

UBND TỈNH LÂM ĐỒNG
TRƯỜNG CAO ĐẲNG ĐÀ LẠT

GIÁO TRÌNH
MÔ ĐUN: CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐẠI CƯƠNG
NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

Ban hành kèm theo Quyết định số: /QĐ-... ngàytháng.... năm.....
..... của

Lâm Đồng, năm 2018

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

LỜI GIỚI THIỆU

Giáo trình công nghệ sinh học đại cương được biên soạn cho trình độ cao đẳng công nghệ sinh học hiện đang được đào tạo tại Khoa Nông nghiệp và sinh học ứng dụng Trường Cao đẳng Đà Lạt

Giáo trình được biên soạn căn cứ trên chương trình khung mô đun công nghệ sinh học đại cương trong công nghệ sinh học

Nguồn tài liệu tham khảo dựa trên nhiều tác giả và các biên soạn giáo trình của đồng nghiệp tại Khoa

Lâm Đồng ngày 02 tháng 10 năm 2018

Tham gia biên soạn

Chủ biên: Nguyễn Thị Huế

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC

Tên môn học : Công nghệ sinh học đại cương

Mã số môn học: MH 08

I. VỊ TRÍ, TÍNH CHẤT CỦA MÔN HỌC:

1. Vị trí:

Môn học được bố trí trước các môn học, mô đun chuyên môn .

2. Tính chất:

Là môn học kỹ thuật cơ sở bắt buộc, có liên quan rất nhiều đến các môn chuyên môn.

II. MỤC TIÊU MÔN HỌC:

1. Về kiến thức

- Trình bày được các khái niệm và các quá trình công nghệ sinh học.

2. Về kỹ năng

- Vận dụng được và liên hệ một số lĩnh vực của công nghệ sinh học trong công tác bảo vệ thực vật.

3. Về năng lực tự chủ và trách nhiệm:

- Sinh viên có khả năng làm việc theo nhóm, có khả năng ra quyết định khi làm việc với nhóm, tham mưu với người quản lý và tự chịu trách nhiệm về các quyết

MỤC LỤC

CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐẠI CƯƠNG

CHƯƠNG 1: KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã bài MH 8- 01

1.1. Khái niệm về công nghệ sinh học

Có nhiều định nghĩa về công nghệ sinh học (Biotechnology), tùy theo từng tác giả khác nhau, nhưng tất cả đều thống nhất về khái niệm cơ bản sau đây:

Công nghệ sinh học là sự sản xuất các sản phẩm trên quy mô công nghiệp, trong đó nhân tố tham gia trực tiếp và quyết định là các tế bào sống (vi sinh vật, thực vật, động vật). Mỗi tế bào sống của cơ thể sinh vật hoạt động trong lĩnh vực sản xuất này được xem như một lò phản ứng nhỏ.

Vào những năm 1980, công nghệ sinh học đã chuyển sang một giai đoạn mới là giai đoạn công nghệ sinh học hiện đại với việc sử dụng các thành tựu của kỹ thuật gen, là lĩnh vực công nghiệp sử dụng hoạt động sinh học của các tế bào đã được biến đổi di truyền. Cơ sở sinh học được áp dụng ở đây bao gồm sinh học phân tử, sinh học tế bào, hóa sinh học, di truyền học, vi sinh vật học, miễn dịch học, cùng các nguyên lý kỹ thuật máy tính...

Có hai cách định nghĩa công nghệ sinh học một cách tổng quát nhất:

- Do UNESCO (1985) định nghĩa: Công nghệ sinh học là công nghệ sử dụng một bộ phận hay tế bào riêng rẽ của cơ thể sinh vật vào việc khai thác sản phẩm của chúng.

- Do Trường Luật Stanford (1995) định nghĩa: Công nghệ sinh học là công nghệ chuyển một hay nhiều gen vào sinh vật chủ nhằm mục đích khai thác sản phẩm và chức năng của gen đó.

Sự khác biệt rõ rệt nhất của hai định nghĩa trên thuộc về đối tượng tác động của công nghệ sinh học: UNESCO xem cơ quan, bộ phận, tế bào và chức năng riêng rẽ của sinh vật là đối tượng, trong khi đó Trường Luật Stanford lại coi gen là đối tượng tác động của công nghệ.

Từ các định nghĩa trên, có thể phân biệt được hai nhóm công nghệ sinh học là:

- *Công nghệ sinh học truyền thống (Traditional Biotechnology)*

Bao gồm:

- + Thực phẩm lên men truyền thống (Food of Traditional Fermentations)
- + Công nghệ lên men vi sinh vật (Microbial Fermentation Technology)
- + Sản xuất phân bón và thuốc trừ sâu vi sinh vật (Production of Microbial Fertilizer and Pesticide)
- + Sản xuất sinh khối giàu protein (Protein-rich Biomass Production)
- + Nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô và tế bào thực vật (Plant Micropropagation)

+ Thụ tinh nhân tạo (*In vitro* Fertilization)

- *Công nghệ sinh học hiện đại (Modern Biotechnology)*

Bao gồm:

- + Nghiên cứu genome (Genomics)
- + Nghiên cứu proteome (Proteomics)
- + Thực vật và động vật chuyển gen (Transgenic Animal and Plant)
- + Động vật nhân bản (Animal Cloning)
- + Chip gen (DNA chip)
- + Liệu pháp tế bào và gen (Gen and Cell Therapy)
- + Công nghệ sinh học nano (Nanobiotechnology)
- + Tin sinh học (Bioinformatics)
- + Hoạt chất sinh học (Bioactive Compounds)
- + Protein biệt dược (Therapeutic Protein)

Sự phân loại công nghệ sinh học cũng có thể dựa vào các tác nhân sinh học tham gia vào quá trình công nghệ, có thể chia thành các nhóm sau:

- Công nghệ sinh học thực vật (Plant Biotechnology)
- Công nghệ sinh học động vật (Animal Biotechnology)
- Công nghệ sinh học vi sinh vật (Microbial Biotechnology)
- Công nghệ sinh học enzyme hay công nghệ enzyme (Enzyme Biotechnology)

Gần đây, đối với các tác nhân sinh học dưới tế bào còn hình thành khái niệm công nghệ protein (Protein Engineering) và công nghệ gen (Gen Engineering). Công nghệ Protein và công nghệ gen xuyên suốt và trở thành công nghệ chìa khóa nằm trong công nghệ sinh học thực vật, công nghệ sinh học động vật và công nghệ sinh học vi sinh vật. Nhờ kỹ thuật đọc trình tự gen và kỹ thuật DNA tái tổ hợp, công nghệ gen đã đạt được những thành tựu hết sức to lớn mang tính quyết định, mở ra những giai đoạn phát triển mới. Đó là nghiên cứu về toàn bộ genome của nhiều sinh vật, trong đó đáng chú ý là việc giải mã genome của con người và của cây lúa. Đó là việc hình thành cả một phương hướng nghiên cứu, ứng dụng và kinh doanh các sinh vật chuyển gen (Genetically Modified Organism-GMO) và các thực phẩm chuyển gen (Genetically Modified Food-GMF). Công nghệ protein có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong việc sản xuất ra các protein tái tổ hợp (Recombinant Protein) dùng làm dược phẩm điều trị các bệnh hiểm nghèo như: interferon, interleukin, insulin...

Mặt khác, tùy vào đối tượng phục vụ của công nghệ sinh học, có thể phân ra các lĩnh vực công nghệ sinh học khác nhau như:

- Công nghệ sinh học nông nghiệp (Biotechnology in Agriculture)
- Công nghệ sinh học chế biến thực phẩm (Biotechnology in Food Processing)
- Công nghệ sinh học y dược (Biotechnology in Medicine-Pharmaceutics)
- Công nghệ sinh học môi trường (Environmental Biotechnology)
- Công nghệ sinh học vật liệu (Material Biotechnology)
- Công nghệ sinh học hóa học (Biotechnology in Chemical Production)
- Công nghệ sinh học năng lượng (Biotechnology in Energy Production)...

1.2. Lĩnh vực nghiên cứu của công nghệ sinh học

Bốn lĩnh vực công nghệ sinh học hiện nay đang được quan tâm nhiều nhất đó là:

1. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp

Là lĩnh vực công nghệ sinh học có nhiều đóng góp trong việc cải thiện giống cây trồng, xây dựng những kỹ thuật canh tác mới, nghiên cứu quá trình cố định đạm ở những cây không thuộc họ đậu...

- Công nghệ sinh học trong cải thiện và nhân nhanh giống cây trồng. Lĩnh vực này có bốn ứng dụng chính: Ứng dụng kỹ thuật chọn dòng tế bào biến dị soma, nhân giống trong ống nghiệm (nhân giống *in vitro*), lai vô tính hay còn gọi là dung hợp tế bào trần, kỹ thuật sản xuất cây đơn bội (1n).

- Cố định đạm và biến nạp gen *nif*. Dùng kỹ thuật gen tách gen *nif* từ các cơ thể cố định đạm chuyển sang các cây trồng quan trọng như lúa, ngô là một mô hình lý tưởng của các nhà tạo giống.

- Các phương pháp canh tác mới, bao gồm: Phương pháp màng dinh dưỡng, hệ thống thủy canh.

- Công nghệ sinh học trong chăn nuôi, bao gồm: Kỹ thuật cấy chuyển phôi, tạo chế phẩm phòng tránh bệnh cho động vật...

2. Công nghệ sinh học trong y dược

Nhiều công trình nghiên cứu của công nghệ sinh học đã được ứng dụng thành công trong y dược, đặc biệt là trong sản xuất thuốc và trong chuẩn đoán bệnh.

Trong những năm qua, lĩnh vực ứng dụng công nghệ di truyền mạnh nhất trong y tế là ngành sản xuất thuốc kháng sinh, vắc xin, kháng thể đơn dòng và các protein có hoạt tính sinh học. Hiện nay, các nghiên cứu nhằm tìm kiếm các chất kháng sinh mới tăng mạnh do hiện tượng vi sinh vật kháng lại tác dụng của kháng sinh ngày càng nhiều hơn.

Phạm vi ứng dụng của kháng thể đơn dòng trong ngành y tế ngày càng tăng như phân tích miễn dịch, định vị các khối u, phát hiện một số protein có liên quan đến sự hình thành khối u, xác định sự có mặt của các loại vi khuẩn khác nhau, ... giúp cho các bác sĩ xác định bệnh một cách nhanh chóng và chính xác.

Kháng thể đơn dòng là tập hợp các phân tử kháng thể đồng nhất về mặt cấu trúc và tính chất. Kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng cách cho lai tế bào lympho trong hệ miễn dịch của động vật hoặc của người với tế bào ung thư. Một số thể lai có khả năng tạo ra kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên. Chọn các thể lai đó nhân lên và sản xuất kháng thể đơn dòng. Các tế bào lai có khả năng tăng sinh vĩnh viễn trong môi trường nuôi cấy - tính chất này nhận được từ tế bào ung thư.

Nhờ công nghệ sử dụng DNA tái tổ hợp mà người ta có thể sản xuất một số protein có hoạt tính sinh học dùng để chữa bệnh như insulin chữa bệnh tiểu đường, interferon chữa bệnh ung thư, các hormon tăng trưởng cho con người. Bản chất của công nghệ này là làm thay đổi bộ máy di truyền của tế bào bằng cách đưa gen mã hóa cho một protein đặc hiệu và bắt nó hoạt động để tạo ra một lượng lớn loại protein mà con người cần.

3. Công nghệ sinh học trong chế biến thực phẩm

Công nghệ lên men là một lĩnh vực quan trọng trong sản xuất thực phẩm. Việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng lên men tốt, đem lại hiệu quả cao là rất cần thiết. Các nghiên cứu sử dụng công nghệ di truyền phục vụ cho công nghệ lên men chủ yếu đi vào hai hướng chính là:

- Phân tích di truyền các loại vi sinh vật sử dụng trong quá trình lên men, xác định các gen mã hóa cho các tính trạng mong muốn nhằm tạo ra năng suất và chất lượng sản phẩm lên men.

- Tạo ra các vi sinh vật chuyển gen phục vụ cho các qui trình lên men.

Ví dụ trong sản xuất rượu, ngày nay người ta đã dùng các chủng vi sinh vật có khả năng tạo rượu cao và cho hương vị tốt. Phần lớn các chủng đó được nghiên cứu, tuyển chọn, lai tạo bằng công nghệ di truyền.

Để sản xuất rượu vang, trước đây, người ta phải dùng hai loại vi sinh vật là *S. Cerevisiae* để tạo ra hàm lượng rượu trong dịch lên men và sau đó, sử dụng *Leuconostos* trong lên men phụ ở quá trình tàng trữ, nhằm nâng cao chất lượng của rượu. Ngày nay, người ta tiến tới dùng một chủng vi sinh vật chuyển gen để thực hiện cả hai quá trình.

Đối với các sản phẩm lên men sữa như phomat và sữa chua, trước kia, người ta thường sử dụng những vi sinh vật tự nhiên có mặt trong sữa để lên men, do vậy, người ta khó lòng kiểm soát quá trình lên men và hiệu quả không cao. Ngày nay người ta đã tạo được các chủng mới với các tính chất xác định và đã điều khiển được quá trình lên men theo định hướng mong muốn.

Bằng công nghệ vi sinh vật, công nghệ gen người ta đã tạo ra những chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp các enzyme chịu nhiệt, chịu axit, chịu kiềm tốt để sản xuất enzyme. Enzyme λ -amylase chịu nhiệt đã và đang được sử dụng nhiều để sản xuất nha, đường glucose từ tinh bột.

Trước đây, trong công nghiệp thực phẩm các nghiên cứu công nghệ sinh học được sử dụng chủ yếu để hoàn thiện các quy trình công nghệ lên men truyền thống. Còn hiện nay, các nghiên cứu công nghệ sinh học chủ yếu liên quan đến việc tạo ra các chủng mới có năng suất sinh học cao và việc áp dụng chúng vào các công nghệ lên men hiện đại, trong sản xuất và chế biến các loại sản phẩm sau:

- Công nghiệp sản xuất sữa.
- Công nghệ sinh học trong chế biến tinh bột.
- Sản xuất nước uống lên men, như: bia, rượu nho, rượu chưng cất...
- Sản phẩm chứa protein, như: protein vi khuẩn đơn bào, protein từ tảo lam cố định đạm cyanobacteria và vi tảo.
- Sản xuất các chất tăng hương vị thực phẩm, như: citric acid, amino acid, vitamin và màu thực phẩm, chất tăng vị ngọt thực phẩm, keo thực phẩm...
- Chế biến rau quả.

4. Công nghệ sinh học bảo vệ môi trường

Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, loài người phải bắt đầu tìm cách giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường bằng các biện pháp khác nhau. Trong đó, các biện pháp công nghệ sinh học ngày càng tỏ ra ưu việt hơn so với các biện

pháp khác. Nói chung, hiện nay vấn đề bảo vệ môi trường được giải quyết theo ba hướng sau:

- Phân hủy các độc chất vô cơ và hữu cơ.
- Phục hồi các chu trình trao đổi chất của C, N, P và S trong tự nhiên.
- Thu nhận các sản phẩm có giá trị ở dạng nhiên liệu hoặc các hợp chất hữu cơ.
- Xử lý chất thải, như: xử lý sinh học hiếu khí, xử lý bằng lên men phân hủy yếm khí.
- Thu nhận các chất có ích từ lên men yếm khí, như: xử lý các dạng nước thải khác nhau và tái sử dụng chúng để phục vụ cho các ngành công nghiệp nặng.
- Xử lý các chất thải công nghiệp, như: xử lý chất thải công nghiệp chế biến sữa, xử lý chất thải công nghiệp dệt.

1.3. Lược sử phát triển của công nghệ sinh học

Lịch sử hình thành và phát triển công nghệ sinh học trải qua các giai đoạn sau:

1. Giai đoạn thứ nhất

Đã hình thành từ rất lâu trong việc sử dụng các phương pháp lên men vi sinh vật để chế biến và bảo quản thực phẩm, ví dụ: sản xuất pho mát, dấm ăn, làm bánh mì, nước chấm, sản xuất rượu bia... Trong đó, nấu bia có vai trò rất đáng kể. Ngay từ cuối thế kỷ 19, Pasteur đã chỉ ra rằng vi sinh vật đóng vai trò quyết định trong quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu của Pasteur là cơ sở cho sự phát triển của ngành công nghiệp lên men sản xuất dung môi hữu cơ như aceton, ethanol, butanol, isopropanol... vào cuối thế kỷ 19, đầu thế kỷ 20.

2. Giai đoạn thứ hai

Nổi bật nhất của quá trình phát triển công nghệ sinh học trong giai đoạn này là sự hình thành nền công nghiệp sản xuất thuốc kháng sinh penicillin, khởi đầu gắn liền với tên tuổi của Fleming, Florey và Chain (1940). Trong thời kỳ này đã xuất hiện một số cải tiến về mặt kỹ thuật và thiết bị lên men vô trùng cho phép tăng đáng kể hiệu suất lên men. Các thí nghiệm xử lý chất thải bằng bùn hoạt tính và công nghệ lên men yếm khí tạo biogas chứa chủ yếu khí methane, CO₂ và tạo nguồn phân bón hữu cơ có giá trị cũng đã được tiến hành và hoàn thiện.

3. Giai đoạn thứ ba

Bắt đầu từ những năm 50 của thế kỷ 20, song song với việc hoàn thiện các quy trình công nghệ sinh học truyền thống đã có từ trước, một số hướng nghiên cứu và phát triển công nghệ sinh học đã hình thành và phát triển mạnh mẽ nhờ một loạt những phát minh quan trọng trong ngành sinh học nói chung và sinh học phân tử nói riêng. Đó là việc lần đầu tiên xác định được cấu trúc của protein (insulin), xây dựng mô hình cấu trúc xoắn kép của phân tử DNA (1953). Tiếp theo là việc tổng hợp thành công protein (1963-1965) và đặc biệt là việc tổng hợp thành công gen và buộc nó thể hiện trong tế bào vi sinh vật (1980). Chính những phát minh này đã tạo tiền đề cho sự phát triển nhanh chóng của các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng thực tế sau đó trong lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại.

4. Giai đoạn tư tư

Kể từ 1973, khi những thí nghiệm khởi đầu dẫn đến sự ra đời của kỹ thuật DNA tái tổ hợp được thực hiện và sự xuất hiện insulin-sản phẩm đầu tiên của nó vào năm 1982, và thí nghiệm chuyển gen vào cây trồng năm 1982 thành công thì đến nay công nghệ sinh học hiện đại đã có những bước tiến khổng lồ trong các lĩnh vực nông nghiệp (cải thiện giống cây trồng...), y dược (liệu pháp gen, liệu pháp protein, chẩn đoán bệnh...), công nghiệp thực phẩm (cải thiện các chủng vi sinh vật...)...

Công nghệ sinh học phát triển cho đến ngày nay chủ yếu dựa trên ba công nghệ chính là:

- Công nghệ vi sinh.
- Công nghệ tế bào (nuôi cấy mô và tế bào...).
- Công nghệ sinh học hiện đại, tức công nghệ gen.

Cũng có tác giả gắn quá trình phát triển công nghệ sinh học với ba cuộc cách mạng sinh học.

- Cách mạng sinh học lần thứ nhất (đầu thế kỷ 20): sử dụng quá trình lên men để sản xuất các sản phẩm như acetone, glycerine, citric acid, riboflavin...

- Cách mạng sinh học lần thứ hai (sau thế chiến thứ 2): sản xuất kháng sinh, các sản phẩm lên men công nghiệp như glutamic acid, các polysaccharide, trong đó có thành tựu về đột biến, tạo các chủng vi sinh vật cho năng suất và hiệu quả cao, phát triển các quá trình lên men liên tục và phát hiện phương pháp mới về bất động enzyme để sử dụng nhiều lần...

- Cách mạng sinh học lần thứ ba (bắt đầu từ giữa thập niên 1970): với các phát hiện quan trọng về enzyme hạn chế, enzyme gắn, sử dụng plasmid làm vector tạo dòng, đặt nền móng cho một nền công nghệ sinh học hoàn toàn mới đó là công nghệ DNA tái tổ hợp.

Hai giai đoạn đầu, công nghệ vi sinh và công nghệ tế bào, sử dụng hoạt động sinh học của các tế bào tách biệt, nhưng chưa biến đổi được cấu trúc di truyền của chúng, nên được xem là hai giai đoạn của công nghệ sinh học truyền thống. Phải đến cuộc cách mạng sinh học lần thứ ba như đã nêu trên, thì mới ra đời nền công nghệ sinh học hiện đại, giai đoạn phát triển cao nhất của công nghệ sinh học, mở ra kỷ nguyên mới của sinh học.

1.4. Vị trí của công nghệ gen trong công nghệ sinh học

Công nghệ gen là một mũi nhọn của công nghệ sinh học. Năm 1972-1973 kỹ thuật gen ra đời, mở đầu cho một giai đoạn mới của cuộc cách mạng công nghệ sinh học. Con người đã có khả năng vượt giới hạn tiến hoá, có thể chuyển các gen từ một loài này sang một loài khác, điều mà không thể thực hiện được bằng con đường chọn lọc tự nhiên. Đến nay người ta đã giải mã bộ gen của nhiều sinh vật như bộ gen của vi khuẩn E. coli, của nhiều virus, của giun tròn, của cây lúa và đến năm 2003 về cơ bản đã giải mã được bộ gen người.

Trên cơ sở kỹ thuật gen các nhà khoa học đã tạo ra nhiều giống cây trồng có những đặc tính ưu việt như cây chống chịu hạn, chịu mặn, cây có năng suất cao góp phần là tăng giá trị kinh tế cho xã hội. Nhiều chủng vi sinh vật mới có khả năng tổng hợp enzym cao được tạo ra bằng công nghệ gen đã được sử dụng trong công nghiệp

Sự hiểu biết một cách chi tiết về cấu tạo và vận hành của bộ gen cho phép

con người có khả năng can thiệp một cách chính xác vào các quá trình sống để phục vụ lợi ích của mình. Những thành tựu của công nghệ gen luôn gắn với ứng dụng thực tiễn nhằm phục vụ lợi ích của con người. Tóm lại có thể nói công nghệ gen là mũi nhọn, là trung tâm phát triển của công nghệ sinh học.

1.5. Khái niệm về tế bào gốc

Tháng 2 năm 1997, Wilmut đã công bố công trình nhân bản vô tính động vật, đã tạo ra được con cừu Dolly, đánh một dấu mốc cho sự phát triển về nhân giống nhiều loài động vật từ tế bào dinh dưỡng (tế bào soma). Năm 1999 tế bào gốc (Somatic stem cell) được phát hiện. Tế bào gốc là những tế bào vẫn giữ nguyên tính chất như tế bào phôi, tức là chúng có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào chuyên biệt khác nhau như tế bào tim, tế bào thần kinh, tế bào thận vv... và từ đó có thể phát triển thành một cơ thể. Như vậy nhân bản vô tính động vật từ tế bào gốc sẽ dễ dàng hơn nhiều. Từ đó đến nay việc nhân bản vô tính động vật từ các tế bào gốc đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Những thành công trong nhân bản vô tính động vật đã mở ra khả năng nhân bản vô tính con người. Đây là một vấn đề đã được nhiều nhà khoa học, nhà quản lý, những người đứng đầu của quốc gia quan tâm bàn cãi và cho đến nay đã có một số nước cấm không cho tiến hành nhân bản người.

1.6. Thực phẩm chuyển gen

Cho đến nay nhiều loài sinh vật chuyển gen (GMO) đã xuất hiện với qui mô sản xuất công nghiệp, như cây ngô chuyển gen, cây đậu tương chuyển gen, cà chua, lúa vv... Những cây chuyển gen thường có nhiều đặc tính ưu việt như năng suất cao, có thể chống chịu những điều kiện ngoại cảnh bất lợi như chống chịu sâu bệnh, chống chịu hạn, chịu mặn vv... Nhờ vậy khi trồng cây chuyển gen thường đem lại hiệu quả kinh tế cao.

Cây trồng là thực phẩm cho người và động vật nên phải chịu sự giám sát của các tổ chức quản lý về an toàn sinh học, vì vậy những loại cây chuyển gen đưa ra sản xuất phải đảm bảo những tiêu chuẩn nhất định. Ví dụ ở Mỹ nơi mà công nghệ sinh học được đầu tư và phát triển mạnh nhất trên thế giới, vấn đề quản lý cũng rất chặt chẽ

Hệ thống quản lý của Mỹ nhằm đảm bảo an toàn lương thực bao gồm Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA), Cục Bảo vệ Môi trường (EPA), Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA), quản lý các loại lương thực có nguồn gốc thực vật được tạo ra nhờ công nghệ sinh học. Theo Đạo luật Lương thực, Dược phẩm và Mỹ phẩm (FD&C), FDA có thẩm quyền bảo đảm độ an toàn của tất cả các lương thực trong nước và nhập khẩu cho người và động vật trên thị trường Mỹ. Cơ quan Kiểm tra Sức khỏe Thực vật và Động vật của USDA (APHIS) có chức năng giám sát an toàn nông nghiệp và an toàn môi trường trong trồng trọt và thử nghiệm tại hiện trường các giống cây trồng được tạo ra nhờ công nghệ sinh học.

Tuy vậy cũng cần lưu ý rằng việc tạo ra các GMO, các gen kháng kháng sinh như kanamycine, ampicillin hoặc hygromycine thường được dùng kèm để làm gen chỉ thị. Chúng tồn tại trong sản phẩm của các GMO và có thể có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua dây chuyền thức ăn của sinh quyển đến con người.

1.7. Một số khía cạnh về kinh tế và khoa học của công nghệ sinh học hiện đại

Các phương tiện thông tin đại chúng đăng tải không ít các ý kiến phản đối ứng dụng một số thành tựu công nghệ sinh học trong sản xuất, thậm chí đối với những thành tựu được giới khoa học đánh giá là sáng chói. Thật vậy, công nghệ sinh học cũng như khoa học hạt nhân, bên cạnh các ứng dụng cực kỳ to lớn cho lợi ích và phát triển của loài người, có thể còn mang lại nhiều hiểm họa không thể lường trước được hậu quả. Sau đây chúng ta sẽ tìm hiểu các hiểm họa tiềm tàng của công nghệ sinh học.

1. Về khoa học

Sự dè dặt trong sử dụng các sản phẩm chuyển gen làm thực phẩm cho người và gia súc có thể do nhiều lý do khác nhau, nhưng tựu trung có thể chia thành hai nhóm sau:

- Bộ máy di truyền của sinh vật mang tính hoàn thiện rất cao vì đã tiến hóa qua hàng trăm triệu năm, những gen mới được lắp thêm vào cho cây trồng và vật nuôi để tăng năng suất hoặc chất lượng nông sản, biết đâu có thể phá vỡ tính hoàn thiện, tính cân bằng của sự sống ở các sinh vật này. Và vì thế con người không thể yên tâm với việc hàng ngày nuốt vào cơ thể một số lượng lớn các sản phẩm thiếu tính hoàn thiện, cân bằng hay nói cách khác là có thể có dị tật.

- Cho đến nay trong việc tạo ra các GMO, các gen kháng kháng sinh như kanamycine, ampicillin hoặc hygromycine thường được dùng kèm để làm gen chỉ thị. Chúng tồn tại trong sản phẩm của các GMO và có thể có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua dây chuyền thức ăn của sinh quyển đến con người. Hiện nay, người ta đang tìm cách thay thế các gen chọn lọc cũ bằng các gen có vẻ ít hại hơn như gen mã hoá protein phát huỳnh quang màu xanh lục (Green Fluorescence Protein-GFP). Gen GFP được coi là một gen chỉ thị tốt, vì nó làm cho các GMO phát sáng xanh rực rỡ khi đặt dưới tia tử ngoại. Nhưng dù sao sự nghi ngại vẫn còn, vì gen GFP có nguồn gốc từ một loài cá ở Bắc Băng Dương, chứ không từ một động vật có nguồn gốc gần với người.

2. Về kinh tế

2.1. Những công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học

Tổ chức quốc tế nông nghiệp tiên bộ RAFI (Rural Advancement Foundation International) là một tổ chức quốc tế phi chính phủ ở Canada hoạt động nhằm hạn chế ảnh hưởng của các công ty đa quốc gia về giống.

Theo RAFI, thế kỷ 21 sẽ là những năm tung hoành ngang dọc của các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học, hiện nay những công ty này đang phát triển

nhANH chóng nhờ thâu tóm các công ty nhỏ hơn và trước hết nhờ lợi nhuận khổng lồ thu được trong độc quyền bán các sản phẩm GMO.

Chẳng hạn cách đây hơn 15 năm, công ty Monsanto chỉ chuyên về các sản phẩm hóa dầu, thuốc trừ sâu, trừ cỏ. Tuy nhiên thời gian gần đây, Monsanto đã đầu tư rất lớn và triển khai công nghệ gen thực vật để tạo ra các giống GMO và đang trở thành công ty giống lớn nhất thế giới. RAFI gọi Monsanto là một "Microsoft công nghệ sinh học" vì từ năm 1996 đến nay Monsanto đã mua lại nhiều công ty trước đây vốn là người khổng lồ trên thị trường hạt giống.

2.2. Sự lệ thuộc vào các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học

RAFI tiên đoán người nông dân ở hầu hết các nước trên thế giới, kể cả các nước công nghiệp phát triển, sẽ dần dần sẽ bị lệ thuộc vào một nhóm nhỏ các công ty công nghệ sinh học đa quốc gia.

Với quy chế ngặt nghèo về quyền tác giả IPR (Intellectual Property Right) hiện hành trong quan hệ kinh tế thế giới, người nông dân sẽ bị tước bỏ hoàn toàn quyền tự do trồng cây gì trên mảnh đất của mình và bán cho ai sản phẩm của mình. Lý do để các công ty như Monsanto có được nhiều quyền hạn như vậy chính là sự tiến bộ của công nghệ sinh học.

Chẳng hạn, gen terminator được cơ quan đăng ký bản quyền của Mỹ chính thức cấp bằng phát minh cho công ty Delta Pine (3/1998). Khi chuyển gen vào bất cứ một giống cây nào, hạt bán ra sẽ chỉ nảy mầm trong một thế hệ duy nhất. Nếu người nông dân lấy hạt để trồng vụ sau, gen này sẽ tạo ra một hợp chất giết chết mầm, vì thế hạt hoàn toàn không nảy mầm được. Với gen terminator trong tay, các công ty đa quốc gia sẽ bắt nông dân các nước hàng năm phải mua hạt giống của họ.

Mặt khác, các công ty giống đang thôn tính dần các công ty chế biến lương thực, thực phẩm là đầu ra của sản phẩm nông nghiệp. Một mặt độc quyền hạt giống GMO, một mặt nắm các công ty chế biến nông sản, các công ty đa quốc gia công nghệ sinh học sẽ không chừa một lối thoát nào cho nông dân các nước đang phát triển.

1.8. Những vấn đề pháp lý của công nghệ sinh học hiện đại

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã giúp các nhà khoa học thay đổi cơ chế tiến hóa của tự nhiên, sáng tạo ra sản phẩm của gen, tạo ra các dạng sinh vật mới. Ngày càng có nhiều bằng chứng hiển nhiên về lợi ích của kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Nhưng cũng phải cân nhắc đến những nguy cơ tiềm tàng của nó, và thực tế cũng đã nảy sinh một số vấn đề pháp lý quan trọng buộc chúng ta phải xem xét lại một cách thận trọng. Có nhiều vấn đề pháp lý trong công nghệ sinh học, tuy nhiên trong phạm vi bài giảng này chỉ đề cập đến một số khía cạnh sau:

1. Vấn đề an toàn sinh học

Mục đích của công nghệ sinh học là phục vụ cho lợi ích của con người. Tuy vậy nhiều vấn đề nảy sinh ra khi tác động đến các sinh vật, một số không ít của chúng là những kẻ thù của con người như các vi sinh vật gây bệnh. Vấn đề an toàn sinh học và đạo lý được sự quan tâm của xã hội. Công nghệ gen đã đem lại nhiều

lợi ích cho con người, tuy nhiên bên cạnh đó cũng không ít những nỗi lo ngại, do vậy vấn đề an toàn sinh học đã được đặt ra ngay từ những ngày đầu.

An toàn sinh học đó là sự bảo vệ con người, xã hội và môi trường khỏi tác động có hại, tác động nguy hiểm do các độc tố hay các sản phẩm của công nghệ gen gây ra cho hôm nay và các thế hệ mai sau. Nó đòi hỏi phải đánh giá mức độ an toàn của tất cả các sản phẩm cũng như các biện pháp sử dụng đối với vật nuôi cây trồng, các liệu pháp chữa trị đối với con người.

Ngay từ những năm đầu của công nghệ gen (1972-1973) mối lo ngại về sự xuất hiện một loại vi sinh vật mới nguy hiểm cho con người và động vật có thể xảy ra đã làm cho các nhà nghiên cứu dừng các thí nghiệm của mình. Ngay từ đó vấn đề an toàn sinh học đã được đặt ra. Ngày nay các nhà nghiên cứu phải tuân thủ theo các nguyên tắc chỉ đạo quản lý chính thức được đưa ra nhằm đảm bảo các vi sinh vật tái tổ hợp đang nghiên cứu không phát triển bên ngoài các phòng thí nghiệm, đồng thời các nhân viên phòng thí nghiệm phải được bảo vệ để không xảy ra bất cứ một sự rủi ro nào.

Các sản phẩm chuyển gen luôn được kiểm tra, thử nghiệm một cách nghiêm ngặt trước khi đưa vào sử dụng. Ví dụ năm 1999, có khoảng 6000 thử nghiệm ngoài thiên nhiên được thực hiện tại Mỹ và một số đã được chấp nhận. Tuy nhiên các nhà môi trường luôn lo lắng vì cũng có nghiên cứu quả quyết rằng khi cho chuột ăn khoai tây chuyển gen thì hệ thống miễn dịch của nó bị tổn thương, hay hạt phấn từ cây bắp chuyển gen Bt đã huỷ hoại quần thể bướm "hoàng hậu", hay bi kịch của bệnh viêm não ở bò ở Anh và một số nướcKết quả của những thông tin này đã đẩy lên những phản ứng chống lại những cây chuyển gen.

2. Quản lý và đánh giá độ an toàn của thực phẩm

Tại Mỹ và một số nước phát triển vấn đề quản lý và đánh giá độ an toàn của thực phẩm rất nghiêm ngặt. Tính an toàn của các lương thực từ cây trồng cũng như thành phần thực phẩm, bao gồm hương vị, chất phụ gia, thành phần dinh dưỡng, các chất gây dị ứng vv... phải được đánh giá kỹ trước khi cho phép tiêu thụ. Tuy vậy đôi khi cũng có những lỗ hổng trong quản lý, cũng như lợi nhuận cao đã làm giảm đi phần nào tính nghiêm ngặt, do vậy những vấn đề tranh cãi luôn tồn tại như việc sử dụng tryptophan gây ra hội chứng đau cơ bị nghi ngờ là được sản xuất từ dòng vi khuẩn tạo ra bằng công nghệ gen hay việc sử dụng hormon tăng trưởng ở bò (Somatotropin bò viết tắt là BST). Người ta thấy rằng khi tiêm BST cho bò sữa thì sẽ làm tăng đáng kể lượng sữa và lượng BST tồn dư trong sữa không cao so với đối chứng nên không có hại cho con người, tuy nhiên BST tự nhiên thu nhận với giá thành cao nên BST sản xuất bằng công nghệ gen ra đời (rBST). Các nhà quản lý và nhà khoa học Mỹ đã kiểm tra rất kỹ và đã có kết luận là thịt và sữa bò đã được xử lý với rBST an toàn cho người. Tuy nhiên những người phản đối sử dụng rBST cho rằng việc sử dụng rBST sẽ làm gia tăng nhiễm vi khuẩn vào tuyến sữa gây chứng viêm vú. Tranh cãi sâu hơn nữa như vậy khi sử dụng rBST thì phải dùng kháng sinh cao hơn để ổn định sức khỏe của gia súc dẫn đến làm tăng dư lượng kháng sinh trong thịt và sữa, điều này có thể gây dị ứng ở nhiều người tiêu

dùng. Do vậy mặc dù FDA của Mỹ khẳng định là an toàn nhưng nhiều quốc gia như Canada và các nước châu Âu từ chối sử dụng.

3. Quyền tác giả

Những cuộc tranh luận ở diễn đàn quốc tế về quyền tác giả của các nước có nguồn gen quý hiếm được phương Tây sử dụng trong công nghệ tạo giống, đã không đem lại một kết quả nào. 169 nước đã đăng ký vào công ước Quốc tế về Đa dạng sinh học (Convention on Biological Diversity) và công ước này có hiệu lực từ 12/1993, trong đó quy định cùng chia sẻ quyền lợi giữa các nước có nguồn gen với các công ty phương Tây sử dụng nguồn gen đó. Tuy nhiên, từ đó đến nay các nước có nguồn gen quý hiếm vẫn tiếp tục bị mất dần tài sản quốc gia của mình mà quyền lợi được chia sẻ thì không đáng kể.

Chẳng hạn, ngày 16/1/1996, Bản quyền sở hữu số 5.484.889 của Mỹ được cấp cho Giáo sư Sinh học phân tử (Đại học New York) Sylvia Lee-Huang để bảo vệ quyền tác giả của giáo sư về một loại protein chiết từ cây *Momordica charantia*. Cây này là một loại tài nguyên đặc hữu ở miền Nam Trung Quốc, được người Trung Quốc gọi là dưa đắng, là thành phần chính của một bài thuốc dân gian chống nhiễm trùng có lịch sử hàng thế kỷ. Lee-Huang tuyên bố: "Nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp, từ nay không bao giờ chúng tôi cần mua hạt dưa đắng từ Trung Quốc, vì các protein tái tổ hợp sản xuất trong phòng thí nghiệm ở Đại học New York hoàn toàn giống như protein chiết từ quả dưa đắng trước đây".

Năm 1994, hãng ArgEvo phân lập được gen PAT (phosphinothricin acetyltransferase) từ dòng vi khuẩn *Streptomyces viridochromogens* có trong mẫu đất lấy từ Camerun. Gen PAT cho phép tạo ra các giống cây trồng kháng thuốc diệt cỏ nhóm glufosinate, đóng góp quan trọng vào doanh số 2,3 tỷ USD của AgrEvo năm 1995. Tuy nhiên, hãng này đã từ chối không trả cho Camerun một khoản tiền nào về quyền tác giả.

CHƯƠNG 2: CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

Mã bài MH 8- 02

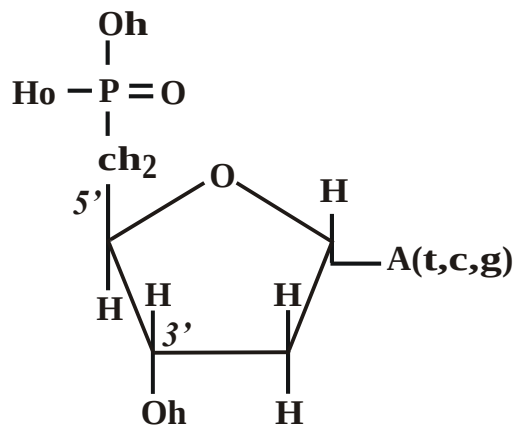
2.1- Khái niệm DNA tái tổ hợp

2.1.1- Khái niệm

1- DNA:

DNA là chữ viết tắt của axit 2'-deoxyribonucleic, được nhà sinh học người Thụy Điển Miescher tìm ra vào năm 1869 trong nhân tế bào bạch cầu (tế bào mũ). Đầu tiên ông gọi nó là nuclein có nghĩa là hạch nhân. Sau đó, ông đã phát hiện ra nó có bản chất axit và gọi nó là axit nucleic. Sau hơn 80 năm cùng với sự tranh cãi của nhiều nhà khoa học, đến năm 1952, người ta mới công nhận DNA là vật chất di truyền.

DNA gồm 3 thành phần chính: bazơ nitơ dạng purine và pyrimidine (A,T,C,G), đường pentose (đường 5 carbon) và axit phosphoric (H_3PO_4). Ba thành phần này có tỷ lệ 1:1:1 và chúng liên kết với nhau tạo thành một nucleotide:



Hình 2-1: Cấu tạo một nucleotide

Cấu trúc của DNA được Watson-Crick khám phá ra. Đó là chuỗi xoắn kép cong nhẹ nhàng, có cấu trúc không gian 3 chiều, gồm hai sợi song song, đối xứng và bổ sung cho nhau theo một qui luật nghiêm ngặt: A bắt cặp với T và C bắt cặp với G nhờ các liên kết hydro. Cấu trúc xoắn kép của Watson- Crick là chiếc chìa khóa để mở ra những kỹ thuật của sự sống.

2,- DNA tái tổ hợp:

Với cấu trúc đặc biệt của phân tử DNA và sự bắt cặp nghiêm ngặt của các bazơ nitơ, nhiều nhà nghiên cứu đã nảy ra ý tưởng: nếu tạo ra được những đuôi ở một trong hai sợi của phân tử DNA khác nhau thì chúng có thể nối lại với nhau nhờ bắt cặp bổ sung.

Vào những năm 70, bằng những phương pháp khác nhau, người ta đã tạo được những phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên.

Năm 1972, nhóm nghiên cứu của trường đại học Stranford (Paul-Berg) đã đưa ra phương pháp đuôi để nối các phân tử DNA khác nhau. Để tạo đầu dính, người ta sử dụng enzyme terminal transferase. Dưới tác dụng của enzyme này, người ta đã tạo được những đuôi poly nucleotide khoảng 50 đến 100 gốc adenine

(polyA) ở đầu OH (3') của mạch đơn DNA SV 40 (Simian virus 40) và đuôi polyT ở DNA plasmid đã được mở bởi enzyme. Sau khi trộn lẫn hai loại DNA này, các đuôi bổ sung adinine và thymine bắt cặp lại với nhau và với sự có mặt của enzyme ligase, hai DNA này được nối lại và tạo ra plasmid tái tổ hợp vòng. Vì sự an toàn cho cộng đồng nên sản phẩm tái tổ hợp này không được biến nạp trong tế bào chủ. Tuy chưa hoàn tất, nhưng thực nghiệm của Berg đã cho ta hai vấn đề mấu chốt về DNA tái tổ hợp. Ông cho rằng, có thể dùng enzyme để cắt DNA một cách định trước và các đoạn DNA ở các loài khác nhau có thể nối lại với nhau.

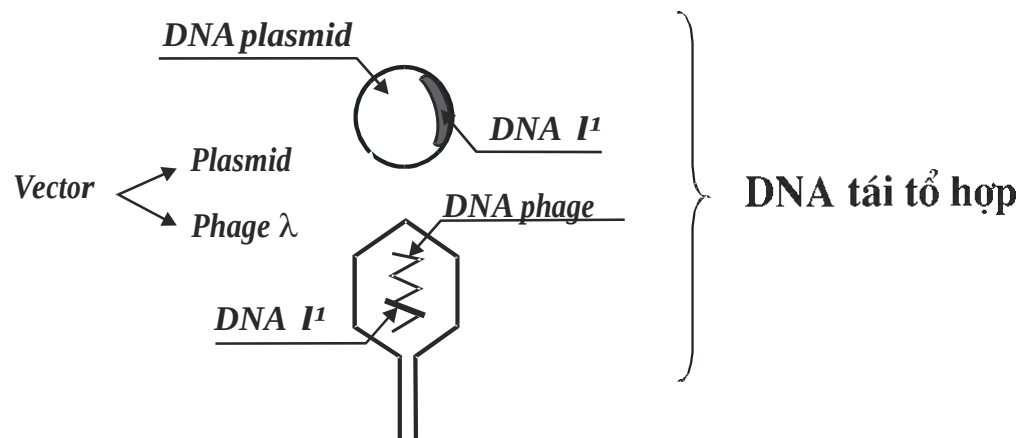
Năm 1973, Staley Cohen và Annie Chang đã tạo ra những phân tử DNA tái tổ hợp từ các loài khác nhau, có nhiều ưu điểm và đã được biến nạp trong tế bào chủ. Và từ đây, công nghệ DNA tái tổ hợp ra đời. Sau đó, nhiều nhà khoa học đã lao vào các thí nghiệm lắp ghép gen và nhanh chóng thu được những kết quả có ứng dụng trong thực tiễn.

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA do Rerg, Chang, Boyer và Cohen đề ra đã giúp các nhà sinh học có thể làm thay đổi tính di truyền của cơ thể sống theo chiều hướng định trước và vượt qua được hàng rào ngăn cản loài. Mỗi tổ hợp DNA mới đều tạo nên những đặc điểm sinh học mới kể cả về mặt di truyền lẫn sinh hóa.

Vậy người ta gọi DNA tái tổ hợp là một DNA lai, tìm được *invitro* (trong ống nghiệm) bằng cách tổ hợp 2 DNA thuộc 2 loài khác nhau.

Ví dụ: Hai vector là plasmid, phage λ được cài mảnh DNA lạ để tạo ra DNA tái tổ hợp (Hình 2-2).

Các DNA lạ này được gọi là đoạn cài hay DNA ngoại lai. Nó chính là một mảnh (đoạn) DNA hay là gen mà người nghiên cứu quan tâm và ghép nó vào DNA của plasmid hay DNA của virus.



Hình 2-2: Mô hình biểu diễn sự tạo ra DNA tái tổ hợp

2.1.2- Mục đích tạo DNA tái tổ hợp

DNA tái tổ hợp được chế tác với mục đích là để thực hiện một quá trình gọi là sự tách dòng. Tách dòng là sự tách lập và thu nhận nhiều bản sao đồng nhất của một gen hay của một mảnh đoạn DNA. Tách dòng có thể được đi kèm hoặc không được đi kèm với sự biểu hiện protein. Những áp dụng này của DNA tái tổ hợp

dùng để thiết lập các ngân hàng bộ gen, cDNA hoặc tổng hợp protein, enzyme, hormone, ...

2.1.3- Những yêu cầu của DNA tái tổ hợp

- DNA tái tổ hợp phải đạt được những yêu cầu cần thiết của một vector chuyển gen.

- DNA tái tổ hợp phải có hoạt tính khi đưa vào tế bào chủ.

- DNA tái tổ hợp phải có những dấu hiệu dễ phát hiện trong quần thể vi khuẩn.

Và để quan sát sự hoạt động và biểu hiện của gen tái tổ hợp.

2.2- Các công đoạn chính tạo DNA tái tổ hợp

2.2.1- Chọn nguyên liệu

DNA được chọn làm phương tiện vận chuyển gen (vector) thường là DNA plasmid và DNA phage. Chúng được thu nhận chủ yếu từ tế bào vi sinh vật, được tách và làm sạch theo phương pháp chiết tách DNA plasmid, DNA virus.

DNA chứa gen cần nghiên cứu (DNA lạ) cũng được thu nhận từ tế bào sinh vật được chiết tách và làm sạch và kiểm tra theo phương pháp chiết tách DNA. Ngoài ra, người ta còn sử dụng DNA tổng hợp bằng phương pháp hóa học hoặc tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme sao chép ngược theo cơ chế nuclease S₁ hoặc kỹ thuật Gubler-Hoffman.

Các enzyme để cắt, nối các đoạn DNA lại với nhau như enzyme restriction, enzyme ligase cùng với sự hợp tác của một số enzyme khác như kinase và alkaline phosphatase, ...

2.2.2 Công đoạn cắt với sự tham gia của enzyme RE kiểu II

RE (Restriction Endonuclease) kiểu II: là những enzyme cắt hạn chế ở những vị trí xác định và được dùng trong công nghệ DNA tái tổ hợp bởi vì chúng có một số ưu điểm: Hầu như chỉ có một kiểu hoạt tính cắt, enzyme khác đảm nhiệm việc cải biên. Mỗi một enzyme cắt ở vị trí phù hợp định trước ngay ở bên trong hay cạnh trình tự nhận biết. Chúng chỉ cần ion Mg⁺² và không cần năng lượng ATP.

Ví dụ:

EcoRI



- Các enzyme này gặp chuỗi đích của nó trên phân tử DNA và cắt DNA thành hai mảnh dạng đầu bằng hay đầu dính. Hiệu quả cắt của enzyme giới hạn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như hàm lượng của enzyme, nhiệt độ, ion kim loại, môi trường đệm, pH và độ tinh khiết của DNA.

2.2.3- Công đoạn nối với sự có mặt của DNA ligase

Bước tiếp theo của kỹ thuật di truyền là nối các đoạn DNA vào vector chuyển gen để tạo plasmid có mang DNA lạ. Phản ứng nối được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase.

DNA ligase là một enzyme xúc tác các phản ứng nối hai mảnh DNA bằng cách tạo cầu nối phosphodiester giữa đầu 5'(P) và đầu 3'(OH) của hai nucleotide

đứng cạnh nhau (Hình 6-2). Trong sinh học phân tử, người ta coi DNA ligase như một chất keo phân tử để kết dính các mảnh DNA lại với nhau.

1,- *Nối đầu bằng:*

Nối đầu bằng được xảy ra khi hai đoạn DNA đầu bằng đứng cạnh nhau. Dưới tác dụng của enzyme ligase, liên kết phosphodiester giữa đầu 5'(P) và đầu 3'(OH) được hình thành và hai nucleotide được nối lại với nhau (Hình 6-3a). Khả năng nối hai đoạn DNA đầu bằng rất thấp. Để tăng hiệu suất phản ứng, thường người ta phải tăng nồng độ của các đoạn DNA.

2,- *Nối đầu lệch:*

Đầu tiên, hai mảnh DNA đầu lệch do có những bazơ bổ sung nên chúng tiến gần lại nhau để tạo liên kết hydro giữa các bazơ nitơ bổ sung. Sau đó, hai nucleotide của hai đầu nối tạo liên kết este giữa OH(3') và P(5') dưới tác dụng của enzyme DNA ligase. Phản ứng nối được thực hiện theo sơ đồ được biểu diễn trên Hình 2-3b.

Plasmid được tách từ tế bào *E. Coli* hoặc tế bào nấm men theo phương pháp chiết tách DNA plasmid. Sau đó, dùng enzyme RE II (như EcoRI) cắt để tạo ra plasmid hở có hai đầu lệch nhau.

2.3 Các phương pháp tạo AND tái tổ hợp

2.3.1. *Phương pháp đơn giản dùng đầu lệch*

1,- *Chọn và xử lý AND plasmid*

Plasmid được tách từ tế bào *E. coli* hoặc tế bào nấm men theo phương pháp chiết tách AND plasmid. Sau đó dùng enzym RE II cắt để tạo ra plasmid hở có hai đầu lệch

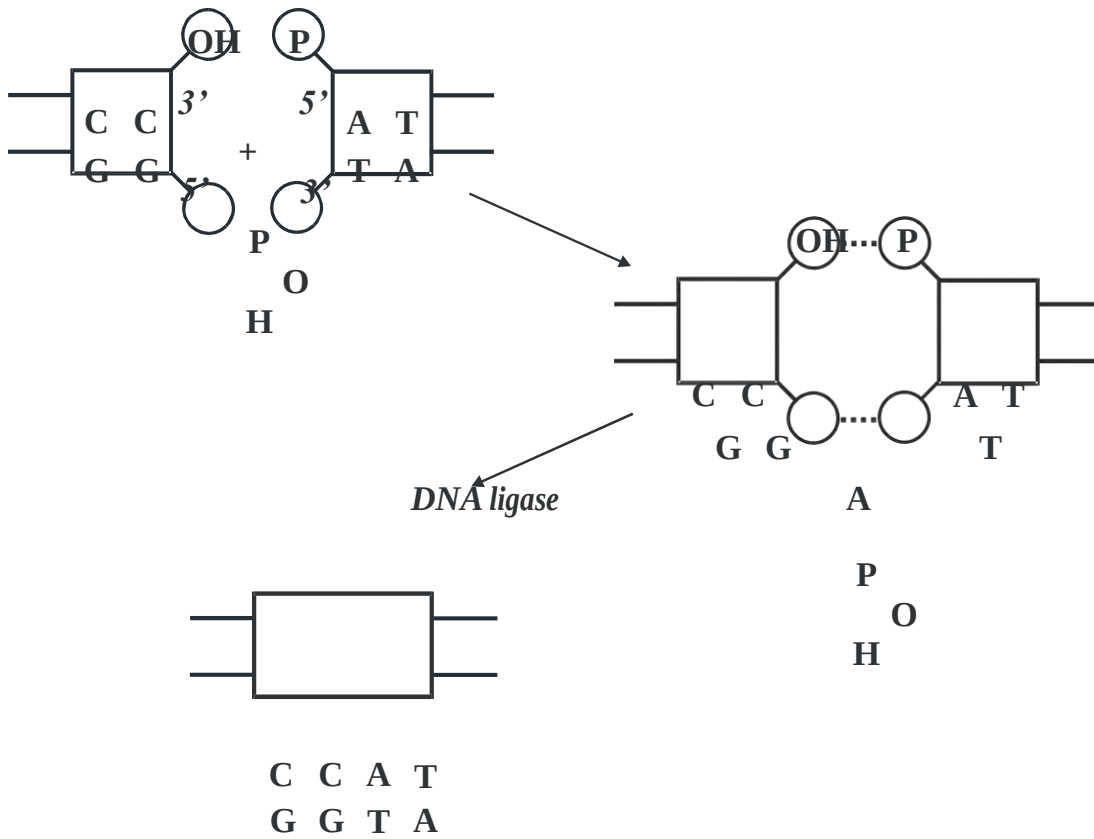
2,- *Chọn và xử lý đoạn cài:*

DNA đoạn cài được thu nhận và lựa chọn, tinh chế theo mục đích của từng nghiên cứu. Cắt DNA bằng enzyme RE loại II cùng loại với enzyme cắt plasmid (EcoRI) để tạo ra các vết cắt giống nhau.

