

Phần I

Các khái niệm và nguyên lý cơ bản

Chương 1

Mở đầu

I. Định nghĩa công nghệ sinh học

1. Định nghĩa tổng quát

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

Công nghệ sinh học là quá trình 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.

Đầu những năm 1980, đã bắt đầu hình thành công nghệ sinh học hiện đại là lĩnh vực công nghiệp sử dụng hoạt động sinh học của các tế bào đã được biến đổi di truyền. Công nghệ sinh học hiện đại ra đời cùng với sự xuất hiện kỹ thuật gen. 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:

1.1. 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)

1.2. 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 DNA (DNA chip)
- + Liệu pháp tế bào và gen (gene and cell therapy)
- + Protein biệt dược (therapeutic protein)
- + Tin sinh học (bioinformatics)
- + Công nghệ sinh học nano (nanobiotechnology)
- + Hoạt chất sinh học (bioactive compounds)

2. Nội dung khoa học của công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học cũng có thể được phân loại theo các kiểu khác nhau. Xét về góc độ các tác nhân sinh học tham gia vào quá trình công nghệ sinh học, 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 nhân tố sinh học dưới tế bào còn hình thành khái niệm công nghệ protein (protein engineering) và công nghệ gen (gene 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, 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 biến đổi gen (genetically modified organism-GMO) và các thực phẩm biến đổi 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 chia 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)...

Một số tác giả cho rằng loài người đã áp dụng công nghệ sinh học từ rất lâu vào các hoạt động sản xuất, ví dụ: công nghệ sản xuất đồ uống (rượu, bia...) hoặc công nghệ sản xuất thực phẩm (món bánh mì, nước mắm, tương, chao...). Do đó, việc định nghĩa và phân loại công nghệ sinh học trong giai đoạn phát triển ban đầu có một ý nghĩa rất quan trọng để có những chính

sách đầu tư hợp lý và ưu tiên cho công nghệ sinh học. Dưới đây là các lĩnh vực ứng dụng công nghệ sinh học hiện nay đang được quan tâm hàng đầu.

3. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học

3.1. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp

Lĩnh vực nông nghiệp tuy không phải là mục tiêu phát triển hàng đầu của công nghệ sinh học ở nhiều nước công nghiệp trên thế giới, nhưng trên thực tế những hoạt động nghiên cứu và phát triển, sản xuất và thương mại hóa ở lĩnh vực này cũng được nhiều tập đoàn lớn quan tâm. Có thể nêu ba lĩnh vực chính là:

- Giống cây trồng và vật nuôi nhân vô tính và chuyển gen mang những đặc điểm nông-sinh quý giá mà các phương pháp truyền thống không tạo ra được, đồng thời lại được bảo vệ thông qua bản quyền tác giả.

- Các chế phẩm sinh học dùng trong bảo vệ cây trồng vật nuôi, như: vaccine, thuốc trừ sâu bệnh và phân bón vi sinh.

- Công nghệ bảo quản và chế biến nông-hải sản bằng các chế phẩm vi sinh và enzyme. Giá trị nông sản được nâng lên nhiều lần và quy trình công nghệ đi kèm trang thiết bị là một dạng hàng hóa trong kinh doanh chuyển giao công nghệ.

Ngoài ra có thể liệt kê thêm một số lĩnh vực khác:

- Công nghệ sinh học chế biến thực phẩm: Các enzyme (amylase, rennin, β -galactosidase, invertase, gluco-isomerase, pectinase), các chất phụ gia thực phẩm (các chất tạo ngọt, hương vị, tạo màu, bột nở và làm ổn định, các vitamin, các amino acid, các chất chống oxy hóa, các chất bảo quản, các chất hoạt hóa bề mặt...).

- Các loại thức ăn bổ sung cho chăn nuôi (kháng sinh mới...).

- Các loại thuốc trừ sâu, diệt cỏ với tính đặc hiệu tăng lên (các sản phẩm *Bt*, các baculovirus, tuyến trùng ký sinh...).

- Các hormone sinh trưởng thực vật (các cytokinin...).

- Các hóa chất chẩn đoán bệnh cho động-thực vật.

3.2. Công nghệ sinh học trong y dược

Có lẽ thành tựu công nghệ sinh học được thể hiện rõ nét nhất là ở lĩnh vực y học. Hiện nay, hầu hết các sản phẩm quan trọng sau đây đều được sản xuất trên cơ sở công nghệ sinh học, bao gồm các ứng dụng sau:

- Các loại kháng sinh và các chất diệt khuẩn, các loại vitamin và chất bổ dưỡng, các loại amino acid và hỗn hợp của chúng trong dịch truyền, các loại vaccine và các loại hormone chữa bệnh.

- Các bộ kit chuẩn dùng trong chẩn đoán bệnh và chẩn đoán hóa sinh trong y dược.

- Cây trồng và vật nuôi được cấy chuyển những gen sản sinh ra các loại protein trị liệu đang là mục tiêu đầu tư của khá nhiều công ty y dược hàng đầu trên thế giới hiện nay.

Cụ thể là nghiên cứu và sản xuất các dược phẩm, các kháng thể đơn dòng, interferon, các hormone (hormone sinh trưởng, insulin, erythropoietin, thrombopoietin...), các enzyme (urokinase, heparinase, alcohol dehydrogenase), các protein khác (các kháng nguyên đặc hiệu, albumin, antithrombin, fibronectin...), các kháng sinh, thuốc và vitamin mới, các dược phẩm có bản chất protein, các loại vaccine viêm gan B, C, HIV, cúm, sốt rét, viêm não, tả và các tác nhân gây bệnh tiêu chảy, các kit chẩn đoán như: chẩn đoán sự có mặt HIV, virus viêm gan B và C trong máu, một số chẩn đoán thai..., liệu pháp gen: điều trị các gen gây bệnh di truyền.

Hiện nay, các công ty công nghệ sinh học y dược hàng đầu thế giới đang tập trung vào nghiên cứu tạo ra sản phẩm chống lại các căn bệnh như HIV/AIDS, các loại bệnh ung thư, tiểu đường, các bệnh tim mạch, các bệnh truyền nhiễm...

3.3. Công nghệ sinh học công nghiệp và chế biến thực phẩm

Công nghệ sinh học công nghiệp bao gồm các lĩnh vực sản xuất các loại enzyme như amylase, cellulase và protease dùng trong công nghiệp dệt, công nghiệp xà phòng và mỹ phẩm, công nghiệp bánh kẹo, rượu bia và nước giải khát...

Sau đây là các loại sản phẩm của công nghệ sinh học công nghiệp:

- Công nghiệp hóa chất: Các hóa chất thông dụng (ví dụ: acrylamide) đều có thể sản xuất bằng công nghệ sinh học. Công nghiệp hóa học sẽ có

hiệu quả hơn nếu dùng các chất xúc tác sinh học (enzyme), tái sinh và xử lý các dung môi bằng con đường sinh học.

- Quá trình chế biến tinh bột: Dùng các enzyme do công nghệ sinh học tạo ra để dịch hóa và đường hóa tinh bột thành glucose và chuyển hóa thành fructose.

- Công nghiệp làm sạch: Các chất giặt tẩy hiện đại được bổ sung protease và các enzyme khác làm sạch các vết bẩn protein, tinh bột và chất béo.

- Công nghiệp bột gỗ và giấy: Nhu cầu của thị trường và bảo vệ môi trường ngày càng lớn đối với giấy ít chứa các hợp chất chlorine gây ô nhiễm. Quá trình sản xuất bột giấy hiện nay gây ô nhiễm rất nặng. Công nghệ sinh học đưa ra giải pháp sinh học để sản xuất bột giấy không gây ô nhiễm bằng cách sử dụng các loại nấm phân hủy lignin-cellulose để tạo bột. Các enzyme cũng được dùng nâng cao chất lượng sợi và chất lượng giấy.

- Công nghiệp khai khoáng và phát hiện khoáng sản. Có hai công nghệ: lọc sinh học/oxy hóa sinh học các kim loại, xử lý ô nhiễm kim loại và tái sinh. Công nghệ lọc kim loại dùng các vi sinh vật có thể thu được các kim loại quý như đồng, kẽm và cobalt. Công nghệ xử lý sinh học ô nhiễm có thể áp dụng đối với các kim loại nặng.

3.4. Công nghệ sinh học môi trường

Tuy là lĩnh vực khá mới nhưng sự phát triển và ứng dụng của công nghệ sinh học môi trường rất đáng kể. Mọi quá trình xử lý chất thải nếu không khép kín bằng xử lý sinh học thì khó có thể thành công trọn vẹn.

Các hoạt động chính của công nghệ sinh học môi trường đang được chú trọng là:

- Công nghệ phân hủy sinh học: Dùng các cơ thể sống phân hủy các chất thải độc tạo nên các chất không độc như nước, khí CO_2 và các vật liệu khác. Bao gồm, công nghệ kích thích sinh học: bổ sung chất dinh dưỡng để kích thích sự sinh trưởng của các vi sinh vật phân hủy chất thải có sẵn trong môi trường, công nghệ bổ sung vi sinh vật vào môi trường để phân hủy chất ô nhiễm, công nghệ xử lý ô nhiễm kim loại và các chất ô nhiễm khác bằng thực vật và nấm.

- Dự phòng môi trường: Phát triển các thiết bị dò và theo dõi ô nhiễm môi trường, đặc biệt trong việc dò nước và khí thải công nghiệp trước khi giải phóng ra môi trường.

II. Sơ lược lịch sử hình thành công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học phát triển cho đến ngày nay, đã qua ba giai đoạn chính:

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

Cũng có tác giả gắn quá trình phát triển nêu trên 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 các 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 cắt 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.

Cũng có thể chia lịch sử hình thành và phát triển công nghệ sinh học theo 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, nghề nấu bia có vai trò rất đáng kể. Ngay từ cuối thế kỷ 19, Pasteur đã cho thấy 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), đặc biệt là việc tổng hợp thành công gen và buộc nó biểu 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 (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Một số hướng phát triển của công nghệ sinh học hiện đại

Lĩnh vực	Ứng dụng
Nông nghiệp	Tạo chủng vi sinh vật mới, xây dựng các phương pháp chọn giống cây trồng và vật nuôi mới.
Y tế	Dùng enzyme tạo các bộ cảm biến sinh học trong các thiết bị phân tích y tế. Sử dụng tế bào vi sinh vật, tế bào động-thực vật trong sản xuất thuốc (ví dụ: steroid) và tổng hợp các loại kháng sinh mới. Sử dụng enzyme trong chữa trị bệnh.
Công nghiệp thực phẩm	Xây dựng và hoàn thiện các phương pháp chế biến và bảo quản thực phẩm mới, sản xuất chất bổ sung vào thực phẩm (vitamin, amino acid...), sử dụng protein đơn bào và enzyme trong công nghệ chế biến thực phẩm.
Giám sát môi trường	Hoàn thiện các phương pháp dự đoán và giám sát tình trạng môi trường. Hoàn thiện các phương pháp xử lý chất thải (đặc biệt là chất thải công nghiệp).
Sản xuất hóa chất	Sản xuất các acid hữu cơ (citric acid, itaconic acid, acetic acid...), sản xuất enzyme làm chất tẩy rửa.
Năng lượng	Gia tăng phạm vi sử dụng biogas, xây dựng các dự án lớn sản xuất ethanol dùng làm nhiên liệu.

4. Giai đoạn thứ tư

Bắt đầu từ năm 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, cùng với thí nghiệm chuyển gen vào cây trồng cũng thành công vào năm này. 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...)... Những thành công này sẽ được trình bày chi tiết hơn trong Phần II-Các ứng dụng của công nghệ sinh học.

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

Các phương tiện thông tin đại chúng đã 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 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. Gần đây, khi các nhà khoa học xác nhận kỹ thuật nhân bản cừu Dolly hoàn toàn có thể áp dụng cho việc nhân bản con người, ở khắp các nước đã dấy lên một làn sóng phản đối việc nhân bản người, có nơi cấm hoàn toàn hướng nghiên cứu này. 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 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 gắn 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 kanamycin, ampicillin hoặc hygromycin thường được sử dụng kèm theo để làm gen chỉ thị chọn lọc. 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. Mặc dù khả năng này là vô cùng thấp, thậm chí khi một gen kháng sinh được phát tán sang một sinh vật khác thì tác động của việc này cũng không đáng kể do các gen chỉ thị chọn lọc được sử dụng trong sinh vật chuyển gen có ứng dụng rất hạn chế trong thú y và y học. Tuy nhiên, để làm dịu những lo lắng của xã hội, các nhà nghiên cứu được yêu cầu tránh sử dụng các gen kháng kháng sinh trong sinh vật chuyển gen. Việc sử dụng gen chỉ thị thay thế khác đang được đánh giá và phát

triển. Hiện nay, người ta đang tìm cách thay thế các gen chỉ thị chọn lọc cũ bằng các gen có vẻ ít hại hơn như gen mã hóa 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 tiến bộ RAFI (Rural Advancement Foundation International) là một tổ chức phi chính phủ ở Canada hoạt động nhằm hạn chế ảnh hưởng của các công ty đa quốc gia về giống. Theo RAFI, các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học sẽ hoạt động rất mạnh trong thế kỷ 21, hiện nay những công ty này đang phát triển nhanh chóng nhờ thu 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 và 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, 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 nông sản. Vừa độc quyền hạt giống GMO lại vừa 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.

IV. Các vấn đề pháp lý của công nghệ sinh học hiện đại

Công nghệ DNA tái tổ hợp 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 công nghệ DNA tái tổ hợp. Tuy nhiên, 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.

Chẳng hạn, chúng ta có thể tham khảo hệ thống quản lý đối với các sản phẩm cây trồng của công nghệ sinh học hiện đại ở Mỹ, nơi mà lĩnh vực công nghệ sinh học được đầu tư và phát triển tốt nhất trên thế giới.

Hệ thống quản lý của Mỹ là một bộ phận quan trọng nhằm đảm bảo an toàn lương thực. Phối hợp với Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA) và Cục Bảo vệ Môi trường (EPA), Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) đóng vai trò 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. Ngoại trừ thịt gia súc-gia cầm và một số sản phẩm trứng, những hạng mục này thuộc phạm vi điều tiết của USDA. Tuy nhiên, độ an toàn của dư lượng thuốc thú y trong thịt gia súc, gia cầm và thủy sản là do FDA quản lý. Thuốc trừ sâu lại chủ yếu do EPA điều tiết. 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.

Các loại lương thực và thành phần lương thực được tạo ra nhờ công nghệ sinh học phải đáp ứng những tiêu chuẩn an toàn tương tự như các tiêu chuẩn mà Đạo luật FD&C áp dụng đối với các cây trồng được tạo ra theo phương pháp lai giống thông thường. Điều này có nghĩa là các sản phẩm công nghệ sinh học cũng phải an toàn giống như các sản phẩm truyền thống trên thị trường. FDA có quyền loại trừ một loại lương thực khỏi thị trường hoặc trừng phạt những người buôn bán loại lương thực đó nếu nó gây ra rủi ro đối với sức khỏe cộng đồng. Cần lưu ý rằng Đạo luật FD&C quy định những người áp dụng công nghệ sinh học phải chịu trách nhiệm pháp lý nhằm đảm bảo rằng những lương thực mà họ bán cho người tiêu dùng phải an toàn và đáp ứng tất cả các yêu cầu về pháp lý.

1. An toàn sinh học

1.1. Sự chuyển gen bằng hạt phấn

Cho tới nay không có hạt phấn của loại cây trồng biến đổi gen nào được hạn chế khả năng phát tán. Các phương thức quản lý như cách ly không gian và thời gian có thể hạn chế sự lưu chuyển gen (gene flow) giữa cây trồng, hạn chế hạt sót lại trong đất và cây sót lại sau khi thu hoạch. Việc sử dụng vùng cách ly, rào cản cây trồng và các rào cản thực vật khác giữa nguồn tạo và nơi nhận hạt phấn cũng có thể giảm mức độ phát tán hạt phấn. Thời gian hạt phấn ở trong không khí cũng khá dài, do đó có thể phát tán đến khoảng cách khá xa. Tuy nhiên, điều kiện thời tiết và môi trường thay đổi có thể gây ra sự phát tán ở những khoảng cách xa hơn nữa. Các biện pháp cách ly sinh học đang được phát triển nhằm xác định liệu sự sinh sản ở cây trồng có thể kiểm soát được hay không để tránh sự giao lưu gen qua hạt hoặc hạt phấn.

Đặc biệt ở các giống hoặc dòng có cây bất dục đực, sẽ xảy ra hiện tượng lai xa với giống biến đổi gen hữu thụ ở một tần số cao hơn và khoảng cách xa hơn so với giống truyền thống. Sự tích lũy gen (gene stacking) đã được quan sát ở cây trồng và người ta dự đoán là cây trồng mang gen đa kháng sẽ trở nên phổ biến sau khi cây trồng chuyển gen được phép đưa vào thị trường, và vì vậy cây mọc hoang biến đổi gen sẽ phải cần các biện pháp diệt cỏ khác.

Các nghiên cứu cho thấy phần lớn sự thụ phấn chéo xảy ra ở khoảng cách ngắn và khả năng thụ phấn thành công giảm theo hàm mũ so với khoảng cách từ nguồn phát ra hạt phấn. Nhưng trên phạm vi nông trại vẫn có sự lưu chuyển gen, mặc dù mức độ xảy ra rất thấp ở một khoảng cách khá xa, vì vậy sự tách biệt hoàn toàn về mặt di truyền là rất khó duy trì.

Trong khi hạt phấn đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo không gian thì hạt giống đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo thời gian. Do đó, khi cách ly cây trồng chuyển gen với cây trồng không chuyển gen phải tính đến chuyện trước đó cây trồng chuyển gen có được trồng trên cùng mảnh đất đó không và tập quán canh tác có gây ra sự di chuyển các hạt giữa các mảnh ruộng hay không.

Ngoài ra, sự lưu chuyển gen giữa cây biến đổi gen và họ hàng của nó còn tùy thuộc vào loại tính trạng gen chuyển quy định, đặc điểm sinh học của cây (thụ phấn chéo hoặc tự thụ phấn) và bối cảnh nông nghiệp (hệ thống cây trồng, tổ chức không gian giữa các thửa ruộng).

1.2. Sự bền vững của DNA trong đất

DNA của cây chuyển gen có thể được phóng thích vào môi trường từ các nguyên liệu thực vật đã già hoặc mục nát. Vấn đề này đã được khảo sát ở một số cây chuyển gen như thuốc lá (aacC1), hoa dã yên (NOS-nptII) và củ cải đường (bar/TR1, TR2/nptII, 35S/BNYVV-cp). Sự bền vững của cấu trúc DNA trong đất được phát hiện bằng cách tách chiết DNA trực tiếp từ đất, sau đó khuếch đại cấu trúc này bằng kỹ thuật PCR. Chọn lọc primer thích hợp cho phép phát hiện rõ ràng cấu trúc chuyển gen bên cạnh các gen xuất hiện tự nhiên. Với phương pháp này sự hiện diện của cấu trúc DNA có thể được phát hiện nhưng không có thông tin nào về sự hiện diện của nó trong nguyên liệu thực vật mục nát, có thể do DNA tự do đã được hấp thụ vào bề mặt đất. DNA của cây củ cải đường chuyển gen được phát hiện trong mẫu đất ở vị trí đã không sử dụng 6, 12 và 18 tháng sau khi cây củ cải đường bị cày lấp trong đất. Người ta cũng đã tìm thấy DNA cây thuốc lá chuyển gen ở trong đất sau hơn 1 năm thu hoạch. Trong khi đó DNA của hoa dã yên chuyển gen chỉ có thể phát hiện vào thời điểm 2 tháng sau khi cây được cày lấp trong đất.

Mặc dù chỉ có một vài khảo sát về sự bền vững của DNA cây chuyển gen ở trong đất, nhưng sự bền vững của cấu trúc trong một thời gian dài có thể được chứng minh rõ ràng.

1.3. Chuyển gen ngang từ thực vật vào vi sinh vật đất

Chuyển gen ngang (horizontal gene transfer) là hiện tượng chuyển các gen hoặc nguyên liệu di truyền trực tiếp từ một cá thể riêng biệt vào một cá thể khác bằng các quá trình tương tự sự gây nhiễm. Phân biệt với một quá trình bình thường là chuyển gen dọc (vertical gene transfer)-từ bố mẹ vào con cái-xuất hiện trong quá trình sinh sản. Chuyển gen ngang trong phần này đề cập đến DNA ngoại lai của cây chuyển gen hiện diện ở trong đất, vi khuẩn phát triển khả năng để nhận gen này và cuối cùng, các trình tự này được hợp nhất trong genome của vi khuẩn.

Nguy cơ của công nghệ di truyền đó là làm tăng tiềm năng của sự chuyển gen ngang qua các loài không họ hàng. Các cơ chế tế bào cho phép các gen ngoại lai xen đoạn vào genome của một loài nào đó. Các gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc kháng kháng sinh của vi khuẩn thường được sử dụng như là các chỉ thị chọn lọc đối với cây chuyển gen. Vì thế, chuyển ngang từ thực vật vào vi sinh vật của các gen kháng như thế thường được xem như là một hiệu ứng tiềm tàng không mong muốn giữa cây chuyển gen và các vi sinh vật đất.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bằng chứng rõ ràng về việc chuyển gen từ thực vật vào các vi sinh vật. Hiện nay, các nghiên cứu an toàn sinh học (biosafety) về chuyển gen ngang từ cây chuyển gen vào vi sinh vật (vi khuẩn và nấm) có hai hướng chính là tìm hiểu cơ chế chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật và đánh giá các hậu quả sinh thái của nó.

Cơ chế chủ yếu của việc chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật là quá trình biến nạp tự nhiên đòi hỏi sự hấp thụ DNA tự do. Vi khuẩn đất có thể biến nạp tự nhiên và hợp nhất DNA ngoại lai trong genome của mình. Để chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật ở điều kiện đồng ruộng, không phải chỉ có cơ chế cho phép hấp thụ và sao chép trong một vật chủ mới mà sự chọn lọc vật chủ để biểu hiện một tính trạng mới là quan trọng nhất. Phát hiện chuyển gen ngang có thể thực hiện bằng cách phân tích vi khuẩn đất sau giai đoạn nuôi cấy đầu tiên.

1.4. Chuyển gen từ thực vật vào virus

Kết quả đầu tiên về cây chuyển gen biểu hiện protein vỏ của virus khảm thuốc lá (TMV) đã ngăn chặn sự phát triển của bệnh xuất hiện trong năm 1986. Phương thức này sau đó đã được sử dụng để tạo ra tính kháng cho các loại virus khác nhau, tuy nhiên các nhà di truyền học đã đặt câu hỏi về sự an toàn của cây trồng chuyển gen ngay từ những ngày đầu tiên. Nguy cơ rõ rệt nhất là tiềm năng tạo ra các virus gây nhiễm mới bằng sự tái tổ hợp, ví dụ: gen chuyển của virus (viral transgene) liên kết hoặc trao đổi các phần với nucleic acid của các virus khác. Do vỏ protein không ngăn được virus xâm nhập vào tế bào thực vật, gen chuyển (transgene) sẽ được tiếp xúc với các nucleic acid của nhiều virus được mang tới thực vật bởi các vector côn trùng (insect vector).

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các virus thực vật có thể tấn công một loạt các gen virus khác nhau từ cây chuyển gen. Chẳng hạn:

- Virus gây bệnh khảm hoại tử ở cây cỏ ba lá màu đỏ (red clover necrotic mosaic virus-RCNMV) dạng khiếm khuyết đã thiếu gen cho phép nó chuyển từ tế bào này đến tế bào khác (vì thế không gây nhiễm được) đã tái tổ hợp với một bản sao của gen đó trong cây thuốc lá chuyển gen *Nicotiana benthamiana*, và đã sinh sản các virus gây nhiễm.

- Cây cải *Brassica napus* chuyển gen VI, một nhân tố hoạt động dịch mã, của virus khảm súp- lơ (cauliflower mosaic virus-CaMV), đã tái tổ hợp với phần bổ sung của virus thiếu mất gen đó, và tạo ra virus gây nhiễm trong 100% cây chuyển gen.

- Sự tái tổ hợp giữa CaMV dạng hoang dại và dạng chuyển gen VI được chứng minh trong *N. bigelovii*. Ít nhất một trong số các virus tái tổ hợp có độc tính hơn dạng hoang dại.

- Cây *N. benthamiana* biểu hiện một đoạn gen protein vỏ của virus CCMV (cowpea chlorotic mottle virus) đã tái tổ hợp với virus khiếm khuyết thiếu gen đó.

Nhiều khảo sát cho thấy trong các thí nghiệm có CaMV tần số tái tổ hợp cao hơn nhiều so với các virus khác. Trong khi CCMV tái tổ hợp được phục hồi từ 3% cây chuyển gen *N. benthamiana*, thì CaMV tái tổ hợp được phục hồi từ 36% cây chuyển gen *N. bigelovii*. Người ta nghi ngờ rằng sự đứt gãy DNA sợi đôi có thể xảy ra trong trường hợp tái tổ hợp ở CaMV do thực tế là DNA chuyển gen bao gồm cả promoter CaMV 35S.

2. An toàn thực phẩm

Các giống cây trồng chuyển gen ngày càng được phát triển nhờ vào các công cụ của công nghệ sinh học hiện đại. Cũng chính vì vậy mà nhiều người băn khoăn rằng liệu các thực phẩm này có an toàn bằng các loại thực phẩm có được nhờ sử dụng các phương pháp nông nghiệp truyền thống hay không. Vậy sự khác biệt giữa lai giống thông thường và công nghệ sinh học thực vật là gì. Thực ra cả hai đều có cùng một mục tiêu là tạo ra các giống cây trồng có chất lượng cao với những đặc tính đã được cải thiện giúp chúng phát triển tốt hơn và ngon hơn. Sự khác biệt là ở chỗ mục đích này đạt được bằng cách nào.

Lai giống truyền thống đòi hỏi sự trao đổi hàng ngàn gen giữa hai cây để có được tính trạng mong muốn. Trong khi đó, nhờ công nghệ sinh học hiện đại, chúng ta có thể lựa chọn một đặc tính mong muốn và chuyển riêng nó vào hạt giống. Sự khác biệt giữa hai kỹ thuật này là rất lớn. Phương pháp công nghệ sinh học hợp lý hơn, có hiệu quả cao và đem lại kết quả rất tốt.

Các kỹ thuật sử dụng trong công nghệ sinh học hiện đại cung cấp cho những nhà lai tạo giống những công cụ chính xác cho phép họ chuyển những đặc tính mong muốn vào cây trồng. Hơn thế nữa, họ có thể làm điều này mà không bị chuyển thêm các tính trạng không mong muốn vào cây như vẫn thường xảy ra, nếu sử dụng lai giống truyền thống.

Thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen phải trải qua nhiều thử nghiệm hơn bất kỳ loại thực phẩm nào trong lịch sử. Trước khi được đưa ra thị trường, chúng phải được đánh giá sao cho phù hợp với các quy định do một vài tổ chức khoa học quốc tế đưa ra như Tổ chức Y tế Thế giới, Tổ chức Nông Lương, Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế... Những quy định này như sau:

- Các sản phẩm chuyển gen cần được đánh giá giống như các loại thực phẩm khác. Các nguy cơ gây ra do thực phẩm có nguồn gốc từ công nghệ sinh học cũng có bản chất giống như các loại thực phẩm thông thường.

- Các sản phẩm này sẽ được xem xét dựa trên độ an toàn, khả năng gây dị ứng, độc tính và dinh dưỡng của chúng hơn là dựa vào phương pháp và kỹ thuật sản xuất.

- Bất kỳ một chất mới nào được đưa thêm vào thực phẩm thông qua công nghệ sinh học đều phải được cho phép trước khi đưa ra thị trường,

cũng giống việc các loại chất phụ gia mới như chất bảo quản hay màu thực phẩm cần phải được cho phép trước khi thương mại hóa.

Một số nhận định trong vấn đề an toàn thực phẩm hiện nay như sau:

- Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với các thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với việc đánh giá các thực phẩm khác. Quá trình đánh giá an toàn thực phẩm đảm bảo rằng thực phẩm chuyển gen mang lại tất cả các lợi ích như thực phẩm thông thường và không có thêm một tác hại nào.

- Chưa có bằng chứng nào cho thấy thực phẩm chuyển gen hiện đang có trên thị trường gây ra bất cứ lo ngại nào về sức khỏe con người hay có bất kỳ khía cạnh nào kém an toàn hơn so với cây trồng tạo được nhờ lai giống truyền thống.

- Một điểm đặc trưng của kỹ thuật chuyển gen là nó đưa vào một hay nhiều gen đã được xác định rõ. Điều này giúp cho việc thử nghiệm độc tính của các cây trồng chuyển gen dễ thực hiện hơn so với các cây trồng bình thường.

2.1. Các chất gây dị ứng

Một trong những mối quan tâm lớn nhất về thực phẩm chuyển gen là chất gây dị ứng (một protein gây ra dị ứng) có thể được chuyển vào thực phẩm. Đến nay các nhà khoa học đã biết rất nhiều về các thực phẩm gây ra dị ứng ở trẻ nhỏ và người trưởng thành. Khoảng 90% sự dị ứng thức ăn là có liên quan tới tám thực phẩm và nhóm thực phẩm-động vật có vỏ (tôm, cua, sò, hến), trứng, cá, sữa, lạc, đậu tương, quả hạch và lúa mì. Những loại thực phẩm này và rất nhiều chất gây dị ứng khác đã được xác định rất rõ và do vậy khó tin rằng chúng có thể được đưa vào thực phẩm chuyển gen.

Tuy vậy, việc kiểm tra tính dị ứng vẫn là một khâu quan trọng trong việc kiểm tra an toàn trước khi một giống cây trồng được đưa ra làm thực phẩm. Hàng loạt các thử nghiệm và câu hỏi phải được xem xét kỹ để quyết định liệu thực phẩm này có làm tăng sự dị ứng hay không.

Các chất gây dị ứng có những đặc tính chung như không bị phân hủy trong quá trình tiêu hóa, có xu hướng không bị phân hủy trong quá trình chế biến thực phẩm, và thường có rất nhiều trong thực phẩm. Cho đến nay,

không có loại protein nào được chuyển vào thực phẩm chuyển gen đã được thương mại hóa lại mang những đặc tính nói trên. Chúng không có tiền sử và khả năng gây dị ứng hay độc tính, cũng không giống với các chất gây dị ứng hay các độc tố đã biết và nói chung chức năng của chúng đã được biết rõ. Những protein này có một hàm lượng rất thấp trong thực phẩm chuyển gen, nhưng nhanh chóng bị phân hủy trong dạ dày và đã được kiểm tra độ an toàn trong các nghiên cứu về thực phẩm cho động vật.

Các gen mã hóa thông tin di truyền có mặt trong tất cả các loại thực phẩm và việc ăn chúng không gây ra bất kỳ ảnh hưởng xấu nào. Không có tác hại di truyền nào xảy ra khi tiêu hóa DNA cả. Trên thực tế, chúng ta luôn nhận DNA mỗi khi ăn do nó có mặt ở tất cả thực vật và động vật.

2.2. Đánh giá độ an toàn của các thực phẩm

Bất kỳ một sản phẩm chuyển gen nào trước khi được đưa ra thị trường phải được thử nghiệm toàn diện, được các nhà khoa học và các giám định viên đánh giá độc lập xem có an toàn về dinh dưỡng, độc tính và khả năng gây dị ứng hay không. Các khía cạnh khoa học thực phẩm này dựa trên những quy định của các tổ chức có thẩm quyền của mỗi nước, bao gồm: một hướng dẫn sử dụng sản phẩm, thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hóa sinh, độc tính, dinh dưỡng và khả năng gây dị ứng. Các câu hỏi điển hình có thể được đặt ra là: (1) Các thực phẩm chuyển gen có được tạo ra từ thực phẩm truyền thống đã được công nhận an toàn hay không. (2) Nồng độ các độc tố hay chất gây dị ứng trong thực phẩm có thay đổi hay không. (3) Hàm lượng các chất dinh dưỡng chính có thay đổi hay không. (4) Các chất mới trong thực phẩm chuyển gen có đảm bảo tính an toàn hay không. (5) Khả năng tiêu hóa thức ăn có bị thay đổi hay không. (6) Các thực phẩm có được tạo ra nhờ các quy trình đã được chấp nhận hay không.

Ngay khi các câu hỏi này và các câu hỏi khác về thực phẩm chuyển gen đã được trả lời, vẫn còn nhiều việc phải làm trong quá trình phê chuẩn trước khi thực phẩm chuyển gen được thương mại hóa. Thực tế, thực phẩm chuyển gen là loại sản phẩm được nghiên cứu nhiều nhất trong các loại đã được sản xuất.

3. Đạo đức sinh học

Đạo đức sinh học (bioethics) là một phạm trù phức tạp mà cách nhìn nhận tùy thuộc vào đặc điểm dân tộc và văn hóa khác nhau. Cho nên, những vấn đề được coi là hợp với đạo đức ở nơi này có thể là trái đạo đức ở nơi khác. Thuật ngữ này có lẽ bắt nguồn ở Mỹ vào những năm 1970, khi các kỹ thuật thao tác gen (gene manipulation), còn gọi là kỹ thuật di truyền hay công nghệ DNA tái tổ hợp, được áp dụng.

Phạm trù đạo đức sinh học bao hàm cách đánh giá lợi ích và rủi ro liên quan tới sự can thiệp của con người, đặc biệt là công nghệ mới, xem xét làm cân đối sự theo đuổi quyền tự do cá nhân với trách nhiệm pháp lý. Đạo đức sinh học đòi hỏi phải đánh giá công nghệ thật kỹ, trong đó có đánh giá ảnh hưởng đến xã hội và cá nhân.

Cùng với thời gian, vấn đề này ngày càng trở nên sâu sắc. Trước những xáo trộn do sự phát triển của di truyền học, người ta tự hỏi mình đang tiến tới loại xã hội nào và sự cân bằng mới nào trên hành tinh sẽ được thiết lập.

Đạo đức sinh học không giới hạn suy nghĩ về mối quan hệ giữa khoa học và xã hội. Nó gắn liền quan hệ giữa con người với tự nhiên trong tính đa dạng sinh học của nó, kể cả bản chất của chính con người. Mặt khác, đạo đức sinh học là một cách suy nghĩ về tương lai và giá trị của chúng ta. Nó giúp cho giới chuyên môn đối thoại với những người ra quyết định và người dân, cùng quan tâm đến sự tồn tại của xã hội loài người.

Ngày 25/7/1978, bé gái được thụ tinh trong ống nghiệm (Louise Brown) đã ra đời ở Anh. Từ đó đến nay, kỹ thuật này đã tạo ra không biết bao nhiêu em bé như vậy trên thế giới, kể cả ở Việt Nam. Mục đích đầu tiên của công việc này là hoàn toàn lành mạnh. Trong trường hợp của Louise Brown, người mẹ bị vô sinh do khuyết tật ở vòi trứng nên để giúp bà có con, người ta đã lấy tế bào trứng của bà thụ tinh trong ống nghiệm với chính tinh trùng của chồng bà, rồi cấy hợp tử vào ngay tử cung của bà. Về mặt sinh học và pháp lý, em bé là con của họ và điều này cũng không đặt ra vấn đề gì về đạo đức hay vi phạm một điều luật nào.

Nhưng một vấn đề tế nhị và phức tạp khác lại được đặt ra nếu một phụ nữ không thể hoặc không muốn mang thai, đề nghị một phụ nữ khác nhận trứng được thụ tinh của mình và mang hộ cái thai đó, vậy đứa con sẽ là của ai. Cho đến nay, ở những nước có dịch vụ mang thai hộ đã phát sinh nhiều

vụ kiện, vì người được thuê nhiều khi phá hợp đồng, không muốn trả lại đứa con cho người thuê nữa.

Một biểu hiện của chủ nghĩa ưu sinh dưới dạng mới, đó là người ta hy vọng có được những đứa con thiên tài bằng cách xin hoặc mua tinh trùng của các nhà bác học được giải thưởng Nobel, cho thụ tinh với trứng của những phụ nữ trẻ đẹp và thông minh rồi cấy phôi vào những phụ nữ này. Nhưng cách làm này không chắc chắn tuyệt đối do quy luật phân ly di truyền và đứa con sinh ra vẫn có thể thuộc loại tầm thường. Sau thành công nhân bản cừu Dolly, người ta hy vọng khắc phục được vấn đề trên bằng cách “nhân bản các thiên tài” nhờ chính tế bào của họ. Như ta đã biết, nhân bản người là một vấn đề rất khó và hiện nay hầu như bị cấm trên thế giới. Và lại đồng nhất di truyền không có nghĩa là đồng nhất bản sắc cá nhân. Xét về mặt luân lý và đạo đức việc làm trên không thể chấp nhận được, còn về mặt khoa học cũng khó hiện thực: thiên tài chỉ biểu hiện ở một độ tuổi nào đó và nếu định cho ra thiên tài theo cách này cũng khó vì hình dạng và thể chất của người mẹ đã khác trước. Lại càng khó thực hiện nếu thông qua một phụ nữ xa lạ không phải là mẹ mình, vì hệ gen của tế bào chất trong trứng lạ cũng có ảnh hưởng và sẽ không phát huy được như của chính mẹ mình.

Hiện nay, sự phát triển nhanh chóng của công nghệ sinh học đã đặt cho các ủy ban đạo đức và luật pháp trên thế giới những vấn đề sau đây:

- Có nên cho phép thay đổi chương trình di truyền của người hay không; và nếu cho phép thì ở mức độ nào, cho dù việc làm này được biện minh là để chữa các bệnh di truyền.

- Có nên chấp nhận việc chẩn đoán trước khi sinh để lựa chọn giới tính của đứa trẻ hay không.

- Có nên bắt buộc thực hiện các chương trình phát hiện di truyền phục vụ lợi ích sức khỏe của người dân hay để mỗi cá nhân nhận xét cơ hội dựa vào các thử nghiệm mà kết quả có thể trái ngược, ảnh hưởng tới họ và người thân của họ (ví dụ việc sinh ra một đứa con có thể có rủi ro khuyết tật hay không).

- Có nên cấm liệu pháp gen (gene therapy) nhằm vào các tế bào sinh dục hay không. Theo Suleiman, giáo sư nghiên cứu các vấn đề quốc tế và giám đốc của Ủy ban nghiên cứu châu Âu (Đại học Princeton, Mỹ) thì “Nhà nước cần xác định mức độ can thiệp vào nghiên cứu khoa học qua tranh luận công khai nhằm hợp pháp hóa hành động cũng như để người dân kiểm

soát các hành động này. Tóm lại, nhà nước cần hợp tác với cộng đồng khoa học để đảm bảo tự do nghiên cứu và ứng dụng hợp đạo đức các kết quả từ đó”.

4. Quyền tác giả và sở hữu trí tuệ

4.1. Quyền tác giả

Mặc dù đã có rất nhiều cuộc tranh luận ở các 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 nhưng đến nay vẫn chưa đem lại một kết quả thật sự 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, 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.

Ngày 16/1/1996, Bản quyền sở hữu số 5.484.889 của Mỹ được cấp cho Giáo sư Sylvia Lee-Huang (Đại học New York) để bảo vệ quyền tác giả của ông về một loại protein chiết từ một giống mướp đắng (*Momordica charantia*) có nguồn gốc từ miền Nam Trung Quốc. Giống mướp đắng này là thành phần chính của một bài thuốc dân gian cổ truyền của Trung Quốc để chống nhiễm trùng. Lee-Huang đã cho rằng nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp, từ nay ông không cần phải mua hạt mướp đắng từ Trung Quốc nữa, vì các protein tái tổ hợp sản xuất trong phòng thí nghiệm của ông hoàn toàn giống như protein chiết từ quả mướp đắng trước đây.

Các trường hợp trên cho thấy các công ty lớn ở các nước phát triển nhờ vào tiềm năng khoa học và nguồn vốn dồi dào của mình đã thương lượng về bản quyền tác giả với tư thế của kẻ mạnh. Sự thua thiệt của các nước yếu về công nghệ sinh học sẽ còn kéo dài.

4.2. Sở hữu trí tuệ

Một trong những nét đặc trưng của công nghệ sinh học hiện đại là sự gia tăng tính sở hữu của nó. Hiện nay, ngành công nghệ sinh học được bảo vệ bởi các bằng sáng chế và các quyền về sở hữu trí tuệ (IPR).

Như chúng ta biết, sở hữu trí tuệ đại diện cho các sản phẩm của trí tuệ. Chúng là các ý tưởng được chuyển thành dạng hữu hình. Ví dụ của sở hữu trí tuệ bao gồm: các sáng chế, phần mềm máy tính, ấn phẩm, băng đĩa ca nhạc, giống cây trồng-vật nuôi... Để tạo ra những sản phẩm như vậy thường đòi hỏi một khoảng thời gian dài và một nguồn vốn đầu tư lớn. Do vậy, các nhà sáng chế thường tìm cách thu hồi các nguồn đầu tư bằng cách sử dụng IPR. IPR cho phép các sáng chế giới hạn quyền sử dụng sở hữu trí tuệ, không một cá nhân hoặc tổ chức nào được phép sử dụng để sản xuất, nuôi trồng, bán hay đề nghị để sáng chế mà không được cho phép. Có một số hình thức để bảo vệ các tác giả bao gồm: quyền tác giả, sáng chế, bí mật kinh doanh, nhãn hiệu hàng hóa, quyền bảo hộ giống cây trồng-vật nuôi...

Các bằng sáng chế, quyền bảo hộ giống cây trồng-vật nuôi và các nhãn hiệu hàng hóa được ban hành bởi chính phủ của từng quốc gia và sự bảo hộ chỉ có hiệu lực trong các nước mà sở hữu trí tuệ (IP) được ban hành. Do vậy, để nhận được sự bảo hộ ở nhiều nước, các quyền này phải được áp dụng và thông qua ở mỗi nước. Còn quyền tác giả và bí mật kinh doanh không đặc trưng theo quốc gia. Hiện nay, nhiều công nghệ mũi nhọn được sử dụng để tạo ra các sản phẩm công nghệ sinh học nông nghiệp dường như không được bảo hộ ở các nước đang phát triển. Chẳng hạn, các bằng sáng chế đối với promoter CaMV 35S chỉ được cấp và có hiệu lực ở Hoa Kỳ và Châu Âu (và ở Nhật Bản chỉ có một đơn xin đăng ký cấp bằng). Do đó, hiện nay chưa có IP nghiêm cấm các nước đang phát triển sử dụng công cụ này trong nghiên cứu.

Hơn nữa, các tổ chức và cá nhân có thể sử dụng các công nghệ trong tạo giống cây trồng bao gồm triển khai, sản xuất và tiêu thụ ở các nước mà công nghệ sản xuất này chưa có IP bảo hộ. Tuy nhiên, các vấn đề liên quan đến IP sẽ phát sinh ở các nước có những công nghệ được bảo hộ bởi IPR. Thời gian phát triển sản phẩm cũng cần được cân nhắc kỹ lưỡng vì các bằng sáng chế có thể được cấp ở trong nước cùng thời điểm phát triển sản phẩm. Do vậy, các nhà khoa học ở các nước đang phát triển cần phải biết về các vấn đề liên quan đến IP và có phương án giải quyết thích hợp.

Cây trồng được canh tác để sử dụng bền vững ở các nước đang phát triển và các công nghệ được áp dụng để tạo ra các cây trồng này đang nhận được rất ít sự quan tâm thương mại của khu vực kinh tế tư nhân. Trên thực tế, các công nghệ này đã và đang được chuyển giao nhằm tăng năng suất mùa vụ. Tuy nhiên, các nhà khoa học ở các nước đang phát triển cần thận trọng vì chuyển giao công nghệ liên quan đến nhiều vấn đề, không chỉ là ký kết các hợp đồng chuyển giao nguyên liệu và cấp giấy phép sử dụng cho một sản phẩm. Cả bên chuyển giao và bên tiếp nhận công nghệ phải thận trọng với các IPR liên quan đến công nghệ và điều này là cần thiết cho các đối tác để tạo sự tin tưởng lẫn nhau giữa các bên tham gia.

Các nước đang phát triển luôn thiếu năng lực và nguồn lực quản lý IP để tiến hành các phân tích và đánh giá về sự cho phép sử dụng công nghệ nhằm phát triển sản phẩm nhập khẩu, sử dụng hoặc xuất khẩu sản phẩm. Do vậy, để giúp chuyển giao các công nghệ ứng dụng trong nông nghiệp cho các nước đang phát triển, việc xây dựng khả năng quản lý IPR là rất quan trọng cho cả bên chuyển giao và bên tiếp nhận công nghệ. Cây trồng được canh tác để sử dụng bền vững ở các nước đang phát triển và các công nghệ được ứng dụng để tạo ra các cây trồng này rõ ràng nhận được ít sự quan tâm thương mại của khu vực kinh tế tư nhân. Trên thực tế các công nghệ này đã và đang được chuyển giao nhằm tăng năng suất mùa vụ.

Trong lĩnh vực công nghệ sinh học nông nghiệp, sáng chế có thể bao gồm: các phương pháp chuyển gen ở thực vật, các vector, các gen... Các sáng chế giữ vai trò quyết định nhất trong bảo hộ công nghệ sinh học nông nghiệp và được đánh giá là công cụ mạnh nhất trong hệ thống IP. Các sáng chế tạm thời, thường được bảo hộ trong khoảng 20 năm và tùy thuộc vào mỗi quốc gia.

Nói chung, các cơ quan nghiên cứu khoa học của chính phủ cần xây dựng năng lực quản lý sở hữu trí tuệ mà họ nhận được hay tạo ra. Kiến thức về IPR sẽ giúp các nhà khoa học của các nước đang phát triển xác định được các thông tin về một công nghệ nhất định đã thuộc quyền sở hữu công cộng và họ có quyền sử dụng. Hơn nữa, IP do các khu vực kinh tế nhà nước tạo ra có thể được xem xét là tài sản được trao đổi với các công ty tư nhân hoặc được sử dụng làm hàng hóa trong các đàm phán chuyển giao công nghệ. Sự hợp tác giữa các khu vực kinh tế nhà nước và tư nhân trong phát triển công

nghe nhờ chia sẻ bí quyết sản xuất và IP sẽ thúc đẩy sự chuyển giao công nghệ cũng như đem lại lợi ích cho cả hai bên.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Nguyễn Ngọc Hải.** 2005. Sinh học mạo hiểm. *NXB Thanh niên*, 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. **Borém A, Santos FR and Bowen DE.** 2003. *Understanding Biotechnology. Prentice Hall PTR*, New Jersey, USA.
5. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. *Basic Biotechnology. Cambridge University Press*, UK.
6. **Shantharam S and Montgomery JF.** 1999. *Biotechnology, Biosafety, and Biodiversity: Scientific and Ethical Issues for Sustainable Development. Science Publisher Inc.* USA.

Chương 2

Công nghệ DNA tái tổ hợp

I. Mở đầu

Công nghệ DNA tái tổ hợp được hình thành từ những năm 1970 nhờ sự phát triển của các phương pháp và kỹ thuật dùng trong nghiên cứu các quá trình sinh học ở mức độ phân tử. Từ đó, cho phép phân lập, phân tích và thao tác trên các nucleic acid theo nhiều phương thức khác nhau, giúp hiểu biết sâu sắc các lĩnh vực mới của sinh học như công nghệ sinh học, bào chế các loại thuốc mới, y học phân tử và liệu pháp gen.

Sự khám phá ra các enzyme hạn chế (restriction endonuclease) trong những năm đầu 1970 là sự phát triển then chốt (key development) không chỉ cho khả năng phân tích DNA hiệu quả hơn, mà còn cung cấp khả năng cắt các phân tử DNA để tạo ra các đoạn DNA tái tổ hợp mới, một quá trình mà ngày nay được gọi là tạo dòng gen (gene cloning). Phương thức tạo dòng gen này đã báo hiệu một kỷ nguyên mới trong thao tác, phân tích và khai thác các phân tử nucleic acid.

Tạo dòng gen đã cho ra nhiều phát minh quan trọng và cung cấp những hiểu biết giá trị trong cấu trúc, chức năng và sự điều hòa hoạt động của gen. Từ những ứng dụng đầu tiên của chúng, các phương pháp xây dựng thư viện gen (gene library) được hình thành và phát triển, và hiện nay được xem như là nền tảng cơ sở cho nhiều thí nghiệm hóa sinh và sinh học phân tử. Mặc dù phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction-PCR) để khuếch đại gen cho phép phân tích gen nhanh hơn nhưng trong nhiều trường hợp kỹ thuật tạo dòng gen vẫn còn hữu ích và là một yêu cầu tuyệt đối. Những phần dưới đây cung cấp một bức tranh tổng quát về các quá trình cơ bản của công nghệ DNA tái tổ hợp.

II. Phân lập đoạn DNA/gen

Một số phương pháp phân lập gen để thực hiện kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã được sử dụng là:

1. Tách các đoạn DNA từ genome

Phương pháp này được thực hiện như sau: DNA hệ gen (genomic DNA) của một sinh vật được cắt thành các đoạn nhỏ dài khoảng 20 kb (kích thước thích hợp tùy thuộc vào loại vector nhận chúng) bằng enzyme hạn chế rồi gắn vào vector để xây dựng thư viện genome (genomic library).

Thư viện genome là một tập hợp các đoạn DNA cùng đại diện cho một genome nguyên vẹn (hoặc gần nguyên vẹn) của cá thể mà DNA được bắt nguồn từ đó. Các đoạn này nằm trong các vector tự sao chép cho phép chúng được duy trì và sinh sản cùng với tế bào của cơ thể vi sinh vật, như vi khuẩn *Escherichia coli* hoặc nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Những thư viện như thế có thể bảo quản như là một nguồn cố định của các đoạn DNA đại diện cho một cơ thể.

Thông thường, DNA hệ gen được cắt bằng enzyme hạn chế có trình tự nhận biết 4 bp, ví dụ như *MboI* nhận biết trình tự 5'-GATC-3'. Tuy nhiên, không phải dễ dàng thu được một gen nguyên vẹn nằm trên một đoạn DNA. Trong thực tế, một gen thường bị cắt thành nhiều đoạn DNA do vị trí nhận biết của enzyme nằm ngay trong gen.

Một phản ứng cắt từng phần DNA hệ gen được tiến hành bằng cách dùng một lượng tối thiểu enzyme và ủ trong một thời gian đủ ngắn sao cho mọi vị trí nhận biết không bị cắt đồng thời. Do các vị trí cắt được phân bố ngẫu nhiên nên một gen vẫn có thể được bảo toàn nguyên vẹn ngay khi nó chứa vị trí nhận biết trong gen. DNA sau đó được phân đoạn và chỉ có các đoạn có kích thước nằm trong phạm vi mong muốn được chọn lọc. Các đoạn DNA được đưa vào vector thích hợp. Tập hợp các vector chứa các đoạn DNA của hệ gen tạo thành thư viện genome. Mỗi đoạn DNA chứa trong vector của thư viện được gọi là một dòng (clone).

Có thể sử dụng DNA tách từ các loại mô khác nhau để xây dựng thư viện genome. Các thư viện genome của một cơ thể chứa các đoạn DNA dài ngắn khác nhau nhưng thông tin di truyền không thay đổi. Ngược lại, thư viện cDNA được xây dựng từ các mRNA. Trong cơ thể có những gen chỉ hoạt động trong những loại tế bào nhất định, do đó giữa các mô khác nhau có thể thu được các phân tử mRNA khác nhau. Vì vậy, một cơ thể có nhiều thư viện cDNA khác nhau đặc trưng cho từng loại tổ chức chuyên hóa.

Thư viện genome được dùng chủ yếu hoặc để sàng lọc theo các phương pháp khác nhau nhằm phân lập một (các) trình tự nucleotide (gen)

quan tâm đặc biệt, hoặc để xác định vị trí và thứ tự của các gen trong genome mà từ đó thư viện được xây dựng (physical mapping).

2. Sinh tổng hợp cDNA từ mRNA

Đoạn DNA được tổng hợp dựa trên khuôn mẫu mRNA được gọi là cDNA (complementary DNA). Quá trình tổng hợp cDNA qua ba giai đoạn như sau:

- **Tổng hợp sợi cDNA thứ nhất.** Tổng hợp sợi cDNA thứ nhất dựa trên khuôn mẫu mRNA nhờ phản ứng phiên mã ngược. Thành phần chính của phản ứng bao gồm enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase), các oligo(dT) primer sẽ liên kết với đuôi polyA của mRNA, deoxyribonucleoside-5'-triphosphate (dNTPs), các cation hóa trị 2 (Mg^{2+}) là yêu cầu tuyệt đối cho hoạt tính của enzyme phiên mã ngược.

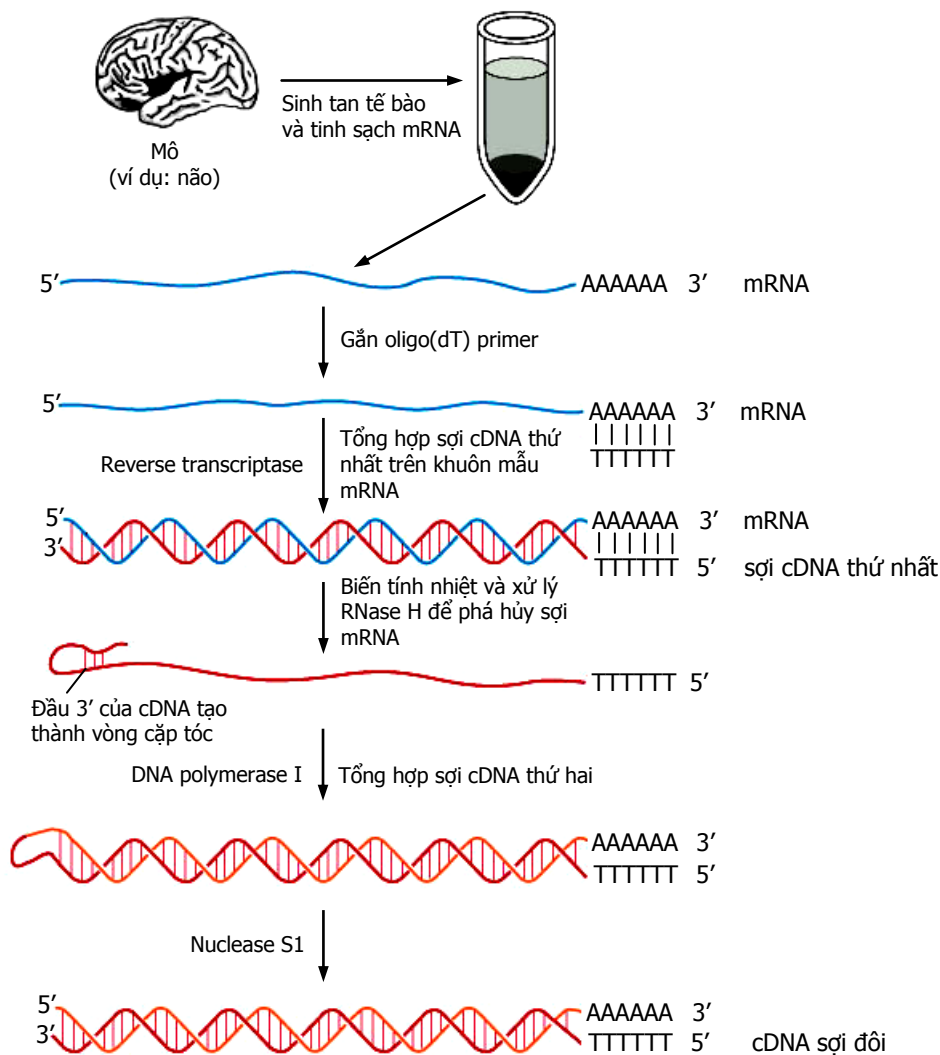
- **Tổng hợp sợi cDNA thứ hai.** Gây biến tính (đun sôi) thể lai mRNA-cDNA (khi tổng hợp sợi thứ nhất) để cắt RNA bằng RNase H của *E. coli*. Thông thường, đầu tận cùng 3' của các cDNA sợi đơn có khả năng tạo thành các cấu trúc vòng cặp tóc (hairpin loop) và vì thế có thể được sử dụng để làm primer (đoạn mồi) cho quá trình tổng hợp sợi cDNA thứ hai bằng DNA polymerase I của *E. coli* (Hình 2.1). Phương thức tổng hợp sợi cDNA thứ hai bằng DNA polymerase I được sử dụng rộng rãi. Đoạn Klenow của DNA polymerase I thiếu hoạt tính exonuclease 5→3' cũng được sử dụng thành công để tổng hợp sợi cDNA thứ hai.

