợp với kháng sinh cổ điển (Mahlpuu M. et al., 2016, da Cunha N.B. et al., 2017). Do đó, nhu cầu về AMPs đã tăng vọt trong vài năm qua do sự khan hiếm của các loại thuốc kháng sinh hiệu quả và sự gia tăng đồng thời của các vi khuẩn kháng thuốc đã ngừng đáp ứng với các loại thuốc kháng sinh thông thường.

Brevinin là một peptide kháng khuẩn tích điện dương điển hình, bao gồm 2 họ: brevinin-1 và brevinin-2. Brevinin-1EMa là một peptide kháng khuẩn thuộc họ brevinin-1, gồm 24 axit amin được phân lập từ da của một loài ếch ở Hàn Quốc có tên *Rana rugosa* (Won et al., 2009; Conlon, 2008). Brevinin-1EMa thuộc nhóm peptide kháng khuẩn tích điện dương, có cấu trúc xoắn α , là nhóm lớn nhất và mang các đặc trưng của peptide kháng khuẩn tự nhiên (Zelezetsky and Tossi, 2006). Peptide kháng khuẩn này tiêu diệt vi khuẩn bằng cách tấn công màng tế bào một cách chọn lọc. Sự hiện diện của axit amin mang điện tích dương tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác với màng phospholipid tích điện âm của vi khuẩn và màng tế bào nhân thực tích điện âm. Đồng thời, cấu trúc xoắn α đóng vai trò quan trọng trong quá trình thâm thấu qua màng tế bào của peptide (Won et al., 2011).

Brevinin-1EMa có phổ hoạt tính kháng khuẩn rộng bao gồm vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương, nấm, một số virus và kí sinh trùng. Ngoài ra, Brevinin-1EMa và các dẫn xuất peptide có tác dụng chống ung thư. Cụ thể, đặc tính chống ung thư của Brevinin-1EMa và các dẫn xuất đã được Su-Jin Kang và cộng sự nghiên cứu trên bảy dòng tế bào ung thư: A498 (thận), A549 (phổi), HCT (đại tràng), MKN45 (dạ dày), PC-3 (tuyến tiền liệt), SK-MEL-2 (da) và SK-OV-3 (buồng trứng) (Kang et al., 2012).

Với nhiều đặc điểm nổi bật như vậy, peptide brevinin-1EMa có tiềm năng trở thành nguồn kháng sinh thế hệ mới cho cuộc chiến kháng kháng sinh đã và đang được các nhà khoa học quan tâm đặc biệt. Tuy nhiên, hàm lượng Brevinin-1EMa thu nhận khi tách chiết từ da ếch thấp và con đường tổng hợp hóa học có chi phí đắt đỏ, do đó phương pháp tái tổ hợp với chi phí tương đối thấp, dễ dàng tăng quy mô sản xuất đã trở thành công cụ để sản xuất peptide kháng khuẩn lượng lớn.

Với mong muốn sản xuất peptide brevinin-1EMa bằng con đường sản xuất protein tái tổ hợp quy mô lớn để ứng dụng cho lĩnh vực y học, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: "Tách

dòng và biểu hiện peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli*".

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

1.1. Sinh phẩm

Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α , BL21(DE3) và plasmid PET-22b(+) được cung cấp bởi phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

Các đoạn Oligonucleotide sợi đơn dùng tạo gen mã hóa cho brevinin-1EMa được đặt tổng hợp bởi công ty Phù Sa; Cặp mồi T7 promoter/ T7 terminator được tổng hợp bởi công ty IDT (Mỹ), enzyme T4 DNA ligase (Thermo- Mỹ).

1.2. Hóa chất

Các hóa chất: Ampicillin, IPTG, agarose, isopropanol, ethanol, methanol, Coomassie Brilliant Blue, EtBr, Tris base, Tris-HCl, acrylamide, imidazole, Polyarylamide, Bis-acrylamide, Paraformaldehyde.

Các loại đệm: Native binding buffer (Native Purification Buffer 1X, pH 8.0), Native Wash Buffer (Imidazole 20mM, Native Purification Buffer 1X, pH 8.0), Native Elution Buffer (imidazole 250mM, Native Purification Buffer 1X, pH 8.0).