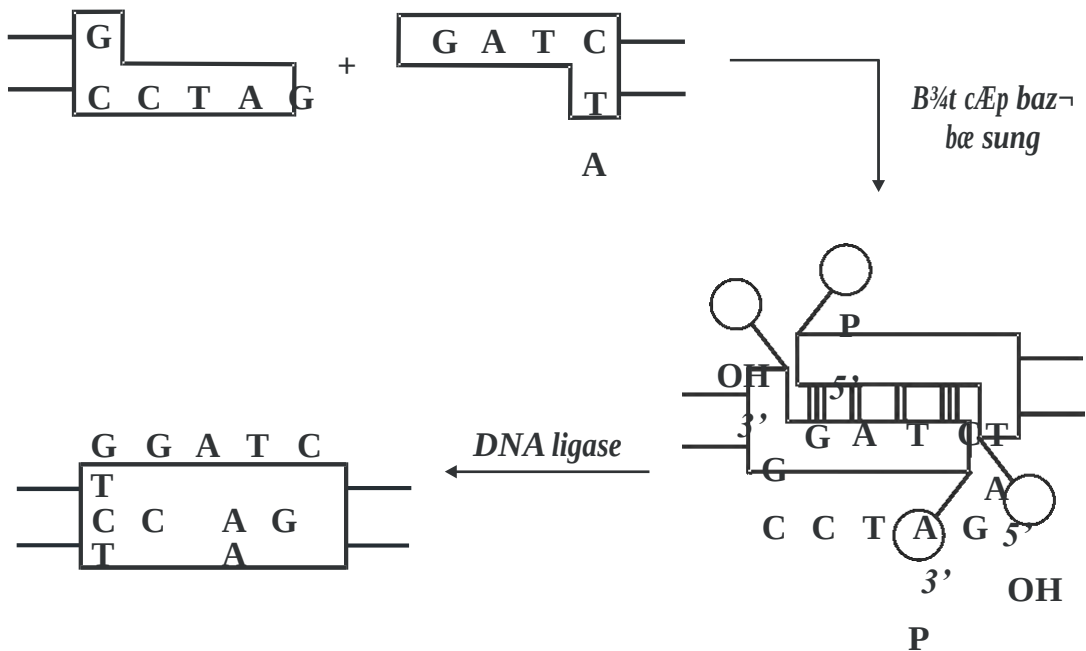
3,- *Tạo plasmid tái tổ hợp:*

Ghép đoạn cài vào plasmid bằng cách ủ các DNA đoạn cài với plasmid với sự có mặt của enzyme DNA ligase, ta thu được DNA tái tổ hợp. Phản ứng nối xảy ra theo sơ đồ được biểu diễn trên Hình 2-4.

Nèi ®Çu b»ng:



Nèi ®Çu löch:



Hình 2-3: DNA và các phản ứng nối

2.3.2- Các phương pháp sử dụng đoạn nối

1,- Chọn và xử lý *vector plasmid*: (tương tự như trên)

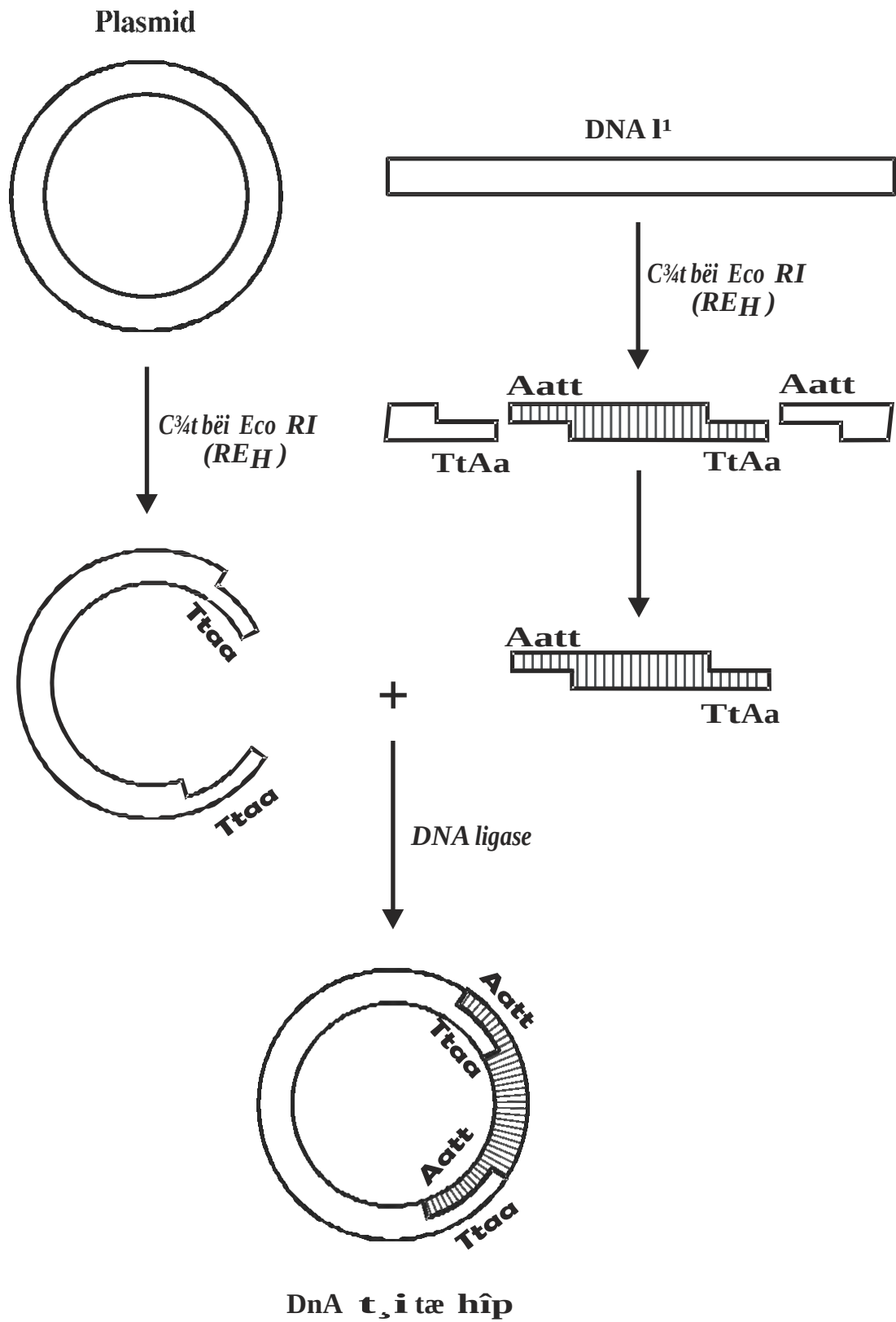
2,- Chọn và xử lý đoạn cài:

Linker là những đoạn DNA dài 10 đến 15 nucleotide, được tổng hợp bằng phương pháp hóa học, sao cho ở giữa mỗi linker phải có trình tự nhận biết bởi một enzyme cắt hạn chế loại II. Ví dụ như EcoRI có chuỗi đích là G/AATTC.

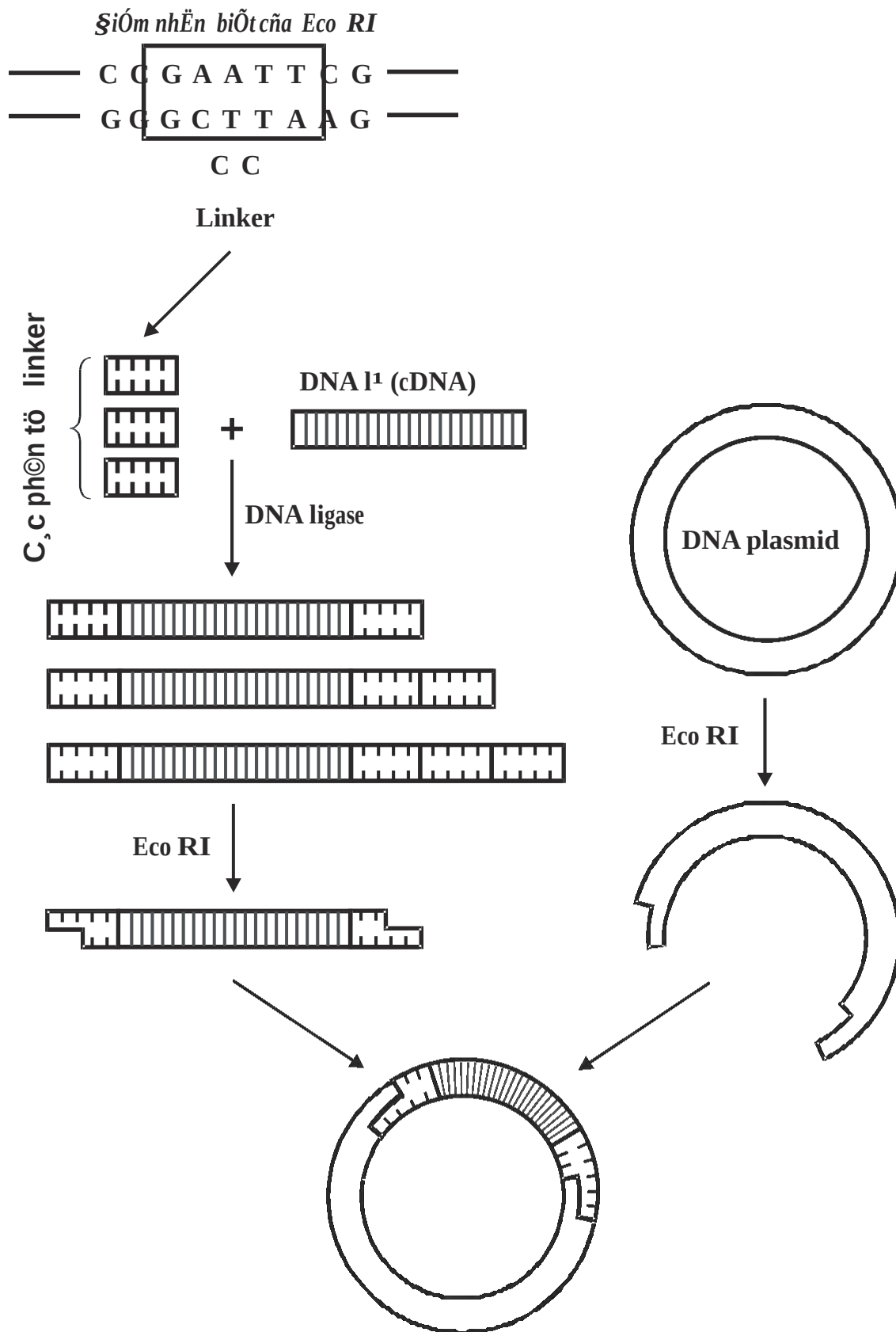
cDNA đầu bằng được tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme sao chép ngược theo cơ chế nuclease S₁. Metyl hóa các vùng hạn chế có trong đoạn cDNA sợi đôi được nhận biết bởi enzyme EcoRI.

Ủ linker có chứa chuỗi đích G/AATTC với cDNA và enzyme DNA ligase để tạo phân tử lai.

Cắt phân tử DNA lai bởi enzyme EcoRI, ta được phân tử lai có hai đầu lệch.



Hình 2-4: Phương pháp dùng đầu lách



Hình 2-5: Dùng các đoạn nối linker tạo DNA tái tổ hợp

3,- *Tạo vector tái tổ hợp:*

Để tạo vector tái tổ hợp, người ta ghép phân tử DNA lai đầu lệch vào plasmid mà cũng được cắt bởi cùng một enzyme EcoRI. Nhờ tác dụng của enzyme DNA ligase mà vector tái tổ hợp được tạo thành (Hình 6-5).

2.3.3- *Phương pháp sử dụng enzyme terminal transferase (ETT)*

Nguyên tắc: Dựa vào đặc tính của enzyme terminal transferase có khả năng gắn cùng một loại nucleotide vào đầu 3'(OH) của phân tử DNA.

Cách tạo DNA tái tổ hợp bằng phương pháp này được tiến hành theo 4 bước sau (Hình 6-6):

1,- *Bước 1:*

Chọn và phân lập DNA lạ đầu bằng và plasmid, giả sử ta phân lập plasmid có chứa chuỗi đích được nhận biết bởi enzyme BamHI (G/GATCC).

Cắt plasmid bằng enzyme BamHI để tạo plasmid hở có hai đầu dính.

Cắt DNA lạ bằng enzyme exonuclease theo hướng 5' → 3' để tạo DNA có hai đầu lệch nhau.

2,- *Bước 2:*

Ủ DNA lạ với cùng một loại nucleotide dCTP với sự có mặt của enzyme terminal transferase để tạo đuôi polyC ở đầu 3'(OH) của DNA lạ.

Ủ plasmid với cùng một loại nucleotide dGTP với sự có mặt của enzyme terminal transferase để tạo đuôi polyG ở đầu 3'(OH) của plasmid hở.

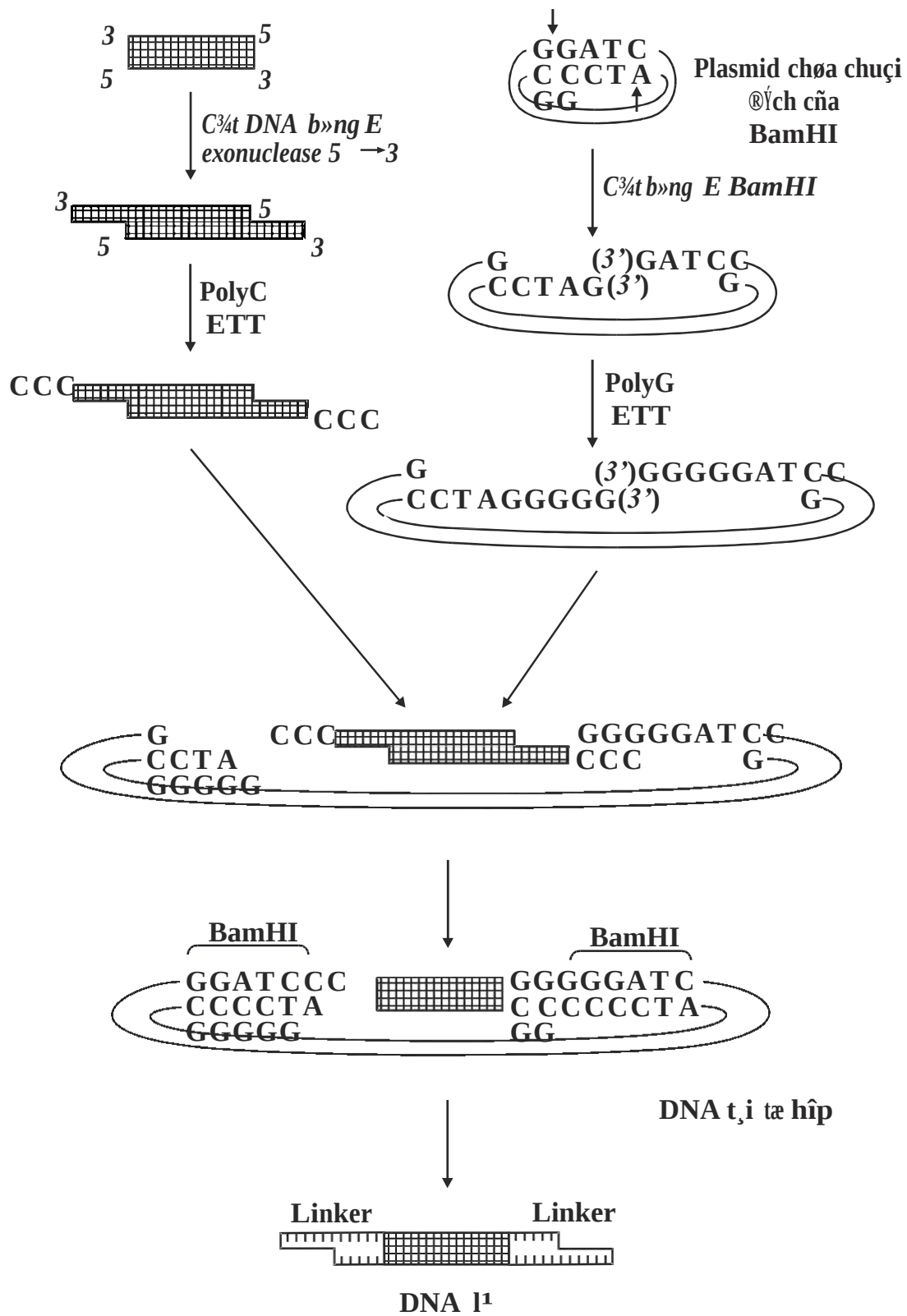
3,- *Bước 3:*

Đưa DNA lạ vào plasmid với sự có mặt của enzyme DNA ligase, các đầu mút của homopolymer có trình tự bổ sung (---GGGG 3'/3'CCCC---) sẽ bắt cặp với nhau.

4,- *Bước 4:*

Bổ sung enzyme DNA-polymerase I để gắn các nucleotide tương ứng vào chỗ trống theo nguyên tắc bổ sung. Enzyme ligase nối liên kết phosphodiester và cuối cùng tạo được plasmid tái tổ hợp có hai chuỗi đích được nhận biết bởi enzyme BamHI.

Ưu điểm của phương pháp là ghép DNA lạ đầu bằng vào plasmid để tạo DNA tái tổ hợp và chế tác được DNA đầu lệch từ DNA đầu bằng.



Hình 2-6: Cách tạo DNA tái tổ hợp dùng enzyme terminal transferase

2.4- Một số phương pháp đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ

2.4.1- Hóa biến nạp

Hiện tượng biến nạp là chìa khóa giúp ta hiểu biết cơ sở phân tử của gen, cũng là công cụ để thực hiện các thao tác tạo tính di truyền của vật sống. Theo Mandel và Higa cho thấy rằng, *E. Coli* trở nên rất dễ bị biến nạp bởi DNA ngoại lai khi các tế bào vi khuẩn được xử lý trong môi trường có CaCl_2 và trước đó được sốc nhiệt ở 42°C .

Hóa biến nạp là phương pháp sử dụng chất hóa học, tạo điều kiện để đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ. Quá trình được thực hiện theo hai bước sau: Xử lý tế bào chủ trong dung dịch CaCl_2 ở nhiệt độ thấp nhằm để thay đổi màng tế bào và ủ vector tái tổ hợp với tế bào chủ đã xử lý.

Hiệu suất của phương pháp hóa biến nạp này vào khoảng 10^5 đến 10^6 tế bào biến nạp trên 1mg DNA tái tổ hợp. Qua các kết quả thực nghiệm, người ta thấy rằng, các tế bào phát triển ở pha sớm đến pha giữa dễ được biến nạp hơn. Những nghiên cứu sau này cho thấy việc xử lý tế bào bằng các ion kim loại hóa trị hai như

Mg^{+2} , Mn^{+2} và Ba^{+2} cũng cho khả năng biến nạp lớn. Ngoài ra, hiệu suất biến nạp còn phụ thuộc vào kích thước của plasmid, plasmid càng nhỏ thì hiệu suất biến nạp càng cao.

2.4.2- Điện biến nạp

Nguyên tắc: Sử dụng dòng điện cao thế cục bộ theo xung để tạo lỗ nhỏ trên màng sinh học của tế bào, tạo điều kiện cho tế bào hấp thụ DNA tái tổ hợp được dễ dàng.

Hiệu suất: Từ 10^9 đến 10^{10} tế bào biến nạp cho 1mg DNA tái tổ hợp, tuy nhiên, lượng tế bào biến nạp bị chết nhiều có khi lên tới 70%. Hiệu suất của phương pháp này phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Độ mạnh của điện trường tác động khác nhau đối với các loại tế bào khác nhau,

- Độ dài của hằng số thời gian (thời gian ngắt xung - ms). Theo nhiều nghiên cứu, hầu hết đối với các loại tế bào sinh vật, hiệu quả biến nạp cao khi hằng số thời gian đạt được khoảng 6ms,

- Nồng độ tế bào chủ,

- Nồng độ DNA tái tổ hợp,

- Giai đoạn phát triển của tế bào (tế bào quá già hoặc quá non đều không thích hợp),

- Môi trường dung dịch đệm,

- Cấu trúc màng tế bào.

2.4.3- Biến nạp tế bào trần (*p rotoplast*)

Là phương pháp chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ đã được xử lý bằng polyetylen glycol (PEG). Để tạo tế bào trần, người ta ủ tế bào với PEG nồng độ 30% đến 40%. Đây là phương pháp chuyển gen có hiệu quả cao đối với tế bào thực vật. Bằng phương pháp này, người ta đã nhận được các cây mang gen biến nạp ổn định và di truyền qua nhiều thế hệ (Potrykus và cộng sự - 1995).

Ưu điểm: Tần số biến nạp đồng thời gen chỉ thị và gen cần biến nạp cao. Có thể chuyển gen vào tế bào protoplast của bất kỳ loại cây nào. Đặc biệt là loại cây có giá trị kinh tế cao như lúa, ngô, đại mạch.

Nhược điểm: Việc tái sinh cây protoplast còn rất khó khăn ở một số loài cây.

2.4.4- **Phương pháp bắn gen**

Nguyên tắc: Người ta sử dụng hạt kim loại nặng được bao bọc DNA và bắn trực tiếp vào tế bào.

Ưu điểm: Phương pháp này có thể biến nạp cho tất cả các loại tế bào thực vật. Thao tác dễ dàng, bắn một lần được nhiều tế bào.

Nhược điểm: Hiệu suất biến nạp thấp, thường xuyên nhận được cây biến nạp khảm (cây có tế bào biến nạp và tế bào không biến nạp).

Một số thành tựu đã đạt được bằng phương pháp bắn gen: Năm 1988, McCabe và cộng sự đã nhận được cây đậu tương biến nạp đầu tiên bằng phương pháp bắn gen. Năm 1990, Promm, Gordon, Kamm và cộng sự đã nhận được cây ngô biến nạp ở nhiều phòng thí nghiệm. Những năm gần đây có hàng loạt công bố về biến nạp thành công ở lúa. Năm 1996, Zhang và cộng sự đã biến nạp ở đu đủ, mía và bông. Điều đó đã khẳng định tính ưu việt của phương pháp này.

2.4.5- **Phương pháp vi tiêm**

Phương pháp vi tiêm là phương pháp sử dụng vi kim và kính hiển vi để đưa DNA tái tổ hợp vào mỗi tế bào nhất định.

Đây là quá trình lai ghép cho tế bào bậc cao hoặc tế bào hợp tử. Tùy thuộc từng trường hợp cụ thể, người ta có thể chọn phương pháp sao cho việc đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào có hiệu quả cao.

Ưu điểm: Có thể tối ưu lượng DNA tái tổ hợp đưa vào tế bào và quyết định đưa DNA vào loại tế bào nào. Đưa chính xác và thậm chí vào tận nhân của tế bào và có thể quan sát được. Các tế bào có cấu trúc nhỏ như hạt phấn, tế bào tiền phôi cũng có thể tiến hành một cách chính xác. Có thể biến nạp cho mọi giống cây.

Nhược điểm: Một phát tiêm chỉ được một tế bào và thao tác cần phải khéo léo và tỉ mỉ.

2.4.6- **Tải nạp**

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật liệu di truyền qua vector là virus từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận, trong đó có quá trình chuyển gen và tái tổ hợp gen ở vi khuẩn nhờ thực khuẩn thể (Bacteriophage).

Thực nghiệm đã chứng minh được tải nạp ở *E. Coli* qua phage λ , phage P1 và ở *Bacillus subtilis* qua phage SP10. So với các phương pháp trên, tải nạp cho hiệu suất cao hơn.

Như vậy, đến nay đã có nhiều phương pháp hóa học, hóa lý, cơ học và sinh học để đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ. Tùy các đối tượng và yêu cầu cụ thể, phương pháp này hay phương pháp khác có hiệu quả và được sử dụng nhiều hơn.

2.5- **Kỹ thuật tách dòng (tạo dòng)**

Kỹ thuật tách dòng bao gồm việc phải cài một mảnh (chuỗi) DNA lạ vào một vector (plasmide hoặc phage λ) bằng phương pháp hóa sinh. Sau đó, đưa phân tử lai này vào tế bào chủ đã chọn lựa bằng phương pháp biến nạp hoặc tải nạp. Trường hợp muốn tạo dòng tổng hợp enzyme thì mảnh DNA định cài phải mã hóa cho gen cấu trúc của một enzyme nào đó.

2.5.1- Mục đích của sự tách dòng

- Thiết lập ngân hàng bộ gen,
- Thiết lập ngân hàng cDNA,
- Sản xuất protein, enzyme,
- Sản xuất vaccine,
- Sản xuất kháng sinh.

2.5.2- Các bước cơ bản của phương pháp tách dòng

Quá trình thực hiện có thể thay đổi phụ thuộc vào nhân tố tham gia và mục đích của quá trình tách dòng. Tuy nhiên để tạo dòng, cần phải thực hiện các bước sau:

2.5.2.1- Tách lập các DNA lạ cần tạo dòng

Chọn và cắt DNA lạ của tế bào cho bằng một enzyme cắt hạn chế (RE). Phân lập đoạn DNA (gen quý) phù hợp với vector và mục đích cần tạo dòng.

Trong trường hợp đặc biệt, để tạo dòng một gen chưa biết, người nghiên cứu có thể tổng hợp hóa học đoạn DNA cần tạo dòng khi dự đoán cấu trúc protein do gen chỉ huy tổng hợp hoặc tổng hợp cDNA từ mRNA.

Tạo đầu dính khi cần thiết.

2.5.2.2- Chọn và xử lý vector

Chọn vector cần phải chú ý những yêu cầu sau: độ lớn của gen lạ (đoạn cài), loại tế bào chủ tiếp nhận vector và phương pháp ứng dụng.

Xử lý vector: cắt vector bằng enzyme cắt hạn chế cùng loại với enzyme đã cắt DNA nói trên (để tạo những vết cắt giống nhau, thuận tiện cho việc nối ghép sau này). Khử nhóm phosphat bằng enzyme alkaline phosphatase để tránh hai đầu vector đóng kín trở lại.

2.5.2.3- Tạo DNA tái tổ hợp (Vector tái tổ hợp)

Việc tạo DNA tái tổ hợp bằng cách ghép DNA lạ vào vector đã được cắt cùng một enzyme cắt hạn chế loại II, khi đó, chúng sẽ ghép đôi những đầu dính lại với nhau nhờ bắt cặp bổ sung.

Một phản ứng ghép nối xảy ra với sự có mặt của enzyme DNA ligase của *E. Coli* hoặc phage T4 để hoàn chỉnh phân tử lai.

2.5.2.4- Chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ bằng phương pháp biến nạp hoặc tải nạp

Công đoạn này nhằm mục đích sử dụng bộ máy của tế bào chủ để sao chép vector tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao. Việc chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn tức là làm cho vi khuẩn trở thành khả biến, nghĩa là có khả năng thấm vector tái tổ hợp. Sự thấm này có thể xảy ra một cách tự nhiên hoặc được cảm ứng. Tuy nhiên, nó sẽ phụ thuộc vào loại plasmid sử dụng làm vector và phụ

thuộc vào sự định vị của vùng cài lắp chứa bên trong vector mà người nghiên cứu sẽ chọn phương pháp biến nạp hoặc tải nạp.

Biến nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho D (Doner) sang tế bào thể nhận R (Reception), không cần sự tiếp xúc giữa hai tế bào hoặc nhân tố trung gian là phage hoặc virus. Biến nạp được thực hiện với vector chuyển gen là plasmid. Có nhiều phương pháp biến nạp như hóa biến nạp, điện biến nạp, biến nạp tế bào trần, phương pháp bắn gen và phương pháp vi tiêm.

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho D (Doner) sang tế bào thể nhận R (Reception) qua nhân tố trung gian là virus. Tải nạp được thực hiện với vector chuyển gen có nguồn gốc là virus như phage, cosmid, ...

2.5.2.5- **Phát hiện dòng cần tìm**

Công việc tiếp theo là kiểm tra sự hiện diện của gen mong muốn. Việc chọn lựa những chủng như ý muốn là không đơn giản, vì cách tiến hành thí nghiệm trong một hỗn hợp không đồng nhất nên các dòng vi khuẩn có thể mọc lên theo ba khả năng:

- Tế bào vi khuẩn không nhận plasmid tái tổ hợp,
- Tế bào nhận plasmid nhưng không có gen lạ,
- Tế bào vi khuẩn nhận được plasmid tái tổ hợp.

Tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu mà người ta có các phương pháp khác nhau để xác định dòng cần tìm. Nếu mục đích là nghiên cứu đoạn gen chưa biết, người ta thường dùng đầu dò. Nếu đoạn DNA đã biết (cDNA), công việc sẽ đơn giản và nhanh chóng.

2.5.2.6- **Kiểm tra và thu nhận sản phẩm của gen tái tổ hợp**

Tùy từng trường hợp cụ thể mà người nghiên cứu đưa ra những phương pháp kiểm tra thu hồi sản phẩm của gen tái tổ hợp. Nếu là mục đích thiết lập ngân hàng cDNA, ta phải tiến hành các bước sau: Đầu tiên người ta phải tách plasmid tái tổ hợp ra khỏi dịch nuôi cấy, sau đó, cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme RE loại II và thu được hai băng DNA, một có độ dài bằng khung vector, còn băng khác có độ dài tương ứng đúng bằng cDNA. Cách kiểm tra lại cDNA đã được cắt bằng cách điện di trên gel agarosa 0,8% và kiểm tra lại độ dài của những băng cDNA thu được. Những đoạn có kích thước khác nhau sẽ di chuyển những khoảng cách khác nhau trên gel.

Nếu sản phẩm của gen tái tổ hợp là protein, enzyme, hormone, vaccine, kháng sinh,... người ta có thể thu nhận sản phẩm bằng phương pháp chiết tách lắng lọc ly tâm kết tủa phân đoạn hoặc trao đổi ion.

2.6- **Một số phương pháp xác định dòng cần tìm**

2.6.1- **Phương pháp lai axit nucleic**

1,- **Khái niệm đầu dò:**

Các đầu dò là những mảnh DNA được đánh dấu, có khả năng nhận biết một chuỗi DNA hoặc RNA đồng đẳng qua lai hóa.

2,- **Đặc điểm của đầu dò:**

Là một đoạn axit nucleic (DNA hoặc RNA) sợi đơn. Đầu dò phải bổ sung các bazơ nitơ, đối song song với đoạn axit nucleic cần nhận biết. Đầu dò phải so khớp được, đó là các đầu đánh dấu phóng xạ.

3,- *Các loại đầu dò:*

cDNA làm đầu dò cực tốt, ngoài ra, mRNA và oligonucleotide cũng có thể làm đầu dò. Nếu chuỗi DNA chưa biết trình tự, người ta phải tinh sạch một lượng nhỏ protein tương ứng với DNA đã nghiên cứu và từ đó tổng hợp đầu dò. Còn nếu một phần DNA phải so khớp đã biết thì công việc rất dễ dàng để tổng hợp một đầu dò.

4,- *Nguyên tắc của phương pháp lai axit nucleic:*

Dựa vào khả năng biến tính khi nhiệt độ tăng và hồi tính khi hạ nhiệt độ từ từ của DNA. Khi tăng nhiệt độ của DNA lên quá nhiệt độ sinh lý (thường ở khoảng 80 đến 95°C), hai sợi đơn DNA sẽ tách rời nhau do liên kết hydro bị đứt. Khi hạ nhiệt độ từ từ của khối DNA đã biến tính cùng với các điều kiện thích hợp khác, các mạch đơn bắt cặp trở lại. Sự bắt cặp chỉ có thể xảy ra khi hai trình tự DNA hoàn toàn bổ sung cho nhau. Tính đặc hiệu cực lớn của phản ứng lai này cho phép bất kỳ trình tự mạch đơn nào cũng tìm gặp mạch bổ sung với nó, mặc dù chúng nằm trong hàng triệu các trình tự DNA và RNA khác nhau. Có thể dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu để phát hiện đoạn lai.

5,- *Cách tiến hành:*

Chuẩn bị mẫu (đầu) dò đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc hóa chất. Biến tính dòng cần tìm ở dưới dạng một sợi, sau đó hạ nhiệt độ từ từ, các sợi đơn tương đồng bắt cặp với nhau. Sự bắt cặp xảy ra giữa DNA và DNA, RNA và DNA, RNA và RNA.

2.6.2- ***Phương pháp sử dụng kháng thể***

1,- *Nguyên tắc:*

Dựa vào phản ứng đặc trưng của một số protein và kháng thể mà chúng ta có thể nhận biết được qua phản ứng đặc trưng đó như phản ứng tạo màu, phản ứng kết tủa.

2,- *Cách tiến hành:*

Chọn kháng thể đặc trưng cho protein (thuốc thử cho protein). Tách protein được biểu hiện trong quá trình tạo dòng. Ủ protein với kháng thể đặc trưng. Sau đó tiến hành nhận biết thông qua các dấu hiệu của phản ứng đặc trưng giữa protein và kháng thể.

3,- *Ứng dụng:*

Chủ yếu sử dụng trong y học với hai yêu cầu sau: DNA cần nghiên cứu được gắn vào vector phải biểu hiện protein khi tạo dòng và đồng thời, vector tạo dòng phải là vector biểu hiện (ví dụ như vector λ gt11). Protein biểu hiện cần phải có kháng thể đặc trưng.

2.6.3- ***Phương pháp phát hiện do mất hoạt tính vì xen đoạn***

Nguyên tắc: Dựa vào sự mất khả năng kháng thuốc của vi khuẩn mang vector tái tổ hợp khi chúng được nuôi cấy trong môi trường kháng sinh.

Phạm vi sử dụng: Phương pháp này dùng cho vector có từ hai gen kháng thuốc trở lên, ví dụ như vector pBR322. Trong plasmid pBR322 có hai gen kháng thuốc AmP^R và TetR. Trên các gen này có những điểm nhận biết của các RE nơi cài đặt DNA lạ. Khi gắn DNA lạ vào một trong hai gen nói trên thì gen nhận đoạn

cài mất khả năng kháng thuốc. Quan sát những khuẩn lạc bị mất gen kháng thuốc, chúng tỏ những khuẩn lạc đó có chứa gen cần tạo dòng.

Ưu điểm của phương pháp là ít tốn kém so với phương pháp lai.

2.6.4- **Phương pháp phát hiện do thay đổi kiểu hình**

1,- *Nguyên tắc:*

Dựa vào sự thay đổi màu sắc của khuẩn lạc, chứng tỏ rằng, khuẩn lạc đó có chứa gen lạ.

2,- *Cách tiến hành:*

Chuẩn bị hai mẫu thử nghiệm mà plasmid tạo dòng có chứa gen lacZ (ví dụ như dây pUC), một mẫu để so sánh còn mẫu kia để cài DNA lạ vào gen lacZ. Sau đó, nuôi cấy cả hai mẫu trong môi trường có chất cảm ứng X-Gal (5 brom-4chloro-3indolyl D-galactopyranoside). Chất cảm ứng này bị phân hủy bởi enzyme β -galactosidase tạo ra galactose và X (dẫn xuất indol), ngoài môi trường, dẫn xuất này bị oxy hóa cho màu xanh đậm.

Qua quan sát, ta thấy plasmid không chứa gen lạ cho khuẩn lạc màu xanh do gen lacZ tổng hợp enzyme β -galactosidase. Còn plasmid thứ 2 cho khuẩn lạc màu trắng, điều đó chứng tỏ nó chứa DNA lạ được cài trong gen lacZ và chọn những khuẩn lạc màu trắng.

2.7- **Ngân hàng gen (Genomic library)**

Ngân hàng bộ gen của một sinh vật là tập hợp các trình tự DNA cấu thành bộ gen được gắn vào vector, nó chỉ biểu diễn tổng số của gen. Ngân hàng này được tạo ra từ một bộ sưu tập DNA tái tổ hợp cả các chuỗi mã hóa lẫn các chuỗi không mã hóa. Khác với ngân hàng cDNA, ngân hàng bộ gen có thể được thiết lập bất kỳ loại tế bào nào của sinh vật nghiên cứu.

Các bước thiết lập ngân hàng gen:

- Tách và làm sạch DNA của sinh vật,
- Cắt DNA thành những đoạn có kích thước xác định bằng enzyme RE loại II - thông thường, người ta sử dụng EcoRI,
- Vector được chọn để tạo dòng gen thường là cosmid hoặc phage λ cũng được xử lý bởi EcoRI,
- Tạo vector tái tổ hợp và đóng gói trong vỏ phage,
- Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ và tạo dòng,
- Xác định đặc tính và biểu hiện của dòng vi khuẩn vừa lập,
- Tiến hành sàng lọc, nghĩa là phải tách những vector nào có đoạn DNA ưa chuộng, từ đó xây dựng ngân hàng bộ gen.

Đặc điểm và ứng dụng:

- Ngân hàng gen chứa các đoạn DNA lớn hơn 100 lần so với cDNA.
- Giải mã thông tin di truyền chứa trong bộ gen, đặc biệt là cấu trúc intron và exon của một gen xác định.

- Tạo dòng những trình tự DNA không mã hóa nằm cạnh các gen mã hóa và đóng vai trò quyết định trong sự điều hòa biểu hiện của gen.

2.8- Ngân hàng cDNA

2.8.1- Thiết kế ngân hàng cDNA

Ngân hàng cDNA là tập hợp các bản sao cDNA từ tất cả các mRNA của một tế bào. Như vậy, ngân hàng được thiết lập từ một loại tế bào xác định (tế bào biệt hóa), vì thế, cDNA mang tính tế bào rất cao.

Quá trình chuẩn bị ngân hàng cDNA bao gồm các bước sau đây:

- Chiết tách RNA tổng số, ta phải chọn những tế bào có chứa nhiều mRNA cần thiết và sau đó, làm sạch mRNA,

- Chọn lựa các mRNA chứa nhiều A (polyA) bằng cách tách trên cột xenlulose oligo dT,

- Tổng hợp cDNA sợi kép đầu bằng từ mRNA dưới tác dụng của enzyme sao chép ngược nhờ kỹ thuật nuclease S₁ hoặc kỹ thuật Gubler-Hoffman,

- Metyl hóa các vùng hạn chế (có trong đoạn cDNA sợi đôi) được nhận biết bởi enzyme EcoRI để bảo vệ vùng này không bị cắt khi thao tác với EcoRI,

- Tạo đầu dính bằng cách sử dụng đoạn nối linker có chứa trình tự nhận biết bởi EcoRI, sau đó, cắt bằng enzyme EcoRI. Trong trường hợp này, chỉ có đoạn nối bị cắt còn cDNA vẫn còn nguyên vẹn (do được metyl hóa). Đưa cDNA vào vector tạo DNA tái tổ hợp,

- Ghép cDNA đầu dính vào vector thích hợp đã được mở EcoRI và đã khử nhóm phosphat,

- Hàn kín mạch nhờ enzyme phosphoryl hóa và enzyme ligase để tạo vector tái tổ hợp,

- Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ và nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp để tạo dòng,

- Xác định dòng cần tìm và thành lập ngân hàng cDNA.

Mục đích của việc thiết lập ngân hàng cDNA là nhằm nghiên cứu sự biểu hiện của một gen xác định cùng với những vấn đề liên quan đến sự điều hòa biểu hiện gen cũng như mối tương tác giữa các gen trong một quá trình sống.

Chú ý: Khi phân tích kết quả thu được ngân hàng cDNA, cần chú ý tác dụng sinh lý từng thời điểm thí nghiệm.

2.8.2- Sàng lọc ngân hàng cDNA

Một phương pháp phổ biến nhằm sàng lọc ngân hàng cDNA được bắt đầu từ việc tạo canh trường nuôi cấy chứa đựng nhiều khuẩn lạc từ ngân hàng cDNA. DNA plasmid từ mỗi mẻ cấy vi khuẩn gắn với mảnh nhỏ nitro-xenlulose (màng lai) sẽ bị biến tính và lai với mRNA tổng số. Mỗi mRNA khác nhau sẽ được lai trên nitroxelulose với thứ tự cDNA bổ sung của nó. Các mRNA bám vào màng lọc được tách ra và dùng để tổng hợp protein mà nó mã hóa bằng hệ thống dịch mã *in vitro*. Protein hình thành được đem phân tích xem có phải là sản phẩm của mRNA cần tìm hay không, và từ đó, xác định vi sinh vật nuôi cấy chứa gen mong muốn. Sàng lọc tất cả các mẻ nuôi cấy theo cách trên để xác định dòng đơn thể hiện gen tìm kiếm.

Chương 3

Công nghệ sinh học thực vật

Mã bài MH 8- 03

I. Mở đầu

Nuôi cấy mô thực vật là một trong những lĩnh vực ứng dụng đạt nhiều thành công nổi bật của công nghệ sinh học thực vật. Bằng các kỹ thuật nuôi cấy trong điều kiện vô trùng các bộ phận tách rời của cơ thể thực vật, người ta đã nhân giống *in vitro* thành công nhiều loài cây trồng có giá trị mà trước đây các phương thức nhân giống truyền thống gặp nhiều khó khăn. Bên cạnh đó, một số kỹ thuật khác cũng đã được ứng dụng có kết quả như: nuôi cấy đơn bội (1n) để tạo dòng thuần chủng phục tráng giống cây trồng, dung hợp protoplast giúp mở rộng nguồn gen tạo ra nhiều loài thực vật mang tính trạng mới hữu ích, chọn dòng biến dị soma và biến dị giao tử có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh như nóng-lạnh, phèn-mặn, khô hạn, sâu-bệnh..., và cuối cùng sản xuất các cây trồng sạch bệnh virus từ những cá thể nhiễm bệnh virus.

nhờ sử

, thiết kế các vector biểu hiện cao và xây dựng các kỹ thuật chuyển gen hiện đại... đã cho phép chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp có khả năng hợp nhất DNA ngoại lai. Những nghiên cứu gần đây cho thấy thông tin di truyền mới được biến nạp vào các thực vật bậc cao không chỉ biểu hiện ở mức độ tế bào và sau đó mức độ cơ thể hoàn chỉnh mà còn có thể truyền lại cho các thế hệ sau của chúng. Thành tựu nổi bật của công nghệ gen ở thực vật bậc cao là tái sinh được cây chuyển gen đầu tiên vào đầu thập niên 1980, đến nay đã thành công ở nhiều loài khác nhau. Lúc đầu người ta sử dụng các gen chỉ thị để biến nạp, nhưng nay đã thay thế bằng các gen quan trọng có giá trị kinh tế nhằm mục đích cải thiện phẩm chất cây trồng.

điều

kiện tự nhiên không thuận lợi, chi phí lao động ngày càng tăng, các khó khăn về kỹ thuật và kinh tế trong trồng trọt... Phương pháp nuôi cấy tế bào dịch huyền phù thực vật trong bioreactor có khả năng góp phần giải quyết những khó khăn nói trên và những thành công của công nghệ này trong những năm gần đây đã được nhiều công trình tổng kết. Hiện nay, nhiều hợp chất tự nhiên dùng làm dược phẩm hoặc phụ gia thực phẩm đã được sản xuất thành công bằng phương thức nuôi cấy tế bào trên quy mô công nghiệp cho hiệu suất rất cao. Đặc biệt, việc sản xuất các protein ngoại lai để điều trị bệnh trong hệ thống tế bào thực vật đang được chú ý do chúng an toàn cho người hơn các protein có nguồn gốc từ tế bào động vật, bởi vì các chất nhiễm bẩn và virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh ở người.

II. Nuôi cấy mô và nhân giống *in vitro*

1. Thuật ngữ học (terminology)

Nuôi cấy mô (tissue culture) là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình nuôi cấy vô trùng *in vitro* các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô dùng cho cả hai mục đích nhân giống và cải thiện di truyền (ví dụ: giống cây trồng), sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo quản các nguồn gen quý... Các hoạt động này được bao hàm trong thuật ngữ công nghệ sinh học.

Thuật ngữ nhân giống *in vitro* (*in vitro* propagation) hay còn gọi là vi nhân giống (micropropagation) được sử dụng đặc biệt cho việc ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống thực vật, bắt đầu bằng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật có kích thước nhỏ, sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong các ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác.

Trong thực tế, các nhà vi nhân giống (micropropagators) dùng thuật ngữ nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô thay đổi cho nhau để chỉ mọi phương thức nhân giống thực vật trong điều kiện vô trùng. Thuật ngữ đồng nghĩa là nuôi cấy *in vitro* (*in vitro* culture).

Nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, và được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên

dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là cutting (cành giâm), layer (cành chiết), scion (cành ghép) hoặc seed (hạt).

Năm thuật ngữ khác được dùng để chỉ các loại tái sinh sinh dưỡng (vegetative or somatic regeneration) cơ bản trong nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô:

1.1. Nuôi cấy đỉnh phân sinh (meristem-tip culture)

Phương thức nhân giống bằng cách dùng các phần rất nhỏ của đỉnh chồi (shoot-tip) bao gồm mô phân sinh đỉnh riêng rẽ (single apical meristem) và mầm lá non (young leaf primordia) để kéo dài chồi (shoot elongation) ngay sau đó. Kiểu nuôi cấy này được dùng lần đầu tiên để làm sạch virus (virus-free) ở thực vật. Nếu dùng đỉnh phân sinh không thể sống sót và tạo rễ một cách độc lập, thì có thể thay thế bằng phương thức vi ghép (micrografting).

Thành công điển hình trong phương thức này là nhân giống các cây một lá mầm như hoa lan, dứa, huệ và chuối (protocorm hoặc cụm chồi)... hoặc cây hai lá mầm như khoai tây, cà chua và cúc (kéo dài chồi)...

1.2. Sinh sản chồi nách (axillary shoot proliferation)

Kiểu nuôi cấy này sử dụng chồi của các điểm sinh trưởng bên và ngọn nơi mà sự kéo dài của chồi tận cùng (elongation of terminal shoot) bị kìm hãm và sự sinh sản chồi nách được đẩy mạnh. Sự điều khiển này cho phép nhân nhanh được các chồi *in vitro* (microshoots), là các chồi có thể tách ra và tạo rễ *in vitro* để hình thành cây trong ống nghiệm (microplants), hoặc nó có thể được cắt ra riêng biệt tạo thành các cành giâm *in vitro* (microcuttings) để tạo rễ bên ngoài *in vitro*.

Phương thức này thường được áp dụng cho các đối tượng hai lá mầm như cúc, cà chua, thuốc lá...

1.3. Tạo chồi bất định (adventitious shoot induction)

Loại nuôi cấy cho phép hình thành các chồi bất định hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật. Hệ thống nuôi cấy này có những yêu cầu tương tự với nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, nó chỉ khác về nguồn mẫu vật và nguồn

gốc bất định của các chồi mới. Một số loại mẫu vật được dùng như là đoạn thân (thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải), mảnh lá (thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao), cuống lá (thủy tiên), các bộ phận của hoa (súp lơ, lúa mỳ, thuốc lá), nhánh củ (họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên), đoạn mầm (măng tây)...

1.4. Phát sinh cơ quan (organogenesis)

Thuật ngữ này dùng để mô tả quá trình tái sinh các chồi hoặc/và rễ bất định từ các khối tế bào callus. Quá trình này xảy ra sau thời điểm mà mẫu vật được đặt vào môi trường nuôi cấy và bắt đầu cảm ứng tạo callus. Đối với mục đích nhân giống *in vitro*, nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay mà phát triển thành khối callus. Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất.

1.5. Phát sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis)

Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotetic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitic embryogenesis). Phôi vô tính có cấu trúc tương tự phôi hữu tính của thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Phương thức tạo phôi vô tính được ứng dụng rất hiệu quả trong sản xuất hạt nhân tạo (synthetic seed).

2. Nhân giống *in vitro* và các hệ thống nuôi cấy mô

Phương pháp nhân giống *in vitro* thực chất là một tiến bộ vượt bậc của các phương pháp nhân giống vô tính cổ điển như giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép, tách dòng... Ở đây giá trị thực tiễn của các tiến bộ khoa học kỹ

thuật là đã biến những phương thức cổ điển đó thành những phương thức hoàn toàn mới về chất cho phép giải quyết những khó khăn mà phương pháp cổ điển không thể vượt qua. Ví dụ: kỹ thuật giam cầm chỉ có thể ứng dụng thành công ở một số cây trồng nhất định, vì rằng với kích thước 5-20 cm khả năng tạo rễ phụ của vùng mô tương tầng gần vết cắt hoặc khả năng đánh thức chồi phụ vẫn bị các vùng tế bào lân cận và toàn bộ phần còn lại của đoạn giam khống chế. Nếu tiến hành nuôi cấy mẫu mô với kích thước 5-10 mm, tức là làm giảm thể tích khối mô xuống 10^3 lần thì rõ ràng mối tương tác giữa các tế bào và các loại mô sẽ đơn giản đi rất nhiều, hiệu quả tác động của các biện pháp nuôi cấy sẽ phải cao hơn. Sau đây là một số phương thức nhân giống *in vitro*:

2.1. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng

2.1.1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh hay đỉnh phân sinh

Phương thức này sử dụng các bộ phận nhỏ nhất của đỉnh chồi hay đỉnh sinh trưởng (apex) làm mẫu vật nuôi cấy. Nó bao gồm mô phân sinh đỉnh và các mầm lá non. Khái niệm mô phân sinh đỉnh (ngọn) chỉ đúng khi mẫu vật được tách từ đỉnh sinh trưởng có kích thước trong vòng 0,1-0,15 mm tính từ chóp sinh trưởng. Trong thực tế mẫu vật được tách với kích thước như vậy chỉ khi nào người ta tiến hành nuôi cấy với mục đích làm sạch virus cho cây trồng. Thường sẽ gặp khó khăn lớn trong việc nuôi thành công các mô phân sinh đỉnh riêng rẽ có kích thước nhỏ như vậy. Do đó, trong khuôn khổ nhân giống *in vitro* người ta thường nuôi cấy cả đỉnh chồi hoặc đỉnh sinh trưởng. Phổ biến nhất ở các đối tượng như phong lan, dưa, mía, chuối... đỉnh sinh trưởng được tách với kích thước từ 5-10 mm, nghĩa là toàn bộ mô phân sinh đỉnh và một phần mô xung quanh.

Tương quan giữa độ lớn của chồi nuôi cấy, tỷ lệ sống và mức độ ổn định về mặt di truyền của chồi được biểu hiện như sau: Nếu độ lớn tăng thì tỷ lệ sống và tính ổn định tăng, nếu độ lớn giảm thì tỷ lệ sống và tính ổn định giảm. Nhưng xét về hiệu quả kinh tế nuôi cấy (thể tích bình nuôi, lượng dung dịch môi trường dinh dưỡng): Nếu độ lớn tăng thì hiệu quả kinh tế giảm, nếu độ lớn giảm thì hiệu quả kinh tế tăng. Do đó, phải kết hợp hài hòa được các yếu tố trên để tìm ra phương thức lấy mẫu tối ưu.

Một đỉnh sinh trưởng nuôi cấy ở điều kiện thích hợp sẽ tạo một hay nhiều chồi và mỗi chồi sẽ phát triển thành một cây hoàn chỉnh. Xét về nguồn gốc của các cây đó có ba khả năng:

- Cây phát triển từ chồi đỉnh (chồi ngọn).

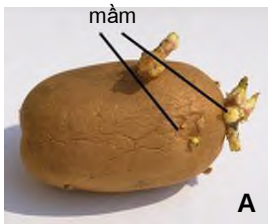
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ.