- **Cắt vòng cặp tóc nhờ nuclease S1.** Sau khi tổng hợp cDNA hoàn toàn, sợi thứ nhất và thứ hai được liên kết đồng hóa trị bởi vòng cặp tóc và vòng cặp tóc dễ bị cắt bởi nuclease S1. Kết quả là đầu tận cùng thường là đầu bằng. Sợi đôi cDNA sau đó được tách thành các tiểu phần theo kích thước và các phân tử lớn nhất được gắn vào các plasmid của vi khuẩn. Hoặc là một tập hợp đầy đủ các kích thước của cDNA sợi đôi được tạo dòng trong bacteriophage λ để xây dựng thư viện cDNA (cDNA library).

3. Phân lập đoạn DNA bằng phương pháp PCR

Ngoài hai phương pháp trên, hiện nay người ta sử dụng rất phổ biến phương pháp PCR để phân lập một trình tự nucleotide (gen) từ genome của

sinh vật dựa trên các primer đặc hiệu cho trình tự đó. Phương pháp PCR đơn giản và ít tốn thời gian hơn hai phương pháp trên, mà hiệu quả vẫn rất cao.



Hình 2.1. Sơ đồ tổng hợp cDNA từ khuôn mẫu mRNA

PCR là một kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong công nghệ sinh học hiện đại và đã đóng góp rất lớn cho những tiến bộ về sinh học phân tử, đánh dấu một bước tiến vô cùng quan trọng tương đương với việc khám phá ra các enzyme hạn chế và kỹ thuật Southern blot (phân tích DNA).

PCR dựa trên cơ sở phản ứng mở rộng primer nhờ enzyme Taq polymerase để khuếch đại *in vitro* các đoạn DNA đặc trưng. PCR cho phép khuếch đại (amplification) theo hàm mũ lên đến hàng triệu lần các đoạn DNA có chiều dài từ 200-3.000 bp. Đoạn DNA được khuếch đại (DNA đích) được nhận dạng nhờ cặp primer (oligonucleotide) đặc hiệu thường có chiều dài khoảng 20 nucleotide.

▪ Nguyên tắc của PCR

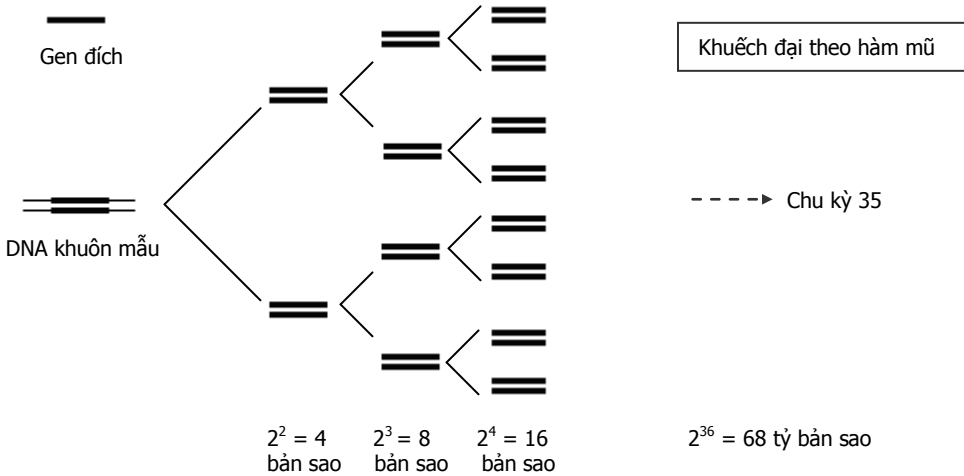
Taq polymerase là một loại enzyme DNA polymerase chịu nhiệt (có ở vi khuẩn chịu nhiệt độ cao *Thermus aquaticus*) được dùng để tổng hợp các đoạn DNA mới trong môi trường có bốn loại deoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và hai primer, trên cơ sở khuôn mẫu của một đoạn DNA nhất định đã biết hoặc chưa biết trình tự. Các đoạn DNA mới hình thành lại được sử dụng làm khuôn mẫu. Sau nhiều chu kỳ, số lượng đoạn DNA nói trên được nhân lên gấp nhiều lần, nhờ vậy có thể đủ số lượng để tách ra, phân tích trình tự hoặc tạo dòng. Primer ở bên trái tác động trên sợi DNA 3'→5' được gọi là primer thuận (forward primer-ký hiệu là F). Primer ở bên phải tác động trên sợi DNA 5'→3' được gọi là primer ngược (reverse primer-ký hiệu là R).

Nguyên tắc của PCR được trình bày trong hình 2.2. Theo đó, từ chu kỳ thứ hai Taq polymerase bắt đầu tạo ra các đoạn DNA có chiều dài xác định. Nếu biết trình tự của đoạn gen cần khuếch đại thì có thể tổng hợp nhân tạo các primer tương ứng để thực hiện PCR và tách chúng ra bằng kỹ thuật điện di. PCR thường tiến hành khoảng 25-35 chu kỳ, qua đó từ 10^{-6} µg DNA ban đầu có thể khuếch đại lên tới trên 1 µg (khoảng 2 kb). Mỗi chu kỳ PCR bao gồm ba giai đoạn có nhiệt độ khác nhau:

- *Gây biến tính (denaturation) ở 90-95°C.* Trong giai đoạn biến tính, phân tử DNA khuôn mẫu ở dạng xoắn kép được tách thành hai sợi đơn (single strands). Tất cả các phản ứng enzyme trong giai đoạn này đều bị dừng lại (ví dụ: phản ứng tổng hợp DNA từ chu kỳ trước đó).

- *Gắn primer (annealing) ở 40-65°C.* Trong giai đoạn này các primer gắn vào các vị trí có trình tự tương đồng ở DNA khuôn mẫu. Các primer bị lắc nhẹ chung quanh do chuyển động Brown vì thế các liên kết ion được tạo thành và bị đứt gãy liên tục giữa primer sợi đơn và DNA khuôn mẫu sợi đơn. Các liên kết ion ổn định hơn tạo thành một đoạn nhỏ (các primer đã lắp

ráp chính xác) và trên các đoạn nhỏ DNA sợi đôi đó (khuôn mẫu và primer) enzyme Taq polymerase có thể bắt đầu quá trình sao chép khuôn mẫu.



Hình 2.2. Sơ đồ phản ứng chuỗi polymerase (PCR)

- *Kéo dài phân tử (extension) ở 70-72°C.* Đây là khoảng nhiệt độ tối thích cho Taq polymerase tiến hành tổng hợp DNA bắt đầu từ các vị trí có primer theo chiều 5'→3'. Các primer có một vài base gắn vào khuôn mẫu có mối liên kết ion mạnh hơn các lực phá vỡ các liên kết này sẽ không bị đứt gãy. Các primer ở các vị trí không bắt cặp chính xác lại bị rời ra (do nhiệt độ cao) khỏi khuôn mẫu đã không tổng hợp được DNA. Enzyme Taq polymerase bổ sung các dNTP từ 5'→3'.

III. Tạo dòng (gắn) đoạn DNA/gen vào vector

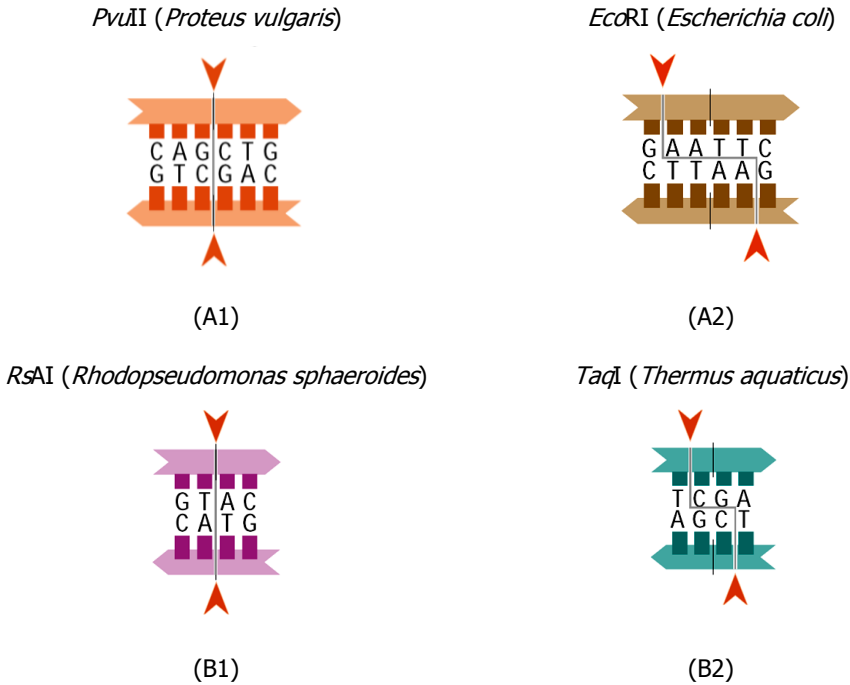
1. Enzyme hạn chế

Việc phát hiện ra các enzyme hạn chế (restriction enzyme) của vi khuẩn cắt DNA ở những trình tự đặc trưng, đã giúp cho việc thao tác gen dễ dàng hơn, vì nó có thể giảm chiều dài của các phân tử DNA thành một tập hợp bao gồm các đoạn ngắn hơn.

Các enzyme hạn chế hiện diện trong hầu hết các tế bào vi khuẩn để ngăn cản DNA ngoại lai (của bacteriophage) tiếp quản bộ máy tổng hợp

protein của tế bào. DNA của chính chúng sẽ được bảo vệ khỏi tác dụng của enzyme hạn chế, nhờ sự có mặt của các enzyme nội bào có thể methyl hóa (methylation) các nucleotide đặc biệt, vì thế các nucleotide này không thể bị nhận biết bởi các enzyme hạn chế.

Mỗi enzyme hạn chế nhận biết và cắt một trình tự DNA đặc trưng chứa 4 hoặc 6 cặp nucleotide. Ví dụ: enzyme *EcoRI* chiết từ *E. coli* cắt trình tự GAATTC, enzyme *TaqI* của *Thermus aquaticus* cắt trình tự TCGA (Hình 2.3). Hiện nay, có trên 900 enzyme hạn chế khác nhau đã được tinh sạch từ hơn 230 chủng vi khuẩn. Các enzyme hạn chế cắt gây các phân tử DNA sợi đôi theo hai cách khác nhau như trình bày ở hình 2.3:



Hình 2.3. Các kiểu cắt và nhận biết trình tự nucleotide của enzyme hạn chế. (A1): tạo ra đầu bằng và (A2): tạo ra đầu so le với trình tự 6 nucleotide. (B1): tạo ra đầu bằng và (B2): tạo ra đầu so le với trình tự 4 nucleotide.

- Cắt trên một đường thẳng đối xứng để tạo ra các phân tử đầu bằng (Hình 2.3, A1 và B1).

- Cắt trên những vị trí nằm đối xứng quanh một đường thẳng đối xứng để tạo ra những phân tử đầu so le (đầu dính) (Hình 2.3, A2 và B2).

Vì một enzyme hạn chế nhận biết một trình tự duy nhất, cho nên số vị trí cắt trên một phân tử DNA đặc biệt thường là nhỏ. Các đoạn DNA được cắt bởi enzyme hạn chế có thể được phân tách theo kích thước bằng điện di agarose gel để nghiên cứu. Do sự tương tự của tổ chức phân tử trong tất cả các cơ thể, cho nên DNA vi khuẩn, DNA thực vật và DNA động vật có vú tương hợp nhau về cấu trúc. Vì thế, một đoạn DNA từ một dạng sống này có thể dễ dàng được pha trộn với DNA của một dạng sống khác. Sự tương tự này cũng phù hợp đối với plasmid, nhân tổ di truyền ngoài nhân được tìm thấy trong nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Chúng là những phân tử DNA mạch vòng đóng-sợi đôi được dùng làm vector mang các đoạn DNA ngoại lai (foreign DNA) dùng trong kỹ thuật tái tổ hợp DNA.

2. Các vector được dùng để tạo dòng các đoạn DNA

Các đoạn DNA thu được từ phản ứng cắt hạn chế được gắn đồng hóa trị *in vitro* vào vector tạo dòng bằng cách dùng enzyme gắn DNA ligase. Trước khi gắn, vector được cắt ra ở một vị trí đơn, thông thường là cùng với enzyme được dùng để cắt DNA nguồn, nhằm tạo các đầu kết dính bổ trợ (tương đồng) cho các đầu của đoạn DNA chèn vào (DNA ngoại lai). Một đôi khi, vector và DNA nguồn được cắt với tổ hợp hai enzyme khác nhau để ngăn cản mỗi loại phân tử tự gắn lại. Sự tự tái tạo lại vòng của vector cũng có thể giảm thiểu bằng cách xử lý với enzyme alkaline phosphatase để loại nhóm 5'-PO₄ khỏi các đầu của vector.

Một số lớn các vector tạo dòng được phát triển cho việc xây dựng các thư viện DNA, chọn lựa vector nào tùy thuộc vào phạm vi kích thước của các đoạn DNA được tạo dòng, và các ứng dụng tiếp theo.

Trong thực tế, các đoạn DNA được gắn với nhau để tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp thường không phải là các đoạn ngẫu nhiên của DNA hệ gen, mà thay vào đó là một trong các đoạn DNA mang một gen từ sinh vật eukaryote hoặc vi khuẩn và một đoạn DNA khác thường là một phân tử vector (vector molecule) hoạt động như là một vật truyền để chuyển gen quan tâm vào trong một vi khuẩn hoặc một tế bào eukaryote. Hai loại vector được sử dụng phổ biến nhất là một loại có nguồn gốc từ các plasmid của vi

khuẩn và một loại khác có nguồn gốc virus xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn (bacteriophage, viết tắt là phage).

2.1. Plasmid vector

Plasmid là các thông tin di truyền ngoài nhân, được tìm thấy trong nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Chúng là những phân tử DNA mạch vòng, sợi đôi, kích thước từ 1- $\geq$ 200 kb, có khả năng tự sao chép để tồn tại độc lập trong tế bào.

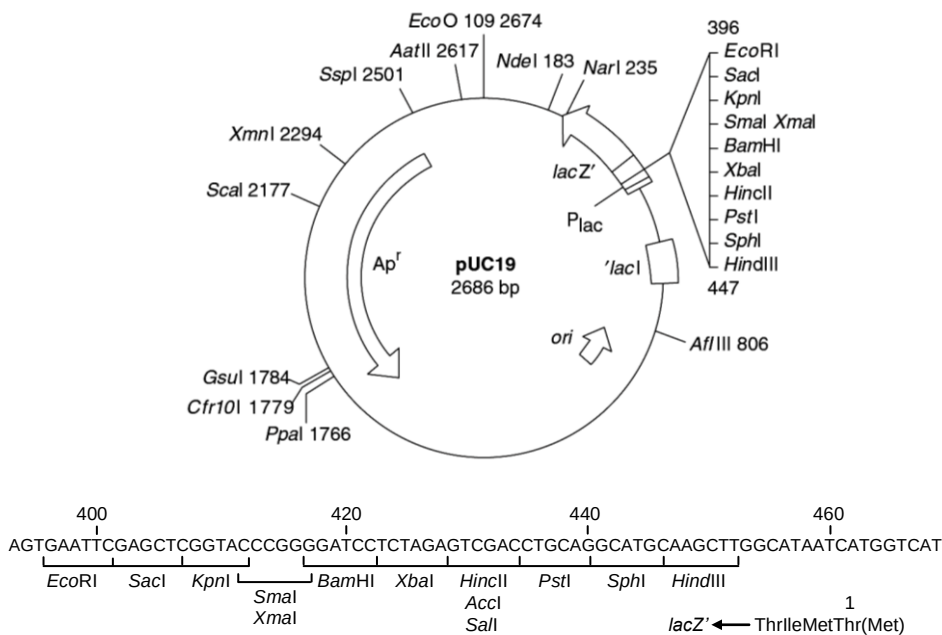
Các plasmid dùng làm vector tạo dòng có các đặc điểm sau: Kích thước tương đối nhỏ, mang một hoặc nhiều gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) cho phép xác định các nhân tố biến nạp và duy trì plasmid trong quần thể vi khuẩn, chứa các vị trí nhận biết đơn cho một hoặc nhiều enzyme hạn chế.

Các plasmid được sử dụng phổ biến nhất hiện nay là các plasmid đa năng (polycloning plasmid) và chuyên dụng thuộc thể hệ thứ ba. Để tiện cho việc sử dụng nhiều loại enzyme hạn chế khác nhau, nhiều trình tự nhận biết của chúng được xếp nối tiếp nhau thành một đoạn dài gọi là polylinker (vùng đa nối) hay multiple cloning sites (vùng tạo dòng). Các plasmid vi khuẩn có thể chứa đoạn DNA ngoại lai khoảng 3-10 kb. Dưới đây là ba nhóm plasmid thông dụng hiện đang được sử dụng rộng rãi:

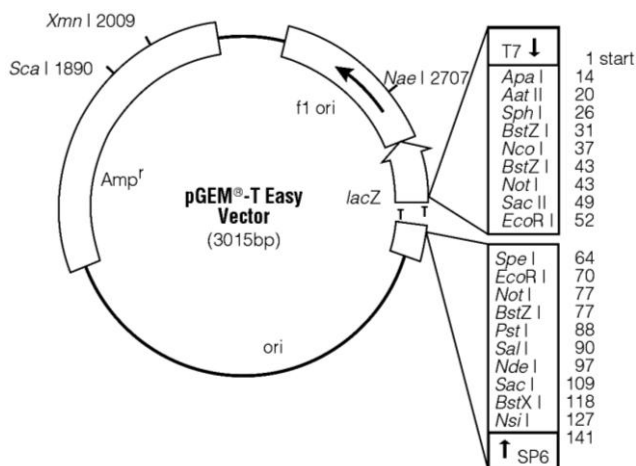
- **Nhóm các plasmid pUC.** Kích thước khoảng 2.600 bp, mang gen *Amp^r* và gen *lacZ'*, xen vào giữa gen *lacZ'* là polylinker (Hình 2.4). Các thành viên của nhóm này chỉ khác nhau do độ dài và chiều của polylinker. Nhóm này có ưu điểm kích thước nhỏ, vùng polylinker cho phép chèn vào gần như bất kỳ một trình tự DNA lạ nào, sự có mặt của gen *lacZ'* rất thuận lợi cho việc phát hiện vector tái tổ hợp.

- **Nhóm các plasmid pGEM.** Kích thước khoảng 3.000 bp, mang gen *Amp^r*, gen *lacZ*, polylinker và promoter đặc trưng cho các RNA polymerase (SP6, T7) ở hai bên vùng polylinker cho phép phiên mã đoạn DNA gắn trong vector thành nhiều RNA (Hình 2.5). Các RNA này thường dùng làm probe hay dùng trong nghiên cứu cấu trúc và chức năng của RNA.

- **Nhóm các plasmid pBluescript.** Kích thước khoảng 3.000 bp, các plasmid này kết hợp được tất cả những ưu điểm của hai nhóm vừa kể và được xem là nhóm có tiềm năng lớn nhất hiện nay (Hình 2.6).

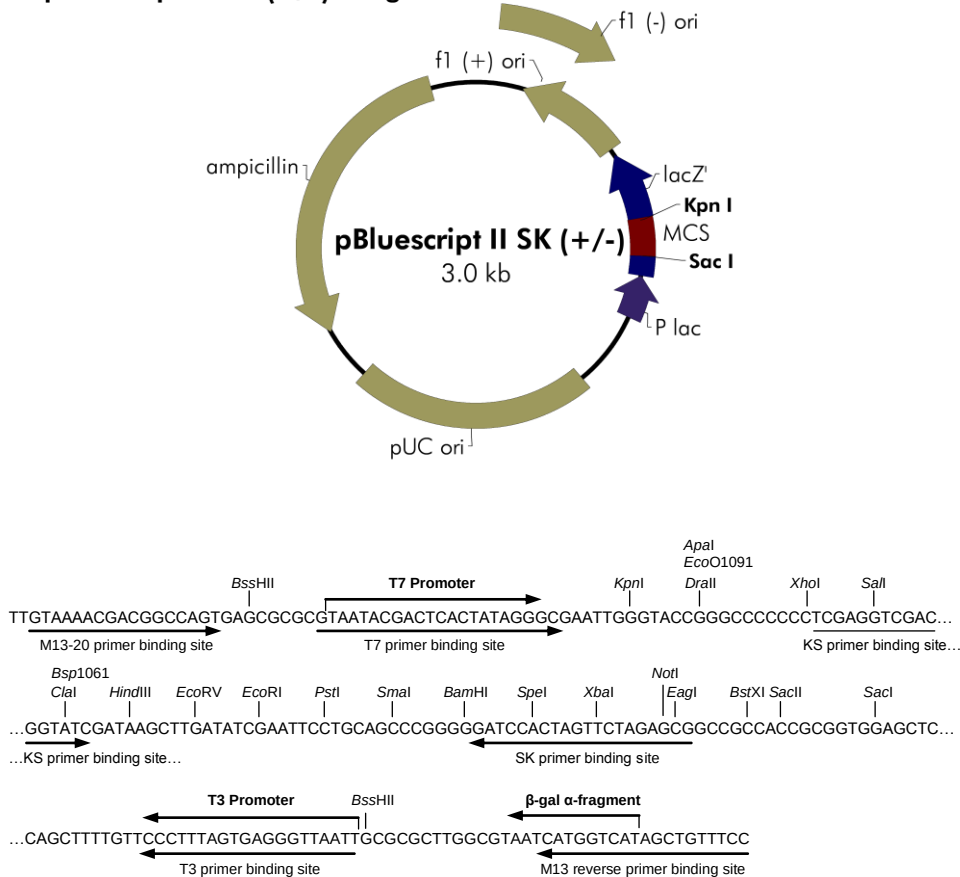


Hình 2.4. Plasmid vector pUC19. Vùng tạo dòng (từ 396-447) được gắn vào gen *lacZ'*, nhưng không can thiệp vào chức năng của gen.



Hình 2.5. Plasmid vector pGEM[®]-T Easy. Loại vector này đã được mở sẵn ở vùng tạo dòng trên gen *lacZ* mang hai đầu T, thích hợp cho việc gắn các sản phẩm PCR do chúng có mang hai đầu A.

pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



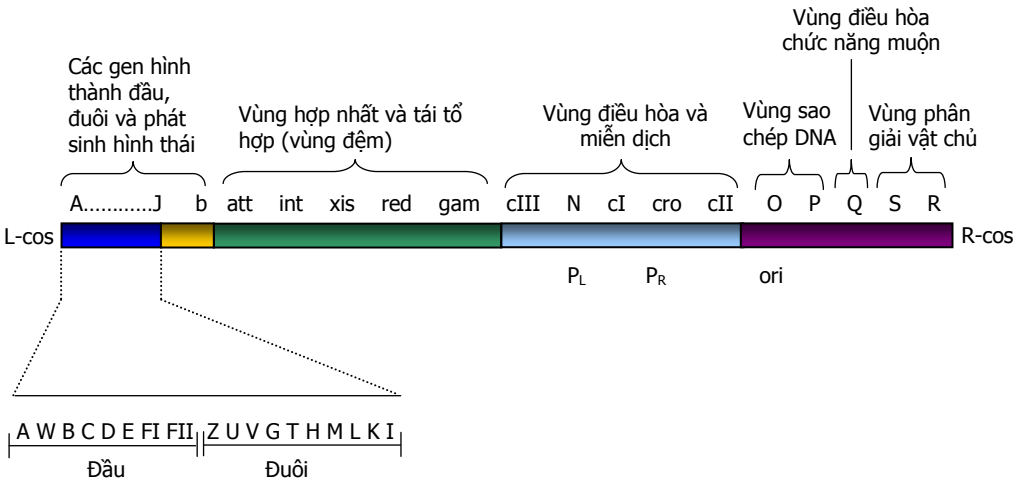
Hình 2.6. Plasmid vector pBluescript II SK (+/-). Vector này mang vùng tạo dòng (multiple cloning sites-MCS) ở vị trí từ 598-826 trên gen *lacZ'*, và các vị trí gắn primer khác nhau dùng cho phân tích trình tự đoạn DNA ngoại lai.

Về nguyên tắc, DNA của plasmid được cắt bởi enzyme hạn chế và gắn *in vitro* với đoạn DNA ngoại lai tạo ra các plasmid tái tổ hợp, sau đó chúng được dùng để biến nạp vào vi khuẩn. Khó khăn lớn nhất là phân biệt giữa các plasmid chứa các đoạn DNA ngoại lai-thể tái tổ hợp (recombinant) và các phân tử vector đã tái tạo lại vòng (recircularization). Sự tái tạo lại vòng của plasmid có thể được hạn chế bằng cách điều chỉnh nồng độ DNA ngoại lai và DNA của plasmid trong phản ứng gắn (ligation).

2.2. Bacteriophage λ vector

Có hai loại bacteriophage thường được sử dụng là λ và M13, tuy nhiên chương này chỉ trình bày loại phổ biến hơn là bacteriophage λ .

Bacteriophage λ là một virus mang DNA sợi đôi có kích thước khoảng 50 kb, DNA của nó ở dạng phân tử mạch thẳng có hai đầu bổ sung sợi đơn dài 12 nucleotide (được dùng làm hai đầu cos). Sau khi xâm nhiễm vào vi khuẩn vật chủ, DNA tạo vòng ngay lập tức bằng cách ghép hai đầu kết dính cos (R-cos và L-cos) nhờ DNA ligase của vật chủ (Hình 2.7). Các giai đoạn tiếp theo có thể dẫn đến việc hoặc làm tan (lysis) tế bào vật chủ (bao gồm việc sản xuất và giải phóng các phage thế hệ con) hoặc là gây ra hiện tượng tiềm tan (lysogeny) (trong giai đoạn này λ DNA hợp nhất vào trong chromosome của vật chủ).

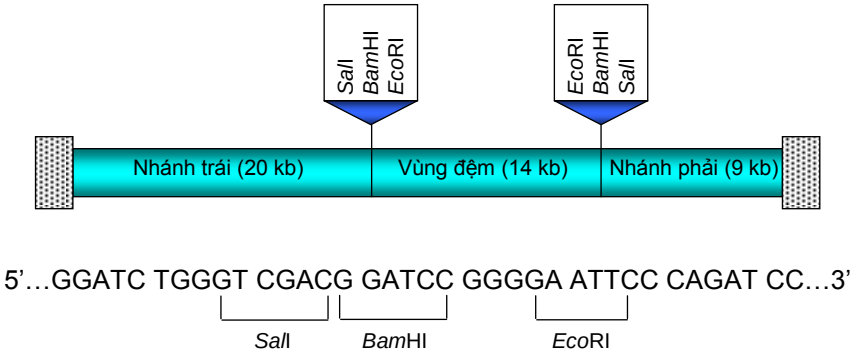


Hình 2.7. Bản đồ đơn giản của bacteriophage λ genome. Các gen liên quan đến các chức năng khác nhau đã được trình bày trên sơ đồ. *cIII*, *N*, *cI*, *cro* và *cII*: các gen liên quan đến hoạt động điều hòa, miễn dịch tiền phage, siêu nhiễm. *O* và *P*: các gen tổng hợp DNA. *Q*: gen điều hòa chức năng muộn. *S* và *R*: các gen phân giải tế bào vật chủ. P_L : promoter bên trái, P_R : promoter bên phải, L-cos: đầu dính bên trái, R-cos: đầu dính bên phải.

Các phage có khả năng thực hiện tải nạp mang gen từ tế bào vi khuẩn cho (donor) sang tế bào nhận (recipient). Phage λ vector được sử dụng rộng

rất dễ xây dựng thư viện gen, vì nó mang được đoạn DNA ngoại lai lớn hơn (15-23 kb) so với plasmid, dễ bảo quản, dễ tách ra để phân tích. Ưu điểm nổi bật của các phage λ là chúng có hệ thống tự động xâm nhập và sinh sản trong tế bào vi khuẩn với một hiệu quả cao hơn nhiều so với việc đưa plasmid vào tế bào vi khuẩn bằng biến nạp. Tuy nhiên, các thao tác ban đầu có phức tạp hơn.

Trước đây, người ta nghĩ rằng việc sử dụng phage λ làm vector là rất bất tiện do DNA của nó quá dài, muốn cắt ra nhiều đoạn thì phải có nhiều trình tự cắt. Tuy nhiên, về sau người ta đã phát hiện ở giữa DNA của phage λ có vùng đệm (stuffer) hay còn gọi là vùng trung tâm có chiều dài bằng khoảng 1/3 chiều dài của phage λ , vùng này không quan trọng và nếu cắt nó đi thì vẫn không ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của phage λ trong tế bào vi khuẩn vật chủ và khả năng làm tan tế bào vật chủ của chúng. Vì thế, người ta đã cắt bỏ đoạn stuffer để lắp các đoạn gen ngoại lai vào. Trên phage λ vector người ta cũng đã chọn được các vị trí nhận biết cho các enzyme cắt hạn chế, và xây dựng phương pháp đóng gói *in vitro* (*in vitro* packing) để đưa đoạn DNA đã được gắn vào đầu của phage (Hình 2.8).



Hình 2.8. Vector EMBL 3. Vector này được thiết kế từ phage λ mang các vị trí nhận biết cho ba enzyme *Sall*, *BamHI* và *EcoRI*.

3. Gắn đoạn DNA vào vector

3.1. Gắn các đoạn cDNA

Có nhiều phương pháp khác nhau được dùng để liên kết cDNA sợi đôi với các plasmid vector, chẳng hạn như: bổ sung các đuôi đồng trùng hợp

(homopolymetric tailing) cho cDNA sợi đôi và cho plasmid vector, bổ sung các đoạn nối nhân tạo (linkers và adapter) cho đầu tận cùng của DNA sợi đôi... Ở đây chỉ trình bày các linker và adapter nhân tạo.

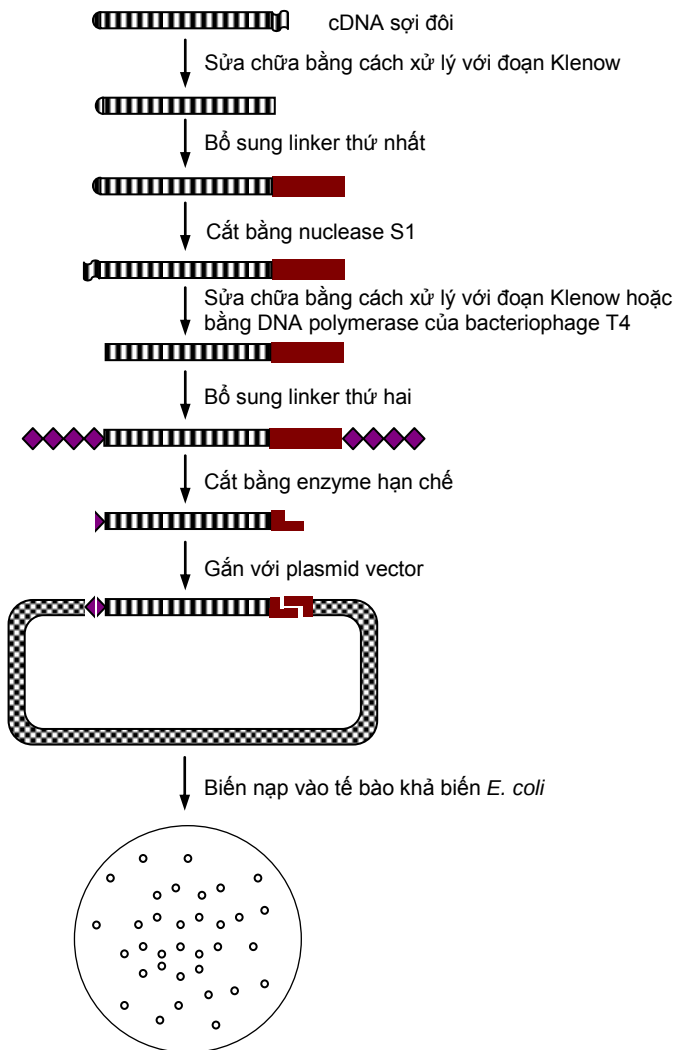
3.1.1. Các linker

Các linker chứa một hoặc nhiều vị trí cắt hạn chế cho phép gắn cDNA sợi đôi với các plasmid vector hoặc bacteriophage λ vector. Sợi đôi cDNA được xử lý với DNA polymerase (ví dụ: đoạn Klenow của DNA polymerase I của *E. coli*), enzyme này loại bỏ đầu tận cùng 3' sợi đơn so le bằng hoạt tính exonuclease 3' $\rightarrow$ 5' và lấp đầy các đầu tận cùng 3'-OH bị khuyết bằng hoạt tính trùng hợp (polymerase 5' $\rightarrow$ 3'). Sự phối hợp của các hoạt tính này đã tạo ra các phân tử DNA đầu bằng, sau đó các cDNA này được ủ với các phân tử linker có mặt của enzyme gắn là DNA ligase.

Các phân tử DNA sợi đôi mang các đầu dính nhân tạo được cắt hạn chế ở vị trí nhận biết trong linker, tinh sạch và sau đó gắn với vector cũng được cắt bởi cùng một loại enzyme hạn chế tạo ra các đầu dính tương đồng với các đầu của linker (Hình 2.9). Có thể hạn chế sự tái tạo lại vòng của plasmid vector (không tái tổ hợp) bằng cách xử lý các vector được cắt bằng alkaline phosphatase trước khi thực hiện phản ứng gắn với cDNA.

3.1.2. Các adapter

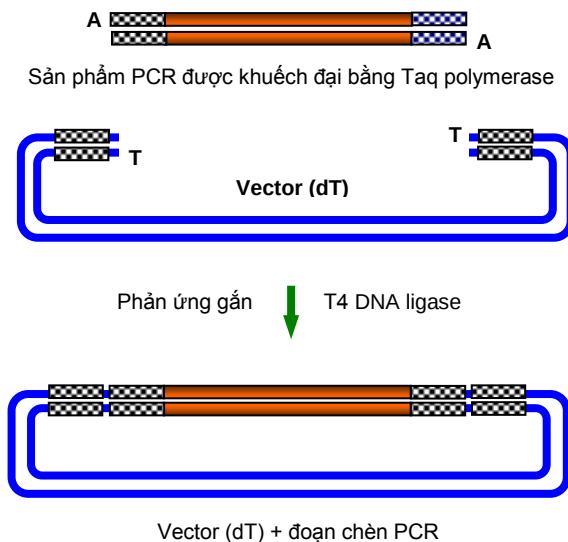
Sử dụng adapter có hiệu quả hơn linker, các adapter có kích thước ngắn, là các oligonucleotide sợi đôi mang một đầu bằng (để gắn với cDNA sợi đôi) và một đầu tận cùng kết dính (để gắn với đầu tận cùng tương ứng trong vector). Không giống như linker, các adapter không đòi hỏi phải cắt bằng các enzyme hạn chế sau khi chúng được gắn với cDNA sợi đôi. Tuy nhiên, các phân tử cDNA mang các adapter được phosphoryl hóa có thể tạo thành các phân tử mạch vòng đóng bằng liên kết cộng hóa trị (dạng không thể tạo dòng) hoặc các phân tử mạch thẳng dạng khảm (dạng hoàn toàn không mong muốn) trong suốt phản ứng gắn tuần tự với sự có mặt của vector DNA đã được dephosphoryl hóa.



Hình 2.9. Tạo dòng cDNA bằng cách bổ sung tuần tự các linker nhân tạo. Đoạn Klenow tạo đầu bằng cho cDNA sợi đôi và enzyme nuclease S1 cắt vòng cặp tóc. Các linker thứ nhất và thứ hai được gắn tuần tự vào hai đầu của cDNA, sau đó đoạn cDNA này sẽ được cắt cùng enzyme hạn chế với vector tạo dòng có vị trí nhận biết trên hai linker nhân tạo. Cuối cùng đoạn cDNA có hai đầu tương đồng được gắn với vector và biến nạp vào *E. coli*.

3.2. Gắn các sản phẩm PCR

Trong một số trường hợp nhất định có thể thay thế phương pháp tạo dòng truyền thống bằng phương pháp PCR, vì PCR cho phép sản xuất ra một lượng lớn đoạn DNA mong muốn và sau đó có thể tạo dòng đoạn DNA này trong các vector plasmid hoặc phage thích hợp. Phương thức tạo dòng cho các sản phẩm PCR hoàn toàn giống tạo dòng các đoạn DNA thu được từ những thao tác DNA truyền thống, và có thể được tạo dòng với đầu bằng hoặc đầu kết dính (so le). DNA polymerase ôn nhiệt như Taq polymerase đã khuếch đại các sản phẩm PCR có gốc A lồi ra ở đầu 3'. Như vậy, có thể tạo dòng sản phẩm PCR vào trong các dT vector (được gọi là tạo dòng dA:dT). Điều này cho thấy việc bổ sung các gốc A vào đầu cuối có thể giúp gắn thành công sản phẩm PCR với vector đã được chuẩn bị các gốc T lồi ra (Hình 2.10). Phản ứng được xúc tác bởi DNA ligase, như trong một phản ứng gắn truyền thống.



Hình 2.10. Tạo dòng các sản phẩm PCR bằng phương thức tạo dòng dA:dT

Người ta cũng có thể tạo dòng đầu dính với các sản phẩm PCR. Trong trường hợp này các oligonucleotide primer được thiết kế với một vị trí cắt hạn chế được kết hợp chặt chẽ trong chúng. Do sự hỗ trợ của các primer cần thiết là tuyệt đối ở đầu 3', nên thông thường đầu 5' của primer là vùng định

vị của vị trí cắt hạn chế. Điều này cần phải được thiết kế với sự chú ý thận trọng do hiệu suất cắt DNA bằng một enzyme hạn chế nhất định sẽ giảm nếu các nucleotide bổ sung thêm cho sự nhận biết của enzyme lại thiếu ở đầu 5'. Trong trường hợp này các phản ứng cắt và gắn giống như các phản ứng truyền thống.

4. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn/tế bào vật chủ

Sau khi tạo được vector tái tổ hợp mang gen ngoại lai, việc tiếp theo là biến nạp nó vào tế bào vật chủ. Trong trường hợp này tế bào vật chủ thường được sử dụng là vi khuẩn *E. coli* để khuếch đại một lượng lớn DNA của plasmid tái tổ hợp dùng cho các phân tích về sau.

Hai phương pháp được dùng để biến nạp vector tái tổ hợp vào *E. coli* là điện biến nạp (electroporation transformation) và hóa biến nạp (chemical transformation).

4.1. Điện biến nạp

Đây là kỹ thuật hiệu quả nhất để biến nạp vi khuẩn. Hai thông số quan trọng của phương thức này là loại tế bào vi khuẩn và tần số xung điện cần thiết. Thể tích của dung dịch tế bào thường được dùng là 30 μL (tương ứng với nồng độ 10^{10} tế bào *E. coli*/mL) có bổ sung 5 ng plasmid trong một cuvette có khoảng trống điện cực (electrode gap) 0,1 cm. Hiệu suất biến nạp của phương thức này lớn hơn 1×10^9 thể biến nạp/ μg plasmid siêu xoắn và khoảng 1×10^8 thể biến nạp/ μg plasmid được dùng trong phản ứng gắn. Tần số biến nạp khoảng 0,02 cho cả hai loại plasmid. Tần số biến nạp thấp đã ngăn cản được sự đồng biến nạp (co-transformation) vào vi khuẩn của hai hoặc nhiều phân tử plasmid.

Phương pháp điện biến nạp có một số ưu điểm sau:

- Hiệu suất biến nạp cao.
- Có thể dùng một thể tích dịch tế bào nhỏ. Thể tích dịch tế bào khoảng 20 μL có thể cho hiệu suất khoảng 10^9 thể biến nạp.
- Phương pháp chuẩn bị tế bào biến nạp rất đơn giản, không sử dụng các kỹ thuật phức tạp và tốn thời gian. Hơn nữa, các tế bào dùng để biến nạp có thể được chuẩn bị trước và bảo quản vô hạn định mà không mất tính khả biến.

- Tần số điện biến nạp với DNA siêu xoắn và DNA mạch vòng là giống nhau. Do đó, không cần thiết phải dùng vector được tinh sạch cao trong các phản ứng gắn.

- Hiệu suất biến nạp phân tử cho DNA mạch vòng rất cao đối với các plasmid có kích thước lên đến 50 kb.

Nhược điểm của phương pháp này là đòi hỏi thiết bị biến nạp đắt tiền.

4.2. Hóa biến nạp

Đây là phương thức kinh điển để biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*. Các tế bào được ủ trong dung dịch CaCl_2 để trở thành tế bào khả biến giúp cho chúng dễ tiếp nhận plasmid. Plasmid được đưa vào bằng cách shock nhiệt nhanh (40-50 giây), các tế bào biến nạp sau đó được chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc dương tính trên đĩa agar chứa môi trường LB với kháng sinh thích hợp. Mỗi khuẩn lạc trên đĩa kháng sinh đại diện cho một thể biến nạp đơn. Các tế bào chứa plasmid mang DNA ngoại lai có thể xác định bằng mắt trên đĩa môi trường có bổ sung thêm cơ chất nhiễm sắc thể cho β -galactosidase (X-gal) vì chúng là các khuẩn lạc không màu do sự khử hoạt tính của enzyme bằng cách chèn đoạn DNA ngoại lai.

Phương pháp chuẩn bị và bảo quản tế bào khả biến trong hóa biến nạp cũng rất đơn giản. Hiệu suất biến nạp của phương pháp này trong khoảng 10^4 - 10^6 thể biến nạp/ μg plasmid, tùy thuộc vào kích thước của đoạn DNA chèn (DNA ngoại lai) và chủng vi khuẩn được sử dụng. Hiệu suất này thích hợp cho các phương thức tạo dòng truyền thống. Đối với các phương thức cần hiệu suất biến nạp cao hơn (ví dụ: xây dựng thư viện cDNA, xây dựng thư viện phân tích trình tự DNA...) thì tốt hơn hết là dùng phương pháp điện biến nạp. Tuy nhiên, nếu không có sẵn thiết bị biến nạp bằng điện thì vẫn có thể thu được hiệu suất biến nạp cao bằng cách dùng các chủng vi khuẩn thích hợp hơn cho mục đích này và có thể thu được hiệu suất 10^9 thể biến nạp/ μg plasmid.

IV. Chọn dòng mang DNA tái tổ hợp

Trong thí nghiệm tạo vector tái tổ hợp, hỗn hợp vector và một lượng lớn phân tử DNA cắt cùng một enzyme hạn chế được gắn lại với nhau bằng enzyme DNA ligase. Kết quả, hỗn hợp này có plasmid tái tổ hợp lẫn các

plasmid không có gen ngoại lai chèn vào và chúng được trộn lẫn với các tế bào vi khuẩn để thực hiện biến nạp. Sau đó, người ta chuyển tất cả lên môi trường dinh dưỡng chọn lọc để chúng phát triển thành các dòng tức các khuẩn lạc vi khuẩn. Do cách tiến hành thí nghiệm trong một hỗn hợp không đồng nhất như vậy nên các dòng vi khuẩn mọc lên có ba loại như sau:

- Tế bào vi khuẩn không nhận plasmid.
- Tế bào vi khuẩn nhận plasmid không có gen ngoại lai chèn vào.
- Tế bào vi khuẩn nhận đúng plasmid tái tổ hợp.

Vì vậy, việc xác định đúng các dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp phải mất nhiều công sức. Có ba phương thức chính để xác định các dòng DNA tái tổ hợp là lai khuẩn lạc và vết tan, khử hoạt tính bằng chèn đoạn, và tạo dòng định hướng.

1. Lai khuẩn lạc và vết tan

DNA được tạo dòng trong plasmid sản xuất ra các khuẩn lạc khi các nuôi cấy biến nạp được dàn mỏng trên đĩa agar chứa môi trường sinh trưởng và nuôi cấy dưới những điều kiện thích hợp. Các bacteriophage sinh tan tế bào bị chúng xâm nhiễm và sản xuất ra các plaque (vết tan) có dạng hình tròn chu vi khoảng 2-3 mm có màu sáng trên thảm vi khuẩn (bacterial lawn) của lớp agar đỉnh [trong trường hợp này người ta chuẩn bị đĩa agar có hai lớp: lớp agar đỉnh (top agar) có nồng độ agar thấp để bacteriophage dễ sinh tan tế bào vi khuẩn, và lớp agar đáy (bottom agar) có nồng độ agar cao hơn].

Các vector, như mô tả ở trên, thường chứa gen chỉ thị cho phép chọn lọc những tế bào vật chủ mang vector (thể biến nạp). Các chỉ thị này thường là gen kháng kháng sinh và các tế bào biến nạp sinh trưởng trên môi trường chứa kháng sinh tương ứng.

Ngoài ra, các vector còn chứa các gen chỉ thị bổ sung để phân biệt các tế bào biến nạp chứa đoạn chèn của DNA ngoại lai với các tế bào chứa các vector tự tái tạo lại vòng. Ví dụ: gen *lacZ* mã hóa enzyme β -galactosidase.

Một dòng chứa các chuỗi DNA quan tâm đặc biệt có thể được xác định bởi lai khuẩn lạc hoặc vết tan. Một lượng nhỏ khuẩn lạc biến nạp hoặc vết tan được chuyển lên màng nitrocellulose hoặc nylon bằng cách phủ (overlay) màng này lên trên đĩa agar. DNA được biến tính và cố định trên màng bằng cách đun nóng (baking) hoặc chiếu tia tử ngoại (UV-

crosslinking), và sau đó được lai trong đệm chứa probe đánh dấu đồng vị phóng xạ có trình tự bổ trợ một phần hoặc toàn bộ của chuỗi được xác định. Ví dụ: có thể một oligonucleotide tổng hợp nhân tạo, có nguồn gốc từ DNA hệ gen từng phần, cDNA hoặc trình tự protein hoặc sản phẩm PCR. Một đôi khi probe có thể được thiết kế dựa trên trình tự bắt nguồn từ gen tương đồng của các loài khác và thường được lai với cường lực thấp. Các probe thừa được rửa khỏi màng để ủ với phim X-quang. Theo hướng của phim (sau khi rửa) so sánh với đĩa agar gốc, chúng ta có thể đối chiếu các khuẩn lạc/vết tan thực tế với các khuẩn lạc/vết tan lai dương tính (positive clones) tương ứng trên phim X-quang.

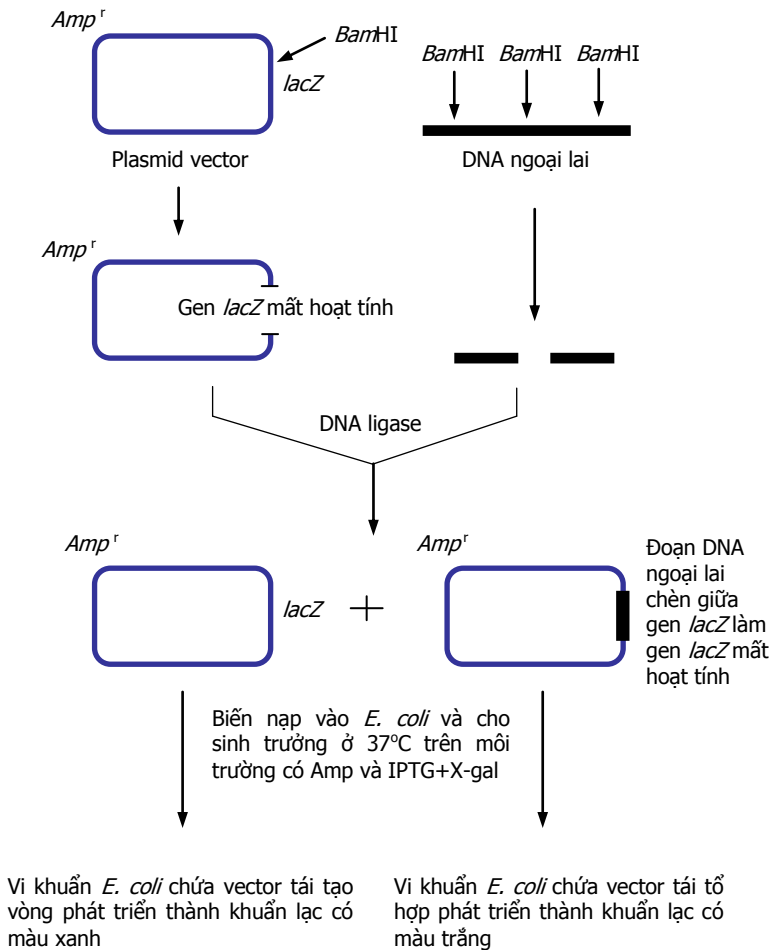
2. *Khử hoạt tính bằng chèn đoạn*

Phương pháp này dùng cho các plasmid mang hai hoặc nhiều marker (ví dụ: *Amp^r*, *lacZ*). DNA ngoại lai và DNA của plasmid được cắt bởi cùng một loại enzyme hạn chế và tinh sạch, sau đó gắn hai DNA với nhau, hỗn hợp gắn được biến nạp vào *E. coli* miễn cảm Amp để chọn lọc thể biến nạp nhờ tính kháng Amp của plasmid và hoạt tính β -galactosidase của gen *lacZ*. Các khuẩn lạc chứa các plasmid tái tổ hợp sinh trưởng trên môi trường có mặt Amp và isopropyl-thiogalactoside (IPTG) cùng với cơ chất nhiễm sắc thể X-gal sẽ có màu trắng do đoạn DNA ngoại lai chèn vào giữa gen *lacZ* làm gen này mất hoạt tính. Trong khi đó, các khuẩn lạc chứa plasmid tái tạo lại vòng sẽ có màu xanh do gen *lacZ* không bị mất hoạt tính (Hình 2.11).

3. *Tạo dòng định hướng*

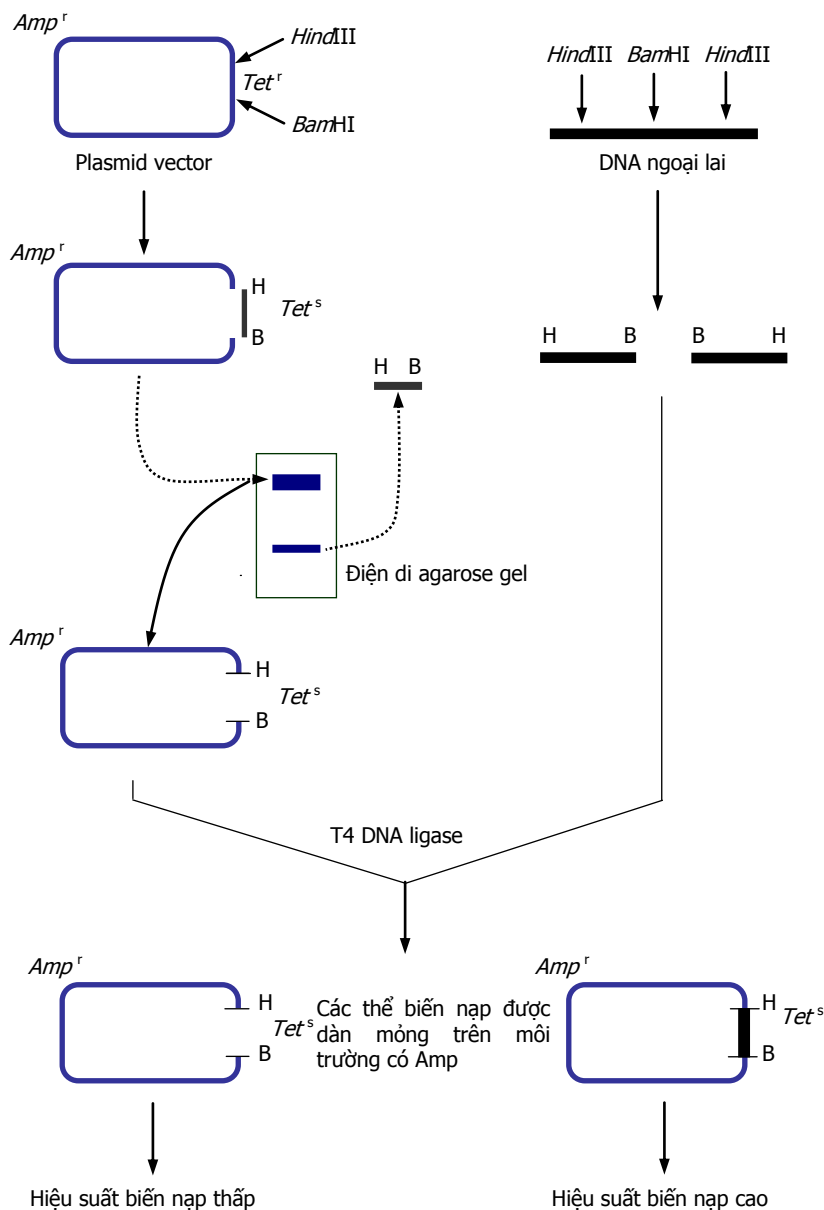
Hầu hết các plasmid vector mang hai hoặc nhiều vị trí nhận biết enzyme hạn chế, ví dụ: vector pBR 322 chứa các vị trí nhận biết đơn *HindIII* và *BamHI* sau khi cắt bằng hai enzyme hạn chế tương ứng, đoạn DNA lớn hơn của vector có thể được tinh sạch bằng điện di agarose gel và gắn với một đoạn DNA ngoại lai mang các đầu dính (cohesive ends) tương đồng với nó cũng được cắt bởi *BamHI* và *HindIII*. Kết quả, thể tái tổ hợp dạng vòng mang tính kháng Amp sau đó được dùng để biến nạp vào *E. coli*. Do thiếu sự bổ trợ giữa các đầu lồi (protruding ends) *HindIII* và *BamHI* nên đoạn vector lớn hơn không thể tái tạo lại vòng một cách hiệu quả được vì thế nó biến nạp vào *E. coli* với hiệu suất rất thấp (Hình 2.12). Dĩ nhiên, các

tổ hợp khác của enzyme cũng có thể được sử dụng tùy thuộc vào các vị trí nhận biết (RS-recognition sites) trong vector và của đoạn DNA ngoại lai.



Hình 2.11. Khử hoạt tính bằng chèn đoạn. Amp^r : gen kháng ampicillin, $lacZ$: gen $lacZ$ mã hóa enzyme β -galactosidase.

Về mặt lý thuyết, kỹ thuật tái tổ hợp DNA cho phép đưa bất kỳ một đoạn gen nào từ sinh vật này vào sinh vật khác. Vấn đề quan trọng tiếp theo là làm sao để các gen lạ đó có sự biểu hiện.