1.3. Môi trường

Môi trường LB đặc: Cao nấm men 5 g/L, trypton 10 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L. Môi trường LB lỏng: Cao nấm men 5 g/L, trypton 10 g/L, NaCl 10 g/L.

2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen mã hóa brevinin-1EMa

Vector tách dòng pET-22b(+) được xử lý bằng 2 enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I.

Mỗi sợi đơn oligonucleotide (trình tự như bảng 1) được pha trong H₂O, biến tính 95°C 5 phút, để ở nhiệt độ phòng 10-15 phút, rồi đặt trên đá. Các sợi oligonucleotide được gắn nối với vector pET-22b(+) bằng enzyme T4 DNA ligase và được biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Tế bào *E.coli* DH5 α sau khi biến nạp được cấy trải trên đĩa môi trường LB/agar có bổ sung Ampicillin (Amp) nồng độ 100 μ g/mL và ủ qua đêm ở 37°C. Các plasmid được tách chiết từ tế bào DH5 α theo phương pháp miniprep của Sambrook.

Giải trình tự gen mã hóa peptide Brevinin

Sản phẩm plasmid được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự sử dụng cặp mồi T7 promoter/ T7 terminator (trình tự mồi như Bảng 1). Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Gene Bank.

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide và cặp mỗi vector

	Trình tự
Oligonucleotide	pepF: 5'-GATCGCATGTTCTGAAATGGTTGTTAAGTGGGCGAAAAAGC-3'
	pepR: 5'-TCGAGCTTTTTGGCCACTTAAACAACCATTTCAGGAACATGC-3'
T7 promoter/T7 terminator	T7 promoter: 5'TTAATACGACTCACTATAGGG-3'
	T7 terminator: 5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Biến nạp plasmid mang gen mã hóa peptide brevinin-1EMa vào E.coli BL21(DE3)

Vector tái tổ hợp pET-22b(+)/ brevinin-1EMa được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* BL21(DE3) theo phương pháp sốc nhiệt. Tế bào *E.coli* BL21(DE3) sau khi biến nạp được cấy trải trên đĩa môi trường LB/agar có bổ sung Amp nồng độ 100 µg/mL và ủ qua đêm ở 37°C.

Biểu hiện peptide brevinin-1EMa

Cấy hoạt hóa một khuẩn lạc từ đĩa thạch vào 2mL môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Amp 100 µg/ml, lắc qua đêm ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút. Cấy chuyển 1% dịch nuôi tế bào qua đêm sang môi trường LB mới có bổ sung Amp 100 µg/mL. Nuôi lắc ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút đến khi OD ở bước sóng 600 nm đạt 0.5-0.7 thì hút 500µL dịch môi trường, sau đó tế bào được cảm ứng với IPTG 0.5mM. Thu mẫu cảm ứng sau 3 giờ, 5 giờ và 16 giờ. Sự biểu hiện của peptide brevinin được kiểm tra bằng phương pháp điện di protein Tricine SDS-PAGE.

Tối ưu hóa sự biểu hiện của peptide brevinin- 1EMa

Cấy hoạt hóa 2-4% dịch tế bào vào môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Amp 100 µg/mL, nuôi lắc ở 37°C qua đêm. Cấy chuyển 1% thể tích dịch môi trường nuôi cấy qua đêm sang môi trường LB mới bổ sung ampicilin 100 µg/mL theo thể tích phù hợp, nuôi lắc tế bào ở 37°C trong khoảng 1-3h thì bổ sung IPTG để cảm ứng biểu hiện peptide đích. Tiến hành khảo sát sự biểu hiện ở nhiệt độ 30°C và 37°C, thời gian biểu hiện lần lượt ở 3 giờ, 5 giờ và 16 giờ, nồng độ IPTG cảm ứng là 0.2 mM, 0.5 mM và 1 mM.