- Cây phát triển từ chồi mới phát sinh, ví dụ nuôi cấy đoạn trụ dưới mầm (hypocotyl) của cây măng cầu (*Annona squamosa*) sẽ cho xuất hiện rất nhiều mầm (buds) trên mô nuôi cấy, một số mầm sau đó sẽ phát triển thành chồi (shoots) và trở thành cây *in vitro* hoàn chỉnh (plantlet). Tuy nhiên, thường khó phân biệt được chồi phá ngủ và chồi phát sinh mới. Các phương thức phát triển cây hoàn chỉnh từ đỉnh sinh trưởng nuôi cấy như sau:

- Phát triển cây trực tiếp

Chủ yếu ở các đối tượng hai lá mầm (dicotyledon) như khoai tây, thuốc lá, cam chanh, hoa cúc... ví dụ khoai tây (*Solanum tuberosum*):

Mầm (đỉnh sinh trưởng) Chồi nách Cây (Hình 4.1)

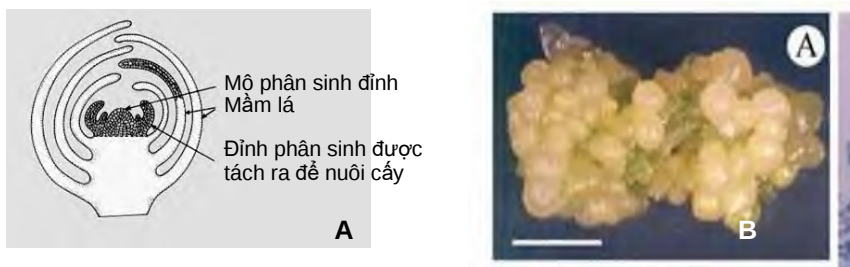


Hình 4.1. Sự phát triển cây trực tiếp. A: mầm khoai tây. B: sự kéo dài mầm khoai tây trong nuôi cấy và phát sinh chồi nách, các đoạn thân mang chồi nách sẽ được tách ra và cấy chuyển trên cùng môi trường để nhân nhanh.

- Phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

Chủ yếu gặp ở các đối tượng một lá mầm (monocotyledon) như phong lan, dừa, huệ... Cùng một lúc đỉnh sinh trưởng tạo hàng loạt protocorm (proembryo) và các protocorm này có thể tiếp tục phân chia thành các protocorm mới hoặc phát triển thành cây hoàn chỉnh. Bằng phương thức này trong một thời gian ngắn người ta có thể thu được hàng triệu cá thể, ví dụ Hoa lan (Orchidaceae):

Đỉnh sinh trưởng Protocorm Cây (Hình 4.2)



Hình 4.2. Phát triển cây qua giai đoạn protocorm. A: đỉnh sinh trưởng. B: Protocorm hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Các đối tượng hoa lan đã mang lại hiệu quả kinh tế đặc biệt cao. Sau những kết quả đầu tiên ở chi *Cymbidium* của Morel (1966), đến nay người ta đã thu được kết quả rất tốt ở khoảng 30 chi khác nhau của họ này. Sở dĩ nhân giống vô tính hoa lan đạt được thành công lớn và được ứng dụng rộng rãi như vậy là vì hoa lan có phương thức sinh sản qua protocorm. Nhờ có phương thức nhân giống nhanh và rẻ tiền mà hoa lan vốn đắt trở nên có giá phải chăng và được nhiều người ưa chuộng. Những thành công ở họ lan không những chỉ là bằng chứng mà còn mở đường cho việc ứng dụng kỹ thuật này đối với các loài cây khác.

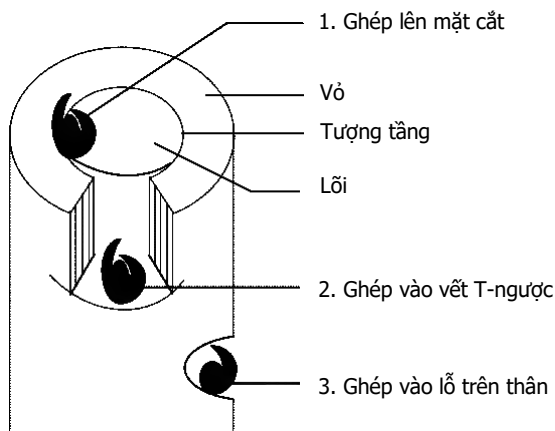
Lĩnh vực ứng dụng mới đây nhất cũng đã bắt đầu có kết quả là các cây ăn quả và cây lâm nghiệp, trong đó có các cây quý như cà phê, táo, lê, thông, bồ đề... Tổng số có trên 30 chi khác nhau đã được nuôi cấy thành công. Do các cây trồng rừng và các cây ăn quả là những cây trồng lâu năm nên mọi chi phí ban đầu trong nhân giống *in vitro* đều có thể chấp nhận được.

- Ghép đỉnh chồi (shoot apex grafting) hay vi ghép

Về nguyên tắc, vi ghép là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nhưng thông qua dinh dưỡng tự nhiên của gốc ghép. Đỉnh sinh trưởng dùng làm mắt ghép có kích thước khoảng từ 0,2-0,5 mm được tách từ búp non đang sinh trưởng mạnh của cây mẹ trưởng thành, gốc ghép là mầm giá mới nảy mầm từ hạt của giống hoang dại, toàn bộ cây ghép được nuôi dưỡng trong điều kiện ống nghiệm vô trùng. Phương thức này thường dùng để tạo ra các giống cây ăn quả sạch bệnh virus nhằm cung cấp mắt ghép và cành chiết đầu dòng làm nguyên liệu nhân giống cho sản xuất đại trà. Phương thức này cho phép thu

được cây hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

Có nhiều cách ghép khác nhau, chẳng hạn: (1) Ghép lên mặt cắt: đặt mắt ghép trực tiếp lên bề mặt lát cắt, trên vùng tượng tầng. (2) Ghép chữ T-ngược: dùng đầu nhọn của lưỡi dao cắt lỗ ghép hình chữ T-ngược, chân chữ T là mặt cắt để dễ bóc lộ vùng tượng tầng. (3) Ghép hàm ếch: khoét trên thân mầm cách mặt cắt 5 mm một vết lõm hình hàm ếch, chiều sâu vết lõm bằng chiều dày lớp vỏ. Đặt mắt ghép vào đáy hàm ếch (Hình 4.3).



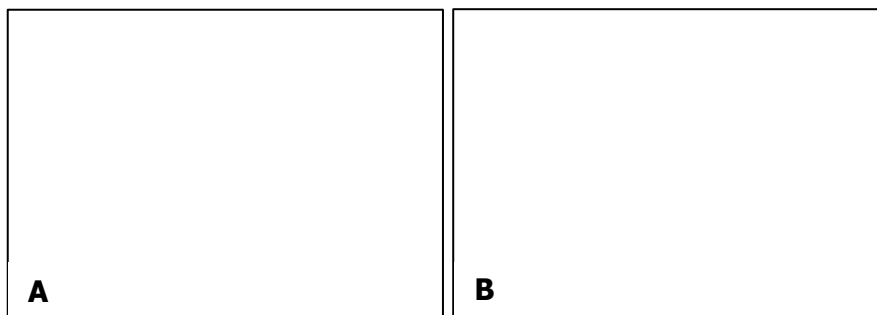
Hình 4.3. Vị trí mắt ghép trong ba kiểu vi ghép khác nhau

2.1.2. Nuôi cấy chồi bất định (adventitious shoot culture)

Hệ thống nuôi cấy này có những yêu cầu tương tự với nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, nó chỉ khác về nguồn mẫu vật và nguồn gốc bất định của các chồi mới. Đỉnh chồi bất định mới có thể phát triển hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật (Hình 4.4). Một số loại mẫu vật được dùng như sau:

- Đoạn thân: thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải...
- Mảnh lá: thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao...
- Cuống lá: thủy tiên...
- Các bộ phận của hoa: súp lơ, lúa mỳ, thuốc lá...
- Nhánh củ: họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên...

- Đoạn mầm: măng tây...



Hình 4.4. Tái sinh chồi bất định và nhân giống *in vitro* cây *Hylothelephium sieboldii*. A: Chồi bất định. B: Cây *in vitro* hoàn chỉnh.

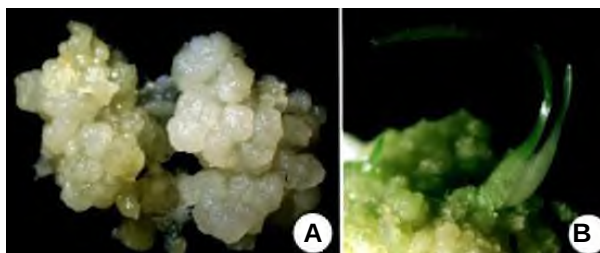
Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô (parenchyma cells) nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh (meristemoids) phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế bào đơn. Tuy nhiên, chiều hướng phản ứng của thực vật cũng tùy thuộc vào nồng độ phytohormone. Nghiên cứu sự tạo chồi ở mô nuôi cấy của cây linh sam Douglas cho thấy cytokinin (BAP 5 μM) cần thiết cho sự phát sinh chồi bất định, nhưng có ba kiểu phản ứng khác nhau có kết quả tùy thuộc vào nồng độ của auxin được cung cấp. Nồng độ auxin thấp (NAA 5 μM) chỉ có chồi phát triển. Khi nồng độ auxin cao hơn (NAA 5 μM) lá mầm tạo ra cả callus và nhiều chồi. Khi cung cấp chỉ riêng auxin (NAA = 5 μM) thì chỉ có callus được tạo thành.

Sự phát triển các chồi bất định gián tiếp đầu tiên qua giai đoạn hình thành callus cơ sở (basal callus) từ các chồi được tách trong nuôi cấy. Các chồi sau đó phát triển từ ngoại vi mô callus và không có quan hệ ban đầu với các mô có mạch dẫn (vascular tissue) của mẫu vật.

2.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus

Trong khuôn khổ của mục đích nhân giống *in vitro* nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền.

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay mà phát triển thành khối callus (Hình 4.5).



Hình 4.5. Callus (A) và tái sinh chồi từ callus (B) của chi *Lilium*

Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất. Thông qua giai đoạn callus còn có thể thu được những cá thể sạch virus như trường hợp của Kehr và Sehaffer (1976) thu được ở tỏi.

2.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính-công nghệ hạt nhân tạo

2.3.1. Phôi vô tính

Một phương thức nhân giống vô tính nữa là tạo phôi vô tính từ tế bào callus. Năm 1958, Street và Reinert là hai tác giả đầu tiên mô tả sự hình thành phôi vô tính từ các tế bào đơn của cà rốt (*Daucus carota*). Đến năm 1977, Murashige cho rằng phôi vô tính có thể trở thành một biện pháp nhân giống *in vitro*. Ở một số loài, sự phát sinh phôi vô tính hình thành trực tiếp từ những phôi bất định (adventitious embryos) nằm trong phôi tâm (nucellar embryos). Đến nay, công nghệ phôi vô tính được coi là công nghệ rất có triển vọng cho nông nghiệp trong thế kỷ 21.

Phôi vô tính là các cá thể nhân giống (propagules) có cực tính bất nguồn từ các tế bào soma (Hình 4.6 và 4.7). Chúng rất giống phôi hữu tính (zygotic embryo) ở hình thái, quá trình phát triển và sinh lý, nhưng do không phải là sản phẩm của sự thụ tinh giữa giao tử đực và giao tử cái, và vì vậy không có quá trình tái tổ hợp di truyền (genetic recombination), các

phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra chúng.

Ở trường hợp phôi hữu tính, sự kết hợp giao tử đực và cái cho ra hợp tử (zygote). Hợp tử phân chia nhiều lần tạo nên phôi hữu tính có cấu trúc hai cực: rễ và ngọn. Khi hợp tử phát triển, miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn cùng phát triển và cuối cùng tạo thành cây hoàn chỉnh, qua các giai đoạn phôi học như sau:

- Trường hợp cây hai lá mầm:

Dạng cầu dạng thủy lô dạng có lá mầm

- Trường hợp cây một lá mầm:

Dạng cầu dạng scutellar dạng diệp tiêu

Hình 4.6. Các phôi vô tính (A) và cây mầm phát sinh từ phôi vô tính (B)



Hình 4.7. Phôi vô tính của chuối (A) và nuôi cấy phát triển phôi vô tính (B)

Bảng 4.1. Một số cây trồng có giá trị kinh tế được nhân giống bằng phương thức phát sinh phôi vô tính *in vitro*

Stt	Tên khoa học	Tác giả
1	<i>Citrus</i>	Stevenson (1966), Rangan <i>et al.</i> (1968), Jumin <i>et al.</i> (1996)
2	<i>Theobroma cacao</i>	Litz (1986), Alemanno <i>et al.</i> (1996)
3	<i>Coffea arabica</i>	Sondahl and Sharp (1977), Boxtel <i>et al.</i> (1996)
4	<i>Coffea canephora</i>	Berthouly <i>et al.</i> (1996), Boxtel <i>et al.</i> (1996)
5	<i>Hevea brasiliensis</i>	Carron and Enjalsic (1985)
6	<i>C. cogiensis</i> <i>C. canephora</i>	Boxtel <i>et al.</i> (1996)
7	<i>Eugenia</i>	Litz (1984)
8	<i>Camellia sinensis</i>	Ponsamuel <i>et al.</i> (1996)
9	<i>Medicago suffruticosa</i>	Li <i>et al.</i> (1996)
10	<i>Saccharum officinarum</i>	Aftab <i>et al.</i> (1996)
11	<i>Docynia indica</i>	Litz (1985)
12	<i>Malus domestica</i>	Eichholtz (1979)
13	<i>Picea sitchensis</i>	Moorhouse <i>et al.</i> (1996)
14	<i>Mangifera indica</i>	Litz (1982), Pliego-Alfaro <i>et al.</i> (1996)

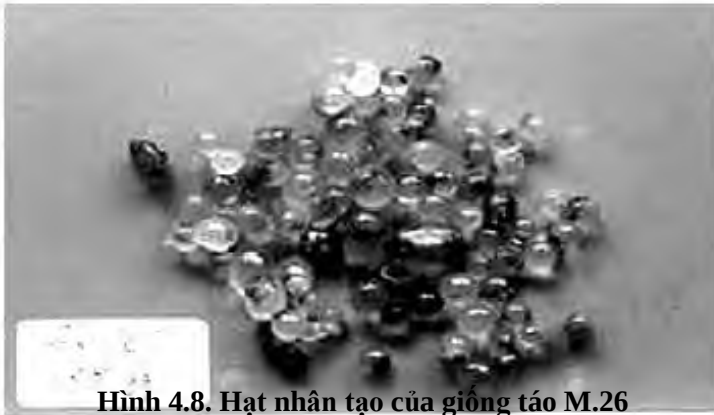
Ở rất nhiều cây, người ta nhận thấy các tế bào đang phân chia vô tổ chức đã tạo nên callus khi nuôi cấy. Có thể thay đổi hướng phát triển của chúng để tạo ra các phôi vô tính với các bước phát sinh hình thái rất giống với trường hợp phôi hữu tính. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi

vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Sự khác nhau này không chỉ đáng chú ý về mặt khoa học mà còn là một yếu tố rất quan trọng trong công nghệ phôi vô tính.

Khả năng tạo phôi vô tính trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các điều kiện vật lý, hóa học thuận lợi cho sự tạo phôi, còn phụ thuộc rất lớn vào loài, vào các giống (cultivars), dòng (strains) trong cùng một loài. Khả năng này được chứng minh là do một hoặc một vài gen phụ trách. Vì vậy, bằng biện pháp lai tạo có thể chuyển khả năng tạo phôi vô tính cao từ cây này qua cây khác.

2.3.2. Công nghệ hạt nhân tạo

Hạt nhân tạo (artificial seed hoặc synthetic seed) là phôi vô tính bọc trong một lớp vỏ polymer như agar, agarose, alginate... Trong cấu trúc lưới của các lớp vỏ đó, nước, chất dinh dưỡng và chất sinh trưởng được cung cấp thay cho nội nhũ, giúp cho phôi vô tính có thể nảy mầm trở thành cây hoàn chỉnh (Hình 4.8).



Hình 4.8. Hạt nhân tạo của giống táo M.26

Trong việc thu nhận các hạt nhân tạo thông qua phôi vô tính từ nuôi cấy dịch lỏng, thì nội phản ứng sinh học (bioreactor) là thiết bị không thể thay thế được.

Do phôi vô tính cũng có thể nảy mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh, nên kỹ thuật hạt nhân tạo đã được nghiên cứu và ứng dụng thành công ở nhiều nước. Hạt nhân tạo gồm có ba phần:

- Phôi vô tính

- Vỏ bọc polymer (alginate)
- Màng ngoài (calcium alginate)

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phôi vô tính, trong đó alginate được coi là tốt nhất. Alginate là một polymer sinh học, được chiết từ rong biển mà chủ yếu là các loài thuộc chi *Sargassum*. Aliginat do các phân tử manuronic acid gắn với nhau tạo thành, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose. Đặc điểm quan trọng nhất của alginate là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị một (monovalent) như: Na^+ , K^+ , $\text{NH}_4 \dots$ và lập tức chuyển sang dạng không tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị hai (divalent) hoặc đa hóa trị (polyvalent) như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Al}^{3+}, \dots$ Nếu nhỏ một giọt dung dịch sodium alginate vào dung dịch CaCl_2 thì sodium alginate ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành calcium alginate và tạo nên một màng không thấm nước hình thành các viên alginate.

2.3.3. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học

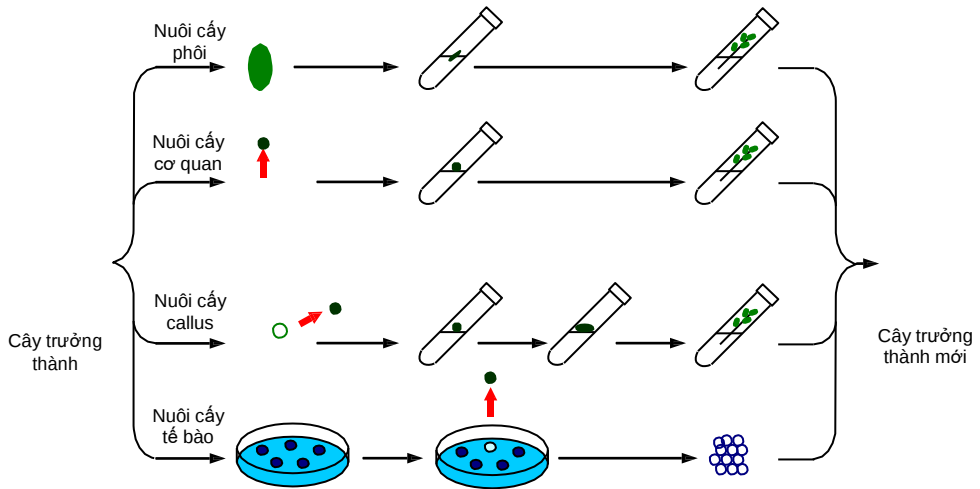
Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là bình lên men (fermenter) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

Phôi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2-4 lít. Nồi vận hành theo các nguyên tắc của một bình lên men (có thể không dùng cánh khuấy mà chỉ dùng bọt khí để thực hiện việc sục khí và truyền nhiệt). Mỗi mẻ có thể thu được 4-5 triệu phôi vô tính cà phê. Ở Indonesia, cụm chồi dừa được đưa vào sản xuất thành công với bình lên men 10 lít. Điểm đáng chú ý trong công nghệ này là thay vì bơm khí vào nồi phản ứng, dịch lỏng nuôi cấy (môi trường mới) được bơm vào nồi và hút ra (môi trường cũ) theo chu kỳ ngắn, nhờ vậy mô và tế bào thực vật có đủ oxy và chất dinh dưỡng để phát triển mạnh. Phương thức nuôi cấy này được gọi là nuôi cấy thể ổn định hóa tính (chemostat culture).

Củ siêu bi (microtuber) được thị trường quốc tế công nhận là dạng khoai tây giống của thế kỷ 21. Củ khoai tây siêu bi có kích thước bằng hoặc nhỏ hơn hạt ngô, hoàn toàn sạch bệnh virus được công ty Microtuber Inc. (Mỹ) sản xuất trong các nồi phản ứng là các đoạn thân khoai tây nhân giống

bằng nuôi cấy mô theo phương pháp kinh điển. Trong nồi phản ứng, các đoạn thân được kích thích ra rễ và tạo củ nhỏ. Hiện nay, Microtuber Inc. có thị trường ở Bắc Mỹ và Hà Lan. Nồi phản ứng ở hãng Microtuber Inc. là các ống nhựa kín chịu nhiệt, đường kính 15 cm, dài 50 cm, quá trình tạo củ hoàn toàn không cần chiếu sáng.

Hình 4.9 mô tả các phương thức phổ biến để phát triển cây hoàn chỉnh trong nhân giống *in vitro*.



Hình 4.9. Các phương thức tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*

3. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính *in vitro*

Quy trình nhân giống vô tính *in vitro* được thực hiện theo ba (hoặc bốn) giai đoạn tùy theo cách phân chia của từng tác giả:

- Cấy gây
- Nhân nhanh
- Chuẩn bị và đưa ra ngoài đất

3.1. Giai đoạn I-cấy gây

Đưa mẫu vật từ bên ngoài vào nuôi cấy vô trùng phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Tỷ lệ nhiễm thấp

- Tỷ lệ sống cao
- Tốc độ sinh trưởng nhanh

Kết quả bước cấy gây này phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy mẫu. Quan trọng nhất vẫn là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, sau đó là đoạn hoa tự, hoa, đoạn thân, mảnh lá, rễ...

Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ cho tỷ lệ sống cao và môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt được tốc độ sinh trưởng nhanh.

Một số dạng môi trường dinh dưỡng phổ biến:

- Muối khoáng: Theo White (1943), Heller (1953), Murashige và Skoog (1962) (Bảng 4.2).

- Chất hữu cơ:

- + Đường saccharose 1-6 %.
- + Vitamin: B1, B6, *myo*-inositol, nicotinic acid.
- + Amino acid: Arg, Asp, Asp-NH₂, Glu, Glu-NH₂, Tyr.
- + Phytohormone:
 - Nhóm auxin: IAA, IBA, NAA, 2,4-D...
 - Nhóm cytokinin: BAP, kinetin, 2-iP, zeatin...
 - Nhóm gibberellin: GA₃.

Tùy theo từng loài, từng bộ phận nuôi cấy và từng mục đích nuôi cấy mà bổ sung các hàm lượng và thành phần phytohormone khác nhau.

3.2. Giai đoạn II-nhân nhanh

Ở giai đoạn này người ta mới kích thích tạo cơ quan phụ hoặc các cấu trúc khác mà từ đó cây hoàn chỉnh có thể phát sinh. Những khả năng tạo cây đó là:

- Phát triển chồi nách
- Tạo phôi vô tính
- Tạo đỉnh sinh trưởng mới

Trong giai đoạn này cần nghiên cứu các tác nhân kích thích phân hóa cơ quan, đặc biệt là chồi như:

Bảng 4.2. Thành phần môi trường Murashige và Skoog (1962)

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. Các nguyên tố đa lượng</i>		FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170		
KNO ₃	1900	<i>3. Nguồn carbon</i>	
NH ₄ NO ₃	1650	Sucrose	30000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		
<i>2. Các nguyên tố vi lượng</i>		<i>4. Phụ gia hữu cơ</i>	
H ₃ BO ₃	6,2	- Các vitamin	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Thiamine.HCl	0,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Pyridoxine.HCl	0,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Nicotinic acid	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	myo-inositol	100
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	- Các chất khác	
KI	0,83	Glycine	2

- Bổ sung tổ hợp phytohormone mới (tăng cytokinin giảm auxin). Tăng tỷ lệ auxin/cytokinin sẽ kích thích mô nuôi cấy tạo rễ và ngược lại sẽ kích thích phát sinh chồi.

- Tăng cường thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, tối thiểu 1.000 lux. Trong thực tế nghiên cứu, người ta nhận thấy khó tách biệt ảnh hưởng của chu kỳ chiếu sáng khỏi ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng. Ánh sáng tím là thành phần quan trọng kích thích phân hóa mạnh. Ánh sáng đỏ có ảnh hưởng giống cytokinin (cytokinin-like effect), nó tạo nên sự tích lũy cytokinin trong mô của một số loài, chính lượng cytokinin này đã góp phần

kích thích quá trình phát sinh cơ quan và tạo chồi từ những mô nuôi cấy *in vitro*.

- Bảo đảm chế độ nhiệt độ trong khoảng 20-30°C. Trường hợp những loài có nguồn gốc nhiệt đới, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp vào khoảng từ 32-35°C. Ngược lại, đối với những loài hoa ở vùng ôn đới nhiệt độ thích hợp cho quá trình tạo cụm chồi phải 30°C.

Mục tiêu quan trọng nhất của giai đoạn này là xác định được phương thức nhân nhanh nhất bằng môi trường dinh dưỡng và điều kiện khí hậu tối thích.

3.3. Giai đoạn III-chuẩn bị và đưa ra ngoài đất

Đây là giai đoạn quan trọng bao gồm việc tạo rễ, huấn luyện thích nghi với thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn. Giai đoạn này thường bị bỏ qua một cách thiếu căn cứ.

Các nghiên cứu về cấu trúc của lá khoai tây nuôi cấy *in vitro* và so sánh với lá cây khoai tây trồng bên ngoài cho thấy chúng rất khác nhau. Điều đó chứng tỏ phải tiến hành thích nghi dần dần cây nhân giống *in vitro* với điều kiện tự nhiên. Quá trình thích nghi ở đây phải được hiểu là quá trình thay đổi những đặc điểm sinh lý và giải phẫu của bản thân cây non đó. Thời gian tối thiểu cho sự thích nghi là 2-3 tuần, trong thời gian này cây phải được chăm sóc và bảo vệ trước những yếu tố bất lợi sau:

- Mất nước nhanh làm cho cây bị héo khô.
- Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng thối nhũn.
- Cháy lá do nắng.

4. Nhân giống *in vitro* và việc sử dụng giống ưu thế lai

Trong chăn nuôi, việc sử dụng giống vật nuôi mang ưu thế lai ở thế hệ F₁ đã trở thành biện pháp tăng năng suất quan trọng bậc nhất.

Ở ngành trồng trọt, giống ưu thế lai mới chỉ được ứng dụng ở một số đối tượng như: ngô, cà chua, lúa, cải dầu, bắp cải, hành tây, măng tây, và đặc biệt là các giống hoa...

Sử dụng ưu thế lai không những làm tăng năng suất từ 20-40%, mà giống lai còn có đặc điểm là rất đồng đều so với giống bố mẹ. Tính đồng đều của giống là tiền đề quan trọng cho sản xuất theo phương thức công nghiệp. Ở súp-lơ chẳng hạn, phương thức sản xuất công nghiệp đòi hỏi phải thu hoạch toàn bộ diện tích bằng cơ giới vào một thời điểm. Điều này chỉ được thực hiện khi sử dụng giống ưu thế lai F_1 . Nếu dùng giống thuần chủng theo phương thức tự phối thì không đảm bảo, vì ở các giống rau họ cải (Brassicaceae) thường xuất hiện hiện tượng bất tự thụ. Vì vậy, phương pháp nhân giống và bảo quản giống trong ống nghiệm đối với một số giống rau và giống hoa có một ý nghĩa kinh tế cao.

Vấn đề đặt ra hiện nay là phải nghiên cứu các quy trình nhân giống *in vitro* tối ưu cho từng loài cây trồng và cải tiến quy trình đó để giảm tới mức đối đa các tổn kém về nhân công lao động trong các công đoạn nuôi cấy và đưa cây con ra ngoài đất.

5. Nhân giống *in vitro* và các đặc điểm không di truyền

Bên cạnh những đặc điểm di truyền ở thực vật người ta còn phát hiện được hàng loạt đặc điểm (hình thái và sinh lý) không di truyền, đó là các đặc điểm epigenetic. Quá trình nhân giống *in vitro* có ảnh hưởng tới các đặc điểm không di truyền này.

5.1. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic được lưu lại

Nghiên cứu nhân giống vô tính về cây *Phyllanthus amarys* (cây chó đẻ) cho thấy:

Phyllanthus là một loại cây cỏ có thân thẳng đứng và cành ngang giống lá kép nhưng lại ở nách lá và có hoa cho nên vẫn tạm coi như cành ngang. Lá ở thân đứng xếp theo kiểu xoắn ốc, nhưng ở cành ngang là tương đối so le.

Ở nách lá có cành ngang, chồi nách phát triển mạnh thành cành thẳng đứng như thân. Nếu cắt cành ngang để ươm thì sẽ thu được cành ngang dài hàng mét. Cành ngang phát triển vô hạn theo một chương trình “ngang” định trước. Nếu ươm cành thẳng thì sẽ thu được cây thẳng đứng. Như vậy, mô phân sinh của cành khác mô phân sinh của thân và khi nhân giống vô tính các bộ phận khác nhau sẽ thu được các dạng cây khác nhau. Ở đây mô

phân sinh đỉnh điều khiển mô phân sinh cành phát triển theo hướng ngang. Nếu cắt bỏ mô phân sinh đỉnh sớm thì cành ngang sẽ phát triển thành cành đứng.

Tế bào sinh trưởng đỉnh (organisator) điều khiển sự hoạt động của các tế bào khác (tương tự như ở động vật). Hiện tượng điều khiển hướng phát triển này có một ý nghĩa thực tiễn rất lớn.

Các cây cà phê và ca cao cùng có đặc điểm xếp cành tương tự như vậy, do đó khi tiến hành nhân giống vô tính các loài cây này phải chú ý đến hiện tượng điều khiển hướng phát triển như ở *Phyllanthus*.

5.2. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic không lưu lại

Nhân giống vô tính *in vitro* giống dừa Cayen không gai thông qua phân chia protocorm người ta thu được một tỷ lệ đáng kể các cá thể có gai.

Bình thường trong kỹ thuật trồng dừa người ta sử dụng hom dừa có kích thước khá lớn 15-30 cm. Đặc điểm không gai đã được chương trình hóa trong các đợt có kích thước lớn như vậy và vườn dừa trồng như vậy đều không có gai. Vì sao khi tách đỉnh sinh trưởng và nuôi cấy thành protocorm và cây dừa non thì gai lại xuất hiện.

Có thể ở giai đoạn sinh lý sớm của protocorm và quá trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng phân lập, mô phân sinh của những cây dừa non tương lai đã được giải phóng một phần khỏi ảnh hưởng của tổ chức điều khiển và vì thế chúng phát triển tự do theo đặc điểm có gai của thế hệ xa xưa. Hiện tượng tương tự chúng ta cũng bắt gặp ở trường hợp cây cam không gai. Khi gieo hạt hoặc nuôi cấy phôi vô tính từ mô phôi tâm sẽ thu được những cá thể có gai.

Hiện nay, vấn đề này đang được quan tâm vì một số đặc tính chống chịu như chịu mặn, chịu bệnh, chịu lạnh vẫn thường là những đặc tính epigenetic và liệu thông qua nhân giống *in vitro* các đặc tính đó có còn được giữ lại hay không.

III. Các kỹ thuật chuyển gen ở thực vật

Chuyển gen là kỹ thuật sử dụng DNA tinh khiết để đưa vào cơ thể hay tế bào khác và theo dõi biểu hiện của thông tin di truyền mới này. Để chuyển gen vào tế bào vật chủ một cách hiệu quả, các cấu trúc di truyền cần

được thiết kế thích hợp cho sự hợp nhất và biểu hiện của các gen ngoại lai. Cấu trúc di truyền phải mang một gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker gene: gen mã hóa một protein khử độc của hóa chất bổ sung trong môi trường nuôi cấy, cho phép sinh trưởng ưu tiên của các tế bào có DNA ngoại lai được hợp nhất) hoặc sàng lọc (screenable marker gene: gen mã hóa một protein cho kết quả trong sản phẩm sống sót nhờ đó có thể xác định tế bào biến nạp thể hiện gen) để nhận biết hiệu quả chuyển gen.

Một cấu trúc di truyền cơ bản bao gồm: trình tự khởi động (promoter), gen mã hóa (coding gene hay còn gọi là gen cấu trúc-structure gene) và trình tự kết thúc (terminator). Các gen mã hóa có thể được đưa vào mô thực vật nhờ vào các plasmid vector. Hai promoter chủ yếu thường được sử dụng cho biến nạp gen ở thực vật là: promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus) thích hợp cho sự biểu hiện của DNA ngoại lai ở cây hai lá mầm và promoter ubiquitin của ngô thích hợp cho sự biểu hiện mạnh của DNA ngoại lai ở cây một lá mầm.

Các mẫu vật (các bộ phận của cây hoặc mô) thích hợp nhất cho chuyển gen là những mẫu vật đòi hỏi thời gian nuôi cấy trước và sau khi chuyển gen ngắn nhất. Nhiều nghiên cứu cho thấy thời gian kéo dài của mô nuôi cấy thường tạo ra các đột biến di truyền làm mất khả năng tái sinh của các cây được chuyển gen. Các mẫu vật được sử dụng trong chuyển gen thường là: protoplast, phôi non hoặc callus có nguồn gốc từ hạt (lúa mì), các mô nuôi cấy phát sinh cụm chồi, trụ phôi (có nguồn gốc từ các hạt non hoặc hạt già), và mô phân sinh ở cây hai lá mầm (legumes, bông...). Trong một số trường hợp, chuyển gen thông qua nuôi cấy phát sinh phôi (embryogenic culture) cũng có thể thực hiện được, chẳng hạn ở các loài tùng bách, các loài cây ăn quả và một số loài khác.

Các phương pháp chuyển gen có thể bị hoặc không bị giới hạn bởi các genotype khác nhau của thực vật. Tùy thuộc vào mục đích ứng dụng, có thể thiết kế các phương thức chuyển nạp thích hợp cho từng genotype. Trong những nghiên cứu cơ bản, người ta thường tập trung tìm hiểu về cấu trúc và chức năng của các gen chuyển nạp, khảo sát các promoter và các cơ chế phân tử ở thực vật để có thể chuyển gen thành công vào các loài khác nhau. Các thí nghiệm chuyển gen đầu tiên đã sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để đưa vào cây thuốc lá các gen kháng kháng sinh. *Agrobacterium* là vật truyền hữu hiệu để đưa các DNA ngoại lai vào trong các loài thuộc họ cà

(Solanaceae), nhưng ở một số cây trồng khác quan trọng hơn việc sử dụng nó còn gặp nhiều hạn chế. Trở ngại lớn nhất là tính đặc trưng vật chủ của *Agrobacterium*, mặc dù những tiến bộ gần đây đã cho phép ứng dụng thành công trên một số giống cây trồng. Sự phát triển của các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ callus và protoplast đã mở ra một hướng mới cho công nghệ di truyền thực vật thông qua các phương pháp chuyển gen trực tiếp. Nhờ sự phát triển của phương pháp bắn gen-dựa trên cơ sở tăng gia tốc của các hạt kim loại nặng mang nguyên liệu di truyền vào trong mô thực vật-việc chuyển gen ở các loài cây trồng đã gặp nhiều thuận lợi hơn. Các phương pháp chuyển nạp khác cũng có hiệu quả đối với từng trường hợp đặc biệt, nhưng khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng bị hạn chế. Chẳng hạn, phương pháp chuyển gen vào tế bào bằng xung điện (electroporation), phương pháp xử lý hóa học bằng PEG (polyethylene glycol), phương pháp vi tiêm (microinjection) đưa DNA ngoại lai trực tiếp vào tế bào, phương pháp dùng silicon carbide lắc với tế bào có tác dụng như các mũi kim nhỏ giúp DNA bên ngoài xâm nhập vào bên trong tế bào, phương pháp siêu âm, phương pháp chuyển gen qua ống phần...

Mặc dù hiện nay việc chuyển gen đã được tiến hành ở nhiều loài nhưng vẫn còn gặp nhiều khó khăn, chủ yếu ở các quá trình thao tác. Hai nhân tố then chốt thúc đẩy sự phát triển của công nghệ gen ở thực vật bậc cao là: các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ những tế bào chuyển nạp và các phương pháp đưa DNA ngoại lai vào các loài thực vật khác nhau. Muốn chuyển một gen thành công cần phải chứng minh hiệu quả của phương pháp chuyển nạp, nhưng đôi khi các loài được nghiên cứu hoặc không thể tái sinh được cây từ các mô không phân hóa, hoặc có thể tái sinh nhưng sau đó khó phát triển thành cây hoàn chỉnh. Do đó, hai nhân tố nói trên thường được nghiên cứu phát triển song song. Có nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau ở thực vật, nhưng ở đây chỉ trình bày một vài phương pháp chủ yếu:

1. Chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium*

1.1. Vi khuẩn *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens *Agrobacterium rhizogenes*

. *A. tumefaciens* có chứa

tumefaciens

được do *A. tumefaciens* -plasmid (T-DNA)
xâm nhập vào hệ gen của cây bị bệnh.

1.2. Ti-plasmid

- đó là các
. Ở vi kh -

Các plasmid của *Agrobacterium* được sử dụng vào công nghệ gen thực vật ở hai dạng vector *cis* và *trans*. Đây là hai dạng vector rất thuận lợi để tái tổ hợp gen ngoại lai và chuyển vào tế bào thực vật. Dạng *cis* chỉ sử dụng Ti-plasmid và tế bào vật chủ là *Agrobacterium tumefaciens* mà không có sự tham gia của các plasmid và vi khuẩn khác. Vùng T-DNA của Ti-plasmid được thiết kế lại để gắn những gen ngoại lai mong muốn, các phần còn lại của Ti-plasmid vẫn được giữ nguyên. *Agrobacterium tumefaciens* được dùng làm tế bào vật chủ để nhân lên nhiều bản sao của Ti-plasmid và chuyển gen. Dạng *trans* hay *binary* là dạng sử dụng hai hay nhiều loại plasmid và vi khuẩn cùng lúc, ví dụ: vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium*, plasmid trong trường hợp này thích ứng với cả *E. coli* và *Agrobacterium*. Trước tiên, plasmid của *E. coli* chứa đoạn T-DNA được giới hạn bởi bờ phải (right border-RB) và bờ trái (left border-LB) mang gen ngoại lai được thiết kế và nhân lên trong vi khuẩn *E. coli*. Tiếp đến plasmid mang gen ngoại lai được chuyển nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* nhờ một helper plasmid thực hiện sự tiếp hợp thông qua quá trình giao phối bộ ba (triparental mating). Vi khuẩn *Agrobacterium* đã mang sẵn một loại plasmid khác chứa vùng vir (virulence region) có chức năng quan trọng trong quá trình chuyển gen ngoại lai. Sự tồn tại song song hai plasmid này đã tương tác lẫn nhau trong việc chuyển gen vào tế bào thực vật. Như vậy, gen ngoại lai và vùng DNA

giúp quá trình chuyển gen (vùng *vir*) không nằm trên cùng một plasmid nên hệ chuyển gen này được gọi là hệ *trans*.

1.3. Vùng T-DNA

Trong Ti-plasmid, vị trí của T-DNA, opine, cytokinin, và auxin.

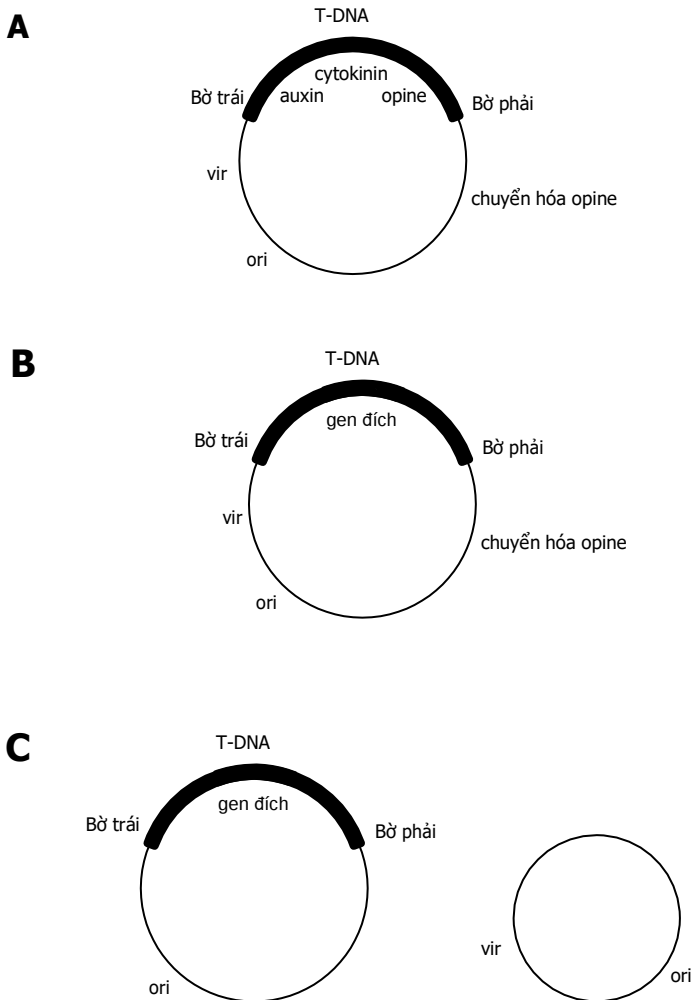
(vùng *vir*)

(Hình 4.10).

Trong các vùng DNA của Ti-plasmid, ngoài T-DNA, được nghiên cứu nhiều hơn cả là vùng DNA phụ trách khả năng lây nhiễm còn gọi là vùng *vir*. Sản phẩm hoạt động của các gen nằm trong vùng *vir* dưới tác động kích thích của các hợp chất phenol tiết ra từ vết thương là một loạt các protein đặc hiệu như *virE2*, *virB*, *virD*, *virD2*, *virC1*... Các protein này nhận biết các vết thương ở các cây chủ thích hợp (hầu hết là cây hai lá mầm), kích thích sản sinh ra các đoạn T-DNA, bao bọc che chở các đoạn DNA này và giúp chúng tiếp cận với hệ gen của cây chủ một cách an toàn.

Khi cây nhiễm *A. tumefaciens*, do T-DNA nạp vào trong hệ gen của cây chủ bắt đầu hoạt động và sản sinh ra auxin, cytokinin và opine, toàn bộ sinh trưởng của cây bị rối loạn, các tế bào phân chia vô tổ chức và tạo ra các khối u. Opine được vi khuẩn sử dụng như một loại “thức ăn” nhờ gen chuyển hóa opine trên Ti-plasmid. Cơ chế lây nhiễm của *A. rhizogenes* đối với cây hai lá mầm cũng tương tự, nhưng trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản sinh ra auxin, vì thế sự thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rất nhiều rễ tơ (hairy roots) khi bị nhiễm bệnh.

Trên thực tế bệnh cây, *Agrobacterium* chỉ gây hại ở cây hai lá mầm, vì vậy người ta cho rằng chúng chỉ có thể đưa T-DNA vào hệ gen các cây hai lá mầm. Gần đây, nhiều tác giả đã chứng minh khi nhiễm vi khuẩn, các cây một lá mầm cũng có thể sản xuất opine và có thể khai thác khả năng biến nạp gen của *Agrobacterium* vào cây một lá mầm.



Hình 4.10. Bản đồ của các dạng Ti-plasmid. A: dạng tự nhiên ban đầu, B: dạng *cis*, C: dạng *trans*.

1.4. Chuyển DNA ngoại lai vào tế bào và mô thực vật nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Cơ chế gây bệnh của các *Agrobacterium* là sau khi xâm nhiễm vào tế bào, chúng gắn đoạn T-DNA vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật, dẫn đến sự rối loạn các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra khối u (trường hợp A.

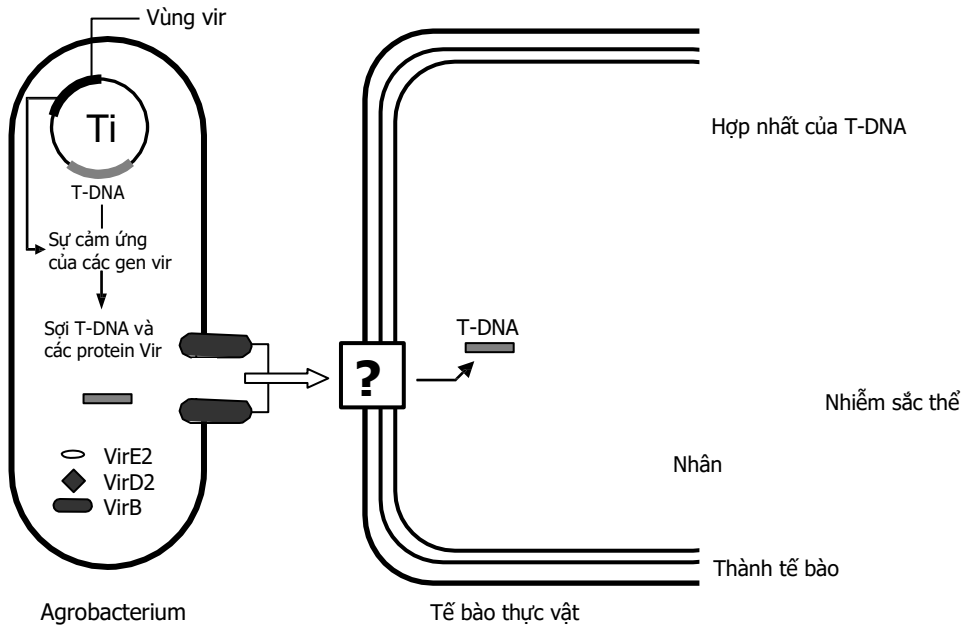
tumefaciens) hoặc rễ tơ (trường hợp *A. rhizogenes*). Khả năng chuyển gen này đã được khai thác để chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

Để gắn T-DNA vào tế bào thực vật, đầu tiên vi khuẩn *A. tumefaciens* phải tiếp xúc với thành tế bào thực vật bị tổn thương. Quá trình này được thực hiện nhờ các gen *chvA* và *chvB*. Gen *chvB* mã hóa một protein liên quan đến hình thành β -1,2 glucan mạch vòng, trong khi đó gen *chvA* xác định một protein vận chuyển, định vị ở màng trong của tế bào vi khuẩn. Protein vận chuyển giúp vận chuyển β -1,2 glucan vào khoảng giữa thành tế bào và màng sinh chất. β -1,2 glucan giữ vai trò quan trọng để vi khuẩn *Agrobacterium* tiếp xúc với thành tế bào thực vật. Nếu không có sự tiếp xúc này, sẽ không có sự dẫn truyền T-DNA.

Các sản phẩm protein của vùng *vir* có tác dụng cho việc dẫn truyền T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Các loại protein đó rất cần thiết cho quá trình cắt T-DNA khỏi Ti-plasmid, cảm ứng thay đổi màng tế bào thực vật mà chúng tiếp xúc, tham gia di chuyển phần T-DNA qua màng vi khuẩn tới tế bào chất của tế bào thực vật, vận chuyển tới nhân rồi cuối cùng xâm nhập vào genome của cây chủ.

Thực chất chỉ riêng T-DNA của Ti-plasmid được chuyển vào genome tế bào thực vật, mà không còn phần nào khác. Quá trình dẫn truyền chỉ do sản phẩm của các gen *vir* (vùng *vir*) và gen *chv* quyết định mà không liên quan đến các gen khác trên T-DNA. Tuy nhiên, chuỗi DNA 25 bp (RB và LB của T-DNA) có vai trò là vị trí cảm ứng cho các sản phẩm của tổ hợp các gen vùng *vir*, đặc biệt là protein từ gen *virE* mang chúng dẫn truyền vào tế bào thực vật. Chúng hoạt động như các tín hiệu nhận biết và khởi động quá trình dẫn truyền. Trước hết gen *virA* trong tổ hợp gen vùng *vir* được phosphoryl hóa nhờ tác động của các hợp chất phenol như acetosyringone giải phóng ra từ các tế bào thực vật tổn thương. Sản phẩm của quá trình này lại tiếp tục phosphoryl hóa gen *virG*. Sản phẩm của gen *virG* liên tiếp làm hoạt hóa toàn bộ các gen *vir* còn lại, mà hai gen cuối cùng được hoạt hóa là gen *virB* và *virE*. Trước đó, khi gen *virD* được hoạt hóa, sản phẩm của nó cảm ứng nhận biết RB và LB của T-DNA và làm đứt phần T-DNA ra khỏi DNA của Ti-plasmid thành các sợi đơn. Đồng thời quá trình phosphoryl hóa này cũng làm thay đổi thẩm xuất màng tế bào thực vật, màng tế bào bị mềm ra và bị thủng. Các sợi đơn T-DNA được gắn vào protein do gen *virE* tổng

hợp và dịch chuyển về phía màng tế bào vi khuẩn. Ngay sau đó, sợi T-DNA được trượt từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Cầu nối chính là sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào do cảm ứng sản phẩm gen *virB* mà thành. Khi T-DNA đã được chuyển giao vào tế bào thực vật, chúng nhanh chóng hợp nhất (integration) trong genome tế bào thực vật được ổn định và di truyền như các gen bình thường khác (Hình 4.11).



Hình 4.11. Phương thức chuyển T-DNA vào genome của thực vật

2. Các gen chỉ thị chọn lọc và gen chỉ thị sàng lọc

(herbicide). Các gen chỉ thị sàng lọc thường được sử dụng là các gen β -glucuronidase (*gusA*), luciferase và gần đây hơn là gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescent) của sữa.

Bằng các phương pháp sinh học phân tử có thể tạo ra các cấu trúc DNA plasmid, trong đó ngoài các promoter, các gen của vi khuẩn *Agrobacterium* giúp cho DNA plasmid gắn được vào bộ gen thực vật, gen ngoại lai cần chuyển vào... còn có các gen giúp phân lập ra tế bào hoặc mô

Gen chỉ thị chọn lọc thường dùng nhất là các gen mã hóa cho một số enzyme chỉ có trong vi khuẩn ở điều kiện tự nhiên mà không có trong giới thực vật. Sau khi chuyển gen, nếu thấy enzyme vi khuẩn hoạt động thì có thể suy ra là toàn bộ DNA plasmid đã được gắn vào bộ gen của thực vật và gen ngoại lai mà ta cần chuyển đã trở thành một bộ phận của bộ máy di truyền thực vật.

Các gen chỉ thị thường dùng nhất là các gen: *gus A*, *npt II*, *lux*, *cat*, *nos* và *bar* (Bảng 4.3).

- **Gen *npt II*.** Gen mã hóa cho neomycin phosphotransferase, đây là một enzyme vi sinh vật có khối lượng phân tử khoảng 25 kD, xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa một số kháng sinh gốc aminoglycoside như neomycin, kanamycin và G148. Trong phản ứng này, nhóm γ phosphate của ATP được gắn vào phân tử chất kháng sinh làm nó trở nên bất hoạt do ngăn trở sự liên kết của kháng sinh với ribosome.

- **Gen *bar*.** Gen *bar* phosphinothricin acetyltransferase (PAT),

và Basta. Gen *bar*
Streptomyces hygroscopicus
 _ *bar*

- **Gen *gus A*.** Gen mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme β -glucuronidase. β -glucuronidase là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải các β -glucuronide, sản phẩm phân giải có màu xanh chàm đặc trưng, dễ nhận biết. β -glucuronide thường dùng nhất trong phản ứng để nhận biết sự tồn tại của gen *gus A* là X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). Dung dịch X-Gluc không màu dưới tác động của enzyme β -glucuronidase sẽ chuyển sang màu xanh chàm.

- **Gen *lacZ*.** Gen mã hóa cho enzyme β -galactosidase có khối lượng phân tử 116 kD. Gen *lacZ* ở *E. coli* được dùng rất phổ biến trong công nghệ gen và đã có sẵn các hệ thống phương pháp kiểm tra rất nhạy với thuốc thử

X-Gal.

lac

lac

lac

.

A. Một số gen chỉ thị chọn lọc		
Ký hiệu gen		
<i>npt II</i>	Neomycin phosphotransferase	Kanamycin
<i>hyg</i>	Hygromycin phosphotransferase	Hygromycin
<i>gent</i>	Gentamycin acetyl transferase	Gentamycin
<i>aat</i>	Streptomycin phosphotransferase	Streptomycin
<i>bleo</i>		Bleomycin
<i>bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Phosphinothricin
<i>bxn</i>	Bromoxynil nitrilase	Bromoxynil
B. Một số gen chỉ thị sàng lọc		
Ký hiệu gen		
<i>gus A</i>	β -glucuronidase	X-Gluc X-
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	Gal Lumis
<i>luc</i>		Phos Lumi
<i>lux</i>		Phos
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	
<i>nos</i>	Nopaline synthase	Nopaline

- **Gen *cat*.** Được phân lập và tạo dòng từ dòng vi khuẩn Tn9, là gen gây khả năng kháng chloramphenicol ở vi khuẩn nói chung. Gen *cat* đã

được dùng rộng rãi trong công nghệ gen động vật và thực vật vì nó mã hóa cho enzyme chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Enzyme này xúc tác phản ứng acetyl hóa hai vị trí trên phân tử chloramphenicol và làm nó bất hoạt.