Hình 2.12. Tạo dòng định hướng. Tet^r : gen kháng tetracycline, Tet^s : gen kháng tetracycline bị khuyết đoạn và mất hoạt tính.

V. Biểu hiện của gen được tạo dòng

Muốn gen tạo dòng có biểu hiện tổng hợp protein cần cấu tạo vector có đủ các yếu tố phiên mã và dịch mã. Các vector này được gọi là vector

biểu hiện. Nếu gen không nằm giữa promoter và terminator, nó sẽ không được phiên mã. Các gen được tổng hợp hóa học hay từ cDNA không có promoter nên phải gắn chúng cạnh promoter thì mới có thể biểu hiện phiên mã. Để sự dịch mã được thực hiện, mRNA cần phải mang ở đầu 5' trình tự RBS (ribosome binding sites-vùng liên kết ribosome). Đoạn gen ngoại lai thiếu điểm bám của ribosome (RBS), do đó muốn được dịch mã thì nó phải gắn vào vị trí nằm sau promoter và RBS.

Ở một số gen của sinh vật eukaryote, sự dịch mã đòi hỏi quá trình splicing tức là cắt bỏ các đoạn intron khỏi tiền thân mRNA thông tin (premature mRNA) và nối các exon lại với nhau để tạo thành mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA).

Mục đích việc tạo dòng các gen của động vật có vú, nhất là của người, là nhằm tạo ra các sản phẩm đúng như trong cơ thể với số lượng lớn và có giá trị thương mại. Sự biểu hiện của các gen eukaryote trong tế bào vi khuẩn nhiều khi gặp trở ngại, do đó cần phải thiết kế các vector biểu hiện thích hợp cho phép gen ngoại lai biểu hiện ở mức độ cao.

1. Vector biểu hiện

Các vector biểu hiện là vector có thể mang các gen ngoại lai mong muốn cho phép thực hiện sự phiên mã của các bản sao được tạo dòng và sự dịch mã các mRNA của chúng trong *E. coli*. Những vector như thế được dùng để biểu hiện các gen của eukaryote trong *E. coli* (nếu sản phẩm protein của các gen này không cần quá trình hậu dịch mã) hoặc tăng hiệu suất các sản phẩm của gen prokaryote. Để biểu hiện tất cả các gen ngoại lai trong *E. coli* phải bắt đầu bằng việc gắn đoạn gen ngoại lai vào trong vector biểu hiện (thường là plasmid). Vector này phải có đủ các cấu trúc cần thiết sau:

- Các trình tự mã hóa gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) để đảm bảo duy trì vector trong tế bào.

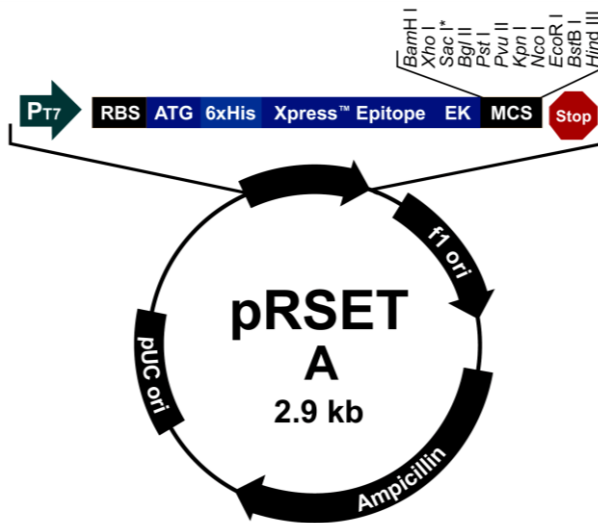
- Một promoter kiểm soát phiên mã (ví dụ: *lac*, *trp* hoặc *tac*) cho phép sản xuất một lượng lớn mRNA từ các gen được tạo dòng.

- Các trình tự kiểm soát dịch mã như vùng liên kết ribosome được bố trí thích hợp và codon khởi đầu ATG.

- Một polylinker để đưa gen ngoại lai vào trong một hướng chính xác với promoter.

Chỉ khi được cấu trúc đầy đủ như thế, các vector biểu hiện mang gen ngoại lai mới được biến nạp vào chủng *E. coli* thích hợp.

Tuy nhiên, cần lưu ý là số lượng các bản sao của vector phải hợp lý đối với một tế bào vật chủ và nó có sự ổn định lâu dài, đồng thời cần tránh sự thủy phân sản phẩm protein (proteolysis) do các enzyme của tế bào. Hình 2.13 mô tả một loại vector biểu hiện ở prokaryote.



Hình 2.13. Vector biểu hiện pRSET A ở prokaryote (*E. coli*) được thiết kế dựa trên hệ thống biểu hiện promoter T7. Sự biểu hiện của các gen đích tạo dòng trong vector được cảm ứng bằng cách sản xuất T7 RNA polymerase trong tế bào vật chủ *E. coli* chủng BL21(DE). P_{T7} -promoter mạnh của bacteriophage T7 cho phép biểu hiện gen ở mức độ cao, RBS-vùng liên kết ribosome, ATG-mã khởi đầu, N-terminal polyhistidine (6×His) tag-cho phép tinh sạch nhanh protein bằng nickel resin và phát hiện bằng kháng thể Anti-HisG, N-terminal Xpress™ epitope-cho phép phát hiện protein bằng kháng thể Anti-Xpress™, EK-enterokinase cắt điểm để loại bỏ đầu dung hợp, MCS-vùng tạo dòng, Stop-gen kết thúc phiên mã terminator, f1 ori của phage dạng sợi (filamentous phage)-sản xuất DNA sợi đơn để cho phép phân tích trình tự và phát sinh đột biến dễ dàng, Ampicillin-gen chọn lọc kháng kháng sinh. Nhóm pRSET bao gồm 3 vector A, B và C. Mỗi loại vector có trình tự mã hóa N-terminal tag ở trong một khung đọc khác nhau liên quan với vùng MCS để đơn giản hóa sự tạo dòng trong khung của gen quan tâm.

2. Xác định mức độ biểu hiện của gen được tạo dòng

Nói chung có ba cách thường được dùng để đánh giá mức độ biểu hiện protein ngoại lai của gen được tạo dòng:

- Điện di polyacrylamide gel để xác định protein có kích thước thích hợp được sản xuất ở mức độ cao trong các tế bào mang vector biểu hiện. Thông thường, protein quan tâm có thể quan sát bằng cách nhuộm gel với Coomassie Brilliant Blue hoặc bằng thuốc nhuộm bạc. Nếu không có băng protein mới được thấy khi dùng các thuốc nhuộm này, thì đánh dấu sự trao đổi chất với 100 μCi của [^{35}S]Met hoặc [^{35}S]Cys trên 1 mL dịch nuôi cấy trong 5 phút. Kỹ thuật SDS-PAGE¹ và phóng xạ tự ghi có thể cho phép phát hiện protein quan tâm.

- Phân tích Western blot bằng cách dùng các kháng thể đặc hiệu liên kết với protein quan tâm đã được thấm tích lên màng nitrocellulose sau khi thực hiện kỹ thuật SDS-PAGE.

- Nếu mức độ biểu hiện thấp thì nên đặt gen *lacZ* cùng hướng với gen được biểu hiện. Như vậy, nếu sự phiên mã hoặc dịch mã hạn chế biểu hiện thì những thay đổi trong hệ thống biểu hiện có thể được kiểm soát bằng những thay đổi trong hoạt tính của β -galactosidase.

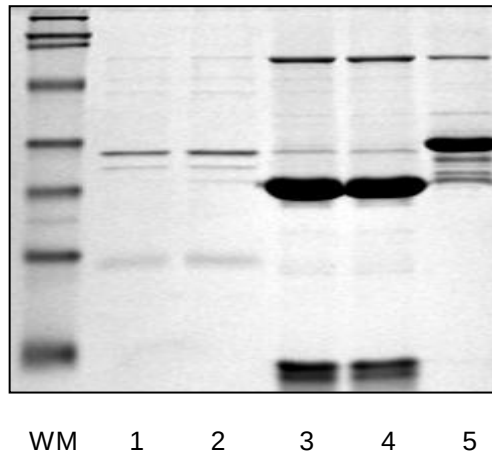
▪ Phân tích Western blot

- Kỹ thuật SDS-PAGE

Điện di trên polyacrylamide gel với sự có mặt của SDS cho phép phân ly các phân tử protein có khối lượng khác nhau. SDS có điện tích âm rất lớn và có khả năng liên kết với mạch peptide. Như vậy, số lượng SDS tương tác với protein tỷ lệ với kích thước phân tử protein và điện tích của SDS bám vào có thể làm bất cứ phân tử protein nào cũng chuyển động trong điện trường từ cực âm sang cực dương. Do đó, bằng phương pháp điện di, có thể phân tách riêng biệt các protein có khối lượng phân tử khác nhau (Hình 2.14). Ngoài ra, có thể điện di các protein tùy theo điểm đẳng điện (isoelectric point-IEP) của chúng. Phương pháp này được gọi là điện di tập trung đẳng điện (isoelectric focusing-IEF). Trong dung dịch đệm có pH biến thiên liên tục (gradient pH), các protein sẽ phân ly đến vị trí tương thích với

¹ SDS-PAGE: Điện di SDS-polyacrylamide gel (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).

điểm đẳng điện của chúng. Hai phương pháp điện di theo khối lượng phân tử và điểm đẳng điện có thể kết hợp với nhau tạo nên kỹ thuật điện di 2 chiều (2-D electrophoresis). Điện di protein trên polyacrylamide gel cho phép phân đoạn, xác định khối lượng phân tử và phân lập protein. Ngoài ra, khối lượng phân tử của protein còn được xác định chính xác bằng phương pháp sắc ký khối phổ.



Hình 2.14. Hình ảnh điện di SDS-PAGE. WM: chuẩn khối lượng phân tử của protein. Các đường từ 1-5: mẫu protein được điện di.

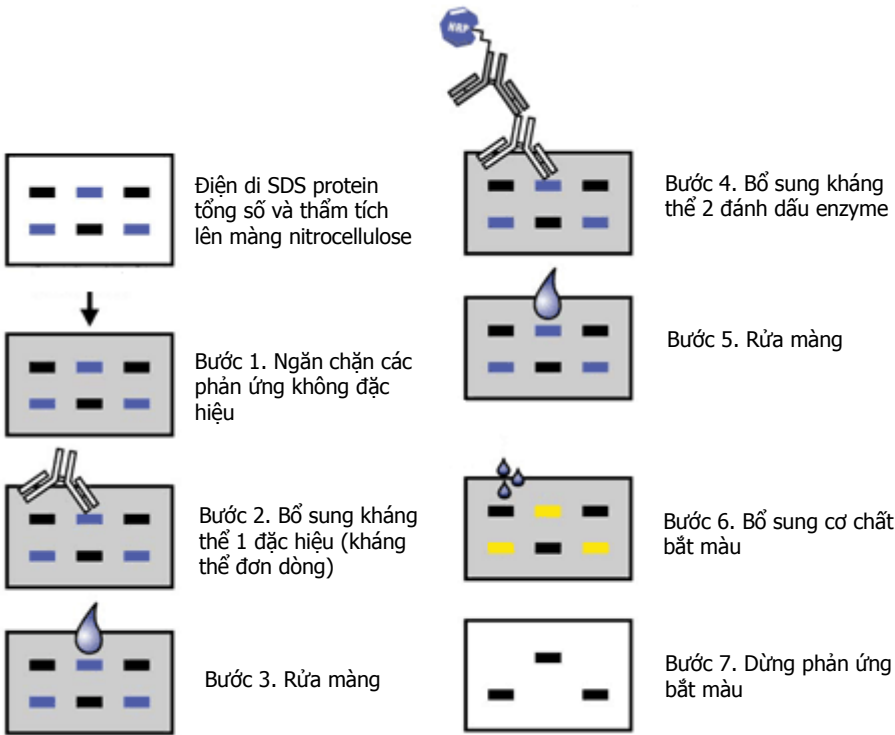
- Phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể

Phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể có tính đặc hiệu rất cao. Vì vậy, có thể áp dụng phản ứng này để phát hiện sự có mặt và tinh sạch protein. Kháng thể (antibody) được sản xuất khi đưa kháng nguyên vào thử và được tinh sạch từ máu thử sau khi gây nhiễm. Những kháng thể tạo ra bằng cách này là những kháng thể đa dòng (polyclonal antibodies-do các tế bào lympho khác nhau tiết ra), do đó chúng có khả năng nhận biết một số kháng nguyên. Ngược lại, kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) chỉ tương tác với một kháng nguyên nhất định.

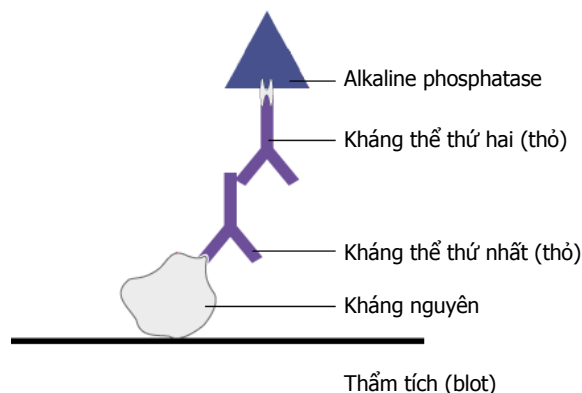
Kháng thể được đánh dấu bằng enzyme (hoặc bằng chất phát huỳnh quang) để phát hiện protein đặc hiệu (thường được thấm tích lên màng nitrocellulose sau khi chạy điện di SDS, và cố định ở đó) thông qua kỹ thuật Western blot (hoặc immunoblot) (Hình 2.15). Nguyên lý của phản ứng liên

kết kháng nguyên-kháng thể được trình bày ở hình 2.16. Sau khi protein trên màng nitrocellulose gắn với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và tiếp đến là kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme (ví dụ: alkaline phosphatase, horse-radish peroxidase...) thì phức hợp này sẽ được liên kết với cơ chất để tạo màu. Sự hiện diện của protein ngoại lai (sản phẩm dịch mã của gen ngoại lai được chuyển vào tế bào vật chủ) sẽ được phát hiện nhờ sự xuất hiện màu của phản ứng liên kết.

Sự phân bố của protein đặc hiệu trong tế bào và tổ chức mô cũng có thể phát hiện bằng kỹ thuật lai *in situ* (*in situ* hybridization) với nguyên tắc tương tự Western blot. Ngoài ra, kháng thể cũng được sử dụng để tinh sạch protein đặc hiệu bằng kết tủa miễn dịch hoặc sắc ký ái lực (affinity chromatography). Kháng thể đánh dấu còn được dùng để định lượng kháng nguyên trong kỹ thuật xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay) gọi tắt là ELISA.



Hình 2.15. Sơ đồ kỹ thuật Western blot



Hình 2.16. Sơ đồ phản ứng liên kết kháng nguyên với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme trong Western blot

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

- 1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K.** 2002. Short Protocol in Molecular Biology. Vol 1 and 2. 5th ed. John Wiley & Sons Inc. USA.
- 2. Glick BR and Pasternak JJ.** 2003. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd ed. ASM Press, USA.
- 3. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J.** 1989. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- 4. Ohman DE.** 1989. Experiments in Gene Manipulation. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- 5. Primrose SB, Twyman R and Old RW.** 2001. Principles of Gene Manipulation. 6th ed. Blackwell Science, Oxford, UK.
- 6. Rapley R and Walker JM.** 1998. Molecular Biomethods Handbook. Humana Press Inc. New Jersey, USA.
- 7. Walker JM and Rapley R.** 2002. Molecular Biology and Biotechnology. 4th ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Chương 3

Công nghệ lên men vi sinh vật

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:

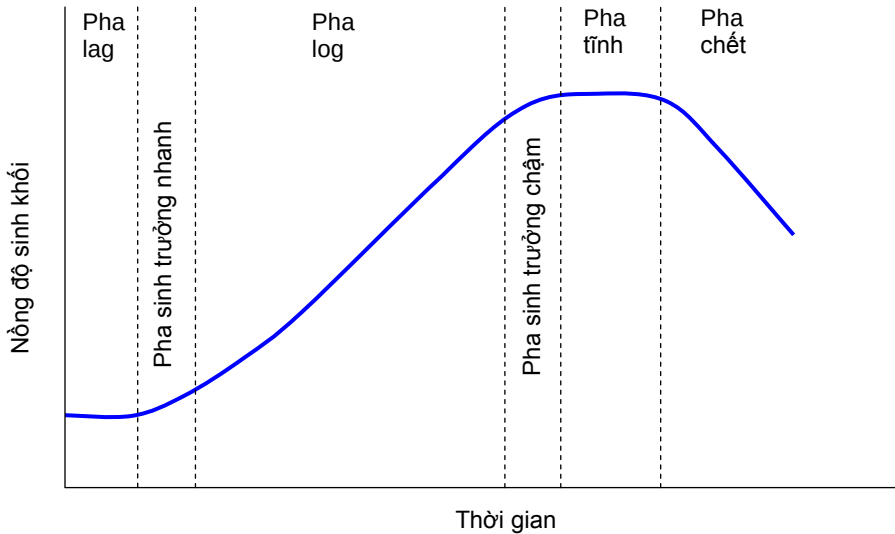
$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

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...

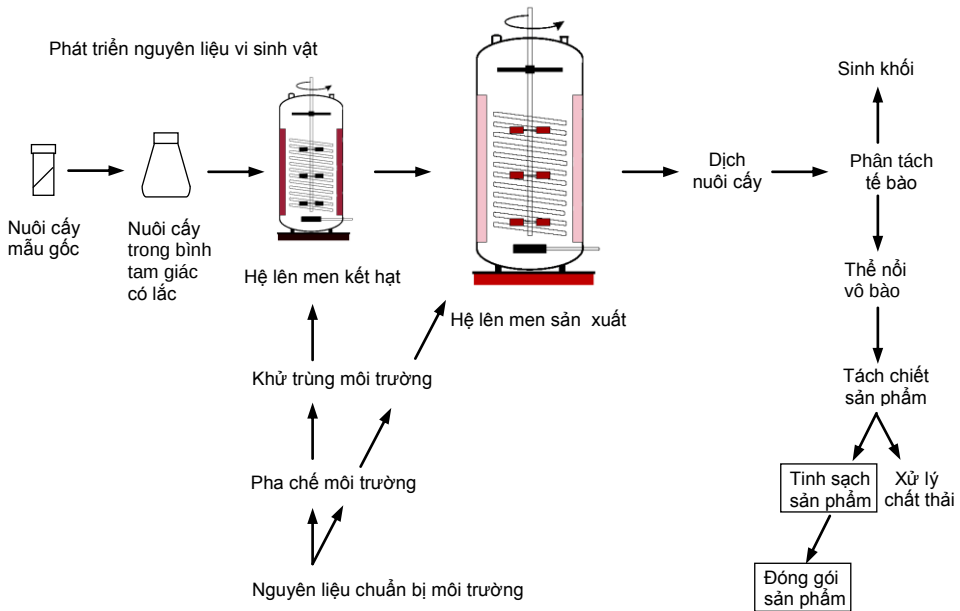
- Sinh khối cố định đạm làm phân bón vi sinh, các loại phân bón vi sinh với vi khuẩn sống tự do trong đất và sống cộng sinh với cây họ đậu.

- 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.

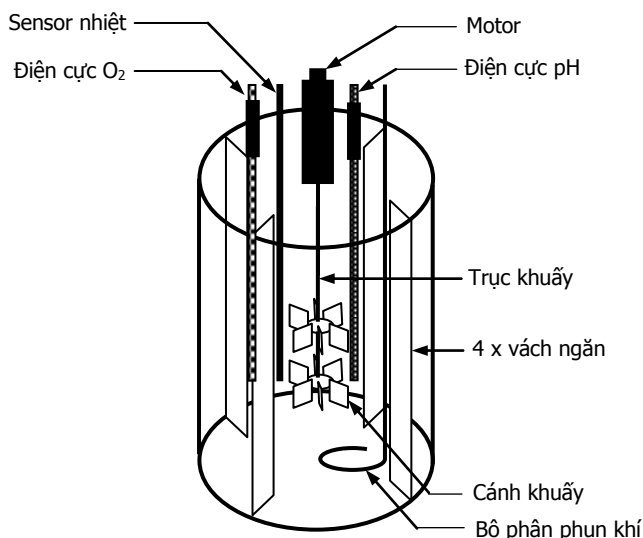
2. Quá trình lên men

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 mẻ

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

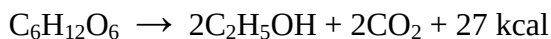
1. Lên men rượu

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

Khi chế biến nguyên liệu thành dịch quả cần bổ sung SO_2 để ngăn cản các phản ứng oxy hóa và tiêu diệt các vi khuẩn tạp nhiễm, bổ sung thêm đường để tăng quá trình chuyển hóa thành rượu của vi sinh vật, điều chỉnh độ chua vì độ chua có thể ảnh hưởng đến chất lượng nước quả cũng như làm thay đổi pH của dịch nước quả sẽ ảnh hưởng bất lợi đến hoạt động của vi sinh vật và các enzyme. Quá trình lên men tạo rượu vang được tiến hành hoặc bằng cách dùng nấm men dính trên vỏ quả (rơi vào dịch quả một cách tự nhiên) hoặc cho lên men dịch quả nhờ các chủng nấm men như *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 giai đoạn này có quá trình lên men malolactic chuyển hóa malic acid thành lactic acid, làm cho rượu được chuyển từ vị chua gắt sang vị chua nhẹ dễ chịu. (3) Giai đoạn vang chín, rượu non đã ổn định thành phần nhưng rượu vẫn còn “sống”, 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

Những enzyme được tạo thành trong tế bào vi sinh vật không phải chỉ phụ thuộc vào hoạt tính riêng của từng loại vi sinh vật, mà còn phụ thuộc vào thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy.

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, invertase, 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.

Tương tự như vậy khi nuôi cấy bề mặt nấm mốc *Asper. awamori* trên cám sẽ thu được một số lượng lớn glucoamylase, α -amylase, protease, pectinase, cellulase; nhưng khi nuôi chìm trên môi trường chứa tinh bột và nitrate thì chỉ thu được phức hợp amylase.

Hiện tượng này có thể giải thích bằng lý thuyết sinh tổng hợp cảm ứng enzyme, nó chỉ xảy ra trong khi nuôi cấy vi sinh vật mà không thấy ở động-thực vật. Những enzyme thủy phân của vi sinh vật đều thuộc hệ enzyme cảm ứng. Khi trong môi trường nuôi cấy có một chất khó đồng hóa, vi sinh vật phải tiết vào môi trường một hoặc những enzyme tương ứng để phân hủy nó thành những chất có thể đồng hóa được.

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

ứng. Các cơ 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.

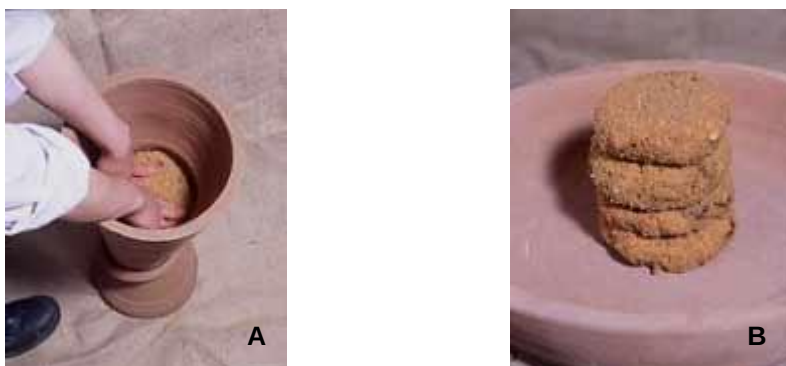
2.3. Những phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzyme

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.

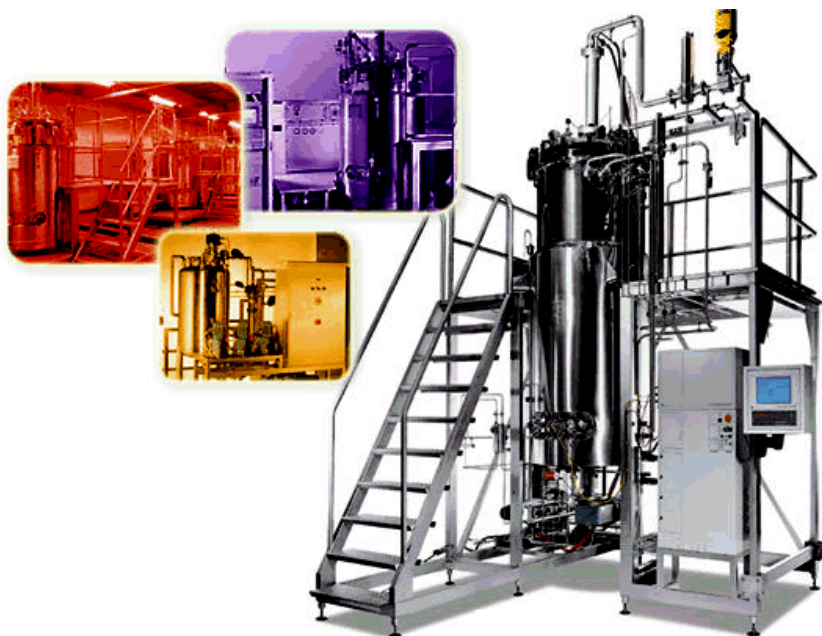


Hình 3.8. Lên men bằng phương pháp nuôi cấy chìm trong môi trường lỏng ở quy mô phòng thí nghiệm (5 L)

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 để 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

khi 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 m³/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±1°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

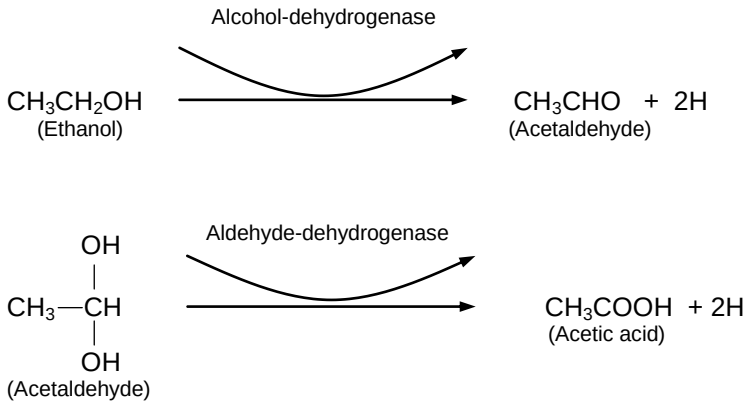
4.1. Acetic acid

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 bọn ưa ấm 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*.

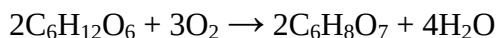
Nguồn cơ chất chủ yếu trong lên men acetic là ethanol có bổ sung thêm một ít đường, nguồn nitrogen vô cơ hoặc hữu cơ, và một số chất khoáng khác. Có ba phương pháp lên men acetic: (1) Phương pháp chậm còn gọi là phương pháp Orlean hoặc phương pháp Pháp, dùng nước hoa quả làm nguyên liệu với vi khuẩn *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. Lốp 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 4

Công nghệ sinh học thực vật

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.

Một trong những hướng phát triển gần đây nhất của công nghệ sinh học thực vật là biến nạp và biểu hiện các gen ngoại lai trong tế bào thực vật. Việc biến đổi di truyền ở thực vật bậc cao bằng cách đưa DNA ngoại lai vào trong các tế bào của chúng là một quá trình phức tạp. Tuy nhiên, nhờ sử dụng enzyme hạn chế để cắt phân tử DNA sợi đôi thành những đoạn nhỏ riêng rẽ, phát triển kỹ thuật lai phân tử và các gen chỉ thị, 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.

Bên cạnh công nghệ hóa học và dược học đang phát triển một cách nhanh chóng và hiện đại, thực vật bậc cao vẫn là một nguồn cung cấp các hợp chất hóa học và dược liệu rất quan trọng. Tuy nhiên, trong những năm gần đây sản lượng các thực vật đó rất khó đảm bảo ở mức ổn định do 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 giâm cành 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 tượng 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 giâm 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, dứa, 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).

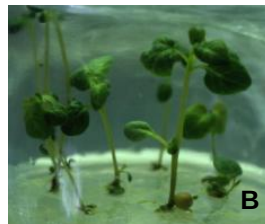
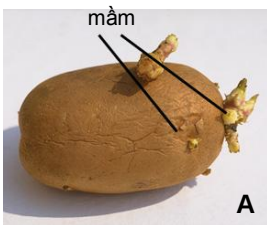
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ.

- 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)

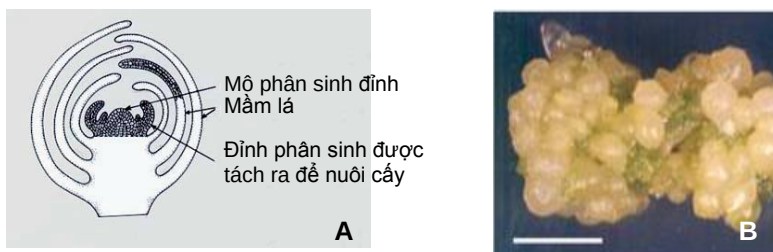


Hình 4.1. Sự phát triển cây trực tiếp. A: mầm khoai tây. B: sự kéo dài mầm khoai tây trong nuôi cấy và phát sinh chồi nách, các đoạn thân mang chồi nách sẽ được tách ra và cấy chuyển trên cùng môi trường để nhân nhanh.

- 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.

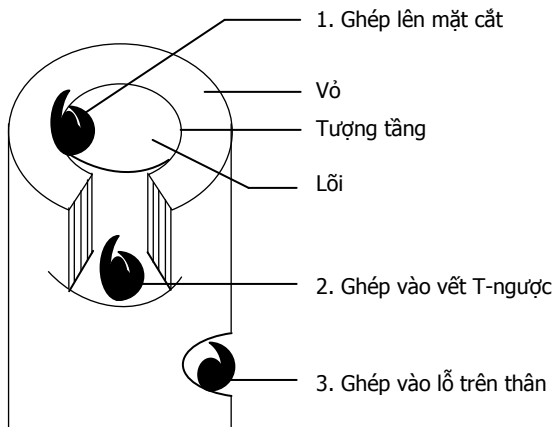
Lĩnh vực ứng dụng mới đây nhất cũng đã bắt đầu có kết quả là các cây ăn quả và cây lâm nghiệp, trong đó có các cây quý như cà phê, táo, lê, thông, bồ đề... Tổng số có trên 30 chi khác nhau đã được nuôi cấy thành công. Do các cây trồng rừng và các cây ăn quả là những cây trồng lâu năm nên mọi chi phí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



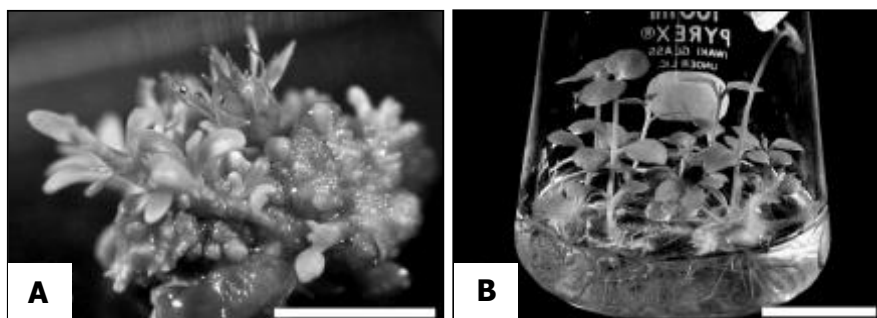
Hình 4.3. Vị trí mắt ghép trong ba kiểu vi ghép khác nhau

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 *Hylotelephium sieboldii*. A: Chồi bất định. B: Cây *in vitro* hoàn chỉnh.

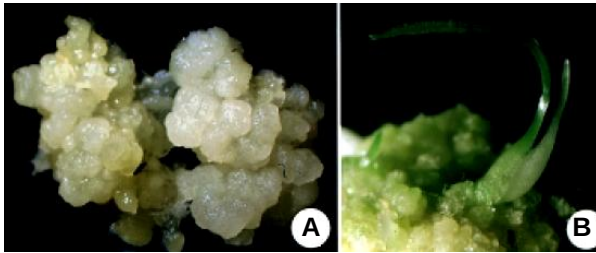
Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô (parenchyma cells) nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh (meristemoids) phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế 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 Schaffer (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.

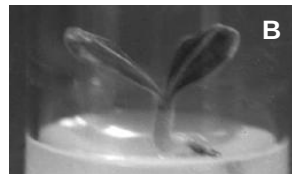
Ở trường hợp phôi hữu tính, sự kết hợp giao tử đực và cái cho ra hợp tử (zygote). Hợp tử phân chia nhiều lần tạo nên phôi hữu tính có cấu trúc hai cực: rễ và ngọn. Khi hợp tử phát triển, miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn cùng phát triển và cuối cùng tạo thành cây hoàn chỉnh, qua các giai đoạn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

- Trường hợp cây hai lá mầm:

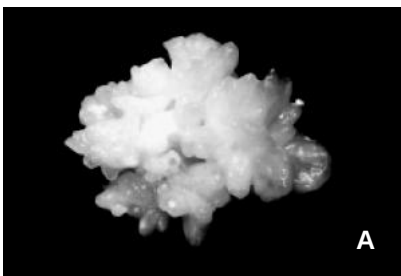
Dạng cầu → dạng thủy lôi → dạng có lá mầm

- 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*

Sтт	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 sản xuất các hạt nhân tạo thông qua phôi vô tính từ nuôi cấy dịch lỏng, thì nồi 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*. Alginat 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^+ , NH_4^+ ... 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+} , Al^{3+} ,... 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

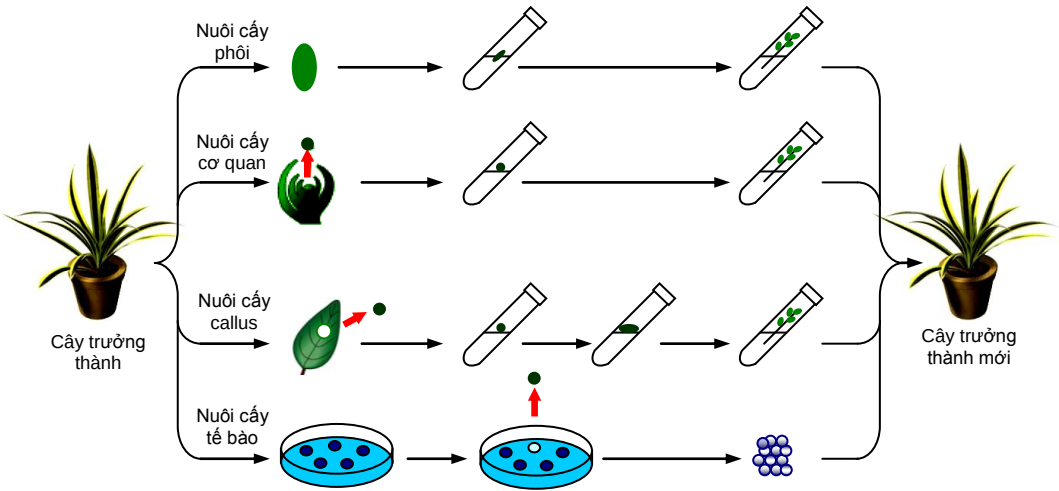
Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là bình lên men (fermenter) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

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 cạnh phát triển theo hướng ngang. Nếu cắt bỏ mô phân sinh đỉnh sớm thì cạnh ngang sẽ phát triển thành cạnh 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 thể 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 lacerate 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 và *Agrobacterium rhizogenes* là hai loài vi khuẩn gây bệnh cho thực vật được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai vào mô và tế bào thực vật. *A. tumefaciens* có chứa

một plasmid lớn kích thước khoảng 200 kb gọi là Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) chính là tác nhân gây bệnh cho cây. Khi cây bị nhiễm *A. tumefaciens* qua các vết thương, biểu hiện bệnh rõ nhất là các khối u được hình thành ở ngay chỗ lây nhiễm. Sự hình thành khối u sau đó có thể tiếp tục mà không cần thiết phải có sự hiện diện của vi khuẩn. Khả năng này có được do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid (T-DNA) xâm nhập vào hệ gen của cây bị bệnh.

1.2. Ti-plasmid

Trong thế giới động-thực vật đều tồn tại các thể plasmid, đó là các vòng DNA tự sinh sản độc lập. Ở vi khuẩn và động-thực vật, plasmid liên quan tới yếu tố giới tính của tế bào, đến khả năng chống chịu các loại kháng sinh... Đặc điểm quan trọng của plasmid là chúng có thể liên kết vào nhiễm sắc thể nhưng cũng có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể một cách độc lập.

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*.

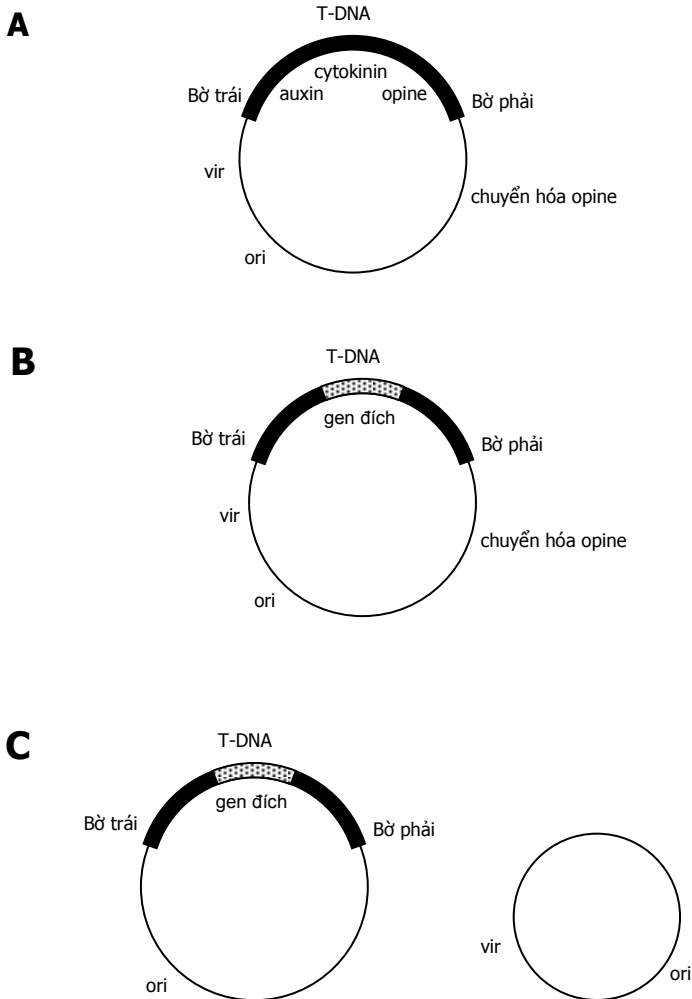
1.3. Vùng T-DNA

Vùng T-DNA được nghiên cứu rất kỹ. Đó là một đoạn DNA có kích thước 25 kb trong đó chứa gen mã hóa cho sinh tổng hợp auxin, cytokinin, opine là các gen gây khối u (oncogenes). Trong Ti-plasmid, vị trí của T-DNA được giới hạn bằng RB và LB. Ngoài T-DNA, trên Ti-plasmid còn có các vùng DNA mã hóa cho việc tái sinh plasmid (replication), cho khả năng lây nhiễm và tiếp hợp (vùng *vir*), cho việc tiêu hóa opine (opine catabolism) (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.

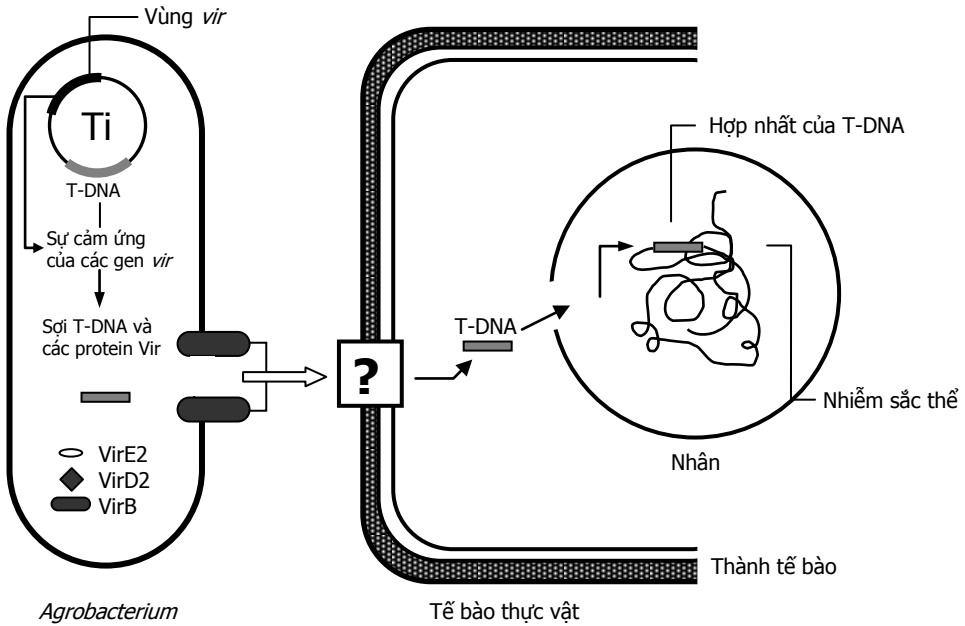
tumefaciens) hoặc rễ tơ (trường hợp *A. rhizogenes*). Khả năng chuyển gen này đã được khai thác để chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

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

Các gen chỉ thị chọn lọc chung nhất mã hóa các protein khử độc các nhân tố ức chế trao đổi chất như các kháng sinh hoặc chất diệt cỏ (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 sứa.

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

thí nghiệm. Các gen được lắp ghép vào DNA của plasmid với mục đích này được gọi là gen chỉ thị chọn lọc hay gen chỉ thị sàng lọc.

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* là tên gọi của gen mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT), có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), là hoạt chất chính của thuốc trừ cỏ như Bialaphos và Basta. Gen *bar* được tạo dòng đầu tiên từ một dòng vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*. Phương pháp đơn giản nhất để kiểm tra sự có mặt của gen *bar* là phương pháp trực tiếp. Mô, tế bào hoặc cây chuyển gen được đặt trên môi trường có các nồng độ phosphinothricin khác nhau (hoặc các thuốc trừ cỏ tương ứng) và so sánh sinh trưởng của mô, tế bào hoặc cây đối chứng đặt trên cùng môi trường.

- **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. Sự tồn tại hoạt động của *lacZ* trong tế bào thực vật đã được khẳng định. Vì vậy trước khi kiểm tra sự có mặt của gen *lacZ* ngoại lai, cần phải bất hoạt gen *lacZ* nội sinh bằng glutaraldehyde.

Bảng 4.3. Hệ thống các gen chỉ thị chọn lọc và các gen chỉ thị sàng lọc

A. Một số gen chỉ thị chọn lọc		
Ký hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để chọn lọc
<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>	Enzyme kháng bleomycin	Bleomycin
<i>bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Phosphinothricin
<i>bxn</i>	Bromoxynil nitrilase	Bromoxynil
B. Một số gen chỉ thị sàng lọc		
Ký hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để phát hiện
<i>gus A</i>	β -glucuronidase	X-Gluc
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	X-Gal
<i>luc</i>	Luciferase đom đóm	Lumis Phos
<i>lux</i>	Luciferase vi khuẩn	Lumi Phos
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol đánh dấu
<i>nos</i>	Nopaline synthase	Nopaline

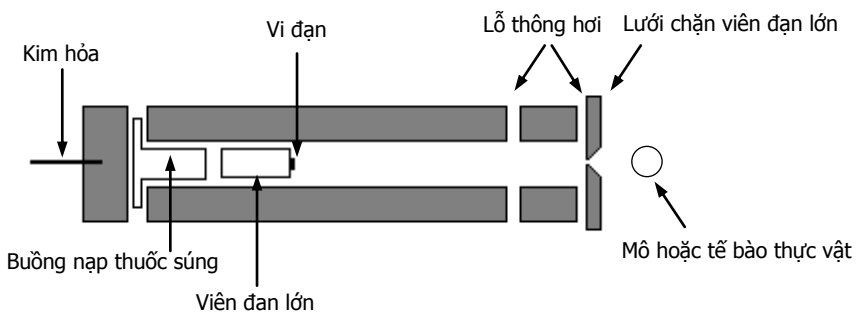
- **Gen *cat*.** Được phân lập và tạo dòng từ dòng vi khuẩn Tn9, là gen gây khả năng kháng chloramphenicol ở vi khuẩn nói chung. Gen *cat* đã

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.

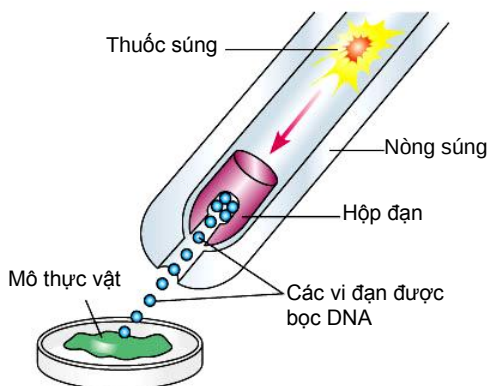
3. Chuyển gen bằng vi đạn

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 (microprojectile). Vi đạn được trộn với DNA theo một tỷ lệ thích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh vi đạn, hỗn hợp được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng kích thước 0,5-0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) vừa khít với nòng của súng bắn gen (gene gun) (Hình 4.12) hoặc hệ thống dội bom (bombardement) (Hình 4.13). Thường đạn lớn làm bằng nhựa hoặc bông nén hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn, áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Ra khỏi đầu nòng, một lưới thép mịn cản viên đạn lớn lại, nhưng các vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình biến nạp gen.



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 nhờn, 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.

4.2. Triển vọng và hướng phát triển

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-enolopyruvyl-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, α -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 α -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 β -methyl-digitoxin. Sau 12 ngày, người ta đã thu được 4 g β -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 bẩn. 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 bẩn 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>
Erythropoietin	<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.

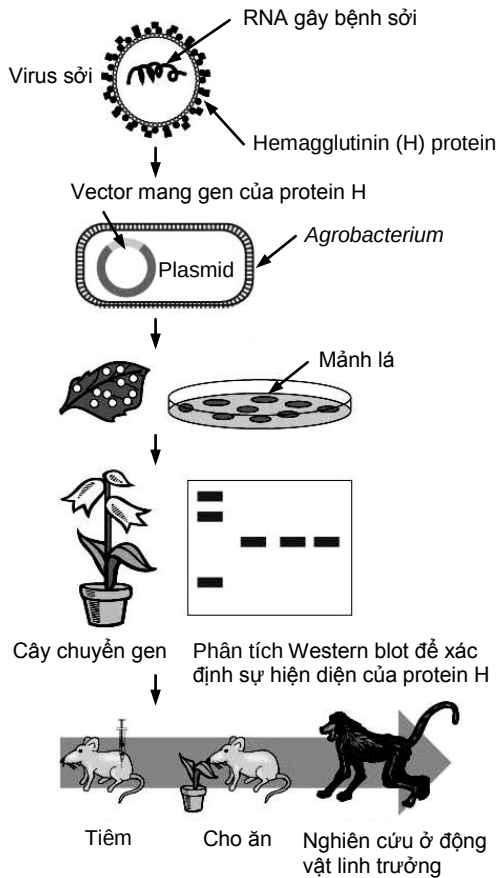
Vaccine thực phẩm là một mô hình lý tưởng cho các nước đang phát triển, vì nó giúp khắc phục được các khó khăn nói trên của vaccine được sản xuất theo phương pháp truyền thống hoặc DNA tái tổ hợp. Nguyên lý cơ bản của quá trình này là chuyển một loại gen đặc biệt vào tế bào thực vật. Loại gen này hoạt 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 bursan 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 cấy *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. **Klevenz 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.

Công nghệ sinh học động vật

I. Mở đầu

Tế bào động vật có thể sinh trưởng trên các loại môi trường dinh dưỡng tổng hợp bên ngoài cơ thể, vì thế chúng đã được nuôi cấy cho các mục đích sau:

- Nghiên cứu các tế bào ung thư, phân loại các khối u ác tính, xác định sự tương hợp của mô trong cấy ghép, nghiên cứu các tế bào đặc biệt cùng sự tương tác của chúng, sản xuất tế bào gốc...

- Ứng dụng để sản xuất các hợp chất hóa sinh quan trọng dùng trong chẩn đoán như các hormone sinh trưởng của người, interferon, hoạt tố plasminogen mô, các viral vaccine và các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies). Theo phương pháp truyền thống các hợp chất hóa sinh này được sản xuất bằng cách sử dụng các động vật sống hoặc được tách chiết từ xác người chết. Chẳng hạn, các kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy các tế bào hybridoma trong các khoang màng bụng (peritoneal cavity) của chuột, hoặc hormone sinh trưởng dùng để chữa bệnh còi (dwarfism) có thể được tách chiết từ xác người chết. Tuy nhiên, số lượng thu được từ các phương pháp này rất hạn chế vì thế việc ứng dụng rộng rãi chúng trong điều trị còn gặp nhiều khó khăn.

Chuyển gen vào động vật để tạo ra nguồn thực phẩm có giá trị là một trong những ứng dụng có ý nghĩa của công nghệ sinh học động vật. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu này vẫn còn một vài hạn chế trên động vật có vú lớn do chúng sinh sản mỗi lần rất ít trứng, việc cấy phôi trở vào mẹ mang phức tạp, mỗi mẹ mang chỉ nhận được một ít phôi, trứng của đa số động vật nuôi có tế bào chất rất đục nên khó nhìn thấy tiền nhân để chuyển gen vào... Mục tiêu của chuyển gen là nhằm đưa vào vật nuôi những tính trạng có hiệu quả kinh tế cao như sử dụng triệt để thức ăn, nhiều thịt ít mỡ, sinh trưởng nhanh, kháng bệnh... Mặc dù, còn gặp một số khó khăn và thất bại nhưng người ta cũng đã có được một vài thành công bước đầu như tạo ra loại gà kháng bệnh do avian leukosis virus gây ra hay cừu cho nhiều lông... Các kết quả này cho phép hy vọng sẽ đạt được những bước tiến mới trong tương lai.

Nhân bản vô tính (tạo dòng) đối với các vật nuôi có năng suất cao nhưng các thế hệ con của nó lại không được như vậy cũng đã có một vài thành công nhất định, kỹ thuật này cho phép tái tạo các vật nuôi có đầy đủ phẩm chất như ban đầu bằng phương thức vô tính. Thành công vang dội trong lĩnh vực này là kết quả của Wilmot và cộng sự (1996) đã cho ra đời chú cừu Dolly. Cừu Dolly không có bố mẹ hiểu theo nghĩa thông thường mà được tạo ra bằng cách sao y một con cừu trưởng thành. Ngoài ra, kỹ thuật này cũng được áp dụng trong nhân giống các động vật chuyển gen, các động vật này khi sinh sản hữu tính có thể thế hệ con không nhận được gen đích, do đó sự can thiệp của nhân bản vô tính trong trường hợp này là rất cần thiết. Bên cạnh các ứng dụng trong sản xuất, hiện nay việc ứng dụng nhân bản vô tính để bảo tồn các nguồn gen và động vật quý hiếm cũng đang được chú trọng đặc biệt.

II. Nuôi cấy tế bào động vật có vú

1. Các ưu điểm và hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật

1.1. Các ưu điểm của nuôi cấy tế bào động vật

- Hệ thống tế bào động vật là các “nhà máy tế bào” thích hợp cho việc sản xuất các phân tử phức tạp và các kháng thể dùng làm thuốc phòng bệnh, điều trị hoặc chẩn đoán (Bảng 5.1).

- Các tế bào động vật đáp ứng được quá trình hậu dịch mã chính xác đối với các sản phẩm protein sinh-dược (biopharmaceutical protein). Chuyển gen của động vật có vú cũng có thể được sản xuất bởi hệ thống vi khuẩn bằng cách dùng công nghệ DNA tái tổ hợp. Tốc độ sinh trưởng nhanh, thành phần môi trường đơn giản và rẻ tiền của nuôi cấy tế bào vi khuẩn khiến chúng có nhiều ưu điểm hơn so với nuôi cấy tế bào động vật có vú. Tuy nhiên, vi khuẩn thiếu khả năng biến đổi hậu dịch mã (post-translational modifications) bao gồm việc phân giải protein, liên kết tiểu đơn vị (subunit), hoặc nhiều phản ứng kết hợp khác nhau như glycosylation, methylation, carboxylation, amidation, hình thành các cầu nối disulfide hoặc phosphorylation các gốc amino acid. Những sửa đổi này rất quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của sản phẩm. Ví dụ quá trình glycosylation có thể giúp bảo vệ protein chống lại sự phân giải chúng, duy trì khả năng ổn định cấu trúc và biến đổi kháng nguyên.

Bảng 5.1. Các sản phẩm quan trọng của nuôi cấy tế bào động vật

Nhóm I	Enzyme	Urokinase, hoạt tố plasminogen mô
	Hormone	Hormone sinh trưởng (GH)
	Các nhân tố sinh trưởng	Các cytokine khác
Nhóm II	Vaccine	Bệnh dại, bệnh quai bị, bệnh sởi ở người... Veterinary-FMD vaccine, New Cattle's Disease ...
Nhóm III	Kháng thể đơn dòng	Các công cụ chẩn đoán
Nhóm IV	Virus côn trùng	Thuốc trừ sâu sinh học cho Baculovirus
Nhóm V	Các chất điều hòa miễn dịch	Interferon và interleukin
Nhóm VI	Các tế bào nguyên vẹn	Thử nghiệm độc chất học

- Sản xuất các viral vector dùng trong liệu pháp gen (biến nạp một gen bình thường vào trong tế bào soma mang gen tương ứng bị khiếm khuyết để chữa bệnh do sự khiếm khuyết đó gây ra). Các mục đích chính của liệu pháp này là các bệnh ung thư, HIV, chứng viêm khớp, các bệnh tim mạch và xơ hóa u nang.

- Sản xuất các tế bào động vật để dùng như một cơ chất *in vitro* trong nghiên cứu độc chất học và dược học.

- Phát triển công nghệ mô hoặc phát sinh cơ quan để sản xuất các cơ quan thay thế nhân tạo-sinh học/các dụng cụ trợ giúp, chẳng hạn:

- + Da nhân tạo để chữa bỏng.
- + Mô gan để chữa bệnh viêm gan.
- + Đảo Langerhans để chữa bệnh tiểu đường.

1.2. Một số hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật

Mặc dù tiềm năng ứng dụng của nuôi cấy tế bào động vật là rất lớn, nhưng việc nuôi cấy một số lượng lớn tế bào động vật thường gặp các khó khăn sau:

- Các tế bào động vật có kích thước lớn hơn và cấu trúc phức tạp hơn các tế bào vi sinh vật.
- Tốc độ sinh trưởng của tế bào động vật rất chậm so với tế bào vi sinh vật. Vì thế, sản lượng của chúng khá thấp và việc duy trì điều kiện nuôi cấy vô trùng trong một thời gian dài thường gặp nhiều khó khăn hơn.
- Các tế bào động vật được bao bọc bởi màng huyết tương, mỏng hơn nhiều so với thành tế bào dày chắc thường thấy ở vi sinh vật hoặc tế bào thực vật, và kết quả là chúng rất dễ bị vỡ.
- Nhu cầu dinh dưỡng của tế bào động vật chưa được xác định một cách đầy đủ, và môi trường nuôi cấy thường đòi hỏi bổ sung huyết thanh máu rất đắt tiền.
- Tế bào động vật là một phần của mô đã được tổ chức (phân hóa) hơn là một cơ thể đơn bào riêng biệt như vi sinh vật.
- Hầu hết các tế bào động vật chỉ sinh trưởng khi được gắn trên một bề mặt.