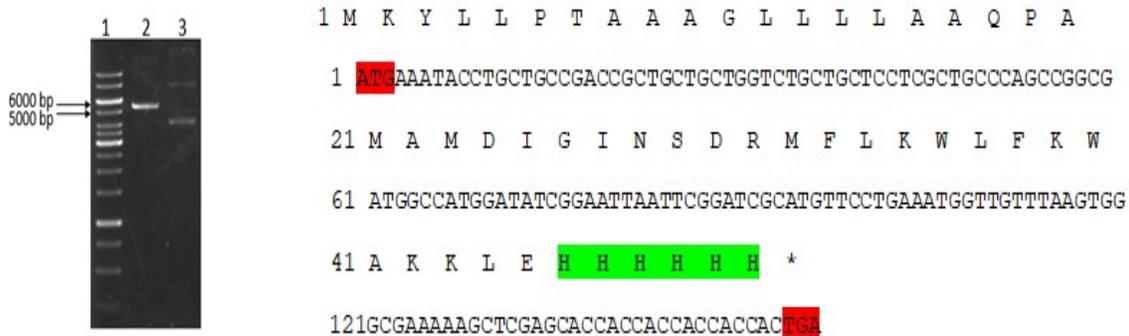
Tinh sạch peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp

Sau khi điều kiện biểu hiện, peptide brevinin-1EMa được biểu hiện ở lượng lớn hơn (50 mL LB lỏng). Và sau đó, Brevinin-1EMa tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột ái lực Ni-NTA Agarose theo phương pháp native. Peptide brevinin-1EMa sau tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di protein Tricin SDS- page và phương pháp Western Blot.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thiết kế vector tái tổ hợp pET-22b(+)/ brevinin-1EMa

Vector pET-22b(+) được xử lý bằng hai enzyme cắt giới hạn là *Bam*HI và *Xho*I có kích thước 5493 bp. Kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% cùng với vector pET-22b(+) gốc, kết quả thu được một băng duy nhất với kích thước khoảng 5493 bp nằm giữa băng 5000 bp và 6000 bp của marker (Hình 2) phù hợp với kích thước dự đoán trên lý thuyết.

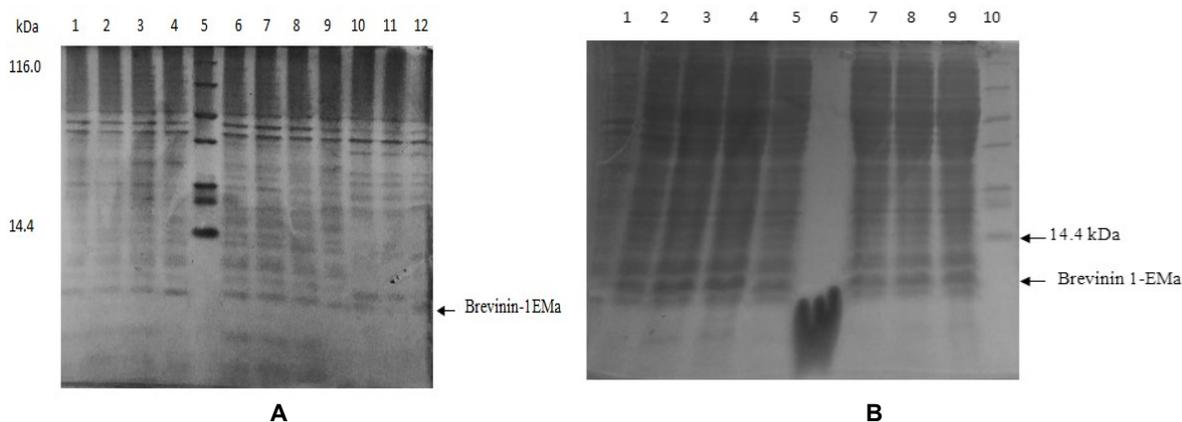


Hình 2. Cắt vector pET-22b(+) bằng enzyme cắt giới hạn. Vector pET-22b(+) được cắt đồng thời bằng hai enzyme *Bam*HI và *Xho*I, phản ứng cắt được ủ ở 37°C, qua đêm. 1.Marker 1kb, 2. vector pET-22b(+) sau khi cắt bằng hai enzyme cắt giới hạn, 3. vector pET-22b(+)