3. Chuyển gen bằng vi đạn

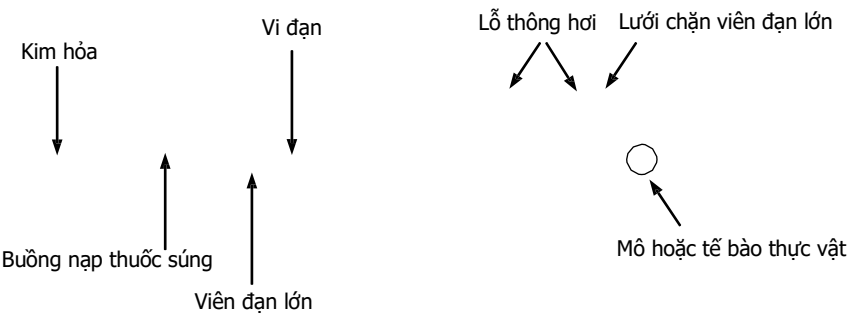
Đây là phương pháp hiện đang được sử dụng phổ biến tại các phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật ở trong nước và trên thế giới. Phương pháp này được đề xuất lần đầu tiên vào năm 1987, nguyên lý của nó là sử dụng các viên đạn có kích thước hiển vi, có tỷ trọng cao để đạt gia tốc cao xuyên qua vỏ và màng tế bào, đưa lớp DNA bọc ngoài tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào.

Hạt tungsten hoặc vàng có đường kính 1-1,5 µm được dùng làm vi đạn

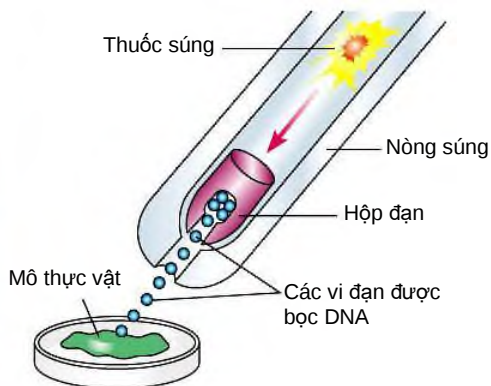
-0,8 cm. Đĩa

(gene —

thực



Hình 4.12. Sơ đồ súng bắn gen



Hình 4.13. Thao tác chuyển gen bằng phương thức đội bom

4. Các ứng dụng của công nghệ chuyển gen

4.1. Một số kết quả bước đầu

Ứng dụng của các kỹ thuật chuyển gen trong công nghệ sinh học thực vật có một tiềm năng rất lớn, vượt qua các tiến bộ kỹ thuật quan trọng trong cuộc cách mạng sản xuất nông nghiệp trước đây. Nó chỉ mất bốn năm cho sự phát triển thương mại các cây trồng chuyển gen ở Bắc Mỹ và đạt tới 52% đối với đậu tương, 30% với ngô, và 9% cho cả hai loại bông và canola (năm 1999) cùng với việc tăng sản lượng trên nhiều loại cây trồng chuyển gen khác như: lúa, lúa mì, lúa mạch, lúa miến, mía, củ cải đường, cà chua, khoai tây, hướng dương, đậu phộng, đu đủ, các loài cây gỗ và các loài cây hoa như cẩm chướng... Trong số 27,8 triệu hecta cây trồng chuyển gen được canh tác trong năm 1998, thì 74% được trồng ở Mỹ, 15% Argentina, 10% ở Canada và 1% ở Úc. Các tính trạng chuyển gen được tập trung chủ yếu là chống chịu chất diệt cỏ (71%), kháng côn trùng (28%) và 1% cho các tính trạng khác.

Các cây chuyển gen đang được thương mại hóa hiện nay là thế hệ đầu tiên của các cây trồng chuyển gen, và ba thế hệ cây trồng chuyển gen có thể được dự đoán trước là :

- **Thế hệ thứ nhất.** Các tính trạng sản xuất (ví dụ chống chịu chất diệt cỏ, kháng bệnh/côn trùng).

- **Thế hệ thứ hai.** Các gen xếp thành chồng cho nhiều tính trạng (ví dụ tổ hợp của các gen kháng bệnh cộng với các tính trạng chất lượng).

- **Thế hệ thứ ba.** Các tính trạng khác nhau được đáp ứng cho việc sử dụng đặc biệt cuối cùng (ví dụ thực phẩm, sợi, nhiên liệu, dầu nhòn, nhựa, dược phẩm và các nguyên liệu thô cho các quá trình công nghiệp).

Việc sản xuất các cây trồng chuyển gen thế hệ thứ hai đang tiến triển. Tuy nhiên, để hướng tới các lợi ích tiềm tàng của công nghệ sinh học thực vật chuyển gen, có nhiều nhân tố bổ sung cần xem xét bao gồm: sự kiểm soát công nghệ sinh học, sở hữu trí tuệ, an toàn thực phẩm, sự chấp nhận của cộng đồng, tính chất gây dị ứng, nhãn hiệu, sự chọn lựa, môi trường, sự phân biệt của các sản phẩm chuyển gen và mậu dịch quốc tế. Tầm quan trọng ở đây là việc ứng dụng và các lợi ích tiềm tàng của các kỹ thuật chuyển gen. Trong khi mọi kỹ thuật đang phát triển, thì mục đích cần đạt được là tối đa các lợi ích và giảm thiểu các rủi ro.

4

Trong những năm qua, các phương pháp chuyển gen ở thực vật bậc cao đã có rất nhiều tiến bộ. Hiện nay, các phòng thí nghiệm công nghệ gen đang bắt tay vào việc cải thiện có ý nghĩa cho một số loài cây trồng nhờ các công cụ của sinh học tế bào và sinh học phân tử. Trong một vài trường hợp đặc biệt (đậu tương, lúa, ngô và bông) các phương pháp chuyển gen bị giới hạn bởi genotype. Một số các cây trồng quan trọng cần thiết cho nhu cầu sử dụng của người dân ở các nước đang phát triển hiện ít được chú ý.

Công nghệ di truyền thực vật là một bước ngoặt quyết định. Một số cây trồng quan trọng đã được chuyển gen; một vài vấn đề kỹ thuật vẫn đang còn tồn tại, nhưng chúng đang dần dần được giải quyết. Để có kết quả cần phải thay đổi dần sang một phạm vi khác, như là phát hiện và tạo dòng các gen mang các tính trạng đa gen (multigenic traits). Một điều không thể quên là vấn đề nhận thức của xã hội và dự báo nguy cơ tác động xấu đến môi trường do các sản phẩm có nguồn gốc từ công nghệ DNA tái tổ hợp mang lại. Hiện nay, công nghệ chuyển gen đang được quan tâm hơn thông qua các quỹ tài trợ của các cơ quan quốc tế như là chương trình Rockefeller Foundation (Mỹ), và vấn đề đang được thảo luận nhiều là cần thiết xác định phương thức tốt nhất để chuyển các lợi ích do công nghệ chuyển gen mang lại đến các nước đang phát triển.

Cây chuyển gen đầu tiên thu được vào đầu thập niên 1980. Điều này cho phép nhận xét rằng mới chỉ hơn hai thập niên, các công cụ của công nghệ DNA tái tổ hợp và sinh học tế bào đã giúp ích rất nhiều cho các nhà tạo giống thực vật. Việc lựa chọn phương thức sử dụng các cây trồng thu được từ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể cung cấp thêm nguồn tài nguyên mới cho công nghiệp và người tiêu dùng, như vậy có thể mở rộng cơ sở kinh tế ở cả các nước công nghiệp lẫn các nước đang phát triển.

5. Công nghệ di truyền trong kháng chất diệt cỏ

Ước tính khoảng 10% tổng sản lượng lương thực hàng năm trên thế giới bị mất mát do cỏ dại, mặc dù đã tiêu tốn khoảng 10 tỷ USD và sử dụng trên 100 loại hóa chất khác nhau để diệt trừ. Hơn nữa, dùng thuốc diệt cỏ dại vẫn bị hạn chế vì nhiều loại thuốc không phân biệt được cỏ dại và cây trồng. Glyphosate (phosphonomethyl glycine) là một loại thuốc diệt được nhiều loại cỏ dại nhưng chúng cũng có thể làm chết cây trồng. Vì vậy, nếu tạo được các giống cây chuyển gen chống chịu được glyphosate thì nó sẽ được dùng phổ biến để diệt cỏ. Một trong những hướng nghiên cứu là chuyển gen sản xuất dư thừa 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphatase (EPSP), một enzyme bị ức chế bởi thuốc diệt cỏ glyphosate. Nghĩa là nếu cây sản xuất được nhiều enzyme EPSP chúng có thể chống chịu được glyphosate.

Chất diệt cỏ là phương pháp được chọn lựa để kiểm soát cỏ dại trong hầu hết các hệ thống nông nghiệp quy mô lớn. Chúng đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng sản lượng cây trồng bằng cách giảm thiểu sự cạnh tranh giữa cây trồng với cỏ dại về không gian, ánh sáng, nước và chất dinh dưỡng. Cỏ dại cũng có thể hoạt động như một nguồn cung cấp các tác nhân gây bệnh cho cây trồng.

Do các gen kháng chất diệt cỏ cũng là các gen chỉ thị chọn lọc hiệu quả trong trồng trọt, nên đây là tính trạng chuyển gen đầu tiên được sản xuất và thương mại hóa, và các thứ (variety) chống chịu chất diệt cỏ vẫn đang là các cây trồng chuyển gen sinh trưởng rộng rãi nhất.

Dựa trên cơ sở hoặc là sự biểu hiện của gen không mẫn cảm chất diệt cỏ, sự thoái biến của chất diệt cỏ hoặc sự biểu hiện mạnh của sản phẩm gen đích của chất diệt cỏ, mà tính kháng được chuyển gen thích hợp trong một phạm vi rộng các chất diệt cỏ như 2,4-D, glyphosate, glufosinate,

protoporphyrinogen oxidase inhibitors, imidazalonones, chlorsulfuron/sulfonylureas, bromoxynil, triazines và isoxazoles.

Hiện nay, có những bằng chứng tốt cho thấy chẳng những không tăng sử dụng của các chất diệt cỏ, mà sự điều chỉnh các cây trồng chuyển gen kháng chất diệt cỏ được cung cấp cho nông dân đã cho kết quả giảm sử dụng glyphosate tới 33% trên các giống đậu tương Roundup Ready, và giảm sử dụng glufosinate khoảng 20% đối với giống canola Liberty Link.

6. Công nghệ di truyền trong kháng sâu-bệnh

6.1. Kháng côn trùng

Sử dụng hóa chất để phòng trừ sâu bọ côn trùng vừa đắt tiền vừa tác động xấu đến môi trường. Các cây trồng như bông, ngô và khoai tây chuyển gen đang được sinh trưởng thương mại biểu hiện độc tố của *Bacillus thuringiensis* (Bt) để tạo ra tính kháng đối với các côn trùng nhóm nhai-nghiền (chewing insects). *B. thuringiensis* tổng hợp các protein δ -endotoxin tinh thể được mã hóa bởi các gen *Cry*. Khi côn trùng ăn vào bụng, các prototoxins bị đứt gãy trong dạ dày kiềm của côn trùng để tạo thành độc tố hoạt động. Các liên kết này tạo ra các receptor đặc trưng trong các tế bào biểu mô ruột làm thành các lỗ chân lông và cuối cùng là gây chết côn trùng. Một số ưu điểm của độc tố Bt như sau :

- Tính đặc hiệu, mỗi protein *Cry* chỉ hoạt động chống lại một hoặc một vài loài côn trùng.
- Sự đa dạng, nhiều protein *Cry* khác nhau đã được nhận biết.
- Các ảnh hưởng không bất lợi hoặc bị giảm đã được xác nhận trên các côn trùng không phải đích hoặc các địch thủ tự nhiên của côn trùng.
- Độc tính với động vật có vú là rất thấp.
- Có thể thoái biến dễ dàng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy điểm mấu chốt là gen chịu trách nhiệm tổng hợp protein tinh thể trừ sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* chủng *kurstaki*, chưa đặc biệt biểu hiện rõ ở cây trồng. Để nâng cao hiệu quả của độc tố, các nhà nghiên cứu đã cắt bớt gen chỉ để tổng hợp phần protein có hoạt tính chứa độc tố mà không cần các phần gen phụ khác. Gen *Cry* được cắt bớt đã biểu hiện tổng hợp protein gấp 500 lần so với gen tự nhiên. Hiện nay, hơn 40 gen khác nhau mang tính kháng côn trùng đã được hợp nhất

trong cây trồng chuyển gen với một vài giống đã được thương mại hóa ở các nước khác nhau như Mỹ và Úc.

Đưa ra lợi ích của các độc tố của *Bt* đối với sự kiểm soát côn trùng, các phương thức quản lý khác nhau phải được chấp nhận để làm chậm sự phát triển của tính kháng côn trùng đối với *Bt*. Những cái đó bao gồm :

- Bố trí các vùng bên cạnh trồng cây bông không chuyển gen *Bt* làm nơi trú ẩn để giảm áp lực chọn lọc hướng tới việc kháng côn trùng.

- Triển khai các gen kháng côn trùng khác nhau (ví dụ: protease inhibitors).

- Dùng các loại độc tố *Bt* cho các receptors đích khác nhau.

- Dùng các promoter khác nhau để điều chỉnh sự biểu hiện của các gen *Bt*.

- Dùng các promoter đặc trưng mô (tissue-specific promoter) như thế côn trùng có thể ăn mà không tổn hại đến kinh tế trên các bộ phận ít quan trọng của thực vật.

Có các hướng khác để phát triển tính kháng côn trùng cho cây chuyển gen dựa trên cơ sở: protease inhibitors, -amylase, lectins, chitinases, cholesterol oxidase, các virus của côn trùng được tạo dòng, tryptophan decarboxylase, anti-chymotrypsin, anti-elastase, nhân tố ức chế trypsin tuyến tụy của bò và nhân tố ức chế lá lách.

6.2. Kháng các virus thực vật

Các virus gây ra những thiệt hại đáng kể trong hầu hết các cây trồng lương thực và cây cho sợi trên phạm vi thế giới. Nhiều phương thức được sử dụng để kiểm soát sự xâm nhiễm virus bao gồm các xử lý hóa học để giết các vector virus, chuyển vào cây trồng các gen kháng tự nhiên từ các loài liên quan, sử dụng chẩn đoán và chỉ dẫn để đảm bảo nhân giống các vật liệu khởi đầu sạch virus (ví dụ: hạt, củ...). Tuy nhiên, sự phát triển chính đã khai thác tính kháng xuất phát từ các tác nhân gây bệnh, ví dụ sử dụng các trình tự xuất phát từ virus được biểu hiện trong các cây chuyển gen để cung cấp tính kháng đối với các virus thực vật. Hướng này dựa trên cơ sở các nghiên cứu về sự gây nhiễm (inoculation) hay xâm nhiễm (infection) ở thực vật khởi đầu với các chủng virus nhẹ cung cấp sự bảo vệ chống lại sự gây nhiễm tiếp theo với cùng loại chủng virus hoặc các virus liên quan gần gũi. Tính kháng bắt nguồn từ tác nhân gây bệnh như vậy đòi hỏi sự chuyển nạp

gen thực vật với các trình tự xuất phát từ virus; tính kháng vật chủ xuất hiện cho kết quả từ hai cơ chế khác nhau: (1) sự bảo vệ được dàn xếp bởi sự biểu hiện của các protein virus tự nhiên hoặc biến đổi (ví dụ protein vỏ, replicase, và replicase khiếm khuyết), và (2) sự bảo vệ được dàn xếp ở mức độ phiên mã (“RNA-mediated resistance”), đòi hỏi sự phiên mã của RNA hoặc từ các chuỗi hoàn chỉnh hoặc từng phần xuất phát từ virus đích (bao gồm các gen cho protein vỏ, replicase, replicase khiếm khuyết, protease, protein vận động...).

Trường hợp các phân tử làm nền tảng cho tính kháng xuất phát từ virus là đối tượng của nghiên cứu chuyên sâu. Cơ sở của tính kháng virus được sắp đặt bởi RNA (RNA-mediated) và sự im lặng của các gen hậu dịch mã có khả năng tương tự, phản ánh các hoạt động cơ bản trong các tế bào thực vật để phát hiện, bất hoạt và đào thải các DNA hoặc các RNA ngoại lai. Ví dụ: các gen nội sinh của thực vật được chèn vào virus như PVX có thể biểu hiện im lặng của gen nội sinh của thực vật.

Để tạo giống cây trồng chống chịu virus, hiện nay có các hướng:

- Bảo vệ chéo.
- Sử dụng RNA vệ tinh.
- Sử dụng enzyme replicase.

6.2.1. Bảo vệ chéo

Là biện pháp lợi dụng hiện tượng lớp vỏ protein của virus thứ nhất đã cản trở sự xâm nhập của virus thứ hai, nghĩa là cho cây nhiễm loại virus có độc lực vừa phải sẽ chống được sự xâm nhiễm của virus có độc lực cao hơn. Để tăng cường khả năng biểu hiện gen protein vỏ người ta gắn thêm vào đuôi phần promoter 35S từ virus khảm súp lơ (CaMV) và đưa vào genome cây trồng nhờ hệ thống Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Thành công đầu tiên theo hướng này là kháng bệnh virus khảm thuốc lá (TMV) ở cây thuốc lá, nhờ sự biểu hiện gen *cp*. Thí nghiệm đồng ruộng đầu tiên về cây cà chua biểu hiện gen *cp* kháng bệnh TMV tiến hành năm 1987 tại Mỹ và cho kết quả kháng bệnh cao. Sau đó hàng loạt kết quả chứng tỏ gen *cp* có hiệu lực đối với tất cả các loại virus gây bệnh ở 20 loài cây khác nhau kể cả các loại cây trồng như cà chua (1987), dưa hấu (1987), lúa (1990), khoai tây (1989, 1990), củ cải đường... Qua hàng loạt thí nghiệm đồng ruộng, Bộ Nông

ngiệp Mỹ đã công nhận giống quốc gia cho giống bí xanh (Freedom II) kháng virus (1995). Các giống khoai tây, dưa chuột, cà chua chống bệnh virus đã và đang được tiếp tục công nhận.

6.2.2. Sử dụng RNA vệ tinh

Trong một số quần thể virus có các thực thể giống virus chứa các phân tử RNA nhỏ hơn gọi là RNA vệ tinh (sattelite RNA). RNA vệ tinh dường như không mã hóa cho bất cứ protein nào nhưng được nhân lên nhờ enzyme của RNA từ virus bình thường và hợp thành các tiểu phần giống virus có vỏ protein. Một số RNA vệ tinh có thể ức chế rất mạnh sự nhân bản của virus bình thường. cDNA từ RNA vệ tinh được tổng hợp với sự tham gia của promoter 35S CaMV rồi đưa vào cây thông qua hệ thống Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Các cây được chuyển gen kiểu này thể hiện tính kháng virus thuốc lá và virus khảm dưa chuột khá tốt. Tuy nhiên, so với tính kháng theo phương pháp bảo vệ chéo, tính kháng này khó đạt hơn vì phải cần nồng độ virus rất cao. Bên cạnh đó, người ta vẫn lo ngại dễ xảy ra hiện tượng đột biến từ phân tử RNA vệ tinh thành một loại gây độc cho chính cây chủ.

6.2.3. Sử dụng enzyme replicase

Replicase là enzyme tham gia quá trình tổng hợp nucleic acid của virus, hoạt hóa cho sự nhân lên của DNA hoặc RNA theo cơ chế bổ sung. Cây trồng chống virus cũng có thể được tạo ra bằng chuyển các gen replicase với nhiều đoạn bị biến đổi hoặc bị cắt bớt, kết quả cho thấy kháng virus rất cao. Ví dụ, thuốc lá theo phương pháp chuyển gen đã biểu hiện gen replicase bị cắt bớt cho khả năng kháng virus khảm thuốc lá rất tốt (1990). Hiện nay, vẫn chưa thành công với enzyme replicase của virus khảm từ cỏ alfalfa đối với bệnh virus khảm thuốc lá. Protoplast đại mạch được chuyển gen replicase từ virus khảm brome cũng chưa kháng được bệnh này ở đại mạch. Tuy thế, từ khi tìm thấy hướng ứng dụng gen replicase, người ta vẫn đang hy vọng vào hướng này.

6.3. Kháng các bệnh nấm

Nấm bệnh gây hại cây trồng rất nặng, nhất là ở các nước nhiệt đới có độ ẩm cao. Cải tạo giống chống nấm hại dựa trên nguyên lý đưa gen mã hóa

một loại enzyme nào đó có tác dụng ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự phát triển của nấm hại. Enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm chitin và β -1,3 glucan là loại đang được chú ý. Khi có gen chitinase chuyển vào, cây thuốc lá chuyển gen đã tăng cường hoạt tính chống nấm hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gen chitinase và glucanase trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm hại cao hơn cây có một gen độc lập. Cũng tương tự, cà chua cho tính kháng nấm *Fusarium* cao hơn hẳn, sau khi được chuyển giao cả hai gen nói trên.

Protein ức chế ribosome (ribosome inhibitive protein, RIP) cũng biểu hiện tính kháng nấm khả quan. Cây thuốc lá cho tính kháng nấm rất tốt, khi cây được chuyển giao đồng thời gen RIP và chitinase.

6.4. Kháng các bệnh vi khuẩn

Đối với vi khuẩn, hướng nghiên cứu tạo giống công nghệ sinh học mới bắt đầu. Về cơ bản có ba hướng :

- Dùng gen mã hóa enzyme làm thoái hóa thành tế bào vi khuẩn, ví dụ gen lysozyme từ các nguồn tế bào động vật hoặc gen lysozyme từ thực khuẩn thể T4 đưa vào cây thuốc lá và khoai tây. Các gen này biểu hiện rất cao hoạt tính lysozyme và các tế bào có khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwina carotovora* rất tốt.

- Gen mã hóa -thionin-cystein được chuyển giao sang cây thuốc lá cũng phòng ngừa được vi khuẩn *Pseudomonas syringae*.

- Cây gen sản xuất protein làm giảm độc tố của vi khuẩn, là hướng có nhiều hứa hẹn. Các gen này chủ yếu sản xuất các loại enzyme phân hủy độc tố của vi khuẩn, do vậy vô hiệu hóa tác hại của chúng.

IV. Sản xuất các dược liệu sinh học

1. Các hợp chất tự nhiên

Thực vật là nguồn cung cấp các hợp chất hóa học dùng làm dược liệu rất có giá trị. Những sản phẩm này, được biết như là các chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolites), thường được sản xuất với một lượng rất nhỏ (dạng vết) trong thực vật và không có chức năng trao đổi chất rõ ràng. Chúng dường như là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với

môi trường chung quanh, là sự thích nghi với stress của môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật.

Để sản xuất các sản phẩm thứ cấp từ thực vật, các mô thực vật ngoại sinh từ cây hoàn chỉnh được nuôi cấy dịch huyền phù (suspension culture) trong điều kiện vô trùng (Hình 4.14). Cơ sở của kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật dựa trên tính toàn thể hóa sinh (biochemical totipotency) duy nhất của tế bào thực vật. Nhiều sản phẩm trao đổi chất có thể được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh. Có nhiều bằng chứng cho thấy có mối quan hệ ngược (feedback) giữa tốc độ sinh trưởng và sản xuất các chất thứ cấp. Khi tốc độ sinh trưởng cao, các quá trình sơ cấp của tế bào là phân chia tế bào và sản xuất sinh khối tế bào. Trong pha tĩnh, khi sự sinh trưởng giảm đến mức tối thiểu, sự sản xuất và tích lũy các chất thứ cấp sẽ tăng lên.

Hình 4.14. Nuôi cấy tế bào dịch huyền phù thực vật trong hệ lên men 100 L

Các chất trao đổi thứ cấp hay còn gọi là các chất thứ cấp có thể xếp trong ba nhóm chính: alkaloid, tinh dầu và glycoside.

Các alkaloid có dạng tinh thể là các hợp chất chứa nitrogen, có thể được tách chiết bằng cách dùng dung dịch acid. Alkaloid có hoạt tính sinh lý trên tất cả động vật và được sử dụng trong công nghiệp dược. Họ alkaloid bao gồm: codein, nicotine, caffeine và morphine. Các tinh dầu chứa hỗn hợp terpenoid và được sử dụng như là chất mùi, chất thơm và dung môi. Glycoside bao gồm các phenolic, tanin và flavonoid, saponin và các cyanogenic glycoside, một số trong chúng được sử dụng làm chất nhuộm, các chất mùi thực phẩm và dược phẩm.

1.1. Các alkaloid

Người ta cũng có thể thu được các chất như caffeine từ nuôi cấy tế bào cây *Coffea arabica*, betalain trong callus củ cải đường, berberin từ tế bào cây *Coptis japonica* (loài cây này phải trồng từ 4-6 năm mới thu được hàm lượng đáng kể berberin trong rễ, so với hàm lượng này có thể thu được sau 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào)... Những chất này được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp hương liệu và trong y học.

Chất reserpine có tác dụng chữa bệnh cao huyết áp và các bệnh rối loạn tuần hoàn cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *Rauwolfia serpentina*. Nuôi cấy tế bào của cây này trong 30 ngày ở hệ lên men quy mô lớn có thể sản xuất được 3.500 kg reserpine, tương đương với lượng hàng năm của cả thế giới thu được từ rễ cây đó.

Các nhà nghiên cứu thuộc tổ hợp dược phẩm Gibageigy (Based, Thụy Sĩ) đã sản xuất được loại alkaloid là scopolamine từ tế bào cây *Hyoscyamus aegypticus* nuôi cấy trong hệ lên men không có cánh khuấy. Bằng cách chọn lọc các dòng tế bào cao sản nhờ kỹ thuật đột biến tế bào trần, biến dị đơn dòng và kỹ thuật gen, người ta đã tăng được sản lượng scopolamine lên gấp hàng ngàn lần.

Nhiều nghiên cứu cho thấy nuôi cấy callus và tế bào của cây *Catharanthus roseus* có hàm lượng serpentin ngang với cây dược liệu bình thường. Một số nghiên cứu đã phân lập được các dòng tế bào *Cantharanthus* sản xuất serpentin và ajmalacine từ nuôi cấy *in vitro*. Bằng loại môi trường sản xuất đặc biệt người ta đã đưa được sản lượng alkaloid của hai dòng tế bào tốt nhất lên một mức cao hơn nữa, trong đó một dòng

tạo được 162 mg/L serpentin, còn dòng kia tạo được 72 mg/L serpentin cùng với 264 mg/L ajmalacine. Mới đây người ta đã hoàn thiện được công nghệ nuôi cấy tế bào của cây *Catharanthus roseus* để sản xuất viblastine và vincristine là hai chất kháng ung thư rất mạnh, hiện đang có nhu cầu rất cao vì chúng được sử dụng để chữa ung thư máu.

Sikuli và cs (1997) sau khi gây nhiễm cây *Datura stramonium* với *Agrobacterium rhizogenes* đã nhận thấy hàm lượng hyoscyamine ở rễ đạt cực đại sau 6 tuần nuôi cấy <100 mg/L.

1.2. Các steroid

Trong lĩnh vực steroid và chuyển hóa steroid, các dòng tế bào có năng suất cao đã được Kaul và cs đề cập đến từ năm 1969. Họ đã nuôi cấy thành công tế bào của cây *Dioscorea deltoidea* để sản xuất diosgenin, là nguyên liệu thô chủ yếu để sản xuất các steroid chống thụ thai và các hormone tuyến thượng thận.

Quá trình chuyển hóa các hợp chất glycoside tim (cardiac) bằng nuôi cấy tế bào của cây *Digitalis lanata* cũng đã được nghiên cứu. Người ta nhận thấy, mặc dù các tế bào *Digitalis* ngừng sản xuất glycoside tim nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử ^{12}C để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất -methyl-digitoxin. Sau 12 ngày, người ta đã thu được 4 g -methyl-digitoxin trong một bình nuôi dung tích 20 L.

1.3. Một số chất khác

Thí dụ điển hình nhất là công nghệ sản xuất shikonin, một loại sắc tố đỏ có khả năng diệt khuẩn, có trong rễ của cây *Lithospermum erythrorhizon*. Bình thường shikonin tích lũy không nhiều trong rễ. Tuy nhiên, các nhà khoa học Nhật đã tạo được dòng tế bào rễ cây *Lithospermum* có khả năng tích lũy đến 15% shikonin và đã hoàn chỉnh công nghệ nuôi cấy tế bào sản xuất shikonin. Công nghệ này cho phép trong một chu kỳ nuôi cấy thu hoạch tới 5 kg hoạt chất và giúp giảm rất nhiều giá thành của shikonin.

Hàm lượng tương đối cao của ubiquinone-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá nuôi cấy *in vitro* và của L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuna pruriens*. Nuôi cấy tế bào của cây *Panax pseudoginseng* đã cho hàm lượng saponin khá cao. Nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đã thu được hàm lượng glycyrrhizin từ 3-4% khối lượng khô.

Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được tìm thấy trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei* đó là chất rosmarinic acid chiếm 13-15% khối lượng khô trong chu kỳ nuôi 13 ngày, lớn gấp 5 lần so với hàm lượng trong cây trồng ở điều kiện tự nhiên. Trong những năm 1980, người ta cũng đã sản xuất rất có hiệu quả ginsenoside là hoạt chất chủ yếu của nhân sâm *Panax ginseng*. Các anthraquinone là một nhóm các sản phẩm tự nhiên quan trọng có ở vi khuẩn, nấm, địa y và thực vật bậc cao có các hoạt tính sinh học như: kháng khuẩn, kháng nấm, giảm huyết áp, giảm đau, chống sốt rét, chống oxy hóa, kháng bệnh bạch cầu và các chức năng đột biến. Ở thực vật bậc cao, chúng đã được tìm thấy ở rất nhiều họ thực vật khác nhau, chẳng hạn Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Leguminosae... Nuôi cấy tế bào các loài của họ Rubiaceae đã cho phép thu được một lượng lớn anthraquinone thậm chí trong một số trường hợp đã vượt quá hàm lượng anthraquinone ở cây bố mẹ.

2. Các protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp (protein ngoại lai) là protein tự nhiên được biến đổi bằng công nghệ DNA tái tổ hợp nhằm nâng cao hoặc thay đổi hoạt tính của chúng. Nuôi cấy tế bào thực vật đã được sử dụng để sản xuất các sản phẩm tự nhiên cách đây hơn 20 năm và gần đây hơn chúng được dùng để sản xuất các protein tái tổ hợp. Các tế bào thực vật rất thích hợp cho các nguyên liệu tái tổ hợp do chúng có thể sinh trưởng trên môi trường tương đối đơn giản không cần bổ sung protein. Nếu protein ngoại lai được sản xuất trong nuôi cấy tế bào và được tiết ra trong môi trường, nhiều hơn phần được tích lũy trong tế bào, thì việc thu hồi và tinh sạch sản phẩm có thể được tiến hành mà không có nhiều protein nhiễm bản. Các protein có nguồn gốc thực vật an toàn cho người hơn các protein có nguồn gốc từ tế bào động vật bởi vì các chất nhiễm bản và virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh ở người. Ngoài ra, nuôi cấy tế bào thực vật cũng là một công cụ thực nghiệm thuận lợi cho việc khảo sát sự sản xuất protein ngoại lai trong cây hoàn chỉnh.

Bảng 4.4. Sản xuất các protein tái tổ hợp bằng nuôi cấy tế bào thực vật

Protein	Loài thực vật
Hormone sinh trưởng ở người	<i>Nicotiana tabacum</i>
Albumin huyết thanh người	<i>N. tabacum</i> , <i>Solanum tuberosum</i>
Nhân tố sinh trưởng biểu mô ở người	<i>N. tabacum</i>
Nhân tố sinh trưởng ở cá hồi	<i>N. tabacum</i>
α -interferon người	<i>Oryza sativa</i>
Hirudin (chống đông máu)	<i>N. tabacum</i>
Erythropoetin	<i>N. tabacum</i>
α and β haemoglobin người	<i>N. tabacum</i>
Human muscarinic cholinergic receptors	<i>N. tabacum</i>
GM-CSF chuột	<i>N. tabacum</i>
Interleukin-2 và Interleukin-4	<i>N. tabacum</i>
Alkalinephosphatase nhau thai người	<i>N. tabacum</i>
α 1-antitrypsin người	<i>O. sativa</i>
Hormone sinh trưởng người	<i>N. tabacum</i>
GM-CSF người	<i>N. tabacum</i> , <i>O. sativa</i>

Thực vật chuyển gen hiện nay được xem là hệ thống sản xuất rất kinh tế cho việc sản xuất các protein ngoại lai như kháng thể, enzyme và hormone. Sản xuất thương mại một số protein của vi khuẩn và động vật đã được tiến hành bằng thực vật. Yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của sản xuất protein dựa trên cơ sở thực vật là hiệu suất của protein ngoại lai hoặc nồng độ của sản phẩm được tích lũy trong sinh khối. Theo đó, người ta đã chú ý cải thiện sự biểu hiện gen ngoại lai trong cây chuyển gen thông qua việc phát triển các promoter tốt hơn, chọn lọc các dòng chuyển gen ổn định, và ức chế gen im lặng (silence gene). Tuy nhiên, một yếu tố

quan trọng là sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm giảm nồng độ của sản phẩm chức năng trong mô thực vật sau khi các phân tử được tổng hợp và lắp ráp. Sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm bản sản phẩm với các đoạn protein mất hoạt tính, và người ta cũng gặp khó khăn khi loại bỏ các protein đứt gãy này trong các hoạt động thu hồi protein chức năng ở sản xuất quy mô lớn. Tìm hiểu chi tiết về vị trí và cơ chế của sự đứt gãy ở nội và ngoại bào là rất cần thiết để có thể phát triển phương pháp sao cho giảm thiểu được sự tổn thất protein sau dịch mã.

3. Vaccine thực phẩm (*edible vaccine*)

Cho đến thời gian gần đây người ta vẫn sử dụng vaccine sống nhược độc làm kháng nguyên kích thích tạo kháng thể cần thiết trong cơ thể người và vật nuôi. Vaccine kiểu này có một số hạn chế như: có khả năng quay trở lại dạng độc hoặc hoạt lực của nó giảm khá nhanh trong cơ thể người và vật nuôi. Hiện nay, nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta đã sản xuất được protein vỏ của một số loại virus như virus bệnh lở mồm long móng, bệnh dại và viêm gan B. Tuy nhiên, vaccine được sản xuất theo các phương pháp trên có giá thành cao, điều kiện bảo quản và vận chuyển nghiêm ngặt, cần có kỹ thuật viên để tiến hành tiêm chủng.

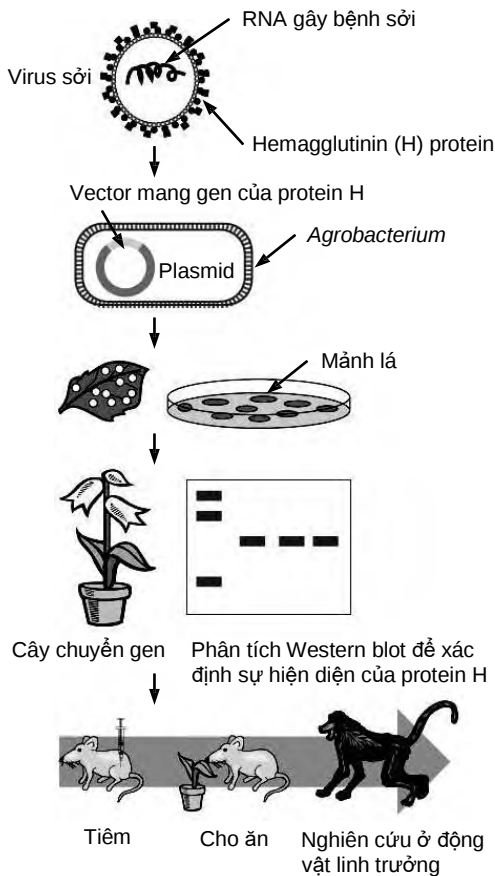
Vaccine thực phẩm là một mô hình lý tưởng cho các nước đang phát triển, vì nó giúp khắc phục được các khó khăn nói trên của vaccine được sản xuất theo phương pháp truyền thống hoặc DNA tái tổ hợp. Nguyên lý cơ bản của quá trình này là chuyển một loại gen đặc biệt vào tế bào thực vật. Loại gen này hoạt động trong cơ thể thực vật, sẽ biến thành nơi sinh ra protein kháng nguyên. Khi những kháng nguyên này đi vào cơ thể người thông qua ăn uống (dưới dạng tươi sống không nấu chín, nếu không sẽ làm mất hoạt tính kháng nguyên), hệ thống miễn dịch của người sẽ tự động sinh ra kháng thể để chống lại kháng nguyên. Như vậy là đã thay việc tiêm chủng vaccine bằng việc ăn những hoa quả hoặc rau xanh có kháng nguyên.

Vaccine thực phẩm có một số ưu điểm sau: giá thành rẻ, ổn định, dễ sản xuất trên quy mô lớn, dễ quản lý, không cần tinh sạch, bảo quản lâu, dễ vận chuyển...

Một số kết quả nghiên cứu bước đầu của vaccine thực phẩm:

- Sản xuất vaccine chống bệnh infectious bursal disease virus (IBDV) ở gà trong cỏ *Arabidopsis* chuyển gen.

- Chuyển gen *orf2* của virus gây bệnh viêm gan E vào cây cà chua, và cây *Pichia pastoris*.
- Sản xuất vaccine viêm gan B trong cây chuối chuyển gen, cây *Physalis ixocarpa*, đậu lupin vàng, rau diếp và cà chua.
- Chuyển gen *ltb* của *E. coli* (B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin) gây bệnh đường ruột vào khoai tây.
- Chuyển gen *ctb* (cholera toxin B subunit) gây bệnh tả của vi khuẩn *Vibrio cholerae* và gen *ltb* vào cây thuốc lá...



A: Chọn kháng nguyên làm vaccine và xác định trình tự mã hóa

B: Chuyển trình tự mã hóa vào vector (plasmid) và biến nạp vào *Agrobacterium*

C: Đồng nuôi cây *Agrobacterium* và mô thực vật

D: Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các tế bào được chuyển gen và phân tích sự biểu hiện của kháng nguyên bằng Western blot

E: Xác định khả năng sinh miễn dịch kháng nguyên trong động vật mô hình

Hình 4.15. Mô hình phát triển vaccine thực phẩm

Một nghiên cứu đã được công bố gần đây trong lĩnh vực sản xuất vaccine từ thực vật, đó là gây miễn dịch trong cơ thể người bằng vaccine thực phẩm để điều trị bệnh viêm gan B. Loại cây trồng được sử dụng để chuyển gen viêm gan B lần này là khoai tây. Người ta hy vọng rằng khi ăn loại khoai tây này, chất kháng nguyên sẽ gây ra một phản ứng miễn dịch nhẹ trong cơ thể người. Từ đó, cơ thể người sẽ tạo ra chất miễn dịch cá thể đối với căn bệnh lây nhiễm viêm gan B. 42 nhân viên chăm sóc sức khỏe ở độ tuổi 25-58 đã tham gia vào cuộc nghiên cứu. Trong đó, 33 người được chỉ định ăn khoai tây chuyển gen mà không có tá dược, một chất làm tăng khả năng phản ứng miễn dịch. Chuẩn độ kháng nguyên kháng virus viêm gan B trong huyết thanh được đo trong một số lần nhất định mỗi ngày. Kết quả cho thấy đối với những người ăn khoai tây không chuyển gen các chuẩn độ không tăng, trong khi đó 19 trong số 33 người ăn khoai tây chuyển gen thì chuẩn độ tăng 57,6%, trong khi vaccine hiện có trên thị trường có tác dụng tới 90% đối tượng, kể cả khi có chứa chất tá dược.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Bajaj YPS.** 1990. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 5, *McGraw-Hill Publishing Company*. USA.
2. **Chrispeels MJ and Sadava DE.** 2003. Plants, Genes, and Crop Biotechnology. 2nd ed. *Jones and Bartlett Publishers*, Massachusetts, USA
3. **Cutler SJ and Cutler HG.** 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. *CRC Press LLC*, USA.
4. **Jain SM, Gupta PK and Newton RJ.** 1994. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol 3. Forestry Sciences 44, *Kluwer Academic Publishers*, Netherland.
5. **Klefenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
6. **Narayanaswamy S.** 1994. Plant Cell and Tissue Culture. *Tata McGraw-Hill Publishing Co. Ltd.* New Delhi, India.
7. **Ramawat KG and Merillon JM.** 1999. Biotechnology: Secondary Metabolites. *Science Publishers Inc.* USA.
8. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

- 9. Razan MK.** 1994. An Introduction to Plant Tissue Culture. *Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.* New Delhi, India.
- 10. Roberts MF and Wink M.** 1998. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Plenum Press*, New York, USA.
- 11. Trigiano RN and Gray DJ.** 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. *CRC Press*, New York, USA.

Chương 4

Công nghệ lên men vi sinh vật

Mã bài MH 08- 04

I. Mở đầu

Các cơ thể vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trên nhiều loại cơ chất (môi trường dinh dưỡng) khác nhau và có thể sản xuất nhiều sản phẩm thương mại. Gần đây, việc áp dụng các kỹ thuật di truyền *in vitro* đã mở rộng phạm vi các sản phẩm được sản xuất bởi vi sinh vật và đã cung cấp các phương pháp mới để tăng sản lượng của những sản phẩm đó. Khai thác thương mại sự đa dạng hóa sinh (biochemical diversity) của các vi sinh vật đã thúc đẩy phát triển công nghiệp lên men, và các kỹ thuật di truyền đã thiết lập một nền công nghiệp ưu thế tạo cơ hội phát triển các quá trình mới và cải thiện những quá trình đang có.

Thuật ngữ lên men (fermentation) trong công nghệ vi sinh có nguồn gốc từ động từ Latin *fervere* nghĩa là đun sôi, mô tả sự hoạt động của nấm men trên dịch chiết của trái cây hoặc các hạt ngũ cốc được tạo mạch nha (malt) trong sản xuất đồ uống có ethanol. Tuy nhiên, sự lên men được các nhà vi sinh vật học và hóa sinh học giải thích theo các cách khác. Theo các nhà vi sinh vật học thuật ngữ lên men có nghĩa là quá trình sản xuất một sản phẩm bằng nuôi cấy sinh khối vi sinh vật. Tuy nhiên, các nhà hóa sinh học lại cho rằng đó là quá trình sản sinh ra năng lượng trong đó các hợp chất hữu cơ hoạt động với vai trò vừa là chất cho lẫn chất nhận điện tử, đó là quá trình yếm khí mà ở đó năng lượng được sản xuất không cần sự tham gia của oxygen hoặc các chất nhận điện tử vô cơ khác.

Trong chương này thuật ngữ lên men được sử dụng theo nghĩa rộng của nó, ở góc độ vi sinh vật học.

II. Sinh trưởng của vi sinh vật

Sinh trưởng của vi sinh vật có thể tạo ra sự trao đổi chất, nhưng để sản xuất một chất trao đổi như mong muốn thì cơ thể của chúng phải được sinh trưởng dưới những điều kiện nuôi cấy đặc biệt với một tốc độ sinh trưởng đặc trưng.

Nếu vi sinh vật chỉ được đưa một lần vào môi trường sinh trưởng, thì nuôi cấy ban đầu (innoculated culture) sẽ trải qua một số giai đoạn và hệ thống này được gọi là nuôi cấy mẻ (batch culture). Đầu tiên, sự sinh trưởng không xuất hiện và quá trình này được xem như là pha lag, có thể coi đây là thời kỳ thích nghi. Tiếp theo là khoảng thời gian mà ở đó tốc độ sinh trưởng của tế bào tăng dần, các tế bào sinh trưởng với một tốc độ cực đại và không đổi, thời kỳ này được xem là pha log hoặc pha sinh trưởng theo hàm mũ và được mô tả bằng phương trình:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

Trong đó: x là nồng độ tế bào (mg/mL), t là thời gian nuôi cấy (giờ), và μ là tốc độ sinh trưởng đặc trưng (giờ⁻¹). Từ phương trình tích phân (1) ta có:

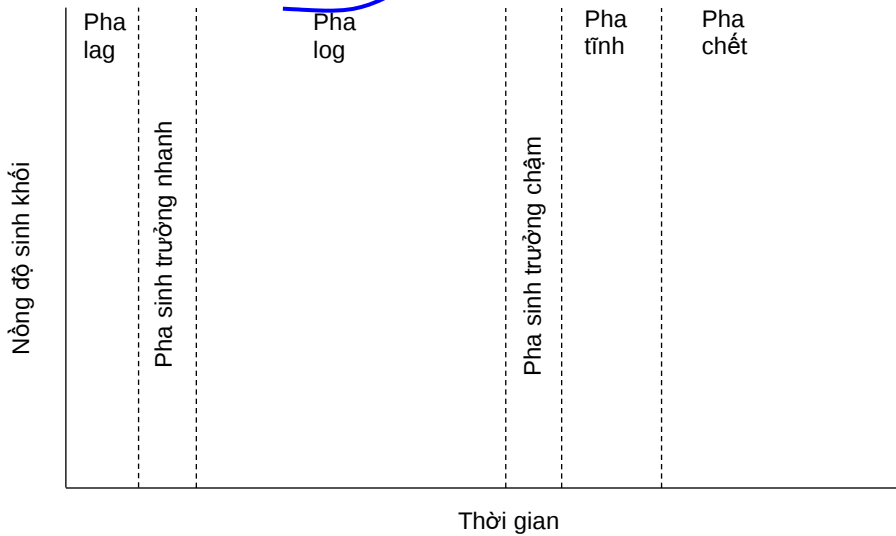
$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Trong đó: x_0 là nồng độ tế bào ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy và x_t là nồng độ tế bào sau một khoảng thời gian t (giờ).

Như vậy, đường cong logarithm tự nhiên của nồng độ tế bào theo thời gian t có độ dốc bằng tốc độ sinh trưởng đặc trưng. Tốc độ sinh trưởng đặc trưng trong suốt pha log đạt cực đại ở các điều kiện nuôi cấy thông thường và được mô tả như là tốc độ sinh trưởng cực đại đặc trưng ($\mu_{\max}$). Phương trình (1) và (2) bỏ qua trường hợp sự sinh trưởng sẽ làm tiêu hao các chất dinh dưỡng và tích lũy độc tố của sản phẩm. Tuy nhiên, trong thực tế khi chất dinh dưỡng bị hao hụt và các sản phẩm độc được tích lũy, thì tốc độ sinh trưởng của tế bào sẽ không đạt cực đại và cuối cùng làm ngừng quá trình sinh trưởng, lúc này nuôi cấy đi vào pha tĩnh và sau một thời gian sẽ đi vào pha chết, dẫn đến giảm số lượng tế bào sống sót (Hình 3.1).

Như đã trình bày, hiện tượng ngừng sinh trưởng trong nuôi cấy mẻ là do hao hụt thành phần dinh dưỡng hoặc tích lũy sản phẩm độc. Tuy nhiên, có thể khắc phục điều này bằng cách bổ sung một lượng tối thiểu môi trường sạch (mới) vào bình nuôi. Khi môi trường mới được bổ sung liên tục ở một tốc độ thích hợp (hệ nuôi cấy liên tục-continuous culture), thì sinh trưởng của tế bào trong hệ này được điều chỉnh bằng sự sinh trưởng giới hạn và thành phần của môi trường, vì vậy hệ thống này được xem như là một

chemostat (thể ổn định hóa tính). Hệ thống nuôi cấy liên tục cho phép đạt tới trạng thái ổn định (steady-state) và việc hao hụt sinh khối tế bào qua dòng chảy ra (output) sẽ được bù đắp bởi sự sinh trưởng tế bào trong bình nuôi.



Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng đặc trưng của các cơ thể đơn bào trong nuôi cấy mẻ

Dòng chảy môi trường qua hệ thống điều chỉnh để vào bình nuôi được mô tả bởi thuật ngữ tốc độ pha loãng (dilution rate), ký hiệu là D , bằng tốc độ bổ sung môi trường trên thể tích làm việc của bình nuôi. Sự cân bằng giữa sinh trưởng của tế bào (growth) và sự hao hụt của chúng từ hệ thống này có thể được mô tả như sau:

$$dx/dt = \text{growth} - \text{output}$$

hoặc:

$$dx/dt = \mu x - Dx$$

Dưới các điều kiện trạng thái ổn định:

$$dx/dt = 0$$

và vì thế, $\mu x = Dx$ và $\mu = D$

Kể từ đây, tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật được điều chỉnh bằng tốc độ pha loãng, và đây là một biến thực nghiệm. Điều này lưu ý rằng dưới các điều kiện nuôi cấy mẻ, một cơ thể sẽ sinh trưởng ở tốc độ sinh trưởng cực đại đặc trưng của nó. Vì thế, nuôi cấy liên tục chỉ có thể hoạt động ở các tốc độ pha loãng phía dưới tốc độ sinh trưởng cực đại đặc trưng. Như vậy, trong các giới hạn nhất định, tốc độ pha loãng có thể được dùng để điều chỉnh tốc độ sinh trưởng của nuôi cấy chemostat.

Cơ chế về hiệu quả điều chỉnh tốc độ pha loãng là mối quan hệ giữa μ (tốc độ sinh trưởng đặc trưng) và s (nồng độ cơ chất giới hạn trong chemostat) được chứng minh bởi Monod vào năm 1942:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} s}{K_s + s} \quad (3)$$

Trong đó: K_s là hằng số sử dụng hoặc bão hòa, bằng giá trị của nồng độ cơ chất khi μ bằng 1/2 của $\mu_{\max}$. Ở trạng thái ổn định, $\mu = D$, vì thế:

$$D = \frac{\mu_{\max} \bar{s}}{K_s + \bar{s}}$$

Trong đó: $\bar{s}$ là nồng độ cơ chất ở trạng thái ổn định trong chemostat, và:

$$\bar{s} = \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D} \quad (4)$$

Phương trình (4) cho thấy nồng độ cơ chất được xác định bằng tốc độ pha loãng. Trong thực tế, điều này xảy ra do sinh trưởng của tế bào đã làm tiêu hao cơ chất tới một nồng độ cần thiết để tốc độ sinh trưởng bằng tốc độ pha loãng. Nếu cơ chất bị hao hụt dưới mức cần thiết thì tốc độ sinh trưởng phụ thuộc tốc độ pha loãng và một loạt các khả năng có thể xảy ra như sau:

- Tốc độ sinh trưởng của tế bào kém hơn tốc độ pha loãng và chúng sẽ bị rửa trôi khỏi bình nuôi ở một tốc độ lớn hơn tốc độ mà chúng đang được sản xuất, kết quả là làm giảm nồng độ sinh khối tế bào.

- Nồng độ cơ chất trong bình nuôi sẽ tăng lên do các tế bào được để lại ít hơn trong bình nuôi để tiêu thụ nó.

- Nồng độ cơ chất được tăng lên trong bình nuôi sẽ cho kết quả các tế bào sinh trưởng ở một tốc độ lớn hơn tốc độ pha loãng và nồng độ sinh khối sẽ tăng.

- Trạng thái ổn định sẽ được thiết lập trở lại.

Như vậy, chemostat là hệ thống nuôi cấy tự cân bằng được giới hạn chất dinh dưỡng, có thể duy trì trạng thái ổn định trong một phạm vi rộng của các tốc độ sinh trưởng cực đại đặc trưng.

Nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng (fed-batch culture) được xem là hệ thống trung gian giữa quá trình nuôi cấy mẻ (batch) và nuôi cấy liên tục (continuous). Thuật ngữ nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng được dùng để mô tả các nuôi cấy mẻ được cung cấp dinh dưỡng liên tục (hoặc nối tiếp nhau) bằng môi trường mới mà không loại bỏ dịch nuôi cấy cũ. Như vậy, thể tích của loại nuôi cấy này tăng lên theo thời gian. Pirt (1975) đã mô tả động học của hệ thống này như sau: Nếu sinh trưởng của một cơ thể bị giới hạn bởi nồng độ của cơ chất trong môi trường thì sinh khối ở pha tĩnh, $x_{\max}$, sẽ được mô tả bởi phương trình:

$$x_{\max} = YS_R$$

Trong đó: Y là yếu tố hiệu suất, bằng khối lượng tế bào được sản xuất trên một gram cơ chất được sử dụng, và S_R là nồng độ ban đầu của cơ chất giới hạn sự sinh trưởng. Nếu môi trường mới được bổ sung vào bình nuôi ở tốc độ pha loãng kém hơn $\mu_{\max}$ thì sau đó hầu như tất cả cơ chất sẽ được sử dụng khi nó đi vào hệ thống:

$$FS_R = \mu \frac{X}{Y}$$

Trong đó: F là tốc độ dòng chảy và X là sinh khối tổng số trong bình nuôi, ví dụ: nồng độ tế bào được nhân lên bởi thể tích nuôi cấy.