2. Các dòng tế bào động vật có vú và các đặc điểm của nó

Các tế bào động vật có vú là tế bào eukaryote, chúng được liên kết với nhau bởi các nguyên liệu gian bào để tạo thành mô. Mô động vật thường được phân chia theo bốn nhóm: biểu mô (epithelium), mô liên kết (connective tissue), mô cơ (muscle) và mô thần kinh (nerve). Biểu mô tạo thành lớp phủ và lớp lót trên các bề mặt tự do của cơ thể, cả bên trong và bên ngoài. Ở mô liên kết, các tế bào thường được bao bọc trong thể gian bào rộng (kéo dài), đó có thể là chất lỏng, hơi rắn hoặc rắn. Các tế bào mô cơ thường thon dài và được gắn với nhau thành một phiến hoặc một bó bởi mô liên kết. Mô cơ chịu trách nhiệm cho hầu hết chuyển động ở động vật bậc cao. Các tế bào mô thần kinh gồm có thân bào chứa nhân và một hoặc nhiều phần mở rộng dài và mảnh được gọi là sợi. Các tế bào thần kinh được kích thích dễ dàng và truyền xung động rất nhanh.

2.1. Các tế bào dịch huyền phù

Tế bào hồng cầu (blood) và bạch huyết (lymph) là các mô liên kết không điển hình dạng thể lỏng. Các tế bào máu hoặc dịch bạch huyết là các tế bào dịch huyền phù (suspension cells), hoặc không dính bám khi chúng sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Các tế bào không dính bám không đòi hỏi bề mặt để sinh trưởng.

Chẳng hạn, các tế bào bạch huyết (lymphocytes) bắt nguồn từ mô bạch huyết là các tế bào không dính bám và có hình cầu đường kính từ 10-20 μm . Chúng có thể được nuôi cấy trong môi trường dịch lỏng theo phương thức tương tự vi khuẩn.

2.2. Các tế bào dính bám

Hầu hết các tế bào động vật bình thường là các tế bào dính bám, vì thế chúng cần có bề mặt để gắn vào và sinh trưởng. Trong các ứng dụng, người ta sử dụng rộng rãi các loại tế bào dính bám là tế bào biểu mô và nguyên bào sợi (fibroblast). Các tế bào dính bám cần có một bề mặt ẩm để sinh trưởng như là thủy tinh hoặc plastic. Đĩa petri hoặc các chai trực lẫn là các loại được sử dụng rộng rãi nhất. Các chai được đặt nằm trên một trục lẫn quay tròn chậm trong tủ ẩm. Chai có dung tích một lít chứa khoảng 100 mL môi trường là thích hợp cho các tế bào vừa sinh trưởng trên thành chai vừa tiếp xúc với môi trường và không khí. Tuy nhiên, chai trực lẫn chỉ dùng cho quy mô phòng thí nghiệm vì diện tích bề mặt trên một đơn vị thể tích của chai nuôi cấy khá nhỏ ($500 \text{ cm}^2/\text{L}$).

Tỷ lệ diện tích/thể tích có thể được tăng lên khi các tế bào sinh trưởng trên các giá thể là polymer bọt biển (spongy), thể gốm (ceramic), các sợi rỗng, microcapsule, hoặc trên các hạt nhỏ có kích thước hiển vi gọi là microcarrier.

3. Các sản phẩm thương mại của nuôi cấy tế bào động vật có vú

Các sản phẩm sinh học được sản xuất bằng tế bào động vật có vú chủ yếu là các glycoprotein. Bảng 5.2 giới thiệu một số sản phẩm tiêu biểu. Sự phức tạp và chi phí cao của các quá trình nuôi cấy tế bào động vật cho thấy sản xuất protein bằng tế bào động vật có vú chỉ thật sự kinh tế đối với những sản phẩm có giá trị cao ($>\text{USD } 10^6/\text{kg}$). Vì thế, các sản phẩm protein của tế

bào động vật có vú là những sản phẩm chủ yếu dùng làm dược phẩm. Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies-Mabs) là sản phẩm nuôi cấy tế bào động vật có vú có giá trị nhất hiện nay. Các tính chất liên kết đặc hiệu cao của Mabs có thể được dùng trong chẩn đoán (cả y học lẫn thú y), phân tích hình ảnh (ung thư và bệnh tim), tinh sạch sản phẩm (sắc ký ái lực) và như là các nhân tố trị liệu. Các protein có đặc tính dược liệu khác sản xuất bằng nuôi cấy tế bào động vật có vú được hướng tới sử dụng trong điều trị ung thư, bệnh tim, các bệnh về máu và rối loạn hormone.

- Quá trình glycosyl hóa một phân tử protein (hậu dịch mã) xảy ra ở mạng lưới nội sinh chất (endoplasmic reticulum-ER) và phức hợp Golgi của tế bào eukaryote, và phụ thuộc vào sự hiện diện của các enzyme đặc hiệu: glycosyltransferase và glycosidase.

- Vi khuẩn hoặc không chứa các cơ quan tử này hoặc không chứa các enzyme vì thế không thể thực hiện sự biến đổi hậu dịch mã này.

- Nấm men và nấm sợi (eukaryote) có thể glycosyl hóa các protein từ các tế bào động vật có vú nhưng thực hiện khó khăn hơn.

- Một số protein dùng làm dược phẩm không được glycosyl hóa hoặc không cần được glycosyl hóa cho chức năng thích hợp như insulin hoặc hormone sinh trưởng ở người, albumin huyết thanh người và haemoglobin, có thể được sản xuất với giá thành thấp hơn nhiều nhờ vi khuẩn, nấm men hoặc nấm sợi.

4. Glycosyl hóa protein (glycosylation)

- Trong khi quá trình tổng hợp protein được hướng dẫn bởi các khuôn mẫu DNA và RNA, thì việc bổ sung đường vào protein là một quá trình không cần khuôn mẫu. Vì thế, có thể tìm thấy nhiều biến thể trong các cấu trúc oligosaccharide của các glycoprotein (các protein được glycosyl hóa).

- Các glycoprotein có trình tự amino acid giống nhau, nhưng các cấu trúc oligosaccharide khác nhau được gọi là các glycoform. Các cấu trúc oligosaccharide được liên kết đồng hóa trị với protein hoặc ở nguyên tử nitrogen (N-glycosylation) hoặc ở nguyên tử oxygen (O-glycosylation). Hai dạng glycosylation này khác nhau không chỉ ở vị trí gắn vào của đường mà còn ở loại đường và số lượng đường được bổ sung.

Bảng 5.2. Một số protein dùng làm dược phẩm được sản xuất bằng nuôi cấy tế bào động vật có vú

Protein dược liệu	Chức năng	Loại glycosylation
Hoạt tố plasminogen mô (tPA)	Tác nhân phân giải fibrino-gen (chất tạo tơ huyết)	Liên kết N
Erythropoietin (EPO)	Tác nhân chống thiếu máu	Liên kết N và O
Nhân tố VII, VIII, IX và X	Các tác nhân gây cục máu, bệnh máu loãng khó đông	Liên kết N và O
Hormone kích thích nang noãn (FSH), kích dục tố màng đệm ở người (hCG)	Điều trị vô sinh	Liên kết N và O
Interleukin-2	Chống ung thư, điều hòa miễn dịch, điều trị HIV	Liên kết O
Interferon-alpha (IFN- α)	Chống ung thư, điều hòa miễn dịch	Liên kết N và O
Interferon-beta (IFN- β)	Chống ung thư, tác nhân chống virus	Liên kết N
Interferon-gamma (IFN- γ)	Tác nhân chống ung thư, điều hòa miễn dịch	Liên kết N
Nhân tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt (G-CSF)	Chống ung thư	Liên kết O
Kháng thể đơn dòng	Trị liệu và chẩn đoán	Liên kết N

- Hầu hết các protein hiện diện trên bề mặt tế bào, virus, và trong máu của các động vật được glycosyl hóa, và vì thế nó được xem giống như một

số được phẩm sinh học cũng sẽ được glycosyl hóa để có cùng chức năng như các bản sao tự nhiên của chúng.

- Vi khuẩn không glycosyl hóa các protein của chúng (hoặc đúng hơn là có các loại liên kết peptide-đường hoàn toàn khác với động vật), vì thế các kỹ thuật của công nghệ di truyền được phát triển cho nấm men và các tế bào eukaryote là những loại có glycosyl hóa. Dĩ nhiên, chúng không luôn luôn glycosyl hóa trong một phương thức chính xác như các tế bào ở người thực hiện.

- Đường có thể được liên kết với protein thông qua các nhóm amide của asparagine (Asn) trong chuỗi peptide ngắn Asn-X-Ser/Thr (trong đó X đại diện cho mọi amino acid ngoại trừ proline), hoặc hiếm khi hơn, thông qua nhóm hydroxyl của serine (Ser) và threonine (Thr).

- Glycosyl hóa là một dạng của sự biến đổi hậu dịch mã, tức là biến đổi hóa học của protein sau khi protein được dịch mã từ RNA. Một kiểu glycosyl hóa protein khác là theo phương thức hóa học, nó xảy ra bất cứ khi nào một protein nằm trong các dung dịch đường một thời gian lâu. Phương thức này cũng được gọi là glycosylation.

- Một tế bào có thể thu được một hỗn hợp các glycoform khác nhau. Các glycoform khác nhau có các tính chất và chức năng khác nhau trong nhiều trường hợp, và được nhận biết bằng hệ thống miễn dịch. Các tế bào ung thư thường sản xuất các glycoform khác nhau từ những tế bào bình thường ít khi glycosyl hóa các protein bề mặt của chúng. Nhiều chỉ thị khối u trên thực tế là các dấu hiệu phân biệt glycoprotein đặc trưng cho các tế bào ung thư, và do đó là phương thức có nhiều tiềm năng trong chẩn đoán ung thư hoặc sản xuất các dược phẩm đích cho nó.

5. Môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú

Nhu cầu dinh dưỡng của các tế bào động vật có vú lớn hơn vì sinh vật do, không giống các vi sinh vật, động vật không trao đổi chất nitrogen vô cơ. Vì thế, nhiều amino acid và vitamin cần phải được bổ sung vào môi trường. Môi trường đặc trưng dùng trong nuôi cấy tế bào động vật bao gồm các amino acid, các vitamin, các hormone, các nhân tố sinh trưởng, muối khoáng và glucose. Ngoài ra, môi trường cần được cung cấp từ 2-20% (theo thể tích) huyết thanh của động vật có vú. Mặc dù huyết thanh có thành phần chưa được xác định đầy đủ, nhưng nhiều nghiên cứu đã cho thấy nó rất cần

thiết cho sự phát triển và tồn tại của tế bào trong nuôi cấy. Bảng 5.3 trình bày thành phần và hàm lượng của các chất trong môi trường Eagle (Eagle 1959), đây là một trong những môi trường được sử dụng phổ biến.

Bảng 5.3. Thành phần môi trường Eagle (1959)

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. L-Amino acid</i>		<i>3. Vitamin</i>	
Arginine	105	Choline	1
Cystine	24	Folic acid	1
Glutamine	292	Inositol	2
Histidine	31	Nicotinamide	1
Isoleucine	52	Pantothenate	1
Leucine	52	Pyridoxal	1
Lysine	58	Riboflavin	0,1
Methionine	15	Thiamine	1
Phenylalanine	32		
Threonine	48	<i>4. Muối</i>	
Tryptophan	10	NaCl	6800
Tyrosine	36	KCl	400
Valine	46	CaCl ₂	200
		MgCl ₂ .6H ₂ O	200
<i>2. Carbohydrate</i>		NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	150
Glucose	1000	NaHCO ₃	2000
Serum	5-10%		

Huyết thanh dùng trong môi trường nuôi cấy không chỉ đắt tiền mà còn là nguồn nhiễm bẩn virus và mycoplasma. Do bản chất hóa học của huyết thanh chưa được xác định đầy đủ nên trong một số trường hợp có thể ảnh hưởng xấu đến kết quả nuôi cấy. Sự hiện diện của nhiều protein khác

nhau trong huyết thanh cũng có thể làm phức tạp các quá trình phân tách và tinh sạch đầu ra (downstream processing). Vì lý do đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xây dựng công thức môi trường không có huyết thanh. Những công thức này chứa các hormone và các nhân tố sinh trưởng được tinh sạch để thay thế cho huyết thanh.

6. Nuôi cấy tế bào động vật có vú trên quy mô lớn

6.1. Các điều kiện chung

Hệ thống lên men (fermenter) đã được sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn và nấm men từ rất lâu. Đầu tiên, sự lên men (fermentation) là thuật ngữ dùng cho sản xuất ethanol. Sau đó, các nhà vi sinh vật học ứng dụng các nguyên tắc trên để tách chiết các vitamin, các acid hữu cơ và các kháng sinh... Kết quả dẫn đến sự phát triển nhanh chóng các phương pháp và các hệ thống lên men khác nhau.

Các nguyên lý tương tự sau đó được ứng dụng cho nuôi cấy sinh khối tế bào động vật và thực vật. Tuy nhiên, nuôi cấy các tế bào động vật và thực vật khó khăn hơn nhiều so với vi sinh vật, cái chính là do quá trình trao đổi chất trong các loại tế bào này diễn ra chậm, điều này cũng phản ánh tốc độ sinh trưởng chậm của tế bào. Các tế bào động vật có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp hơn so với vi khuẩn và nấm men, chúng không có thành tế bào như vi khuẩn vì thế chúng rất dễ biến dạng và vỡ. Do đó, các hệ thống khuấy và sục khí được thiết kế khác với nuôi cấy vi khuẩn. Mật độ tế bào thấp sẽ cho nồng độ sản phẩm thấp. Mặc dù có một số điểm không thuận lợi, nhưng hệ thống lên men đã được sử dụng để nuôi cấy tế bào động vật ít nhất cũng đã vài chục năm (Hình 5.1). Các dòng tế bào khác nhau như BHK-21, LS, các tế bào Namalwa... đã được sinh trưởng trong hệ lên men theo phương thức nuôi cấy chìm ngập trong môi trường để sản xuất các viral vaccine và các sản phẩm khác.

- Đặc điểm dễ biến dạng và dễ vỡ của tế bào động vật đã được khắc phục bằng cách:

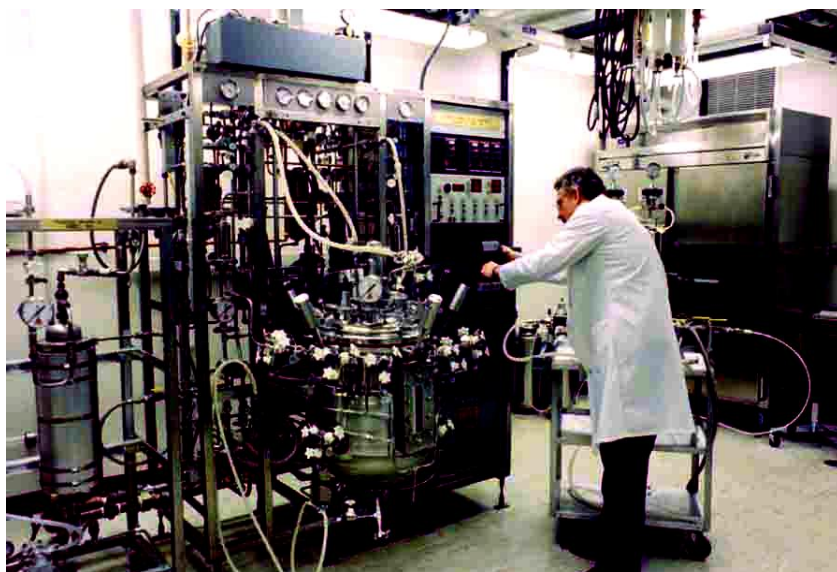
+ Sử dụng hệ lên men có cánh khuấy hình mái chèo.

+ Cung cấp khí trực tiếp có thể tạo ra bọt khí dễ làm vỡ tế bào, vì thế cần cung cấp khí bằng cách khuếch tán thông qua ống silicone.

+ Môi trường chứa nhiều protein huyết thanh có khả năng gây ra hiện tượng tạo bọt nên cần khuấy chậm và nhẹ. Đối với nuôi cấy mật độ cao, cần cung cấp thêm oxygen. Phương pháp dùng ống silicone để sục khí có nhiều ưu điểm do không tạo ra bọt khí và tốc độ truyền oxygen là thỏa đáng. Tuy nhiên, khúc lượn của tube dễ vỡ, đây là khó khăn và hạn chế đối với các hệ lên men quy mô nhỏ dùng trong phòng thí nghiệm.

- Như vậy, các hệ lên men vi sinh vật được cải tiến thích hợp có thể dùng để nuôi cấy sinh khối các tế bào động vật sinh trưởng trong dịch huyền phù.

- Nếu muốn nuôi cấy một dòng tế bào dính bám thì nên dùng một hệ thống chất mang như là microcarrier.



Hình 5.1. Nuôi cấy tế bào động vật trong hệ lên men 50 L

6.2. Nuôi cấy mẻ

Trong nuôi cấy mẻ (batch culture), các tế bào cấy gây (các tế bào được tiếp vào-inoculum cells) được bổ sung vào thể tích tổng số của môi trường nuôi cấy (Hình 5.2). Tế bào sẽ sử dụng hết chất dinh dưỡng trong môi trường và tiết ra các sản phẩm phụ (by-product) trong suốt quá trình

sinh trưởng. Sự sinh trưởng chỉ dừng lại khi cơ chất bị sử dụng hết hoặc sản phẩm phụ đã đạt đến một nồng độ có thể ức chế tế bào. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp nguyên nhân làm ngừng sinh trưởng tế bào vẫn chưa được làm rõ.

- **Nuôi cấy tế bào động vật ở quy mô phòng thí nghiệm.** Các tế bào động vật có vú được duy trì bằng cách cấy chuyển với một số lượng ổn định trong các chai bệt bằng nhựa có đáy nông (được gọi là T-flask hoặc Roux-bottle) chứa từ 10-100 mL môi trường (Hình 5.3):

+ Các tế bào dính bám sẽ gắn vào đáy chai, và những lần cấy chuyển sau phải dùng trypsin (một loại protease hòa tan được các protein bắc cầu) để tách rời tế bào.

+ Các tế bào dịch huyền phù gắn lỏng lẻo hơn tế bào dính bám và có thể lấy ra bằng cách lắc bình nuôi cấy. Cần lưu ý là lượng mẫu đưa vào không được quá ít, mật độ thường được sử dụng là khoảng 2×10^5 tế bào/mL hoặc hơn cùng với một ít môi trường đã gần hết chất dinh dưỡng của lần nuôi cấy trước đó (spent medium), trong môi trường này có thể chứa các nhân tố chưa biết có tác dụng kích thích sinh trưởng tế bào. Trong một số trường hợp khác, môi trường đã sử dụng gần hết chất dinh dưỡng phải được loại bỏ bằng cách ly tâm để tránh các sản phẩm phụ gây ức chế có mặt trong môi trường.

- **Nuôi cấy tế bào động vật có vú ở quy mô lớn.** Thể tích môi trường thường sử dụng là khoảng 200 L, thể tích này đáp ứng được yêu cầu sản xuất cho các protein trị liệu có giá trị cao. Nhưng dù vậy, quá trình nuôi cấy vẫn đòi hỏi một số bước trung gian, bước đầu tiên chuyển tế bào từ nuôi cấy tĩnh tới bình nuôi có lắc hoặc bình nuôi xoay (spinner flask) (Hình 5.3). Bình nuôi xoay, có trang bị cánh khuấy từ tính treo xuống từ nắp bình mà không tiếp xúc với đáy, được phát triển đầu tiên để tạo ra sự khuấy trộn nhẹ cho nuôi cấy microcarrier, nhưng hiện nay cũng được dùng cho nuôi cấy dịch huyền phù. Hệ số độ chia (scale-up factor) từ nuôi cấy tĩnh, hoặc các bình lắc không điều chỉnh pH, thường nhỏ hơn 5, nghĩa là một thể tích cấy gây ít nhất là 20% phải được dùng. Trong hệ lên men, nơi có mật độ tế bào cao hơn, thì hệ số độ chia có thể lên tới 10 (nghĩa là cấy gây 10% v/v hoặc ít hơn).

Một nuôi cấy mẻ đặc trưng, chẳng hạn nuôi cấy tế bào hybridoma trong hệ lên men, kéo dài từ 3-5 ngày đạt tới mật độ tế bào là $2-5 \times 10^6$ tế

bào/mL. Tốc độ sinh trưởng cực đại đặc trưng (μ) của các tế bào hybridoma và myeloma khoảng 0,05/giờ. Lượng kháng thể đơn dòng được sản xuất trong nuôi cấy mẻ của tế bào hybridoma nằm trong khoảng từ 10-100 mg /L. Ở quy mô lớn, sản xuất mẻ của kháng thể đơn dòng được tiến hành ở hệ lên men thùng khuấy loại 1 m³, trong đó mật độ tế bào lên tới 5×10^6 tế bào/mL thu được sau 3,5 ngày. Sản xuất thương mại đầu tiên với các tế bào dính bám được thực hiện trong chai quay (Hình 5.2). Các chai quay được giữ trong một chuyển động không đổi bằng cách quay tròn và các tế bào dính bám sinh trưởng trên bề mặt chai. Một bề mặt đặc trưng từ 750-1.500 cm² với 200-500 mL môi trường sẽ cho sản lượng $1-2 \times 10^8$ tế bào. Một diện tích bề mặt lớn hơn có thể thu được bằng cách dùng microcarrier trong các hệ lên men thùng khuấy.

6.3. Nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng

Nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng (fed-batch culture), trong một nghĩa chính xác, được điều khiển cùng một phương thức như nuôi cấy thể ổn định hóa tính (chemostat culture), nghĩa là tốc độ sinh trưởng tế bào bị hạn chế bởi tốc độ pha loãng và cơ chất giới hạn sự sinh trưởng. Lý do để sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng (được giới hạn cơ chất) là vì sự giới hạn O₂ và chuyển hóa bài tiết quá mức bị ngăn cản trong quá trình nuôi cấy, kết quả là mật độ tế bào cao hơn nhiều so với nuôi cấy mẻ. Mặc dù nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng (được giới hạn glucose và glutamine) cũng giải quyết được vấn đề chuyển hóa bài tiết quá mức trong tế bào động vật có vú, nhưng nó không đủ để làm tăng mật độ tế bào lên một cách đáng kể. Bằng cách cung cấp một hỗn hợp cân bằng các chất dinh dưỡng, mật độ tế bào và nồng độ sản phẩm cũng được cải thiện hơn 10 lần so với nuôi cấy mẻ. Nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng có thể kéo dài ít nhất tới một tháng, các quá trình nuôi cấy ở quy mô 15 m³ đã được khảo sát và mật độ tế bào trong khoảng $1-1,4 \times 10^7$ tế bào sinh trưởng/mL cũng đã được thông báo.

6.4. Nuôi cấy thể ổn định hóa tính

Nuôi cấy chemostat là kiểu nuôi cấy có sự bổ sung liên tục môi trường sạch và sự chảy ra của chất lỏng nuôi cấy, đồng thời giữ thể tích nuôi cấy không đổi (Hình 5.2). Trong nuôi cấy vi sinh vật ở trạng thái ổn định

(steady-state), mối quan hệ giữa tốc độ pha loãng (D) và tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ) được biểu diễn bằng đẳng thức $\mu = D$. Tuy nhiên, trong nuôi cấy tế bào động vật có vú, sự sinh trưởng của nuôi cấy cần phải được tính toán. Sự sinh sản của tế bào không chỉ thay thế sự hao hụt các tế bào sống sót (đang sinh trưởng) bị cuốn theo dòng chảy ra, mà còn thay thế cho các tế bào bị chết trong quá trình nuôi cấy. Do đó, có thể mô tả trạng thái ổn định cho tốc độ sinh trưởng như sau:

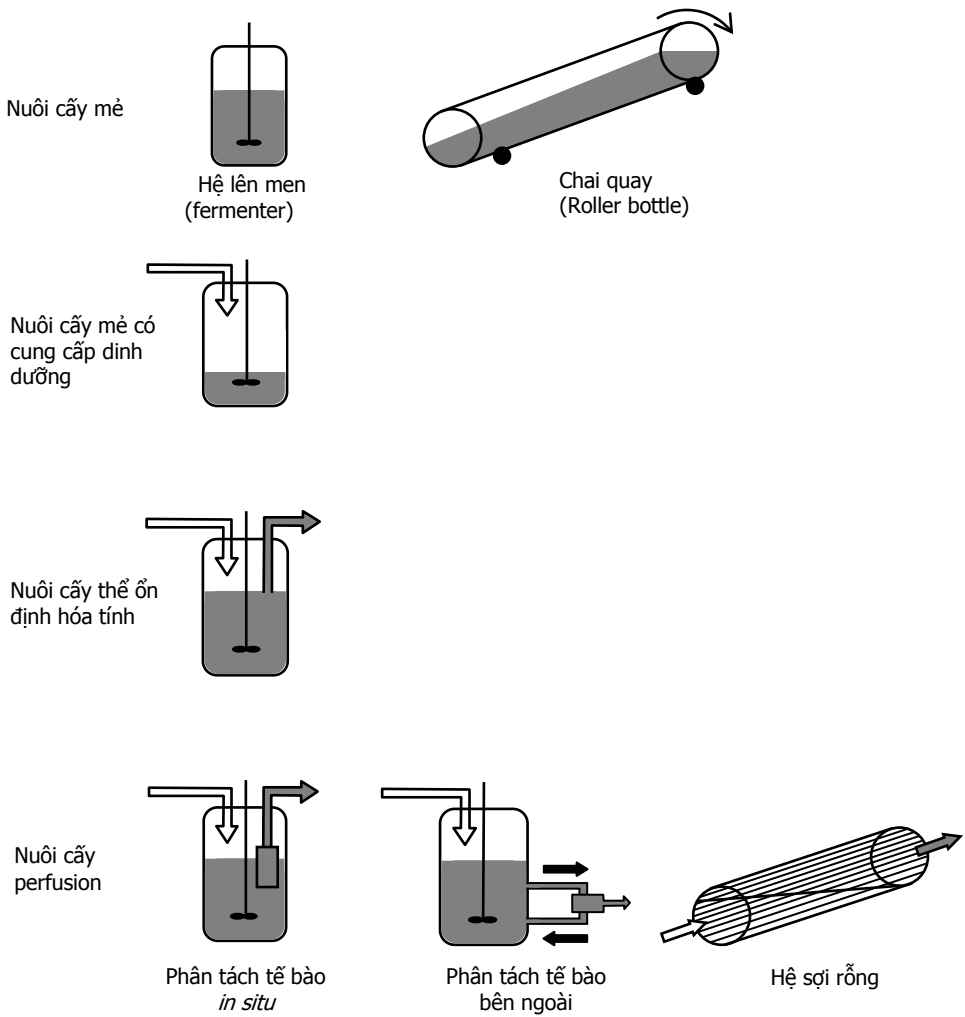
$$\mu = D \left(\frac{N_t}{N_v} \times N_v^{-1} \right)$$

Trong đó: N_t là nồng độ tế bào tổng số (tế bào chết cộng với tế bào sống sót) và N_v là nồng độ tế bào sống sót. Từ quan hệ này cho thấy rằng μ lớn hơn D khi hiện tượng chết tế bào xuất hiện trong hệ thống.

Trong nuôi cấy tế bào động vật có vú, môi trường chứa nhiều nguồn carbon và nitrogen, do đó dễ thiết lập sự sinh trưởng trạng thái ổn định được giới hạn bởi một chất dinh dưỡng là khó khăn. Mặc dù, một trong các nguồn năng lượng (glucose hoặc glutamine) có thể giới hạn hiệu suất sinh khối trong nuôi cấy trạng thái ổn định, nhưng tốc độ tiêu thụ các chất dinh dưỡng khác có thể phụ thuộc vào mức độ cung cấp nguồn năng lượng, hoặc vào nồng độ của một chất dinh dưỡng riêng rẽ.

Nhiều hướng nghiên cứu tập trung tối ưu môi trường và sinh lý học của tế bào động vật có vú, chẳng hạn như ảnh hưởng của μ lên sự tạo thành sản phẩm và ảnh hưởng của nồng độ O_2 hòa tan, pH, nồng độ glucose và glutamine, nồng độ các vitamin và amino acid lên sinh trưởng và tạo thành sản phẩm, đã được khảo sát bằng cách dùng hệ nuôi cấy chemostat. Các quá trình sản xuất chemostat với reactor (bình nuôi) có thể tích lên tới 2 m^3 cũng đã được khảo sát.

Nuôi cấy chemostat cho các mục đích sản xuất có một vài nhược điểm. Thời gian nuôi cấy dài ngày (ít nhất là năm tuần) đã tăng đáng kể nguy cơ nhiễm bẩn, và thời gian cần thiết để tái thiết lập một nuôi cấy trạng thái ổn định sau khi sự nhiễm bẩn xuất hiện lâu hơn việc tái khởi động các quá trình nuôi cấy mẻ hoặc mẻ có cung cấp chất dinh dưỡng. Hơn nữa, giá trị của một quá trình sản xuất dựa trên nuôi cấy liên tục muốn được thừa nhận phải chứng minh được rằng dòng tế bào đang sử dụng là ổn định trong thời gian nuôi cấy.



Hình 5.2. Các phương pháp nuôi cấy tế bào động vật có vú. Các mũi tên trắng chỉ dòng chảy môi trường, mũi tên đen dày chỉ dòng chảy của dịch nuôi cấy có sinh khối, mũi tên xám nhạt chỉ dịch nuôi cấy đã tách sinh khối ra.

6.5. Nuôi cấy perfusion

Trong nuôi cấy perfusion, sinh khối được tích lũy khi tế bào được giữ lại trong reactor nhờ bộ phận thu hồi, trong khi môi trường sạch được đưa vào và môi trường đã hao hụt chất dinh dưỡng bị loại bỏ. Theo cách này, mật độ tế bào lên tới 3×10^7 tế bào/mL và có thể đạt được nồng độ sản phẩm cao hơn trong nuôi cấy mẻ. Các bộ phận phân tách tế bào từ dịch lỏng nuôi

cây có thể được đặt bên trong hoặc bên ngoài reactor (Hình 5.2). Một vài hệ thống perfusion có thể được phân biệt, dựa trên phương pháp phân tách tế bào và môi trường:

- Bộ lọc xoay (spin-filter) sử dụng buồng quay có lưới kim loại (đường kính lỗ 5-75 μm). Nhược điểm của spin-filter là dễ làm tắc nghẽn, dẫn đến giảm tốc độ dòng chảy môi trường qua hệ lọc và cuối cùng bịt kín tất cả các lỗ của màng lọc.



A



B

Hình 5.3. Các loại bình nuôi cấy tế bào động vật. (A) Bình T-flask. (B) Bình spinner loại 0,5 L.

- Một chọn lựa khác là hệ lọc sợi rỗng (hollow fibre) có thể được dùng để phân tách tế bào từ dịch lỏng nuôi cấy. Việc làm tắc nghẽn hệ lọc cũng có thể xuất hiện nhưng có thể khắc phục bằng cách dùng tia nước ngược. Các thiết bị lắng để thu sinh khối cũng đã được phát triển trong trường hợp phân tách tế bào từ dịch lỏng nuôi cấy có mật độ cao.

- Một thiết bị đặc biệt dùng trọng lực hấp dẫn để giữ tế bào trong reactor là hệ lọc âm thanh (acoustic filter). Hệ thống này dùng sóng âm thanh tĩnh để tập trung các tế bào trong dòng chảy. Các tế bào tích lũy trong các giao điểm (node) của sóng và lắng ngược xuống đáy chất lỏng trong nuôi cấy, ngược lại với dòng chảy lên (up-flowing effluent stream). Sau cùng, sử dụng phương pháp ly tâm để thu hồi tế bào cho các quá trình sản xuất ở quy mô lớn.

Các hệ thống nuôi cấy sợi rỗng có thể được xem là một loại đặc biệt của nuôi cấy perfusion trong đó tế bào được phân tách vật lý khỏi dòng chảy môi trường (Hình 5.2). Các tế bào được sinh trưởng trong một khối không

gian siêu mao dẫn (extra capillary space), trong đó môi trường sạch được cung cấp thông qua một số lượng lớn các sợi rỗng của màng (sự chuyển khối). Có thể đạt tới mật độ 10^8 tế bào/mL trong không gian siêu mao dẫn và môi trường dòng chảy trong không gian này chứa một nồng độ cao của sản phẩm. Tuy nhiên, khi nồng độ các chất dinh dưỡng tăng dần và sản phẩm được tạo thành trên khắp các sợi sẽ giới hạn khả năng của các khối sợi rỗng được thiết kế cho các bình nuôi (reactor) quy mô sản xuất lớn. Mặc dù vậy, các khối sợi rỗng vẫn dễ dàng sử dụng và được ứng dụng thành công trong các quá trình sản xuất thương mại.

6.6. Số lượng và chất lượng sản phẩm

Một sản phẩm được tinh sạch từ nuôi cấy tế bào động vật có vú không thể có 100% hoạt tính sinh học mà tùy thuộc vào những biến đổi trong kiểu glycosylation hoặc sự phân giải protein. Hai thông số này chịu ảnh hưởng bởi các điều kiện môi trường. Phương thức glycosyl hóa trong phản ứng phụ thuộc vào nhiều nhân tố như kiểu nuôi cấy, pha sinh trưởng của nuôi cấy mẹ, tế bào được sinh trưởng trong các microcarrier hoặc trong dịch huyền phù, nồng độ glucose, nồng độ ammonium, hiệu quả của các hormone trong môi trường, sự hiện diện của huyết thanh, hàm lượng của protein và lipid trong môi trường, pH, và nồng độ O_2 hòa tan. Vì vậy, việc chọn lựa các điều kiện sinh lý thích hợp trong một quá trình sản xuất là rất quan trọng để có được sự glycosyl hóa chính xác của một protein được phẩm.

Không những chất lượng của các sản phẩm mà hiệu suất toàn phần của nuôi cấy tế bào động vật có vú cũng chịu ảnh hưởng của nhiều thông số như pH, nồng độ các ion ammonia/ammonium và lactate, nồng độ huyết thanh, phương pháp nuôi cấy, tuổi tế bào nuôi cấy, lượng mẫu cấy gây và thành phần môi trường. Do sự phức tạp của sinh lý tế bào động vật có vú, nên sự phối hợp giữa các môi trường và phương pháp nuôi cấy khác nhau thường phải được sử dụng, và nếu tách riêng ảnh hưởng của từng nhân tố đặc trưng sẽ gặp nhiều khó khăn. Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng vẫn là thông số chính ảnh hưởng rõ rệt lên hiệu suất đặc trưng của sản phẩm ở tế bào động vật có vú.

Hiệu suất đặc trưng cũng có thể được cải thiện bởi các hợp chất không phải là thành phần bình thường của môi trường nuôi cấy tế bào. Nuôi cấy một số dòng tế bào động vật có vú cho thấy chúng có hiệu suất đặc trưng

cao hơn trong môi trường mà ở đó áp lực thẩm thấu được tăng lên từ mức bình thường là 330 mosmol tới hơn 400 mosmol. Mặc dù chưa hiểu được đầy đủ, nhưng người ta nhận thấy ảnh hưởng này phụ thuộc vào dòng tế bào và môi trường cơ bản được sử dụng.

Số lượng sản phẩm được sản xuất trong quá trình nuôi cấy có thể biểu diễn bằng phần trăm của lượng protein tổng số được sản xuất. Trong một số trường hợp, khi tốc độ sinh trưởng tăng lên thì phần trăm của sản phẩm sẽ giảm xuống một lượng đáng kể (tỷ lệ nghịch). Ví dụ: tốc độ sản xuất đặc trưng của protein trong dòng tế bào hybridoma đã được thông báo là $1,5 \text{ mg}/10^9 \text{ tế bào} \times \text{giờ}$ ở tốc độ sinh trưởng đặc trưng $0,02/\text{giờ}$. Lượng sản phẩm được sản xuất tương ứng với 28% protein tổng số. Nhưng ở một dòng tế bào tương tự có tốc độ sản xuất đặc trưng thấp hơn nhiều ($0,2 \text{ mg}/10^9 \text{ tế bào} \times \text{giờ}$) ở tốc độ sinh trưởng $0,058/\text{giờ}$, thì lượng sản phẩm chỉ chiếm 1% của protein tổng số. Trong một số trường hợp khác, ở dòng tế bào myeloma sản xuất kháng thể tái tổ hợp thì phần trăm của protein sản phẩm tăng lên từ 18%-29% quan sát được khi tốc độ sinh trưởng tăng lên từ $0,016/\text{giờ}$ đến $0,042/\text{giờ}$ (tỷ lệ thuận).

Nuôi cấy tế bào động vật có vú thành công nhất (nồng độ và hiệu suất) là để sản xuất kháng thể đơn dòng với các tế bào hybridoma hoặc myeloma. Như đã trình bày ở trên, tiềm năng sản xuất của các tế bào động vật có vú là không giới hạn, nhưng điều được quan tâm hơn cả đó là nồng độ sinh khối có thể đạt được. Để đáp ứng yêu cầu này, nuôi cấy mẻ có cung cấp chất dinh dưỡng và reactor sợi rỗng (hollow fibre reactor) đã được sử dụng để hướng tới các nuôi cấy có mật độ tế bào cao của hybridoma và myeloma. Sự giới hạn glucose và glutamine được phối hợp với việc cung cấp amino acid và huyết thanh, cho kết quả là nồng độ tế bào tổng số xấp xỉ $5 \times 10^7 \text{ tế bào/mL}$ (trong đó ít hơn một nửa là sống sót) sau hơn 550 giờ, và nồng độ cuối cùng của kháng thể là $2,4 \text{ g/L}$, với sản lượng $0,1 \text{ g/L} \times \text{ngày}$. Sản xuất thương mại các kháng thể đơn dòng trong các reactor sợi rỗng có thể cho sản lượng khoảng $700 \text{ g sản phẩm/tháng}$ (khoảng 2 g/L). Mỗi lần nuôi cấy kéo dài khoảng ba tháng nhưng lần nuôi cấy đầu tiên là không sản xuất do thời gian này được yêu cầu cho việc xây dựng sinh khối trong không gian siêu mao dẫn. Hiệu suất trong hệ thống này là $0,3 \text{ g/L} \times \text{ngày}$ trong suốt thời gian thu hoạch.

III. Công nghệ di truyền của các tế bào động vật có vú

Chuyển nạp và biểu hiện DNA ngoại lai trong tế bào eukaryote nuôi cấy *in vitro* được bắt đầu cách đây hơn 30 năm. Phương pháp chuyển nhiễm đã mở đầu cho một chuỗi đa dạng và phức tạp của các kỹ thuật chuyển gen. Hầu như đồng thời với sự phát triển các quy trình chuyển nạp là việc khám phá ra enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) từ đó có thể tạo ra các bản sao DNA bổ sung (cDNA) của mọi mRNA. Sự phát hiện enzyme cắt hạn chế đã mở ra kỷ nguyên của công nghệ DNA tái tổ hợp. Nhìn chung, việc phát triển các kỹ thuật thao tác DNA để tạo ra công nghệ di truyền thực vật, động vật và liệu pháp gen ở người đã trở thành hiện thực. Các kỹ thuật hiện đại đã cải thiện hiệu quả chuyển DNA, tăng sự đa dạng của vector để điều hòa và tạo thuận lợi cho biểu hiện của gen trong một phạm vi rộng các loại tế bào đích (target cell).

Chuyển gen được định nghĩa như là việc đưa DNA bên ngoài vào genome, sao cho nó ổn định và duy trì cùng với di truyền của vật chủ. Hơn 15 năm qua, việc chuyển gen vào genome của động vật có vú đã trở thành một công cụ thực nghiệm được làm đều đặn và đang tăng tầm quan trọng trong công nghiệp công nghệ sinh học. Thông thường, DNA ngoại lai được đưa vào trong phôi một tế bào bằng phương pháp vi tiêm và các phôi sống sót sau đó được cấy vào con cái thụ tinh giả và cho phép phát triển tới kỳ hạn. Trong một số phôi được cung cấp, DNA đã hợp nhất trong genome trước khi phân chia tế bào lần thứ nhất, thể chuyển gen sẽ được chuyển qua những lần sinh sản tiếp theo thông qua phôi.

Các kỹ thuật chuyển gen có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nghiên cứu. Ở mức độ phân tử chúng cho phép xác nhận các trình tự *cis-acting* DNA quan trọng trong sự biểu hiện gen đặc trưng mô và/hoặc phát triển định hướng, và thao tác đặc biệt của sự biểu hiện gen *in vivo*. Với sự ra đời của kỹ thuật tế bào mầm phôi (embryo stem-ES), và sự phát triển các phương pháp giúp đạt được sự tái tổ hợp tương đồng, các nghiên cứu hiện nay có khả năng tìm hiểu về chức năng của một gen đặc biệt và xác định chắc chắn các ảnh hưởng *in vitro* của những biến đổi đặc biệt đến chức năng gen. Sự đổi mới này có nhiều gợi ý quan trọng cho nhiều lĩnh vực nghiên cứu sinh-y bao gồm thiết kế các mô hình bệnh, sử dụng mẹ như là các hệ lên men cho việc sản xuất các protein trị liệu ở người và, cuối cùng, sửa chữa những sai sót bẩm sinh của sự chuyển hóa bởi gen đích.

1. Các phương pháp chuyển gen

Có nhiều phương pháp thích hợp để chuyển DNA ngoại lai vào trong các tế bào eukaryote, chẳng hạn như: chuyển nhiễm (hóa biến nạp) bằng calcium phosphate hoặc diethylaminoethyl-dextran (DEAE-dextran), xung điện, lipofection, liposome, viral vector (kể cả các tiểu phần phage), vi tiêm, bắn gen (vi đạn)...

Chọn phương pháp chuyển gen phụ thuộc vào mức độ biểu hiện được mong đợi, biểu hiện trong thời gian ngắn hoặc biểu hiện ổn định; loại tế bào đích, như tế bào dịch huyền phù hoặc tế bào dính bám, các dòng tế bào đã thích nghi hoặc phân hóa. Mỗi phương pháp đều đòi hỏi sự tối ưu cao, bao gồm các yếu tố như: số lượng tế bào, nồng độ DNA, các vector biểu hiện. Tổng quan tóm tắt một số phương pháp chuyển gen thông dụng dưới đây để mô tả kỹ thuật cơ bản, hiệu quả biểu hiện gen, và các cải tiến gần đây minh họa cho các ứng dụng lâm sàng.

1.1. Phương pháp chuyển nhiễm (transfection)

Dùng calcium phosphate kết tủa DNA, có phạm vi hiệu quả từ $1-10^4$ khuẩn lạc/ 10^6 tế bào/ μg DNA. Sự hợp nhất của DNA ngoại lai trong DNA tế bào mang tính ngẫu nhiên. DNA được chuyển nhiễm thường tái tổ hợp trước khi hợp nhất làm cho thể hội nhập mang nhiều bản sao DNA trong tế bào. Hiệu quả chuyển nạp có thể tăng ở một vài dòng tế bào được xử lý dimethyl sulfoxide (DMSO) hoặc glycerol trong một thời gian ngắn (4-6 giờ) sau khi chuyển nhiễm. Xử lý sốc sau chuyển nhiễm bằng chloroquindiphosphate gây độc cao. Mức độ độc thay đổi giữa các dòng tế bào, đặc biệt các tế bào nuôi cấy dịch huyền phù và các tế bào phân hóa ở giai đoạn cuối. Khi thay đổi calcium phosphate bằng DEAE-dextran thì chuyển nhiễm DNA có thể ít độc hơn với mọi xử lý sốc sau chuyển nhiễm ở tế bào nuôi cấy dịch huyền phù và tế bào phân hóa.

1.2. Phương pháp lipofection

Sử dụng các lipid trung tính hoặc mang cation để tạo thành các liposome. Phức lipid hợp nhất với màng huyết tương sẽ phóng thích DNA dính bám vào trong phần bào tan (cytosol). Phương pháp này cho hiệu suất chuyển nạp cao hơn chuyển nhiễm bằng DEAE-dextran hoặc calcium

phosphate. Tính đồng nhất của thành phần lipid giữa màng tế bào vật chủ và lipofectant làm tăng hiệu quả dung hợp và tăng khả năng xâm nhập của DNA gắn kèm. Các liposome mang cation (lipofectin) thích hợp cho chuyển nạp gen *in vitro* với hiệu suất trên 90% ở một số loại tế bào nuôi cấy. Lipofectin được sử dụng để bọc các virus. Việc tạo ra các liposome chứa protein virus trong lớp lipid đã cải thiện hiệu quả của vector với các tế bào đặc biệt như tế bào gan (liver hepatocytes). Chỉ có một số phương pháp thích hợp để chuyển DNA qua màng huyết tương bằng thực ẩm bào (endocytosis) và đẩy mạnh các quá trình nội thể gây thoái biến và sắp xếp lại DNA. Liposome được dùng để phân phối *in vivo* và *ex vivo* các gen người tới tế bào đích thích hợp.

1.3. Phương pháp xung điện (electroporation)

- Phương pháp này cũng được sử dụng cho chuyển gen ở thực vật. Tuy nhiên, tế bào thực vật phải được phá vỡ thành cellulose mới cho hiệu suất chuyển nạp cao.

- Yêu cầu nghiêm ngặt các thông số của thiết bị tạo xung điện (Hình 5.4) liên quan đến hiệu suất xâm nhập của DNA. Dòng điện được sử dụng để tạo ra các tế bào treo trong dung dịch DNA các lỗ thủng trên màng huyết tương và qua đó DNA theo gradient mật độ chui vào trong phần bào tan. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy dịch huyền phù lymphocyte (lympho bào).

- Chuyển nạp gen bằng xung điện có khuynh hướng tạo ra các thể hội nhập mang bản sao DNA đơn và thường được sử dụng để chuyển gen vào các tế bào mầm phôi. Việc chuyển nạp gen thông qua điện trường ở các tế bào máu (hematopoietic cells) và các thể hệ tổ tiên của chúng là phương thức thích hợp cho các viral vector cần hệ thống đóng gói phức tạp.

- Các tế bào tủy xương tiền thân (bone marrow progenitor cells) được nuôi trong môi trường có cytokine, interleukin-3 sẽ tăng tần số chuyển nhiễm và biểu hiện gen ở các tế bào tạo bạch cầu hạt (granulopoietic) và tế bào hồng cầu tiền thân (erythroid). Các gen chọn lọc trội như là pSVNeo ghi mã cho các gen của prokaryote, neomycin phosphatransferase (*neo*) mang trình tự khởi động (promoter) và trình tự tăng cường (enhancer) của Simian Virus 40 (SV40), cho phép phân lập các tế bào kháng neomycin bằng cách dùng một dạng đồng đẳng của neomycin, G418, trong môi trường bổ sung.

Chuyển nạp gen pSVNeo bằng xung điện vào trong tế bào mầm tủy xương cho kết quả tốt, và có thể ứng dụng để chuyển nạp cDNA của yếu tố đông máu (factor IX) vào trong tế bào đệm (stromal cells) nguồn gốc tủy xương.



Hình 5.4. Hệ thống chuyển gen bằng xung điện

1.4. Phương pháp vi tiêm (microinjection)

- Đây là phương pháp chuyển DNA trực tiếp nhất và có hiệu quả cao. Tuy nhiên, số lượng tế bào thí nghiệm giới hạn chỉ trong vài trăm. Kỹ thuật tinh xảo và thiết bị đắt tiền của vi tiêm (Hình 5.5 và 5.6) đã hạn chế việc sử dụng rộng rãi phương pháp này. Tiến bộ lớn nhất của phương pháp vi tiêm là khả năng giám sát biểu hiện của DNA ngoại lai ở các tế bào riêng rẽ.

- Hơn nữa, trong khi chuyển nhiễm và chuyển gen bằng xung điện có thể vô cùng độc thì vi tiêm phân phối DNA trực tiếp vào trong nhân tế bào mà không gây nguy hiểm đến sự nguyên vẹn của màng tế bào. Để giảm độc tính tới mức tối thiểu, thể tích DNA phải được hạn chế nhỏ hơn 10% thể tích nhân.

- Đặc trưng của vi tiêm là cung cấp phương thức để tạo ra các động vật được chuyển gen, đánh giá biểu hiện gen được tạo dòng trong các tế bào phôi, cung cấp phương pháp trực tiếp để tạo các đột biến thêm đoạn (insertional mutants), xác định các nhân tố điều hòa biểu hiện gen đặc trưng mô và đặc trưng tế bào, và phân lập các dòng provirus (các virus DNA được

hợp nhất trong DNA nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ) nguyên vẹn của các retrovirus (các virus mang RNA sợi đơn được tái bản thông qua DNA sợi đôi trung gian) để tiến hành phân tích bệnh lý học.



Hình 5.5. Thiết bị vi tiêm



Hình 5.6. Vi tiêm DNA vào tế bào

Xác định phương pháp chuyển nạp thích hợp cho các gen ngoại lai đặc trưng là cần thiết để thực hiện liệu pháp sửa chữa gen *in vivo*. Một vài bệnh di truyền xuất hiện do thiếu các gen chức năng hoặc sản phẩm gen, vì vậy thay thế một gen khiếm khuyết bằng một gen bình thường có thể sửa chữa

được khuyết tật và tránh các đột biến tiềm tàng ở các locus ngẫu nhiên. Gen thay thế phải được thiết kế thích hợp để thực hiện tái tổ hợp tương đồng giữa DNA ngoại lai và DNA nội sinh. Tần số tái tổ hợp tương đồng ở locus đích (target locus) trung bình là $1/10^3$ tế bào nếu dùng phương pháp vi tiêm. Ở chuột chuyển gen, gen đặc trưng đã được nghiên cứu để cung cấp một hệ thống mô hình *in vivo* cho phép đánh giá hiệu quả của biện pháp thay thế gen. Mô hình động vật cho hội chứng Lesch-Nyhan tạo thuận lợi để đánh giá các quy trình chuyển nạp gen *in vivo*, cho dù bệnh học của động vật hiếm khi tương tự như ở người.

1.5. Phương pháp dùng súng bắn gen (gene gun)

Sử dụng các hạt kim loại như tungsten hoặc vàng làm vi đạn. Vi đạn được bọc bằng DNA và đi với một vận tốc thích hợp để xâm nhập vào tế bào đích. Hiệu quả của phương pháp này tương đương với phương pháp chuyển nhiễm. Sự biểu hiện thành công của DNA ngoại lai trong tế bào chuột NIH 3T3, tế bào khỉ COS 7 và một dòng đại thực bào (macrophage) đã được thông báo. Súng bắn gen và phương pháp tiêm trực tiếp DNA trần của plasmid bị hạn chế đối với tim và các tế bào cơ xương của động vật. Chỉ có 1-3% tế bào nhận DNA và sản xuất một lượng nhỏ protein được ghi mã. Các phương thức hiện hành hầu hết đều thích hợp cho các mục đích phát triển liệu pháp DNA vaccine trong đó với một lượng nhỏ protein là đủ để tạo ra một phản ứng miễn dịch (xem thêm chương 4).

1.6. Phương pháp dùng các viral vector

Đây là các cấu trúc tái tổ hợp trong đó một hoặc nhiều gen của virus được thay thế bởi DNA tạo dòng. Chuyển nạp gen đặc trưng mô hoặc tế bào được thực hiện bằng cách chọn lọc các điểm thụ cảm của tế bào đặc hiệu virus. Virus mang DNA tái tổ hợp xâm nhiễm vào tế bào đích đặc trưng và phân phối tải trọng di truyền vào trong chúng. Một đặc điểm hấp dẫn của viral vector là điều hòa biểu hiện gen khi có mặt promoter và enhancer của virus. Các viral vector có nguồn gốc từ hầu hết các virus DNA, bao gồm SV40, các virus tạo u dạng nhú (papilloma virus) ở người và bò, nhóm virus DNA của parvoviridae (adeno-associated virus, AAV), adenoviruses (các virus mang DNA sợi đôi), các virus gây bệnh mụn giộp (herpes), và virus bệnh đậu mùa (vaccinia). Kích thước của đoạn chèn (insert DNA) thay đổi

từ 2-3 kb ở các papovavirus tới > 50 kb ở vaccinia. Các viral vector có thể cho phép biểu hiện trong thời gian ngắn và gần như 100% ở điều kiện *in vitro*. DNA của provirus được sản xuất nhờ phiên mã ngược RNA của retrovirus hợp nhất như là một bản sao đơn trong nhiễm sắc thể vật chủ, giảm tới mức tối thiểu sự phiên mã gen. Các viral vector đặc biệt được thiết kế để phân phối DNA ngoại lai vào trong các tế bào phân hóa, các tế bào mầm phôi, các lymphocyte. Mặc dù các retrovirus đã được sử dụng để chuyển gen nhưng cũng có một vài khó khăn do provirus của nó thiếu khả năng hợp nhất vào các tế bào thụ động, bởi vì DNA chỉ hợp nhất khi tế bào trải qua thời kỳ phân bào. Điều này dẫn tới thất bại khi biểu hiện ở mức độ cao các gen chuyển nạp. Để có khả năng tái tổ hợp, kích thước tối đa của insert DNA chỉ khoảng 7 kb.

Chọn lựa một phương pháp chuyển gen thích hợp phụ thuộc vào mục đích thí nghiệm và loại tế bào đích (dính bám hay dịch huyền phù), chúng là những tế bào sơ cấp hay đã thích nghi, đã phân hóa hay có nhiều tiềm năng. Thử nghiệm biểu hiện của DNA chuyển nhiễm có thể là tạm thời (trong thời gian ngắn) hoặc bền vững (ổn định) với các mức độ biểu hiện cơ bản hoặc có thể suy diễn. Các dòng tế bào dính bám dễ thao tác bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau và cho biểu hiện gen thành công sau đó. Khi độc tính của phương pháp chuyển nhiễm loại trừ khả năng biểu hiện gen, thì một trong các phương pháp khác có thể cho phép thiết kế thí nghiệm thành công. Khi phương pháp chuyển nhiễm, xung điện và viral vector thất bại thì phương pháp vi tiêm có thể sẽ thích hợp. Chuyển gen vào các tế bào không dính bám khó thực hiện nhưng sử dụng viral vector và chuyển nhiễm DEAE, cũng như liposome có thể là giải pháp hợp lý. Đối với các tế bào không dính bám thì có thể sử dụng phương pháp vi tiêm để chuyển gen.

Nồng độ DNA dùng trong thí nghiệm chuyển gen thay đổi từ 1 ng đến 10 μg cho 10^5 - 10^6 tế bào nhận. Trong vi tiêm, một vài trăm tế bào được tiêm trực tiếp DNA nồng độ từ 1 pg đến 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tương đương với 1 - 10^2 bản sao của cấu trúc tái tổ hợp. Số lượng bản sao đưa vào trong các tế bào nhận (tế bào vật chủ) tỷ lệ với kích thước của vector, đoạn chèn và nồng độ DNA. Các cấu trúc mạch thẳng hợp nhất thông qua tái tổ hợp cao hơn khoảng 10 lần các cấu trúc mạch vòng. Chuyển nhiễm thông qua liposome trở thành một kỹ thuật phổ biến nhờ độc tính thấp hơn và hiệu quả chuyển nạp cao.