Gen mã hóa cho peptide brevinin được tổng hợp từ 2 đoạn oligonucleotide sợi đơn. Đoạn gen này được gắn nối với vector pET-22b(+) sau khi cắt bằng hai enzyme *Xho*I và *Bam*HI với sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo vector tái tổ hợp. Sản phẩm của phản ứng gắn nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và cấy trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung kháng sinh Amp 100 μ g/mL. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, xuất hiện các khuẩn lạc màu trắng trên đĩa thạch. Tuy nhiên không phải tất cả các khuẩn lạc mọc và phát triển được trên môi trường LB/agar có ampicillin đều mang plasmid tái tổ hợp chứa gen cần tách dòng mà còn có cả vector gốc pET-22b(+) tự đóng vòng. Do kích thước đoạn gen chèn vào quá ngắn (43 nucleotide) nên việc kiểm tra các dòng plasmid mang gen mã hóa brevinin-1EMa bằng phản ứng PCR với khuôn là các dòng plasmid trên, đối chứng là plasmid gốc với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator là không thể phát hiện được. Nên chọn dòng bằng giải trình tự Sanger với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator cho 6 dòng, kết quả giải trình tự cho thấy có 3 dòng là đã gắn được gen mã hóa brevinin-1EMa bao gồm 156 nucleotide, có mã mở đầu ATG và mã kết thúc TGA (Hình 2). Dịch mã từ trình tự nucleotide của gen mã hóa peptide brevinin-1EMa sang trình tự axit amin, chúng tôi thu được một peptide có trình tự gồm 51 axit amin tương đương với khối lượng xấp xỉ 5.9 kDa tương ứng với kích thước của peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp theo tính toán lý thuyết. Như vậy đã thiết kế và tạo thành công vector biểu hiện tái tổ hợp pET-22b+ mang gen mã hóa peptide brevinin-1EMa.

Sự biểu hiện của peptide brevinin – 1EMa tái tổ hợp trong *E. coli*

Vector tái tổ hợp pET-22b(+)/brevinin- 1EMa được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL 21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau đó nuôi các tế bào *E. coli* mang gen mã hóa brevinin- 1EMa trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Amp 1000 μ g/mL, cảm ứng IPTG ở nồng độ 0.5mM, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, ly tâm thu sinh khối tế bào ở các khoảng thời gian 3 tiếng, 5 tiếng và 16 tiếng. Kiểm tra sự biểu hiện của brevinin -1EMa bằng phương pháp điện di Tricine SDS-PAGE (hình 4).



Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện của peptide brevinin -1EMa ở tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp điện di Tricine SDS-PAGE. A. 1,2,3,4: Mẫu sau 3h cảm ứng của dòng 1,2,3,4; 5. Marker protein, 6,7,8,9: Mẫu sau 5h cảm ứng dòng 1-4, 10,11: Mẫu sau 16h cảm ứng dòng 1,2; 12. Dòng số 1 không cảm ứng. B. 1. Mẫu ko cảm ứng, 2-4: Mẫu cảm ứng IPTG 0.2 mM, 0.5 mM và 1 mM thu mẫu sau 16h cảm ứng, nhiệt độ nuôi cấy 30°C; 6. Peptide brevinin (Genscript), 7-9. Mẫu cảm ứng IPTG 0.2 mM, 0.5 mM và 1 mM thu mẫu sau 16h cảm ứng, nhiệt độ nuôi cấy 37°C; 10. Marker protein

Kết quả điện di cho thấy khi có mặt chất cảm ứng IPTG sau thời gian cảm ứng 16h ở các mẫu đã khảo sát tương ứng với các đường chạy từ 1 đến 4 và từ 6 đến 11 đều xuất hiện một băng có kích thước nhỏ hơn 14.4 kDa (so với marker) được dự đoán là kích thước của peptide brevinin - 1EMa tái tổ hợp. Trong khi đó,

mẫu không được cảm ứng IPTG (đường chạy số 12) không có băng này. Tuy nhiên, ở mẫu cảm ứng 3h và 5h băng này rất mờ, có thể do thời gian cảm ứng ngắn, lúc này mức độ biểu hiện peptide brevinin -1EMa tái tổ hợp còn yếu. Đối với hai mẫu cảm ứng 16h ở đường chạy số 10 và số 11 băng này đậm hơn hẳn. Kết quả

cho thấy peptide brevinin- 1EMa được biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli*.

Tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện peptide brevinin- 1EMa

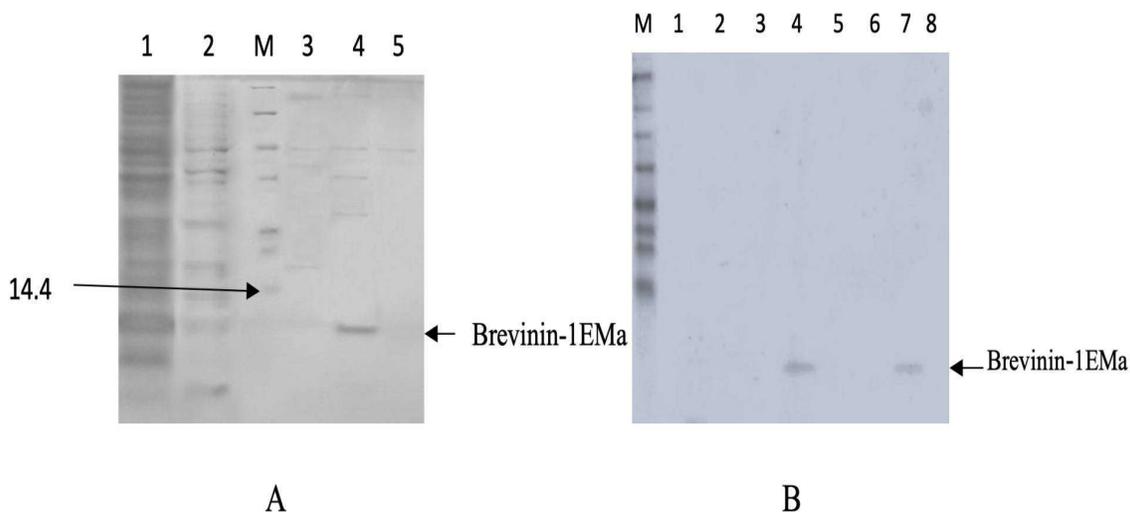
Chọn dòng số 1 để tiến hành tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện thu lượng peptide nhiều nhất. Khảo sát điều kiện nuôi cấy gồm 3 yếu tố nhiệt độ, thời gian cảm ứng và nồng độ cảm ứng IPTG. Chủng tế bào *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp (dòng số 1) được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 37°C, thu sinh khối sau 3 tiếng, 5 tiếng và 16 tiếng, cảm ứng IPTG lần lượt ở các nồng độ 0.2mM, 0.5mM và 1mM. Kết quả thu được ở hình 4A cho thấy thời gian biểu hiện tối ưu là 16 tiếng.

Kết quả thu được trên hình 4B cho thấy từ đường chạy số 2 đến 5 và từ 7 đến 9 có một băng đậm ở kích thước nằm trong khoảng 1.2 kDa (kích thước của brevinin thương mại) và 14.4 kDa dự đoán là của peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp với kích thước khoảng 5.9 kDa. Trong khi đó, mẫu không cảm ứng ở đường chạy số 1 không có băng này. Độ đậm của các băng quan

tâm không chênh lệch đáng kể chứng tỏ từ nồng độ IPTG 0.2 mM, brevinin-1EMa tái tổ hợp đã được cảm ứng biểu hiện. Ở nhiệt độ 30°C và 37°C, brevinin được biểu hiện với lượng tương đương nhau. Như vậy từ kết quả thu được, chúng tôi chọn được điều kiện biểu hiện tối ưu tại nhiệt độ 37°C, thời gian biểu hiện 16 h, nồng độ IPTG là 0.2 mM.

Tinh sạch peptide brevinin tái tổ hợp

Do brevinin tái tổ hợp có 6 Histidine ở đầu C nên có ái lực cao với Ni^{2+} nên tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với Ni-NTA resin. Các protein lẫn trong dịch chiết kháng thể tái tổ hợp được loại bỏ khỏi peptide tái tổ hợp ở nồng độ Imidazole 20 mM. Sau đó peptide tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột nhờ buffer đẩy (Native Elution Buffer). Chúng tôi thu 6 phân đoạn với thể tích 1 mL/phân đoạn ở nồng độ Imidazol 250 mM. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di biến tính protein Tricin SDS- PAGE (Hình 5).



Hình 5. A. Kiểm tra độ tinh sạch peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp sau quá trình tinh sạch. 1. Dịch trước tinh sạch, 2. Dịch rửa qua cột (Native Wash Buffer), M. Marker protein, 3-5. Phân đoạn 1-3. B. Phát hiện peptide tái tổ hợp brevinin-1EMa bằng phản ứng Western Blot. M. Marker protein màu, 1. Mẫu không cảm ứng, 2. Dịch rửa qua cột (Native wash buffer), 3-5. Phân đoạn 1-3, 6-8: 7. Phân đoạn 1-3 lặp lại.