Cho dù khi sinh khối tổng số (X) trong bình nuôi tăng lên theo thời gian thì nồng độ tế bào (x) hầu như vẫn không đổi; vì vậy $dx/dt = 0$ và $\mu = D$. Một hệ thống như thế được xem là ở trạng thái gần như ổn định (quasi-steady-state). Khi thời gian và thể tích nuôi cấy tăng lên, thì tốc độ pha loãng lại giảm. Như vậy, giá trị của D được đưa ra như sau:

$$D = \frac{F}{V_0 + F_t}$$

Trong đó: F là tốc độ dòng chảy, V_0 là thể tích nuôi cấy ban đầu, và t là thời gian. Động học Monod dự báo rằng khi D hạ xuống thì nồng độ cơ chất còn thừa cũng sẽ giảm và kết quả là làm tăng sinh khối. Tuy nhiên, trên phạm vi các tốc độ sinh trưởng hoạt động thì sự tăng sinh khối sẽ không có

ý nghĩa. Sự khác nhau giữa trạng thái ổn định của chemostat và trạng thái gần như ổn định của fed-batch ở chỗ trong chemostat thì D (kể từ đây là μ) là hằng số còn ở fed-batch thì D (kể từ đây là μ) lại giảm theo thời gian. Tốc độ pha loãng trong fed-batch có thể được giữ không đổi bằng cách tăng (theo hàm mũ) tốc độ dòng chảy nhờ sử dụng một hệ thống điều chỉnh thông qua computer.

III. Sinh khối vi sinh vật và công nghệ lên men

Sự lên men vi sinh vật có thể được phân loại theo các nhóm chính sau:

- Sản xuất các tế bào vi sinh vật (sinh khối) như là sản phẩm.
- Sản xuất các chất trao đổi của vi sinh vật.
- Sản xuất các enzyme vi sinh vật.
- Sản xuất các sản phẩm tái tổ hợp.

1. Sinh khối vi sinh vật

Công nghệ thu sinh khối vi sinh vật là các quá trình nuôi cấy các chủng thuần khiết hoặc hỗn hợp vài chủng để thu được khối lượng tế bào sau khi sinh trưởng với các mục đích:

- Sinh khối giàu protein dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn cho gia súc là những tế bào vi sinh vật (kể cả sinh khối tảo) đã sấy khô và chết, giàu protein, các vitamin nhóm B và chất khoáng. Nguồn sinh khối này được gọi là protein đơn bào.

- Sinh khối nấm men là những tế bào sống để dùng trong công nghiệp bánh mì-men bánh mì, sinh khối vi khuẩn lactic sống có hoạt tính enzyme tiêu hóa để sản xuất các thuốc hỗ trợ tiêu hóa như biolactovin...

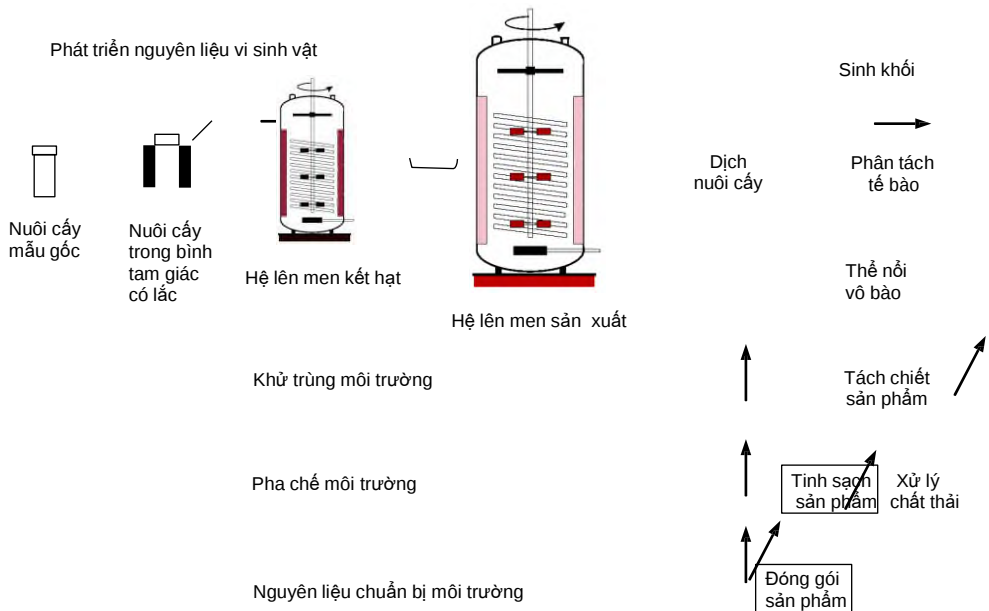
- Sinh khối cố định đạm làm phân bón vi sinh, các loại phân bón vi sinh với vi khuẩn sống tự do trong đất và sống cộng sinh với cây họ đậu.

- Sinh khối vi khuẩn sinh độc tố đối với các loại sâu thân mềm phá hoại rau màu, để sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh.

- Sinh khối vi sinh vật có hệ enzyme phân giải các chất hữu cơ kể cả thuốc trừ sâu và hydrocarbon để sản xuất các chế phẩm vi sinh xử lý nước thải và ô nhiễm trong bảo vệ môi trường.

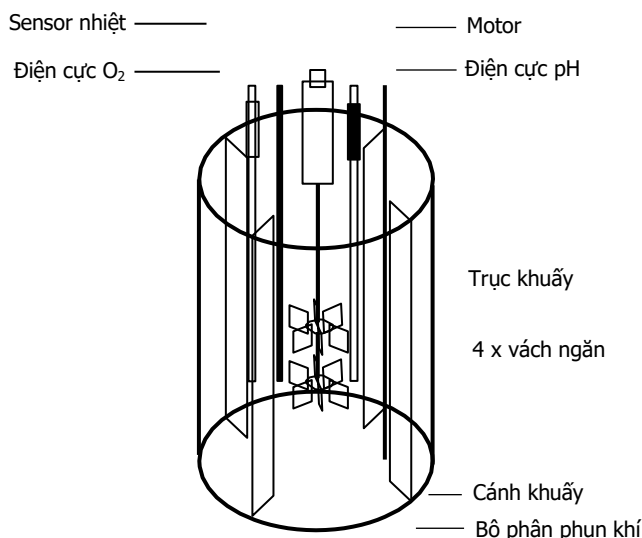
2. Quá trình lên men

Hình 3.2 minh họa các phần của một quá trình lên men tổng quát. Phần trung tâm của hệ thống là hệ lên men, trong đó cơ thể được sinh trưởng dưới các điều kiện tối ưu để tạo thành sản phẩm. Trước khi sự lên men bắt đầu, môi trường phải được pha chế và khử trùng, hệ lên men đã vô trùng, và nuôi cấy khởi đầu phải có một số lượng vi sinh vật vừa đủ ở trong một trạng thái sinh lý phù hợp để cấy truyền vào hệ lên men sản xuất. Kết thúc quá trình lên men các sản phẩm phải được tinh sạch và xử lý thêm.



Hình 3.2. Sơ đồ chung của một quá trình lên men

Các cơ thể vi sinh vật có thể sinh trưởng trong kiểu nuôi cấy mẻ (Hình 3.3), nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng và nuôi cấy liên tục. Ưu điểm của nuôi cấy liên tục đối với sản xuất sinh khối là quá rõ rệt (có thể xem ở những tính toán sau) nhưng đối với các sản phẩm vi sinh khác thì nhược điểm của nó lại lớn hơn ưu điểm kỹ thuật là có khả năng điều chỉnh để cải thiện quá trình lên men.



Hình 3.3. Cấu hình cơ bản của một hệ lên men mở

Hiệu suất của nuôi cấy mẻ có thể được mô tả bởi phương trình:

$$R_{\text{batch}} = \frac{x_{\text{max}} - x_0}{t_i + t_{ii}} \quad (5)$$

Trong đó: R_{batch} là sản lượng nuôi cấy trong giới hạn nồng độ sinh khối/giờ, x_{max} là nồng độ tế bào cực đại đạt được ở pha tĩnh, x_0 là nồng độ tế bào ban đầu ở lúc gây nhiễm, t_i là thời gian cơ thể sinh trưởng ở μ_{max} và t_{ii} là thời gian mà cơ thể không sinh trưởng ở μ_{max} bao gồm pha lag, pha giảm tốc độ, và các thời kỳ của từng mẻ, khử trùng và thu hoạch.

Hiệu suất của nuôi cấy liên tục có thể được biểu diễn như sau:

$$R_{\text{cont}} = D\bar{x} \left(1 - \frac{t_{iii}}{T} \right) \quad (6)$$

Trong đó: R_{cont} là sản lượng của nuôi cấy trong giới hạn nồng độ tế bào/giờ, t_{iii} là thời gian trước khi thiết lập trạng thái ổn định bao gồm thời gian chuẩn bị bình nuôi, khử trùng và hoạt động trong nuôi cấy mẻ trước khi hoạt động liên tục. T là thời gian mà các điều kiện trạng thái ổn định chiếm ưu thế, và $\bar{x}$ là nồng độ tế bào ở trạng thái ổn định.

Sản lượng cực đại của sinh khối trên một đơn vị thời gian (ví dụ hiệu suất) trong một chemostat có thể đạt tới bằng cách hoạt động ở tốc độ pha loãng cao nhất của $D\bar{x}$, giá trị này được xem như là $D_{\max}$. Hiệu suất lên men mẻ, như đã mô tả trong phương trình (5), là một giá trị trung bình cho thời gian tổng số của sự lên men. Do $dx/dt = \mu x$, nên hiệu suất của nuôi cấy tăng lên theo thời gian, và như vậy, phần lớn sinh khối trong quá trình nuôi cấy mẻ được sản xuất ở gần phần kết thúc của pha log. Trong chemostat trạng thái ổn định, hoạt động ở (hoặc gần) $D_{\max}$ cho hiệu suất duy trì không đổi, và đạt cực đại cho sự lên men toàn phần. Cũng như vậy, một quá trình liên tục có thể được hoạt động một thời gian rất lâu sao cho thời kỳ không sản xuất, t_{iii} trong phương trình (6), có thể không có ý nghĩa. Tuy nhiên, yếu tố thời gian không sản xuất cho nuôi cấy mẻ là rất có ý nghĩa, đặc biệt khi hệ lên men được thiết lập lại nhiều lần trong suốt thời gian vận hành, và vì thế t_{ii} sẽ tái diễn nhiều lần.

Bản chất của quá trình liên tục ở trạng thái ổn định cũng có thuận lợi do nó dễ dàng điều chỉnh hơn hệ lên men mẻ. Trong suốt thời gian lên men mẻ, sản lượng nhiệt, sự sản xuất kiềm hoặc acid, và sự tiêu thụ oxygen sẽ biến thiên từ các tốc độ rất thấp ở lúc bắt đầu tới các tốc độ rất cao trong suốt pha log muộn. Vì vậy, điều chỉnh môi trường của một hệ thống như thế khó hơn nhiều so với quá trình liên tục mà ở trạng thái ổn định các tốc độ sản xuất và tiêu thụ là hằng số.

Nhược điểm thường xuyên của hệ thống nuôi cấy liên tục là sự mất cảm của chúng với sự nhiễm bẩn bởi các cơ thể bên ngoài. Ngăn cản sự nhiễm bẩn là vấn đề hàng đầu khi thiết kế hệ lên men, xây dựng và vận hành, và phải được khắc phục bởi một công nghệ tốt.

Sản xuất các sản phẩm phụ được kết hợp với sự sinh trưởng (ví dụ như ethanol) sẽ hiệu quả hơn trong nuôi cấy liên tục. Nhưng việc ứng dụng nuôi cấy liên tục để sản xuất các sản phẩm sinh tổng hợp của vi sinh vật (ngược với sự dị hóa) đã gặp nhiều hạn chế. Mặc dù, về lý thuyết có khả năng tối ưu một hệ thống liên tục để có thể tăng hiệu suất của sự trao đổi chất, tuy nhiên khả năng ổn định trong một thời gian dài của các hệ thống như thế là rất khó khăn do sự thoái hóa của chủng vi sinh vật. Khảo sát về động học của nuôi cấy liên tục cho thấy rằng hệ thống này là sự chọn lọc cao và thích hợp cho việc nhân giống những cơ thể thích nghi tốt nhất trong

nuôi cấy. Sự thích nghi tốt nhất trong phạm vi này được xem là ái lực của cơ thể đối với cơ chất được giới hạn ở tốc độ pha loãng đang hoạt động.

Mặc dù công nghiệp lên men đã miễn cưỡng chấp nhận nuôi cấy liên tục để sản xuất các chất trao đổi của vi sinh vật, nhưng những tiến bộ rất đáng kể lại thu được trong sự phát triển các hệ thống nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng. Nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng có thể được sử dụng để đạt tới một mức độ rất đáng kể của sự điều chỉnh quá trình và mở rộng thời gian sản xuất của quá trình nuôi cấy mẻ truyền thống mà không có các nhược điểm cố hữu của nuôi cấy liên tục đã được mô tả ở trên. Ưu điểm chính của cung cấp thành phần môi trường vào nuôi cấy là chất dinh dưỡng có thể được duy trì ở nồng độ rất thấp trong suốt quá trình lên men. Nồng độ chất dinh dưỡng thấp có thể thuận lợi trong một số mặt sau:

- Duy trì các điều kiện nuôi cấy trong phạm vi khả năng thông khí của hệ lên men.
- Loại bỏ các ảnh hưởng khắc nghiệt của các thành phần môi trường, ví dụ như sử dụng nhanh các nguồn nitrogen, carbon và phosphate.
- Tránh các hiệu quả độc của thành phần môi trường.
- Cung cấp một mức độ giới hạn chất dinh dưỡng cần thiết cho các chủng dị dưỡng.

IV. Các sản phẩm lên men vi sinh vật

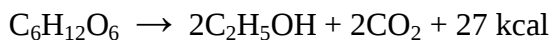
1. Lên men rượu

Rượu đã được con người sản xuất và sử dụng rất lâu, vào khoảng 6.000 năm trước công nguyên. Do nhu cầu và lợi ích của sản phẩm này nên đến nay việc nghiên cứu và mở rộng sản xuất chúng ngày càng được quan tâm. Có rất nhiều loại rượu và mỗi loại đều có thành phần và quy trình sản xuất khác nhau, có thể tạm chia thành ba loại chủ yếu sau: Rượu trắng (ethanol), rượu vang (wine) và rượu mùi (liquor).

1.1. Rượu trắng

Rượu trắng được sản xuất bằng hai phương pháp chính: phương pháp lên men vi sinh vật và phương pháp hóa học. Tuy nhiên, phương pháp lên men vi sinh vật là phương pháp chủ yếu. Đây là quá trình lên men rượu của nấm men và một số vi sinh vật khác, trong đó nấm men là đối tượng chính

được sử dụng để sản xuất rượu ở quy mô công nghiệp (Hình 3.4). Lên men rượu là một quá trình phức tạp chuyển đường thành rượu, có sự tham gia của nấm men trong điều kiện yếm khí. Phương trình tổng quát của lên men rượu như sau:



Quy trình sản xuất rượu trắng bằng phương pháp lên men rượu bởi nấm men được thực hiện qua các bước sau: Chế biến nguyên liệu thành dịch đường, lên men biến đường thành rượu, chưng cất và tinh chế ethanol. Trong đó, lên men biến đường thành rượu là giai đoạn quan trọng nhất trong sản xuất rượu, quyết định chất lượng sản phẩm tạo thành. Sau khi dịch đường hóa đã được xử lý, người ta bổ sung thêm một số thành phần để cung cấp thêm vitamin và amino acid như muối ammonium, muối phosphate, dịch thủy phân nấm men. Môi trường có thành phần như trên có thể sử dụng để lên men. Giống được sử dụng chủ yếu trong lên men rượu là các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có tốc độ phát triển mạnh và hoạt lực lên men cao, lên men được nhiều loại đường khác nhau và có tốc độ lên men nhanh, có khả năng chịu được độ ethanol cao từ 10-12%.

Hình 3.4. Nhà máy sản xuất ethanol quy mô nhỏ

Môi trường lên men sau khi được khử trùng cần có độ đường đạt 90-120 g/L và pH trong khoảng 4,5-4,8. Thời gian lên men từ 65-72 giờ, trong đó 10 giờ đầu có sục khí để nấm men sinh sôi nảy nở, sau đó cho lên men tĩnh (yếm khí). Quá trình lên men rượu qua các bước sau: đường và các chất dinh dưỡng của môi trường lên men được hấp thụ vào trong tế bào nấm men qua màng tế bào và tham gia vào quá trình trao đổi chất, rượu ethanol và CO₂ tạo thành liên thoát ra khỏi tế bào, rượu ethanol tan tốt trong nước do vậy nó khuếch tán rất nhanh vào môi trường chung quanh. Kết thúc lên men rượu, sau khi đã loại bỏ tế bào nấm men, muốn được rượu tinh khiết cần chưng cất dịch lên men để loại bỏ tạp chất. Kỹ thuật chưng cất rượu ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng rượu thu được.

1.2. Rượu vang

Danh từ rượu vang được dùng để chỉ loại rượu lên men từ dịch ép trái cây (nhô, dâu, thơm, táo, lê...) với một số chủng nấm men. Rượu vang thu được không qua chưng cất, có hương vị thơm ngon của trái cây tự nhiên, có độ cồn nhẹ (10-15%) là loại nước giải khát thơm ngon giàu chất bổ dưỡng.

Quy trình sản xuất rượu vang đơn giản hơn lên men ethanol và qua các bước sau: chế biến nguyên liệu và lên men tạo rượu vang (Hình 3.5).

Hình 3.5. Một dây chuyền sản xuất rượu vang

các phản ứng

tự nhiên)

Sac.

ellipsoideus, Sac. cerevisiae, Sac. oviformis...

Lên men rượu vang bao gồm ba giai đoạn: (1) Giai đoạn hình thành rượu, bắt đầu từ lúc cấy men giống vào cho lên men đến khi dịch lên men hết sủi bọt mạnh. Trong thời gian này nấm men hoạt động mạnh nhất. (2) Giai đoạn phát triển, gạn dịch lên men thu “rượu non” tiếp tục cho rượu non lên men phụ để phân hủy lượng đường còn trong dịch lên men. Quá trình gạn lọc và lên men phụ có thể lặp lại nhiều lần để có dung dịch trong suốt. Ở

, do đó cần hạ thổ rượu ở nơi mát một thời gian lâu để rượu được “chín” và có chất lượng hoàn hảo.

2. Sản xuất enzyme

Ứng dụng thương mại chính của các enzyme vi sinh vật là trong công nghiệp thực phẩm và sản xuất bia mặc dù enzyme đã được thừa nhận trong các ứng dụng phân tích và chẩn đoán bệnh, cũng như trong sản xuất bột giặt. Hầu hết các loại enzyme được tổng hợp trong pha log của nuôi cấy mẻ và có thể, vì thế, được xem như các chất trao đổi sơ cấp. Tuy nhiên, trong một số trường hợp amylase (*Bacillus stearothermophilus*) được sản xuất bởi nuôi cấy idiophase vì thế có thể xem là tương đương với các chất trao đổi thứ cấp. Các enzyme có thể được sản xuất từ động-thực vật cũng như các nguồn vi sinh vật, nhưng sản xuất bằng lên men vi sinh vật là phương pháp kinh tế và thích hợp nhất. Hơn nữa, hiện nay nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta có thể chuyển gen vào các tế bào vi sinh vật để sản xuất các enzyme của động-thực vật (Hình 3.6).

Các tiến bộ của công nghệ DNA tái tổ hợp đã mở rộng phạm vi các sản phẩm lên men tiềm tàng của vi sinh vật. Có khả năng đưa các gen từ các cơ thể bậc cao vào các tế bào vi sinh vật như là các tế bào nhận để tổng hợp các protein (bao gồm enzyme) ngoại lai. Các tế bào vật chủ dùng trong những trường hợp này là *E. coli*, *Sac. cerevisiae* và một số loại nấm men khác.

2.1. Các loại enzyme vi sinh vật

Trong quá trình sinh trưởng, các enzyme được hình thành trong tế bào và một số được tiết ra môi trường xung quanh. Trong sản xuất chủ yếu là sản phẩm của enzyme ngoại bào, còn nếu muốn tách enzyme nội bào thì phải phá vỡ tế bào. Các vi sinh vật được dùng trong sản xuất enzyme gồm có vi khuẩn, nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn.

Các chế phẩm enzyme được sản xuất từ vi sinh vật đã được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau, chủ yếu là các enzyme thủy phân: amylase, protease, pectinase, cellulase...

Hình 3.6. Sản xuất enzyme ở quy mô công nghiệp

2.1.1. Amylase nấm mốc

Nhiều chủng nấm mốc có khả năng sản xuất enzyme amylase. Amylase nấm mốc có các loại sau:

- α -amylase có tác dụng thủy phân tinh bột thành maltose, glucose và các dextrin có phân tử lượng khác nhau.

- Glucoamylase có tác dụng thủy phân tinh bột, glycogen và polysaccharide. Enzyme này được dùng trong sản xuất rượu, chuyển những dextrin có phân tử lượng cao không lên men thành những hợp chất lên men được và do đó nâng cao được hiệu suất nấu rượu từ các nguyên liệu là tinh bột.

- α -glucosidase thủy phân maltose thành glucose.

- Dextrinase thủy phân isomaltose, panose và dextrin thành những loại đường có thể lên men được.

2.1.2. Amylase vi khuẩn

Một số vi khuẩn có khả năng sinh ra nhiều enzyme α -amylase. Amylase vi khuẩn chỉ có khả năng phân hủy tinh bột mạnh và tạo thành những α -dextrin phân tử lượng cao bắt màu với iodine. Enzyme α -amylase vi khuẩn được dùng trong sản xuất đường mật ngô và chocolate, trong sản xuất bia, chế biến dextrin với dịch đường để sản xuất thức ăn cho người già và trẻ em, trong sản xuất nước quả và trong y học.

Dextrinase nấm mốc và amylase vi khuẩn còn được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp dệt và giấy.

2.1.3. Protease

Protease là nhóm enzyme thủy phân các liên kết peptide trong phân tử protein hoặc các polypeptide.

- Protease thủy phân protein thành các peptide có phân tử lượng nhỏ (peptone và polypeptide). Tiếp theo đó là sự phân hủy các peptide trên thành các amino acid tự do dưới tác dụng của peptidase.

- Protease được dùng để nâng cao giá trị dinh dưỡng của thịt cá, thủy phân protein của sữa để chế biến những món ăn kiêng đặc biệt, được dùng trong thuộc da, sản xuất bột giặt, phim ảnh, tơ sợi, len dạ và trong y học. Protease vi sinh vật có thể sử dụng cùng với amylase trong chế biến thức ăn gia súc.

2.1.4. Pectinase

Là nhóm enzyme thủy phân pectin tạo thành galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, methanol... Pectinase có nhiều loại, nhưng có

hai loại được nghiên cứu nhiều hơn cả là pectinesterase và polygalacturonase.

- Pectinesterase có tác dụng thủy phân các liên kết ester trong phân tử pectin, tách nhóm metocyl tạo thành methanol và polygalacturonic acid.

- Polygalacturonase thủy phân pectinic acid và các polygalacturonic khác, tách các gốc D-galacturonic acid tự do.

2.1.5. Cytolase

Vi sinh vật (đặc biệt là nấm mốc) sản sinh ra hệ enzyme có hoạt tính cao có thể phân hủy hemicellulose, pentozan, lignin... Các enzyme này được gọi chung là cytolase (bao gồm cellulase, hemicellulase, pentosinase).

Cellulase tác dụng phân hủy cellulose thành cellobiose, rồi sau đó tiếp tục thủy phân tới glucose. Việc phân lập các chủng vi sinh vật sản xuất cellulase có hoạt tính cao và tách enzyme này ra dưới dạng tinh khiết vẫn còn gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, hiện nay chưa sản xuất được enzyme này ở quy mô công nghiệp, song việc sử dụng nó trong các ngành kinh tế và công nghiệp có nhiều tiềm năng. Ví dụ cytolase có thể dùng trong công nghiệp bia để phân hủy các vỏ hạt không phải vỏ mạch, trong sản xuất nước quả, trong chế biến bánh mì, trong các quá trình gia công thực phẩm để nâng cao giá trị dinh dưỡng, cũng như trong sản xuất thức ăn gia súc.

2.1.6. Invertase

Invertase của nấm mốc và nấm men đều thủy phân saccharose, nhưng cơ chế tác dụng của chúng hoàn toàn khác nhau. Invertase của nấm mốc là glucosidase, tác dụng lên đầu glucose của saccharose. Còn invertase của nấm men là fructosidase, tác dụng lên đầu fructose của saccharose.

Invertase là enzyme nội bào và chỉ thoát ra môi trường khi tế bào bị phân hủy. Enzyme này được dùng rộng rãi trong sản xuất bánh kẹo, rượu mùi, kem, mật ong nhân tạo. Nó làm tăng vị ngọt khi thủy phân đường saccharose thành fructose và glucose, làm tăng độ hòa tan của saccharose trong sản phẩm.

2.1.7. Enzyme oxy hóa glucosooxydase-catalase

Glucosooxydase là enzyme oxy hóa khử, chỉ tác dụng lên β -D-glucose khi có mặt oxygen, nó oxy hóa glucose thành gluconic acid và H_2O_2 . Dưới

tác dụng của catalase (một enzyme hay đi cùng với glucosooxydase) H_2O_2 sẽ bị khử thành H_2O và O_2 .

Glucosooxydase-catalase có thể loại bỏ oxygen không khí khỏi môi trường. Vì vậy, chúng được dùng để bảo vệ những nguyên liệu, vật liệu khác nhau để tránh oxy hóa bởi không khí. Sử dụng những enzyme này cho phép kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm (các dịch cô đặc, chất béo, bia, rượu vang, nước uống, sữa...). Đồng thời chúng cũng được sử dụng rộng rãi trong y học từ năm 1950 để chữa bệnh.

2.2. Sinh tổng hợp enzyme cảm ứng yme

và

Khi nuôi cấy nấm mốc *Asper. oryzae* trên môi trường cám mì theo phương pháp bề mặt có hàng chục enzyme tự do được hình thành, trong đó có amylase, protease, mantase, pectinase, invectase, ribonuclease... Nếu nuôi nấm mốc này trên môi trường Kzapek với tinh bột và nitrate thì chỉ có α -amylase được tạo thành, còn các enzyme khác chỉ có ở dạng vết. Nhưng nếu thay sodium nitrate bằng casein ở dạng sữa đã tách chất béo thì protease được tạo thành cùng với α -amylase.

Asper. awamori trên

-

nitrate thì chỉ thu được phức hợp amylase .

-

óa

thực vật

Một định nghĩa tổng quát có thể nêu lên như sau: Một quá trình sinh tổng hợp được gọi là cảm ứng, nếu như nó chỉ xảy ra ở mức độ đáng kể khi trong môi trường có cơ chất đặc hiệu của enzyme này hoặc các chất trao đổi có cấu trúc tương tự cơ chất. Các enzyme thuộc loại này gọi là enzyme cảm

· Các hợp chất kích thích quá trình tổng hợp này được gọi là chất cảm

ứng

Muốn tổng hợp được enzyme cảm ứng cần phải có bốn điều kiện:

- Có gen tương ứng trong thể nhiễm sắc của tế bào.
- Có đầy đủ các nguyên liệu để xây dựng các phân tử enzyme đó (các amino acid và các hợp chất coenzyme nếu enzyme đó gồm hai cấu tử).
- Năng lượng cần thiết dùng cho việc tổng hợp enzyme.
- Chất cảm ứng, nếu không có chất cảm ứng thì dù có đủ ba điều kiện trên cũng không thể tổng hợp được enzyme.

Như vậy, có thể coi việc có chất cảm ứng là điều kiện rất cần thiết để thu được những enzyme mong muốn. Trong công nghiệp sản xuất enzyme cần phải lựa chọn những chất cảm ứng thích hợp và xác định nồng độ tối ưu của nó trong môi trường để có hiệu suất sinh tổng hợp cao nhất.

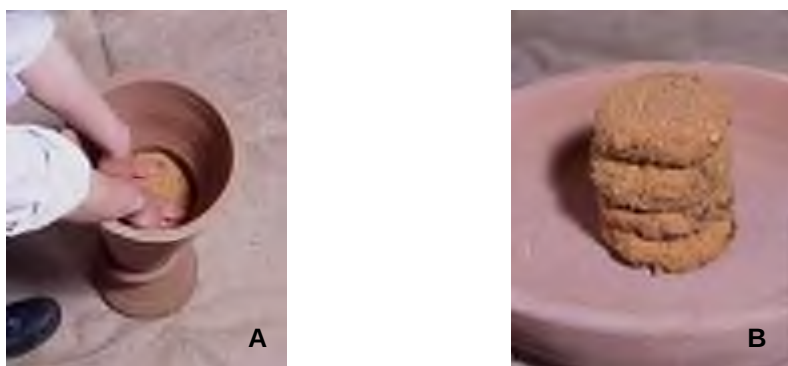
2.3. Những phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzyme

Công nghệ sản xuất enzyme hiện nay trên thế giới ứng dụng hai phương pháp: nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm.

Trong nuôi cấy bề mặt, vi sinh vật mọc trên bề mặt môi trường rắn (Hình 3.7) hoặc lỏng. Các môi trường rắn trước khi nuôi cấy vi sinh vật cần được làm ẩm. Vi sinh vật phát triển sẽ lấy những chất dinh dưỡng trong môi trường và sử dụng oxygen phân tử của không khí để hô hấp. Để đảm bảo cho vi sinh vật mọc đều trên bề mặt môi trường và sử dụng được nhiều chất dinh dưỡng sinh ra enzyme, những lớp môi trường rắn cần phải mỏng (chỉ dày khoảng 2-5 cm). Điều này dẫn đến một nhược điểm cơ bản của phương pháp này cần phải có mặt bằng sản xuất lớn và chi phí lao động chân tay nhiều.

Trong nuôi cấy chìm, vi sinh vật hiếu khí chỉ sử dụng được oxygen hòa tan trong môi trường, vì vậy trong quá trình nuôi cấy phải sục khí và khuấy liên tục. Phương pháp nuôi cấy chìm hiện đại hơn, dễ cơ khí hóa và tự động hóa, việc tổ chức quy mô lớn tương đối dễ dàng và đơn giản. Với phương pháp này có thể dùng các chủng vi sinh vật đột biến có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao và lựa chọn các thành phần môi trường thích hợp, các điều kiện nuôi cấy tối ưu.

Phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường rắn cũng có một số ưu điểm so với phương pháp nuôi cấy chìm, đó là: nồng độ enzyme tạo thành ở môi trường rắn cao hơn nhiều lần, không cần các thiết bị phức tạp, chủ yếu nuôi trên khay và buồng nuôi giữ ở nhiệt độ và độ ẩm thích hợp, quá trình sản xuất tiêu tốn ít năng lượng. Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt vi sinh vật được nuôi cấy trong điều kiện không vô trùng tuyệt đối. Nếu có vi sinh vật tạp nhiễm thì chỉ cần loại bỏ phần đó. Còn trong nuôi cấy chìm cần phải giữ vô trùng tuyệt đối trong tất cả quá trình, nếu bị nhiễm thì hư hỏng toàn bộ và có thể phải bỏ đi hoàn toàn. Khi nuôi cấy chìm không những chỉ cần vô trùng ở quá trình nhân giống, lên men, mà còn phải đảm bảo vô trùng đối với không khí thổi vào môi trường.



Hình 3.7. Lên men trên môi trường rắn. A: lên men kỵ khí trong nồi bằng đất nung, B: lên men hiếu khí.

2.3.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt

Nuôi cấy nấm mốc và một số vi khuẩn theo phương pháp bề mặt để sản xuất enzyme thường dùng môi trường rắn, một số trường hợp có thể dùng môi trường lỏng.

Môi trường rắn thường là các nguyên liệu tự nhiên như cám, đôi khi dùng gạo tằm, ngô, bã bia, bã củ cải đường, khoai tây, lõi ngô... hoặc hỗn hợp những nguyên liệu này. Môi trường lỏng thường là rỉ đường, dịch thủy phân từ thóc mầm, nước bã rượu... có pha thêm muối khoáng.

Để đảm bảo đủ các chất dinh dưỡng trong môi trường người ta có thể bổ sung các nguồn N, P, K hoặc các chất sinh trưởng (nước khoai tây, cao

ngô...). Độ ẩm 58-60% tương đối thích hợp với nhiều chủng nấm mốc nuôi cấy bề mặt trên khay hở. Tuy nhiên, độ ẩm 60% vi khuẩn dễ phát triển, dễ gây tạp nhiễm, khó thông khí. Trường hợp độ ẩm từ 45-50%, khi nuôi cấy môi trường sẽ khô nhanh, sinh bào tử yếu và làm giảm hoạt tính của enzyme tạo thành. Trong thời gian nuôi cấy, nên giữ độ ẩm của môi trường ở 50-60%, muốn vậy độ ẩm không khí phòng nuôi cấy phải khoảng 90-100%.

Tuy rằng, nuôi cấy bề mặt không cần điều kiện vô trùng tuyệt đối nhưng môi trường (đặc biệt trong quá trình nhân giống) cũng cần được vô trùng để cho giống phát triển bình thường nhất là giai đoạn đầu. Trong sản xuất cần phải vô trùng môi trường rắn ở 1-1,5 atm bằng hơi nóng trong 45-60 phút. Nếu môi trường trước khi vô trùng được trộn với chlohydric acid hoặc sulfuric acid đến pH thích hợp, hay thêm một ít formalin hoặc một số chất sát trùng khác thì chỉ cần vô trùng dưới ở 0,2-0,3 atm. Thêm acid và giữ môi trường ở pH nhất định sẽ giúp cho một vài enzyme tạo thành được nhiều hơn.

Môi trường được dàn mỏng ra các khay đã vô trùng dày khoảng 2-2,5 cm, để nguội tới 30°C thì tiến hành cấy giống. Giống được nhân cũng theo phương pháp bề mặt hoặc bằng bào tử thu được theo phương pháp tách bào tử khỏi môi trường nhân giống và chứa vào các bình nút kín hoặc trong các túi polyethylene. Trong nuôi cấy nhân giống thường để mốc phát triển đến già sinh ra nhiều bào tử. Tỷ lệ nhân giống khoảng 0,2-2%. Mỗi gram bào tử mốc có thể cấy vào 10 kg môi trường. Các khay có môi trường đã cấy mốc được đặt vào phòng nuôi có sẵn các giá. Phòng nuôi có thể điều chỉnh được nhiệt độ, độ ẩm và được thông gió. Nhiệt độ thích hợp với đa số mốc là 30-32°C, nếu nhiệt độ xuống dưới 24°C nấm phát triển chậm, sinh bào tử yếu, thời gian nuôi cấy dài dẫn đến giảm khả năng sinh tổng hợp enzyme. Thời gian nuôi cấy nấm mốc khoảng 36-60 giờ.

Quá trình nuôi cấy nấm mốc trên bề mặt môi trường bao gồm ba thời kỳ:

- **Khoảng 10-14 giờ đầu.** Bào tử bắt đầu nảy mầm, thời kỳ này chưa hình thành enzyme không đòi hỏi phải thông khí nhiều, chỉ cần làm thoáng khoảng 2-3 thể tích không khí/thể tích phòng/giờ. Giống rất nhạy cảm với nhiệt độ ở những giờ này, nhiệt độ buồng nuôi cần giữ 29-31°C.

- **Thời kỳ giữa khoảng 14-18 giờ.** Mốc phát triển nhanh, hô hấp mạnh. Sợi nấm có thể quan sát thấy bằng mắt thường, lúc đầu lớp lông có

màu trắng xám và ngày càng rõ, làm môi trường kết bánh lại. Có thể phải lật môi trường, bẻ nhỏ ra để sợi nấm mọc tốt hơn. Các chất dinh dưỡng trong môi trường tiêu hao nhanh để phục vụ cho quá trình trao đổi chất trong tế bào và giống hô hấp mạnh tỏa ra môi trường chung quanh 80-90 kcal/giờ, làm nhiệt độ môi trường có thể tăng lên đến 37-40°C hoặc hơn. Thời kỳ này cần phải thông khí mạnh, tới 60 thể tích khí/thể tích phòng/giờ để cung cấp O₂ cho mốc và đuổi CO₂ ra khỏi môi trường, đồng thời làm giảm nhiệt độ buồng nuôi. Nhiệt độ buồng nuôi ở giai đoạn này cần giữ ở 28-29°C và độ ẩm trong phòng khoảng 100%.

- **Thời kỳ cuối khoảng 10-20 giờ.** Các quá trình trao đổi chất vẫn tiếp tục nhưng yếu dần, nhiệt độ môi trường giảm xuống và việc tạo thành enzyme của tế bào vẫn tiếp tục. Nhiệt lượng tỏa ra khoảng 15-30 kcal/kg/giờ. Thông khí không quá 20-25 thể tích không khí/thể tích phòng/giờ, giữ nhiệt độ buồng nuôi ở 30°C.

Tùy thuộc vào đặc tính sinh lý của từng loại mốc, thời gian nuôi cấy có thể kết thúc tại điểm mà lượng enzyme tạo thành tối đa.

2.3.2. Phương pháp nuôi cấy chìm

Nuôi cấy vi sinh vật sinh enzyme theo phương pháp chìm được thực hiện trong các bình lên men có cánh khuấy và sục khí liên tục (Hình 3.8 và 3.9). Quá trình tương tự như trong sản xuất amino acid, kháng sinh...

Không thể có môi trường nuôi cấy chung cho tất cả các chủng vi sinh vật, vì vậy cần phải chọn thành phần môi trường, tỷ lệ các chất dinh dưỡng sao cho thích hợp với từng chủng, đặc biệt phải chú ý tới chất cảm ứng cần thiết để cho vi sinh vật sản sinh ra enzyme ở mức tối đa. Trong nhiều môi trường nuôi cấy chìm, nguồn carbon thường là tinh bột hoặc các loại bột khác nhau. Có thể thêm một lượng rất hạn chế các carbohydrate dễ tiêu như glucose hoặc saccharose. Trong sản xuất người ta còn sơ bộ dịch hoá tinh bột bằng amylase trước khi hấp vô trùng môi trường. Đối với các mốc sinh amylase thì đường maltose lại là chất cảm ứng tốt hơn tinh bột. Các nguồn nitrogen hữu cơ thường dùng là cao ngô, nước chiết từ mầm mạ... Khi cho thêm các chất này phải thận trọng, vì hỗn hợp các amino acid sẽ có tác dụng nâng cao sinh tổng hợp amylase ở *Aspergillus*, nhưng lại có ảnh hưởng xấu đối với các enzyme khác.



Hình 3.8. Lên men bằng phương pháp nuôi cấy chìm trong môi trường lỏng ở quy mô phòng thí nghiệm (5 L)

Thành phần khoáng trong môi trường cũng rất có ý nghĩa. Trong môi trường nuôi cấy một số chủng *Asper. oryzae* ngoài tinh bột và nitrate còn cần thêm $MnSO_4$. Nếu thiếu $MnSO_4$ mốc vẫn phát triển bình thường, nhưng amylase không được tạo thành (trong phân tử amylase có chứa những amino acid mang S và Mn). Môi trường được vô trùng trong thiết bị riêng hoặc trong bình lên men ở $121-125^\circ C/45-60$ phút. Môi trường trước khi vô trùng cần được dịch hóa sơ bộ để tránh tình trạng tinh bột hồ hóa làm môi trường đặc sệt hoặc có độ dính cao.

Sau khi làm nguội môi trường đến nhiệt độ thích hợp sẽ tiến hành tiếp giống. Giống được cấy từ ống nghiệm qua các bình tam giác, đặt trên máy lắc, rồi nuôi ở bình nhân giống có thể tích bằng 5-10% thể tích bình lên men từ 24-36 giờ. Như vậy, nuôi cấy chìm cần tiếp giống ở hệ sợi không dùng giống bào tử như cấy các xạ khuẩn sinh chất kháng sinh. Cấy giống mốc bào tử theo phương pháp chìm sẽ kéo dài thời gian nảy mầm và cũng kéo dài toàn bộ quá trình nuôi cấy. Môi trường nhân giống có thể dùng các hợp chất nitrogen dễ tiêu đối với vi sinh vật mà trong quá trình nuôi cấy vẫn nâng cao được hoạt tính sinh tổng hợp. Tỷ lệ tiếp giống nằm trong khoảng 2-5%, nhưng ở một số chủng tỷ lệ này thấp hơn nhiều (0,5-0,6%).

Sinh tổng hợp enzyme theo phương pháp nuôi cấy chìm thường khoảng từ 2-4 ngày. Đa số các enzyme thủy phân do nấm mốc, xạ khuẩn tạo thành được tiết ra môi trường xung quanh, phần còn lại trong hệ sợi sau ba ngày nuôi cấy khoảng 10-15%. Độ pH môi trường có một ý nghĩa rất lớn, độ pH thích hợp cho sinh tổng hợp α -amylase là 7-8, glucoamylase là 4,5-5. Khi dùng các muối ammonium làm nguồn nitrogen, quá trình phát triển vi sinh vật sẽ acid hóa môi trường còn khi dùng nitrate làm nguồn nitrogen môi trường sẽ bị kiềm hóa.



Hình 3.9. Lên men bằng phương pháp nuôi cấy chìm trong môi trường lỏng ở quy mô pilot (200 L)

Sự sục khí không những ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật mà còn ảnh hưởng đến sự tạo thành enzyme. Tốc độ sử dụng oxygen cao nhất của nấm mốc sau khoảng 24 giờ nuôi cấy rồi giảm dần. Tăng nồng độ tất cả các chất dinh dưỡng và oxygen hòa tan trong môi trường có thể nâng cao được khả năng sinh tổng hợp α -amylase.

2.4. Tách và tinh sạch chế phẩm enzyme

2.4.1. Chế phẩm enzyme từ môi trường nuôi cấy bề mặt

Để chiết rút enzyme từ môi trường rắn người ta dùng nước, các dung dịch muối trung tính, các dung môi hữu cơ (ethanol, acetone). Nhiều nghiên cứu cho thấy dùng nước có kết quả tốt và dễ áp dụng trong sản xuất. Có thể chiết được lượng enzyme trên 90-95% và trong nước chiết không chứa các tạp chất không tan. Nước thường dùng để khuếch tán hòa tan ở nhiệt độ 25-28°C. Để tránh tạp nhiễm nên thêm vào nước một ít formalin hoặc chất sát trùng khác. Dịch chiết thu được có màu nâu sẫm, khá trong, chứa 10-15% chất khô hòa tan và được làm lạnh kịp thời xuống 10-12°C.

Dịch chiết được cô đặc chân không tới 50-55% chất khô hòa tan. Dịch đậm đặc này có thể bảo quản lâu dài mà không mất hoạt tính và rất dễ hòa tan. Dịch chiết có thể không cần phải cô đặc mà đưa ngay vào máy sấy phun và sẽ thu được sản phẩm ở dạng bột.

Phương pháp tách chiết và làm sạch enzyme được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay là phương pháp kết tủa enzyme bằng dung môi hữu cơ (ethanol, isopropanol và acetone). Các dung môi hữu cơ này làm giảm hằng số điện môi của môi trường. Như ta đã biết, lực hút tĩnh điện tỷ lệ nghịch với hằng số điện môi. Vì vậy, các enzyme-protein cũng như các chất có phân tử lượng thấp trong hệ dung dịch nước-dung môi hữu cơ sẽ kết tủa và lắng xuống. Độ hòa tan của enzyme vào dung dịch ethanol-nước phụ thuộc vào nồng độ ethanol, nhiệt độ, pH, lực hút ion của dung dịch và tính chất protein của enzyme. Thông thường, người ta thêm 3-4 thể tích ethanol vào một thể tích nước chiết enzyme. Để tránh mất hoạt tính của enzyme tất cả phải được làm lạnh xuống 3-5°C. Khi trộn phải khuấy mạnh, khi các enzyme kết tủa và lắng xuống dưới cần tách ly tâm ngay. Enzyme được rửa 2-3 lần bằng ethanol cao độ, rồi đưa vào bình hút ẩm hoặc máy đông khô chân không, sản phẩm thu được sẽ có dạng bột. Dùng isopropanol kết tủa enzyme chỉ cần 1,5-2 thể tích dung môi/1 thể tích dịch chiết. Các enzyme tách ra sẽ ở dạng sữa đặc quánh rất khó sấy. Dùng acetone với tỷ lệ như khi dùng isopropanol, nhưng kỹ thuật phòng tránh cháy nổ trong sản xuất là rất khó khăn.

Phương pháp thứ hai để tách enzyme là dùng muối trung tính để kết tủa. Chế phẩm enzyme thu được có hoạt lực cao hơn so với việc tách bằng dung môi. Muối trung tính thường dùng là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với tỷ lệ 50-66% (có

khí cao hơn) so với dịch chiết enzyme. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pha thành dung dịch bão hòa rồi cho vào dịch lên men. Dịch lên men có thể sơ bộ cô đặc trong thiết bị chân không và như vậy sẽ cần dùng một lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ít hơn. Chế phẩm enzyme thu được có lẫn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, vì vậy muốn sử dụng rộng rãi cần phải loại muối bằng cách thẩm tích qua màng bán thấm.

2.4.2. Chế phẩm enzyme từ dịch nuôi cấy chìm

Dịch nuôi cấy chìm sau khi lọc sinh khối vi sinh vật và các tạp chất rắn không tan còn khoảng 1-3% chất khô hòa tan, trong đó có các enzyme. Về nguyên tắc tách enzyme từ dịch lọc nuôi cấy chìm cũng tương tự như tách từ dịch chiết trong môi trường rắn nuôi cấy bề mặt. Dịch lọc cần phải cô để giảm thể tích từ 4-10 lần trong điều kiện chân không ở 25-30°C, rồi tiến hành tách enzyme.

Ngoài phương pháp cô chân không, có thể tiến hành theo phương pháp hấp phụ qua nhựa trao đổi ion hoặc các chất có hoạt tính bề mặt, sau đó lại tiến hành phản hấp phụ. Tiến hành nhiều lần và dịch thu được chứa α -amylase của nấm mốc và vi khuẩn có thể được hấp phụ lại bằng tinh bột khoai tây hoặc ngô đã được xử lý sơ bộ bằng nhiệt. Trước khi cho hấp phụ cần cho thêm 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để nâng cao khả năng hấp phụ của tinh bột. Trừ amylase được hấp phụ còn các enzyme khác sẽ ở lại trong dịch. Tinh bột có amylase được sấy khô (không cần phản hấp phụ) và đem sử dụng trong kỹ thuật sản xuất các sản phẩm chứa tinh bột.

Hiện nay, còn một số phương pháp tương đối phức tạp khác để kết tinh và tách enzyme như lọc gel (gel filtration), điện di (electrophoresis), siêu ly tâm (ultracentrifuge)...

3. Sản xuất kháng sinh

3.1. Penicillin

Penicillin là kháng sinh được tìm ra đầu tiên và được sản xuất sớm nhất dùng để chữa một số bệnh nhiễm khuẩn vào những năm đầu của Thế chiến thứ 2.

Những vi sinh vật sinh penicillin thuộc các giống nấm mốc *Penicillium* và *Aspergillus*. Nhưng các chủng của *Penicillium notatum* và *Pen. chrysogenum* có hoạt lực cao và được dùng trong công nghiệp kháng sinh. Tuy nhiên, những chủng *Penicillium* có hoạt lực cao lại thường kém ổn định. Do đó, một vấn đề khó khăn được đặt ra là tạo được khả năng sinh kháng

sinh cao nhất, giữ được ổn định trong quá trình nghiên cứu và sản xuất. Nhiệm vụ này có một ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp. Ngày nay, nhờ kỹ thuật di truyền học người ta đã tạo được những giống ổn định, ít nhất sau sáu thế hệ vẫn không giảm hoạt tính kháng sinh.

Quá trình lên men penicillin thuộc vào loại lên men hai pha: pha sinh trưởng và pha sinh penicillin. Nguồn carbon trong lên men penicillin bằng nấm *Pen. chrysogenum* có thể là glucose, saccharose, lactose, tinh bột, dextrin, các acid hữu cơ (lactic, acetic, formic), các amino acid... Tuy nhiên, đường lactose cho hiệu suất penicillin cao nhất và thường được dùng trong công nghiệp. Nhưng do nấm sử dụng đường lactose chậm, vì vậy trong thực tế lactose được dùng phối hợp cùng với đường khác (glucose, saccharose...) trong môi trường dinh dưỡng.

Trong pha lên men thứ nhất giống phát triển mạnh, sử dụng glucose và lactic acid của cao ngô. Sau đó, lactose mới được sử dụng (chủ yếu trong pha thứ hai tạo thành penicillin). Khi trong môi trường cạn lactose và không bổ sung các chất dinh dưỡng, hệ sợi nấm sẽ bắt đầu tự phân, nếu tiếp tục lên men nồng độ penicillin sẽ giảm. Trong thực tế sản xuất cần phải kết thúc lên men trước thời điểm này.

• Phương pháp sản xuất penicillin

Sản xuất penicillin cũng như các chế phẩm sinh học khác, dựa trên cơ sở nuôi cấy vi sinh trên môi trường rắn hoặc lỏng. Trong quá trình nuôi cấy, giống vi sinh vật phát triển sẽ tích tụ các sản phẩm trao đổi chất trong môi trường hoặc trong sinh khối. Quy trình công nghiệp sản xuất penicillin dựa trên nấm mốc *Pen. chrysogenum* có khả năng sinh penicillin cao, theo hai phương pháp:

- *Lên men bề mặt*. Phương pháp này được áp dụng trong thời gian đầu của công nghiệp kháng sinh. Môi trường nuôi cấy bề mặt có thể là các cơ chất rắn hoặc lỏng. (1) Cơ chất rắn có thể là cám hoặc các loại hạt, cám được làm ướt rồi trải lên khay một lớp dày khoảng 2 cm, giống nấm mốc được trộn vào môi trường có độ ẩm 50-60% đã vô trùng để nguội tới 30°C. Thời gian lên men 6-7 ngày ở 24-28°C trong các buồng được điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm và thông gió. Nói chung, phương pháp này giống như lên men các enzyme bằng nấm mốc. (2) Môi trường lỏng dùng nguồn carbon là lactose, cao ngô và một số nguyên tố khoáng. Giống được cấy vào môi trường rồi lên men ở 24°C khoảng 6-7 ngày đạt hiệu suất khoảng

193 unit/mL penicillin. Ngày nay, phương pháp lên men chìm đã thay thế phương pháp lên men bề mặt.

- *Lên men chìm*. Thành phần môi trường gồm có cao ngô, glucose, lactose và các muối khoáng. Giống dùng trong công nghiệp thường ở dạng bào tử. Bào tử được nuôi trên các bình nhân giống có cánh khuấy và sục khí $36-50 \text{ m}^3/\text{giờ}$ để hệ sợi nấm phát triển, sau đó chuyển vào các bình lên men. Quá trình lên men penicillin bằng nấm mốc *Pen. chrysogenum* ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$ trong khoảng 120-125 giờ. Trong quá trình lên men ở pha thứ nhất nấm phát triển hệ sợi mạnh, sinh khối tăng nhanh, các nguồn carbon dễ đồng hóa (glucose, saccharose) cùng các nguồn nitrogen được tiêu hao nhanh, cường độ hô hấp tăng dần đến cực đại, pH tăng và penicillin được tạo thành ít. Sang pha thứ hai hệ sợi nấm phát triển chậm, lactose được tiêu hao dần, pH tăng đến khoảng 7-7,5 và penicillin được tạo thành chủ yếu trong pha này. Nếu nguồn carbon trong môi trường cạn và sinh khối nấm mốc bắt đầu tự phân thì pH có thể tăng tới 8 hoặc hơn, lượng penicillin được tạo thành trong môi trường sẽ giảm. Vì vậy, quá trình lên men cần được kết thúc trước thời điểm hệ sợi nấm mốc bắt đầu tự phân. Nấm mốc sinh penicillin rất hiếu khí, cho nên quá trình nuôi cấy (nhân giống và lên men) cần phải sục khí và khuấy môi trường để đảm bảo độ hòa tan oxygen cân bằng với nhu cầu sinh lý của chúng. Nếu không đủ oxygen hiệu suất penicillin có thể giảm tới hai lần.

3.2. Streptomycin

Streptomycin là một kháng sinh dùng phổ biến trong y học, thú y và bảo vệ thực vật. Schatz và cs (1944) đã phát hiện ra streptomycin từ dịch nuôi cấy một chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* (còn gọi là *Actinomyces streptomycin*).

Giống xạ khuẩn sinh streptomycin khi nuôi cấy chìm phát triển thành hai pha:

- **Pha thứ nhất (pha sinh trưởng mạnh)**. Các bào tử nảy chồi và mọc thành sợi sau 6-8 giờ, mỗi bào tử mọc một chồi, khuẩn ty thường thẳng và phân nhánh rất yếu, tế bào chất ưa kiềm.

- **Pha thứ hai (khuẩn ty không phát triển)**. Cuối ngày thứ ba sợi xạ khuẩn bị chia nhỏ và bắt đầu tự phân.