Trong khi phương pháp xung điện đòi hỏi một số lượng lớn DNA (10-40 μ g) và trung bình sẽ giết chết một nửa tế bào nhận.

2. Các điều kiện cần thiết cho biểu hiện gen ngoại lai

Sau sự vận chuyển hiệu quả DNA vào trong nhân của tế bào nhận, biểu hiện của DNA ngoại lai tùy thuộc vào các nhân tố điều hòa: enhancer và promoter trình tự *cis* 5' và các nhân tố phiên mã tác động *trans* (*trans-acting*) của tế bào vật chủ. Promoter và enhancer là các nhân tố có thể được chuyển vào trong vector để điều hòa biểu hiện gen sau khi hợp nhất vào trong DNA tế bào. Hiểu biết cơ chế điều hòa của gen chuyển nạp sẽ chọn được tế bào vật chủ cho phép các nhân tố phiên mã thích hợp hiện diện và hoạt động. Cấu trúc một vector chuyển nạp gen thích hợp bao gồm các nhân tố điều hòa eukaryote và prokaryote cần thiết để thực hiện khuếch đại trong môi trường prokaryote và biểu hiện sản phẩm protein mong đợi trong vật chủ eukaryote.

Sự điều hòa của prokaryote được kết hợp với sự khuếch đại DNA tái tổ hợp trong *E. coli* hoặc các tế bào vật chủ prokaryote khác. Điều kiện tối thiểu là phải có vùng khởi đầu sao chép (*ori*) vi khuẩn, promoter vi khuẩn và gen chỉ thị chọn lọc hoặc sàng lọc để phân lập DNA tái tổ hợp được khuếch đại. Các gen chỉ thị được sử dụng như gen neomycin transferase (*neo*), thymidine kinase (*tk*), xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*xgp^rt*), kháng methotrexate nhờ dihydrofolate reductase (*dhfr*), kháng hygromycin (*hgr*) và kháng tetracycline (*tet*). Các gen chỉ thị là các gen prokaryote được tạo dòng trong các vector biểu hiện ở các eukaryote cho phép thử nghiệm biểu hiện tạm thời của DNA ngoại lai nhưng không phụ thuộc vào môi trường chọn lọc. Các gen chỉ thị là β -galactosidase (β -*gal*), luciferase (*luc*), chloramphenicol acetyl transferase (*cat*) và green fluorescent protein (*gfp*). Các sản phẩm protein của mỗi gen tương ứng là B-GAL, LUC, CAT và GFT.

Nói chung, các promoter eukaryote rất phức tạp, đòi hỏi hai hoặc nhiều trình tự *cis* mà nhân tố phiên mã liên kết thành hàng RNA polymerase II để phiên mã. Các nhân tố promoter tối thiểu bao gồm các lớp protein liên kết DNA thường gặp AP-1 và SP-1 được xem là các nhân tố bảo thủ tìm thấy nhiều trong promoter của eukaryotic virus. Tạo dòng trở lại (subcloning) promoter 5' của virus vào trong các gen mã hóa các sản phẩm

protein chọn lọc sẽ tạo điều kiện cho một số vector biểu hiện. Các promoter của virus hoạt động mạnh trong một số loại tế bào nuôi cấy đặc biệt nhưng lại hoạt động không giống nhau ở các tế bào phân hóa hoặc các tế bào phôi. Nhiều gen eukaryote quan tâm bắt nguồn từ mRNA thông qua phiên mã ngược để sản xuất cDNA không chứa các nhân tố điều hòa. Tạo dòng cDNA vào trong các vector mang promoter mạnh để biểu hiện trong tế bào nhận. Các promoter SV40 và CMV (cytomegalovirus) cũng chứa các enhancer là nhân tố làm tăng hiệu quả của promoter virus trong hầu hết các tế bào eukaryote. Các enhancer có nguồn gốc từ virus có tác dụng tăng hiệu quả phiên mã của promoter.

Vùng khởi đầu sao chép DNA của eukaryote có thể được gắn vào vector để tăng sự sao chép với hàng triệu DNA tế bào. Trong thực tế, tất cả các vùng khởi đầu sao chép DNA của eukaryote có nguồn gốc từ hệ gen của virus. Sự sao chép phụ thuộc vào DNA polymerase và accessory protein của các tế bào cũng như replicase đặc trưng của virus. Để duy trì ổn định DNA ngoại lai đòi hỏi hoặc là DNA được hợp nhất trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc là tồn tại sự hỗ trợ đặc trưng giữa episome và protein tác động từ ngoài (*trans-acting protein*).

Phiên mã eukaryote khởi đầu tại hướng của promoter nhưng lại kết thúc không chính xác. Phức nhân RNA-hnRNA dị hợp (*heterogenous nuclear RNA*) là thể phiên mã sơ cấp ($5' \rightarrow 3'$), một bản sao chính xác của sợi DNA khuôn mẫu ($3' \rightarrow 5'$), và tương đương với sợi mã hóa của DNA ($5' \rightarrow 3'$). Khi có mặt intron, các spliceosome sẽ loại intron ở ranh giới đặc trưng exon-intron gắn cùng với chuỗi mã hóa được biểu hiện của gen trong một khung đọc mở để dịch mã. Các bước của quá trình này là đặc trưng của tế bào eukaryote và không xuất hiện trong các tế bào prokaryote. Sự điều hòa biểu hiện của gen *de novo* trong eukaryote phức tạp hơn sự điều hòa dịch mã và các bước của quá trình sau dịch mã. Sự điều hòa tiếp theo có thể bao gồm khả năng ổn định của mRNA, các tín hiệu chỉ thị (*maker signals*) trong vùng không dịch mã 5' hoặc 3' (UTR) của mRNA, các chuỗi mang bộ ba mã hóa khởi đầu tối ưu... Các hiểu biết ban đầu về cơ chế phức tạp và tinh vi của sự điều hòa gen là cơ sở để chuyển nạp gen thành công ở điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Liệu pháp gen ở người đòi hỏi thông tin chi tiết về gen bẩm sinh và xác định các nhân tố điều hòa để biểu hiện gen thích hợp.

3. Các điều kiện thực nghiệm tối ưu

Các nhân tố cần thiết để tối ưu thực nghiệm bao gồm số lượng tế bào, nồng độ DNA, điều hòa biểu hiện gen trong các tế bào nhận, và chọn lựa các hệ thống phân tích. Có thể xác định đặc trưng điều hòa của gen trong các môi trường tế bào khác nhau bằng cách phân tích biểu hiện tạm thời như CAT, B-GAT, hoặc GFP. Để phân tích biểu hiện ổn định bền vững có thể sử dụng các gen chỉ thị như β -gal, hoặc các gen đánh dấu chọn lọc như *neo*. Chi tiết của mỗi thí nghiệm phân tích được trình bày trong các bộ kit chuẩn và các hướng dẫn căn cứ trong đó để chọn lựa những ưu điểm và nhược điểm của từng phương pháp.

Các plasmid mang gen chỉ thị không chọn lọc như biểu hiện LUC hoặc GFP rất hữu ích khi làm việc trên môi trường không có áp lực chọn lọc. Gen mã hóa GFP (*gfp*) được tạo dòng từ loài sứa phát sáng sinh học (*Aequorea victoria*). Đặc tính hấp dẫn nhất là sự đơn giản của phương pháp phát hiện do chỉ cần kính hiển vi huỳnh quang chuẩn và không cần cơ chất hoặc các cofactor khác. Các phân tích hóa miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang cho phép phát hiện các tế bào nhận bằng mắt thường và quan sát chặt chẽ sự hợp nhất của cấu trúc tế bào. GFP là gen duy nhất trong số các gen chỉ thị có thể phát hiện bằng kính hiển vi huỳnh quang ở các tế bào, có thể theo dõi sự sử dụng và biểu hiện của các protein chỉ thị trong phân chia tế bào ở giai đoạn tiếp theo và phân loại các tế bào biểu hiện bằng cách sử dụng thiết bị sàng lọc các tế bào có hoạt tính phát huỳnh quang.

Gen *gfp* được tạo dòng trở lại trong các retrovirus vector mang đoạn lặp lại tận cùng dài (long terminal repeat-LTR) của virus, các vị trí tạo dòng, và gen kháng *neo* ngược hướng của LTR mang đầu tận cùng 3'. Chuyển các vector GFP vào trong các tế bào COS-7 biểu hiện mức độ huỳnh quang của protein có thể phát hiện trong 24-48 giờ mà không cần cố định. Các retrovirus vector mang GFP cho phép chuyển nhiễm dòng đã được đóng gói và sau 24 giờ các tế bào có thể được phân lập bằng thiết bị phân loại tế bào có phát huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorter-FACS) và tiến hành nuôi cấy. Thiết bị đếm bằng phương pháp nhuộm propidium iodide sẽ phát hiện các tế bào chết và tách chúng ra khỏi tế bào sống biểu hiện GFP trong quá trình phân tích FACS.

4. Đồng chuyển nạp gen chỉ thị và gen thử nghiệm

Chuyển nạp gen bằng cách dùng hai plasmid, một mang DNA quan tâm và một mang gen chỉ thị, như *neo*, β -gal, *luc* hoặc *gfp*, vào trong các tế

bào động vật có vú thường đánh dấu các tế bào biểu hiện DNA ngoại lai. Thí nghiệm đồng chuyển nạp đầu tiên bắt đầu năm 1979 với các gen β -globin và *tk* của herpes virus. Tiếp đó, nhiều quá trình tái tổ hợp gen chọn lọc và không chọn lọc đã được sử dụng bằng nhiều phương pháp chuyển gen và đã thu được nhiều thành công khác nhau. Nếu gen chỉ thị hoặc gen chọn lọc được biểu hiện trong tế bào nhận, thì gen thứ hai (gen quan tâm) cũng sẽ được biểu hiện. Khi gen chọn lọc được sử dụng để phân lập các quần thể tế bào biểu hiện gen đánh dấu trội, thì các tế bào tương tự sẽ được theo dõi cho kiểu hình của gen thứ hai. Chẳng hạn, gen chỉ thị trội pSVneo cho phép chọn lọc các tế bào trên môi trường G418 trong đó gen quan tâm thứ hai có thể được theo dõi cho kiểu hình đặc trưng. Vi tiêm pSVneo vào tế bào NIH3T3 đã sản xuất 35% khuẩn lạc kháng *neo*. Vi tiêm gen *ras* (một loại oncogene) được tạo dòng, có nguồn gốc từ ung thư bàng quang người, thì có từ 10-20% tế bào biểu hiện kiểu hình được chuyển nạp. Vi tiêm các tế bào NIH3T3 với cả hai gen *ras* và *neo* cho phép chọn lọc các tế bào kháng *neo*, trong đó 50% của chúng có kiểu hình oncogene.

Hệ thống chọn lọc kép với hai gen chọn lọc được sử dụng như hygromycin và neomycin, đòi hỏi xác định cẩn thận các điều kiện thí nghiệm. Độc tính kết hợp với sự chọn lọc trong G418 và hygromycin đã giới hạn khả năng sống sót của tế bào, đặc biệt ở các dòng tế bào sơ cấp và phân hóa. Phương pháp vi tiêm mẫn cảm hơn 100 lần so với phương pháp chuyển nhiễm khi chuyển gen *ras* vào các nguyên bào sợi dị bội của người đã được bắt từ bởi kháng nguyên SV40T. Một tế bào, c-rasSVneo-HAL, đã được hình thành bằng kỹ thuật vi tiêm pSV2neoT24 sau khi không thành công với các kỹ thuật lipofection, chuyển nhiễm và xung điện. Tần số biểu hiện *ras* p21 kém hơn 10% trong thử nghiệm tạm thời và 1% cho biểu hiện ổn định.

Vi tiêm trực tiếp vào 100-200 tế bào cho cơ hội quan sát các phản ứng nội bào riêng rẽ tới các đại phân tử. Antisense oligodeoxynucleotide (ODN) và peptide nucleic acid (PNA) cung cấp một phương thức mới cho liệu pháp gen trong tương lai. Đánh giá phản ứng trả lời sợi đối nghĩa (antisense) của gen đích (target gene) được thực hiện bằng cách dùng phương pháp vi tiêm ở hệ thống mô hình. Mô hình xây dựng để phân tích hiệu quả ODN và PNA được thiết kế đặc biệt. Gen đích là đơn vị phiên mã sớm của DNA ở SV40 mã hóa cho kháng nguyên T lớn. Các tế bào chứa bản sao hợp nhất đơn của DNA SV40 với kháng nguyên T lớn mẫn cảm nhiệt độ (tsA8) được dùng để

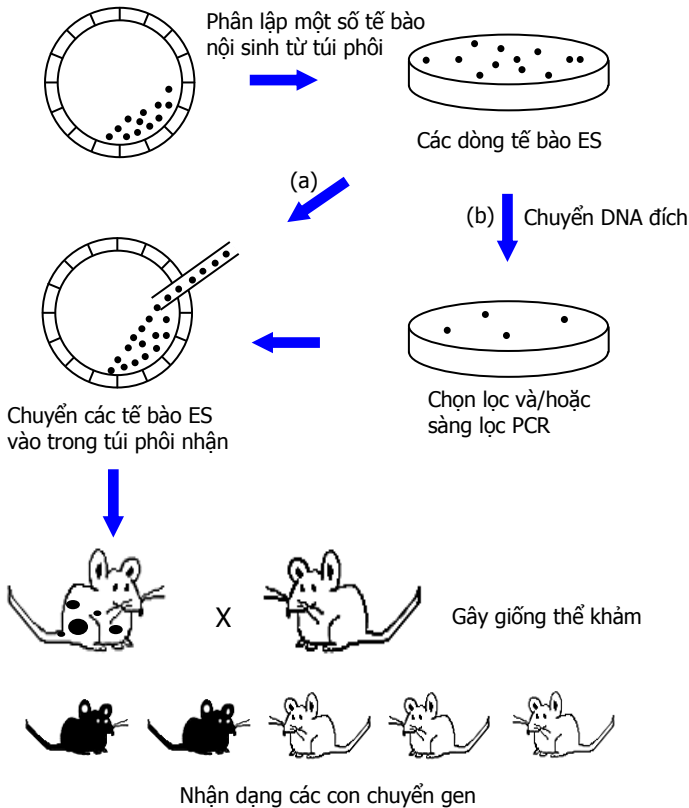
đánh giá sự kìm hãm của kháng nguyên SV40 sau khi vi tiêm các cấu trúc PNA và ODN của sợi không có nghĩa (missense) và sợi đối nghĩa. Đồng vi tiêm với β -gal cho phép phát hiện các tế bào được vi tiêm riêng rẽ nhờ phân tích miễn dịch huỳnh quang kép cho kháng nguyên T và β -gal. Hai chrome huỳnh quang (fluorochromes) riêng biệt cho phép xác định số phần trăm tế bào biểu hiện β -gal có hoặc không biểu hiện kháng nguyên T như là kết quả của sự ức chế sợi đối nghĩa. Vi tiêm PNA có từ 15-20 b vào nhân đã ức chế hoàn toàn biểu hiện cơ bản của kháng nguyên T ở SV40. Sự ức chế đặc hiệu đã được chứng minh trên cơ sở không có sự khử trong gen β -galactosidase được đồng vi tiêm. PNA của sợi không có nghĩa không khử kháng nguyên T ở SV40 mà cũng không biểu hiện β -galactosidase.

Tiếp đến các tế bào thận thích nghi của khỉ (CV-1) đã được vi tiêm plasmid biểu hiện kháng nguyên T của SV40 và một plasmid phân chia chứa β -gal được điều hòa bởi promoter CMV. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang kép được dùng để xác định số lượng biểu hiện của β -gal như một nhân tố chỉ thị của một tế bào vi tiêm và sự có mặt hoặc vắng mặt kháng nguyên T được xem như một đơn vị đo số lượng của hiệu suất ức chế gen bởi sợi đối nghĩa ODN hoặc PNA. Một hệ thống thí nghiệm điều khiển cao như thế cho phép so sánh trực tiếp hiệu quả của tính đặc hiệu chuỗi oligonucleotide, sự biến đổi chiều dài và nồng độ, trong sự so sánh với peptide nucleic acid như là các lớp phân chia oligomer antisense.

5. Kỹ thuật tế bào mầm phôi, chuyển gen và tái tổ hợp tương đồng

Một phương thức khác rất hữu hiệu trong chuyển gen là đưa DNA ngoại lai vào các tế bào mầm phôi (embryonic stem-ES) còn gọi là tế bào gốc (Hình 5.7a). Thiết lập một dòng tế bào ES, các tế bào được cấy chuyển từ khối tế bào bên trong của túi phôi (blastocyst) đang phát triển lên các tầng nuôi dưỡng hoặc vào môi trường có hoạt tính ức chế phân hóa (differentiation inhibiting activity-DIA), để duy trì trạng thái không phân hóa của chúng. DNA ngoại lai có thể được đưa vào trong các tế bào ES bằng một số phương thức sau: xung điện, chuyển nhiễm hoặc vi tiêm. Sau đó, các tế bào chọn lọc được đưa trở lại vào trong túi phôi và được dính vào trong con cái mang thai giả cho phép phát triển tới kỳ hạn sinh đẻ. Sự khác biệt quan trọng giữa các con của một số động vật thu được theo phương thức này so với những con vật thu được bằng kỹ thuật vi tiêm vào phôi một

tế bào (one-cell embryo) đó là chúng tạo ra các thể khảm vì các tế bào mang gen được biến nạp chỉ chiếm một tỷ lệ nhất định của sinh khối tế bào bên trong của túi phôi. Tuy nhiên, phương thức này cung cấp các tế bào chuyển gen đóng góp vào dòng tế bào mầm (germline), sau đó một phương thức chọn giống thích hợp sẽ cho phép thiết lập một dòng chuyển gen.



Hình 5.7. Chuyển gen động vật. (a) Sinh sản của các động vật chuyển gen bằng các phương thức thao tác tế bào ES. (b) Tiếp theo việc chuyển DNA, các tế bào ES mang thể tái tổ hợp tương đồng có thể được chọn lọc trước khi đưa vào trong túi phôi.

Việc đưa DNA ngoại lai vào trong tế bào ES có ý nghĩa hơn phương pháp vì tiêm vào phôi một tế bào nhờ ưu điểm thực tế là DNA ngoại lai có thể được thiết kế để tái tổ hợp tương đồng với bản sao nội sinh của nó (Hình 5.7b). Sự chọn lọc tiếp theo, các dòng đích chính xác có thể được nhận diện, hoặc bằng Southern blot hoặc phân tích PCR, và đưa trở lại vào trong các

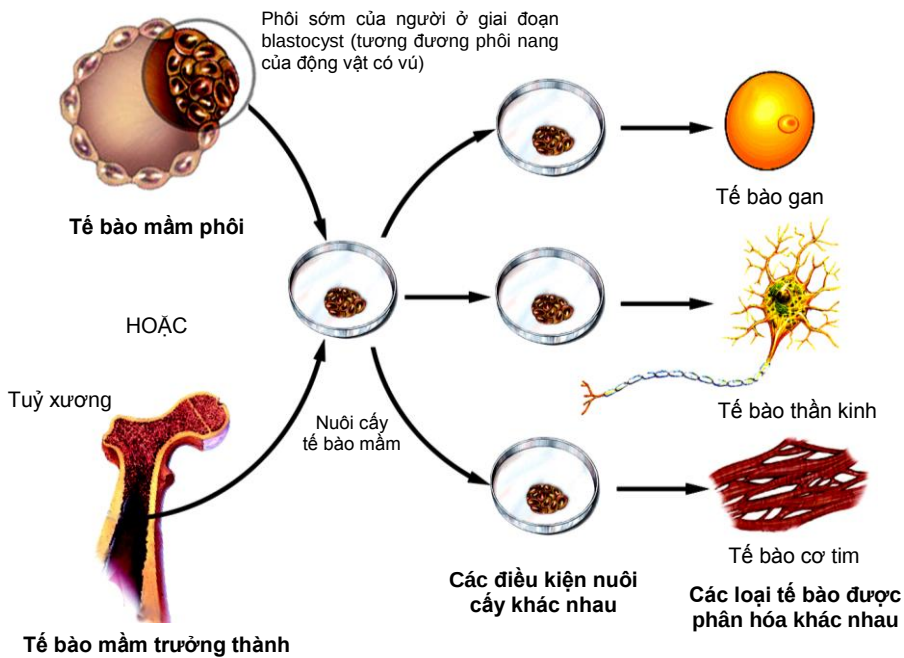
túi phôi vật chủ để sinh sản các thể khảm chuyển gen mong muốn. Một số phương thức đã được phát minh cho chọn lọc dương tính các thể tái tổ hợp tương đồng phối hợp với chọn lọc âm tính dựa theo sự hợp nhất ngẫu nhiên. Chọn lọc dương tính có thể hướng tới bằng cách ngắt quãng các chuỗi tương đồng trong vector đích với marker chọn lọc, như là gen *neo* kháng neomycine của vi khuẩn. Nếu vector hợp nhất trong genome ở một kiểu tương đồng, thì sau đó gen *neo^r* sẽ được kết hợp chặt chẽ trong germline. Mọi chuỗi bổ sung của vector mà không có vùng tương đồng sẽ bị mất. Bằng cách đặt gen HIV-1-*tk* trong vùng không tương đồng của vector đích, mọi tế bào duy trì gen này thông qua các trường hợp hợp nhất ngẫu nhiên sẽ bị giết chết trong sự hiện diện của các nucleoside nhân tạo thích hợp.

IV. Nuôi cấy tế bào mầm để sản xuất cơ quan người

Khả năng sử dụng tế bào ES trong nghiên cứu y sinh học đã hé mở một lĩnh vực ứng dụng mới đó là “y học tái tạo” bắt nguồn từ tính đa năng của của ES do chúng có khả năng tự phân chia và đổi mới vô hạn, hoặc phân hóa thành nhiều loại tế bào, không chỉ là loại bắt nguồn từ ba quần thể tế bào sáng lập (ngoại bì, trung bì và nội bì) ở phôi từ đó sẽ sinh ra tất cả các tế bào của cơ thể, mà còn cả các loại mô chuyên hóa hỗ trợ phôi trong tử cung.

Năm 1981, Martin và Evans cùng lúc phát hiện thấy rằng các tế bào ES của chuột được nuôi cấy trong các điều kiện đặc biệt, bắt đầu phân chia và có thể nhân lên vô hạn mà không phân hóa, cố định ở giai đoạn phát triển phôi sớm này. Tuy nhiên, ngay cả sau khi tạo ra nhiều thể hệ trong nuôi cấy, những tế bào ES này vẫn nhớ chúng được chương trình hóa vì cái gì, và giữ khả năng phân hóa thành bất cứ loại tế bào chuyên hóa nào của cơ thể.

Năm 1998, Thomson và cộng sự đã phân lập được tế bào ES từ phôi người và nhận thấy chúng khác với tế bào gốc của chuột ở nhiều điểm, chẳng hạn như khó duy trì và nhân lên trong nuôi cấy. Năm 2000, Pera và cộng sự đã chứng minh các tế bào ES người cũng có thể phân hóa trong điều kiện *in vitro* thành các loại tế bào trưởng thành khác nhau. Chẳng hạn, họ đã phân lập được từ các tế bào ES nuôi cấy *in vitro* một quần thể tiền tế bào thần kinh thần kinh khiết, và trong một số điều kiện chúng có thể phân hóa thành các tế bào thần kinh thành thực.



Hình 5.8. Nuôi cấy tế bào mầm để sản xuất cơ quan người

Hai tính chất của tế bào ES người đa năng là khả năng sinh sản vô hạn ở trạng thái phôi nguyên thủy trong điều kiện *in vitro*, và khả năng phân hóa thật sự thành bất kỳ loại tế bào trưởng thành nào. Vì vậy, có rất nhiều lĩnh vực ứng dụng chúng, nhưng tựu trung có các hướng chính sau:

1. Ứng dụng tế bào mầm phôi trong nghiên cứu cơ bản

Trên thực tế, những tế bào ES là một công cụ quý giá để hiểu rõ hơn sự phát triển của phôi người và những dị dạng khác nhau có thể làm rối loạn sự phát triển này. Các tế bào ES cung cấp một phương tiện nghiên cứu các sự kiện chủ yếu như sự tăng sinh các tế bào đa năng, sự tham gia của chúng vào các con đường phân hóa đặc thù, cũng như các nhân tố điều khiển chúng. Việc nghiên cứu dòng tế bào ES mang ba nhiễm sắc thể như thể ba 21 sẽ giúp các nhà nghiên cứu đánh giá hậu quả của những tai biến di truyền này đến sự phát triển. Ngoài ra, tế bào ES là niềm hy vọng trong cuộc đấu tranh chống lại nhiều loại u ở trẻ em, như u nguyên bào thần, bắt nguồn từ các quần thể tế bào phôi, nhưng dấu hiệu sinh bệnh khó nghiên cứu. Tế bào ES sẽ giúp chúng ta xác định tác dụng của các gen gây ung thư và các gen

ngăn chặn ung thư ở các quần thể tế bào đích sinh ra các khối u phát triển này.

Những tế bào ES và con cháu phân hóa của chúng, là tiền thân của các loại tế bào nhất định, sẽ được dùng để xác định tác dụng của cytokine và các nhân tố sinh trưởng khác đến sự tăng sinh các quần thể tế bào phôi mà cho đến nay vẫn chưa tiếp cận được để nghiên cứu. Về phương diện điều trị, tương tự như các nhân tố được xác định về tác dụng kích thích sinh trưởng, các tế bào ES máu đã có ứng dụng lâm sàng trong trường hợp ghép tủy, những nhân tố sinh trưởng và phân hóa được xác định nhờ nuôi cấy tế bào ES có thể có ứng dụng trong việc tái tạo các mô khác.

2. Nghiên cứu chức năng gen

Với thành tựu đã xác định được bộ gen của người, người ta có thể xét nghiệm nhanh trong ống nghiệm để xác định chức năng của các gen. Vì các tế bào ES nuôi cấy có thể dễ xử lý di truyền, nhất là chịu những biến đổi định vị tại các vị trí nhiễm sắc thể đặc thù nhờ cách tái tổ hợp cùng nguồn, mới hoặc đã biết, trong các tế bào phôi hoặc ở các tế bào trưởng thành đã phân hóa.

3. Nghiên cứu các mô hình bệnh lý

Theo nguyên lý, tế bào ES là một nguồn *in vitro* đối với bất kỳ loại tế bào nào của cơ thể, vì thế chúng có vai trò quan trọng trong nghiên cứu độc chất học và quá trình tìm ra các loại thuốc. Khả năng sản xuất với số lượng lớn một loại tế bào đặc biệt của người trong ống nghiệm, từ những tế bào tiền thân mà người ta có thể biến đổi di truyền, sẽ giúp tạo ra các mô hình bệnh lý do khuyết tật của một hoặc nhiều gen ở một mô đặc biệt. Những tế bào người này bắt nguồn từ các tế bào ES được biến đổi di truyền sẽ là nguyên liệu lý tưởng để chọn lọc trong ống nghiệm các phân tử điều trị. Chúng ta sẽ không cần đến mô hình động vật, mà những mô hình này có thể thiếu những đặc điểm quyết định sự phát triển bệnh ở người.

4. Ứng dụng trong y học tái tạo

Mặc dù các ứng dụng tương lai của tế bào ES trong nghiên cứu là quan trọng, nhưng ứng dụng hấp dẫn nhất là có thể dùng các tế bào này làm nguồn mô để ghép. Nhiều bệnh làm người suy yếu do hiện tượng tế bào chết, hoặc thoái hóa do các quá trình sinh lý-bệnh lý mãn tính hoặc tổn

thương nghiêm trọng. Trong những trường hợp như vậy, việc thay thế các mô tổn thương bằng một mô lành là hy vọng chữa khỏi nhất. Từ nhiều năm nay, dịch vụ cấy ghép đã phải đương đầu với tình trạng không đủ các mô và cơ quan công hiến. Cho nên về nguyên tắc, tế bào ES càng được quan tâm, vì chúng là nguồn đối mới vô hạn cho tất cả các loại tế bào của cơ thể, bên cạnh các “tế bào mầm trưởng thành”. Trên thực tế, trong nhiều tình huống lâm sàng, việc ghép tế bào có khả năng tái tạo mô có hiệu quả tốt hơn so với ghép cơ quan trọn vẹn. Nếu kết hợp công nghệ tế bào ES với công nghệ nhân bản động vật có vú, người ta có thể xem xét việc sản xuất tế bào ES bắt nguồn từ chính các tế bào của người bệnh, nhằm vào một loại “tự ghép”, để tránh hiện tượng thải loại. Chỉ cần dung hợp một tế bào của người bệnh vào một noãn bào đã tách nhân (như trong trường hợp nhân bản cừu Dolly), rồi cho trứng thu được từ đó phát triển tới giai đoạn phôi bào để phân lập tế bào ES, kích thích các tế bào này phân hóa ở mô cần ghép. Phương pháp này, được gọi là nhân bản điều trị, có thể tạo ra các mô lành hoàn toàn phù hợp, vì có cùng thành phần di truyền như của người bệnh, cùng dấu chuẩn tương hợp mô. Chẳng hạn, người ta đã thành công khi sản xuất tế bào ES ở chuột từ một phôi bào được nhân bản, sau đó những tế bào này khi được tiêm lại vào một phôi chuột, đã phân hóa như mong đợi, thành rất nhiều loại mô.

Nhưng phải nhấn mạnh rằng, tất cả các ứng dụng tế bào ES người, trước khi ra đời, sẽ cần phải hiểu rõ hơn các quá trình sinh học kế cận, cũng như cải tiến các hệ thống nuôi cấy tế bào. Hiện nay, hiểu biết của chúng ta về tế bào ES đa năng còn khá hạn chế, kể cả ở chuột, cho nên vẫn còn nhiều điều phải biết về tế bào ES người trước khi có thể nuôi cấy chúng với quy mô lớn và xử lý chúng về mặt di truyền. Cũng phải cần hiểu cách điều khiển sự phân hóa của chúng thành các tế bào tiền thân của các mô khác nhau, và cách nuôi cấy các tế bào này. Ví dụ: trong trường hợp tiền thân của tế bào thần kinh, có những hệ nuôi cấy rất tốt giúp chúng ta nhân chúng lên, rồi để chúng biến đổi thành tế bào thần kinh thành thực. Người ta cũng đã phân hóa đặc trưng các tế bào ES chuột thành các tế bào thần kinh có hoạt tính dopamin, mà nếu thoái hóa sẽ gây bệnh Parkinson. Tiếc rằng, đối với nhiều dòng tế bào khác, người ta vẫn chưa làm chủ được các giai đoạn này. Cuối cùng, trước khi nhân bản điều trị đạt tới giai đoạn ứng dụng lâm sàng, vẫn còn nhiều việc phải làm để cải tiến hiệu quả của giai đoạn nhân bản, và chứng minh rằng các phôi được nhân bản có thể sinh ra các mô hoạt động

bình thường. Tuy có rất nhiều trở ngại nhưng hiểu biết của con người về sự phát triển phôi đã tiến bộ rất nhanh trong những năm gần đây. Nếu cộng đồng khoa học được ủng hộ để cố gắng nghiên cứu đến cùng, thì tế bào gốc người đa năng có thể sẽ đóng góp chủ yếu vào y học thế kỷ 21 này.

V. Công nghệ phôi động vật có vú

1. Cấy truyền hợp tử

Công nghệ cấy truyền hợp tử hay còn gọi là công nghệ chuyển phôi (embryo transfer technology) là những kết quả của những bước tiến lớn trong sinh học phát triển và sinh học phân tử. Các vi thao tác trên phôi của các loại vật nuôi đều được tiến hành trong điều kiện *in vitro*, sau khi lấy phôi ra từ động vật cho (donor) và trước khi nuôi cấy phôi vào động vật nhận (recipient), bao gồm các thao tác như:

- Tách phôi thành hai hay nhiều phần.
- Phôi hợp hai hay nhiều phôi thành một thể khảm.
- Biến đổi các thành phần trong tế bào của phôi khi mới phát triển.

Kỹ thuật vi thao tác phôi bắt nguồn từ các thao tác trên động vật thí nghiệm, dựa trên cơ sở các phát hiện về cơ chế phân hóa phôi sớm, các cơ chế phát triển cá thể ở động vật không xương sống và sau đó ở động vật có xương sống bậc thấp và cuối cùng là động vật có vú.

Các thực nghiệm đầu tiên đã chứng minh được những tế bào phôi tách từ phôi hai tế bào (two-cell embryo) có khả năng được phát triển thành phôi hoàn chỉnh, đồng thời kết hợp hai hợp tử ở chuột có thể hình thành nên một cơ thể dạng khảm. Thực nghiệm vi thao tác phôi động vật có vú đã được tiến hành đầu tiên trên thỏ.

2. Bảo quản phôi

Đây là giai đoạn tiến hành trước khi cấy truyền phôi vào động vật nhận, tạo điều kiện đảm bảo có thể vận chuyển phôi đi xa, và không cần phải gây động dục đồng thời cho con vật nhận ngay sau khi vi thao tác lấy phôi ra từ vật cho. Trong thực tiễn cấy truyền phôi, bảo quản lạnh phôi ở nitrogen lỏng (-196°C) đối với tất cả các loại vật nuôi (trừ lợn). Ở bò, kỹ thuật đông lạnh phôi có thể cho kết quả thụ thai khoảng 80%, trong đó

trường hợp phôi nguyên cho kết quả cao hơn phôi thao tác do tác động của các yếu tố thao tác khi tách phôi.

3. Nuôi cấy tạm thời phôi trong cơ thể sống

Người ta đã tiến hành nuôi cấy tạm thời phôi gia súc, vật nuôi trong các hệ thống khác nhau: ống dẫn trứng của cừu, chuột, thỏ; tử cung của bò cái; xoang màng bụng (phúc mạc, periton) của chuột; xoang ối phôi gà.

Hầu hết các hệ thống nói trên đều được sử dụng cùng với các vi thao tác, và đều cần đến kỹ thuật bọc phôi trong một loại chất bảo vệ (thường là agar) để bảo vệ màng trong suốt của phôi không bị tổn thương.

4. Kỹ thuật bọc phôi bằng agar

Sử dụng dung dịch agar trong 0,9% NaCl. Trước khi thao tác, cho nóng chảy agar, sau đó làm nguội agar ở 39°C, vừa không quá nóng đối với phôi, nhưng còn có thể nhỏ giọt. Việc bọc agar quanh phôi phải tiến hành rất nhanh, để agar chưa kịp đông lại.

Trước khi bọc agar, các phôi đã mở lớp màng trong suốt phải được nhúng vào huyết thanh bê được đun ấm. Mục đích của thao tác nêu trên là để không làm thương tổn tế bào phôi.

5. Kỹ thuật nuôi cấy tạm thời phôi trong ống dẫn trứng

Lấy một hoặc hai khối agar bọc phôi, chuyển vào ống dẫn trứng của cừu cái, kèm một lượng tối thiểu môi trường. Cừu cái phải được tạm ngừng sinh dục, không động dục hoặc không chữa trong thời gian nuôi cấy. Các điều kiện nêu trên có thể đáp ứng nếu trước ngày thao tác cấy phôi, người ta tiêm vào tử cung progestagen. Các phôi bình thường sẽ đi vào tử cung ở giai đoạn tám đến mười sáu tế bào.

Ống dẫn trứng của thỏ đã được sử dụng rộng rãi để cấy phôi động vật, cấy các hợp tử đã được thụ tinh trong ống nghiệm. Để cấy vào ống dẫn trứng thỏ, các phôi cần bọc bởi một lớp mỏng muxin. Thường người ta dùng ống dẫn trứng của thỏ để nuôi cấy tạm thời phôi lợn.

Ngoài ra, kỹ thuật nuôi cấy tạm thời phôi trong tử cung của bò được sử dụng để nghiên cứu các pha sớm trong quá trình hình thành thể khảm ở phôi bò. Xoang ối của gà được sử dụng để nuôi cấy phôi của chuột, dê và mèo. Phôi được bọc trong các khối agarose sau đó chuyển vào xoang ối của gà.

VI. Nhân bản vô tính động vật có vú

1. Khái niệm cơ bản

Nhân bản vô tính (hay còn gọi là tạo dòng vô tính) là quá trình tạo ra một một tập hợp các cơ thể giống hệt nhau về mặt di truyền và giống bố (hoặc mẹ) ban đầu bằng phương thức sinh sản vô tính. Nhân bản vô tính dựa trên quan điểm cho rằng mọi tế bào của một cơ thể đa bào đều xuất phát từ một tế bào hợp tử ban đầu qua phân bào nguyên nhiễm, do đó nhân của chúng hoàn toàn giống hệt nhau về mặt di truyền.

Sinh sản vô tính là sự sinh sản không kèm theo tái tổ hợp di truyền, được thực hiện theo cơ chế phân bào mitose, trong đó genome được tái bản nguyên vẹn. Khác với sinh sản vô tính, sinh sản hữu tính (tiến hóa hơn) có kèm theo tái tổ hợp di truyền và được thực hiện theo cơ chế phân bào mitose và meiose. Tái tổ hợp di truyền là nguyên nhân dẫn đến sự đa dạng sinh học (biodiversity).

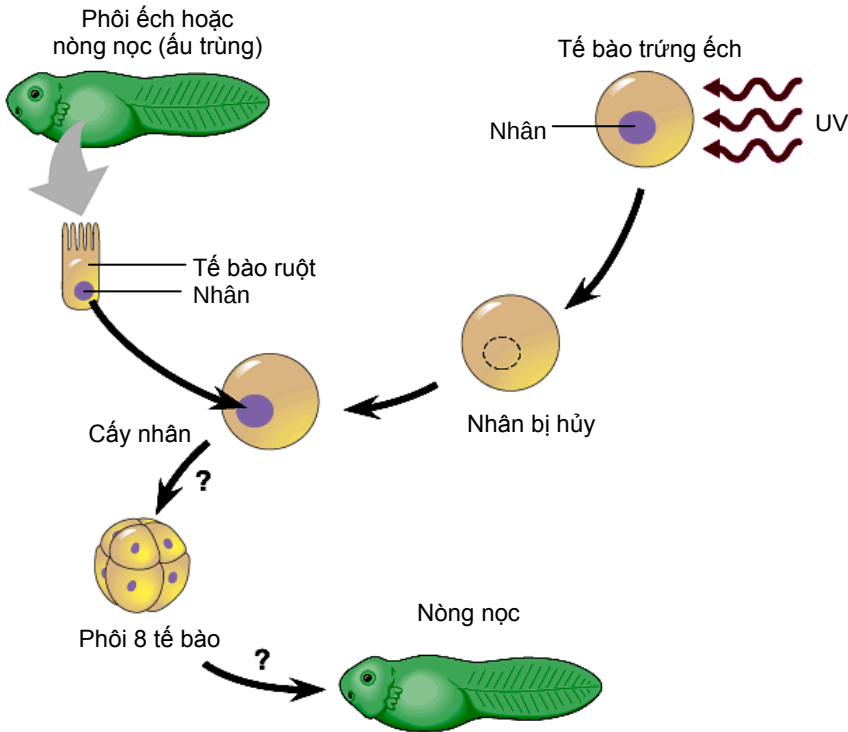
Sinh sản hữu tính là hình thức sinh sản phổ biến ở các sinh vật bậc cao. Trong khi đó sinh sản vô tính chỉ tồn tại ở những cơ thể có cấu trúc tương đối đơn giản và gặp nhiều ở thực vật (thực vật cũng có hình thức sinh sản hữu tính). Ở động vật bậc cao sinh sản vô tính chỉ tồn tại ở giai đoạn phát triển sớm hoặc dưới hình thức biến dạng của sinh sản hữu tính như hình thức đơn tính sinh.

2. Nhân bản vô tính ở động vật

Có thể hiểu một cách đơn giản đây là kỹ thuật nhân nhiều cá thể từ những tế bào vô tính (somatic cell) (Hình 5.9).

Nhân bản vô tính động vật được đánh giá là một phương thức tăng số lượng các động vật thương mại và khoa học quan trọng. Đầu tiên, sự phát triển hoàn chỉnh chuột chỉ thu được khi tiền nhân (pronucleus) hoặc nhân (nucleus) từ các phôi chuột giai đoạn sớm hai tế bào được chuyển vào noãn bào đã phá bỏ nhân (enucleated oocyte). Nhân từ các giai đoạn sau được xem như không đủ khả năng để tái chương trình hóa hỗ trợ sự phát sinh phôi. Người ta cũng thấy rằng sự hoạt hóa nhân tạo (bằng cách kích thích điện) cho phép nhân từ các phôi chuột có tám tế bào được chuyển vào các tế bào chất giai đoạn MII, và việc chuyển theo từng chuỗi (sinh trưởng các trứng được khôi phục lại trong môi trường chứa cytochalasin B, sản xuất

“hai nhân giống tiền nhân”, và chuyển tuần tự những cái này vào các phôi một tế bào được thụ tinh phá bỏ nhân trước đó) cải thiện việc sản xuất các dòng chuột. Bằng cách dùng phương thức chuyển nhân, cừu đã được tạo dòng từ các tế bào có nguồn gốc từ phôi và từ các dòng tế bào soma có nguồn gốc từ thai và tuyến vú. Gần đây hơn, tạo dòng các phôi bò bằng cách chuyển đa nhân cũng đã được thông báo.



Hình 5.9. Sơ đồ nhân bản vô tính ếch

3. Nhân bản vô tính cừu Dolly

Đây là công trình của Wilmut, Campbell và các cộng sự (Ecosse, Anh). Đối tượng nghiên cứu ở đây không còn là những tế bào phôi nang, mà là những tế bào lấy từ tuyến vú một cừu cái Finn Dorset, sáu năm tuổi, lông trắng, ở thời kỳ ba tháng cuối từ khi cừu cái mang thai, là thời kỳ tế bào tuyến vú đã được phân hóa (differentiation) cao độ và phát triển.

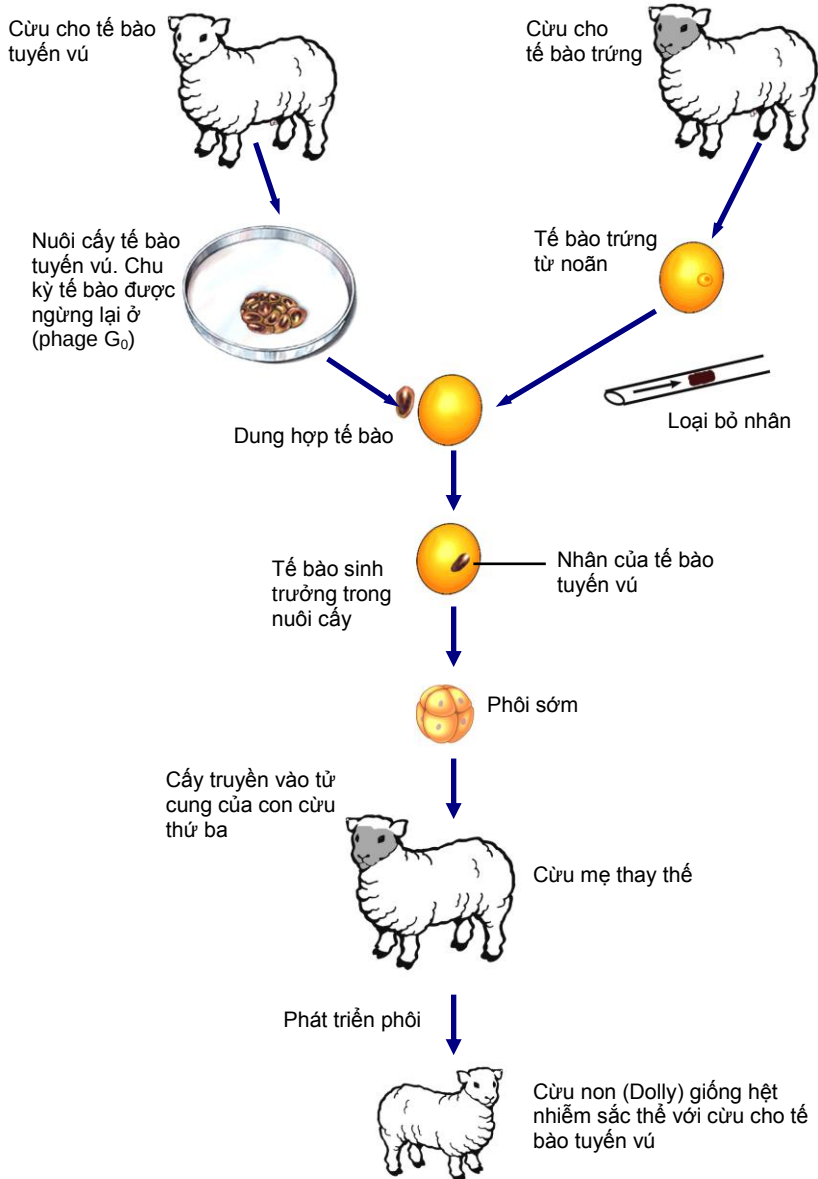


Hình 5.10. Cừu Dolly và cừu mẹ

Đem nuôi cấy *in vitro* các tế bào tuyến vú, để 5 ngày trong một môi trường nuôi cấy rất nghèo huyết thanh, với mục đích làm cho chu kỳ tế bào giảm từ từ cho tới khi ngừng hoàn toàn. Giai đoạn này được gọi là G_0 . Sau đó, làm lạnh trước khi đưa mỗi tế bào tuyến vú vào một noãn chưa thụ tinh, đã rút nhân của một cừu cái khác, đầu đen. Kết quả, một tế bào mới đã được hình thành, phát triển và tạo thành phôi.

Ở đây có sự phối hợp của hai kỹ thuật, một là hoạt hóa trứng đã lấy nhân ra của cừu đen, hai là làm ngừng chu kỳ sống của tế bào tuyến vú cừu trắng, tức là những tế bào soma đã được biệt hóa cao độ, tách từ một cơ thể trưởng thành và người ta đã thành công trong kỹ thuật dung hợp tế bào. Thành công này vượt lên các công trình trước đó, từ 1992 đã thất bại chủ yếu là do các tế bào phôi sử dụng để chuyển nhân không được định vị ở giai đoạn G_0 (như trường hợp tạo cừu Dolly), mà đã phát triển tới G_2 (pha tăng trưởng) hoặc S (pha tái bản, tổng hợp DNA), đã cản trở sự dung hợp tế bào.

Cừu Dolly sinh ngày 5/7/1996, có trọng lượng bình thường không có biểu hiện dị dạng như các thí nghiệm trước đó. Sống trong tử cung của “mẹ nuôi hộ” lông đen, nhưng cừu Dolly vẫn có lông trắng, các phân tích kiểm tra di truyền đã xác nhận cừu Dolly là bản sao của cừu Finn Dorset, cừu đã cung cấp tế bào tuyến vú.



Hình 5.11. Sơ đồ nhân bản vô tính cừu Dolly

Sau đó Wilmut và Campbell còn tạo ra ba cừu con từ những tế bào một bào thai 26 ngày và bốn cừu con từ những tế bào một phôi mới hình thành được 9 ngày.

Thành công nêu trên chứng tỏ một động vật có vú lớn có thể được nhân bản từ tế bào soma mà không cần có tác động gì của tế bào sinh dục,

ngoài sinh chất của một noãn bào. Người ta cũng đã nhân bản thành công khi và lợn, và gần đây là trên cả người dùng các phôi non (14 ngày) để cung cấp nguyên liệu cấy ghép chữa bệnh.

Về chất lượng, nói chung nhân bản từ tế bào soma có thể tạo được cá thể đực hoặc cái ưu việt theo ý muốn. Tuy nhiên, vẫn còn một vấn đề cần tiếp tục kiểm tra, đó là vai trò của tế bào chất của trứng (noãn) khi dung hợp với tế bào soma (tuyến vú). Tế bào chất của trứng tiếp nhận nhân chuyển vào đã khởi động cho sự phát triển của phôi. Tuy nhiên, cơ chế của quá trình chuyển genome mẹ vào genome phôi vẫn chưa được sáng tỏ và vai trò của tế bào chất của noãn trong thí nghiệm dung hợp cũng chưa được biết đầy đủ.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Nguyễn Ngọc Hải.** 2005. Sinh học mạo hiểm. *NXB Thanh niên*, Hà Nội.
2. **Phan Kim Ngọc và Hồ Huỳnh Thùy Dương.** 2001. Sinh học của sự sinh sản. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
3. **Phan Cự Nhân.** 2001. Di truyền học động vật. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội.
4. **Bains W.** 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press Inc.* New York, USA.
5. **Coleman WB and Tsongalis GJ.** 1997. Molecular Diagnostics-For The Clinical Laboratorian. *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey, USA.
6. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
7. **Lee JM.** 2000. Biochemical Engineering. *Prentice Hall Inc.* USA.
8. **Marshak DR, Gardner RL and Gottlieb D.** 2001. Stem Cell Biology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, USA.
10. **Mather JP and Roberts PE.** 1998. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. *Plenum Press*, New York, USA.
11. **Pollard JW and Walker JM.** 1997. Basic Cell Culture Protocols. *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey, USA.
12. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
13. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall Inc.* NJ, USA.

Công nghệ protein

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 bản 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 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.

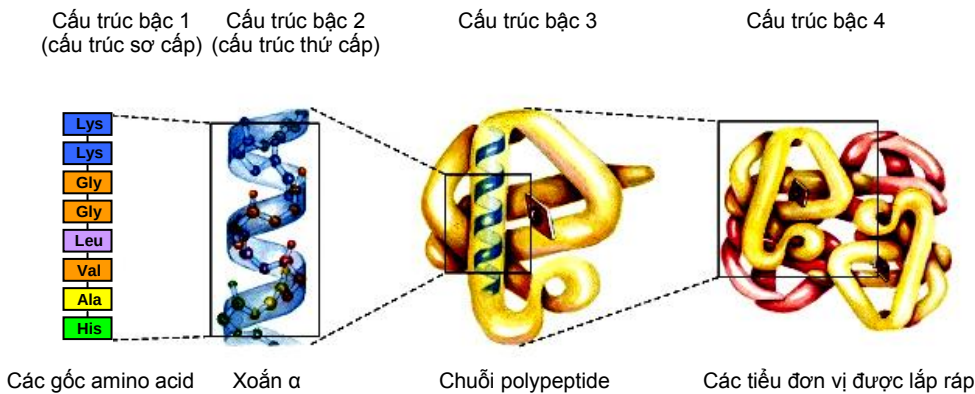
II. Cấu trúc protein

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.

Phân 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 lấp 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.

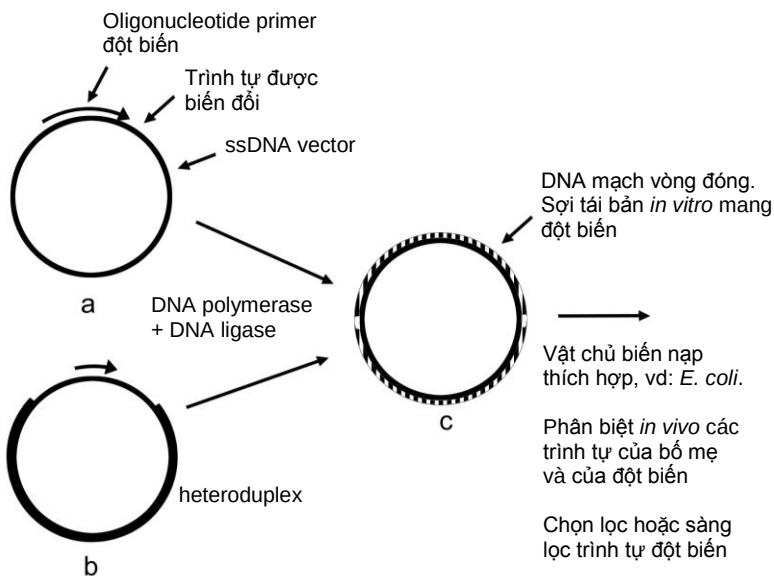
▪ Các phương pháp phát sinh đột biến điểm định hướng

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.

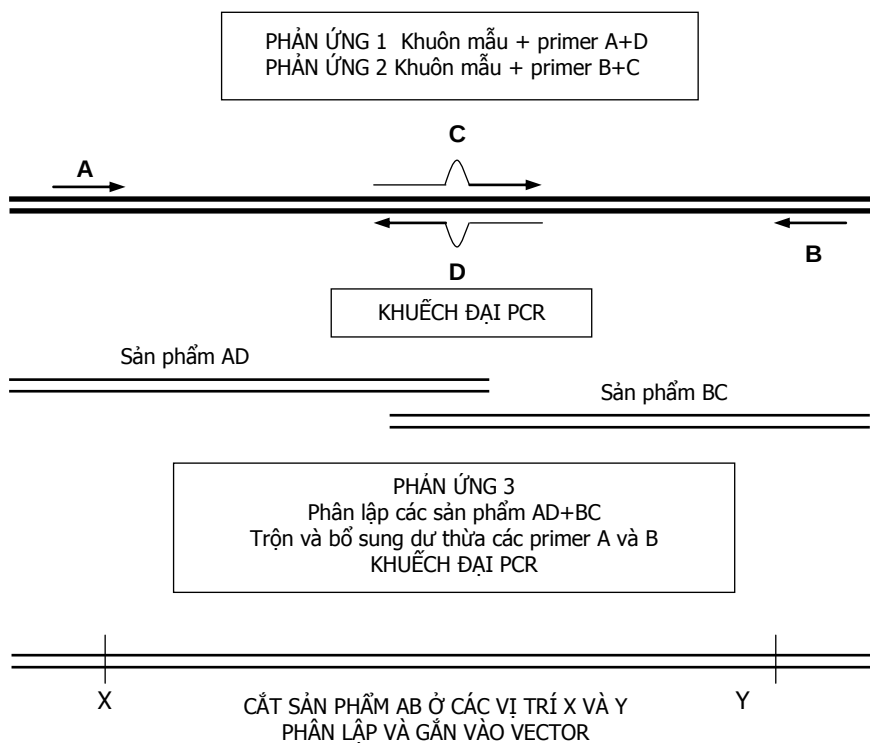
- Phương pháp dựa trên PCR

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.

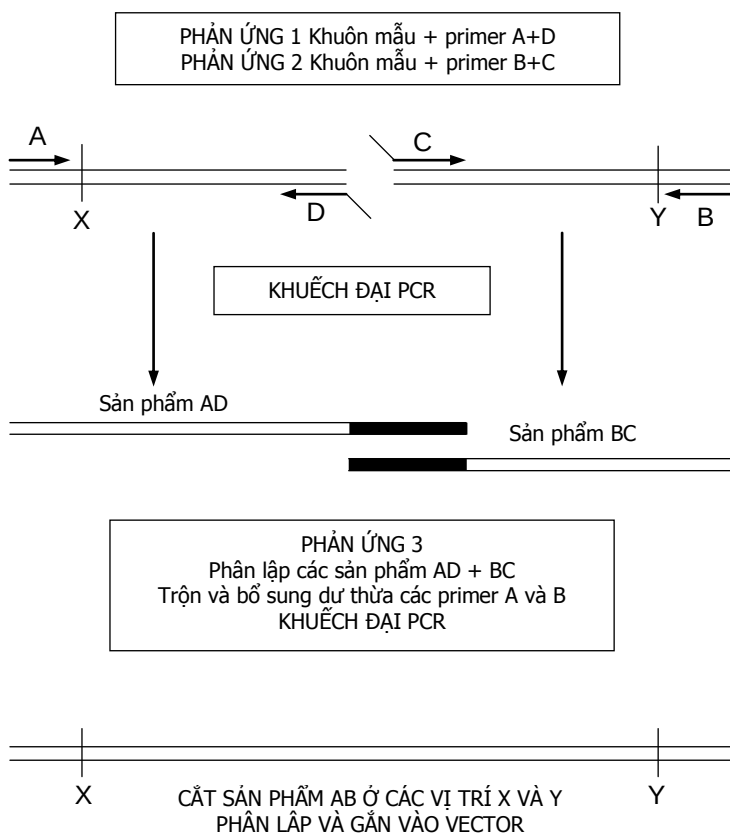


Hình 6.3. Phát sinh đột biến PCR bằng sự mở rộng chông lặp đơn

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), enthalpy, 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 bất 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 mì.