Kết quả thu được cho thấy ở phân đoạn 2 (đường chạy 4) xuất hiện băng đậm có kích thước nằm trong khoảng kích thước dự đoán 5.9 kDa của peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp. Tuy nhiên, các phân đoạn sau tinh sạch vẫn còn một số băng phụ mờ, chứng tỏ còn lẫn một số protein tạp của vi khuẩn *E. coli*. Để quá trình tinh

sạch đạt hiệu quả cao hơn, có thể tăng nồng độ Imidazole trong dịch rửa Native Wash Buffer để loại bỏ được nhiều protein tạp hơn.

Để khẳng định về sự biểu hiện của peptide tái tổ hợp (peptide đích) chúng tôi thực hiện tiếp phản ứng Western Blot. Kết quả thu được ở phân đoạn 2 khoảng kích thước dự đoán 5.9

kDa của peptide brevinin-1EMa tái tổ hợp cần khẳng định trên gel Tricin – SDS Page (Hình 5B đường chạy 4,7). Do peptide tái tổ hợp được thiết kế có gắn đuôi His-tag nên kết quả này chứng tỏ peptide tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công ở hệ thống biểu hiện *E. coli*.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện tái tổ hợp pET-22b(+) mang gen mã hóa peptide brevinin-1EMa và đã lựa chọn được điều kiện peptide brevinin- 1EMa tái tổ hợp và tối ưu các điều kiện biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli*, tinh sạch thành công peptide tái tổ hợp và khẳng định bằng western blot.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Brogden, K.A.** (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–250.
2. **Conlon, J.M.** (2008). Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides* 29: 1815–1819.
3. **Kang, S.-J., Ji, H.-Y., and Lee, B.-J.** (2012). Anticancer activity of undecapeptide analogues derived from antimicrobial peptide, Brevinin-1EMa. *Arch. Pharm. Res.* 35: 791–799.
4. **Savelyeva, A., Ghavami, S., Davoodpour, P., Asoodeh, A., and Los, M.J.** (2014). An overview of Brevinin superfamily: structure, function and clinical perspectives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 818: 197–212.

5. **Won, H.-S., Kang, S.-J., Choi, W.-S., and Lee, B.-J.** (2011). Activity optimization of an undecapeptide analogue derived from a frog-skin antimicrobial peptide. *Mol. Cells* 31: 49–54.

6. **Won, H.-S., Kang, S.-J., and Lee, B.-J.** (2009). Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788: 1620–1629.

7. **Zelezetsky, I. and Tossi, A.** (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1758: 1436–1449.

8. **Bahar A.A., Ren D.** Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 2013;6:1543–1575.

9. **Narayana J.L., Chen J.Y.** Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides.* 2015;72:88–94.

10. **Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C.** Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016;6:194.

11. **da Cunha N.B., Cobacho N.B., Viana J.F., Lima L.A., Sampaio K.B., Dohms S.S., Ferreira A.C.R., de la Fuente-Núñez C., Costa F.F., Franco O.L., Dias S.C.** The next generation of Antimicrobial Peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today.* 2017;22:234–248.

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ GIAI ĐOẠN III KHÔNG MỎ ĐƯỢC, BẰNG PHÁC ĐỒ PACLITAXEL – CARBOPLATIN PHỐI HỢP HOÁ XẠ ĐỒNG THỜI

HÀNG QUỐC TUẤN¹, LÊ CHÍNH ĐẠI²
¹Bệnh viện Đa Khoa Tỉnh Kiên Giang
²Trường Đại Học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm: Hàng Quốc Tuấn
Email: tuanhkg@gmail.com
Ngày nhận: 07/9/2020
Ngày phân biện: 15/10/2020
Ngày duyệt bài: 03/11/2020

TÓM TẮT

Điều trị Ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) giai đoạn III, không mổ được phác đồ paclitaxel – carboplatin phối hợp hoá xạ trị đồng thời là một trong những lựa chọn điều trị được áp dụng hiện nay. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả điều trị.