Những giống sinh streptomycin rất không ổn định. Do đó, trong tương lai cần có sự can thiệp của kỹ thuật di truyền để tạo ra những giống có hoạt lực cao và ổn định để đưa vào sản xuất. Giữ bào tử ở dạng đông khô trong

khoảng năm năm có thể còn 96-99% hoạt lực, trong cát thạch anh tới ba năm, trên môi trường thạch nước đậu ở 5°C tới một năm. Các nguồn carbon mà giống *Streptomyces* có thể đồng hóa được và sinh kháng sinh là glucose, tinh bột, dextrin, maltose, fructose, galactose, manose. Trong thực tế, glucose và tinh bột được dùng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất streptomycin.

▪ Phương pháp sản xuất streptomycin

Lên men streptomycin được thực hiện theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình lên men này cũng giống như lên men các loại kháng sinh khác, bao gồm các giai đoạn: Nhân giống và lên men chính.

- *Nhân giống*. Giống xạ khuẩn được bảo quản ở dạng bào tử. Cấy bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác lắc 180-220 vòng/phút ở 26-28°C/30-70 giờ, sau đó cho tiếp vào các bình nhân giống (có sục khí và khuấy), nuôi tiếp cho phát triển sinh khối 20-40 giờ. Nhiệm vụ chính trong giai đoạn nhân giống là tạo ra một khối lượng lớn khuẩn ty xạ khuẩn ưa kiềm có khả năng phát triển mạnh trong giai đoạn lên men chính và tạo thành một lượng lớn kháng sinh.

- *Lên men*. Lên men streptomycin là quá trình lên men hai pha điển hình. Nhiệt độ lên men khoảng 26-28°C, thời gian lên men 96 giờ. Trong thời gian lên men cần phải thông khí và khuấy trộn môi trường. Lượng không khí thổi qua môi trường trung bình là 1 thể tích khí/1 thể tích môi trường. Khuấy trộn môi trường liên tục trong suốt cả quá trình lên men (kể cả khi nhân giống) nếu ngừng khuấy chỉ trong một thời gian ngắn sẽ làm giảm hiệu suất streptomycin. Độ pH trong những giờ đầu có giảm chút ít sau đó tăng dần.

3.3. Tetracycline

Tetracycline là một dãy các chất kháng sinh có cùng một nhân chung tetracycline (ví dụ: tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, dimethyltetracycline...) và một số nhóm chung có trong phân tử (ví dụ nhóm dimethylamino -N(CH₃)₂, nhóm amide CONH₂...). Tetracycline được dùng rộng rãi trong y học và thú y. Tetracycline có thể được sản xuất bằng lên men xạ khuẩn *Streptomyces aureofaciens*. Tetracycline được tìm thấy vào năm 1953 bằng cách khử halogen trong phân tử chlortetracycline. Lúc đầu phương pháp này được dùng trong công nghiệp nhưng giá thành sản

phẩm rất đắt, sau đó người ta tìm thấy chất kháng sinh này có trong dịch nuôi cấy xạ khuẩn sinh chlortetracycline là *Strep. aureofaciens*.

Giống xạ khuẩn có khả năng tổng hợp tetracycline và chlortetracycline là *Strep. aureofaciens*, còn giống sinh oxytetracycline là *Strep. rimosus*. Nguồn carbon dùng trong nuôi cấy *Strep. aureofaciens* là glucose (tích tụ nhiều tetracycline), còn *Strep. rimosus* cho nhiều oxytetracycline trên môi trường maltose.

Trong quá trình lên men, ở pha thứ nhất các chất dinh dưỡng tiêu hao nhanh. Trong khoảng 24-48 giờ nuôi cấy khối khuẩn ty đã được 70-80% mức tối đa và 60-80% các chất dinh dưỡng đã được sử dụng. Bước sang pha lên men thứ hai các giống xạ khuẩn này đều phát triển chậm lại, tốc độ sử dụng các chất dinh dưỡng giảm đi rất nhiều, phát triển khuẩn ty chậm lại dần, đạt tới mức độ cực đại và ổn định rồi bước vào giai đoạn tự phân. Kháng sinh tích tụ tối đa ở 110-120 giờ.

▪ Phương pháp sản xuất tetracycline

Lên men tetracycline (tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, dimethyltetracycline...) theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình lên men ở đây giống như lên men các chế phẩm khác, bao gồm các giai đoạn: nhân giống và lên men.

- Xạ khuẩn *Strep. aureofaciens* dùng trong lên men tetracycline và chlortetracycline hoặc các halogentetracycline khác. Cây bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác pH 6,8-7,0 lắc 220-250 vòng/phút khoảng 24-40 giờ. Sau đó, được tiếp tục nhân giống trong nôi nhỏ rồi chuyển vào môi trường lên men. Lên men tetracycline và chlortetracycline là lên men hai pha điển hình.

- Giống *Strep. rimosus* được nhân giống ở bình tam giác lắc 220-250 vòng/phút ở 27-28°C/48-72 giờ, sau đó nhân tiếp tục trong nôi có sục khí và khuấy rồi chuyển sang môi trường lên men có điều kiện tương tự nhưng kéo dài từ 5-7 ngày.

4. Sản xuất acid hữu cơ

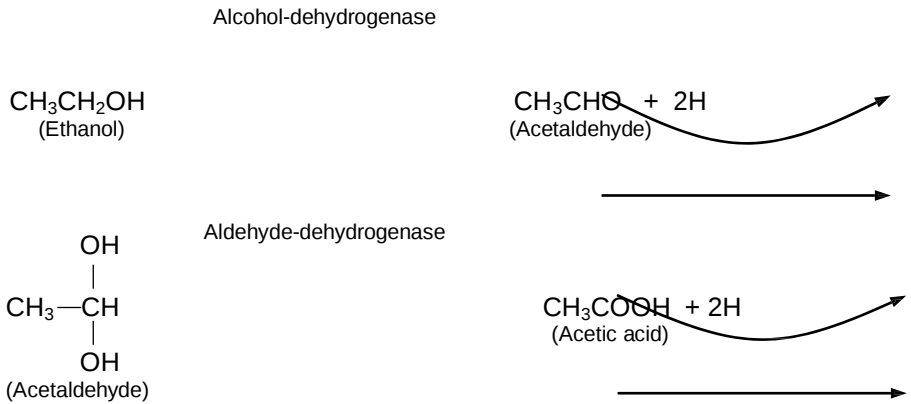
4.1. Acetic acid

Acetic acid (CH_3COOH) có thể thu được bằng phương pháp lên men vi khuẩn acetic. Acid này (còn gọi là dấm ăn) được dùng trong chế biến

thực phẩm, ướp chua rau quả. Quá trình lên men nhờ vi khuẩn acetic oxy hóa rượu ethanol thành acetic acid (Hình 3.10).

Có trên 20 loài vi khuẩn có khả năng lên men acetic, chúng được gọi một tên chung là vi khuẩn acetic. Trong môi trường đủ rượu ethanol (5-13%) thì sản phẩm chủ yếu là acetic acid, nếu nồng độ rượu thấp hơn các vi khuẩn acetic sẽ oxy hóa triệt để rượu thành CO_2 và H_2O .

Vi khuẩn acetic là bọt ưa ẩm và rất hiếu khí, có tốc độ sinh trưởng rất nhanh từ một tế bào sau 12 giờ có thể phát triển thành 12 triệu tế bào. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển chúng tạo thành acetic acid và nồng độ acid thấp lại kích thích sự sinh trưởng của chúng. Vì vậy, trong sản xuất dấm có thể dùng rượu không cần vô trùng được bổ sung một ít acetic để acid hóa môi trường, nhiệt độ lên men khoảng $25\text{-}32^\circ\text{C}$ và sục khí mạnh.



Hình 3.10. Quá trình lên men acetic acid

Các loài vi khuẩn acetic có giá trị như: *Acetobacter aceti*, *Ace. pasteurianum*, *Ace. orleanense*, *Ace. xylium*, *Ace. schiitzenbachii*, *Ace. curvum*, *Ace. suboxydans*.

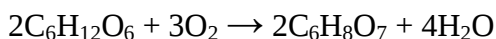
Nguồn cơ chất chủ yếu trong lên men acetic là ethanol có bổ sung thêm một ít đường, nguồn nitrogen vô cơ hoặc hữu cơ, và một số chất khoáng khác. Có ba phương pháp lên men acetic: (1) Phương pháp chậm còn gọi là phương pháp Orlean hoặc phương pháp Pháp, dùng nước hoa quả làm nguyên liệu với vi khuẩn *Ace. orleanense*. (2) Phương pháp nhanh còn gọi là phương pháp Đức, phương pháp này được áp dụng chủ yếu trong

công nghiệp sản xuất dấm ăn trên thế giới, vi khuẩn được sử dụng là *Ace. schiitzenbachii* hoặc *Ace. curvum*. (3) Phương pháp lên men chìm, đây là kiểu lên men bán liên tục sử dụng các chủng vi khuẩn của loài *Ace. suboxydans*.

4.2. Citric acid

Citric acid hay limonic acid ($C_6H_8O_7$) có nhiều trong thiên nhiên, đặc biệt trong các loài cây ăn quả có múi (họ cam chanh-Rutaceae) được dùng chủ yếu trong chế biến thực phẩm và dược phẩm. Citric acid cũng có thể được sản xuất ở quy mô công nghiệp bằng phương pháp lên men, nấm mốc sẽ chuyển hóa đường thành citric acid.

Cơ chế sinh tổng hợp citric acid ở vi sinh vật có thể biểu diễn bằng phương trình tổng quát như sau:



Các nấm mốc sinh citric acid hiếu khí, nhiệt độ thích hợp cho phát triển và lên men là 30-32°C. Nguồn carbon tốt nhất đối với *Asper. niger* là saccharose, còn đối với *Citromyces* là maltose. Nồng độ đường trong môi trường 10-20% là thích hợp hơn cả. Các nguồn nitrogen vô cơ dùng trong lên men citric acid tốt nhất là nitrate còn nitrogen hữu cơ là nước chiết đậu nành. Trong môi trường lên men cần chú ý các nguyên tố khoáng P, Mg, K, Fe và Zn.

Có hai phương pháp được dùng để sản xuất citric acid là lên men bề mặt (trên môi trường lỏng hoặc rắn) và lên men chìm.

- **Phương pháp lên men bề mặt trên môi trường lỏng.** Phương pháp này được dùng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất citric acid. Lớp váng nấm phát triển trên các khay lên men chứa môi trường dinh dưỡng là dịch đường sẽ chuyển hóa đường thành citric acid.

- **Phương pháp lên men chìm.** Quá trình lên men giống như sản xuất kháng sinh, được thực hiện trong các bình lên men chứa môi trường dinh dưỡng và giống nấm mốc. Sau khi kết thúc lên men dùng H_2SO_4 để chuyển calcium citrate thành citric acid.

V. Công nghệ tái tổ hợp vi sinh vật

Không có một lĩnh vực nào của công nghệ sinh học thực nghiệm lại phát triển nhanh chóng như công nghệ di truyền (genetic engineering) hay

còn gọi là công nghệ DNA tái tổ hợp (DNA recombinant technology), cũng không có một lĩnh vực nào khác có thể đưa ra nhiều loại sản phẩm mới và hữu ích đến như vậy. Nguyên lý cơ bản của công nghệ này là thao tác có định hướng và có chủ ý (đưa vào hoặc loại bỏ) DNA và các loại nguyên liệu di truyền khác nhằm làm thay đổi đặc tính di truyền của cơ thể sinh vật.

Hầu hết các kỹ thuật đều bắt đầu bằng sự lựa chọn một gen mong muốn, tiếp theo là phân lập nó và cắt nó bằng các enzyme hạn chế. Gen này được gắn vào một vector tạo dòng (plasmid) và sau đó đưa vào một vật chủ, ở đó nó sẽ được dịch mã thành một protein đặc biệt.

1. Các vi sinh vật tái tổ hợp

Một trong những ứng dụng đầu tiên của công nghệ di truyền là tạo ra một chủng *Pseudomonas syringae*. Chủng hoang dại (wild type) của vi khuẩn này thông thường chứa một gen tạo băng, gen này kích thích sự tạo băng trên các bề mặt lạnh và ẩm. Sự biến đổi gen này tạo ra một thể tái tổ hợp có khả năng ngăn ngừa sự tạo thành băng giá (frost). Được tạo ra dưới tên gọi là Frostban, vi khuẩn này đã mang lại một thành công khiêm tốn trong việc chống lại việc tạo thành băng giá trên các cây dâu tây và khoai tây ngoài đồng ruộng. Trong một thí nghiệm khác, một chủng virus có khả năng diệt sâu đo bắp cải được thả vào một thửa ruộng bắp cải. Nó đã được thiết kế để có thể tự phá hủy sau một thời kỳ nhất định. *Pseudomonas fluorescens* đã được tái tổ hợp với các gen sản sinh chất diệt côn trùng sinh học *Bac. thuringiensis*. Các vi khuẩn này được thả vào đất, chúng sẽ bám vào rễ và giúp tiêu diệt các côn trùng đang tấn công.

Nói chung, mọi sự phóng thích các thể tái tổ hợp vào môi trường đều phải được các cơ quan bảo vệ môi trường chuẩn y và được giám sát chặt chẽ. Đến nay, nhiều nghiên cứu đã cho thấy các vi sinh vật này không sống sót hoặc sinh sôi trong môi trường và chắc chắn không gây ra nhiều hiểm họa. Các virus được thiết kế di truyền đặc biệt có ích trong các ứng dụng y học, chẳng hạn để sản xuất vaccine.

2. Các ứng dụng trong công nghệ vi sinh

Một điều làm công nghệ di truyền trở nên đặc biệt hấp dẫn là các kỹ thuật của nó có thể kết hợp với các kỹ thuật của công nghệ lên men để sản xuất ra những số lượng lớn các chất giống kháng sinh hoặc steroid. Hầu hết

các protein tái tổ hợp đang bán trên thị trường hiện nay đều rất hữu ích trong y học. Dưới đây là một số trong các sản phẩm này:

- Insulin, chất thay thế hormone dùng trong điều trị bệnh tiểu đường type I.
- Hormone sinh trưởng của người, được sử dụng để điều trị những trẻ em bị bệnh lùn hoặc bệnh già trước tuổi.
- Interferone, một chất miễn dịch được sử dụng để điều trị một số loại ung thư, viêm gan mạn tính.
- Interleukin-2, một chất hoạt hóa tế bào T và B được dùng trong điều trị ung thư.
- Erythropoietin (EPO), một chất kích thích các tế bào tủy sống sinh hồng cầu, dùng để điều trị một số bệnh thiếu máu.
- Hoạt tố plasminogen của mô (tPA), một enzyme tham gia vào quá trình làm tan các cục máu đông (huyết khối).
- Nhân tố VIII, một protein gây đông máu cho những người ưa chảy máu.
- Các vaccine tái tổ hợp cho bệnh viêm gan, và bệnh viêm màng não do *Hemophilus influenza B* gây ra.
- Octolon, một chất ức chế miễn dịch dùng cho các bệnh nhân cấy ghép nội tạng.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Trần Thị Thanh.** 2003. Công nghệ vi sinh. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
2. **Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng.** 1999. Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
3. **Asenjo JA and Merchuk JC.** 1995. Bioreactor System Design. *Marcel Dekker Inc.* New York, USA.
4. **Bains W.** 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press Inc.* New York, USA.
5. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
6. **Lee JM.** 2000. Biochemical Engineering. *Prentice Hall Inc.* USA.

7. Ratledge C and Kristiansen B. 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

8. Shuler ML and Kargi F. 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall Inc.* New Jersey, USA.

Chương 5

Công nghệ protein Mã bài MH 8- 05

I. Mở đầu

Công nghệ protein là một hướng nghiên cứu quan trọng của công nghệ sinh học, có tiềm năng ứng dụng rất lớn. Trên cơ sở công nghệ DNA tái tổ hợp hiện nay nhiều loại protein nguyên thể (protein thể hệ thứ nhất), protein đã được sửa đổi hoặc mới (protein thể hệ thứ hai) đang được sản xuất nhờ các sinh vật prokaryote như vi khuẩn *E. coli* hoặc eukaryote như nấm men *Sac. cerevisiae*. Do tốc độ sinh sản nhanh nên vi sinh vật có thể sản xuất các protein với số lượng lớn trong một thời gian ngắn, sản phẩm được tinh sạch không có nguy cơ nhiễm bẩn virus như các trường hợp được tách chiết từ người. Đối với một số protein có cấu trúc phức tạp không thể biểu hiện ở vi khuẩn hoặc biểu hiện với hiệu suất thấp ở nấm men, người ta đang có xu hướng chuyển gen mã hóa của nó vào thực vật. Lý do là vì hệ thống thực vật có nhiều ưu điểm như có thể trồng trên quy mô lớn nhờ năng lượng mặt trời nên ít tốn kém hơn, các virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh cho người, các gen biểu hiện ở mô tạo dầu thực vật nên rất dễ tách chiết và thu nhận protein.

Công nghệ protein là quá trình xây dựng các phân tử protein mới, bằng cách thiết kế một phân tử protein dựa trên các nguyên lý cơ bản nhất, hoặc sửa đổi cấu trúc của một protein đang có, nhằm mục đích:

- Nghiên cứu quá trình lắp ráp của các protein và các nhân tố của chuỗi sơ cấp tham gia vào sự cuộn xoắn, ổn định và thể hiện chức năng của chúng. Các đặc điểm này có thể được khảo sát bằng cách sửa đổi một hoặc nhiều amino acid đặc trưng theo một kiểu đã được định hướng trong protein

Nhập môn Công nghệ sinh học

và quan sát kết quả sau khi sản xuất phiên bản đã được sửa đổi. Thông thường các protein có trình tự tương tự không giống nhau hoàn toàn, tồn tại trong tự nhiên sẽ có các tính chất hơi khác nhau và người ta có thể dựa vào các trình tự khác nhau này để tiến hành những sửa đổi sau đó.

- Sản xuất các phân tử protein ổn định cho một mục đích công nghệ đặc biệt, tuy nhiên các phiên bản được tìm thấy trong tự nhiên không có các tính chất tối ưu cần thiết. Ví dụ: một enzyme có thể được xem như một phần

của một quá trình công nghiệp nhưng một điểm đặc trưng của enzyme, chẳng hạn độ ổn định nhiệt hoặc là độ pH tối ưu cho hoạt tính xúc tác... không thể tương thích với quá trình đó. Các thay đổi amino acid có thể biến đổi enzyme này sao cho nó thực hiện chức năng tốt hơn trong môi trường mới. Có nhiều minh họa khác nhau về protein được sửa đổi để giúp cho chúng phù hợp tốt hơn với các hoạt động công nghệ và thương mại, và một số trong đó được trình bày ở mục IV-Một số ứng dụng của công nghệ protein.

Muốn công nghệ hóa một protein cần phải hiểu biết về các nguyên lý cấu trúc của protein đó và đặc điểm của nguyên liệu để thiết kế hợp lý, hoặc sửa đổi các tính chất mong muốn. Hơn nữa, công nghệ này phải có được các công cụ sản xuất và phân tích protein mong muốn. Các công cụ và nguyên lý cơ bản hiện nay đang được phát triển song song.

Các phần dưới đây cung cấp những kiến thức cơ bản của công nghệ protein và tóm tắt một vài phát triển của lĩnh vực này trong thời gian gần đây.

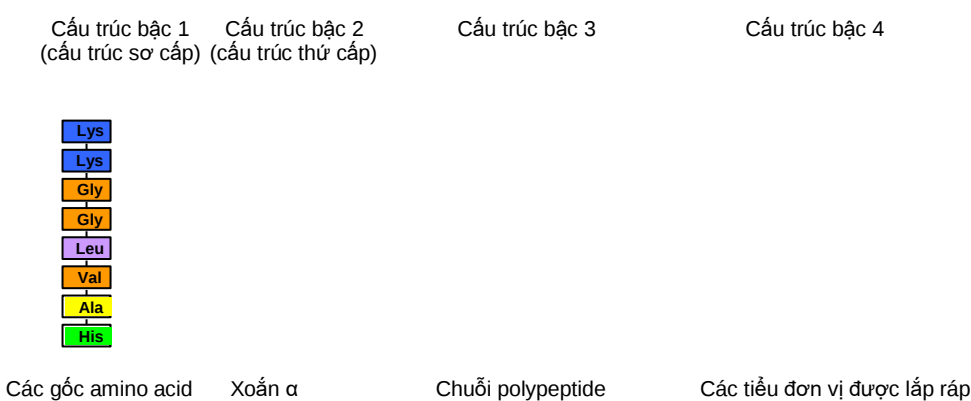
II. Cấu trúc protein

Các nghiên cứu về cấu trúc của protein đã cho thấy có thể phân biệt cấu trúc của phân tử protein thành bốn bậc như sau: Cấu trúc bậc một (cấu trúc sơ cấp) là trình tự sắp xếp các amino acid trong chuỗi polypeptide. Cấu trúc này được giữ vững nhờ các liên kết peptide (liên kết cộng hóa trị). Cấu trúc bậc hai (cấu trúc thứ cấp) là tương tác không gian giữa các gốc amino acid ở gần nhau trong chuỗi polypeptide, hay nói cách khác đó là dạng cuộn xoắn cục bộ (local fold) của từng phần trong chuỗi polypeptide. Cấu trúc này được giữ vững nhờ liên kết hydrogen được tạo thành giữa các liên kết peptide ở gần kề nhau, cách nhau những khoảng xác định. Cấu trúc bậc ba là tương tác không gian giữa các gốc amino acid ở xa nhau trong chuỗi polypeptide, là dạng cuộn xoắn trong không gian của toàn chuỗi polypeptide (overall fold), đây là hình dạng chung của chuỗi polypeptide. Các liên kết như liên kết Van der Waals, liên kết tĩnh điện, liên kết hydrogen giữa các mạch bên của các gốc amino acid đều tham gia giữ vững cấu trúc bậc ba. Cấu trúc bậc bốn xuất hiện ở những phân tử protein bao gồm hai hay nhiều chuỗi polypeptide hình cầu (bậc ba), tương tác không gian (sự sắp xếp) giữa các chuỗi này trong phân tử gọi là cấu trúc bậc bốn. Mỗi chuỗi polypeptide

này được gọi là một tiểu đơn vị (subunit). Chúng gắn với nhau nhờ các liên kết hydrogen, lực Van der Waals giữa các nhóm phân bố trên bề mặt của các tiểu đơn vị (Hình 6.1).

Tuy nhiên, đến nay nhiều vấn đề cơ bản về các tính chất của protein vẫn chưa được giải quyết, ví dụ cơ chế cuộn xoắn protein vẫn còn là chủ đề của một số cuộc tranh luận.

Phần tiếp theo dưới đây sẽ mô tả các công cụ cơ bản của công nghệ protein và một loạt các ví dụ thành công trong lĩnh vực này.



Hình 6.1. Các bậc cấu trúc của một phân tử protein

III. Các công cụ

1. Nhận dạng trình tự

Hiện nay, nhận dạng trình tự (sequence identification), bằng phân tích trình tự gen hoặc protein là một quá trình tương đối không khó khăn. Các cơ sở dữ liệu lớn hiện có chứa nhiều ngàn trình tự khác nhau. Hơn nữa, các dự án phân tích trình tự genome đang cung cấp các trình tự mới và các khung đọc mở (open reading frame) với một tốc độ tăng lên liên tục. Các chức năng của nhiều trình tự này đã được biết, từ các dữ liệu di truyền hoặc hóa sinh, hoặc bằng sự tương đồng trình tự đối với các trình tự chưa biết khác. Điều này đã giúp cho công nghệ protein một phương pháp tiếp cận với sự thiết kế hợp lý.

2. Xác định cấu trúc và mô hình hóa

Các thông số về cấu trúc có độ phân giải cao, được xác định bằng tia X hoặc tinh thể học điện tử (electron crystallography) hoặc kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR), là điểm cốt lõi của sự hiểu biết về hóa sinh protein. Số lượng protein có cấu trúc độ phân giải cao đang ngày càng nhiều, nhưng vẫn còn một số lớn các trình tự đã được xác định là chưa biết. Trong lúc chờ đợi làm đầy chỗ trống trong cơ sở dữ liệu cấu trúc, khi cơ sở dữ liệu về cấu trúc toàn diện này đang được lắp ráp, thì những cố gắng khác vẫn đang được tiến hành bằng nhiều phương thức để dự báo các cấu trúc của protein.

Dự báo các cấu trúc protein từ trình tự sơ cấp (cấu trúc bậc một) có một lịch sử lâu dài và được thực hiện bằng cách mô hình hóa các trình tự mới dựa trên các cấu trúc đã biết của các trình tự hoặc các tiểu trình tự (sub-sequence) tương đồng hoặc gần tương đồng bằng kỹ thuật “xâu kim thành chuỗi” (threading), trong đó một trình tự mới được so sánh trực tiếp với các kiểu cấu trúc đã biết.

3. Biến đổi trình tự

Biến đổi một protein đang tồn tại bằng cách sửa đổi trình tự gen hiện nay là một công việc bình thường và lĩnh vực này bây giờ là phần ít khó khăn nhất của quá trình công nghệ. Từ đầu 1980, các phương pháp biến đổi trực tiếp protein bằng phát sinh đột biến điểm định hướng oligonucleotide (oligonucleotide-directed site mutagenesis) theo phương thức tổng hợp gen hoàn chỉnh từ các oligonucleotide primer hoặc dùng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) đã trở nên thông dụng.

Các phương pháp nói trên chỉ giới hạn cho các amino acid được mã hóa bởi gen. Tuy nhiên, nhiều trình tự cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp protein theo phương pháp hóa học trong điều kiện *in vitro*, phương thức này cũng cho phép hợp nhất các amino acid không được mã hóa trong chuỗi protein.

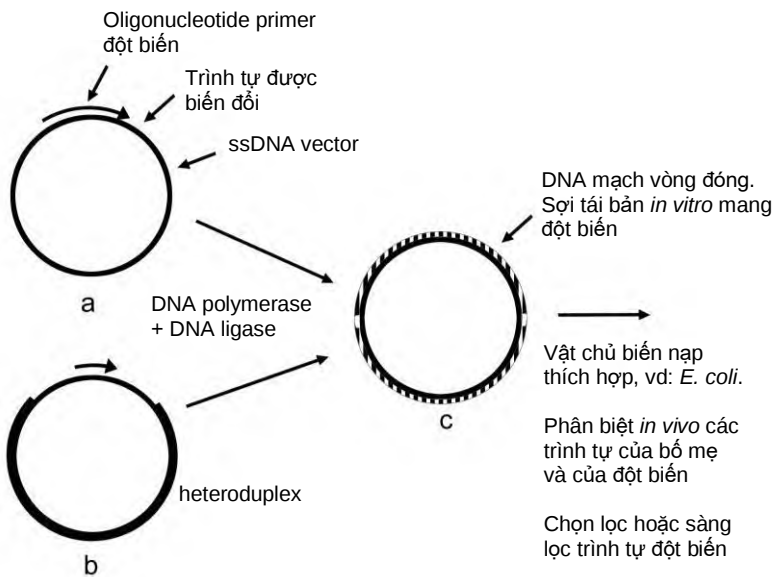
▪ Các phương pháp phát sinh đột biến điểm định hướng

Có hai phương pháp cơ bản để sửa đổi một trình tự mã hóa đang tồn tại của protein ở mức độ DNA. Cả hai phương pháp đều đòi hỏi gắn (ù) một

hoặc nhiều oligonucleotide (ít nhất là tạm thời) trên DNA sợi đơn (single strand DNA, ssDNA), sau đó hoạt tính DNA polymerase *in vitro* sẽ xúc tác để mở rộng các oligonucleotide này. Hai phương pháp đó là:

- Phương pháp không dùng PCR

Ở các phương pháp không dùng PCR, trình tự DNA được biến đổi liên kết với gốc tái bản (ví dụ plasmid, bacteriophage hoặc phagemid), cho phép khuếch đại *in vivo* kiểu gen bố mẹ hoặc kiểu gen đã được sửa đổi. Một oligonucleotide tổng hợp mang đột biến cần thiết được gắn với khuôn mẫu ssDNA mạch vòng (ví dụ genome của phage có ssDNA như M13, hoặc ΦX174 hoặc dạng ssDNA của phagemid (Hình 6.2a), hoặc với một khuôn mẫu dsDNA đã được sợi đơn hóa từng phần (Hình 6.2b). Sử dụng nhiều phương pháp enzyme khác nhau có thể tạo ra khuôn mẫu ssDNA từng phần.



Hình 6.2. Phương thức phát sinh đột biến ssDNA không dùng PCR

Các oligonucleotide được ủ hoạt động như một primer cho sự tổng hợp *in vitro* DNA bằng cách dùng enzyme DNA polymerase, thường dùng là DNA polymerase T4 hoặc T7, cùng với sự hiện diện của enzyme DNA

ligase, các phân tử DNA sợi đôi (dsDNA) mạch vòng đóng sẽ được tạo ra (Hình 6.2c). DNA sợi đôi được đưa vào trong các tế bào vật chủ thích hợp để tái bản và phân chia. Sau đó, sự biến đổi mong muốn được xác định bằng một trong số phương thức sàng lọc hoặc chọn lọc.

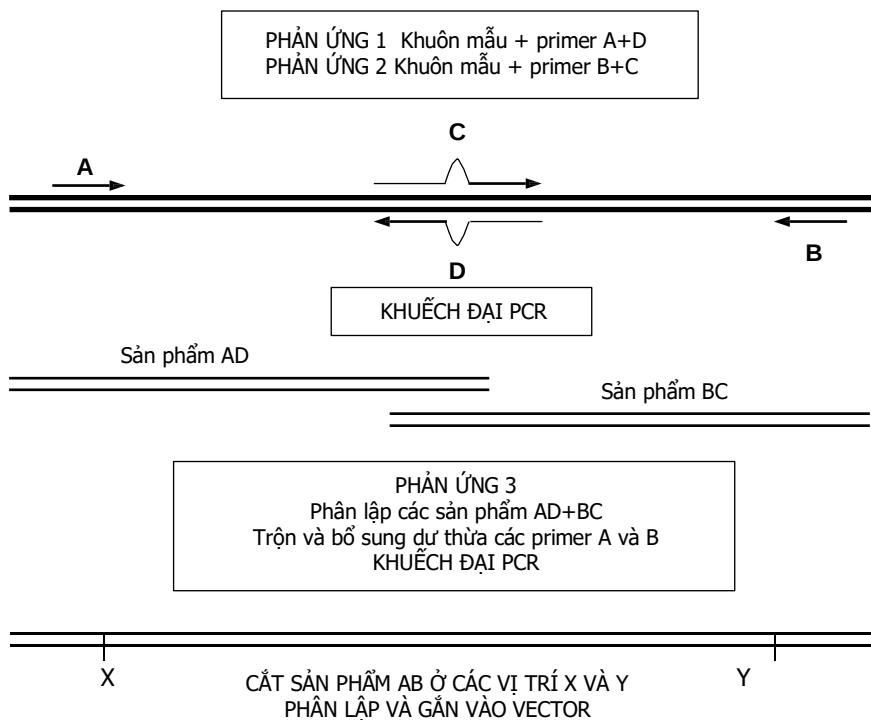
- Phương pháp dựa trên PCR

Phương pháp không dùng PCR đã biết kỹ càng và được tối ưu hóa trong nhiều năm. Tuy nhiên, gần đây các phương pháp dựa trên cơ sở PCR được ứng dụng rộng rãi hơn, đặc biệt để tái sắp xếp nhanh các vùng protein nơi mà các vị trí cắt hạn chế phổ biến thường không có sẵn.

Phương pháp dựa trên cơ sở PCR cho phép thực hiện sự biến đổi mong muốn và khuếch đại *in vitro* bằng cách ủ DNA đích (target DNA) được biến tính với một oligonucleotide mang đột biến cần thiết có thể hoạt động như một primer cho sự tái bản sợi DNA bổ sung (Hình 6.3).

Có nhiều cách thức khác nhau trong phương pháp dựa trên PCR, một số trong chúng cần các vị trí cắt hạn chế ở các oligonucleotide đột biến. Điều này có thể làm giảm số lượng các phản ứng. Ví dụ: nếu ở hình 6.3, các primer A và D có các vị trí cắt hạn chế hữu ích trong các trình tự và ở D vị trí đó là từ 3' tới trình tự đột biến, thì các sản phẩm phản ứng đầu tiên có thể được tạo dòng trực tiếp ngay sau đó. Đoạn DNA được khuếch đại sẽ liên kết với gốc tái bản của vi khuẩn trong plasmid hoặc phage và được tạo dòng bằng cách xâm nhiễm vào trong vi khuẩn.

Một cách thức khác của phương pháp dựa trên PCR cho phép các trình tự riêng biệt mã hóa cho các vùng của các protein khác nhau có thể liên kết với nhau, hoặc tái tổ chức lại các vùng trong một protein. Trong phương thức này (Hình 6.4), các primer C và D là các thể lai chứa các trình tự có thể ủ với cả hai vùng (hai trình tự nucleotide). Sau đó, các phản ứng đầu tiên sẽ tạo ra các đoạn dsDNA chồng lên nhau theo trình tự và sản phẩm mong muốn có thể được tạo ra trong phản ứng thứ ba bằng cách dùng các primer A và B. Trong tất cả trường hợp, thiết kế các trình tự oligonucleotide và các điều kiện phản ứng cần phải được xem xét cẩn thận cùng với sự chọn lựa chính xác của DNA polymerase ổn nhiệt. Tuy nhiên, các phương thức này cho phép tiến hành rất nhanh và có hiệu quả rất cao.

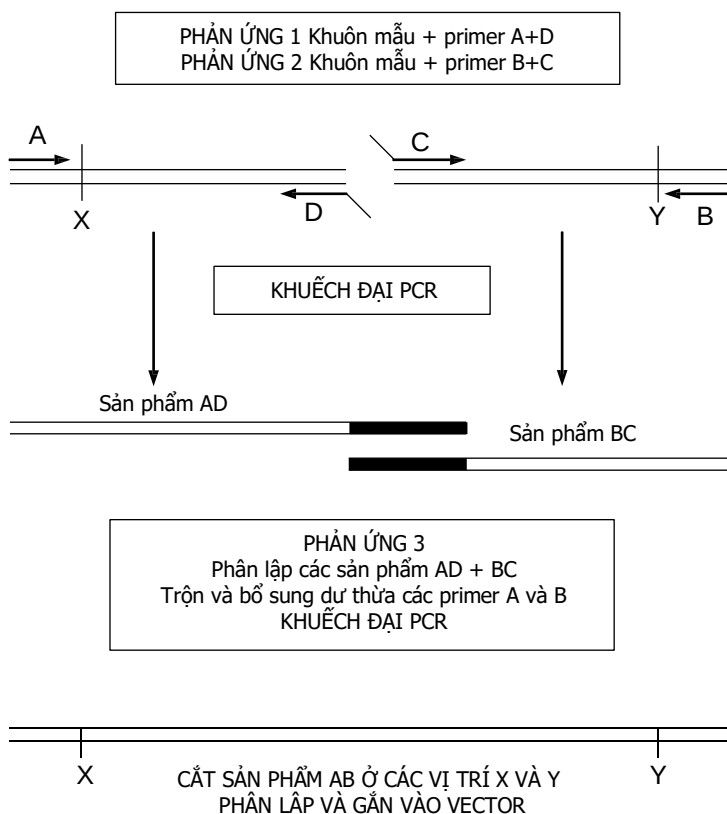


Hình 6.3. Phát sinh đột biến PCR bằng sự mở rộng chông lấp đơn

4. Phát triển phân tử (molecular evolution)

Trong nhiều trường hợp sự biến đổi có định hướng của một trình tự không phải là phương thức thích hợp để thu được kết quả mong muốn, bởi vì thường không xác định được các amino acid đích nằm ở đâu và biến đổi chúng thành cái gì. Vì thế, một số phương thức khác đã được phát triển để sản xuất và thử nghiệm các thư viện lớn hoặc các tập hợp biến thể (repertoires of variants) của một trình tự đặc biệt.

Các phương thức này thường dựa vào ba đặc điểm chính: Thứ nhất, đó là nucleic acid mã hóa cho trình tự protein quan tâm duy trì liên kết vật lý với protein. Liên kết này có được nhờ sự hiện diện của protein trên bề mặt của bacteriophage hoặc vi khuẩn hoặc tế bào eukaryote và trình tự mã hóa nằm trong phage hoặc tế bào, hoặc trên polysome mà ở đó mRNA và protein mới được dịch mã vẫn còn được liên kết nhờ ribosome.



Hình 6.4. Dung hợp vùng PCR

Thứ hai, một phương pháp được phát triển để tạo ra một số lượng lớn các biến thể bằng cách đưa các đoạn oligonucleotide thoái biến (degenerate oligonucleotide) vào trong trình tự mã hóa theo phương thức chèn đoạn cassette hoặc dùng kỹ thuật PCR, hoặc bằng phương thức phát sinh đột biến *in vitro*. Tuy nhiên, với các phương thức như thế thì mỗi lần chỉ có một đoạn nhỏ protein được sửa đổi. Các thư viện bị giới hạn bởi khả năng tiếp nhận các thành viên riêng rẽ của tế bào vật chủ, và trong trường hợp này thì 10^{12} - 10^{14} được xem là một số lượng lớn.

Thứ ba, các phương pháp này đòi hỏi một phương thức sàng lọc hoặc chọn lọc từ thư viện các trình tự protein mới có kiểu hình quan tâm. Phương thức sàng lọc bao gồm việc gắn với một phối tử có thể dễ dàng thực hiện. Phương thức này cũng đòi hỏi phải có sự xúc tác và kết quả là các protein

xuất hiện được giữ lại trên một giá thể rắn. Các hệ thống chọn lọc thường bao gồm sự bổ sung một chức năng cần thiết trong cơ thể vật chủ.

Những protein hữu ích đã được phân lập từ các phương thức trên có thể được khuếch đại bằng cách nhân (sinh sản) phage hoặc tế bào vi khuẩn mang trình tự gen của nó, hoặc bằng cách khuếch đại trực tiếp các trình tự của chính gen nhờ kỹ thuật PCR để làm giàu trình tự mong muốn. Các phương pháp loại này nhanh chóng trở thành kỹ thuật quan trọng cho công nghệ protein và được gọi bằng thuật ngữ phát triển định hướng (directed evolution).

5. Thiết kế trình tự *de novo*

Thiết kế *de novo* protein là một công việc rất phức tạp. Về nguyên tắc, đối với một protein bất kỳ có (n) gốc amino acid thì khả năng sẽ có 2×10^n trình tự khác nhau. Các cơ sở dữ liệu về cấu trúc và trình tự protein cho thấy ở nhiều trình tự sự cuộn xoắn có thể được điều chỉnh tương tự nhau và như vậy chúng có thể thực hiện các chức năng như nhau. Vì thế, phương pháp tiếp cận ngược lại để chọn lựa sự cuộn xoắn thích hợp và sau đó xác định trình tự nào cần thiết để tạo ra sự cuộn xoắn và chức năng mong muốn có thể là thích hợp hơn cả. Dahiyat và Mayo (1997) đã mô tả các phương pháp máy tính để thiết kế các trình tự của vùng peptide. Chỉ khi có trình tự peptide thì protein mới có thể được xây dựng hoặc bằng tổng hợp peptide (nếu trình tự có kích thước vừa phải) hoặc bằng tổng hợp gen. Gần đây, các phương pháp khuếch đại PCR để tổng hợp gen thường được sử dụng để làm đầy và khuếch đại từng phần các oligonucleotide chồng lên nhau (overlap extension).

6. Biểu hiện

Khi một trình tự mới được xác định cần phải cho nó biểu hiện để chứng minh chức năng của protein. Sự biểu hiện của các protein tái tổ hợp là một công việc vô cùng phức tạp và các hệ thống biểu hiện vật chủ ở trong phạm vi từ vi khuẩn (*E. coli* được sử dụng phổ biến nhất), tới nấm men (chẳng hạn *Sac. cerevisiae* và *Pichia pastoris*), tới các tế bào côn trùng và các nuôi cấy tế bào động vật có vú, và cuối cùng tới động-thực vật chuyển gen. Quy mô sản xuất protein cũng thay đổi khác nhau. Ở các giai đoạn đầu của quá trình phát triển một protein mới, ví dụ một phân tử protein được

nhận dạng trong một thư viện thể hiện, thì chỉ một lượng nhỏ (μg) của protein là đủ để xác nhận một đặc tính sinh học. Trong giai đoạn hai, cần có một lượng nguyên liệu tinh sạch lớn hơn (từ 10 đến 100 mg) để thu được các thông tin về cấu trúc đặc trưng và thực hiện thêm một số thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Trong một vài trường hợp, có thể cần lượng nguyên liệu được tinh sạch lớn hơn (từ vài g đến vài kg) bằng các phương thức nghiêm ngặt (và thường là tốn kém) nếu protein được sản xuất để sử dụng cho các mục đích thương mại (ví dụ các enzyme công nghiệp).

Thông thường, người ta phải thử nghiệm một số phương pháp khác nhau để tìm kiếm một vật chủ biểu hiện thích hợp, vì một protein được sửa đổi sẽ không thể biểu hiện trong cùng một kiểu như trình tự của bố mẹ (thỉnh thoảng là tốt hơn, nhưng thường là không). Các yếu tố này trở nên quan trọng hơn khi nhiều phương thức dựa vào các hệ thống thư viện thể hiện, trong đó các thành viên của thư viện có thể bị mất hoặc không được miêu tả đúng mức do biểu hiện kém hoặc do cuộn xoắn không đúng. Đã có rất nhiều thử nghiệm để cải thiện sự biểu hiện và điều chỉnh sự cuộn xoắn protein của các hệ thống vật chủ, đặc biệt là *E. coli*. Để khắc phục một số vấn đề này, các hệ thống phiên mã-dịch mã *in vitro* cũng đã được sử dụng và đang được tối ưu hóa cho sản xuất ở quy mô nhỏ một cách hiệu quả các protein mới với các số lượng thích hợp cho phân tích.

7. Phân tích

Cần phải có nhiều phương pháp khác nhau để phân tích đặc điểm của các protein được sửa đổi. Khi một chức năng được sửa đổi (đưa vào, biến đổi hoặc loại bỏ) thì một phương pháp thử nghiệm sinh học thích hợp có thể được phát triển để xác định khả năng của protein mới được sản xuất. Trong đó, phải đảm bảo rằng phép thử nghiệm có thể tiến hành với một lượng rất nhỏ của nguyên liệu, chẳng hạn các nguyên liệu thu được từ phương thức khuếch đại thư viện.

Trong nhiều trường hợp, việc đạt được và chứng minh chức năng mới của protein là quan trọng nhất. Tuy nhiên, thêm vào các phép thử nghiệm chức năng, để giải thích các kết quả thường đòi hỏi một sự hiểu biết đầy đủ cấu trúc được sửa đổi, đặc biệt để có được sự hiểu biết sâu sắc sau này về sự cuộn xoắn của protein. Việc đánh giá số lượng trung bình của protein mới có thể được tiến hành, các tính chất thô có thể được phát hiện bằng kính

quang phổ (spectroscope) hoặc các phép đo quy mô lớn khác, ví dụ: các tính chất lưỡng hướng sắc vòng (circular dichroism), độ đục (turbidity), ethalpy, độ lắng đọng (sedimentation) hoặc sắc ký (chromatography). Tuy nhiên, thông tin cấu trúc chi tiết của sản phẩm cuối cùng vẫn còn là bước hạn chế trong thiết kế và triển khai công nghệ protein thích hợp. Gần đây, kết quả của Casimiro và cộng sự (1997) đã cho thấy sự tổng hợp gen dựa trên cơ sở PCR, biểu hiện trong *E. coli* của một lượng protein (mg) được đánh dấu đồng vị phóng xạ và phổ NMR có thể được thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn.

IV. Một số ứng dụng của công nghệ protein

1. Các đột biến điểm

Các đột biến điểm riêng rẽ trong các protein có thể thu được chỉ khi có trình tự gen thuận lợi, bằng cách dùng các kỹ thuật đã được trình bày ở trên. Dưới đây là một vài ví dụ điển hình:

1.1. Betaseron/Betaferon (Interferon β -1b)

Một trong những kết quả đầu tiên của công nghệ được phẩm protein là sản xuất interferon β -1b. Protein mới này được tạo ra bởi sự thay thế của cysteine (Cys) cho serine (Ser) ở gốc thứ 17 của phân tử interferon β dài 154 amino acid. Protein được tổng hợp biểu hiện trong *E. coli* một hoạt tính đặc trưng gần với interferon β tự nhiên có nguồn gốc từ fibroblast. Phân tử này đã được đăng ký bản quyền từ 1993 để sử dụng cho việc làm giảm tần số và mức độ khốc liệt của sự tái phát ở những bệnh nhân đi lại được có sự tái phát yếu bệnh đa xơ cứng.

1.2. Humalog (Lispro Insulin)

Humalog là một dạng biến đổi gen của insulin người trong đó hai gốc ở C-terminus của chuỗi B, proline (Pro) và lysine (Lys) ở các vị trí 28 và 29, tương ứng, được đảo ngược thứ tự của chúng. Humalog là một dạng đồng đẳng hoạt động nhanh của insulin, được thiết kế để bắt chước tốc độ đáp ứng insulin tự nhiên của cơ thể đối với thực phẩm. Sự biến đổi C-terminus được thiết kế dựa trên cơ sở cấu trúc và sự tương đồng trình tự với nhân tố sinh trưởng 1 giống insulin (insulin-like growth factor 1, IGF-1) và việc đảo

ngược thứ tự đã giảm sự nhị trùng hóa (dimerization) của tiểu đơn vị B. Humalog đã được đăng ký bản quyền sử dụng trước 1996.

1.3. Các tá dược vaccine mới (adjuvants)

Gần đây, các phương pháp tiếp cận mới trong việc thiết kế vaccine đã giúp cho lĩnh vực y học này có những phát triển quan trọng. Nhiều loại vaccine hiện nay là sản phẩm công nghệ sinh học rất có giá trị. Công nghệ protein đang được sử dụng để xây dựng các phân tử protein mới cung cấp sự hỗ trợ miễn dịch (adjuvant) để gây ra một đáp ứng miễn dịch đối với một kháng nguyên đồng phân phối (co-administered antigen). Các tá dược protein mới này đang được quan tâm đặc biệt nhằm kích thích các phản ứng miễn dịch mucosal sau khi chủng ngừa bằng cách uống (oral immunization) để tránh việc sử dụng phương pháp tiêm phòng vaccine (injection for vaccination).

Những vaccine đã được khảo nghiệm tốt là độc tố của *Vibrio cholerae* (CT) và độc tố không bền nhiệt của *E. coli* (LT). Các cấu trúc tinh thể của CT và LT đã được làm sáng tỏ. Các thí nghiệm phát sinh đột biến điểm định hướng dựa trên cấu trúc của LT đã giúp có được sự hiểu biết đầy đủ về mối quan hệ của tiểu đơn vị A có hoạt tính enzyme đơn với 5 tiểu đơn vị B của các độc tố heterohexameric này, các vị trí liên kết enzyme và cofactor trong tiểu đơn vị A, cùng các điểm cắt hoạt động ở trong chúng. Các nghiên cứu này đã cho phép giải thích tại sao các độc tố đột biến vẫn ổn định để lắp ráp trong holotoxin, nhưng độc tính *in vitro* chỉ còn ở mức tối thiểu trong khi vẫn giữ lại các đặc tính miễn dịch và tá dược của chúng. Ví dụ: đột biến Ser thành Lys ở gốc 63 trong tiểu đơn vị A của LT ức chế sự liên kết với độc tính của NAD cofactor cho hoạt tính ADP ribosyltransferase. Đột biến S63K này cho thấy cường độ độc tính giảm sáu lần trong khi các đặc tính vẫn duy trì khả năng miễn dịch và tá dược. Một trường hợp khác, đột biến ở gốc 192 (arginine-Arg thành glycine-Gly) trong tiểu đơn vị A của LT cũng đã được thực hiện. Đột biến này xảy ra ở vị trí mà tại đó tiểu vùng A1 bị phân giải khỏi tiểu vùng A2 và đây là bước đầu tiên trong hoạt động chức năng enzyme của tiểu đơn vị A. Đột biến cũng tạo ra độc tố bất hoạt enzyme để duy trì các đặc tính tá dược. Các độc tố đột biến này hiện nay đang được

thử nghiệm trong các nghiên cứu lý thuyết và lâm sàng để đánh giá lợi ích của chúng.

2. Sắp xếp lại vùng (liên kết, trao đổi và xóa bỏ)

Hầu hết các protein lớn do các vùng cuộn xoắn độc lập nhỏ hơn tạo thành. Các vùng này thường được liên kết cùng với các chuỗi peptide ngắn và trong nhiều trường hợp, nhưng không phải tất cả, các vùng này có thể xác định như là các exon phân chia trong trình tự gen. Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, người ta có thể bổ sung, loại bỏ hoặc trao đổi các vùng từ một protein này tới protein khác để xây dựng lại các phân tử protein.

2.1. Các vùng liên kết

2.1.1. Các dung hợp vùng cho tế bào đích

Một trong các minh họa đầu tiên của công nghệ protein là vùng có vị trí liên kết của kháng thể được liên kết di truyền với enzyme. Đơn vị kháng thể cơ bản là một cấu trúc có dạng Y hoặc T bao gồm hai chuỗi nặng có khối lượng phân tử 50 kDa và hai chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử 25 kDa, vùng liên kết kháng nguyên được gọi là vùng Fab (antigen binding), gồm có các đầu tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các đầu tận cùng C của hai chuỗi nặng cùng phối hợp để tạo thành vùng dễ kết tinh gọi vùng Fc (crystallisable). Vùng sau liên quan với những tương tác giữa các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch và với bề mặt, cũng là yếu tố quan trọng trong việc xác định chu kỳ bán phân rã (half-life) huyết thanh của các kháng thể, ít nhất là loại IgG.

Dung hợp gen enzyme-kháng thể được thực hiện bằng cách dùng trình tự DNA mã hóa cho thành phần chuỗi nặng của Fab của kháng thể để liên kết nó với trình tự mã hóa cho nuclease của khuẩn tụ cầu hoặc trình tự mã hóa cho DNA polymerase của *E. coli*. Các gen dung hợp sau khi được chuyển vào tế bào sản xuất chuỗi nhẹ của kháng thể đã biểu hiện và khôi phục lại cả hai hoạt tính enzyme và liên kết kháng nguyên. Các nghiên cứu đầu tiên theo hướng này đã cung cấp cơ sở cho những hướng nghiên cứu khác, trong đó một chức năng liên kết (kháng thể, cytokine, nhân tố sinh trưởng hoặc vùng liên kết phối tử ngoại bào (ECD) của thụ thể) được gắn với một chức năng của cơ quan phản ứng lại kích thích (độc tố, enzyme,

cytokine). Một vùng liên kết không phải kháng thể (non-antibody) có thể được gắn với vùng Fc của một kháng thể (tận dụng ưu điểm của chu kỳ bán phân rã dài huyết thanh của các kháng thể) để cải thiện các đặc tính động học dược phẩm (pharmacokinetic) của một phân tử được thiết kế.

Chẳng hạn, EnbrelTM (etanercept) gần đây đã được đăng ký bản quyền sử dụng cho người. EnbrelTM gồm có các vùng thụ thể ngoại bào cho nhân tố α gây hoại tử khối u (TNF α) được dung hợp di truyền với các vùng Fc của IgG để dùng trong việc ngăn chặn hoạt tính của TNF α . EnbrelTM hiện nay đã đăng ký bản quyền để sử dụng cho điều trị làm giảm các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh viêm khớp từ vừa phải đến khốc liệt ở các bệnh nhân có các phản ứng không đầy đủ đối với một hoặc nhiều loại thuốc chống viêm khớp.

2.1.2. Các cytokine được dung hợp

Các cytokine khác nhau thường có các chức năng chồng chéo nhau (overlapping function), hoặc có thể hoạt động hợp lực trên cùng tế bào để gây ra một thay đổi sinh lý đối với tế bào đó. Liên kết các cytokine bằng cách dung hợp các gen trong khung (in-frame) buộc hai nhóm chức năng lại với nhau và có thể về nguyên tắc dẫn đến hiệu quả sinh học mong muốn ở các liều thấp hơn nếu được thực hiện riêng rẽ. Các dung hợp kiểu này đã được thực hiện ở trường hợp interferon cách đây hơn một thập kỷ. Gần đây hơn PIXY321, một dạng dung hợp của GM-CSF và IL-3 cũng đã được khảo sát. Trong trường hợp này, các gen GM-CSF và IL-3 được sửa đổi để loại bỏ các vị trí N-glycosylation của động vật có vú và sau đó được liên kết với nhau nhờ bổ sung một đoạn nối gồm 15 amino acid linh hoạt giữa C-terminus của GM-CSF và N-terminus của IL-3. Nấm men biểu hiện PIXY321 cho thấy ái lực thụ thể đã được tăng cường, hoạt tính sinh sản và hoạt tính kích thích tạo khuẩn lạc cũng đã được so sánh với một trong số các protein khởi đầu monomer.