- 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.

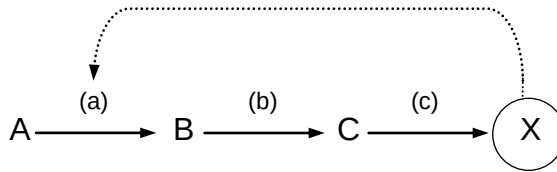
Tuy nhiên, trong thực tế sự cảm ứng thường được tiến hành bằng hỗn hợp các tác nhân cảm ứng đất liền, được khử trùng và bổ sung ở các thời gian đặc biệt để thiết lập sự lên men. Để khắc phục các vấn đề này các đột biến điều hòa có thể được sản xuất để không phụ thuộc vào các nhân tố cảm ứng và vì vậy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



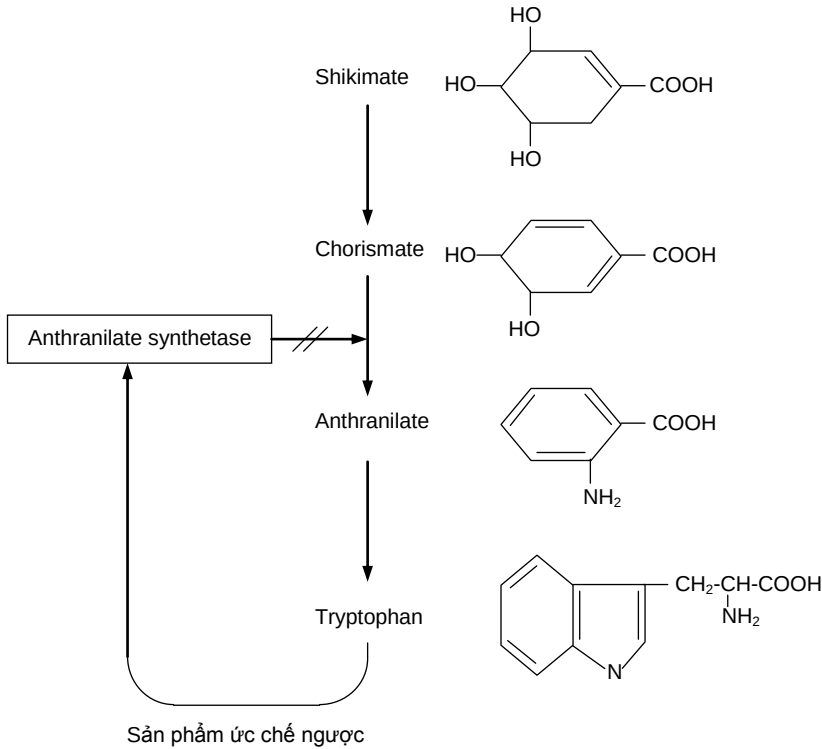
Hình 6.5. Sơ đồ chuỗi phản ứng hóa sinh tổng hợp chất (X)

- 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 β -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 khắc 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 α -amylase, hoặc promoter phenoxylacetic 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 tối 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: α -amylase, β -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 đồng 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 β -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 loại 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.

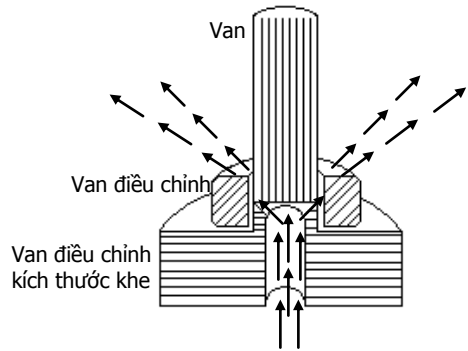
Tương tự như phương pháp trượt rắn, các tế bào trong dịch huyền phù được chuyển qua một lỗ hẹp nén dưới áp suất cao. Trường hợp ở quy mô nhỏ hơn, người ta sử dụng thiết bị French Press (Hình 6.7). Ở quy mô lớn thường dùng thiết bị đồng hóa (homogenizer) là loại được phát triển để tạo thể sữa trong công nghiệp bơ sữa. Nhiệt độ tăng lên ít nhất 10°C trong một lần 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:

$$\text{Log} \left(\frac{R_m}{R_m - R} \right) = KnP^\alpha \quad (1)$$

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 α là hằng số phụ thuộc vào cơ thể.

Giá trị của số mũ α 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: β -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 $100.000\times g$ (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 $20.000\times g$. 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 $8.000 \times g$ 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 m^2 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 $7,5 \text{ m}^2$ 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 α -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 đậm, 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:

$$V_t = V_o + V_i + V_m \quad (2)$$

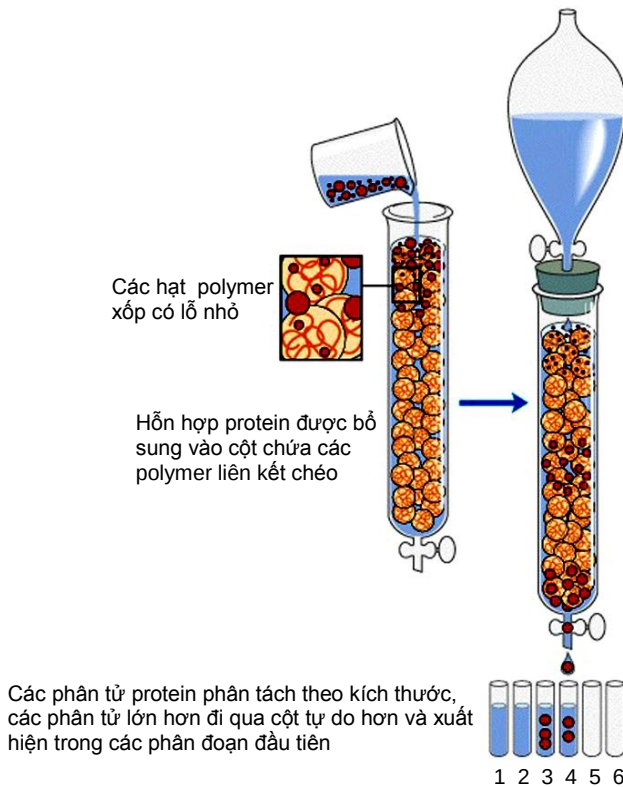
Trong đó: V_t là tổng thể tích của cột, V_o là thể tích của dung môi ở bên ngoài các hạt, V_i là thể tích của dung môi ở bên trong các hạt, và V_m là thể tích bị chiếm bởi khuôn.

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.

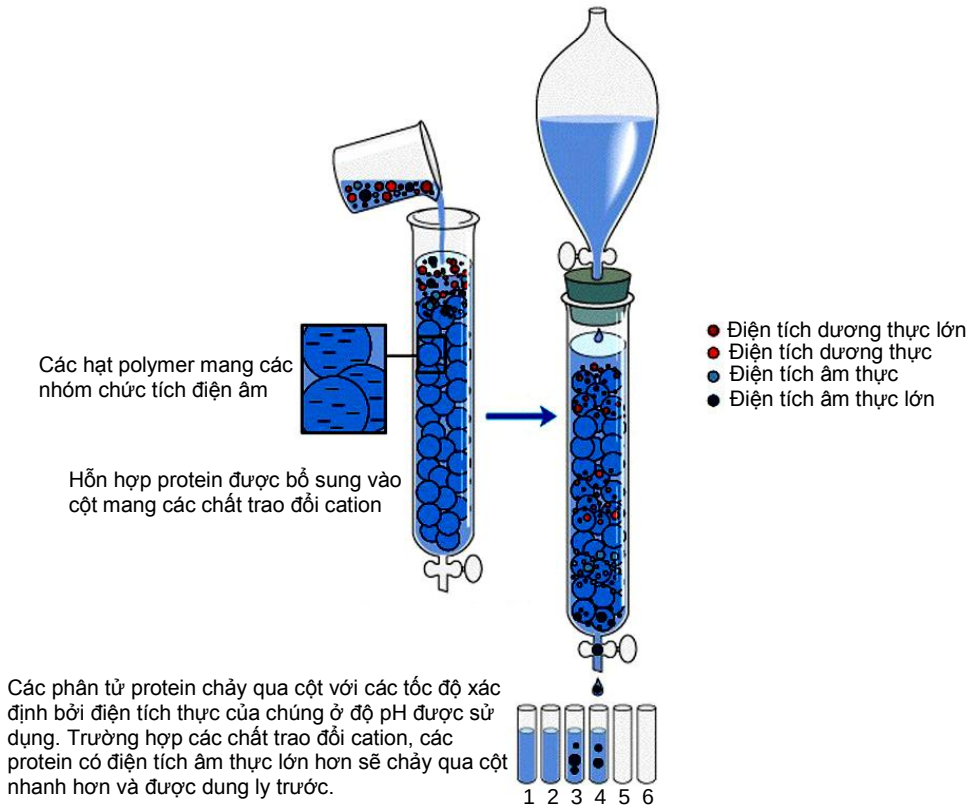
Các loại gel rắn hơn dựa trên cơ sở thay đổi những vật liệu khác nhau đã được đưa vào sử dụng, và thích hợp hơn cho ứng dụng trên quy mô lớn. Ví dụ: Sephacryl (Amersham Pharmacia Biotech) trên cơ sở dextran và polyacrylamide; Superdex (Amersham Pharmacia Biotech) trên cơ sở dextran và agarose, Superose (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
Ambelint E-IR120	Polystyren được liên kết chéo bằng divinylbenzen	-SO ₃ ⁻ Sulfonate	Chất trao đổi cation mạnh
CM-Sephарose	Agarose được liên kết chéo bằng 2,3-dipromopropanol	-CH ₂ COO ⁻ Carboxylmethyl	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.

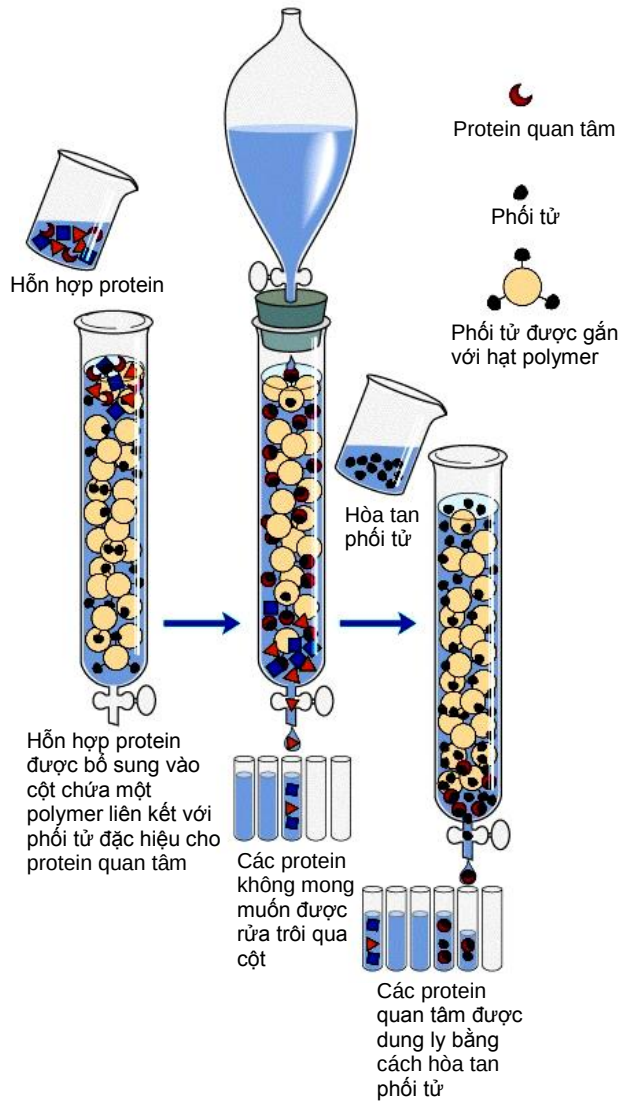
Trong sắc ký trao đổi ion, việc gắn một protein vào nhựa trao đổi ion sẽ phụ thuộc vào trạng thái ion hóa của nó, cũng như trạng thái ion hóa của nhựa trao đổi, pH, lực ion và nhiệt độ. Đối với những protein không bị biến tính ở pH cao hơn điểm đẳng điện của chúng thì có thể dùng DEAE-cellulose (nhựa 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 kim 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 giải 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 thông. 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 γ -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↓Xxx-	CNBr	70% formic acid; 20°C
-Xxx↓(Arg) _n -	CarboxypeptidaseB	pH 8; 37°C
-Xxx↓(His) _n -	CarboxypeptidaseA	pH 8; 37°C
-Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg↓Xxx	Thrombin	pH 7-8; 37°C
-Ile-Glu-Gly-Arg↓Xxx	Factor X _a	pH 7-8; 37°C
-Asp-Asp-Asp-Lys↓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 ± guandinium chloride	Đệm imidazole hoặc giảm pH gradient ± guandinium 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
β-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.

Phần II

Các ứng dụng của Công nghệ sinh học

Các ứng dụng trong nông nghiệp

I. Mở đầu

Đây là lĩnh vực công nghệ sinh học có nhiều đóng góp quan trọng. Các sản phẩm công nghệ sinh học mới trong nông nghiệp chứa đựng triển vọng hứa hẹn đối với người tiêu dùng và nông dân. Hiện nay, các ứng dụng công nghệ sinh học trong nông nghiệp đang tập trung vào các hướng: chọn lọc và biến đổi di truyền cây trồng để có được các đặc điểm mong muốn (năng suất cao, phẩm chất tốt, thích nghi với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi...), nuôi cấy mô và tế bào thực vật để nhân nhanh giống cây trồng, sản xuất các kháng thể đơn dòng để phục vụ chẩn đoán các bệnh thực vật và động vật, thụ tinh trong ống nghiệm và cấy chuyển phôi ở vật nuôi, cải thiện năng suất và chất lượng của động vật, nuôi trồng thủy sản, chế biến thực phẩm...

Nhìn chung, trong những năm qua công nghệ sinh học đã có những tác động rất tích cực trong sản xuất nông nghiệp, tạo ra một cuộc cách mạng sâu sắc trong lĩnh vực giống cây trồng, vật nuôi và chế biến thực phẩm. Nhiều kết quả nghiên cứu đã được ứng dụng trong sản xuất và đem lại những giá trị kinh tế lớn lao. Chẳng hạn, nhiều giống cây trồng mang gen kháng sâu, kháng bệnh, kháng chất diệt cỏ... đã được đưa ra thị trường như bông, ngô, khoai tây, lúa mạch, lúa nước, cà chua, củ cải đường... Nhiều loại vật nuôi đã được thụ tinh trong ống nghiệm và cấy chuyển phôi, sử dụng hormone sinh trưởng để tăng nhanh sức lớn và sản lượng sữa ở trâu, bò, kể cả sản lượng thực phẩm và các chất phụ gia sinh học...

II. Cải thiện và nhân nhanh giống cây trồng

Hướng nghiên cứu được tập trung nhiều nhất để cải thiện và nhân nhanh giống cây trồng là nuôi cấy mô và tế bào thực vật (plant cell and tissue culture). Đây là kỹ thuật nuôi cấy vô trùng *in vitro* các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật. Ngoài mục đích nhân giống và cải thiện di

truyền giống cây trồng, nuôi cấy mô và tế bào thực vật còn đóng góp vào việc sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo quản các nguồn gen quý hiếm... Các hoạt động này được bao hàm trong thuật ngữ công nghệ sinh học nông nghiệp (biotechnology in agriculture).

Lĩnh vực nhân giống và cải thiện giống cây trồng có bốn hướng chính:

- Nhân giống trong ống nghiệm (nhân giống vô tính *in vitro*) bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan của thực vật. Với kỹ thuật này trong một thời gian rất ngắn có thể sản xuất một lượng lớn cây con giống hết nhau và giữ nguyên kiểu di truyền của cây mẹ ban đầu.

- Sản xuất cây đơn bội (1n) bằng cách nuôi cấy bao phấn hoặc hạt phấn cho phép tạo ra các dòng thuần (đồng hợp tử) để phục tráng giống cây trồng bị thoái hóa sau một thời gian dài canh tác. Hoặc tìm kiếm các tính trạng lặn dị hợp tử ưu việt thu được trong quá trình chọn giống.

- Lai vô tính (somatic hybridization) hay còn gọi là dung hợp tế bào trần (protoplast fusion) giữa các loài xa nhau về quan hệ họ hàng mà trong thực tế không thể tiến hành bằng phương pháp lai hữu tính, nhờ đó mở ra khả năng tạo ra những giống cây hoàn toàn mới.

- Ứng dụng kỹ thuật chọn dòng tế bào biến dị soma (somaclonal variation) trong nuôi cấy *in vitro* để tạo ra các giống mới chống chịu các bệnh vi khuẩn, virus và vi nấm, chịu được các điều kiện canh tác khắc nghiệt như hạn hán, ngập mặn, nóng và lạnh...

1. Nhân giống vô tính *in vitro*

Nhân giống *in vitro* là kỹ thuật nhân giống cây trồng bằng cách sử dụng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật, có kích thước nhỏ và sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác chứa môi trường dinh dưỡng nhân tạo.

Trên quan điểm ứng dụng, kỹ thuật nhân giống *in vitro* được ứng dụng nhằm phục vụ các mục đích sau:

- Duy trì và nhân nhanh các kiểu gen quý hiếm làm vật liệu cho công tác tạo giống.

- Nhân nhanh với hiệu quả kinh tế cao các loài hoa và cây cảnh không trồng bằng hạt.

- Nhân nhanh và duy trì các cá thể đầu dòng tốt để cung cấp hạt giống các loài rau, cây cảnh và các cây trồng khác.

- Nhân nhanh và kinh tế các kiểu gen quý của giống cây lấy gỗ trong lâm nghiệp và gốc ghép trong nghề trồng cây ăn quả, cây cảnh.

- Nhân nhanh ở điều kiện vô trùng, cách ly tái nhiễm kết hợp với làm sạch bệnh virus.

- Bảo quản các tập đoàn giống nhân giống vô tính và các loài cây giao phấn trong ngân hàng gen.

2. Sản xuất cây đơn bội *in vitro*

Hầu hết các loài cây trồng của chúng ta đều có mức bội thể >1 , phổ biến là nhị bội ($2n$) và tứ bội ($4n$). Như vậy, mỗi đặc điểm di truyền ở những cá thể này đều bị hai hay nhiều allele của một gen chi phối. Nếu đó là những cá thể dị hợp tử, tức là các gen trong mỗi hệ gen nhị bội hay tứ bội khác nhau thì biểu hiện tính trạng (phenotype) của gen đó hoàn toàn tùy thuộc vào tính trạng lặn hay trội của chúng quyết định. Vì vậy, mức bội thể lý tưởng để tiến hành nghiên cứu di truyền các tính trạng phải là mức đơn bội ($1n$) hoặc các mức đa bội khác nhưng chúng phải đồng nhất tuyệt đối.

Từ lâu, các nhà di truyền và chọn giống cây trồng đã sử dụng trạng thái đơn bội của cây trồng để tiến hành nghiên cứu và thông qua đa bội hóa thể đơn bội đó để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối. Tuy nhiên, các phương pháp kinh điển để thu nhận cây đơn bội cho hiệu quả rất thấp. Kỹ thuật tạo cây đơn bội *in vitro* thông qua kích thích tiểu bào tử phát triển thành cây trong nuôi cấy bao phấn hoặc hạt phấn cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội đã là một biện pháp hữu hiệu đối với lĩnh vực ứng dụng đơn bội vào nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng.

Với các thể đơn bội của thực vật bậc cao người ta có thể sử dụng vào các mục đích:

- Nghiên cứu di truyền về môi tương tác của các gen.
- Tạo đột biến ở mức độ đơn bội.
- Tạo dạng đồng hợp tử tuyệt đối (dòng thuần).

Một số phương pháp được sử dụng để tạo thể đơn bội như sau:

2.1. Phương pháp tạo thể đơn bội *in vivo*

Trong tự nhiên, các dạng đơn bội tăng lên do kết quả của sự trinh sản và các cây này hiếm khi mang các đặc điểm của cây bố. Các kỹ thuật *in vivo*

được ứng dụng để sản xuất cây đơn bội như sau: sinh sản đơn tính cái (gynogenesis), sinh sản đơn tính đực (androgenesis), sự đào thải hệ gen bằng lai xa, sự giao phối không hoàn toàn (semigamy), xử lý hóa chất, shock nhiệt, ảnh hưởng của chiếu xạ. Nhìn chung, các kỹ thuật này cho hiệu suất tạo cây đơn bội thấp.

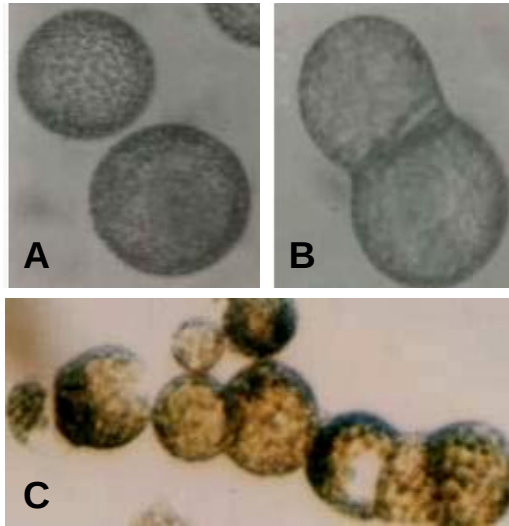
2.2. Phương pháp tạo thể đơn bội *in vitro*

Các phương pháp *in vitro* đã được chứng minh là có hiệu suất tạo cây đơn bội cao hơn nhờ kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn (pollen culture) hoặc nuôi cấy bao phấn (anther culture). Các loài đặc trưng của họ Solanaceae cho kết quả nuôi cấy đơn bội tốt hơn cả, mặc dù ở các họ Cruciferae, Poaceae, Ranunculaceae và một số họ khác cũng có khả năng cảm ứng tạo cây đơn bội bằng sinh sản đơn tính bao phấn hoặc từ nuôi cấy hạt phấn phân lập.

3. Dung hợp protoplast hay lai vô tính tế bào thực vật

Đặc trưng của tế bào thực vật là có thành cellulose bao quanh, sau đó đến màng nguyên sinh chất (plasma membrane). Thành cellulose giữ cho tế bào thực vật có hình dáng nhất định, còn các hợp chất pectin nằm trong thành có nhiệm vụ liên kết gắn các tế bào với nhau thành mô. Màng nguyên sinh chất cho phép protoplast (tế bào đã được phá bỏ thành cellulose và chỉ còn lại màng nguyên sinh chất) có thể hấp thu vào tế bào các đại phân tử (nucleic acid, protein) thậm chí cả các cơ quan tử như lục thể, ty thể, nhân tế bào theo cơ chế của amip (ameba). Nếu để các protoplast cạnh nhau, chúng có thể dễ hòa làm một, đó là hiện tượng dung hợp hay còn gọi là lai tế bào (Hình 7.1). Kỹ thuật dung hợp protoplast cho phép khắc phục được hiện tượng bất thụ thường xảy ra khi lai khác loài (lai xa) để mở rộng nguồn gen, tạo ra các giống cây trồng mới mang các đặc tính di truyền ưu việt.

Kết quả nổi bật của dung hợp protoplast là cây lai pomato giữa cà chua và khoai tây đã đánh dấu một mốc quan trọng trong lĩnh vực này. Cây lai pomato ra đời năm 1977, khi lai protoplast của cây cà chua [*Lycopersicum esculentum* Mill/var. *cerasiforme* (Dunal) Alef. (đột biến xanh vàng 6 Rick)] với protoplast tế bào callus nuôi trong dịch lỏng của dòng khoai tây lưỡng bội DH số HH 258.



Hình 7.1. Dung hợp protoplast. A: các protoplast. B: hai protoplast dung hợp trong một cặp. C: các protoplast có thể dung hợp trong thể 3 (bên phải ảnh) hoặc nhiều hơn, có khi tới 6 protoplast.

3.1. Dung hợp protoplast bằng hóa chất

Phương pháp này dùng NaNO_3 hoặc polyethylene glycol (PEG) để kích thích sự dung hợp của hai protoplast.

3.2. Dung hợp protoplast bằng điện (electrofusion)

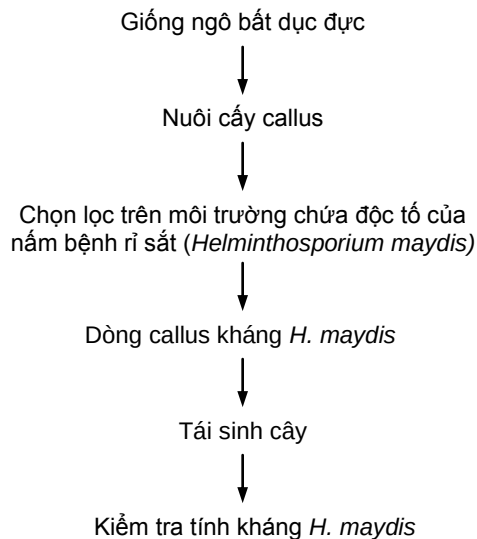
Phương pháp này đơn giản hơn, nhanh hơn và hiệu quả hơn dung hợp bằng hóa chất. Điều quan trọng hơn cả là dung hợp bằng điện không gây độc cho tế bào như thường thấy ở các protoplast hoặc các thể dị nhân được xử lý bằng PEG. Cũng theo hướng này và gần đây đã được chứng minh, người ta đã dùng các xung điện (electric pulse) để đưa trực tiếp DNA ngoại lai vào trong tế bào thực vật (biến nạp bằng điện-electroporation, xem chương 5). Trong dung hợp bằng điện, đầu tiên các protoplast được đưa vào trong ngăn dung hợp nhỏ có 2 dây kim loại song song với nhau đóng vai trò là các điện cực. Tiếp đó, sử dụng điện áp (voltage) thấp và trường AC dao động nhanh (rapidly oscillating AC field) để kích thích các protoplast sắp thành từng chuỗi tế bào (chuỗi ngọc trai-pearl chain) giữa các điện cực. Phương thức này cho phép các tế bào tiếp xúc hoàn toàn với nhau trong một

vài phút. Sau khi các tế bào xếp hàng hoàn chỉnh, quá trình dung hợp được thực hiện theo từng đợt ngắn của xung DC điện áp cao (high-voltage DC pulse). Xung DC điện áp cao tạo ra sự phá vỡ thuận nghịch của màng nguyên sinh chất ở vị trí tiếp xúc của các tế bào, tạo ra sự dung hợp và tái tổ chức lại màng một cách hợp lý. Một quá trình hoàn chỉnh bắt đầu từ lúc đưa các protoplast vào bên trong ngăn và chuyển chúng lên môi trường nuôi cấy, có thể được hoàn chỉnh trong năm phút hoặc ít hơn.

4. Chọn dòng biến dị soma

Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc tế bào thực vật ở ba mức độ chính: callus, tế bào đơn (single cell) và protoplast. Mục đích chọn lọc *in vitro* có thể khái quát ở những điểm sau:

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, ví dụ: chống chịu nóng-lạnh, phèn-mặn, khô hạn...
- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố: độc tố do nấm bệnh tiết ra (Hình 7.2), các loại kháng sinh...
- Chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa (overproduction) các loại sản phẩm chủ yếu là amino acid...
- Chọn dòng tế bào mang các đặc điểm chỉ thị để nghiên cứu di truyền (genetic markers)...



Hình 7.2. Sơ đồ chọn dòng kháng *Helminthosporium maydis* ở ngô

Hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy *in vitro*. Nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô biểu hiện ở sự thay đổi tính trạng của các cây tái sinh và sau đó truyền sang thế hệ sau bằng phương thức nhân giống hữu tính (ví dụ rau diếp, thuốc lá) hoặc dinh dưỡng (ví dụ mía, khoai tây).

Các biến dị chọn lọc được trong nuôi cấy mô có nhiều cách gọi khác nhau như: dòng callus (calliclones-từ nuôi cấy callus) hoặc dòng protoplast (protoclones-từ nuôi cấy protoplast). Tuy nhiên, thuật ngữ biến dị dòng soma (somaclonal variation) được sử dụng phổ biến nhất, hoặc biến dị dòng giao tử (gametoclinal variation) để chỉ các dòng bị biến đổi di truyền phát triển từ các tế bào giao tử hoặc thể giao tử. Sự đa dạng của biến dị ở các dòng soma làm nổi bật một thực tế rằng biến dị dòng soma là một công cụ rất hữu hiệu cho việc cải thiện di truyền cây trồng.

5. Chuyển gen vào cây trồng

Nói chung, hầu hết các loài thực vật đều có thể chuyển được gen. Bảng 7.1 và Hình 7.3 giới thiệu một số loài cây trồng có giá trị kinh tế đã được chuyển gen thành công. Thông thường, hiệu quả chuyển gen khác nhau tùy thuộc vào từng loại cây trồng, và dĩ nhiên quá trình chuyển gen vẫn còn bị hạn chế ở nhiều loài. Dưới đây chỉ trình bày các kết quả chuyển gen thành công ở một giống cây trồng quan trọng.

5.1. Cây lúa

Kết quả tái sinh của cây lúa chuyển gen bằng xung điện hoặc PEG thông qua nuôi cấy protoplast được thông báo lần đầu tiên cách đây khoảng hơn 10 năm. Các nghiên cứu sau đó cũng đã sử dụng hai kỹ thuật này để chuyển gen vào protoplast và phục hồi các cây biến nạp hữu thụ. Tuy nhiên, hạn chế của hai phương pháp này là phải xây dựng phương thức tái sinh cây từ tế bào đơn. Mặc dù các phương thức này đang dùng cho một số giống lúa thuộc loài phụ japonica (chẳng hạn Taipei 309) nhưng hầu hết các giống japonica ưu tú cũng như phần lớn các giống indica đều khó tái sinh cây từ protoplast.

Bảng 7.1. Một số cây trồng chính đã được chuyển gen

Stt	Loài	Phương pháp chuyển gen	Thử nghiệm trên đồng ruộng
1	Chuối	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
2	Lúa mạch	Bắn gen	Kháng vi rus
3	Đậu tây	Bắn gen	-
4	Canola	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ, điều khiển sự thụ phấn
5	Sắn	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
6	Ngô	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
7	Bông	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
8	Đu đủ	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
9	Đậu phụng	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
10	Bạch dương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
11	Khoai tây	<i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, kháng virus, chống chịu chất diệt cỏ
12	Lúa	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
13	Đậu tương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
14	Bí	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
15	Củ cải đường	<i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
16	Mía	Bắn gen	-
17	Hướng dương	Bắn gen	-
18	Cà chua	<i>Agrobacterium</i>	Quả chín muộn, kháng virus
19	Lúa mì	Bắn gen	-



Hình 7.3. Một số cây trồng chuyển gen. A: ngô kháng côn trùng. B: lúa mạch kháng virus. C: cà chua cho quả chín muộn . D: khoai tây chống chịu chất diệt cỏ.

Phương pháp bắn gen cho phép thực hiện việc chuyển nạp hiệu quả ở lúa trong các kiểu gen độc lập, và hiện nay hơn 40 giống đã được chuyển gen thành công. Mẫu vật sử dụng là phôi non và các callus có nguồn gốc từ hạt trưởng thành. Kháng hygromycin B là gen chỉ thị chọn lọc thường được dùng cho lúa. Tần số chuyển gen có thể cao tới 50% (tính theo số cây chuyển gen có nguồn gốc độc lập/số mẫu được bắn gen).

Gần đây, kỹ thuật chuyển gen ở lúa thông qua *Agrobacterium* cũng đã có những cải tiến quan trọng có hiệu quả tương đương với kỹ thuật bắn gen.

5.2. Cây lúa mì

Phương pháp bắn gen cũng được sử dụng để chuyển gen ở lúa mì. DNA ngoại lai được bắn vào trong các vảy nhỏ (scutellum) của phôi non của hai giống mùa xuân và một giống mùa đông. Các callus chống chịu

được chọn lọc bằng phosphinothricin hoặc các nhân tố ức chế trao đổi chất tương tự như basta, bialaphos hoặc glufosinate ammonium. Chọn lọc bằng các hợp chất như thế không hiệu quả lắm và kết quả là một số lớn cây thất thoát. Phân tích di truyền và phân tử đã xác nhận sự hợp nhất ổn định của các gen biến nạp. Nói chung, công nghệ di truyền lúa mì vẫn còn tập trung ở một hoặc hai giống đặc trưng có khả năng tái sinh cây nhanh, thích hợp với phương pháp bắn gen.

5.3. Cây lúa mạch

Wan và Lemaux (1994), đã tái sinh một số lượng lớn các cây lúa mạch chuyển gen độc lập, tự thụ phấn. Các phôi hợp tử non, các callus mới hình thành và các phôi có nguồn gốc từ tiểu bào tử hạt phấn đã được sử dụng để bắn gen với plasmid mang gen *bar* và *gusA* đơn độc hoặc phối hợp với plasmid khác mang gen protein vỏ của virus gây bệnh lùn vàng ở lúa mạch. Kiểm tra khả năng nảy mầm của phôi non để phân lập các cây biểu hiện hoạt tính *bar* bằng môi trường chứa bialaphos, mặc dù đây chưa phải là một chất chỉ thị tốt cho sự có mặt hoặc không của gen.

5.4. Cây đậu tương

Những cố gắng đầu tiên ở cây đậu tương chuyển gen tập trung ở việc tái sinh cây từ protoplast và nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi. Mặc dù có những thành công ban đầu, tiến triển của công việc này vẫn còn chậm và việc phục hồi các cây chuyển gen vẫn đang còn gặp nhiều khó khăn. Sau đó, công nghệ chuyển gen ở đậu tương đã có triển vọng hơn nhờ sự phát triển và tối ưu hóa của kỹ thuật bắn gen. Thực tế, đậu tương đã được dùng như một cây mô hình để phát triển kỹ thuật cho nhiều loài cây trồng khó áp dụng công nghệ di truyền.

Kết quả đầu tiên ở đậu tương là tái sinh thành công cây chuyển gen nhờ *Agrobacterium*. Phương thức này dựa vào sự phát sinh chồi từ lá mầm của giống Peking chọn lọc cho tính miễn cảm với *Agrobacterium*. Các mẫu lá mầm được xâm nhiễm với *Agrobacterium* mang plasmid kháng kanamycin và có hoạt tính *gusA*, hoặc kháng kanamycin và chống chịu glyphosate. Có thể chuyển gen hiệu quả vào protoplast đậu tương bằng các phương thức thông dụng nhưng rất khó tái sinh được cây.

Để chuyển gen vào các giống đậu tương khác nhau người ta đã phối hợp hai yếu tố: genotype đơn giản và phương thức tái sinh cây độc lập (dựa trên cơ sở sự tăng sinh của cụm chồi từ vùng chung quanh mô phân sinh của trụ phôi) với sự tăng gia tốc của vi đạn (particle) có phóng điện để phân phối DNA ngoại lai. Hàng trăm cây đậu tương có nguồn gốc độc lập đã thu được và kết quả chuyển nạp đã cho nhiều phenotype khác nhau. Nói chung, ở các dòng đậu tương chuyển gen có nhiều bản sao của các gen chuyển nạp (số bản sao khoảng từ 1-50 nhưng thường thay đổi từ 2-10). Phân tích DNA (Southern blot) ở thế hệ sau của các bản sao gen phức tạp cho thấy tất cả các bản sao cùng tách rời, như thế mỗi các thể chuyển gen chỉ hiện diện một kết quả chuyển nạp độc lập và có thể sự tái tổ hợp thông nhất đã không xuất hiện thường xuyên.

5.5. Cây đậu tây

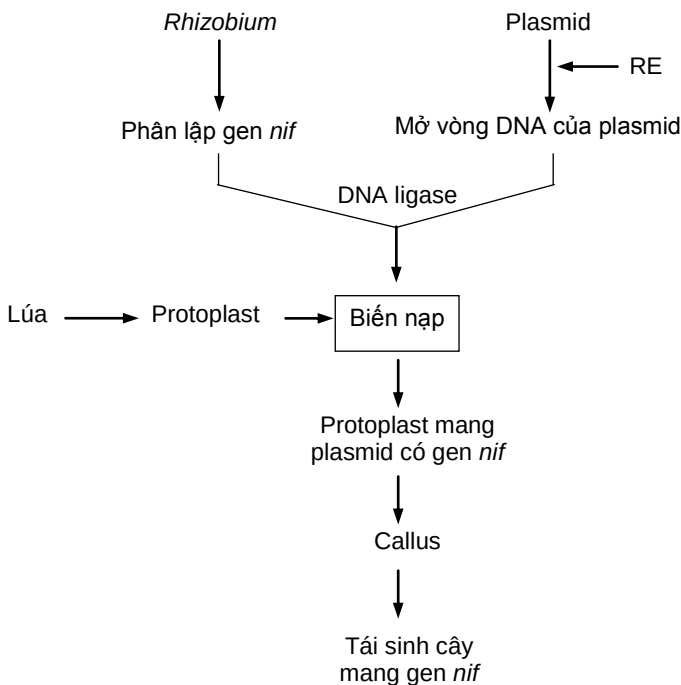
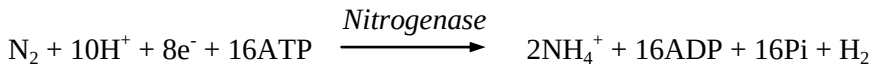
Cho đến nay, việc nghiên cứu chuyển gen ở *Phaseolus* thành công rất ít. Hai hướng được ứng dụng trong công nghệ di truyền ở đậu tây là kỹ thuật xâm nhiễm bằng *Agrobacterium* và bắn gen. Tuy nhiên, chỉ có kỹ thuật sau mới có khả năng tái sinh các cây chuyển nạp. Cây đậu tây chuyển gen biểu hiện các gen *gusA*, *bar* và protein vỏ của virus khảm màu vàng đã được tái sinh. Các cây chuyển gen này qua 5 thế hệ tự thụ phấn vẫn không mất các gen được biến nạp hoặc khả năng biểu hiện. Kỹ thuật bắn gen cũng được sử dụng để chuyển gen *gusA* được điều khiển bằng promoter concanavalin A, hoạt tính *gus* đã biểu hiện trong lá mầm và vỏ hạt của các cây chuyển gen.

5.6. Cây bông

Phương thức chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng để đưa gen vào cây bông giống Coker 312 (Umbeck 1987). Cây bông chuyển gen cũng của giống trên đã được tái sinh sau khi bắn gen vào dịch huyền phù nuôi cấy phát sinh phôi (Finer và McMullen 1990). Hầu hết các giống bông có giá trị kinh tế khác không thể tái sinh cây từ giai đoạn callus. Một số ít các giống đó có thể tái sinh cây nhưng quá trình này thiên về biến dị dòng soma. Phương thức phân phối gen ngoại lai trực tiếp vào trong mô phân sinh của trụ phôi dựa trên công nghệ ACCELL cũng được phát triển và đã thu được cây chuyển gen.

5.7. Cố định đạm

Quá trình cố định đạm diễn ra ở rễ của các loài cây họ đậu nhờ một số loài vi khuẩn cộng sinh có khả năng hấp thụ nitrogen của không khí và tạo ra chất đạm cho cây. Vi khuẩn chính tham gia quá trình cố định đạm là *Rhizobium*. Sự có mặt của nó dẫn đến hình thành các nốt sần trên rễ cây nhiễm khuẩn. Các vi khuẩn sống trong nốt sần sẽ thực hiện quá trình cố định đạm. Phương trình tổng quát có dạng sau:



Hình 7.4. Mô hình biến nạp gen *nif*

Để tăng mức độ cung cấp đạm tự nhiên cho cây trồng, người ta chọn giải pháp chuyển gen *nif* (nitrogen fixation-gen mã hóa enzyme nitrogenase) vào cơ thể thực vật và vi sinh vật sống tự do hoặc sống cộng sinh với thực vật (Hình 7.4). Vì trong tự nhiên, giữa các cơ thể vi sinh vật vẫn xảy ra sự

trao đổi thông tin di truyền, như vậy về mặt kỹ thuật việc chuyển gen *nif* vào cơ thể vi sinh vật sẽ dễ dàng hơn. Vấn đề còn lại là làm thế nào để gen *nif* hoạt động sau khi được chuyển vào cơ thể vi sinh vật chủ. Tương tự, việc chuyển gen *nif* vào tế bào thực vật có thể được thực hiện thông qua viral vector hoặc vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Tuy nhiên, đây là một công việc khó khăn và có lẽ trong một tương lai gần vấn đề này vẫn chưa giải quyết được.

III. Chăn nuôi và thú y

1. Kỹ thuật cấy chuyển phôi

Kỹ thuật đã được ứng dụng khá rộng rãi hiện nay là cấy chuyển hợp tử ở bò. Nguyên lý của kỹ thuật này là gây rụng trứng ở bò cái có các đặc điểm mà ngành chăn nuôi cần đến và cho thụ tinh với tinh trùng của bò đực cũng mang những đặc điểm mong muốn. Các hợp tử hay phôi thu nhận bằng cách rửa dạ con. Đông lạnh phôi và bảo quản chúng trong nitrogen lỏng ở -179°C , phôi ở điều kiện này được vận chuyển dễ dàng đến nơi cần thiết. Sau đó, phôi được cấy vào bò cái khác để mang thai hộ. Bê con phát triển từ các phôi này sẽ ra đời trong môi trường sống của nó và không gặp phải những bất lợi về mặt môi trường như đối với các gia súc nhập nội.

Kỹ thuật cấy phôi còn cho phép tạo ra gia súc sinh đôi hoặc sinh ba (hoặc nhiều hơn nữa) hoàn toàn giống nhau về mặt di truyền. Nguyên tắc của kỹ thuật này là chia noãn bào đã thụ tinh của gia súc thành hai hoặc ba phần (hoặc hơn nữa) giống nhau. Sau đó, cấy ngược lại vào con cái chữa đẻ hộ.

Mặt khác, kỹ thuật cấy chuyển phôi còn giúp xác định giới tính của vật nuôi, việc này đem lại hiệu quả kinh tế cao. Chẳng hạn, người ta chỉ quan tâm lấy phôi bò đực để tạo bò lấy thịt, trong khi phôi bò cái được dùng để tạo bò lấy sữa, hoặc để bảo vệ những giống bò ưu việt. Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên cơ sở phân chia tinh dịch thành hai nhóm: nhóm chứa nhiễm sắc thể X tạo ra bê cái, và nhóm chứa nhiễm sắc thể Y tạo ra bê đực. Người ta chỉ cần chọn một trong hai nhóm để thụ tinh trong ống nghiệm rồi sau đó chuyển phôi được tạo ra vào bố mẹ.

2. Tạo chế phẩm phòng tránh bệnh cho động vật

Công nghệ sinh học trong những năm gần đây đã có những đóng góp không nhỏ, chủ yếu là tạo ra các vaccine thể hệ mới nhờ áp dụng công nghệ

DNA tái tổ hợp, chẳng hạn như vaccine phòng bệnh lở mồm long móng (Foot and Mouth Disease Virus-FMDV), bệnh Theileriosis (bệnh sốt bờ biển đông-East Coast Fever) ở gia súc, bệnh sốt lợn Châu Phi, bệnh Newcastle, bệnh cầu trùng ở gia cầm...

Bệnh toi gà do virus gây ra ở gia cầm, đặc biệt là gà. Virus này thuộc nhóm Paramyxovirus, bao gồm cả virus quai bị, thuộc họ Paramyxoviridae (họ này bao gồm cả virus gây bệnh lợn gạo). Virus có khả năng làm ngưng kết hồng cầu, thông qua một loại protein F của nó. Loại protein này có khả năng gây miễn dịch và được dùng làm vaccine.

Bệnh lở mồm long móng là loại bệnh do virus, lây lan rất nhanh và gây bệnh cho khoảng 30 loài động vật móng guốc, đặc biệt nguy hiểm đối với trâu, bò, lợn và cừu. Khi có dịch, để tránh bệnh lây lan, phải tiêu diệt hàng loạt gia súc nhiễm bệnh, thực hiện các biện pháp cách ly nghiêm ngặt. Người ta đã thành công trong việc dùng enzyme trypsin xử lý vỏ protein và nhận thấy một trong số các protein vỏ của nó có thể tạo được miễn dịch, kích thích sản sinh kháng thể. Năm 1985, các nhà khoa học đã xác định được gen mã hóa loại protein này và tạo dòng nó trong *E. coli*, biến *E. coli* thành “nhà máy” sản xuất protein nói trên và khi tiêm vào bò, lợn thì chúng trở nên miễn dịch đối với loại virus gây bệnh lở mồm long móng.

3. Chuyển gen vào động vật

Một trong những thí nghiệm chuyển gen đầu tiên đã được tiến hành là gắn gen mã hóa cho hormone sinh trưởng của chuột cống và promoter methallothionein của chuột nhắt vào plasmid vector, sau đó vector này được tiêm vào tế bào trứng của chuột nhắt đã thụ tinh. Kết quả là chuột nhắt chuyển gen này lớn nhanh hơn chuột nhắt bình thường. Kiểm tra mô chuột nhắt chuyển gen thấy rằng promoter methallothionein điều hòa sự biểu hiện gen hormone sinh trưởng trong gan nhiều hơn trong tuyến yên mặc dù ở chuột thường thì tuyến yên là chính. Điều này cho thấy việc chuyển gen đã thoát khỏi sự kiểm tra điều hòa của tuyến yên, dẫn đến việc sản xuất một lượng lớn hormone sinh trưởng.

Lợn chuyển gen tổng hợp hormone sinh trưởng của người tuy không lớn hơn về kích thước nhưng lại có lượng thịt nạc nhiều hơn, ít mỡ hơn và tiêu tốn thức ăn ít hơn từ 20-30%. Tuy nhiên, các động vật chuyển gen dễ bị

thấp khớp, stress và mất khả năng sinh sản cũng như định hướng chuyển động.

Như chúng ta đã biết cystein cần cho sự phát triển lông, nhưng do cừu thiếu khả năng tổng hợp amino acid này và do các vi sinh vật đường ruột của cừu sử dụng phần lớn cystein sẵn có nên đã ảnh hưởng xấu đến sản lượng lông cừu. Để khắc phục điều này, người ta đã tạo dòng hai gen vi khuẩn mã hóa cho enzyme chuyển hóa serine thành cystein. Sự ổn định của các gen này trong cừu chuyển gen sau đó đã giúp cừu tự tổng hợp được cystein làm tăng sự phát triển của bộ lông.

Hiện nay, các nhà khoa học cũng đã có những thành công bước đầu trong việc chuyển các gen người vào lợn nhằm mục đích lấy phủ tạng của chúng (tim, gan, thận...) để cấy ghép, thay thế cho các bộ phận bị hư hỏng của người. Như vậy, công nghệ gen mở ra cho y học một khả năng to lớn trong lĩnh vực cấy ghép các bộ phận cho người và một triển vọng giải quyết vấn đề miễn dịch cấy ghép.

Bên cạnh việc chờ đợi những thành công mới của công nghệ chuyển gen trực tiếp cho vật nuôi, người ta cũng đang tìm kiếm các biện pháp mới để tăng năng suất vật nuôi bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Chẳng hạn, một loại hormone tăng trưởng tái tổ hợp của bò (recombinant bovine growth hormone) được chuyển vào *E. coli* đã sản xuất thành công loại hormone trên, và có thể kích thích tăng sản lượng sữa ở bò lên tới 15% mà không cần phải gia tăng thêm khẩu phần thức ăn hàng ngày. Hoặc gen sản xuất hormone sinh trưởng của gà cũng được đưa vào *E. coli*, và người ta đã chứng minh được rằng hormone được sản xuất bằng kỹ thuật trên cho phép tăng khả năng sinh trưởng của gà lên khoảng 15%.

IV. Chế biến thực phẩm

Đây là lĩnh vực công nghệ sản xuất thực phẩm từ nông sản có sự tham gia của vi sinh vật, cũng như sự đóng góp của công nghệ sinh học hiện đại trong việc nâng cao hiệu suất của các quy trình sản xuất nói trên. Thực phẩm được tạo ra bởi vi sinh vật rất đa dạng, từ các sản phẩm truyền thống có nguồn gốc xa xưa như men bánh mì, phomát, sữa chua, rượu vang, rượu cất, đến những sản phẩm mới xuất hiện như protein nấm (mycoprotein)...

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.

Theo đánh giá chung, hiện nay mới chỉ khoảng 15% thực phẩm trên thế giới được sản xuất bằng các quy trình công nghệ sinh học. Do vậy, ảnh hưởng của công nghệ sinh học hiện đại trong lĩnh vực này thực sự chưa rõ nét. Nguyên nhân có thể là do ngành công nghiệp chế biến thực phẩm hiện nay vẫn mang nặng tính thủ công, công nghệ chưa hiện đại, ngành công nghiệp chế biến thực phẩm có quy mô to lớn nhưng lại có lợi nhuận nhỏ, do vậy khó có khả năng tái đầu tư.

Tuy vậy, trong tương lai khi công nghệ chế biến thực phẩm truyền thống không đáp ứng được nhu cầu ngày càng gia tăng của con người, thì ảnh hưởng và vai trò của công nghệ sinh học hiện đại sẽ gia tăng rất mạnh.

1. Sản xuất sữa

Các sản phẩm sữa quen thuộc đối với chúng ta đều được tạo ra trong quá trình lên men của một số nhóm vi khuẩn như *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostos*... Trước kia người ta thường sử dụng những nhóm vi khuẩn tự nhiên có mặt trong sữa để lên men, do vậy quá trình lên men nói chung khó kiểm soát và hiệu suất không cao. Ngày nay, nhờ việc tạo ra được các giống, chủng vi khuẩn với các tính chất xác định, người ta có khả năng điều khiển được quá trình lên men nói trên một cách có định hướng. Các sản phẩm chủ yếu từ sữa là phomat, sữa chua, bơ, kem sữa...

1.1. Sản xuất sữa chua

Trong sữa có sẵn một hệ vi sinh vật phong phú, đó là vi khuẩn lactic (gây lên men lactic), vi khuẩn acetic (lên men acetic), vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn gây thối (phân giải chất hữu cơ thành các mùi thối), nấm men, nấm mốc...

Trong sản xuất sữa chua bằng lên men lactic, vi khuẩn dùng để lên men chính là một số chủng thuộc *Lactobacterium bulgaricum*... có sẵn trong sữa. Trong công nghiệp sản xuất sữa chua, người ta tiến hành thanh trùng sữa rồi cấy vi khuẩn lactic vào.

Quy trình sản xuất sữa chua theo quy mô công nghiệp như sau:

1.1.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu duy nhất là sữa (có thể bổ sung thêm đường). Sữa dùng trong sản xuất sữa chua gồm những loại sau:

- Sữa tươi nguyên hay sữa đã tách béo.
- Sữa khô nguyên hay sữa sấy phun không béo.
- Sữa đặc nguyên hay sữa đặc không đường.

Các loại sữa trên trước khi đưa vào sử dụng cần phải xử lý qua các khâu:

- Điều chỉnh hàm lượng lipid thích hợp thường từ 3,2-6%.
- Nếu trên bề mặt sữa xuất hiện váng sữa thì tiến hành quá trình đồng hóa để trở thành một thể đồng nhất.
- Tiệt trùng sữa 85-90°C trong 15-20 phút. Để nguội sữa đến nhiệt độ cần thiết cho sự lên men để cấy giống vào, thường từ 40-50°C.

1.1.2. Giống

Các chủng lactic thuần khiết thường được dùng để sản xuất là: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium acidophilum*, *Lactobacillus delbrueckibulgaricus*. Thường hai chủng đầu được cùng sử dụng với số lượng bằng nhau. Nếu *Streptococcus thermophilus* có số lượng nhiều hơn, lúc đó sữa chua thu được sẽ quá chua và kém mịn.

1.1.3. Lên men tạo sữa chua

Quy trình sản xuất sữa chua qua hai giai đoạn: giai đoạn đông tụ sữa và giai đoạn giữ chín sữa chua.

- Giai đoạn đông tụ sữa

Sữa sau khi tiệt trùng được cấy giống vào và khuấy đều để lên men bằng phương pháp bể hoặc chai. Ở giai đoạn này quá trình lên men được tiến hành ở 29-35°C. Quá trình lên men lactic xảy ra mạnh mẽ, casein sữa bị kết tủa ở điểm pH đẳng điện, sữa được đông tụ và đạt độ chua cần thiết. Thường căn cứ vào cục đông của sữa và độ chua để kết thúc quá trình lên men. Cục đông phải đặc, đồng nhất, không có hiện tượng nước-sữa tách rời

nhau ra. Độ chua phải đạt 60-80^oT. Thời gian lên men (thường 8-12 giờ) có thể thay đổi khác nhau tùy thuộc vào chủng vi khuẩn và nhiệt độ lên men. Khi sữa có độ chua cần thiết thì kết thúc quá trình lên men bằng phương pháp làm lạnh nhanh (6-8^oC) để tránh tình trạng độ chua tăng và nước sẽ tách ra khỏi sữa.

- Giai đoạn giữ chín sữa chua

Trong giai đoạn này quá trình lên men lactic vẫn còn xảy ra ở mức độ yếu, sữa tiếp tục được đông tụ. Lúc này lipid trong sữa trở nên rắn, nước tự do liên kết với protein làm sữa đông đặc thêm. Giai đoạn này còn xảy ra quá trình tạo hương cho sữa làm cho sữa có mùi rất đặc trưng bằng cách bổ sung vaniline, hương vị trái cây tự nhiên (dâu, cam, dứa...) hay hương tổng hợp, màu thực phẩm. Thời gian của giai đoạn này từ 12-14 giờ.

1.2. Sản xuất phomat

Phomat là sản phẩm lên men được chế biến từ sữa (sữa bò, sữa dê...) với sự tham gia của một số nhóm vi sinh vật. Đây là một thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, bảo quản được lâu. Trong phomat chứa 20% protein (dưới dạng peptone, amino acid), 30% lipid, các muối khoáng, vitamin...

Phomat có mùi vị thơm ngon, kích thích quá trình tiết dịch tiêu hóa, làm tăng khả năng đồng hóa thức ăn cho cơ thể. Quy trình sản xuất phomat được tiến hành qua bốn giai đoạn. Cũng như sản xuất sữa chua, nguyên liệu chính ở đây là sữa.

- Giai đoạn làm đông sữa

Từ nguyên liệu sữa ban đầu, sữa được làm đông lại. Về mặt hóa lý đó là giai đoạn làm kết tủa: những micelle của casein dính lại với nhau để hình thành một gel đặc, rắn chứa huyết thanh sữa bên trong. Sau khi được khử trùng ở 85-90^oC trong 15-20 phút, được xử lý bằng rennin với một lượng nhỏ vừa đủ, sau một thời gian nhất định sữa sẽ đông lại thành một khối nhầy phủ gelatin, mềm dẻo, không thấm nước.