2.2. Trao đổi các vùng protein

Một phương thức đơn giản khác được dùng trong công nghệ protein là trao đổi các vùng hoàn chỉnh, trong đó các vùng tương tự của các nguồn khác nhau được trao đổi trong một protein đa vùng để cung cấp một chức năng mới.

2.2.1. Các kháng thể khảm người-chuột

Ở đây các vùng liên kết kháng nguyên ở kháng thể đơn dòng của chuột được gắn với các vùng không thay đổi (nơi cung cấp các chức năng phản ứng lại kích thích miễn dịch và điều khiển chu kỳ bán phân rã sinh học) của một kháng thể người. Sự chuyển đổi (switching) này có thể làm giảm rõ rệt khả năng tạo miễn dịch (immunogenicity) không mong muốn so với kháng thể gốc của chuột. Tới nay đã có bốn sản phẩm kháng thể khảm đã được đăng ký bản quyền là các dược phẩm, kể cả phức hợp chống tiểu huyết cầu (anti-platelet) ReoProTM.

2.2.2. Xóa các vùng

Hoạt tố plasminogen mô (tPA) là một serine protease tách chiết từ các tế bào màng trong. Sau khi liên kết với fibrin, tPA hoạt hóa plasminogen thành plasmin đây là yếu tố khởi đầu phân giải huyết khối cục bộ (local thrombolysis). Reteplase là một dạng biến thể mà 3 trong 5 vùng của tPA đã bị xóa. Một trong các vùng có khả năng chọn lọc fibrin và vùng xúc tác được giữ lại. Reteplase được đăng ký bản quyền như là Retavase dùng cho việc điều trị chứng nhồi máu cơ tim cấp tính để cải thiện dòng chảy của máu (blood flow) trong tim.

3. Sắp xếp lại toàn bộ protein

Nhiều protein tồn tại như là các thành viên của một họ lớn, trong đó những protein tương đồng thể hiện các hoạt tính sinh học hơi khác nhau. Ở thời kỳ đầu của công nghệ protein, các gen lai được tạo ra bằng cách dung hợp các trình tự nucleotide thông qua các vị trí cắt hạn chế thông dụng, hoặc nhờ sự tái tổ hợp *in vivo* giữa các gen tương đồng trong một kiểu ngẫu nhiên hơn. Các phương pháp này sản xuất một số lượng nhỏ các gen mới có thể được kiểm tra riêng rẽ. Gần đây hơn, các dạng tương đồng của protein đã được sử dụng để tạo ra các thư viện biến thể mới rất lớn. Theo phương thức này, các gen đại diện cho hai hoặc nhiều thành viên của họ được phân đoạn ngẫu nhiên bằng enzyme DNase I. Các đoạn này sau đó được dùng như các PCR primer để tạo ra các trình tự gen mới bằng cách lai ngẫu nhiên giữa các đoạn. Các biến thể mới sau đó có thể được nhận biết bằng phương thức chọn lọc hoặc sàng lọc như đã nêu trước đây. Một số trường hợp đã được tạo ra theo phương thức này là các enzyme, cytokine và các vị trí liên kết kháng thể.

4. Các tương tác protein-phối tử

4.1. Biến đổi enzyme

Trong công nghệ protein, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện theo hướng thay đổi enzyme để kiểm tra và biến đổi các tương tác enzyme-cơ chất. Các loại thay đổi bao gồm: tăng hoạt tính xúc tác; biến đổi tính đặc hiệu cơ chất, kể cả sự phát sinh *de novo* các chức năng xúc tác mới; biến đổi các profile của pH để một enzyme có thể hoạt động trong các điều kiện không sinh lý (non-physiology); cải thiện sự chống oxy hóa bằng cách thay thế các amino acid nhạy cảm với sự oxy hóa như Cys, tryptophan (Trp) hoặc methionine (Met) bằng các amino acid không thể oxy hóa có cấu trúc không gian tương tự (sterically similar) như Ser, phenylalanine (Phe) hoặc glutamate (Glu), tương ứng; cải thiện khả năng ổn định đối với các kim loại nặng bằng cách thay thế các gốc Cys và Met và các nhóm carboxyl bề mặt; loại bỏ các kiểu phân cắt của protease; loại bỏ các vị trí mà ở đó sản phẩm xúc tác có thể liên kết theo một kiểu khác để cảm ứng sự ức chế ngược khác vị trí (allosteric).

4.2. Các chất chủ vận hormone (hormone agonist)

Sự phát triển các chất siêu chủ vận (super-agonist) có hoạt tính sinh học tăng lên rõ rệt có thể làm tăng ái lực liên kết của các hormone với các receptor của chúng. Grossmann và cộng sự (1998) đã mô tả sự thiết kế các biến thể của TSH người (human thyroid-stimulating hormone) có hoạt tính tăng lên 1.300 lần. Các biến thể được thiết kế dựa trên sự tương đồng với hCG (kích dục tổ màng đệm của người-human chorionic gonadotrophin), một loại glycoprotein hormone khác chia sẻ một tiểu đơn vị α chung. Sự thay thế các nhóm tích điện dương trong một vùng móc (loop region) của TSH đã phối hợp tăng hoạt tính của chúng.

4.3. Thay thế các liên kết đặc hiệu

Thay thế các liên kết đặc hiệu được thực hiện bằng cách chuyển vùng đặc hiệu cho một phối tử từ một protein này đến một protein khác. Một số trường hợp đòi hỏi những thay đổi nhỏ, một số khác đòi hỏi việc chuyển đổi ở quy mô lớn của nhiều gốc. Ví dụ tính đặc hiệu của hormone prolactin được biến đổi bằng cách thay thế 8 amino acid ở receptor liên kết bề mặt sao

cho hormone được biến đổi sẽ liên kết với receptor của hormone sinh trưởng.

Các phân tử protein thường có các vùng loop nối giữa các kiểu cấu trúc thứ cấp khác nhau (α -helix, β -strand). Trong một số trường hợp chức năng của các gốc protein trong các loop này có thể là mục tiêu cho các thí nghiệm thay thế tương đối đơn giản. Ví dụ: đặc trưng của nhân tố sinh trưởng có tính base của fibroblast được biến đổi thành loại có tính acid bằng cách thay thế một vùng loop đặc biệt.

V. Sản xuất protein trên quy mô lớn

Nuôi cấy các vi sinh vật trên quy mô lớn là phương pháp kinh tế nhất do có các ưu điểm sau:

- Sử dụng các môi trường đơn giản, rẻ tiền.
- Các chu kỳ lên men ngắn ngày.
- Có thể kiểm soát trạng thái sinh lý của vi sinh vật trong quá trình lên men và đảm bảo được tính đồng nhất của các mẻ lên men.
- Có thể kế hoạch hóa việc thu hoạch protein một cách hợp lý, phù hợp với các quá trình phân tách và tinh sạch đầu ra.
- Hiệu suất protein có thể được tăng lên nhiều lần bằng cách cải thiện các chủng truyền thống và phát triển quá trình lên men, cùng với việc sử dụng thêm công nghệ DNA tái tổ hợp.
- Các kỹ thuật tái tổ hợp DNA cũng mở ra các cơ hội cho việc sản xuất sinh khối enzyme từ việc nuôi cấy những loài vi sinh vật đòi hỏi điều kiện sinh trưởng khắc khe như: môi trường dinh dưỡng đắt tiền hoặc phải bổ sung các nhân tố cảm ứng (inducers)...
- Các enzyme của các dạng vi sinh vật sống ở điều kiện khắc nghiệt (sinh trưởng ở các điều kiện cực đoan của nhiệt độ, muối, áp lực thẩm thấu, kiềm) nhờ kỹ thuật tái tổ hợp DNA nay có thể sinh trưởng thuận lợi trong các nuôi cấy mesophilic (ưa nhiệt trung bình 20-40°C), và có thể sản xuất các enzyme với các đặc điểm chịu nhiệt hoặc chịu muối ở nồng độ cao.

1. Lên men *E. coli* tái tổ hợp

Các enzyme có nguồn gốc từ các sinh vật prokaryote có thể được sản xuất dễ dàng trên quy mô lớn với hiệu suất cao trong các vật chủ *E. coli* tái tổ hợp. Các quá trình lên men này có thể được tiến hành ở quy mô từ 3.000-6.000 L, và không đòi hỏi các bước cấy gây (inoculum culture) phức tạp. Một cấu trúc vật chủ thích hợp cho quá trình lên men đặc trưng có thể như sau:

Vật chủ *E. coli* mang (1) plasmid vector có gen mã hóa cho enzyme cần thiết, (2) cùng với gen chỉ thị kháng kháng sinh thích hợp như ampicillin hoặc neomycin, và (3) một nhân tố cảm ứng như là TAC (bộ ba đặc trưng cảm ứng lactose hoặc isopropylthiogalactose).

Hiệu quả sản xuất cao như mong muốn có thể đạt được bằng cách lên men mẻ có cung cấp dinh dưỡng, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ chứa các thành phần cho sự sinh trưởng ban đầu của vi khuẩn, ví dụ: glucose 2%, dịch chiết nấm men (yeast extract) 1%, phosphate 1% và các loại muối khác cùng với kháng sinh được chọn. Sau khi sự sinh trưởng ban đầu được thiết lập, các chất dinh dưỡng bổ sung được cung cấp ở các tỷ lệ thích hợp đảm bảo đủ nguồn carbon và nitrogen.

Nguồn carbon thuận lợi là glucose, và nitrogen có thể là một phức hợp tự nhiên (chẳng hạn như dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein), sirô ngô (corn sirup), một loại muối ammonium đơn hoặc urea.

Nuôi cấy *E. coli* trong môi trường có bổ sung các hỗn hợp amino acid cho khả năng sinh trưởng và sản xuất protein nhanh hơn, tuy nhiên việc sử dụng các nguồn dinh dưỡng đơn giản hơn (chẳng hạn nguồn nitrogen), mặc dù có thể đòi hỏi thời gian lên men lâu hơn, vẫn có thể tạo ra sự sinh trưởng của tế bào và hiệu suất protein cao tương tự.

Sản xuất enzyme được cảm ứng thuận lợi bằng cách bổ sung isopropylthiogalactoside từ 30-300 mg/L, hoặc lactose từ 1-10 g/L. Việc quyết định thời gian và tần số bổ sung chất cảm ứng là rất quan trọng để thu được hiệu suất enzyme cực đại.

Mật độ tối ưu trên 200 của OD_{600nm} (50 g khối lượng khô của tế bào/L) và sự biểu hiện protein khoảng 10 g/L (30% của protein tổng số) là một kết quả lên men mong muốn. Quá trình lên men thường thực hiện trong

hai ngày ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của cơ thể, nghĩa là từ 24-28°C.

2. Lên men nấm

Các loài nấm vật chủ như *Aspergillus* và *Fusarium*, và nấm men hướng methyl (*Pichia*) thích hợp cho sản xuất các protein glycosyl hóa từ các nguồn động vật hoặc nấm. DNA của protein được hợp nhất trực tiếp trong DNA nhiễm sắc thể cùng với hệ thống promoter điều hòa biểu hiện gen.

Các vật chủ tái tổ hợp có thể được lên men trong một kiểu tương tự như các nuôi cấy không tái tổ hợp và lên men mật độ cao của tế bào có thể dễ dàng thu được bằng cách dùng các phương pháp của kỹ thuật sinh học truyền thống.

Các vật chủ *Aspergillus* hoặc *Fusarium* có thể được sinh trưởng trên các nguyên liệu thô rẻ tiền như bột đậu tương có bổ sung thêm chất dinh dưỡng là sirô ngô. Nấm men, như *Saccharomyces* và *Pichia*, có thể sinh trưởng trên dịch chiết nấm men hoặc các dịch thủy phân protein và sirô ngô.

Quá trình nuôi cấy có thể cho sinh khối tế bào cao bằng cách sử dụng các môi trường đã được xác định đầy đủ có bổ sung xen kẽ thêm một vài chất dinh dưỡng khác. Lên men đặc trưng kéo dài từ 4-8 ngày. Sự biểu hiện protein vượt quá 10 g/L đã thu được ở quy mô công nghiệp.

3. Các enzyme vi sinh vật thay thế các enzyme động-thực vật

Một số enzyme công nghiệp vẫn được tách chiết từ các nguồn động vật như bò tiềm ẩn nguy cơ của sự nhiễm bản bệnh não dạng xốp của bò (bovine spongiform encephalopathy). Chẳng hạn renin, sau khi thu từ dạ dày của bê con mới sinh sẽ được sử dụng để làm phomat. Nó vẫn không được đảm bảo liệu có hiện diện bất kỳ rủi ro nào cho sức khỏe của người tiêu dùng hay không, tuy nhiên renin tái tổ hợp của bê con hiện nay có thể được sản xuất nhờ lên men vi sinh vật là hoàn toàn an toàn.

Một cách khác, bằng phương thức tách chiết enzyme truyền thống từ các nguồn vi sinh vật và việc sử dụng kỹ thuật sàng lọc thích hợp, nhiều enzyme mới giống như enzyme động-thực vật hiện nay đã được sản xuất. Ví dụ:

- Enzyme protease của *Mucor* trong nhiều trường hợp đã thay thế renin từ dạ dày của bê.

- Protease của *Aspergillus* và *Bacillus* đã thay thế các enzyme dùng trong thuộc da.

- Rất nhiều loại amylase vi sinh vật được phát triển để thay thế hoặc bổ sung cho các amylase thực vật trong tạo malt của lúa mạch hoặc lúa mỳ.

- Hơn nữa, một số enzyme có nguồn gốc động vật (như hoạt tố plasminogen của mô) cũng được sản xuất trong các vi sinh vật tái tổ hợp và có thể cung cấp chuỗi protein được tái cuộn xoắn. Các enzyme glycosyl hóa của động vật có vú có thể được biểu hiện trong các cơ thể eukaryote như *Saccharomyces* và *Aspergillus*. Ở đây, vật chủ sẽ glycosyl hóa enzyme để cung cấp hoạt tính đầy đủ cho dù các đường glycosyl hóa ở đây có thể khác ở động vật có vú.

Các enzyme có thể được sản xuất trực tiếp bằng nuôi cấy tế bào động vật có vú, tuy nhiên giá thành sẽ rất cao khoảng từ 1.000-5.000 USD/gram, một mức giá chỉ có thể chấp nhận cho việc sản xuất các enzyme trị liệu đặc biệt như hoạt tố plasminogen của mô hoặc các loại protein liên quan.

4. Các nguyên tắc hóa sinh cơ bản

Hiệu suất lên men enzyme vi sinh vật có thể được cải thiện bằng các kỹ thuật kinh điển, tương tự các kỹ thuật dùng để cải thiện hiệu suất trong lên men kháng sinh. Cả hai sự cải thiện di truyền và quá trình lên men đã dẫn đến sự phát triển khả năng lên men trong sản xuất enzyme lên tới 20 kg/m³. Sự hiểu biết về điều hòa di truyền của quá trình tổng hợp enzyme là rất quan trọng trong việc chọn lọc các chủng đã được cải thiện và tối ưu các quá trình lên men. Có nhiều nhân tố quan trọng có thể ảnh hưởng đến sản xuất enzyme như sau:

4.1. Sự cảm ứng

Sự tổng hợp enzyme thường bị ức chế (điều kiện để giúp bảo tồn năng lượng từ sự tổng hợp protein không cần thiết) tức là enzyme sẽ chỉ được sản xuất trong sự hiện diện của một chất cảm ứng, thường là cơ chất của nó. Mức độ cảm ứng (induction level) có thể là rất mạnh (tăng lên hơn 1.000 lần

so với không cảm ứng) và hoạt động bằng cách gây cản trở sự điều hòa nhân tố ức chế. Nhiều enzyme dị hóa có thể được cảm ứng, như:

- Sucrose cần thiết cho sản xuất invertase.
- Tinh bột cho sản xuất amylase.
- Galactoside cho sản xuất β -galactosidase.

Trong một số trường hợp, một sản phẩm hoặc một sản phẩm trung gian cũng có thể hoạt động như một chất cảm ứng, ví dụ:

- Phenylacetate cảm ứng penicillin G amidase.
- Các acid béo cảm ứng lipase.
- Xylobiose cảm ứng các xylanase.

Sự cảm ứng sản phẩm thường xảy ra trong quá trình tổng hợp các enzyme ngoại bào cần thiết cho việc thủy phân các polymer có khối lượng phân tử lớn để chúng có thể đi vào tế bào và tiếp tục gây ra sự cảm ứng.

Các coenzyme cũng có thể hoạt động như các chất cảm ứng, ví dụ thiamine cảm ứng pyruvate decarboxylase. Hơn nữa, để có hiệu quả trong sản xuất enzyme, sự cảm ứng là điều kiện cần thiết để quyết định hợp lý thời gian sản xuất enzyme trong hệ lên men đảm bảo thu được lượng sản phẩm cao nhất.

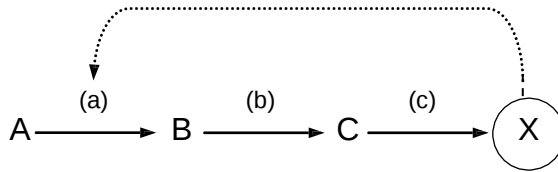
Tuy nhiên, trong thực tế sự cảm ứng thường được tiến hành bằng hỗn hợp các tác nhân cảm ứng đất liền, được khử trùng và bổ sung ở các thời gian đặc biệt để thiết lập sự lên men. Để khắc phục các vấn đề này các đột biến điều hòa có thể được sản xuất để không phụ thuộc vào các nhân tố cảm ứng và vì vậy được gọi là các đột biến cấu thành.

4.2. Ức chế ngược

- Ức chế ngược (feedback repression) là tác dụng ức chế bằng cách cố định tác động dị lập thể của một chất lên hoạt tính của ít nhất một trong những enzyme xúc tác các bước chuyển hóa dẫn đến sinh tổng hợp riêng của chất đó.

- Tổng hợp enzyme cũng được điều chỉnh bởi sự ức chế ngược xuất hiện ở các enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp các chất có phân tử lượng thấp (chẳng hạn là một loại amino acid), trong đó sự tích lũy của sản phẩm cuối cùng có thể gây ức chế sự tổng hợp các enzyme đặc biệt, thông

thường là enzyme đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp. Cơ chế của hiện tượng này được trình bày ở hình 6.5.



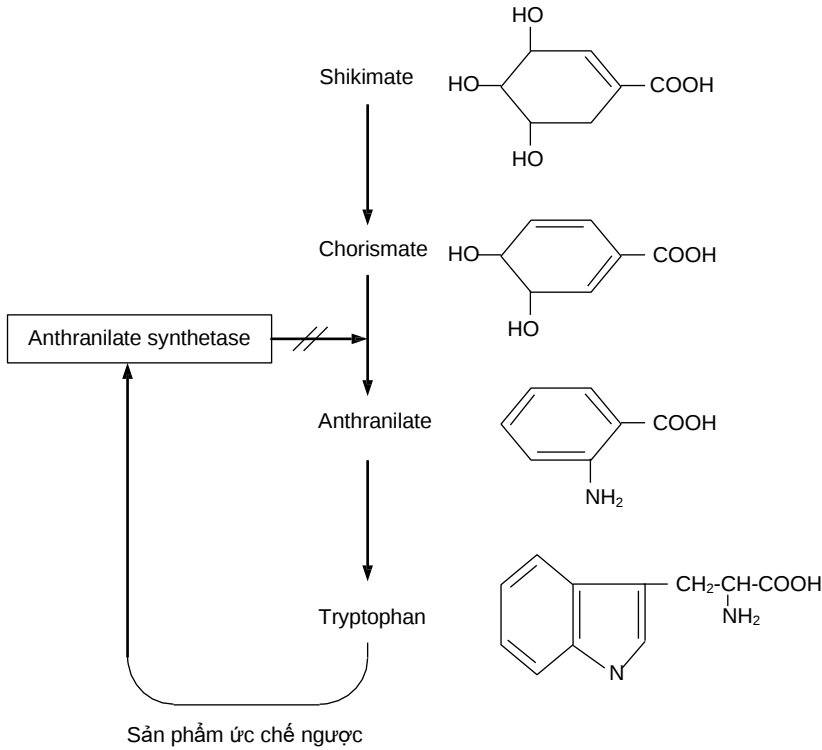
Hình 6.5. Sơ đồ chuỗi phản ứng hóa sinh tổng hợp chất (X)

- Người ta nhận thấy sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp một chất có khả năng gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp của chính nó. Sản phẩm cuối cùng dù được tế bào tổng hợp hay thu nhận từ môi trường bên ngoài, khi ở nồng độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật sẽ ảnh hưởng đến enzyme đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp.

Enzyme đầu tiên (a) là một enzyme dị lập thể. Nó có đặc điểm thay đổi cấu hình không gian khi có mặt sản phẩm cuối cùng nhằm giảm bớt hoạt tính xúc tác của mình. Ở enzyme này, ngoài vị trí gắn với cơ chất A (trung tâm xúc tác), nó còn có một hay nhiều vị trí gắn với sản phẩm cuối cùng X gọi là trung tâm dị lập thể. Trung tâm xúc tác và trung tâm dị lập thể tách biệt nhau về không gian và khác nhau về cấu trúc. Trạng thái hoạt động của enzyme này được đặc trưng ở chỗ nó có khả năng gắn với cơ chất A và nếu bên cạnh cơ chất A còn có sự hiện diện của X ở mức độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật, thì sẽ xảy ra sự bao vây của trung tâm dị lập thể, làm cho trung tâm xúc tác bị biến đổi cấu hình không gian đến mức khiến cho enzyme (a) không thể gắn được với cơ chất A mà chỉ gắn với X. Như vậy, enzyme (a) sẽ không có hiệu lực trong việc chuyển hóa A thành B. Chuỗi tổng hợp X sẽ bị gián đoạn do đó X sẽ bị giảm số lượng. Ví dụ minh họa ức chế ngược đối với tryptophan ở hình 6.6.

Các đột biến ức chế ngược có thể thu được bằng cách chọn lọc các nuôi cấy kháng các độc tố là các chất đồng đẳng của sản phẩm. Các dòng tế bào sống sót sẽ mất sự miễn cảm ngược đối với sản phẩm. Các đột biến tương tự có thể thu được bằng cách phân lập các đột biến khuyết dưỡng (nutritional auxotrophs), các đột biến này không thể tạo ra sản phẩm cuối cùng, mà phụ thuộc vào sự bổ sung hợp chất này từ môi trường bên ngoài để

sinh trưởng bình thường. Sự cung cấp chất dinh dưỡng được điều chỉnh này sẽ hạn chế các nồng độ trong nội bào tới mức để sự ức chế ngược xảy ra ít hơn.



Hình 6.6. Cơ chế ức chế ngược đối với tryptophan

4.3. Ức chế dinh dưỡng

Tổng hợp enzyme cũng có thể được điều chỉnh bằng sự ức chế dinh dưỡng đặc trưng bởi carbon, nitrogen, phosphate hoặc sulphate. Những cơ chế này tồn tại để duy trì sự sản xuất của các enzyme không cần thiết.

Dẫn chứng tốt nhất là sự điều chỉnh nhờ hiện diện của glucose mà trong đó carbohydrate này có thể làm ngừng sản xuất các enzyme cần thiết cho sự chuyển hóa của các hợp chất liên quan và không liên quan (hiệu ứng glucose). Ức chế glucose là một khái niệm chính trong nuôi cấy sinh khối tế bào ở quy mô lớn (nguyên liệu thô có giá trị kinh tế nhất của quá trình lên men). Sự ức chế dị hóa glucose có thể là rất mạnh và thường kìm hãm hiệu quả của chất cảm ứng. Các nguồn carbon khác như lactate, pyruvate,

succinate và citrate, cũng là các chất ức chế hiệu quả trong một số vi sinh vật. Thậm chí citrate cũng có thể ức chế sự chuyển hóa của glucose ở một số vi khuẩn.

Sự ức chế dị hóa glucose cũng được giải quyết về mặt di truyền bằng cách chọn lọc các đột biến chống lại hiện tượng này. Các đột biến có thể chọn lọc dễ dàng từ môi trường nuôi cấy chứa glucose và cơ chất của enzyme cần thiết, ví dụ: hỗn hợp glucose/aspartate cho phép chọn lọc các dòng sản xuất aspartate không bị ức chế glucose (aspartate được cung cấp ở đây chỉ là nguồn nitrogen). Sản xuất penicillin G amidase trong *E. coli* được tăng lên nhiều lần bằng cách chọn lọc các đột biến có khả năng sinh trưởng trên amide như là một nguồn nitrogen duy nhất trong sự hiện diện của glucose. Kết quả tạo ra các dòng vi khuẩn có khả năng sản xuất mạnh và không dễ bị ức chế bởi glucose. Sử dụng dạng đồng đẳng của glucose, 2-deoxyglucose, cũng là một phương thức hiệu quả để chọn lọc các đột biến không có ức chế glucose.

NH_4 là một nguồn nitrogen rất có giá trị, các muối ammonium là nguồn nitrogen rất rẻ so với các hỗn hợp amino acid, nhưng sự hiện diện của các amino acid thường cho phép vi sinh vật sinh trưởng mạnh và nhanh. Một số đột biến không bị ức chế bởi nguồn nitrogen cũng có thể được chọn lọc dựa trên cơ sở đặc điểm chống chuyển hóa ammonium (methyl hóa ammonium, methylammonium).

5. Công nghệ di truyền

Khả năng ứng dụng của kỹ thuật tái tổ hợp DNA hơn 10 năm qua đã có một hiệu quả rất lớn trong sản xuất protein vi sinh vật. Vật chủ *E. coli* thích hợp cho sự biểu hiện cao của protein, cung cấp protein không có glycosyl hóa. Các loài *Bacillus* thích hợp cho sản xuất các protein ngoại bào không có glycosyl hóa. Các loài *Aspergillus* cũng sản xuất rất nhiều các protein ngoại bào và hơn nữa có thể sản xuất các protein được glycosyl hóa.

Một số điểm cần lưu ý khi xây dựng các vi khuẩn và vi nấm tái tổ hợp thích hợp cho sản xuất protein quy mô lớn. Đó là:

- Chọn lựa vật chủ là vấn đề then chốt, trong đó vật chủ phải có khả năng sinh trưởng mạnh, không khuyết dưỡng và không có các hệ thống enzyme không mong muốn trong sản phẩm protein cuối cùng, chẳng hạn

không có hoạt tính β -lactamase trong vật chủ được dùng để sản xuất penicillin G amidase.

- Cấu trúc vector biểu hiện phải càng đơn giản càng tốt. Ví dụ: Hình 2.13. (Chương 2) minh họa vector biểu hiện cho gen ngoại lai trong tế bào vật chủ *E. coli* dưới sự kiểm soát của promoter T7 của bacteriophage.

Sau khi tổng hợp, protein tái tổ hợp có thể hoặc tích lũy trong tế bào chất (cytoplasm) hoặc được chuyển tới chất gian bào (periplasm). Sản xuất dư thừa protein ngoại lai này trong cytoplasm một đôi khi có thể tạo ra các thể vùi (thường chứa protein tái tổ hợp trong trạng thái không cuộn xoắn, hoặc xử lý bị hỏng). Kết quả này thường không được mong muốn vì nó gây nhiều khó khăn để tách chiết và tái cuộn xoắn các protein.

Quá trình tách chiết từ các thể vùi chỉ có giá trị kinh tế khi sản xuất các protein có giá trị cao như insulin và hoạt tố plasminogen mô. Kết quả thường được mong muốn hơn là protein được vận chuyển vào trong chất gian bào. Để hiện tượng này xuất hiện cần thiết phải có các chuỗi tín hiệu. Những chuỗi này được định vị ở đầu tận cùng amino của protein (vùng ngược hướng, upstream) và có thể được chuyển đi dễ dàng nhờ các peptidase tín hiệu. Ở một số trường hợp nhất định, sự tiết protein vào môi trường ngoại bào trong nuôi cấy *E. coli* bị hạn chế. Trong trường hợp sản xuất các protein ngoại bào, thì *Bacillus* spp., nấm men và *Aspergillus* spp. là các vật chủ thích hợp được chọn.

Các plasmid phải hiện diện một số lượng bản sao nhiều trong vật chủ và, để làm điều này, cần phải có một số áp lực chọn lọc vì một tế bào vật chủ không có plasmid sẽ phát triển nhanh hơn vật chủ có plasmid. Phương thức thích hợp nhất để chắc chắn có sự biến nạp plasmid vào tế bào vật chủ là thiết kế một gen kháng kháng sinh trên plasmid và bổ sung kháng sinh tương ứng trong môi trường sinh trưởng để chọn lọc thể biến nạp. Các hệ thống thường được sử dụng là kanamycin phosphotransferase, ampicillin - lactamase, và chloramphenicol acetyltransferase. Nồng độ kháng sinh trên 30 mg/L đủ để duy trì sự hiện diện của plasmid. Nói chung, sự biểu hiện của các protein tái tổ hợp trong nấm (như *Asper. niger*) đòi hỏi có sự hợp nhất của gen và promoter của nấm cùng với một cơ chế chọn lọc phối hợp trực tiếp (kháng kháng sinh hoặc một gen dạng hoang dại khác phục được nhân tố khuyết dưỡng của vật chủ) vào trong DNA nhiễm sắc thể.

- Các promoter cơ bản, như phosphoglycerate kinase và glyceraldehyde phosphate dehydrogenase có tác động rất mạnh và thường được chọn lựa. Các promoter được chèn vào ngược hướng với gen protein mong muốn để tối ưu hóa sản phẩm. Chẳng hạn như: promoter tinh bột có thể được dùng như là một tín hiệu thích hợp cho sản xuất -amylase, hoặc promoter phenoxycetic acid có thể được dùng để sản xuất penicillin V amidase. Thông thường chất cảm ứng hoạt hóa promoter không liên quan đến protein, ví dụ: methanol được dùng để kích thích promoter alcohol dehydrogenase trong *Pichia*, là loại có thể được kết hợp với nhiều gen protein khác nhau.

- Chất cảm ứng được chọn phải được duy trì trên một nồng độ tới hạn, tuy nhiên việc quyết định thời gian bổ sung chất cảm ứng không phải là vấn đề then chốt.

- Phát sinh đột biến điểm định hướng. Các protein đã biết trình tự amino acid và cấu trúc ba chiều có thể được biến đổi bằng đột biến điểm định hướng. Vị trí hoạt động của amino acid hoặc các vùng quan trọng khác được coi là mục tiêu để thay đổi thành các amino acid khác. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách thay đổi các mã bộ ba đặc trưng trong gen mã hóa protein và biểu hiện của protein được phân tích bằng phương pháp tạo dòng truyền thống. Các protein mới dễ dàng sản xuất bằng cách dùng các phương thức sản xuất giống như đã được phát triển cho các dạng tự nhiên, vì thay đổi các amino acid này không ảnh hưởng lên sinh trưởng của vật chủ hoặc sự biểu hiện của protein. Những thay đổi amino acid như thế đã được tăng lên một cách ổn định.

VI. Các quá trình tách chiết và tinh sạch protein

Qua nhiều năm, việc gia tăng sử dụng vi sinh vật như là một nguồn cung cấp protein, đặc biệt là các enzyme, đã cải thiện đáng kể hiệu quả sản xuất và sản phẩm được tạo ra nhiều hơn. Phần lớn enzyme sử dụng trong công nghiệp là các protein ngoại bào từ các cơ thể như *Aspergillus* sp. và *Bacillus* sp., bao gồm: -amylase, -glucanase, cellulase, dextranase, protease và glucoamylase. Nhiều loại trong số này vẫn còn được sản xuất từ các chủng gốc tự nhiên của vi sinh vật. Tuy nhiên, trong sản xuất protein để sử dụng ở các lĩnh vực chẩn đoán lâm sàng và cho các ứng dụng trị liệu, công nghệ protein và công nghệ DNA tái tổ hợp đã thể hiện một vai trò

ngày càng quan trọng. Công nghệ DNA tái tổ hợp, ngoài việc cho phép cải thiện hiệu suất cao, nó cũng cho phép chuyển các vật liệu di truyền từ động vật vào vi khuẩn vật chủ. Theo phương thức này, các protein vốn chỉ có một lượng nhỏ từ mô động vật bây giờ có thể được sản xuất trong một lượng gần như vô hạn từ các vi khuẩn sinh trưởng dễ dàng. Một ví dụ điển hình là hormone sinh trưởng người, chất này được sản xuất mỗi lần với một lượng rất nhỏ từ tuyến yên của người cho đến khi nó được thừa nhận hiện diện một rủi ro tiềm tàng đối với bệnh nhân từ sự nhiễm bản prion là yếu tố được ám chỉ trong hội chứng Creutzfeld-Jacob. Hormone sinh trưởng người bây giờ được sản xuất với một lượng lớn hơn rất nhiều từ vi khuẩn *E. coli* và nó hoàn toàn sạch không bị nhiễm prion không mong muốn.

Các protein hoặc enzyme được sản xuất bằng vi sinh vật có thể ở nội bào, ở khoang gian bào hoặc tiết vào môi trường nuôi cấy. Đối với các enzyme ngoại bào, mức độ tinh sạch cần thiết thường là tối thiểu, khi sản phẩm cuối cùng được dùng trong công nghiệp và không cần độ tinh sạch cao. Các quá trình quy mô lớn như thế có thể cho sản lượng protein lên đến hàng tấn.

Nhiều loại protein khác được sản xuất trong các hỗn hợp nội bào phức tạp đã gây ra nhiều khó khăn trong quá trình tinh sạch chúng. Những protein đòi hỏi phải tinh sạch này thường được sản xuất để sử dụng trong điều trị, do đó phải cố gắng hướng tới các tiêu chuẩn tinh sạch rất cao, và để có được điều này người ta cần phải phát triển các quy trình tinh sạch phức tạp. Một lần nữa, công nghệ DNA tái tổ hợp đã có đóng góp hiệu quả trong lĩnh vực này. Trong trường hợp các protein trị liệu, thường có những thuận lợi nếu protein quan tâm có thể được tiết hoặc vào khoảng gian bào hoặc vào trong môi trường. Điều này giúp giảm rất lớn độ nhiễm bản của protein và các đại phân tử khác, sản phẩm tinh sạch như thế thường thu được chỉ trong hai hoặc ba bước tinh sạch. Chọn lựa hệ thống biểu hiện thích hợp có thể cho hiệu quả cao hơn trong hệ lên men, có liên quan tới việc cải thiện hoạt tính đặc biệt của nguyên liệu khởi đầu. Cũng có khả năng bổ sung các nhóm chức vào protein để giúp cho sự tinh sạch, tạo ra cho nó các tính chất đặc biệt và sau đó loại bỏ các nhóm chức này khi chúng không được yêu cầu lâu hơn.

Trong thiết kế quy trình tinh sạch ở quy mô lớn thì số lượng các bước, và sự thu hồi sản phẩm ở mỗi bước đã ảnh hưởng quan trọng lên sản lượng

toàn phần. Sự thu hồi đặc trưng của một bước sắc ký là trong khoảng 80% và 90%, vì sự tinh sạch phức tạp đòi hỏi nhiều bước do đó sản lượng toàn phần nhiều khi chỉ bằng 10% của nguyên liệu khởi đầu. Điều này không thành vấn đề ở trường hợp tinh sạch quy mô phòng thí nghiệm, nhưng nếu tinh sạch ở quy mô lớn thì đó là vấn đề rất quan trọng cần quan tâm để tối ưu toàn bộ quá trình từ hệ thống biểu hiện hoặc sự lên men đến bước tinh sạch cuối cùng, để giảm thiểu số bước tinh sạch cần thiết.

1. Thu hồi protein

Sự thu hồi và tinh sạch các protein và enzyme cũng quan trọng như các giai đoạn lên men xét theo góc độ kinh tế của quá trình sản xuất. Thách thức chính trong các bước thu hồi là giảm thiểu sự mất hoạt tính của protein. Trong phần này sẽ trình bày các bước thu hồi và tinh sạch truyền thống cho protein.

1.1. Thu hồi các protein ngoại bào

Các protein ngoại bào tương đối dễ thu hồi và tinh sạch. Tế bào và nồng độ của dung dịch hoạt động được loại bỏ một cách đơn giản, và có thể cung cấp trực tiếp protein thô thích hợp cho một số ứng dụng.

Dung dịch protein tương đối sạch có thể thu được bằng cách cho các nuôi cấy sinh trưởng trên môi trường đơn giản có thành phần xác định. Các bước thu hồi và tinh sạch giống như các bước đã dùng cho protein nội bào sau khi phá vỡ tế bào.

1.2. Thu hồi các protein nội bào

Để tách chiết các protein nội bào từ các nguồn động-thực vật, mô phải được phá vỡ để giải phóng chúng.

1.2.1. Phá vỡ tế bào

a. Nguyên lý chung

Làm khô mô là phương pháp thuận lợi để ổn định và phá vỡ tế bào động-thực vật. Phương pháp đông khô không thích hợp để phá vỡ mô nhưng tránh được sự đứt gãy protein, mặc dù nó vô cùng đắt trong sản xuất quy ở mô lớn. Mô có thể được làm khô trong điều kiện chân không hoặc trong

không khí, hoặc kết tủa bằng dung môi trộn với nước. Sau đó, thu dịch chiết enzyme từ các nguyên liệu khô bằng cách hydrate hóa trở lại nguyên liệu trong một dung dịch đệm thích hợp. Phương pháp đông lạnh đơn giản cũng có tác dụng phá vỡ một ít mô, mặc dù đây là phương pháp không thích hợp cho việc tăng quy mô sản xuất.

Một số nguyên liệu động-thực vật cần có quá trình đông hóa trước đó, sao cho mô được phá thành những mảnh nhỏ và trộn lẫn với nhau, sau đó sử dụng phương pháp cơ học để phá vỡ tế bào. Một khi protein được hòa tan, các vỏ tế bào chết được loại bỏ dễ dàng bằng phương pháp lọc. Ly tâm tốc độ thấp cũng có thể được sử dụng. Ở một số mô có sự hiện diện của chất béo, việc loại bỏ lớp chất béo bằng ly tâm gặp nhiều khó khăn. Các chất béo chỉ được loại bỏ dễ dàng bằng tách chiết dung môi; kết tủa acetone là phương thức thích hợp để tách protein ra khỏi các nguyên liệu lipid. Một phương thức khác là các dung môi trộn nước như hexane, cũng có thể được sử dụng.

Phá vỡ các tế bào vi sinh vật thường gặp nhiều khó khăn hơn các tế bào động thực vật. Các tế bào vi sinh vật thường dai hơn và có kích thước nhỏ (khoảng 0,2-10 μm) nên phải có phương pháp phá vỡ đặc biệt. Nhiều enzyme từ nấm men và các vi khuẩn Gram âm có thể được chiết bằng cách dùng các dung môi không trộn nước, như toluen hoặc chloroform, có thể phá vỡ màng tế bào và giải phóng enzyme. Các dung môi hòa tan nước, như ethanol và 2-propanol, được dùng để tách chiết enzyme từ khoảng gian bào, nhưng sử dụng các dung môi này đòi hỏi mức độ an toàn cao trong sản xuất ở quy mô lớn. Các chất tẩy thích hợp có thể được dùng để tách chiết các phân tử enzyme nhỏ (khối lượng phân tử dưới 70.000 Da).

Trong một số trường hợp enzyme ổn định ở giá trị pH cao, có thể sử dụng dung dịch kiềm để phân giải các tế bào vi khuẩn. Thành tế bào vi khuẩn được phân giải bằng lysozyme, tuy nhiên giá thành của enzyme này là rất cao. Tương tự, nấm men có thể được phân giải bằng β -glucanase. Hiện tượng tự phân giải có thể xuất hiện trong nấm men, nhưng cần có thời gian dài vì thế sẽ gây khó khăn khi điều chỉnh hoặc tối ưu quá trình lên men.

Các tế bào vi sinh vật có thể được phá vỡ dễ dàng hơn bằng các phương thức vật lý. Siêu âm là kỹ thuật thích hợp và rất hiệu quả ở quy mô phòng thí nghiệm, nhưng khó ứng dụng ở quy mô sản xuất lớn. Phá vỡ tế bào bằng cách dùng áp suất cao để đẩy nguyên liệu (dịch huyền phù tế bào dưới dạng bột nhão được làm đông ở -20°C) qua các lỗ hẹp của máy nén thì

tế bào sẽ bị phá vỡ do sự thay đổi pha và thay đổi thể tích cũng như do lực cắt của các tinh thể đá. Phương pháp này có thể sử dụng để phá vỡ các tế bào nuôi cấy ở quy mô lớn 100-1.000 L/giờ. Nhiều loại tế bào có thể bị phá vỡ bằng khuấy (rung) nhanh hoặc trộn lẫn với các hạt thủy tinh nhỏ hoặc các hạt gốm (ceramic). Ở quy mô phòng thí nghiệm, phương thức này rất thích hợp. Ở quy mô sản xuất lớn người ta sử dụng phương pháp nghiền bằng quả cầu thép. Tỷ lệ và hiệu suất giải phóng enzyme phụ thuộc vào vận tốc lắc và kích thước của các loại hạt cũng như đường kính của thiết bị. Với cùng một thể tích hạt thì sử dụng một lượng lớn các hạt nhỏ sẽ hiệu quả hơn một lượng tương đối nhỏ các hạt lớn, vì nó làm tăng sự va chạm giữa các hạt và các tế bào.

Có ba phương pháp chính để giải phóng các protein nội bào khỏi vi sinh vật đó là phương pháp enzyme, hóa học và vật lý. Tuy nhiên, không phải tất cả các kỹ thuật có sẵn là thích hợp để sử dụng trên quy mô lớn. Ở quy mô lớn, người ta thường gặp khó khăn trong việc thiết kế công suất cần thiết cho thể tích lớn và loại bỏ nhiệt được sinh ra trong quá trình phá vỡ tế bào.

b. Các phương pháp enzyme

Lysozyme, một enzyme được sản xuất thương mại từ lòng trắng trứng gà, thủy phân các liên kết -1,4-glycosidic trong mucopeptide của thành tế bào vi khuẩn. Các vi khuẩn Gram dương có thành tế bào rắn chắc nhờ vào mucopeptide là loại mẫn cảm với lysozyme nhất. Khi phân giải vi khuẩn Gram âm, ít khi người ta sử dụng một mình lysozyme, mà thường bổ sung thêm EDTA để tạo chelate với các ion kim loại sẽ dễ dàng làm tan tế bào (lysis). Mặc dù quá trình thao tác đơn giản và nhẹ nhàng, nhưng kỹ thuật này không được sử dụng cho việc tách chiết ở quy mô lớn các enzyme của vi khuẩn, vì lẽ do giá thành tương đối cao của lysozyme và khả năng đưa vào các tác nhân gây nhiễm bẩn. Chỉ có trường hợp người ta dùng lysozyme ở quy mô lớn là để giải phóng aryl acylamidase khỏi *Pseudomonas fluorescens*.

c. Các phương pháp hóa học để phân giải tế bào

- Xử lý kiềm. Xử lý bằng kiềm đã được sử dụng thành công trong tách chiết ở quy mô nhỏ và lớn các protein vi khuẩn. Ví dụ enzyme trị liệu, L-asparaginase, có thể được giải phóng khỏi *Erwinia chrysanthemi* bằng cách

ủ tế bào ở pH từ 11-12,5 trong 20 phút. Thành công của phương pháp này là nhờ vào khả năng ổn định của sản phẩm mong muốn. Giá trị pH cao có thể làm bất hoạt protease.

- Chất tẩy rửa. Các chất tẩy, hoặc là ion ví dụ như sodium lauryl sulphate hay còn gọi là sodium dodecyl sulphate, sodium cholate (anion) và cetyl trimethyl ammonium bromide (cation) hoặc không phải ion như Trixton X-100, X-450 và Tween, được dùng để phân giải tế bào, thường có phối hợp với lysozyme. Các chất tẩy ion có hoạt tính mạnh hơn các chất tẩy không phải ion, và có thể dẫn đến sự biến tính của nhiều protein. Sự hiện diện của các chất tẩy cũng có thể ảnh hưởng đến các bước tinh sạch tiếp theo, đặc biệt kết tủa muối. Điều này có thể được khắc phục bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi ion hoặc siêu lọc.

d. Các phương pháp vật lý để phân giải tế bào

- Shock thẩm thấu. Shock thẩm thấu cũng được dùng để giải phóng enzyme và protein khỏi khoảng gian bào của đa số vi khuẩn Gram âm. Phương pháp này bao gồm rửa tế bào trong dung dịch đệm để làm sạch chúng khỏi môi trường dinh dưỡng, và sau đó tạo dịch huyền phù trong môi trường ưu trương sucrose 20%. Sau khi đạt tới sự cân bằng thẩm thấu, tế bào được thu hồi và tái huyền phù nhanh trong nước ở khoảng 4°C. Trung bình chỉ khoảng 4-8% protein tổng số của vi khuẩn được giải phóng bởi shock thẩm thấu, nhưng nếu enzyme mong muốn hiện diện trong khoang gian bào thì có cho phép tách chiết một lượng lớn hơn từ 14-20 lần và rất sạch so với các kỹ thuật tách chiết khác.

Kỹ thuật shock thẩm thấu rất nhẹ nhàng và không làm biến tính các protein, nhưng do có nhiều vi sinh vật chống chịu được shock thẩm thấu nên người ta chỉ sử dụng nó cho các vi khuẩn Gram âm (ví dụ như *E. coli*) để tách chiết các enzyme thủy phân có trong khoang gian bào. Tuy nhiên, có ba lý do đã hạn chế áp dụng shock thẩm thấu ở quy mô lớn, đó là: thể tích làm việc lớn (400 dm³ cho 10 kg bột nhão tế bào), nhiều giai đoạn ly tâm, và luôn phải duy trì ở nhiệt độ thấp.

- Nghiền. Trước đây kỹ thuật này có nhiều hạn chế khi nghiền hỗn hợp bột nhão của tế bào trong cối với bột gây xướt, như là bông thủy tinh, alumina hoặc đất tảo cát (kieselguhr). Sau đó, người ta đã phát triển bằng cách sử dụng các máy nghiền ẩm. Một sản phẩm đặc trưng là Dynomill

(WA Bachofen, Switzerland) có thể được dùng để giải phóng protein khỏi rất nhiều loài vi sinh vật khác nhau. Nó bao gồm một buồng chứa các hạt thủy tinh và các đĩa khuấy quay tròn. Dịch huyền phù tế bào được bơm vào buồng, sau đó khuấy nhanh đủ để phá vỡ thậm chí cả các tế bào vi khuẩn dai nhất. Buồng phân hủy phải được làm lạnh để loại bỏ sự sinh nhiệt. Một mô hình quy mô phòng thí nghiệm, với buồng 600 mL có thể thực hiện tới 5 kg vi khuẩn trên một giờ, và các mô hình ở quy mô sản xuất thích hợp với buồng có thể tích lên tới 250 L.

Một số nhân tố có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào bị phá vỡ, như là kích thước và nồng độ của các hạt thủy tinh, loại, nồng độ và tuổi của tế bào, tiền xử lý hóa chất, tốc độ khuấy, tốc độ dòng chảy qua buồng, nhiệt độ, và sự sắp xếp của các đĩa khuấy, và những yếu tố này đã được khảo sát ở nấm men và vi khuẩn.

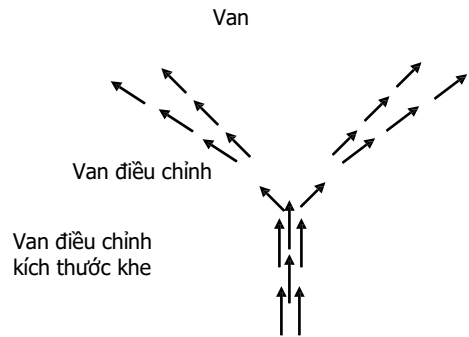
- Trượt rắn. Phương pháp phá vỡ tế bào bằng trượt rắn đã được dùng khá lâu ở quy mô nhỏ. Nguyên tắc của phương pháp này là đẩy nguyên liệu tế bào đã đông lạnh qua một lỗ hẹp ở áp suất cao và một nhiệt độ thoát ra ngoài khoảng -20°C . Phương pháp này ít được sử dụng ở quy mô công nghiệp, do nó không thể dùng một lượng lớn nguyên liệu để phá vỡ tế bào.

- Trượt lỏng. Trượt lỏng là kỹ thuật được chọn lựa để phá vỡ các tế bào vi sinh vật ở quy mô lớn, được ứng dụng rộng rãi trên thế giới trong cả hai: các quá trình công nghiệp và nghiên cứu. Phương pháp này đặc biệt thuận lợi cho phá vỡ tế bào vi khuẩn và nấm men.

Tương tự như phương pháp trượt rắn, các tế bào trong dịch huyền phù được chuyển qua một lỗ hẹp nén dưới áp suất cao. Trường hợp ở quy mô nhỏ hơn, người ta sử dụng thiết bị French Press (Hình 6.7). Ở quy mô lớn thường dùng thiết bị đồng hóa (homogenizer) là loại được phát triển để tạo thể sữa trong công nghiệp bơ sữa. Nhiệt độ tăng lên ít nhất 10°C trong một rãnh đơn là thường xảy ra, vì thế cần phải làm lạnh dịch huyền phù tế bào trước khi đồng hóa. Thiết bị đồng hóa trượt lỏng thường được hoạt động ở độ ẩm tế bào khoảng 20%.

Trong trường hợp quy mô lớn thì thiết bị đồng hóa Manton-Gaulin (APV Ltd. Crawley, UK) được sử dụng rộng rãi nhất. Nó bao gồm một máy bơm kiểu piston có một van thoát hơi được hạn chế, có thể điều chỉnh áp suất hoạt động cần thiết, tới 95 MPa. Thiết bị đồng hóa Manton-Gaulin (Hình 6.8) loại nhỏ nhất, 15-8TA, có thể đưa nguyên liệu vào khoảng

50 L/giờ ở áp suất 55 MPa. Một phiên bản lớn hơn, loại MC-4, có thể đưa nguyên liệu vào 300 L/giờ cũng ở áp suất 55 MPa.



Hình 6.7. Thiết bị đồng hóa French Press

Hình 6.8. Mặt cắt ngang của thiết bị đồng hóa Manto-Gaulin

Tốc độ phá vỡ tế bào và giải phóng protein phụ thuộc vào một số nhân tố như: loại tế bào, điều kiện lên men, nồng độ và tiền xử lý (chẳng hạn đông lạnh, vì các tế bào vi sinh vật thường dễ vỡ hơn nhiều nếu chúng được làm lạnh trước)... Người ta cũng nhận thấy rằng sự hiện diện của các thể vùi giúp cho các tế bào *E. coli* dễ dàng bị phá vỡ hơn.

Tỷ lệ protein giải phóng khỏi các tế bào nấm men có thể được mô tả bằng một phương trình được xây dựng dựa trên kinh nghiệm như sau:

$$\text{Log} \frac{R_m}{R_m - R} = KnP^n \quad (1)$$

Trong đó: R_m là lượng protein hòa tan cực đại được giải phóng theo lý thuyết, R là lượng protein được giải phóng thực tế, K là hằng số phụ thuộc nhiệt độ, n là số rãnh (number of passes), P là áp suất ngược hoạt động và là hằng số phụ thuộc vào cơ thể.

Giá trị của số mũ khác nhau tùy thuộc vào cơ thể, đối với nấm men nó khoảng 2,9 và *E. coli* khoảng 2,0. Có nhiều ví dụ về việc sử dụng thiết bị đồng nhất Manton-Gaulin để phá vỡ tế bào vi sinh vật ở quy mô lớn. Chẳng hạn: -galactosidase được giải phóng khỏi *E. coli*, và carboxypeptidase khỏi *Pseudomonas* spp. Một số lớn enzyme được phân lập từ vi khuẩn ưa nhiệt

Bacillus stearothermophilus, bao gồm glycerokinase và một hexokinase đặc trưng glucose. Trong một quá trình nhất định, các điều kiện để phá vỡ tế bào phải được thiết kế tối ưu một cách cẩn thận, vì các biến thiên khác nhau trong mức độ phá vỡ tế bào và giải phóng protein có thể có các ảnh hưởng một cách ý nghĩa lên các bước tinh sạch tiếp theo.

1.2.2. Phân lập các enzyme hòa tan

Phương thức quan trọng để phân tách enzyme hòa tan nhanh và hiệu quả sau khi phá vỡ tế bào là làm lạnh, dùng dung dịch đệm thích hợp, và có sự hiện diện của các tác nhân bảo vệ enzyme như mercapthoethanol (cần thiết để ổn định một số dung dịch enzyme).