Để làm đông tụ sữa, ngoài vai trò của rennin người ta còn sử dụng vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lactic được tạo điều kiện hoạt động ở 30^oC. Khi tiến hành làm đông tụ sữa, người ta cấy vi khuẩn lactic vào môi trường sữa. Quá trình lên men lactic được tiến hành, chuyển đường lactose của sữa thành lactic acid. Kết quả là quá trình này cũng gây ra sự đông tụ sữa như đã trình

bày ở trên (các sợi micelle của casein sữa lại kết thành cục rắn chứa huyết thanh sữa ở bên trong). Khi quá trình lên men lactic xảy ra, pH môi trường sẽ giảm, pH hướng về môi trường acid là pH thích hợp cho hoạt động của enzyme đông tụ sữa. Điều này dẫn đến sự đông tụ sữa càng xảy ra nhanh hơn. Ở giai đoạn này, dưới tác dụng của rennin, casein và paracasein của sữa sẽ bị phân giải tạo peptone và amino acid (tyrosine, tryptophan...) tập trung lại trong cục đông. Huyết thanh sữa ở bên ngoài cục đông tồn tại ở dạng dung dịch.

- Giai đoạn khử nước

Giai đoạn này ép cục sữa để tách huyết thanh ra khỏi cục đông sữa. Quá trình này xảy ra ở 35-50°C trong 20-24 giờ. Trong thời gian này quá trình lên men lactic vẫn tiếp tục. Phomat lúc này có thành phần chủ yếu là casein và lipid.

- Giai đoạn muối phomat

Ngay sau khi ép cục đông để tách huyết thanh, phomat được ngâm vào bể nước muối NaCl nồng độ 24% trong vài ngày để tăng vị mặn cho phomat, tạo sự đồng nhất về thành phần cho khối phomat và ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật có hại, chủ yếu là trực khuẩn đường ruột. Kết quả của quá trình ngâm muối là các chất ở bề mặt của khối phomat như đường, muối khoáng sẽ khuếch tán ra ngoài, ngược lại NaCl từ ngoài dung dịch ngâm sẽ thấm vào bên trong khối phomat. Muối ăn thấm vào lớp bề mặt của phomat, tạo lớp bảo vệ chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật có hại.

- Giai đoạn ủ chín phomat

Phomat được đưa vào hầm làm chín ở 50-57°C có độ ẩm là 80-90%. Quá trình làm chín phomat kéo dài khá lâu từ vài tháng đến hàng năm, bao gồm nhiều khâu chuyển hóa hóa sinh phức tạp, có nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau tham gia cùng với men đông tụ sữa. Hoạt động của vi khuẩn lactic và rennin có mối liên hệ mật thiết với nhau dẫn đến làm tăng chất lượng của phomat trong giai đoạn này.

Sau khi chế biến xong, trước khi được cắt ra và đóng gói bằng giấy nhôm, oliofilm, rilsan, phomat được khử trùng bằng cách chiếu tia tử ngoại. Việc đóng gói được tiến hành trong điều kiện vô trùng, cuối cùng thu được thành phẩm.

2. Chế biến tinh bột

Sản phẩm truyền thống từ bột mì rất đa dạng và được tạo ra trong những quy trình sản xuất khác nhau. Tuy nhiên, chúng có một điểm chung là sử dụng nấm men bánh mì *Sac. cerevisiae* để lên men. Cho đến những năm 1950, tinh bột chủ yếu được thủy phân bằng công nghệ sử dụng acid. Vào những năm 1960, bằng công nghệ thủy phân acid kết hợp với xử lý enzyme và sau này chủ yếu bằng enzyme.

Thường người ta thủy phân tinh bột bằng α -amylase và amyloglycosidase, là hai enzyme có tốc độ thủy phân cao, không gây ô nhiễm môi trường và tạo ra sản phẩm có hệ số đương lượng dextrose DE (dextrose equivalent) cao. Hệ số DE phản ánh mức độ thủy phân tinh bột thành đường glucose (dịch đường glucose nguyên chất có DE = 100, còn dịch tinh bột có DE = 0). Hiện nay, người ta đã tạo được một số chủng vi khuẩn, trong đó có *Bacillus licheniformis* và *Bac. amyloliquefaciens*, có khả năng tổng hợp α -amylase chịu nhiệt hoạt động được ở nhiệt độ tới 100°C. Điều này cho phép quá trình hồ hóa thực hiện được triệt để, tạo điều kiện cho giai đoạn đường hóa tiếp theo, tạo ra dịch đường có DE gần tới 100. Thông thường, người ta tiến hành đường hóa bằng glucoamylase nhận được từ nấm *Aspergillus niger*.

Dịch có hàm lượng glucose cao được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau, trong đó chủ yếu là để làm nguyên liệu lên men. Tuy nhiên, gần đây mới xuất hiện hướng sản xuất sirô fructose-glucose từ dịch glucose. Hiện nay, sản phẩm này đang được sử dụng rộng rãi trong ngành chế biến thực phẩm ở các nước phát triển để thay thế đường saccharose truyền thống từ mía và củ cải đường. Thông thường, sirô fructose-glucose được tạo ra từ glucose của dịch thủy phân tinh bột có DE gần 100, thông qua quá trình khử ion và đồng phân hóa dịch glucose bởi glucose isomerase do *Streptomyces*, *Bac. coagulans* và *Actinoplanes missouriensis* tạo ra. Trong đó, qua một lần xử lý người ta nhận được sirô chứa khoảng 51% glucose, 42% fructose và 7% oliogossacaride. Nếu xử lý tiếp sẽ có thể nhận được sirô chứa tới 90% fructose.

3. Sản xuất nước uống lên men

Các loại nước uống lên men có cồn nói chung đều được sản xuất từ nguyên liệu chứa đường. Trong đó, quá trình tạo ethanol bằng lên men của các chủng nấm men thuộc giống *Saccharomyces* là quá trình chung, còn

từng loại nước uống lên men có còn lại có quy trình sản xuất riêng của mình.

3.1. Sản xuất bia

Bia là nước giải khát chứa nước, CO₂, rượu, các chất chiết xuất, carbohydrate... Cơ sở khoa học của lên men sản xuất bia là sự trao đổi chất trong quá trình sinh trưởng, phát triển của một số loài vi sinh vật trong điều kiện yếm khí.

Quá trình sản xuất bia chủ yếu dựa vào sự lên men đường của mầm đại mạch (hiện nay có thể thay bằng ngô, gạo, kê...). Bia sản xuất từ mầm đại mạch bao gồm công đoạn chủ yếu là ủ ở 67°C để enzyme tự nhiên trong mầm thủy phân tinh bột của hạt đại mạch, bổ sung hoa bia và dịch thủy phân, ủ để dịch lên men bia, cuối cùng tách men bia và giữ bia tươi một thời gian để bia chín. Bia hơi là loại bia sử dụng ngay không qua khử trùng. Bia chai và bia lon bảo quản được lâu vì đã qua khử trùng ở 55-60°C hoặc qua lọc, đóng chai hoặc đóng hộp bằng các thao tác vô trùng.

Các chủng nấm men được sử dụng chủ yếu trong sản xuất bia là *Sac. cerevisiae* và *Sac. calshbergensis*. Trong đó *Sac. cerevisiae* được sử dụng cho cả lên men bề mặt và lên men chìm để sản xuất các loại nước giải khát lên men. Còn *Sac. calshbergensis* dùng để sản xuất bia nhẹ.

Quá trình lên men bia gồm 2 giai đoạn: lên men chính và lên men phụ.

3.1.1. Lên men chính (chủ yếu dùng lên men chìm)

Ở giai đoạn này tế bào nấm men sinh trưởng mạnh, một lượng lớn cơ chất được chuyển thành ethanol, CO₂ và H₂O. Thời gian lên men khoảng 6-10 ngày. Nhiệt độ yêu cầu từ 28-30°C, pH môi trường 5,3-6. Trong giai đoạn này có hiện tượng tạo bọt do khí CO₂ tạo ra lúc đầu tan trong dung dịch, sau với liều lượng cao sẽ tách ra tạo thành túi khí, tạo cơ sở cho sự tạo bọt. Kết thúc giai đoạn lên men chính tạo ra được sản phẩm gọi là bia non. Bia non có đặc điểm còn đục, có mùi vị đặc trưng của bia nhưng chưa thích hợp cho việc giải khát.

3.1.2. Lên men phụ

Khác với lên men chính xảy ra trong các thiết bị lên men hở, lên men phụ thực hiện trong các bình kín ở nhiệt độ 0-5°C. Ở giai đoạn này quá trình lên men diễn ra chậm, dịch lên men được lắng đọng và bão hòa CO₂. Giai

đoạn này còn gọi là quá trình ủ chín bia. Thời gian lên men phụ kéo dài từ vài tuần đến vài tháng. Kết thúc giai đoạn này thu được sản phẩm ở dạng dung dịch bão hòa CO₂, có hương vị thơm ngon, dễ chịu nhờ những quá trình chuyển hóa xảy ra ở nhiệt độ thấp. Trong giai đoạn lên men phụ ở nhiệt độ thấp, xảy ra quá trình đông tụ nhựa hoa hublon, các hợp chất tanin-protein, tế bào men lắng xuống đáy bình và tiếp tục lên men từ từ. Kết quả làm bia trong dần. Nhờ vậy, quá trình ly tâm và lọc bia thành phẩm sau này sẽ dễ dàng hơn.

Muốn làm trong bia thường người ta sử dụng phương pháp lọc (dùng chất bột trợ lọc diatomite). Có thể dùng phương pháp ly tâm nhưng sau khi ly tâm cần lọc bia qua lọc ống, lọc khung bản không cần chất trợ lọc thì bia mới thật sự trong suốt. Trong quá trình sản xuất bia người ta sử dụng các túi chất dẻo hay cao su để thu hồi CO₂ thoát ra, sau đó đem bơm vào các bình chịu áp lực cao. Số khí này được dùng để nạp lại vào trong bia, để bia thành phẩm có đủ CO₂.

Để tăng độ bền của bia trong thời gian dài người ta khử trùng 60-70°C trong 30 phút để ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật và các quá trình biến đổi trong bia. Bia thành phẩm có màu vàng, trong suốt, hương vị thơm ngon, bọt nhiều, có vị đắng chất nhẹ đặc trưng. Bia thành phẩm được bảo quản trong kho lạnh ở 0-10°C.

3.2. Sản xuất rượu vang

3.2.1. Quy trình sản xuất rượu vang

Trong rượu vang nguyên liệu chính dùng để sản xuất là trái cây các loại. Tất cả các loại quả có chứa đường, protein, muối khoáng và không chứa các chất độc hại đối với nấm men đều có thể sử dụng để chế biến lên men tạo rượu vang. Vấn đề cần lưu ý là các loại quả khác nhau có thành phần khác nhau sẽ được xử lý bằng những phương pháp khác nhau và có sự bổ sung hay không các chất khác nhau.

- **Nguyên liệu.** Các loại quả như nho, táo, dâu, cam, xoài, mận... đều có thể dùng làm nguyên liệu để lên men rượu vang. Tuy nhiên, trong số đó có những loại quả có chất lượng nước quả thích hợp hơn để lên men rượu vang, lý tưởng nhất là nho (nho có hương vị đậm đà, ngọt, nồng độ cồn ethanol cân đối với vị chua, chất của acid và tannin). Nho cho sản lượng

nước quả cao (1 ha có thể đạt 2-3 vạn lít nước quả). Sau nho, các loại quả như dâu, thơm cũng cho nước quả thích hợp để lên men rượu vang.

- **Chế biến nguyên liệu.** Ở đây đề cập đến các biện pháp xử lý đối với nguyên liệu là quả nho. Quả thu hoạch không để dập nát và tiến hành xử lý theo các cách khác nhau tùy qui mô sản xuất: (1) Sản xuất nhỏ, quả đem giã dập bằng cối sành, cối đá, hay cối gỗ. Không sử dụng dụng cụ bằng sắt hoặc đồng (vì nước quả chua sẽ công phá sắt, đồng làm các ion này tan trong dịch quả, sau này gây kết tủa rượu làm mất màu tự nhiên của rượu). Vắt lấy nước quả bằng tay, hay lọc qua túi lọc bằng vải. Trong trường hợp lên men cả vỏ quả thì không cần lọc bỏ vỏ quả. Quá trình xử lý trên được tiến hành nhanh, vì thời gian xử lý kéo dài nước quả sẽ bị oxy hóa, nhiễm tạp khuẩn làm giảm chất lượng. (2) Sản xuất ở qui mô công nghiệp, quả được ép bằng máy rồi lọc trong phòng chứa CO₂ để ngăn dịch quả bị oxy hóa do tiếp xúc với O₂. Nước quả thu được sau khi chiết không được tùy tiện bổ sung các chất mà phải tuân thủ theo những qui định chung để đảm bảo chất lượng của rượu:

+ Để chống dịch quả bị oxy hóa và tiêu diệt vi khuẩn tạp nhiễm (vi khuẩn acetic, lactic), người ta cho SO₂ vào dịch quả với liều lượng được qui định là 30-120 mg/L. Thường không được pha loãng dịch quả bằng nước, nhưng nếu sử dụng nhiều loại quả khác nhau, thành phần của dịch quả có loại chưa đủ lượng nước cần thiết cho quá trình lên men, vì vậy có thể linh động bổ sung lượng nước để đảm bảo cho quá trình lên men được thực hiện tốt (tuy nhiên, cần lưu ý không cho thêm nước vào dịch quả nho, dâu, cam, dứa...). Pha loãng với 15-20% nước tính theo khối lượng của phần quả ăn được (đối với măng cầu, xoài). Pha thêm 30% nước đối với mơ, mận, đào, dâu da...

+ Thêm đường. Đường là thành phần quan trọng nhất trong dịch quả vì từ đường qua chuyển hoá của vi sinh vật sẽ tạo rượu. Tùy theo loại quả mà ta sẽ bổ sung thêm đường.

+ Điều chỉnh độ chua. Acid hữu cơ là thành phần quan trọng của nước quả. Hàm lượng acid không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng nước quả mà quan trọng hơn là làm thay đổi pH của dịch nước quả, từ đó ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật và các enzyme.

+ Điều chỉnh một số chỉ tiêu khác. Có thể bổ sung thêm nguồn nitrogen bằng muối ammonium, thêm nguồn vitamin bằng vitamin B₁...

Sau khi thực hiện các bước điều chỉnh nói trên, nước quả được cho lên men ngay. Nếu dịch quả thu được không bảo đảm độ tinh sạch cần thiết thì sẽ được tiệt trùng bằng nhiệt độ ở 65-70°C trong 10 phút.

3.2.2. Quá trình lên men tạo rượu vang

- **Giống.** Có thể sử dụng hai nguồn giống sau:

+ Nguồn giống đã được chuẩn bị sẵn dưới các dạng: dịch men giống cấy từ ống giống thuần khiết qua khâu nhân giống các cấp được cấy vào dịch lên men, bánh men khô cấy vào dịch lên men, hoặc dùng dịch lên men đang ở giai đoạn lên men mạnh lấy từ lần lên men trước đó. Các chủng nấm men thường được sử dụng: *Sac. ellipsoideus*, *Sac. cerevisiae*, *Sac. oviformis*...

+ Dùng nấm men dính trên vỏ, rơi vào dịch nước quả một cách tự nhiên để lên men. Dịch quả sẽ chứa một số lượng tế bào nấm men nhất định đủ để thực hiện quá trình lên men rượu. Tuy vậy, phương pháp này thường cho độ rượu thấp và dễ bị tạp nhiễm.

- **Theo dõi quá trình lên men.** Qua một số chỉ tiêu như sau:

+ Hàm lượng đường. Khi lên men phải tạo điều kiện để nấm men hoạt động mạnh, lên men nhanh và tiêu thụ hết đường. Vì vậy, cần theo dõi hàm lượng đường thay đổi trong quá trình lên men.

+ Nhiệt độ. Nếu lên men trong thùng có dung tích lớn, cần đo nhiệt độ vài lần trong ngày, vì trong quá trình lên men nhất là giai đoạn đầu, quá trình lên men mạnh, năng lượng tỏa ra nhiều và lúc ấy nhiệt độ sẽ tăng lên. Nhiệt độ lên men thích hợp là 20-30°C trong suốt quá trình lên men.

+ Hàm lượng oxygen. Mặc dù lên men rượu là một quá trình yếm khí nhưng ở giai đoạn đầu của quá trình lên men cần cho nước quả tiếp xúc với O₂ bằng cách sục khí. Giai đoạn sau mới cho lên men yếm khí.

- **Các giai đoạn lên men rượu vang.** Có ba giai đoạn:

+ Giai đoạn hình thành rượu. Là giai đoạn từ lúc cấy men giống vào, cho lên men đến khi dịch lên men hết sủi bọt mạnh (4-5 ngày). Trong thời gian này nấm men hoạt động mạnh nhất.

+ Giai đoạn phát triển. Sau giai đoạn một, tiến hành gạn cặn và tách xác quả bằng biện pháp lọc (rượu vang đỏ là loại thu được do lên men dịch quả có kèm xác quả). Đây là lần gạn thứ nhất. Khi được “rượu non”, tiếp tục

cho lên men phụ để phân hủy lượng đường cuối cùng còn trong dịch lên men. Ở giai đoạn này có quá trình lên men malolactic cho phép malic acid chuyển hóa thành lactic acid, làm cho rượu được chuyển từ vị chua gắt sang vị chua nhẹ dễ chịu. Tiếp theo, gạn cặn lần hai sau lần một khoảng 20-30 ngày, lần ba sau lần hai khoảng 20 ngày. Nếu rượu còn đục lại gạn tiếp để có dung dịch trong suốt. Sau lần gạn cuối cùng rượu cơ bản ổn định về thành phần. Ở giai đoạn này rượu chưa uống được vì có vị cay, đắng và hơi chua. Được gọi là “rượu sống”.

+ Giai đoạn vang chín. Sau giai đoạn hai, “rượu non” đã ổn định thành phần nhưng rượu vẫn còn “sống”, cần áp dụng một số biện pháp kỹ thuật để rượu được “chín” và tăng chất lượng, như sau: (1) Nút chai hoặc bình đựng “rượu non” thật chặt. (2) Hạ thổ ở độ sâu 50-60 cm ở vùng đất cao, mát và không bị ngập nước từ 4-5 tháng, lúc này rượu có thể uống được tuy chất lượng chưa cao. Nếu để từ hai năm trở lên sẽ thu được rượu có chất lượng hoàn hảo gọi là rượu “chín”.

3.3. Sản xuất rượu trắng (cồn)

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.

3.3.1. Chế biến nguyên liệu thành dịch đường

- **Nguyên liệu.** Được dùng phổ biến hiện nay là loại nguyên liệu có sẵn đường (ri đường) và nguyên liệu có tinh bột (bắp, sắn, khoai lang, bột gạo...).

- **Các phương pháp đường hóa.** Có ba phương pháp phổ biến nhất là đường hóa bằng bánh men, maltase và myco-malt.

+ Phương pháp bánh men. Là phương pháp sản xuất rượu thủ công. Nấm mốc (có hệ enzyme amylase phân giải tinh bột) được nuôi cấy và phát triển trên môi trường có tinh bột sống. Tinh bột sau khi được chuyển sang dạng dễ tan (dùng nhiệt độ cao 130-140°C) mà không nhất thiết phải hồ hóa thành dung dịch, thì amylase của nấm mốc sẽ dễ dàng phân hủy tinh bột. Nhược điểm của phương pháp này là tinh bột không ở dạng dung dịch nên hạn chế tác dụng của amylase và việc sử dụng bánh men dễ gây nhiễm

khuẩn, nên phương pháp này tạo ra nhiều sản phẩm trung gian và hiệu suất tổng thu hồi thấp.

+ Phương pháp maltase. Sử dụng chủ yếu là các enzyme α và β -amylase của hạt đại mạch hoặc tiểu mạch đã nảy mầm (malt) để chuyển hóa tinh bột (đã hồ hóa) thành đường lên men. Ưu điểm của phương pháp này là: thời gian hồ hóa tinh bột ngắn, chất lượng rượu không bị ảnh hưởng mà thường tạo ra những hương vị đặc trưng dễ chịu, ít bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một vài nhược điểm: hiệu suất đường hóa không cao và không triệt để vì phức hệ amylase trong mầm thóc không hoàn chỉnh, tỷ lệ malt sử dụng so với hàm lượng tinh bột có trong nguyên liệu tương đối cao (8-20%), giá thành sản phẩm cao.

+ Phương pháp myco-malt. Đây là phương pháp được dùng phổ biến hơn cả. Quá trình đường hóa ở đây dùng enzyme của vi sinh vật (chủ yếu là của nấm mốc). Đa số nấm mốc được sử dụng thuộc chi *Aspergillus* như: *Asper. niger*, *Asper. oryzae*, *Asper. flavus*, *Asper. awamori*. Các chủng nấm mốc được sử dụng để đường hóa tinh bột được nuôi cấy theo hai phương pháp: nuôi cấy bề mặt (thường dùng cho *Asper. awamori* và *Asper. oryzae*) và nuôi cấy chìm trong hệ lên men (thường dùng cho các chủng *Asper. niger* và *Asper. batatae*).

Thời gian thực hiện quá trình đường hóa dài hay ngắn tùy thuộc vào chủng giống nấm mốc và nguyên liệu được sử dụng, thông thường từ 24-40 giờ. Chất lượng của quá trình đường hóa được đánh giá theo hoạt lực của amylase, dextrinase, gluco-amylase. Kết quả, quá trình đường hóa cho các sản phẩm gồm hỗn hợp dextrin, maltose, glucose. Trong đó, glucose chiếm tỷ lệ cao nhất.

3.3.2. Lên men biến đường thành rượu

Đây 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.** Chủ yếu là các chủng của nấm men *Sac. cerevisiae*. Các chủng nấm men dùng trong sản xuất phải có những đặc điểm cơ bản sau:

- + Có đầy đủ đặc điểm đặc trưng của nấm men.
- + Tốc độ phát triển mạnh, hoạt lực lên men cao.
- + Lên men được nhiều loại đường khác nhau và đạt được tốc độ lên men nhanh.
- + Chịu được độ cồn cao từ 10-12%.
- + Thích nghi được với những điều kiện không thuận lợi của môi trường, đặc biệt là đối với chất sát trùng.

- **Quá trình lên men.** Môi trường lên men sau khi được khử trùng, kiểm tra độ đường đạt 90-120 g/L và pH 4,5-4,8 thì có thể cấy giống vào. 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 xảy ra như 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 hòa tan mạnh trong nước do vậy nó khuếch tán rất nhanh vào môi trường chung quanh.

3.3.3. Chưng cất và tinh chế ethanol

Khi 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. Đồng thời, tỷ lệ tạp chất và chất lượng rượu lại chịu ảnh hưởng bởi nguyên liệu nuôi cấy. Quá trình chưng cất rượu diễn ra theo các giai đoạn sau:

- **Chưng cất dịch lên men.** Quá trình này cho phép thu được rượu thô bằng cách tách cồn cùng các chất dễ bay hơi ra khỏi dịch lên men.

- **Tinh chế rượu.** Là quá trình tách các tạp chất ra khỏi cồn thô để thu cồn tinh khiết. Trong cồn thô ngoài ethanol còn có nhiều tạp chất. Dựa vào khối lượng phân tử và khả năng bay hơi người ta chia làm ba nhóm:

+ Tạp chất đầu (có nhiệt độ sôi thấp hơn ethanol: aldehyde acetic, ethyl acetate, methyl acetate, methanol...) được lấy ra giai đoạn đầu của quá trình tinh chế, được gọi là rượu đầu hay cồn công nghiệp.

+ Tạp chất cuối (có nhiệt độ sôi cao hơn ethanol và khó bay hơi, đó là rượu cao phân tử: isoamyllic, isobutyllic...) loại này ít tan trong nước, được gọi là dầu fusel hay rượu tạp.

+ Tạp chất trung gian, tùy thuộc vào nồng độ rượu và tính chất vật lý của các tạp chất mà nó sẽ bay hơi cùng với tạp chất đầu hay ở lại với tạp chất cuối. Số tạp chất này khó tách khỏi ethanol khi tinh chế, chẳng hạn: isobutyrate, ethyl isovalerianate. Sau khi tinh chế, tách ba loại tạp chất trên, ta có rượu tinh khiết. Hỗn hợp rượu-nước là hỗn hợp đẳng phí (có điểm sôi chung) nên với phương pháp chưng cất thông thường không thể tinh chế được rượu ethanol có nồng độ rượu >95,5% (thể tích). Vì vậy, muốn có ethanol tuyệt đối (>99%) ta phải tinh chế thêm (ví dụ: bằng phương pháp chưng luyện dưới áp suất thấp $p \approx 0,0525 \text{ atm}$) để hỗn hợp rượu-nước không có điểm sôi chung và cuối cùng sẽ thu được ethanol tuyệt đối.

4. Các sản phẩm chứa protein

4.1. Thực phẩm lên men truyền thống giàu protein

Bao gồm các sản phẩm khác nhau giàu protein như phomát, đậu phụ, nước mắm... và các hình thức bảo quản thực phẩm nhờ lên men acid như trong sản xuất các loại giò chả, xúc xích, cá ướp, cá mắm... Tuy nhiên, cho đến nay các ứng dụng của công nghệ sinh học hiện đại trong vấn đề này nói chung không đáng kể trừ ngành sản xuất phomát. Ngược lại các ứng dụng của công nghệ sinh học lại thể hiện rất rõ nét trong việc tạo sinh khối vi sinh vật và chế biến chúng thành các dạng thực phẩm khác nhau.

4.2. Protein đơn bào (single cell protein-SCP)

Protein đơn bào là một thuật ngữ được gọi theo quy ước dùng để chỉ vật chất tế bào vi sinh vật được sử dụng làm thức ăn cho người và động vật. Thuật ngữ này hoàn toàn không chính xác, vì sản phẩm được tạo ra thường không phải là một protein thuần khiết mà là các tế bào đã được xử lý thuộc nhiều loại vi sinh vật khác nhau bao gồm cả vi khuẩn, nấm men, nấm sợi và tảo.

Sinh khối tế bào vi sinh vật luôn có hàm lượng protein cao. Do vậy, trong những năm gần đây lĩnh vực công nghệ sinh học rất chú ý nghiên cứu công nghệ sản xuất và khả năng ứng dụng của protein vi sinh vật. Quá trình sản xuất SCP gắn liền với công nghệ lên men, do vậy năng suất tạo protein của nó rất cao (30-80% khối lượng khô). Một nhược điểm quan trọng của SCP là thường chứa hàm lượng nucleic acid cao, đặc biệt là ở vi khuẩn,

những cũng ở cả nấm men và nấm sợi. Nếu các loại SCP này được sử dụng cho người thì là một vấn đề, vì ở người thiếu uricase xúc tác cho sự oxy hóa uric acid thành allantoin hòa tan hơn. Ăn nhiều các dẫn xuất của purine sẽ làm tăng hàm lượng uric acid trong máu, acid này sẽ kết tủa và tạo thành tinh thể trong các khớp và đóng góp vào việc tạo nên các viên sỏi trong đường niệu.

4.2.1. Protein từ nguồn carbohydrate

Cellulose là chất hữu cơ thường gặp nhất trên trái đất và hàng năm được tái tạo với một khối lượng khổng lồ. Các loại rơm rạ chứa tới 30-45% cellulose. Cellulose cũng gặp nhiều trong bã mía, nước thải công nghiệp gỗ, công nghiệp dệt và các chất thải của các ngành công nghiệp thực phẩm. Sản xuất SCP từ cơ chất cellulose là một hướng có nhiều triển vọng. Các vi sinh vật thích hợp cho việc sử dụng cellulose là xạ khuẩn ưa nhiệt, vi khuẩn từ dạ cỏ của các động vật nhai lại và nhiều loại nấm sợi khác... Trong tự nhiên, ít gặp cellulose thuần khiết mà nó thường nằm dưới dạng liên kết với các polymer khác như lignin, pectin, hemicellulose... Lignin là một polymer được tạo nên nhờ sự ngưng tụ của các gốc rượu. Lignin bao quanh các sợi cellulose bằng một mạng lưới ba chiều và do vậy ngăn cản sự phân giải cellulose nhờ enzyme. Riêng việc làm giảm độ lớn của hạt đã cho phép tăng đáng kể sự phân giải cellulose.

Đến nay, mới chỉ có sản phẩm protein từ nấm (mycoprotein) là protein vi sinh vật duy nhất được cho phép sử dụng làm thực phẩm cho người và gia súc. Mycoprotein là dạng thực phẩm chứa sợi nấm *Fusarium graminearum*. Sinh khối được tạo ra trong quá trình nuôi cấy nấm liên tục trên môi trường chứa glucose và muối ammonium. Sau khi quá trình lên men kết thúc, người ta tiến hành xử lý nhiệt đối với sinh khối nấm thu được nhằm mục đích giảm lượng ribonucleic acid của nó. Cuối cùng tách sợi nấm bằng cách lọc chân không. Quy trình công nghệ này có năng suất tạo sinh khối giàu protein cao hơn rất nhiều lần so với chăn nuôi.

4.2.2. Protein từ vi khuẩn lam cố định đạm và vi tảo

Vi tảo (microalgae) là tập hợp những loài tảo có kích thước nhỏ bé và có thể thích hợp được với việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy đối với vi sinh vật. Vi khuẩn lam (cyanobacteria) trước đây được gọi là tảo lam, hay

tảo lam-lục. Trong phần này, chúng ta xếp hai loại này chung với nhau vì giữa chúng có nhiều đặc điểm sinh lý khi nuôi cấy giống nhau. Do đó, qui trình sản xuất thu sinh khối của chúng về cơ bản là không khác nhau.

Ngay từ những năm 1940, người ta đã biết một số vi tảo có khả năng trong một thời gian ngắn tạo ra một lượng sinh khối rất lớn chứa tới 40-60% protein khối lượng khô (*Chlorella* sp.) và 50-55% protein khối lượng khô (*Scenedesmus*). Ở vi khuẩn lam, đặc biệt là chi *Spirulina* hàm lượng protein lên đến 60-70% khối lượng khô. Hàm lượng các amino acid của những protein ở vi tảo và vi khuẩn lam khá cân đối gần với quy định của protein tiêu chuẩn. Đặc biệt là lượng amino acid không thay thế trong protein rất cao có khi lên đến 42%.

Đến đầu những năm 1960, tảo lam cố định đạm cũng được bắt đầu nuôi trồng rộng rãi trên thế giới, bánh tảo được sử dụng làm thực phẩm cho người dân, còn bột tảo được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm bổ sung cho trẻ em suy dinh dưỡng và tăng tích sữa cho sản phụ. *Chlorella* được nuôi trồng đại trà từ thập niên 1950. Để nuôi trồng ở quy mô công nghiệp vi tảo và vi khuẩn lam, người ta sử dụng hai hệ thống cơ bản là hệ thống kín và hở.

- **Hệ thống kín.** Là một hệ lên men, dùng ánh sáng nhân tạo có cường độ cao và có sục khí CO₂. Ưu điểm của phương pháp này là không phụ thuộc khí hậu thời tiết, điều kiện nuôi cấy được kiểm tra, khống chế một cách chủ động. Nhưng phương thức này có giá thành cao nên khó áp dụng rộng rãi.

- **Hệ thống hở.** Là các bể nuôi sử dụng ánh sáng tự nhiên. Nhược điểm của hệ này là các lớp tế bào phần đáy bể nuôi thực tế sẽ không được tiếp xúc với ánh sáng mặt trời để tiến hành quá trình quang hợp (Hình 7.5).

Việc thu hoạch sinh khối vi khuẩn lam và vi tảo là công đoạn rất quan trọng ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm. Có nhiều phương pháp thu sinh khối khác nhau như: ly tâm, vớt, lắng kết hóa học, lắng kết bằng điện trường, tự lắng kết... Trường hợp các vi tảo như *Chlorella*, *Scenedesmus*... có kích thước tế bào nhỏ thì chủ yếu dùng phương pháp ly tâm thu sinh khối. Với *Spirulina* người ta sử dụng phương pháp lọc. Thu hoạch sinh khối các vi khuẩn lam này bằng màng lọc nghiêng kết hợp với hút chân không. Sau khi thu hoạch, sinh khối được sấy khô bằng các cách như sấy đông khô, sấy chân không, sấy hình trống... để có được thành phẩm.



Hình 7.5. Nuôi tảo *Spirulina* ở Thái Lan và bột tảo được đóng viên

5. Chế biến rau quả

Rau quả được bảo quản lâu không biến chất và trong một số trường hợp giá trị dinh dưỡng của chúng còn được gia tăng nhờ được xử lý thông qua lên men lactic nhờ vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* và *Lactobacillus plantarum*.

Chế biến và tạo ra các thực phẩm có giá trị từ đậu tương nhờ lên men vi sinh vật đã được biết từ rất lâu. Phổ biến hơn cả là các loại nước chấm và đậu phụ từ đậu tương nhờ lên *Asper. oryzae* và *Asper. tamari*.

Để sản xuất đậu phụ trước hết phải ngâm đậu, sau đó nghiền đậu thành bột và lọc qua vải. Tạo kết tủa từ dịch nói trên bằng muối Ca hoặc Mg, sau đó đóng thành bánh đậu. Trong thời gian ủ, nấm sợi trắng phát triển rất mạnh trên bề mặt bánh đậu và tạo hương vị đặc biệt cho nó.

Hiện nay, trong công nghiệp sản xuất nước quả người ta sử dụng rộng rãi các loại enzyme pectinase, cellulase, hemicellulase, amylase, và protease. Chủ yếu để xử lý làm trong nước quả, giảm độ nhớt, giúp quá trình lọc và ổn định của chất lượng của nước quả ép. Trong đó, quá trình thủy phân pectin nhờ pectinase, pectateliase, polygalacturonidase và pectin esterase có vai trò quan trọng bậc nhất. Chúng cắt các liên kết glycoside trong phân tử pectin và do vậy, làm tăng hiệu suất tạo nước quả cũng như chất lượng của nó.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. Đái Duy Ban và Lê Thanh Hòa. 1996. Công nghệ sinh học đối với vật nuôi và cây trồng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

2. **Trần Thị Thanh.** 2003. Công nghệ vi sinh. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
3. **Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng.** 1999. Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
4. **Chrispeels MJ and Sadava DE.** 2003. Plants, Genes, and Crop Biotechnology. 2nd ed. *Jones and Bartlett Publishers*, Massachusetts, USA.
5. **Narayanaswamy S.** 1994. Plant Cell and Tissue Culture. *Tata McGraw-Hill Publishing Co. Ltd.* New Delhi, India.
6. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
7. **Razan MK.** 1994. An Introduction to Plant Tissue Culture. *Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.* New Delhi, India.
8. **Trigiano RN and Gray DJ.** 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. *CRC Press*, New York, USA.

Chương 8

Các ứng dụng trong y dược

I. Mở đầu

Cho đến nay, có lẽ thành tựu công nghệ sinh học được thể hiện rõ nét nhất là ở lĩnh vực y học như liệu pháp protein và liệu pháp gen để chữa trị một số bệnh hiểm nghèo (ung thư, nhiễm virus và hiện đang thử nghiệm chữa trị bệnh AIDS...) cũng như để chẩn đoán bệnh (viêm gan, sốt xuất huyết, sán lá gan...) và phòng bệnh (vaccine). Ngày nay, với những công cụ của kỹ thuật gen, ngành y không chỉ dựa vào các triệu chứng lâm sàng mà còn có khả năng tác động thẳng vào các nguyên nhân sâu xa của bệnh đó là sự bất thường của gen. Công nghệ sinh học đã xâm nhập vào hầu như mọi lĩnh vực của y học, trong đó đáng kể nhất là lĩnh vực chẩn đoán và phòng ngừa với việc tạo ra các bộ kit chẩn đoán bệnh bằng phương pháp PCR và các DNA vaccine có hiệu quả cao. Lĩnh vực sản xuất thuốc chữa bệnh như interferon, insulin, interleukin, hormone sinh trưởng ở người... ngày càng phát triển mạnh và trở thành một ngành công nghiệp quan trọng. Đặc biệt, liệu pháp gen mặc dù thành tựu còn ít nhưng đã mở ra những triển vọng to lớn trong việc chữa trị những bệnh di truyền và bệnh nan y.

II. Vaccine

Trong sản xuất vaccine, cho đến thời gian gần đây, người ta vẫn sử dụng vaccine bất hoạt hoặc vaccine sống nhược độc làm kháng nguyên kích thích tạo kháng thể cần thiết trong cơ thể người và vật nuôi. Nhưng vaccine được sản xuất theo cách này có một vài hạn chế, chẳng hạn vaccine sống nhược độc có khả năng quay trở lại dạng độc hoặc hoạt lực của nó giảm khá nhanh trong cơ thể người và vật nuôi.

Đến nay, nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta đã sản xuất được protein vỏ của một số loại virus như virus bệnh dại và viêm gan B. Sản xuất vaccine kỹ thuật gen là một lĩnh vực phát triển mạnh hiện nay của công nghệ DNA tái tổ hợp. Đây là loại vaccine được bào chế từ vi khuẩn đã được chuyển gen mã hóa tổng hợp một protein kháng nguyên của một loại virus hay một loại vi khuẩn gây bệnh nào đó. Hiện nay, các loại DNA vaccine tái

tổ hợp được sử dụng cho người bao gồm vaccine viêm gan B, vaccine dại kiểu mới, vaccine tả kiểu mới, vaccine sốt rét và vaccine bệnh phong. Virus viêm gan B có vỏ ngoài lypoprotein. Kháng nguyên bề mặt là protein chính của vỏ ngoài, được phát hiện trong máu người bị nhiễm. Người ta biến nạp gen tổng hợp kháng nguyên của virus viêm gan B vào vi khuẩn *E. coli* sau đó sản xuất sinh khối ở quy mô lớn các vi khuẩn *E. coli* mang gen tái tổ hợp này, biến *E. coli* thành “nhà máy” sản xuất kháng nguyên để làm vaccine.

Bên cạnh đó, mô hình sản xuất vaccine dựa trên cơ sở thực vật (vaccine thực phẩm) cũng có tiềm năng ứng dụng rất lớn. Bằng cách chuyển một loại gen kháng nguyên của virus hoặc vi khuẩn vào tế bào thực vật, gen này sẽ hoạt động trong cơ thể và biến thực vật thành nơi sinh ra kháng nguyên. Khi những kháng nguyên này đi vào cơ thể người thì hệ thống miễn dịch của người sẽ tự động sinh ra kháng thể đặc hiệu tương ứng. Như vậy, thay vì tiêm chủng theo phương thức thông thường người ta có thể ăn những hoa quả có kháng nguyên được sử dụng làm vaccine.

1. Các phương thức tiêm chủng vaccine hiện nay

1.1. Các vaccine bất hoạt

Các vaccine bất hoạt được sản xuất từ các virus gây bệnh bằng cách phá hủy độc tính của chúng bằng β -propiolactone hoặc formalin nhưng vẫn duy trì một khả năng sinh miễn dịch đầy đủ. Các vaccine được sản xuất theo phương thức này tương đối an toàn và kích thích các kháng thể chống lại các protein bề mặt của tác nhân gây bệnh. Các vaccine tiểu đơn vị được xem là một dạng vaccine bất hoạt nhưng có mức độ thấp hơn. Trong trường hợp này, một phần của tác nhân gây bệnh (như là protein bề mặt) được sử dụng để gây tạo kháng thể nhằm trung hòa tác nhân gây bệnh.

Sử dụng rộng rãi kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B được tinh sạch từ máu của người bệnh hoặc gần đây hơn từ nấm men tái tổ hợp là một phương thức rất hiệu quả để tạo miễn dịch. Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (sản phẩm của gen đơn) kích thích tạo ra sự bảo vệ và gần như hoàn toàn chống lại sự viêm nhiễm virus viêm gan B.

Một ví dụ khác của loại vaccine tiểu đơn vị là sử dụng biến độc tố của vi khuẩn. Nhiều loại vi khuẩn sản xuất độc tố đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh. Vì vậy, một số tác nhân mang độc tố (ví dụ bệnh uốn ván và bệnh bạch hầu) đã được bất hoạt bằng formaldehyde liên kết với một

chất tá dược (adjuvant) để phát triển thành vaccine. Cơ thể tạo miễn dịch bảo vệ bằng cách kích thích kháng thể trung hòa các ảnh hưởng của độc tố.

Một loại vaccine khác cũng thuộc loại tiểu đơn vị là các vaccine vỏ polysaccharide. Chẳng hạn, những vaccine chống lại *Haemophilus influenzae* và viêm màng não do não mô cầu. Trong trường hợp này dịch chiết vỏ ngoài polysaccharide của vi khuẩn được sử dụng như là một vaccine và có khi được liên kết với protein để cải thiện khả năng gây miễn dịch. Kháng thể bền bỉ trong một vài năm và có thể bảo vệ chống vi khuẩn.

1.2. Các vaccine sống nhược độc

Các vaccine sống có hiệu lực (như một sự viêm nhiễm tự nhiên) thường tạo ra một sự miễn dịch lâu dài. Hầu hết các vaccine nhược độc hiện nay được sản xuất một cách khá kinh nghiệm, theo cách quá trình nuôi cấy được cấy chuyển nhiều lần cho tới khi nhận thấy có sự mất độc lực (virulence) của tác nhân gây bệnh bố mẹ. Độc lực này được xét nghiệm trong các hệ thống động vật mô hình trước khi thử nghiệm trên những người tình nguyện. Chẳng hạn, vaccine dùng để tạo miễn dịch chống lại bệnh lao được bắt nguồn sau 13 năm cấy chuyển trong môi trường có chứa mật bởi Calmette và Guérin (vì vậy có tên là BCG-Bacille Calmette-Guérin).

Thực tế cho thấy là có nhiều hướng khác nhau để sản xuất vaccine cho một loại bệnh, điển hình là vaccine bệnh thương hàn hiện nay. Ở Anh có ba loại vaccine khác nhau đã được cấp bản quyền. Một là vaccine từ tế bào hoàn chỉnh bị giết chết, loại thứ hai là dịch chiết vỏ polysaccharide của bệnh thương hàn, và loại thứ ba là chủng *Salmonella typhi* sống nhược độc.

2. Vai trò của công nghệ DNA tái tổ hợp trong nhận dạng, phân tích và sản xuất vaccine

2.1. Nhận dạng và tạo dòng các kháng nguyên có tiềm năng vaccine

Nhiều tác nhân gây bệnh gần như không có khả năng nuôi cấy bên ngoài vật chủ tự nhiên của chúng và điều này đã gây cản trở cho các cách tiếp cận truyền thống để phát triển liệu pháp vaccine. Ví dụ: virus viêm gan B (HBV), tác nhân gây bệnh giang mai ở người (*Treponema pallidum*) và vi khuẩn gây bệnh phong (*Mycobacterium leprae*) không thể sinh trưởng trong điều kiện *in vitro* mặc dù chúng có thể sinh sản trong các loại động vật mô

hình. Bởi vậy, người ta không thể tạo ra các vaccine sống nhược độc hoặc các vaccine bất hoạt bằng cách nuôi cấy các tác nhân này.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cho phép chuyển thông tin di truyền từ những cơ thể “khó tính” này vào những vật chủ “dễ bảo” hơn như là *E. coli*, nấm men hoặc tế bào động vật có vú. Không phải tất cả các gen kháng nguyên đều dễ nhận dạng, tạo dòng và biểu hiện như gen kháng nguyên bề mặt của viêm gan. Trình tự nguyên vẹn của genome HBV có kích thước nhỏ hơn 10 kb. Bởi vậy, tương đối đơn giản khi thiết lập khung đọc mở để biểu hiện. Tuy nhiên, ở trường hợp bệnh sốt rét thì lại khác. Từ lâu các nhà khoa học biết rằng các thoa trùng (sporozoite) sốt rét bị chiếu xạ có thể bảo vệ chống lại bệnh sốt rét. Nhưng giai đoạn thoa trùng trong chu kỳ sống của ký sinh trùng sốt rét chỉ sinh trưởng với một lượng nhỏ, nên người ta cần phải ứng dụng công nghệ DNA tái tổ hợp để sản xuất vaccine. Tuy nhiên, genome của ký sinh trùng sốt rét lại lớn hơn genome của HBV hàng ngàn lần, vì thế người ta đã gặp rất nhiều khó khăn trong việc thu thập các thông tin về trình tự gen thích hợp và sản phẩm của nó để tạo ra bảo vệ miễn dịch.

Điểm khởi đầu của công nghệ DNA tái tổ hợp là xây dựng thư viện DNA của cơ thể được nghiên cứu trong *E. coli*. Thư viện cDNA hoặc genomic DNA có thể cung cấp các phương thức cơ bản để nhận dạng và phân lập các gen quan tâm. Với các thành tựu trong kỹ thuật phân tích trình tự gen thì thông tin trình tự bắt nguồn từ các genome hoàn chỉnh hoặc các nhiễm sắc thể riêng biệt đã trở nên càng ngày càng quan trọng.

2.2. Phân tích các kháng nguyên vaccine

2.2.1. Những yếu tố quyết định kháng nguyên tế bào B (B-cell epitopes)

Phân tích cấu trúc của kháng nguyên vaccine có thể thu được các thông tin giá trị trong việc phát triển vaccine. Chẳng hạn, hiểu biết về những epitope (yếu tố quyết định kháng nguyên) chống lại các kháng thể trung hòa có thể cho phép nghiên cứu loại vaccine peptide thích hợp. Các epitope có thể liên tục hoặc gián đoạn. Các epitope liên tục là các peptide ở dạng xoắn ngẫu nhiên để các huyết thanh miễn dịch cho epitope phản ứng với phân tử hoàn chỉnh từ trình tự mà nó được bắt nguồn. Các epitope gián đoạn lắp ghép các phân tử được nhóm lại do cấu trúc thứ cấp của protein. Một vài epitope trung hòa ở dạng liên tục trong khi những epitope khác là gián đoạn.

2.2.2. Những yếu tố quyết định kháng nguyên tế bào T (T-cell epitopes)

Các T lymphocyte có thể nhận diện các kháng nguyên ngoại lai như các peptide được tạo thành trong sự phối hợp với phần ngoại bào của phân tử MHC. Các tế bào T trợ giúp (helper T-cell) CD4⁺ nhận diện được kháng nguyên tiếp hợp với MHC loại II, trong khi các tế bào T độc hại tế bào (cytotoxic T-cell) CD8⁺ (CTLs) nhận diện kháng nguyên liên kết với các phân tử MHC loại I. Đa hình di truyền của các phân tử MHC loại I và II xác định sự đặc hiệu và ái lực của liên kết peptide trong sự nhận diện của tế bào T.

2.3. Sản xuất các vaccine tiểu đơn vị (subunit vaccine)

Nói chung, nuôi cấy tế bào động vật có vú là phương pháp thích hợp để sản xuất các vaccine chống lại các tác nhân gây bệnh được sao chép trong các tế bào eukaryote. Tế bào *E. coli* không ổn định để tiến hành một vài biến đổi hậu dịch mã của một số vaccine quan tâm. Bởi vì, các hệ thống vi khuẩn không thể bổ sung carbohydrate là yếu tố quan trọng trong đặc tính kháng nguyên và cấu trúc của nhiều kháng nguyên bảo vệ của virus.

Một điều khác cũng rất đáng quan tâm, đó là hiệu suất khá nghèo của kháng nguyên bề mặt trong vi khuẩn và protein hoàn toàn thiếu khả năng cuộn xoắn chính xác để lắp ráp trong các tiểu thể có đường kính 22 nm, nấm men *Sac. cerevisiae* cũng là một trong những hệ thống thích hợp cho biểu hiện gen do nó không những cho hiệu suất protein hợp lý mà còn tạo thành các tiểu thể 22 nm. Điều này, cùng với kinh nghiệm sản xuất ở quy mô lớn trong công nghệ lên men, đã tạo ra một hệ thống hấp dẫn đặc biệt, ví dụ cho việc sản xuất các tiểu thể HbsAg để bào chế vaccine trong nấm men với một hiệu suất cao. Tuy nhiên, vaccine sản xuất theo phương thức này vẫn còn khoảng 1% không có đáp ứng miễn dịch.

Tiếp theo sự thành công của vaccine viêm gan và do khả năng có sẵn của các công nghệ đã được thiết lập để cung cấp một lượng lớn kháng nguyên, thì hướng nghiên cứu tiểu đơn vị là một trong những phương pháp thích hợp nhất để phát triển các vaccine mới. Quá trình glycosyl hóa protein là rất quan trọng để gây ra phản ứng miễn dịch của HbsAg, vì thế nuôi cấy tế bào động vật có vú có thể là thích hợp hơn. Thực tế là một trong những vaccine viêm gan B đã cấp bản quyền được sản xuất trong tế bào động vật có vú.

3. Cải thiện và sản xuất các vaccine sống nhược độc mới

3.1. Cải thiện các vaccine sống nhược độc

Các kỹ thuật sinh học phân tử cho phép phân tích độc tính và đặc tính kháng nguyên ở mức độ phân tử, như vậy đây là cơ sở thuận lợi để triển khai một hướng nghiên cứu thích hợp hơn trong việc sản xuất các cơ thể nhược độc để công nghiệp hóa vaccine sống với các tính chất mong muốn. Các virus loại DNA và các vi sinh vật khác có thể được chuyển gen trực tiếp hoặc gián tiếp. Tuy nhiên, các virus loại RNA ở một mức độ nào đó khó giải quyết hơn, mặc dù đã có một vài thành công với virus bại liệt (poliovirus) và virus bệnh cúm (influenza), do độ rắn chắc của genome virus.

3.2. Các vector sống tái tổ hợp

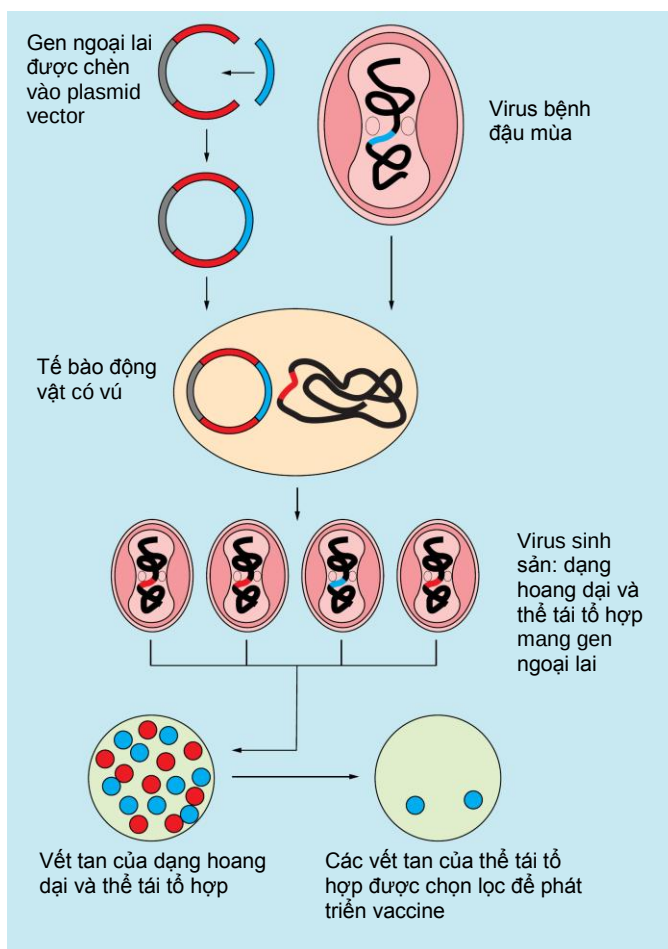
3.2.1. Các thể tái tổ hợp của viral vaccine

Các viral vaccine cho bệnh đậu mùa đã được sử dụng hơn 150 năm dưới dạng vaccine sống nhược độc. Giá thành rẻ, sản xuất đơn giản, bảo quản không cần lạnh, khả năng ổn định khi tiêm chủng và kích thích đáp ứng kháng thể trung gian tế bào (cell-mediated) là tất cả ưu điểm của loại vaccine này.

Tuy nhiên, những ưu điểm này chỉ thật sự hấp dẫn bởi các thể tái tổ hợp vaccine biểu hiện gen ngoại lai (Hình 8.1). Hơn 1.000 thể tái tổ hợp vaccine khác nhau biểu hiện các gen của virus, vi khuẩn và các tác nhân gây bệnh ký sinh trùng đã được công bố. Đa số trong chúng đã cho thấy khả năng bảo vệ ở các hệ thống động vật mô hình chống lại các tác nhân gây bệnh. Thể tái tổ hợp vaccine biểu hiện glycoprotein vỏ gp160 của HIV-1 được thử nghiệm trên người cho thấy đã cảm ứng các đáp ứng miễn dịch đối với HIV gp160. Tuy nhiên, các biến chứng kết hợp với liệu pháp vaccine và việc tăng số lượng các cá thể riêng lẻ mang sự thiếu hụt miễn dịch có thể giới hạn hữu ích của các thể tái tổ hợp đối với liệu pháp vaccine ở người.

3.2.2. Các vaccine tái tổ hợp BCG

Vaccine BCG (*Bacillus* gây bệnh lao xương của avirulent) là loại vaccine được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới. Từ 1948 đến nay hơn 5 tỷ liều vaccine đã được tiêm chủng.



Hình 8.1. Virus đậu mùa được tái tổ hợp trong tế bào động vật có vú với một gen ngoại lai. Các virus đậu mùa được sinh sản bao gồm cả hai dạng: hoang dại và tái tổ hợp. Các virus tái tổ hợp được phân lập và sử dụng để phát triển thành một loại vaccine an toàn và hiệu quả.

Vaccine BCG tái tổ hợp có một số ưu điểm khác biệt hơn hẳn các hướng vaccine đa trị khác, trước tiên là nhờ kinh nghiệm thu được với vaccine BCG gốc (parent). Ưu điểm thực tế đó là chỉ hai vaccine BCG và vaccine polio uống mới được WHO khuyến cáo dùng cho trẻ em mới sinh và người trẻ tuổi, những người mà liệu pháp vaccine có thể khởi đầu tốt hơn cho các cơ hội thành công trong các chương trình tiêm chủng vaccine. Chủng ngừa riêng rẽ với BCG tạo ra một miễn dịch trung gian tế bào bền

vững đối với bệnh lao là rất hiệu quả với ít hơn một biến chứng trên một triệu liều. Mặc dù, các vector loại phage và plasmid đã được sử dụng có một vài thành công nhưng những nghiên cứu tiếp theo vẫn còn được tiến hành để có thể hướng tới các mức độ biểu hiện cao và cho phép hệ thống được thao tác dễ dàng hơn.

3.2.3. Các chủng *Salmonella* nhược độc (vaccine vi khuẩn sống)

Công nghệ DNA tái tổ hợp có khả năng đưa toàn bộ các đột biến hoặc đoạn khuyết vào các chủng vi khuẩn khác nhau để làm yếu độc tính của chúng. Các vaccine nhược độc được thiết kế hợp lý cũng có thể dùng như là các chất mang cho các kháng nguyên được tạo dòng từ các cơ thể gây bệnh khác. Các chủng *Salmonella* nhược độc được xem là một ứng cử viên tốt cho hướng này bởi vì chúng có thể được dùng như một vaccine uống để kích thích các phản ứng miễn dịch nội bào và bài tiết trong vật chủ. Chẳng hạn, gen của tiểu đơn vị B không ổn nhiệt (heat labile B subunit) ở enterotoxic *E. coli* được đưa vào trong chủng *Salmonella* nhược độc AroA. Vi khuẩn *Salmonella* tái tổ hợp này có thể cảm ứng các kháng thể IgG và IgA đối với tiểu đơn vị B enterotoxic (cũng như *Salmonella*) trong các động vật được chủng ngừa vaccine.