Thường các nhân tố ức chế protein phải được bổ sung để làm giảm ảnh hưởng phân hủy của protease. Các enzyme hòa tan có thể được thu thập bằng phương pháp lọc qua màng hoặc bằng cách ly tâm. Phương pháp sau tương đối dễ thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm với các lực ly tâm tốc độ cao. Các lực g cao như thế không thể đạt được ở các thiết bị quy mô sản xuất lớn. Các máy ly tâm lớn thường được cấu tạo từ các hợp kim titanium đắt tiền để chịu đựng các lực g cao, nhưng mặc dù thế chỉ có thể thu được các lực g không cao lắm mà thôi. Để khắc phục điều này, các chất kết tủa nucleoprotein và protein, như polyethyleneimine, được bổ sung vào các chất đồng hóa tế bào để kết bông các nguyên liệu không mong muốn và giảm thời gian lắng xuống nhanh hơn.

Sử dụng phương pháp lọc như dùng đất diatomit (diatomaceous earth), có thể là biện pháp thích hợp để thu được các enzyme hòa tan và phát triển dễ dàng ở quy mô lớn. Các phương thức bổ sung được cũng sử dụng để tăng tốc độ lọc. Thông thường một vài tác nhân kết tủa có thể được cùng sử dụng để giảm các bước tiếp theo của quá trình. Các phương tiện trợ lọc có thể được dùng để thu thập các tế bào hoàn chỉnh và cung cấp một kỹ thuật phá vỡ tế bào mà không dựa vào các thiết bị đồng hóa cơ học. Ví dụ các tế bào trong hỗn hợp lọc có thể được phân giải hóa học, enzyme hoặc phương thức vật lý bằng cách khuấy nhờ khả năng gây xước tế bào của diatomit. Các enzyme hòa tan được giải phóng có thể thu thập thuận lợi bằng phương pháp lọc đơn giản.

Siêu lọc là công nghệ rất toàn diện, dễ dàng cho quy mô lớn và, với sự chọn lựa chính xác độ xốp của màng, các enzyme có thể được thu thập một

cách chọn lọc theo khối lượng phân tử của chúng. Đĩa và khung, và các sợi rỗng (hollow fibres) được sử dụng trong một thời gian dài. Các màng ceramic hiện nay đã được sử dụng phổ biến hơn do đặc điểm dễ làm sạch và dễ khử trùng của chúng, vì chúng có thể chịu được nhiệt độ cao dưới các điều kiện chất tẩy và độ kiềm cao.

Thường thì dung dịch enzyme hòa tan không yêu cầu xử lý thêm nữa ngoại trừ nồng độ, hoặc dưới áp suất giảm hoặc bằng phương pháp lọc màng, để sản xuất một dung dịch protein được cô đặc (10-50% chất rắn). Các chất ổn định như ammonium sulphate có thể được bổ sung nếu cần thiết. Các tá dược như lactose, dextrin cũng có thể được bổ sung với vai trò là các chất ổn định enzyme.

2. Tinh sạch sơ bộ

Tinh sạch protein là một bước rất cần thiết, tuy nhiên thường chỉ thực hiện đối với những protein có giá trị ứng dụng cao. Quy mô của quá trình tinh sạch sẽ quyết định sự chọn lựa kỹ thuật phân tách, vì một số kỹ thuật gặp nhiều khó khăn khi tiến hành trên quy mô lớn.

2.1. Loại bỏ các mảnh vỡ của tế bào

Sau khi phá vỡ tế bào, bước đầu tiên trong quá trình tinh sạch protein nội bào là loại bỏ các mảnh vỡ tế bào. Sự phân tách các vật rắn khỏi chất lỏng là hoạt động cơ bản rất quan trọng trong phân lập protein, và thường được tiến hành bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc. Nhiều quy trình có bổ sung một lượng nhỏ DNase ở giai đoạn này, để phá vỡ thêm các chuỗi DNA có thể làm cho dịch chiết trở thành dạng sệt (gelatinous).

2.2. Ly tâm mẽ

Ly tâm mẽ thích hợp với các dung tích ly tâm trong khoảng từ nhỏ hơn 1 mL đến một vài lít, và có khả năng sử dụng một lực ly tâm (rotational centrifugal force, RCF) tương đối lớn lên tới 100.000 g (hằng số hấp dẫn). Tuy nhiên, để loại bỏ các tế bào vi khuẩn, mảnh vỡ tế bào và các kết tủa protein, thì lực ly tâm chỉ cần đạt khoảng 20.000 g. Nhiều thiết bị ly tâm loại này phù hợp cho các quá trình tách chiết ở quy mô trung bình.

2.3. Ly tâm dòng chảy liên tục

Ly tâm dòng chảy liên tục thường được sử dụng cho quá trình tinh sạch protein ở quy mô lớn để loại bỏ các chất dạng hạt. Có ba kiểu ly tâm chính thích hợp hơn cả là: ly tâm thùng rỗng (hollow bowl), ly tâm thùng có nhiều buồng (multi-chamber) hoặc đĩa (discs), và ly tâm thúng (basket).

- Ly tâm thùng rỗng. Bao gồm một rotor hình ống cung cấp một đường chảy dài cho dịch chiết được bơm vào trong đáy và chảy lên qua thùng. Chất lắng bị bắn vào thành của thùng, và dịch chiết được gạt sẽ chuyển lên để ra khỏi thùng vào trong bình thu. Khi ly tâm bắt đầu, đường kính thực tế của thùng giảm, vì thế đã làm giảm đường lắng và lực ly tâm. Tốc độ dòng chảy phải được xác định theo kinh nghiệm vì nó rất khác nhau giữa các loại dịch chiết, nhưng tốc độ dòng chảy thích hợp cho các máy lớn là khoảng 60 L/giờ.

- Ly tâm đĩa. Thùng ly tâm chứa một dãy đĩa xung quanh một hình nón ở giữa. Khi dịch chiết đi vào, chất hạt bị bắn ra ngoài, chạm vào các đĩa hình nón và chất lắng tập trung trên thành của thùng. Phương pháp này cung cấp một đường chảy không đổi, vì thế hiệu suất ly tâm ít bị ảnh hưởng. Nhược điểm của kiểu ly tâm này là có hao hụt một lượng nhỏ sản phẩm trong suốt quá trình chảy ra ngoài của dịch chiết. Phương thức này cho phép đạt tới một lực ly tâm khoảng 8.000 g và có sức chứa lên đến 20 kg chất lắng.

- Ly tâm thúng. Được thiết kế để hoạt động ở các lực ly tâm thấp hơn nhiều, có thể chỉ 1.000 rpm, về cơ bản đó là các bộ lọc ly tâm. Thúng được đục thủng lỗ và thường được lót bằng vải lọc. Ứng dụng chính của ly tâm này là để thu thập các hạt nguyên liệu lớn; trong phạm vi tinh sạch enzyme đó thường là các nguyên liệu trao đổi ion được dùng cho hấp phụ theo mẻ protein mong muốn.

2.4. Lọc bằng màng

Lọc là một phương pháp khác để gạt các dịch chiết tế bào. Tuy nhiên, dịch nuôi cấy vi sinh vật và các dịch chiết có khuynh hướng trở thành dạng sệt tự nhiên thường gặp khó khăn khi lọc bằng các phương pháp truyền thống, trừ khi diện tích màng lọc được sử dụng là rất lớn.

Có thể khắc phục điều này bằng cách dùng phương pháp lọc dòng chảy ngang (cross-flow) hoặc tiếp tuyến (tangential). Trong phương pháp này dịch chiết chảy ở góc phải theo hướng lọc, và sử dụng tốc độ dòng chảy cao sẽ có khuynh hướng giảm sự tắc nghẽn bằng các hoạt động tự làm sạch. Chẳng hạn: để thu hồi ở quy mô lớn L-asparaginase từ *Erwinia chrysanthemi* người ta sử dụng một màng lọc có diện tích 1 m² dùng để thu hoạch tế bào từ 100 L của chất lỏng nuôi cấy trong 2,5 giờ lúc đó nồng độ các chất rắn ở phần được giữ lại trên màng tăng lên từ 0,55%-22% khối lượng khô. Sau đó, một màng giống như thế được dùng để gạn lọc dịch chiết thu được bằng phân giải kiểm các vi khuẩn này. Các số liệu này đã cho thấy rằng để thu hoạch tế bào từ 500 L nuôi cấy trong 2,5 giờ đòi hỏi màng phải có diện tích 7,5 m² và chi phí cho quá trình này ít hơn so với phương pháp ly tâm.

Do các hạn chế của ly tâm quy mô lớn nên kỹ thuật lọc màng thường được phối hợp sử dụng để đảm bảo rằng dịch chiết thật sự sạch cho bước sắc ký tiếp theo.

3. Hệ phân tách hai pha nước

Một phương pháp khác với ly tâm và lọc là phương pháp phân tách hai pha nước (aqueous two-phase separation), hay chất lỏng-chất lỏng. Các hệ hai pha nước đặc trưng được tạo ra bằng cách trộn các dung dịch polyethylene glycol (PEG) và dextran hoặc PEG và các loại muối như potassium phosphate hoặc ammonium sulphate để tạo thành hai pha riêng biệt. Các protein và mảnh vỡ tế bào có khả năng hòa tan khác nhau giữa hai pha, vì thế kỹ thuật này có thể được dùng cho cả hai trường hợp: phân tách protein khỏi mảnh vỡ tế bào và phân chia (partitioning) protein trong suốt quá trình tinh sạch. Sự phân chia chính xác của một protein tùy thuộc vào các thông số như khối lượng phân tử và điện tích của chúng, nồng độ và khối lượng phân tử của các polymer, nhiệt độ, pH và lực ion của hỗn hợp và sự hiện diện của các muối đa trị như phosphate hoặc sulphate. Các điều kiện tối ưu cho một protein đặc biệt thường được tìm thấy theo kinh nghiệm. Mặc dù, các điều kiện cần thiết để đạt được sự phân tách vừa ý có thể được xác định chính xác, nhưng cơ chế của sự phân chia hai pha hiện nay vẫn chưa được hiểu đầy đủ.

Các pha có thể được phân tách trong một thùng lắng, nhưng để phân tách nhanh và hiệu quả hơn có thể sử dụng phối hợp với phương pháp ly tâm. Vì phân tách các chất lỏng có mật độ khác nhau dễ dàng hơn phân tách các chất rắn ra khỏi các chất lỏng trên quy mô lớn, nên phương thức này có thể được dùng để hỗ trợ cho quá trình tinh sạch enzyme ở quy mô lớn. Mặc dù giá thành khá thấp của hệ thống PEG/muối đã khiến cho nó trở nên thích hợp hơn cho việc sử dụng ở quy mô lớn, nhưng hệ thống PEG/dextran (dextran có giá thành khá cao) phân tách hiệu quả hơn cũng là một phương pháp kinh tế nếu so sánh với các phương pháp tinh sạch khác. Sử dụng hệ phân tách hai pha nước không bị hạn chế đối với các nguyên liệu có nguồn gốc vi sinh vật, và phương pháp này được dùng thành công để phân lập các nguyên liệu khỏi cả hai nguồn thực vật và động vật, bao gồm cả -L-antitrypsin của người được biểu hiện trong sữa chuyển gen. Trong trường hợp này độ tinh sạch sơ bộ của protein tương đối cao, tức là sau khi phân tách hai pha đơn thì protein mong muốn được tinh sạch tới 73%.

Sự phân tách hai pha nước bằng polyethylene glycol, dextran hoặc polyamines có thể tạo ra các pha phân chia chất lỏng trong đó các protein và enzyme mong muốn có thể được tập trung lại. Xử lý kiểu này cho phép thu hồi lại các polymers để sử dụng. Các phương pháp này được ứng dụng dễ dàng đối với toàn bộ dịch nuôi cấy có protein hoặc enzyme hòa tan (enzyme ngoại bào).

Sự phân tách hai pha nước có thể được cải tiến nhằm tạo sự phân chia đặc trưng sinh học bằng cách gắn các phối tử vào polymer để thay đổi sự phân chia của protein. Tất cả các polymer tạo pha có thể có các phối tử được gắn đồng hóa trị vào chúng, và một phạm vi nhiều phối tử như thế đã được khảo sát. Do liên kết hóa học đơn giản của chúng, các chất nhuộm phản ứng được sử dụng thường xuyên như các phối tử. Ngoài các thuốc nhuộm này, một số phối tử khác cũng đã được nghiên cứu. Những phối tử này bao gồm các cofactor, như pyridine nucleotide được sử dụng thành công trong phân chia ái lực các dehydrogenase.

Ở quy mô lớn, phương pháp ái lực đã được sử dụng cho tinh sạch formate dehydrogenase khỏi 10 kg nấm men *Candida bodinii*, bằng cách dùng thuốc nhuộm triazine, Procion Red HE-3B, được bất động trên PEG.

Mặc dù phân tách hai pha nước là phương pháp có thể phát triển dễ dàng ở quy mô lớn để sản xuất, nhưng dường như nó không được dùng thường xuyên để tinh sạch ở quy mô công nghiệp.

4. Các phương pháp kết tủa

Thông thường cần tiến hành giai đoạn kết tủa mẻ đầu tiên để làm giảm thể tích tổng số của dung dịch enzyme. Các enzyme có thể được kết tủa đơn giản, tuần tự hoặc phối hợp với ammonium sulphate, sodium sulphate, polyethyleneimine và polyallylamine, hoặc với các dung môi hữu cơ như là isopropanol, ethanol và acetone.

Streptomycin sulphate, polyethyleneimine và các polyamine khác có thể kết tủa các chất có tính chất acid như nucleic acid và các nucleoprotein. Ammonium sulphate và các dung môi hữu cơ có thể kết tủa một cách chọn lọc enzyme mong muốn với hoạt tính thu hồi từ 80-90%.

Kết tủa đơn giản cũng có thể giúp loại bỏ protease. Lợi ích chính của bước này là làm giảm thể tích hoạt động tổng số, thường bằng một thừa số của 20. Do đó sẽ giảm một cách ý nghĩa thể tích của nhựa trao đổi ion. Thay đổi pH và nhiệt độ cũng có thể tạo ra kết tủa chọn lọc và loại bỏ các protein không mong muốn.

4.1. Kết tủa bằng ammonium

Phương pháp xử lý muối các protein đã được sử dụng trong nhiều năm, và đạt được cả hai mục đích tinh sạch và cô đặc. Loại muối được sử dụng phổ biến nhất là ammonium sulphate, do khả năng hòa tan của nó, không có độc tính cho hầu hết các enzyme, và giá thành thấp.

Kết tủa protein bằng muối phụ thuộc vào nhiều nhân tố như: pH, nhiệt độ, nồng độ protein, và loại muối được sử dụng. Nồng độ protein là thông số đặc biệt quan trọng khi tăng quy mô, bởi vì hầu hết sự tinh sạch ở quy mô lớn được tiến hành ở các nồng độ protein cao hơn sự tinh sạch ở quy mô phòng thí nghiệm. Điều này có thể ảnh hưởng sâu sắc lên nồng độ của muối cần thiết để kết tủa protein mong muốn.

4.2. Kết tủa bằng các dung môi hữu cơ

Việc bổ sung các dung môi hữu cơ vào các dung dịch nước làm giảm khả năng hòa tan của protein do giảm hằng số điện môi của môi trường. Các dung môi hữu cơ khác nhau được dùng để kết tủa protein như ethanol, acetone, và 2-propanol là quan trọng nhất. Thường các protein bị biến tính bởi các dung môi hữu cơ nên cần thiết làm việc ở nhiệt độ dưới 0°C.

Do bản chất dễ cháy của các dung môi hữu cơ nên cần phải sử dụng thiết bị chịu lửa và giá thành cao, vì thế các dung môi hữu cơ thường không được dùng trong tinh sạch enzyme ở quy mô lớn. Ngoại trừ trường hợp xử lý máu (blood processing field), trong đó kết tủa ethanol là phương pháp chính để tinh sạch albumin; và trên thực tế phương pháp này đang được phát triển trong một hệ thống được điều khiển tự động bằng computer.

4.3. Kết tủa bằng các polymer khối lượng phân tử cao

Các chất kết tủa hữu cơ khác có thể được dùng để phân đoạn các protein là các polymer hòa tan trong nước như PEG. Chất này có ưu điểm là không có độc tính, không dễ cháy và không gây biến tính các protein. Nó được dùng chủ yếu trong lĩnh vực xử lý máu.

4.4. Kết tủa bằng nhiệt

Khi protein đủ bền khó bị biến tính, thì xử lý nhiệt có thể cung cấp một mức độ tinh sạch cao được xem như là bước đầu tiên. Ví dụ: Ở quy mô lớn, 55% protein không mong muốn được loại bỏ trong một bước riêng rẽ bằng cách làm nóng dịch chiết *E. coli* mang protein A của *Staphylococcus* tái tổ hợp ở 80°C trong 10 phút. Nếu protein tái tổ hợp được tinh sạch khỏi một cơ thể ưa nhiệt thì kết quả của xử lý nhiệt đầu tiên có thể là hiệu quả hơn nhiều. Ví dụ: Khi dịch chiết *E. coli* chứa malate dehydrogenase tái tổ hợp của *Thermus aquaticus* được làm nóng tới 80°C trong 20 phút, thì enzyme thuần nhất có trong thể nổi là khoảng 90%.

5. Các phương pháp sắc ký

Thuật ngữ sắc ký để chỉ các kỹ thuật phân tách và điều chế cho phép tách biệt các hợp phần khác nhau của một hỗn hợp. Phép phân tách sắc ký dựa vào sự di chuyển khác nhau trong một pha động của các chất hòa tan đã được gắn trên một pha tĩnh ở trạng thái rắn. Người ta thường chọn các chất có khả năng gắn kết được với các chất (hòa tan) định phân tách làm pha tĩnh. Tương tác giữa chất hòa tan và pha tĩnh có thể là tương tác hấp phụ, tương tác ion (trao đổi ion), tương tác kỵ nước, tương tác kiểu rây phân tử hoặc tương tác đặc hiệu sinh học.

Tinh sạch protein bằng phương pháp sắc ký là một thực hành chuẩn ở phòng thí nghiệm trong nhiều năm. Để tinh sạch các sản phẩm có thể tích nhỏ và giá trị cao, các protein trị liệu hoặc chẩn đoán đặc hiệu, thì phương pháp sắc ký là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất. Sắc ký chỉ là phương pháp, với khả năng chọn lọc được yêu cầu, để tinh sạch một protein riêng rẽ khỏi hỗn hợp phức tạp của các protein tới một sự tinh sạch cuối cùng lớn hơn 95%.

Các kỹ thuật phân tách bằng sắc ký được sử dụng phổ biến, bao gồm trao đổi ion, tương tác kỵ nước, ngăn chặn kích thước, ái lực và ái lực giả (sắc ký với phối tử là thuốc nhuộm).

Bước làm sạch thêm có thể được thực hiện bằng cách dùng sắc ký ngăn chặn kích thước. Tuy nhiên, kỹ thuật này khó thực hiện ở quy mô lớn, và thường không cần thiết phải tinh sạch enzyme tới 99%. Nếu cần mức độ tinh sạch lớn hơn 95% có thể tiến hành sắc ký hấp phụ/khử hấp phụ thêm một lần nữa sẽ giúp thu được enzyme tinh sạch hơn. Các kỹ thuật tinh sạch như thế không làm tăng hoạt tính của enzyme, đây là một yếu tố phải được xem xét khi kết tủa enzyme có độ tinh khiết cao.

Các kết tủa enzyme tinh sạch cao thường được đông khô để bảo quản và vận chuyển. Các tác nhân bảo vệ lạnh đông polyhydroxy (cryoprotectants), các dung dịch đệm, các chất khử và các chất kháng khuẩn có thể được bổ sung nếu cần thiết.

5.1. Sắc ký lọc gel

Trong sắc ký lọc gel, sự phân tách protein được dựa trên cơ sở kích thước phân tử (Hình 6.9). Pha tĩnh chứa các hạt gel (polymer) xốp có những lỗ nhỏ li ti được bao quanh bởi pha dung môi chuyển động. Khi dung dịch chứa các protein chảy qua cột thì các phân tử lớn của hỗn hợp có đường kính lớn hơn lỗ của hạt gel nên không thể khuếch tán vào bên trong hạt (qua các lỗ nhỏ) và vì thế chúng đi qua các kẽ hở của cột và bị rửa khỏi cột trước cùng với thể tích dịch rửa bằng thể tích giữa các hạt gel V_o . Các phân tử nhỏ hơn sẽ đi qua các lỗ nhỏ để khuếch tán vào trong các hạt gel và được rửa khỏi cột sau, thể tích dịch rửa của chúng bằng tổng thể tích (pha dung môi) của cột V_t . Tổng thể tích của cột có thể biểu diễn như sau:

$$V_t = V_o + V_i + V_m \quad (2)$$

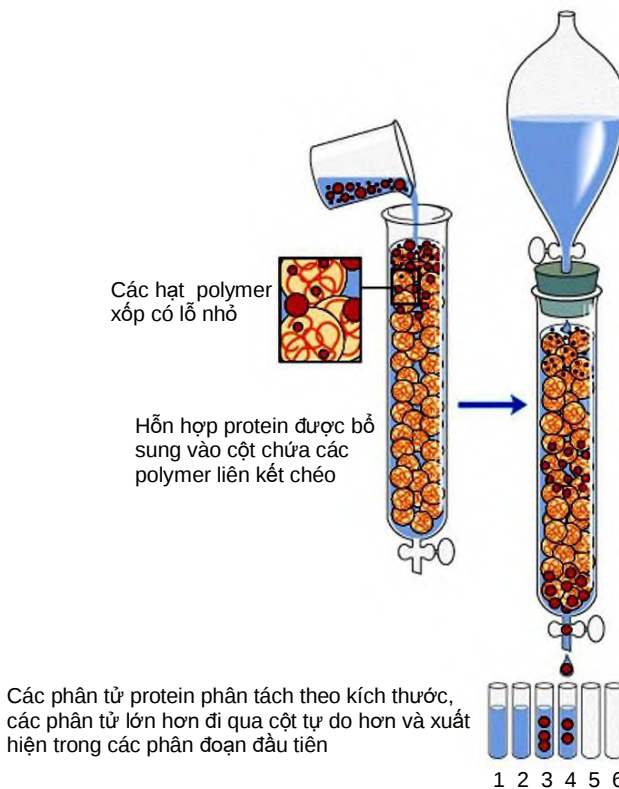
Trong đó: V_t là tổng thể tích của cột, V_o là thể tích của dung môi ở bên ngoài các hạt, V_i là thể tích của dung môi ở bên trong các hạt, và V_m là thể tích bị chiếm bởi khuôn.

Thể tích rửa của protein vì vậy có thể thay đổi giữa V_o và V_i , và có thể tính toán hệ số phân chia hiệu quả (K_{av}) có giá trị giữa 0 và 1:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (3)$$

Trong đó: V_e là thể tích rửa của chất hòa tan.

Đối với các protein hình cầu, kinh nghiệm cho thấy giá trị của K_{av} tỷ lệ nghịch với logarithm của khối lượng phân tử tương đối.



Hình 6.9. Sơ đồ của sắc ký lọc gel

Cần lưu ý không có sự tương tác giữa khuôn và chất hòa tan, vì thế môi trường lọc gel lý tưởng phải trơn hoàn toàn. Để có sức chứa cực đại hạt gel phải rắn và có độ xốp cao. Trường hợp ở quy mô lớn, độ rắn có lẽ là thông số quan trọng nhất vì nó quyết định tốc độ dòng chảy cao nhất có thể đạt được.

Các nguyên liệu lọc gel truyền thống dựa trên cơ sở dextran liên kết chéo (Sephadex), hoặc polyacrylamide (BioGel P). Những nguyên liệu này là đủ trơn nhưng (ở các độ xốp thích hợp khác nhau để phân đoạn hầu hết các protein) lại quá mềm nên khó sử dụng trên quy mô lớn.

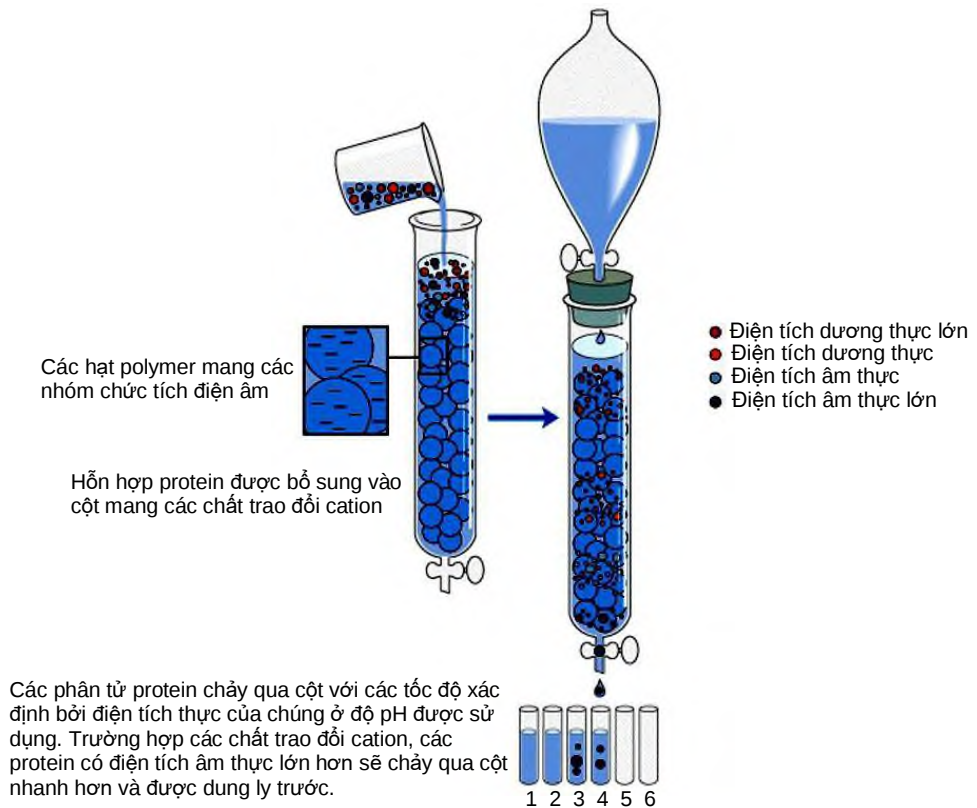
Các loại gel rắn hơn dựa trên cơ sở thay đổi những vật liệu khác nhau đã được đưa vào sử dụng, và thích hợp hơn cho ứng dụng trên quy mô lớn. Ví dụ: Sephacryl (Amersham Pharmacia Biotech) trên cơ sở dextran và polyacrylamide; Superdex (Amersham Pharmacia Biotech) trên cơ sở dextran và agarose, Superose (Amersham Pharmacia Biotech) trên cơ sở agarose liên kết chéo cao. Tất cả những nguyên liệu này thích hợp cho các kích thước của hạt sao cho sự phân đoạn được duy trì ở các tốc độ dòng chảy cao nhờ độ rắn được tăng lên của hạt.

5.2. Sắc ký trao đổi ion

Sắc ký trao đổi ion được sử dụng rộng rãi nhất, có thể bao gồm cả trao đổi cation và anion mạnh và yếu. Các protein và enzyme nói chung được hấp phụ ở lực ion thấp hoặc ở các giá trị pH trong đó điện tích ion tổng số đủ mạnh để tương tác với điện tích đối của nhựa trao đổi ion. Sự tách rửa protein được thực hiện dễ dàng bằng cách thay đổi pH hoặc tăng lực ion của dung dịch rửa (Hình 6.10). Những nhựa trao đổi ion như thế có thể được dùng hoặc như một phương thức để hấp phụ tích cực và tách rửa chọn lọc enzyme mong muốn, hoặc nhờ vào sự hấp phụ đơn giản của các nguyên liệu protein không mong muốn.

Nhựa trao đổi ion là một khung vật liệu rắn không hòa tan có gắn với các nhóm ion hóa bằng liên kết đồng hóa trị. Các nhóm mang điện tích này lại được liên kết với các ion đối (opposite ions) và các ion đối lại có thể trao đổi thuận nghịch với các ion trái dấu. Một khung có mang các nhóm tích điện dương và ion đối tích điện âm, được gọi là nhựa trao đổi anion (anion exchange resin). Ngược lại, một nhựa trao đổi cation sẽ mang điện tích âm.

Ngoài ra, các nhựa trao đổi thường khác nhau về bản chất hóa học của giá khung (polysaccharide gel hay nhựa tổng hợp) cũng như về lực acid, base của nhóm ion hóa. Ba loại nhựa trao đổi ion được trình bày trong bảng 6.1.



Hình 6.10. Sơ đồ sắc ký trao đổi ion

Các protein của một hỗn hợp cần phân tích thường có các nhóm bên ion hóa khác nhau, do đó có pH khác nhau. Ở một giá trị pH nhất định các protein sẽ có một điện tích không giống nhau, do đó chúng được giữ nhiều hay ít bằng tương tác ion trên một nhựa trao đổi ion đã cho và với một pha di động đã cho.

Trong thực tế người ta thường dùng các dung dịch đệm phosphate, acetate, borate và citrate để chiết protein ra khỏi cột. Các protein khác nhau sẽ được chiết ra khỏi cột theo từng phân đoạn chiết khác nhau, trong đó phân đoạn protein cần thu có nồng độ cao nhất.

Bảng 6.1. Bản chất hóa học của các loại nhựa trao đổi ion

Nhựa trao đổi	Bản chất hóa học của giá khung	Nhóm ion hóa	Khả năng trao đổi
DEAE-Sephadex	Các mạch dextran được liên kết chéo	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+ \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	Chất trao đổi anion yếu
Ambelut E-IR120	Polystyren được liên kết chéo bằng divinylbenzen	-SO ₃ ⁻ Sulfonate	Chất trao đổi cation mạnh
CM-Sephadex	Agarose được liên kết chéo bằng 2,3-dipromopropanol	-CH ₂ COO ⁻ Carboxymethyl	Chất trao đổi cation yếu

Một số nhựa trao đổi ion từ các dẫn xuất của cellulose đang được sử dụng như sau:

Nhựa trao đổi cation	Nhựa trao đổi anion
- Carboxyl methyl cellulose (CM-Cellulose) - Phosphor cellulose - Sulfo ethyl cellulose - Sulfo methyl cellulose	- Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-Cellulose) - Triethylaminoethyl cellulose

Quá trình phân tách trên cột bao gồm hai giai đoạn:

- Hấp phụ thuận nghịch protein cần tinh sạch (và các protein có điện tích gần giống) vào nhựa trao đổi ion.

- Khử hấp phụ các protein bằng cách: (1) thay đổi pH của dịch rửa sẽ dẫn đến thay đổi độ ion hóa và do đó thay đổi điện tích tổng của protein,

hoặc (2) tăng lực ion và tăng nồng độ ion đối cạnh tranh. Các protein nào có ái lực với nhựa trao đổi ion yếu nhất sẽ bị đẩy ra trước tiên và ngược lại. Khi sử dụng gradient lực ion hoặc/và gradient pH thường làm tăng chất lượng của phép phân tách protein.

Với các enzyme có tính acid, người ta thường sử dụng các anionic cellulose để tách và tinh sạch. Các nhựa đi từ các dẫn xuất của cellulose có kích thước lỗ lớn, sử dụng rất thích hợp để tách, tinh sạch enzyme ở quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, do hệ số nén cao nên đã phần nào gây khó khăn khi tiến hành sắc ký. Để khắc phục nhược điểm trên, người ta sử dụng các dẫn xuất của agarose liên kết chéo như: Sepharose CL-6B hoặc polymer tổng hợp: trisacryl có hiệu suất cao, hệ số nén không đáng kể, không thay đổi thể tích theo pH và cường độ ion, có thể tái tạo lại nhựa mà không cần tách khỏi cột.

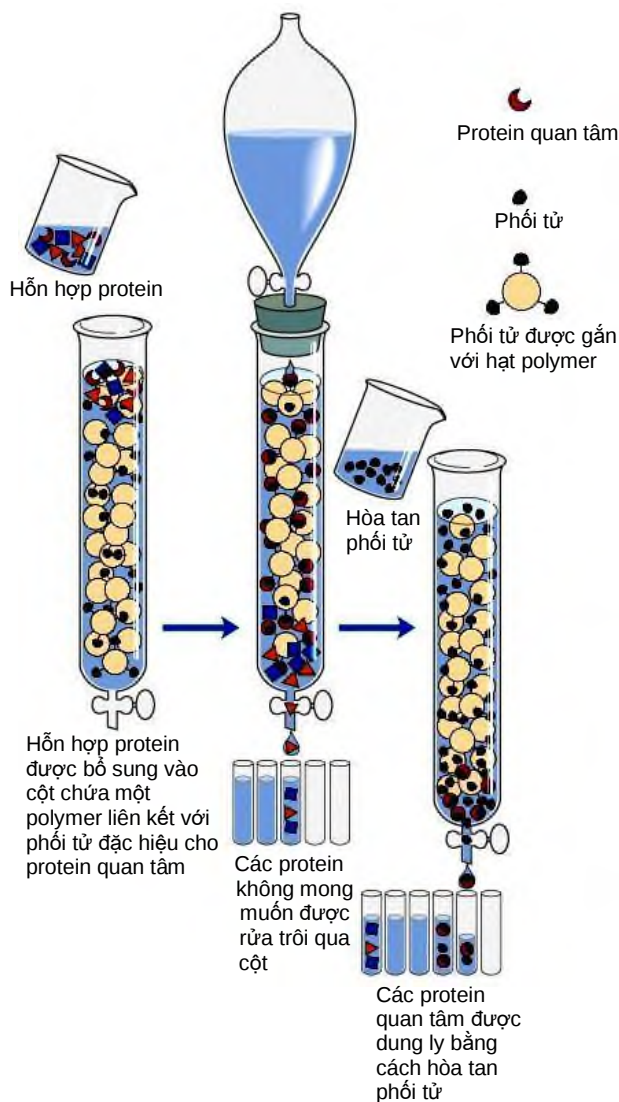
Trong sắc ký trao đổi ion, việc gắn một protein vào nhựa trao đổi ion sẽ phụ thuộc vào trạng thái ion hóa của nó, cũng như trạng thái ion hóa của nhựa trao đổi, pH, lực ion và nhiệt độ. Đối với những protein không bị biến tính ở pH cao hơn điểm đẳng điện của chúng thì có thể dùng DEAE-cellulose (nhựa trao đổi anion) còn đối với các protein không bị biến tính ở pH thấp hơn điểm đẳng điện của chúng thì có thể sử dụng ở CM-cellulose (nhựa trao đổi cation).

5.3. Sắc ký ái lực (affinity chromatography)

Phương pháp này dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu và thuận nghịch của một protein với một phân tử khác (phối tử), đã được gắn bằng liên kết đồng hóa trị vào một chất mang không hòa tan chứa trong cột sắc ký. Khi cho một hỗn hợp có chứa protein cần làm sạch đi qua thì chỉ có protein quan tâm bị giữ lại, còn tất cả các protein khác không tương tác được với phối tử (ligand) sẽ bị rửa trôi ra khỏi cột (Hình 6.11). Tiếp đó, protein sẽ bị rửa giải ra bằng các phương pháp khác nhau.

Phương pháp sắc ký ái lực rất hiệu quả trong việc tinh sạch các enzyme, cho phép thu được enzyme có độ sạch cao (hơn sắc ký trao đổi ion khoảng 10 lần) chỉ bằng một giai đoạn và trong một thời gian ngắn.

Các nhân tố như chất mang, phối tử, phương pháp gắn kết phối tử cũng như các điều kiện rửa giải enzyme đều có vai trò quan trọng trong sắc ký ái lực.



Hình 6.11. Sơ đồ sắc ký ái lực

5.3.1. Chất mang (pha tĩnh)

Phải có một số tính chất sau:

- Hoàn toàn không hòa tan trong pha di động.
- Có độ bền về hóa học và sinh học.
- Có độ cứng cơ học, có tính háo nước và tính thấm.
- Không có các tương tác phi đặc hiệu.

- Có chứa nhiều nhóm chức có khả năng biến đổi khi hoạt hóa trong các điều kiện nhẹ nhàng.

Các chất mang thường là dẫn xuất của cellulose, các dextran gel, thủy tinh xốp... Tuy nhiên, người ta hay dùng agarose hoặc các gel hỗn hợp agarose và polyacrylamide vì chúng có thêm khả năng lọc gel.

5.3.2. Phối tử

Phối tử thường là những chất tương tự cơ chất của enzyme muốn tinh sạch, chất kìm hãm hoặc cofactor. Phối tử nói chung phải đặc hiệu với protein và phải có một ái lực trung bình với nó. Nồng độ phối tử cũng phải được chọn thích hợp và nếu thừa phối tử sẽ gây ra những án ngữ không gian đáng kể. Trường hợp khi phối tử là một phân tử nhỏ hoặc khi phân tử enzyme quá lớn có thể gây ra sự “cồng kềnh không gian” thì phối tử sẽ được nối dài thêm bằng một đoạn “cánh tay đòn” để nó dễ tiếp cận với tâm hoạt động của enzyme. Cánh tay đòn thường là một mạch carbohydrate nhị chức dài từ 6-8 carbon.

5.3.3. Hoạt hóa chất mang

Phối tử (và cánh tay đòn) phải được gắn lên chất mang. Chất mang trước tiên phải được hoạt hóa với cyanogen bromide (CNBr). CNBr sẽ phản ứng với các nhóm hydroxyl của agarose, chẳng hạn để tạo ra một imidocarbamate và imidocarbamate dễ dàng tác dụng với một amine bậc nhất của cánh tay đòn.

5.3.4. Rửa giải

Sau khi loại bỏ các protein khác, enzyme cần tinh sạch có thể được rửa gchươnggiải ra khỏi cột sắc ký nhờ phức hợp của nó với phối tử có bản chất phi đồng hóa trị và thuận nghịch. Dung dịch rửa giải thường phải có: (1) hoặc có chứa một phối tử tự do của enzyme có khả năng cạnh tranh với phối tử đang ở trạng thái liên kết với enzyme, (2) hoặc do pH của mình có thể gây biến tính thuận nghịch enzyme do đó làm biến dạng tâm hoạt động của enzyme. Có thể làm yếu tương tác đặc hiệu sinh học bằng cách thay đổi lực ion. Phối tử cạnh tranh (hoặc dung dịch đệm làm biến tính) sau đó được loại bỏ bằng phương pháp thẩm tích.

5.4. Sắc ký tương tác kỵ nước

Sắc ký tương tác kỵ nước sử dụng tính chất kỵ nước của protein bề mặt như là một đặc điểm để chọn lọc. Loại phân tách này thích hợp khi được tiến hành tiếp theo bước kết tủa ammonium sulphate, và không cần thiết phải loại bỏ muối trước khi thực hiện bước sắc ký này. Bằng cách dùng các kỹ thuật hấp phụ và khử hấp phụ bề mặt sẽ làm giảm mạnh thể tích của các dung dịch protein và lượng protein cần tinh sạch sẽ tăng lên từ 90-95%. Chất lượng này đủ cho hầu hết các ứng dụng của protein đặc biệt.

Các protein sẽ lần lượt được phân tách ra tùy theo tương tác của chúng với một chất mang có chứa các nhóm kỵ nước (ưa béo). Các protein chứa các nhóm kỵ nước trên bề mặt, chất mang kỵ nước và dung môi ưa nước tạo thành một hệ ba thành phần và tương tác được với nhau. Hệ này có thể bị rối loạn khi thay đổi nhiệt độ, pH hoặc lực ion.

Nói chung, các tương tác sẽ mạnh nếu ta tăng lực ion (ví dụ: dung dịch NaCl 4 M). Các protein bị giữ lại, tiếp đó có thể được rửa giải một cách chọn lọc bằng cách giảm lực ion này hoặc bằng cách giảm độ phân cực của dung môi rửa (thêm ethylene glycol hoặc một chất tẩy rửa hoặc tăng pH dịch rửa). Có thể gắn các nhóm khác nhau lên chất mang. Ví dụ ở octylsepharose (R) CL-4B và phenylsepharose CL-4b, các nhóm octyl và phenyl đã được đính lên các đơn vị monosaccharide của agarose bằng liên kết ester không tích điện và bền hóa học. Ở những chất mang khác thì có thể sử dụng những nhóm kỵ nước khác.

5.5. Các kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu suất cao (high performance liquid chromatographic techniques)-HPLC

Còn được gọi là sắc ký lỏng cao áp (high pressure) hay sắc ký lỏng giá thành cao (high price). Đây là phương pháp phân tách các chất bằng cách dùng áp suất để đẩy nhanh dung dịch qua cột sắc ký với một hiệu suất cao. Đầu tiên, kỹ thuật này được thiết kế để phân tách các phân tử hữu cơ nhỏ hòa tan trong các dung môi không phải nước, sau đó kỹ thuật này đã nhanh chóng phát triển thành một phương thức thích hợp để phân tách các protein trong các dung môi nước. Tuy nhiên, đa số các ứng dụng đã được công bố với kỹ thuật sắc ký này đều chỉ giới hạn ở quy mô phòng thí nghiệm.

HPLC sử dụng một loại cột chứa các hạt nhỏ rất đồng nhất, có tác dụng cải thiện sự ổn định vật lý và hóa học và phân tách nhanh hơn các gel

mềm truyền thống. Cột sắc ký chứa các vật liệu đệm kín có độ phân giải cao (8, 15 hoặc 40 μm) cho phép sản xuất các phân đoạn cô đặc hơn. Các hạt nhỏ có sức bền cao đối với dòng chảy của chất lỏng để thiết bị được thiết kế hoạt động ở áp suất tương đối cao. Dung môi được phân phối vào cột bằng bơm với dòng không có xung, không thay đổi ở áp suất ngược cao. Cột có khả năng chịu đựng sự tăng áp suất. Đầu dò (detector) có thời gian phản ứng nhanh vì các đỉnh protein có thể trải qua trong một vài giây. Ưu điểm chính của hệ thống HPLC là có thời gian chạy nhanh hơn nhiều so với các phương pháp sắc ký khác nhưng nhược điểm của hệ thống này là đắt tiền nên khó áp dụng ở quy mô lớn.

Hình 6.12. Hệ thống HPLC

6. Siêu lọc

Siêu lọc đã trở thành một kỹ thuật tiêu chuẩn của phòng thí nghiệm để cô đặc các dung dịch protein dưới các điều kiện rất ôn hòa. Phương pháp này được sử dụng trong trường hợp thẩm tách hoặc lọc gel để khử muối hoặc trao đổi đệm. Bằng cách dùng các chất kết tủa ái lực để tăng khối lượng phân tử của protein mong muốn, phương pháp này cũng có thể được dùng như một kỹ thuật tinh sạch.

Hệ siêu lọc thường sử dụng màng lọc có bề mặt nhẵn hoặc màng lọc hệ sợi rỗng. Các sợi này có đặc điểm tương tự với các bề mặt nhẵn, nhưng đối với các quá trình ở quy mô lớn thì nó tạo ra một diện tích bề mặt lớn hơn thể tích đã cho. Ở trường hợp hoạt động ở quy mô pilot, hệ siêu lọc thích hợp với diện tích màng lên tới $6,4 \text{ m}^2$, cho tốc độ siêu lọc lên tới 200 L/giờ, tùy thuộc vào nồng độ của protein. Các hệ lớn hơn thích hợp với các tốc độ siêu lọc của hàng trăm lít/giờ. Sử dụng phương pháp này có thể ứng dụng cho hầu hết mọi quy mô hoạt động.

7. Thiết kế các protein để tinh sạch

Các nhân tố ở quá trình chuẩn bị cơ chất và nguyên liệu sản xuất (upstream processing) có thể ảnh hưởng đến sự phát triển phương thức tinh sạch protein sau này, công nghệ DNA tái tổ hợp cũng có một ảnh hưởng quan trọng lên sự tinh sạch protein. Bằng cách dung hợp một gen quan tâm với một trình tự promoter hiệu quả, thì một protein ngoại lai có thể được biểu hiện trong cơ thể vật chủ từ 10 tới 40% protein tổng số hòa tan của tế bào. Điều này có thể so sánh với sự biểu hiện của nhiều protein nguyên thể (chỉ chiếm khoảng 0,01 tới 4% protein tổng số hòa tan của tế bào). Vì vậy, quá trình tinh sạch tiếp theo của protein được đơn giản hóa. Đối với các protein được biểu hiện trong một dạng hòa tan, các kỹ thuật di truyền có thể được dùng để hướng tới việc protein được tổng hợp mới trong gian bào, hoặc thậm chí trong môi trường nuôi cấy. Điều này có thể làm tăng sự ổn định của protein được biểu hiện (vì chỉ hai trong số tám protease được biết của *E. coli* là hoàn toàn ở trong gian bào) và đơn giản hóa sự tinh sạch (vì chỉ khoảng 8% của tất cả protein của *E. coli* là ở khoang gian bào).

7.1. Các thể vùi (inclusion)

Các mức độ biểu hiện cao như thế đã sản xuất được rất nhiều protein, dẫn đến xuất hiện các hạt không hòa tan được gọi là các thể vùi. Trường hợp này đã được quan sát ở nhiều protein tái tổ hợp, bao gồm urogastrone, interleukin-2, prochymosin và các interferon. Sau khi phá vỡ tế bào, các hạt như thế có thể được lắng xuống đáy với một lực ly tâm (RCF) tương đối thấp, sản xuất nguyên liệu không hòa tan chứa hơn 50% protein mong muốn.

Nguyên nhân tạo thành các thể vùi chưa được biết đầy đủ, vì không phải tất cả protein biểu hiện ở mức độ cao đều tạo thành thể vùi. Tế bào vật chủ cũng thể hiện một vai trò quan trọng. Cấu trúc chính xác của protein tái tổ hợp cũng có thể ảnh hưởng sự tạo thành các thể vùi. Một nghiên cứu được thực hiện bằng cách dùng β -interferon người tái tổ hợp cho thấy rằng chỉ một vài thay đổi amino acid cũng có thể ảnh hưởng đến sự chuyển hóa giữa các biểu hiện của protein hòa tan và không hòa tan trong *E. coli*.

Thông thường, các thể vùi được hòa tan trong urea hoặc guanidinium chloride (thường ở giá trị pH cao) và một vài trường hợp có thể bổ sung chất tẩy rửa. Một khi được hòa tan, protein phải được tái cuộn xoắn thành một cấu hình tự nhiên. Trong nhiều trường hợp, chỉ cần pha loãng đơn giản của dịch chiết hòa tan trong một đệm thích hợp là đủ. Nếu protein chứa các cầu nối disulfide, người ta cần phải tiến hành oxy hóa và khử glutathione để cung cấp một môi trường thích hợp giúp cho chúng được tạo thành chính xác. thỉnh thoảng cần bổ sung đồng dung môi (co-solvent), như PEG, hoặc các chất tẩy rửa như Triton X-100, Tween 20 hoặc Zwittergent 3-16. Trong một số trường hợp, các protein hòa tan có thể rất khó tái cuộn xoắn, và người ta thấy rằng việc bổ sung chaperonins có thể giúp ích cho các quá trình tái cuộn xoắn. Chaperonins là các protein cần để đảm bảo cuộn xoắn chính xác các *in vivo* protein, với khả năng thuận lợi của chaperonin tái tổ hợp chúng được dùng để xúc tác cho quá trình tái cuộn xoắn chính xác của các protein *in vitro*.

7.2. Các đuôi ái lực

Khái niệm đuôi ái lực xuất hiện khi thiết kế di truyền với mục đích giúp cho sự tinh sạch protein hoặc enzyme hiệu quả hơn. Gen của protein quan tâm được dung hợp với chuỗi DNA mã hóa cho một số trình tự amino acid sẽ đơn giản hóa quá trình tinh sạch protein, bằng cách biến đổi các tính chất của nó trong một kiểu có thể dự đoán. Một trong các trường hợp đầu tiên là dung hợp di truyền của một số gốc arginine với C-terminus của urogastrone. Gen này sẽ sản xuất một protein liên kết mạnh với khuôn trao đổi ion cho cation. Đuôi polyarginine sau đó được loại bỏ bằng cách dùng enzyme bất động carboxypeptidase A.

Bảng 6.2. Các phương pháp loại bỏ các đuôi ái lực

Trình tự liên kết	Phương pháp phân cắt	Các điều kiện
-Asn↓Gly-	Hydroxylamine	pH 9; 45°C
-Asp↓Pro-	Acid	10% acetic acid; 55°C
-Met↓X _{xxx} -	CNBr	70% formic acid; 20°C
-X _{xxx} ↓(Arg) _n -	CarboxypeptidaseB	pH 8; 37°C
-X _{xxx} ↓(His) _n -	CarboxypeptidaseA	pH 8; 37°C
-Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg↓X _{xxx}	Thrombin	pH 7-8; 37°C
-Ile-Glu-Gly-Arg↓X _{xxx}	Factor X _a	pH 7-8; 37°C
-Asp-Asp-Asp-Lys↓X _{xxx}	Enterokinase	pH 8; 37°C
-Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro-	PreCission Protease	pH 7; 5°C

Khó khăn chủ yếu ở các dung hợp ái lực để tinh sạch protein là phải loại bỏ thành công đuôi ái lực và các tác nhân được sử dụng. Vấn đề này có thể được giải quyết từng phần bằng sự biến nạp di truyền các điểm đặc hiệu cao cho protease hoặc cho sự cắt bỏ các liên kết acid không bền ở chỗ nối của protein tái tổ hợp và đuôi ái lực. Nhiều phương pháp phân cắt đã được gợi ý (Bảng 6.2). Sử dụng các protease đặc hiệu là thích hợp hơn cả, bởi vì

có thể ứng dụng trong các điều kiện “nhẹ nhàng”, chủ yếu là thrombin, enterokinase và Factor X_a. Tất cả những protein này hoạt động ở 37°C và có thể phân cắt ở các vị trí bên trong protein quan tâm, hoặc do mất tính đặc hiệu hoặc từ sự nhiễm bẩn các protease. Cuối cùng, các bước sắc ký tiếp theo sẽ được yêu cầu để loại bỏ đuôi ái lực được phân cắt và protease.

Bảng 6.3. Các phương pháp tinh sạch protein bằng đuôi ái lực

Đuôi ái lực	Phối tử/khuôn	Các điều kiện liên kết	Các điều kiện tách rửa
Oligo arginine	S-Sepharose	pH 4-8	NaCl gradient
Oligo histidine	Iminodiacetate-Sepharose (Ni ²⁺)	pH 7-8 ± guanidium chloride	Đệm imidazole hoặc giảm pH gradient ± guanidium chloride
Flag TM antigenic peptide	Anti-Flag antibody-Sepharose	0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,8	10 mM EDTA, pH 7,4
-galactosidase	TPEG-Sepharose	1,6 M NaCl, pH 7	0,1 M sodium borate
Chloramphenicol acetyl transferase	p-amino-chloramphenicol-Sepharose	0,3 M NaCl, pH 7,8	5mM chloramphenicol
Protein A	IgG-Sepharose	pH 7,6	0,5 M acetic acid
Glutathione-S-transferase	Glutathione-Sepharose	pH 7,3	Glutathione

Trong sự phát triển gần đây của lĩnh vực này, người ta đã sử dụng dạng tái tổ hợp của protease 3C từ rhinovirus của người. Protease này có kích thước nhỏ (20 kDa) và có một tính đặc hiệu rất hạn chế (Bảng 6.3). Nó được biểu hiện như là một protein tái tổ hợp được dung hợp với glutathione-

S-transferase. Điều này có một vài ưu điểm, bản thân protease có thể được tinh sạch bằng sắc ký ái lực trên glutathione-Sepharose. Nếu protein đích được biểu hiện như là một sự dung hợp với glutathione-S-transferase thì nó có thể được tinh sạch trên cột glutathione-Sepharose. Sau khi xử lý với protease, protein đích có thể được phân tách khỏi đuôi glutathione-S-transferase và protease bằng cách chuyển qua cột glutathione-Sepharose thứ hai.

Một cách khác, phản ứng phân cắt có thể được đặt trên cột glutathione-Sepharose thứ nhất bằng cách bổ sung protease vào đệm của cột, vì thế tránh được sự cần thiết cho một cột thứ hai. Protease này có sẵn ở dạng thương mại dưới tên PreCission protease do Amersham Pharmacia Biotech sản xuất (Bảng 6.2).

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

- 1. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy và Nguyễn Xuân Sâm.** 2004. Công nghệ enzyme. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội.
- 2. Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng.** 1999. Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
- 3. Bains W.** 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press Inc.* New York, USA.
- 4. Glick BR and Pasternak JJ.** 2003. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd ed. *ASM Press*, USA.
- 5. Lee JM.** 2000. Biochemical Engineering. *Prentice Hall Inc.* USA.
- 6. Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
- 7. Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall Inc.* New Jersey, USA.
- 8. Walker JM.** 2002. The Protein Protocol Handbook. 2nd ed. *Humana Press Inc.* New Jersey, USA.
- 9. Walker JM and Rapley R.** 2002. Molecular Biology and Biotechnology. 4th ed. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.