3.2.4. Các thể khảm của virus bại liệt (poliovirus)

Poliovirus chủng Sabin type 1 sống nhược độc là một vaccine rất an toàn và hiệu quả, kích thích các đáp ứng kháng thể tuần hoàn và bài tiết. Sự hiểu biết về cấu trúc tinh thể của virus cùng với khả năng tạo virus từ các phân tử cDNA cho phép các vùng kháng nguyên của các tác nhân gây bệnh khác được hợp nhất chính xác trong tiểu thể virus ở hầu hết các vị trí kháng nguyên. Ví dụ: DNA mã hóa cho vị trí kháng nguyên chủ yếu của chủng Sabin type 1 được thay bằng DNA của chuỗi peptide từ HIV-1. Huyết thanh miễn dịch đối với peptide được xem như là tiểu thể poliovirus tái tổ hợp và người ta nhận thấy trong các nghiên cứu miễn dịch virus tái tổ hợp có thể cảm ứng rộng rãi các kháng thể trung hòa anti-HIV.

3.2.5. Các chủng *E. coli* tái tổ hợp

Chủng enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) gây bệnh đi chảy ở lợn con và

một vài trường hợp ở người (*E. coli* type huyết thanh O 157). Các vi khuẩn này bám chặt vào ruột của vật chủ qua fimbriae liên kết bề mặt để tiết độc tố ổn nhiệt (ST-toxin) và không ổn nhiệt (LT-toxin). Fimbriae là kháng nguyên mạnh và các vaccine đầu tiên chống ETEC gồm có các tế bào hoàn chỉnh hoặc các dịch chiết vô bào được làm giàu để chống lại fimbriae. Các vaccine được bào chế từ các chủng ETEC đã sinh ra các phản ứng bất lợi đáng kể do các nồng độ cao của lipopolysaccharide và các kháng nguyên vỏ trên bề mặt của chủng ETEC hoang dại. Chủng vi khuẩn *E. coli* K12 gây ra phản ứng bất lợi ít hơn nhiều và được dùng như là một vật chủ để xây dựng plasmid vector biểu hiện một hoặc nhiều loại kháng nguyên khác nhau của fimbriae. Tuy nhiên, để sản xuất một vaccine có phạm vi bảo vệ rộng thì cần đưa vào các thành phần kháng độc tố. Các plasmid vector được xây dựng bằng cách sử dụng promoter mạnh của prokaryote biểu hiện cao LT toxin B subunit.

4. Các hướng tiếp cận khác trong sản xuất vaccine

4.1. Các DNA vaccine (miễn dịch di truyền)

Một điều khá ngạc nhiên là các plasmid mang các gen đặc hiệu cho một hoặc nhiều protein kháng nguyên có thể được dùng để tạo miễn dịch (chủng ngừa). Các plasmid được phân phối bằng cách tiêm (thường vào cơ) đưa gen trực tiếp vào trong một số tế bào và được hấp thu bởi các tế bào lân cận nơi kim tiêm được đưa vào. Ngoài ra, plasmid cũng có thể được phân phối bằng súng bắn gen (các viên đạn vàng được bọc DNA của plasmid) bằng cách đẩy các plasmid vào trong các tế bào gần bề mặt cơ thể, đặc trưng cho loại này là tổ chức da hoặc màng nhầy. Một khi vào bên trong tế bào, một vài plasmid tái tổ hợp sẽ đi vào nhân và do gen được điều hòa bởi một promoter mạnh của eukaryote, các tế bào sẽ tổng hợp các kháng nguyên được mã hóa bởi plasmid.

▪ Tối ưu các đáp ứng miễn dịch

Các đáp ứng đối với DNA vaccine thường cần một lượng nhất định của plasmid DNA (>50 µg trên một lần tiêm) và hiệu quả miễn dịch không bằng tiêm chủng tự nhiên với tác nhân gây bệnh hoặc được kích thích bởi các vaccine sống nhược độc. Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch có thể được cải thiện bằng các phương pháp khác, chẳng hạn dùng súng bắn gen để đưa DNA vào tế bào.

Phản ứng miễn dịch đối với kháng nguyên bị ảnh hưởng bởi DNA của plasmid mang gen. Do DNA của plasmid (có nguồn gốc từ vi khuẩn) có tỷ lệ CG lớn hơn so với DNA trong động vật có xương sống, hơn nữa các đơn vị CG trong plasmid của vi khuẩn có xu hướng không methyl hóa (không gắn các nhóm methyl) trong khi ở động vật chúng thường được methyl hóa. Việc tăng số lượng các chuỗi kích thích miễn dịch trong plasmid có thể sẽ khuếch đại tốt khả năng sinh miễn dịch của các kháng nguyên được mã hóa trong DNA vaccine.

4.2. Các peptide vaccine

Trong những năm gần đây, người ta có thể phân lập các tế bào nhánh (dendritic cells) từ tủy xương hoặc máu ngoại biên của người bệnh và nuôi cấy chúng trong điều kiện *in vitro*. Các tế bào này sau đó được nhồi peptide (hoặc một nguồn kháng nguyên khác) và đưa trở lại vào trong người bệnh. Các tế bào hiện diện kháng nguyên chuyên nghiệp này sau đó sẽ tạo ra một đáp ứng miễn dịch hiệu quả mà không thể tạo ra bằng cách khác. Liệu pháp miễn dịch này được tập trung nghiên cứu để điều trị ung thư và có thể liên quan với một vài loại tác nhân gây nhiễm. Hạn chế chính của hướng kỹ thuật cao này là cần phải đặc biệt kiên nhẫn và vì thế rất đắt tiền.

4.3. Kháng các kiểu gen cá thể (anti-idiotypes)

Anti-idiotype (anti-Id) cũng có thể tạo ra các vaccine hiệu quả, vì các kháng thể tự chúng cũng hoạt động như là các chất kháng nguyên (immunogens). Một đáp ứng miễn dịch tăng lên chống lại vị trí liên kết kháng nguyên đơn nhất (unique antigen combining site) của một kháng thể được gọi là một phản ứng anti-idiotype và có thể tương đồng cấu trúc với kháng nguyên gốc đầu tiên. Khi hiện tượng này xuất hiện thì kháng thể anti-idiotype (đơn dòng hoặc đa dòng) có thể gây ra một đáp ứng kháng thể nhận dạng kháng nguyên gốc và do đó hoạt động như một vaccine. Các anti-idiotype cho thấy một khả năng bảo vệ trong các hệ thống động vật mô hình khác nhau. Thí dụ điển hình về tiềm năng của hướng này là việc bảo vệ con tinh tinh khỏi bệnh phối hợp HBV (HBV-associated disease) bởi miễn dịch trước đó với anti-Id.

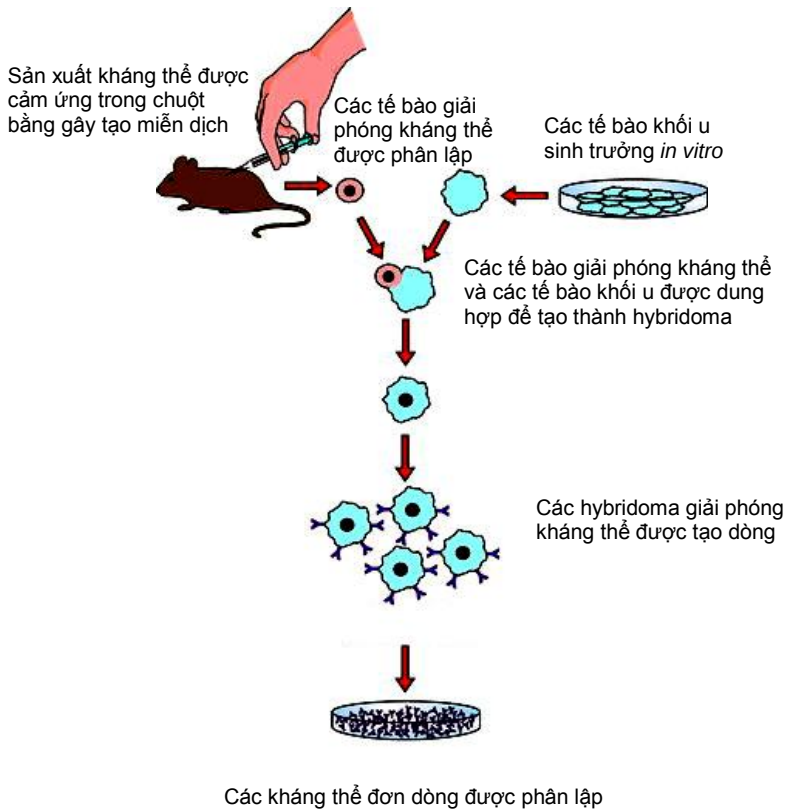
III. Kháng thể đơn dòng

Công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng dựa trên nguyên lý sử dụng tế bào lai (giữa tế bào ung thư myeloma với tế bào lympho B của hệ miễn dịch ở động vật hoặc người) để sản xuất kháng thể. Kháng thể đơn dòng có rất nhiều ứng dụng quan trọng trong y học: phát hiện kháng nguyên, ức chế phản ứng đào thải khi ghép cơ quan, chẩn đoán sự hình thành khối u, định hướng thuốc chữa bệnh bằng kháng thể đơn dòng, sử dụng kháng thể đơn dòng để tinh sạch protein...

1. Sản xuất hybridoma bằng cách dung hợp tế bào sinh dưỡng

Trước đây, người ta cũng tạo ra kháng thể bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, nhưng theo phương pháp này, người ta phải định kỳ làm lại sau mỗi lần thu được kháng thể, vì ở điều kiện nuôi cấy trong ống nghiệm, các tế bào thường chỉ tiến hành một số lần phân bào nhất định rồi bị hủy.

Trong công nghệ sinh học, kỹ thuật tế bào lai hybridoma (lai giữa tế bào myeloma với tế bào lympho B) đã mở ra một phương thức mới trong miễn dịch học, để sản xuất vaccine hàng loạt. Người ta đã tạo ra một loại tế bào lai có thể phân bào liên tục trong điều kiện nuôi cấy, đồng thời lại có khả năng sản sinh ra kháng thể, từ đó kháng thể được sản xuất ra với khối lượng rất lớn. Tế bào ung thư có đặc điểm rất quan trọng là loại tế bào có tiềm năng phân chia liên tục (di căn). Khả năng sinh sản lâu dài và phân bào liên tục của tế bào ung thư nuôi cấy có liên quan với khả năng tăng sinh của các tế bào ung thư trong cơ thể sống. Người ta chọn một loại tế bào có khả năng sinh ra kháng thể, hiện nay đang sử dụng tế bào lách của chuột nhắt đã được miễn dịch chống một loại kháng nguyên nhất định. Tiến hành lai giữa tế bào lách chuột nhắt với tế bào ung thư của tủy xương. Tế bào lai đem nuôi cấy, phân chia liên tục, sản sinh ra một lượng rất lớn kháng thể. Kháng thể này đặc trưng cho một dòng tế bào, nên được gọi là kháng thể đơn dòng. Quá trình trên chính là hiện tượng lai tế bào, tức là khả năng dung hợp giữa một loại tế bào có khả năng tái bản, sinh sản phát triển không ngừng với một loại tế bào có chức năng tạo ra kháng thể (Hình 8.2).



Hình 8.2. Sơ đồ sản xuất kháng thể đơn dòng

2. Sản xuất kháng thể đơn dòng bằng công nghệ DNA tái tổ hợp

2.1 . Phân lập các gen immunoglobulin

Nhờ kỹ thuật PCR vấn đề trở nên tương đối đơn giản khi phân lập và tạo dòng các gen immunoglobulin từ các tế bào B (thuần thực hoặc chưa thuần thực) và các tế bào hybridoma bằng các cặp primer đặc hiệu. Nguyên liệu khởi đầu thường là mRNA hơn là DNA, vì mRNA chỉ chứa các exon mã hóa, các intron bị cắt bỏ (spliced out) trong suốt quá trình phiên mã. Hầu hết sự quan tâm đều tập trung vào việc phân lập và tạo dòng các vùng immunoglobulin có thể thay đổi (immunoglobulin variable regions) của chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) chứa các vùng bổ trợ xác định (complementarity determining regions-CDRs) cần thiết trong liên kết kháng nguyên. Bằng cách liên kết các sản phẩm của các gen V_H và V_L các đoạn chuỗi đơn có thể thay đổi (scFV) sẽ được tạo ra, các sản phẩm protein của chúng có đủ khả năng để liên kết với kháng nguyên. Các cấu trúc scFV này

có thể được đưa vào trong các phagemid vector để thể hiện ở bề mặt các bacteriophage dạng sợi kết đôi với một protein vỏ không quan trọng hiện diện ở một đầu của phage. Các thư viện gen kháng thể của người đã được xây dựng theo phương thức này từ các gen được phân lập của các tế bào B trong máu ngoại vi của cả những người bị nhiễm HIV và những người mạnh khỏe.

2.2. Biểu hiện scFV trên bề mặt bacteriophage

Các thư viện của phage trong *E. coli* TG1 được sinh trưởng trong môi trường chứa glucose và helper phage (ví dụ M13KO7) được bổ sung để gây nhiễm lần thứ hai (superinfect) các vi khuẩn. Các tế bào bị gây nhiễm lần hai sau đó được ly tâm nhanh và cho sinh trưởng qua đêm trên môi trường không có glucose nhưng có bổ sung ampicillin và kanamycin, trước tiên cảm ứng gây đóng gói phagemid biểu hiện scFV phối hợp với protein của gen III và sau đó tạo thành phage. Các vi khuẩn nguyên vẹn được tạo tiểu thể bằng ly tâm và phage được kết tủa từ các thể nổi với PEG. Các bước này cho phép tinh sạch và cô đặc phage thành stock để dùng trong chọn lọc theo vòng tròn trên kháng nguyên

3. Kháng thể đơn dòng trong nghiên cứu Sinh-Y

Các kháng thể đơn dòng là những tác nhân phản ứng cần thiết để phân lập, nhận diện và xác định vị trí của các sản phẩm đặc trưng của gen trong tế bào và để trợ giúp trong việc xác định cấu trúc đại phân tử của chúng. Nói chung, khó có thể thảo luận chi tiết về nhiều ứng dụng của kháng thể đơn dòng trong nghiên cứu cơ bản. Thay vào đó, chúng ta tập trung chính về các ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị.

- Các kháng thể đơn dòng dựa theo các chỉ thị tế bào chất và bề mặt tế bào có một ảnh hưởng không chỉ trong nghiên cứu cơ bản mà còn cho phép phát triển các phương thức trong điều trị. Chẳng hạn, sự biểu hiện dư thừa của thụ thể đối với nhân tố sinh trưởng biểu mô (EGF) và các thụ thể liên quan, một sản phẩm của proto-oncogene *c-erbB-1*, được tìm thấy là chỉ thị của sự tiên lượng nghèo nàn trong các bệnh nhân mang ung thư biểu mô tế bào vảy hoặc u tuyến. Cũng như vậy, nhiều chất chỉ thị bề mặt của tế bào được phát hiện trên leukocyte được sử dụng để nhận dạng các u ác tính và quyết định phương pháp điều trị.

- Phân tích miễn dịch bằng phương pháp RIA và ELISA, dựa trên nguyên tắc dùng kháng thể đơn dòng để phát hiện kháng nguyên tương ứng của nó trong các mẫu phân tích nhờ phản ứng gắn rất đặc hiệu của kháng thể đơn dòng với kháng nguyên.

- Ước chế thải loại khi ghép cơ quan bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng chống kháng nguyên đặc hiệu của tế bào lympho T, nhằm loại bỏ phản ứng thải loại khi ghép các cơ quan của người với nhau.

- Chẩn đoán hình thành khối u, khi có sự hình thành khối u trong máu sẽ xuất hiện một số tác nhân đánh dấu. Do đó, có thể sử dụng các phương pháp phân tích miễn dịch để phát hiện các tác nhân trên trong máu hoặc trên khối u.

- Định hướng thuốc chữa bệnh, lợi dụng khả năng các phân tử kháng thể gắn rất đặc hiệu với tế bào ở vị trí xác định nào đó của cơ thể (trong đó có tế bào ung thư) để định hướng thuốc chữa bệnh hoặc độc chất tới trực tiếp khối u hoặc nơi cần chữa trị như vậy sẽ tăng hiệu quả chữa trị lên nhiều lần.

4. Kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán và điều trị bệnh

Kháng thể đơn dòng có công dụng đặc biệt quan trọng, được sử dụng để chẩn đoán bệnh truyền nhiễm, bệnh di truyền, dị ứng, rối loạn miễn dịch. Dùng kháng thể đơn dòng là phương tiện rất nhạy và đơn giản để chẩn đoán có thai, các bệnh lao, phong...

Kháng thể đơn dòng cũng được sử dụng để chống thụ thai, làm triệt sinh ở gia súc. Kháng thể đơn dòng còn được dùng để chẩn đoán di căn ung thư nếu có gắn thêm đồng vị phóng xạ.

Phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng đã nhanh chóng thay thế các phương pháp miễn dịch học và huyết thanh học truyền thống trong các xét nghiệm, như:

- Xác định lượng hormone để đánh giá chức năng nội tiết.
- Phát hiện một số protein có ý nghĩa để chẩn đoán khối u.
- Xác định vi khuẩn và virus gây bệnh.

- Phát hiện trong máu các cầu thủ, các chất kích thích bị cấm sử dụng, kiểm tra nồng độ thuốc trong máu và các tổ chức cơ thể nhằm bảo đảm liều thuốc dùng không quá ngưỡng gây độc.

Kháng thể đơn dòng còn được dùng để ức chế phản ứng đào thải khi cấy ghép cơ quan (ghép thận, truyền tủy...). Gần đây nhất, kháng thể đơn dòng còn được dùng để phát hiện bệnh AIDS (hội chứng suy giảm miễn dịch).

Người ta đã thành công khi tiêm kháng thể đơn dòng cho bò cái, cừu cái, và đã cứu được hàng triệu súc vật sơ sinh khỏi chết do vi khuẩn *Colibacillus enteritis*.

IV. Liệu pháp gen

Đối với loại bệnh di truyền, bệnh do đột biến gen người ta phải cần đến sự can thiệp của liệu pháp gen, một hướng chữa bệnh gắn liền với các kỹ thuật tiên tiến trong lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại như các vi thao tác gen, sửa đổi thay thế gen...

Liệu pháp gen (gene therapy) thực chất là phương pháp chữa bệnh bằng gen. Có nhiều khái niệm khác nhau về liệu pháp gen, nhưng cách hiểu chung nhất là tập hợp các biện pháp để sử dụng các gen cần thiết (còn gọi là gen trị liệu) nhằm mục đích chữa bệnh cho con người (Hình 8.3).

Trong đó, gen trị liệu có thể là:

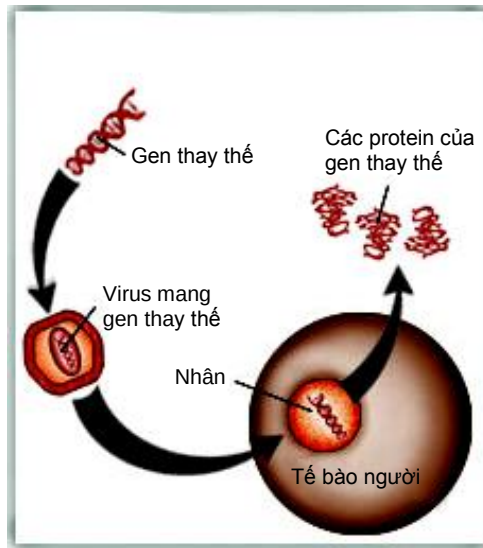
- **Các gen hoạt động bình thường (gen lành)** có thể đưa vào tế bào để thay thế gen hỏng, gen mất chức năng, khôi phục hoạt động bình thường của tế bào và sự sống của cơ thể.

- **Là những gen có khả năng mã hóa một protein đặc hiệu** khi đưa vào tế bào sống có thể tạo nên các loại protein đặc hiệu. Các protein đặc hiệu có thể ức chế hoạt động của một gen khác trong tế bào, kìm hãm khả năng phân chia của tế bào hoặc gây chết các tế bào bị bệnh.

- **Những gen khi đưa vào tế bào hoạt động đồng thời với các gen bệnh** (gen bị đột biến trong tế bào) làm hạn chế tác động của gen bệnh hoặc hỗ trợ, bù đắp cho các gen bị hỏng.

- **Gen liệu pháp còn là các gen bất hoạt** được đưa vào tế bào thay thế cho một gen lành nào đó, nhằm hạn chế sản phẩm không cần thiết của gen lành hoặc tạo ra cho tế bào một trạng thái mới, có tác dụng chống lại bệnh tật.

- **Gen trị liệu có thể là những đoạn oligonucleotide** có tác dụng kìm hãm hoạt động của gen bị hỏng, bị đột biến trong tế bào.



Hình 8.3. Mô hình chung của liệu pháp gen

1. Các loại liệu pháp gen

Liệu pháp gen được chia làm hai nhóm phương pháp cơ bản là liệu pháp gen soma và liệu pháp gen giao tử (còn gọi là liệu pháp tế bào mầm).

1.1. Liệu pháp soma (somatic gene therapy)

Là phương pháp điều trị thay thế hoặc sửa chữa gen hỏng, gen bệnh của các tế bào soma trong cơ thể người bệnh, giúp người bệnh có thể có cuộc sống bình thường. Liệu pháp gen soma có thể sử dụng một số loại tế bào như: tế bào lympho (lymphocyte), nguyên bào sợi (fibroblast), tế bào gốc (stem cells), tế bào gan (hepatocyte), tế bào biểu bì (keratinocyte)... Liệu pháp gen soma đến nay đã chữa và điều trị khỏi hoặc hạn chế biểu hiện cho một số khá lớn người bệnh mang các bệnh hiểm nghèo như: thiếu hụt miễn dịch phối hợp trầm trọng (SCID), ung thư, thiếu máu hồng cầu liềm, xơ nang...

1.2. Liệu pháp gen tế bào mầm (germline gene therapy)

Là phương pháp điều trị, sửa chữa hoặc thay thế gen hỏng cho các giao tử (tinh trùng hoặc tế bào trứng) nhằm tạo ra thế hệ sau bình thường.

Liệu pháp gen tế bào mầm hiện nay còn là vấn đề đang được tranh luận ở nhiều nước trên thế giới chủ yếu vì lý do đạo đức và nhân đạo, chẳng hạn vấn đề nhân bản người.

2. Các ứng dụng của liệu pháp gen trong chữa bệnh

2.1. Bệnh thiếu hụt miễn dịch phối hợp trầm trọng (severe combined immuno deficiency-SCID)

Bệnh SCID là bệnh thiếu hụt miễn dịch phối hợp trầm trọng ở người, gây giảm sút sức khỏe hoặc có thể gây chết do dễ bị mắc các bệnh truyền nhiễm khác. Bệnh SCID do rối loạn di truyền, gây mất chức năng tế bào miễn dịch lympho T, lympho B, tế bào NK (tế bào giết tự nhiên, natural killer cell)... Có nhiều biểu hiện bệnh SCID khác nhau, tùy theo mức độ sai hỏng của các gen (defective gene), dẫn đến rối loạn chức năng của các loại tế bào lympho gây thiếu hụt miễn dịch ở cơ thể người. Bệnh SCID ở người được chia làm hai nhóm: bệnh SCID liên kết nhiễm sắc thể giới tính X (X-SCID, chẳng hạn: sai hỏng gen γc nằm ở locus 13.1 trên cánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X của người) và bệnh SCID do sai hỏng các gen (ADA, PNP, CD₃ và ZAP 70...) nằm trên nhiễm sắc thể thường.

2.1.1. Liệu pháp gen chữa bệnh ADA-SCID

Gen mã hóa enzyme adenosine deaminase bị hỏng, dẫn đến rối loạn chức năng của các lympho T và B gây bệnh ADA-SCID. Liệu pháp gen *ex vivo* gồm có bốn bước cơ bản sau:

- Lấy các tế bào lympho T từ máu của bệnh nhân ADA-SCID.
- Thiết kế vector liệu pháp retrovirus mang gen ADA bình thường.
- Trộn vector liệu pháp với tế bào lympho T để thực hiện quá trình chuyển gen vào tế bào lympho T.
- Đưa các tế bào lympho T mang gen liệu pháp trở lại cơ thể người bệnh.

Kết quả sau khi điều trị liệu pháp gen từ 5-6 tháng số tế bào miễn dịch lympho T tăng dần lên, sau hai năm khả năng miễn dịch của bệnh nhân được phục hồi.

2.1.2. Liệu pháp gen chữa bệnh X-SCID

Liệu pháp gen điều trị loại bệnh này được thực hiện bằng phương pháp *ex vivo* để ghép tế bào tủy xương. Tế bào tủy xương của bệnh nhân

được lấy ra kết hợp xạ trị, sau đó chọn lọc những tế bào khỏe để chuyển gen γc bình thường nhờ retroviral vector. Kết quả sau khi điều trị từ 3-13 tháng thì 10/11 bệnh nhi đã khôi phục được các tế bào lympho T, B và NK, khả năng miễn dịch tăng lên rất đáng kể.

Liệu pháp gen SCID đã thành công ở Ý, Israel, Anh, Pháp và Mỹ.

2.2. Bệnh ung thư

Bệnh ung thư cho đến nay vẫn được coi là một trong những bệnh nan y, làm giảm sút sức khỏe con người, và là loại bệnh có tỷ lệ gây tử vong cao. Ung thư là sự phát triển không bình thường của tế bào, do sai lệch hoặc đột biến một hoặc một số gen trong tế bào. Các tế bào ung thư có quá trình phân chia vô tổ chức, không chịu sự kiểm soát của sự chết theo chương trình (apoptosis), tạo nên các dạng khối u. Có hai nhóm nguyên nhân chủ yếu gây ung thư là: do tế bào và cơ thể bị nhiễm virus gây ung thư và đột biến gen do ảnh hưởng của các tác nhân vật lý và hóa học (tia UV, chất gây phóng xạ, khói thuốc lá, chất độc hóa học...).

Điều trị ung thư có thể thực hiện bằng xạ trị, hóa chất, các dạng độc tố miễn dịch hoặc liệu pháp gen. Trong điều trị ung thư nhiều cytokine được chú ý và thử nghiệm, trong đó interleukin 2 (IL-2) có hiệu quả điều trị ung thư cao, thời gian điều trị ngắn, ít gây các tác dụng phụ như điều trị bằng hóa chất và xạ trị. Liệu pháp gen (*in vivo* và *ex vivo*) là một trong những phương pháp mới điều trị ung thư có hiệu quả. Bằng kỹ thuật vi tiêm, người ta đưa thẳng vào giữa khối u các vector mang gen trị liệu tương ứng, để ức chế hoặc tiêu diệt các tế bào ung thư.

Trong liệu pháp gen điều trị ung thư người ta sử dụng nhiều loại vector liệu pháp khác như retrovirus, adenovirus và plasmid.

Liệu pháp gen điều trị ung thư bằng cách tác động trực tiếp vào khối u, có thể được thực hiện theo nhiều phương thức khác nhau:

- Ức chế phát triển của khối u bằng cách thực hiện các liệu pháp *ex vivo* hoặc *in vivo* với các viral vector mang các gen liệu pháp như *p53*, *pRb*...

- Kích hoạt tế bào chết theo chương trình bằng cách: sử dụng các gen liệu pháp *Bax* tăng cường gây kích hoạt chết theo chương trình, hoặc sử dụng gen *Bcl-2* để ngăn chặn các phản ứng chống apoptosis (anti-apoptosis).

Trường hợp apoptosis các tế bào co lại, tách khỏi các tế bào xung quanh, các gen *ced* (gen tự sát-*suicide gene*) được hoạt hóa làm cho tế bào teo dần rồi chết.

- Thực hiện các liệu pháp thay gen nhằm phục hồi các protein bị hỏng, phục hồi khả năng miễn dịch của tế bào.

- Sử dụng liệu pháp antisense để kìm hãm hoạt động của các oncogen, hoặc ức chế tác dụng các sản phẩm của oncogen.

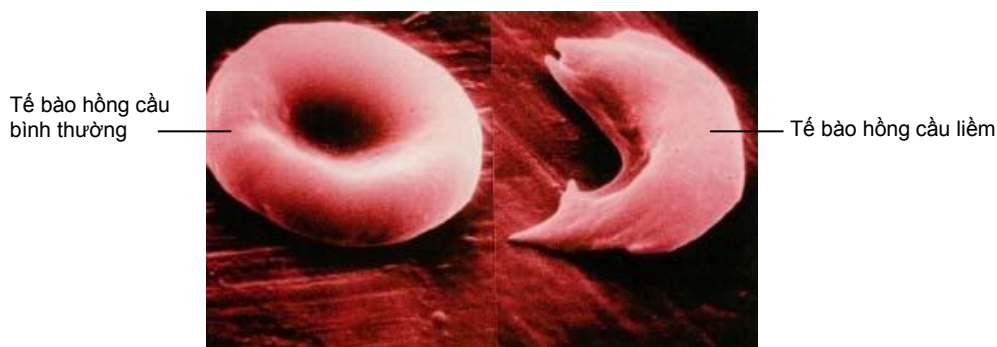
- Hạn chế sự phát triển của khối u bằng vi tiêm các protein tiền apoptosis (pro-apoptosis protein) như các protein BAX (sản phẩm của gen *Bax*) hoặc interferon (*TNF*), kết hợp sử dụng xạ trị hoặc điều trị hóa chất.

- Sử dụng các gen tự sát *ced* và các sản phẩm của nó để tiêm thẳng vào khối u, chẳng hạn tiêm ganciclovir-sản phẩm của gen mã hóa enzyme thymidin kinase có tác dụng tiêu diệt các tế bào ung thư.

- Biện pháp tác động trực tiếp vào tế bào ung thư bằng bao vây thành mạch (anti-angiogenic). Đây là biện pháp chặn mối liên hệ về mặt dinh dưỡng của tế bào ung thư, làm cho tế bào ung thư thiếu dinh dưỡng và chết dần dần. Hiện nay, đã phát hiện hơn 40 hợp chất tự nhiên có chức năng này như: endostatin, angiostatin...

2.3. Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm

Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm SCA (sickle cell anemia) (Hình 8.4) là bệnh do đột biến gen β globin làm thay đổi chức năng phân tử protein, xuất hiện hemoglobin S. Khi các phân tử hemoglobin S trao đổi oxygen với các tế bào, có thể liên kết với nhau tạo các cấu trúc hình que, làm cho hồng cầu biến dạng thành hình liềm. Hồng cầu liềm không có hình lõm hai mặt như hồng cầu bình thường, độ trơn kém không chui qua được các mao mạch, thường xếp lại thành đám gây tắc mao mạch gây cản trở quá trình lưu thông của máu. Sau một thời gian số lượng tế bào hồng cầu bình thường giảm dần, do các tế bào hồng cầu mới sinh ra không bù đắp kịp số tế bào hồng cầu chết đi, trong máu thiếu một lượng hồng cầu ngày càng lớn, gọi là bệnh thiếu máu hồng cầu liềm.



Hình 8.4. Tế bào hồng cầu bình thường và tế bào hồng cầu liềm

Các nghiên cứu trên người, chuột và các động vật có vú khác đều xác định rõ nguyên nhân gây bệnh thiếu máu hồng cầu liềm do đột biến gen β globin. Điểm đột biến và các dạng đột biến đã được nghiên cứu rất kỹ. Tuy nhiên, sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh SCA ở người thu được kết quả rất hạn chế.

2.3.1. Vector liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh SCA

Trong các loại vector liệu pháp, lentivirus vector được đánh giá là loại vector có hiệu quả nhất, vì lentivirus giúp cho các gen liệu pháp hòa nhập rất tốt. Tuy nhiên, nhiều loại virus trong họ lentivirus là nguyên nhân gây nhiều bệnh hiểm nghèo ở người như AIDS, lao, ung thư... nên sử dụng lentivirus làm vector liệu pháp còn nhiều hạn chế. Các lentivirus có thể biến đổi rất mạnh và nhanh, nên có thể gây các hậu quả không lường trước cho cơ thể người. Vì vậy, người ta thường sử dụng các retrovirus quen thuộc để thiết kế vector liệu pháp nhằm hạn chế bớt các rủi ro.

2.3.2. Các bước điều trị bệnh SCA bằng liệu pháp gen

- Tách tế bào tủy xương của người bệnh và chiếu xạ để chọn các tế bào khỏe mạnh, trộn chung với retrovirus vector mang gen β globin bình thường để tạo các tế bào tủy xương tái tổ hợp.

- Xạ trị và điều trị hóa dược để tiêu diệt bớt các tế bào tủy xương mang gen đột biến.

- Chuyển các tế bào tủy xương mang gen β globin bình thường vào bệnh nhân. Sau một thời gian các tế bào này sinh trưởng và bệnh thiếu máu giảm dần.

- Do lượng tế bào mang gen đột biến (β^S globin) vẫn tiếp tục được hình thành trong cơ thể người bệnh, nên sau một thời gian nhất định mức độ bệnh thiếu máu lại tăng lên, do đó phải lập lại các bước điều trị gây nhiều tốn kém.

Hiện nay, các thử nghiệm liệu pháp gen khác nhau trên chuột cho kết quả rất tốt. Vì thế, hy vọng trong một tương lai không xa bệnh thiếu máu hồng cầu liềm ở người sẽ được chữa khỏi bằng liệu pháp gen.

2.4. Bệnh xơ nang

Bệnh xơ nang (cystic fibrosis-CF) xuất hiện do đột biến gen trên nhiễm sắc thể thường, gây rối loạn trong chuyển hóa các ion Cl^- trong tế bào dẫn đến chứng viêm phổi, viêm tụy, viêm gan... gây giảm sút sức khỏe, có thể dẫn tới tử vong do bị suy hô hấp nặng. Bệnh xơ nang là một bệnh di truyền, có tỷ lệ mắc bệnh là 1/2.500 người. Bệnh xơ nang do một loại protein màng (CFTR) bị mất chức năng, không có khả năng đưa các ion Cl^- thừa ra khỏi tế bào, làm mất cân bằng giữa nước và muối trong tế bào. Bệnh xơ nang thường hình thành một lớp dịch nhầy gây rối loạn chức năng protein màng, lớp dịch nhầy ngày càng đặc ở các mô tế bào bị bệnh CF, gây ra các chứng bệnh về phổi, gan, tụy và ruột...

Điều trị bệnh xơ nang ở người bằng liệu pháp gen đã thu được những kết quả tương đối tốt. Các xu hướng sử dụng liệu pháp gen hiện nay bao gồm:

- Sử dụng vector liệu pháp mang gen trị liệu cDNA (do kích thước gen CF rất lớn nên chỉ tổng hợp cDNA từ mRNA mã hóa protein CFTR và một số trình tự đặc hiệu) làm cho gen liệu pháp gắn với nhiễm sắc thể ở những điểm đặc hiệu.

- Thực hiện phương thức sửa chữa gen bằng vector mang các oligonucleotide để sửa chữa đột biến trên gen CF.

- Sử dụng kỹ thuật episomal, nghĩa là chuyển các đoạn cDNA cần thiết vào tế bào, sao cho cDNA vào nhân dính với hệ gen ở một điểm nào đó và tồn tại như một đơn vị độc lập trong tế bào.

2.5. Bệnh HIV/AIDS

Bệnh AIDS (acquired immuno deficiency syndrome) là hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải do nhiễm virus HIV (human immuno-deficiency virus), làm mất sức đề kháng của cơ thể với các tác nhân gây bệnh, có thể dẫn tới ung thư hoặc tử vong.

- Các xu hướng điều trị nhiễm HIV/AIDS bằng liệu pháp gen.
Trong nhiều năm qua, nhiều loại kháng sinh và biệt dược (starudine, lamirudine, nerirapine, azathioprine, antiretrovir...) được nghiên cứu và thử nghiệm trong điều trị chống nhiễm HIV/AIDS, đã có những kết quả tốt góp phần kéo dài cuộc sống cho nhiều bệnh nhân AIDS. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp nhiễm HIV điều trị bằng các loại thuốc trên không có hiệu lực do một số chủng HIV có thể đã có đột biến thích ứng với thuốc.

Để hạn chế nhiễm HIV và đại dịch AIDS, trong những năm gần đây một hướng mới trong điều trị AIDS được chú ý nghiên cứu và thử nghiệm là liệu pháp gen:

+ Sử dụng vector liệu pháp để chuyển các gen trị liệu vào tế bào nhằm hạn chế khả năng xâm nhiễm và tái bản của HIV. Trong trường hợp này người ta sử dụng cả hai loại vector: viral virus (adenovirus, AAV và HIV-1), non-viral virus (oligonucleotide, polycation, liposome...).

+ Kích hoạt hệ thống gen của tế bào, tăng cường miễn dịch chống sự phát triển của HIV/AIDS.

+ Sử dụng các gen tự sát *ced* đã biến đổi, làm cho tế bào bị chết khi có HIV xâm nhiễm. Khi HIV mới xâm nhiễm tế bào, bằng liệu pháp đưa các gen tự sát (*ced*) thymidin kinase (*tk*) phối hợp sử dụng thuốc chống virus ganciclovir (GCV), tạo thành phức hợp ganciclovir-phosphate. Ganciclovir-phosphate ức chế hoạt động của enzyme DNA polymerase, làm cho quá trình tái bản gen của tế bào bị ngừng, sự phân chia tế bào bị gián đoạn, tế bào co lại và chết dần. Tế bào nhiễm HIV bị chết, sẽ hạn chế khả năng lây lan của HIV trong cơ thể.

+ Tạo các DNA vaccine phòng chống nhiễm HIV. DNA vaccine được xem là một chiến lược hiệu quả của liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS. DNA vaccine HIV-1 đã và đang được thử nghiệm trên chuột có hiệu quả. Hiện nay, Trung Quốc vừa bắt đầu thử nghiệm DNA vaccine phòng chống HIV/AIDS trên người, hy vọng sẽ có những thành công quý giá.

V. Protein trị liệu

Nhiều chất có hoạt tính sinh học dùng làm dược phẩm được tạo thành trong quá trình nuôi cấy tế bào động-thực vật nguyên vẹn trong hệ lên men (fermenter/bioreactor). Chẳng hạn: tổng hợp interferon trong quá trình nuôi cấy tế bào nguyên bào bạch huyết (lymphoblast); kỹ thuật tạo kháng nguyên làm nguyên liệu để sản xuất vaccine và tạo kháng thể đơn dòng; sản xuất hormone... Tất cả chúng đều là những sản phẩm y học cao cấp và có tương lai rất lớn.

1. Sản xuất hormone

1.1. Hormone sinh trưởng người (human growth hormone-HGH)

Hormone sinh trưởng người là protein chứa khoảng 191 amino acid, thiếu nó cơ thể người sẽ bị lùn. Trước đây hormone phát triển được tách từ tuyến yên của người chết. Hiện nay, hormone phát triển được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp thông qua *E. coli* (cả insulin và hormone sinh trưởng người là các protein tương đối đơn giản vì không bị glycosyl hóa và hoặc biến đổi nhiều sau dịch mã, nên có thể dùng *E. coli* làm tế bào vật chủ được sản xuất chúng). Hormone sinh trưởng người tái tổ hợp khác với hormone sinh trưởng người bình thường một amino acid đó là do *E. coli* không có khả năng loại bỏ gốc methionine khởi đầu, thông thường amino acid này chỉ bị loại sau khi dịch mã trong tế bào người.

Hormone sinh trưởng người là một trong những protein được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp sớm nhất. Trước đây, muốn có chế phẩm này người ta phải tách chiết từ tuyến yên của người chết. Mỗi tử thi cho khoảng 4-6 mg HGH và muốn chữa khỏi cho một người lùn phải cần lượng HGH thu được từ 100-150 tử thi. Điều này cho thấy một trở ngại rất lớn khi chữa trị chứng lùn cho trẻ em. Bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, người ta có thể thu nhận một lượng lớn HGH từ vi khuẩn *E. coli* đã tái tổ

hợp (1 lít dịch lên men của *E. coli* thu được một lượng HGH tương đương với lượng thu được từ 60 tử thi).

1.2. Somatostatin

Somatostatin là loại hormone đặc biệt, thường được tổng hợp trong não động vật và người với một hàm lượng vô cùng thấp. Somatostatin có vai trò điều hòa hormone sinh trưởng và insulin đi vào máu, kiểm tra sự tổng hợp hai loại hormone này. Quy trình sản xuất loại sản phẩm sinh học đặc biệt quý này cũng bao gồm các bước chủ yếu sau đây:

- Phân lập gen mã hóa somatostatin hoặc tổng hợp trong ống nghiệm.
- Tạo dòng gen somatostatin bằng cách gắn gen này vào plasmid vector để chuyển gen vào *E. coli*. Mỗi mẻ 7,5 L vi khuẩn *E. coli* nuôi cấy sẽ cho ra 5 mg somatostatin nguyên chất. Khối lượng hormone này trước đây muốn có phải tiến hành cả năm trên nguyên liệu lấy từ nửa triệu não cừu.

2. Sản xuất enzyme

Trong một tương lai gần enzyme sẽ được sử dụng rất rộng rãi trong y học để làm đầu dò cho các thiết bị phân tích y khoa và để chữa bệnh. Hiện nay, một số enzyme như: glucooxydase, hexokinase, esterase, urease, cholesteroloxydase, alcoholdehydrogenase... đã được sử dụng khá rộng rãi trong y học. Điển hình nhất là sử dụng glucooxydase cố định trên bề mặt điện cực platinum trong thiết bị phân tích hàm lượng glucose trong máu. Trong y học, enzyme còn được sử dụng để chữa trị một số bệnh liên quan đến sự thiếu hụt của một số enzyme trong cơ thể người, hoặc dùng enzyme để loại bỏ những cục thịt, mỡ dư thừa gây nguy hiểm cho một số bộ phận của cơ thể người. Ví dụ dùng enzyme streptokinase và urokinase để làm tan máu đông gây tắc nghẽn mạch máu.

3. Sản xuất thuốc nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp

Đây là công nghệ thay đổi bộ máy di truyền của tế bào bằng cách đưa gen ngoại lai vào và bắt nó hoạt động. Có nghĩa là bắt nó tạo ra một số lượng lớn protein hoặc peptide cần thiết, mà trước đó bản thân tế bào không tổng hợp được. Có thể nói là công nghệ này đã tạo ra một bước ngoặt lớn trong lĩnh vực sinh học. Các sản phẩm do nó tạo ra đa dạng và một số hiện đang được sản xuất ở mức độ công nghiệp.

3.1. Sản xuất insulin

Insulin là protein chứa 51 amino acid được tổng hợp ở tuyến tụy của người. Vào đầu những năm 80 hãng Eli Lilly và Gentech Inc. (Mỹ) đã đưa ra quy trình sản xuất insulin người bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Đó là protein đầu tiên tạo được bằng công nghệ gen và nhờ công nghệ này mà hiện nay insulin đã được sản xuất đại trà với giá thành rẻ hơn nhiều so với trước kia.

Trong cơ thể người bình thường, tuyến tụy tiết ra một loại hormone có chức năng điều hòa glucose trong máu. Khi nồng độ glucose trong máu lên quá ngưỡng, thì insulin tác động lên tế bào gan để tăng cường chuyển hóa đường glucose thừa trong máu thành glycogen, là loại đường dự trữ. Trường hợp insulin tổng hợp tự nhiên trong cơ thể không đủ, glucose phải thải ra qua đường nước tiểu, gây nên bệnh tiểu đường. Người bị bệnh tiểu đường chỉ được cứu sống nếu được bổ sung vào cơ thể một lượng insulin nhất định. Trước kia insulin ít và đắt, khó đáp ứng nhu cầu của những người bị bệnh tiểu đường. Ngày nay, với công nghệ sinh học hiện đại, người ta đã khắc phục được khó khăn này để đáp ứng nhu cầu cho những người bị bệnh.

Công nghệ sinh học hiện đại đã sản xuất insulin trong vi khuẩn *E. coli* bằng cách:

- Tách gen phụ trách tổng hợp insulin trong cơ thể sống, có thể từ người hoặc từ chuột. Gen insulin cũng có thể được tổng hợp nhân tạo trong ống nghiệm.
- Tạo dòng gen insulin bằng cách gắn gen insulin vào plasmid vector sau đó chuyển plasmid này vào tế bào vi khuẩn nhận (*E. coli*) để sản xuất một lượng sinh khối lớn phục vụ cho việc tách chiết insulin.

3.2. Sản xuất interferon

Interferon là nhóm protein chứa khoảng 146-166 amino acid, chúng xuất hiện trong tế bào động vật có xương sống khi bị nhiễm virus và giúp tế bào kháng lại virus. Cho đến thời gian gần đây, interferon chủ yếu vẫn được sản xuất từ tế bào bạch cầu hay nguyên bào bạch huyết của người bị nhiễm virus. Tuy nhiên, bắt đầu từ năm 1980 người ta đã phân lập được các gen mã hóa tổng hợp ba loại interferon trên và xây dựng được công nghệ sản xuất interferon từ tế bào *E. coli* và nấm men.

Interferon là loại protein tương đối đơn giản, chịu được nhiệt độ tới 65°C, là sản phẩm của tế bào sống, nên bản thân nó không độc. Chương trình sinh tổng hợp tự nhiên interferon được mã hóa trong gen, nhưng sự tổng hợp này chỉ xảy ra khi có virus xâm nhập cơ thể.

Các thành tựu của công nghệ sinh học hiện đại đã mở ra một cuộc cách mạng trong nghiên cứu cấu trúc và hoạt động của interferon. Có ba loại interferon là α , β và γ khác nhau bởi số amino acid và hoạt tính:

- α -interferon do bạch cầu sản xuất khi có virus xâm nhập.
- β -interferon do nguyên bào sợi sản xuất khi có virus xâm nhập.
- γ -interferon do bạch cầu sản xuất qua phản ứng của hệ miễn dịch.

Về cơ chế, interferon không tác động trực tiếp lên virus, mà tác động lên tế bào, để các tế bào này tổng hợp ra loại protein đặc biệt, có khả năng kìm hãm sự phát triển của virus xâm nhập cơ thể. Hiện nay, người ta đã phát hiện được năm loại protein này. Khi virus xâm nhập ô ạt vào cơ thể, như khi có nạn dịch virus, thì interferon tự nhiên không đủ để chống lại virus. Trước đây, người ta phải dùng máu để tách interferon từ bạch cầu dùng trong điều trị viêm gan do virus, nhưng rất đắt. Nếu tách từ máu ra để lấy interferon, thì dù có tách từ máu toàn bộ loài người cũng không đủ để chữa bệnh cho một người.

Bằng công nghệ sinh học hiện đại, người ta đã tách gen interferon từ cơ thể sống, tạo dòng trong plasmid vector và chuyển gen này vào vi khuẩn *E. coli*, để vi khuẩn này sản xuất interferon với hiệu suất lớn, do đó thành tựu nói trên đã trở thành cuộc cách mạng về interferon.

α -interferon hiện nay được dùng có hiệu quả nhất, để điều trị bệnh viêm gan C, nhưng còn quá đắt. Cùng với viêm gan do virus A và B, ngày nay viêm gan do virus C (tức viêm gan C) đang là mối tai họa lớn trên thế giới. Trong đó, ở phần lớn bệnh nhân bị viêm gan C, virus đã làm tê liệt hệ thống miễn dịch, sau đó có thể dẫn tới xơ gan, và ở một số trường hợp trở thành ung thư gan.

3.3. Sản xuất interleukin

Tương tự interferon, một sản phẩm khác cũng giúp cơ thể tăng khả năng miễn dịch là interleukin cũng đã được sản xuất theo công nghệ DNA tái tổ hợp. Interleukin là một lymphokine bao gồm interleukin-1 (IL-1) và interleukin-2 (IL-2), có khả năng điều hòa miễn dịch và chống ung thư.

Hiện nay, interleukin và interferon đang được thử nghiệm cùng với một số biệt dược khác để chữa trị bệnh ung thư và bệnh AIDS.

Interleukin-2 (IL-2) là một cytokine quan trọng nhất đối với sự phát triển và đáp ứng miễn dịch thích ứng. IL-2 có vai trò chính trong hoạt hóa các lympho T, ví dụ các tế bào ác tính lympho T đã bộc lộ quá mức các thụ thể IL-2, nên có thể nghĩ rằng IL-2 là yếu tố sinh trưởng của tế bào. Ngược lại, việc sử dụng tăng cường chức năng của IL-2, cũng làm tăng đáp ứng miễn dịch chống lại các khối u. Liệu pháp tiêm trực tiếp IL-2 vào mạch máu cũng làm tăng lượng tế bào lympho, làm tăng tế bào NK và làm tăng hoạt động của các dạng tế bào kiểu LAK. Liệu pháp này đang được sử dụng cho một số bệnh ung thư, như ung thư da ác tính (melanoma) và ung thư biểu mô thận.

VI. Chẩn đoán bệnh để can thiệp sớm

1. Chẩn đoán sớm giới tính của thai

Như chúng ta đã biết, ở sát bên trong màng nhân tế bào của nữ có một thể nhuộm màu đậm, mà ở tế bào của nam không có. Từ năm 1948, Murray Barr đã phát hiện vật thể giới tính này (thể Barr), gọi là vật thể giới tính vì nó giúp phân biệt nam và nữ. Ở động vật có vú cũng tương tự, con cái thì có còn con đực thì không.

Thể Barr này có ở các loại tế bào khác nhau như tế bào niêm mạc da, niêm mạc âm đạo, tế bào chân tóc, tế bào các tuyến... Đến nay, người ta có thể dùng kỹ thuật chọc ối để xét nghiệm thể Barr, chẩn đoán sớm giới tính và chẩn đoán dị hình, quái thai, để nếu cần phải sử dụng các liệu pháp can thiệp sớm.

Ở nhiễm sắc thể giới tính của nữ và động vật có vú cái có XX, ở nam và động vật có vú đực có XY. Nhiễm sắc thể Y về căn bản, rất ít gen. Số lượng gen liên kết giới tính chủ yếu nằm trong X. Đã có gen, thì tất yếu có các sản phẩm của gen tổng hợp. Trong X, có các gen tổng hợp nhiều loại protein enzyme như glucose-6-phosphatedehydrogenase, γ -globulin... Theo suy luận thông thường, nếu cả hai X ở nữ hoạt động, sinh tổng hợp protein, thì hàm lượng các loại enzyme trên ở nữ sẽ gấp đôi ở nam. Tuy nhiên, các thí nghiệm hóa sinh đã xác minh hàm lượng các loại enzyme nêu trên ở nam và nữ đều tương đương nhau.

Ứng với hiện tượng cân bằng di truyền nêu trên, người ta đã khẳng định thể Barr chính là một trong hai X của nữ, chuyển sang trạng thái dị nhiễm sắc chất, không hoạt động di truyền, bắt màu đậm. Ở nữ và động vật có vú cái, hai X này có nguồn gốc một từ bố và một từ mẹ. Trong cơ thể nữ và động vật có vú cái, dòng tế bào này thì X từ bố không hoạt động, dòng tế bào kia thì X từ mẹ không hoạt động, hoàn toàn theo tính chất ngẫu nhiên.

Trước đây, người ta xét nghiệm tế bào phôi (hợp tử) để phát hiện thể Barr từ 12-14 ngày sau khi thụ thai. Gần đây, với kỹ thuật tiên tiến hơn, đã phát hiện được thể Barr từ ba ngày đầu sau thụ thai, phôi còn mang đặc điểm lưỡng tính, chưa phân rõ nam, nữ nhưng từ ngày thứ ba sau thụ thai, đã có thể phân biệt giới tính thai nhờ kỹ thuật chọc ối.

Trong trường hợp có bệnh di truyền do gen trên nhiễm sắc thể giới tính (chủ yếu là trên X), với kỹ thuật chọc ối xét nghiệm sớm tế bào phôi non, sử dụng phương pháp chẩn đoán enzyme, dùng enzyme hạn chế, người ta có thể xác định gen đột biến gây bệnh. Vì gen bệnh này liên kết giới tính (nằm trên X), cho nên kỹ thuật enzyme hạn chế có thể giúp cho các bà mẹ có thai có phương hướng quyết định, hoặc chấp nhận liệu pháp sảy thai, hoặc không, hy vọng vào may rủi, vì trong trường hợp này khả năng thai dị hình, quái thai có thể không xảy ra, mà cũng có thể là 100%, hoặc chỉ 50%. Ví dụ: một phụ nữ bình thường nhưng có mang gen máu không đông ở dạng thể dị hợp, đã có một con trai bị bệnh máu không đông, nay muốn sinh con tiếp. Vì không có kỹ thuật chẩn đoán trước khi sinh đối với bệnh này, người ta phải chấp nhận chọc ối để chẩn đoán gái, trai. Nếu là gái, thì yên tâm sinh đẻ, vì nếu chồng là người bình thường, thì con gái chỉ mang gen bệnh ở dạng thể dị hợp, và vẫn là bình thường, còn nếu là thai nam, muốn thực sự yên tâm, thì rõ ràng phải nạo thai, nhưng theo hướng này, cũng có thể có đến 50% trường hợp thai nam nạo đi vẫn là thai bình thường.

2. Chẩn đoán sớm dị hình, quái thai trước khi sinh

Tiến hành kỹ thuật chọc ối, kết hợp đồng thời phân tích máu bố mẹ bằng enzyme hạn chế, người ta có thể chẩn đoán sớm trước khi sinh (vì sử dụng enzyme hạn chế có khả năng phân biệt được gen đột biến với gen bình thường). Các đoạn DNA cắt ra, được phân tách qua phương pháp điện di,

đem lai với các mẫu dò DNA hoặc RNA đã đánh dấu phóng xạ bằng ^{32}P . Ảnh phóng xạ tự ghi cho ta thấy các đoạn DNA được lai với các mẫu dò. Các đoạn này được tách ra để nghiên cứu và xác định đột biến hay bình thường bằng enzyme hạn chế, vì một số đột biến di truyền có ảnh hưởng đến các vị trí dành cho enzyme hạn chế.

Ví dụ: bệnh thiếu máu hồng cầu liềm là do một đột biến của gen quy định cấu trúc của hemoglobin. Gen đột biến này dẫn tới biến đổi một amino acid trong chuỗi β của phân tử hemoglobin, từ glutamic acid ở người bình thường (Hb^A) thay bằng valine ở người bệnh (Hb^S). Cháu bé bị bệnh này (Hb^SHb^S) chết sơ sinh, có thể được sinh ra từ bố, mẹ bề ngoài bình thường, nhưng là thể dị hợp về gen đột biến ($\text{Ss} \times \text{Ss}$). Cặp vợ chồng này lại tiếp tục có thai, muốn biết lần này con sinh ra có lại bị bệnh không, người ta dùng kỹ thuật chọc ối, xét nghiệm tế bào thai non. Phân tích máu bố, mẹ bằng enzyme hạn chế để cắt đoạn, đã xác định DNA của bố và mẹ, đều có mang cả đoạn ngắn và đoạn dài trong khi ấy DNA của cháu bé sơ sinh do bị bệnh hồng cầu liềm chỉ có đoạn dài. Cũng bằng enzyme hạn chế, người ta thấy DNA tế bào thai non cũng có cả đoạn ngắn và đoạn dài. Kết quả này cho phép chẩn đoán thai lần này cũng mang gen bệnh, nhưng bệnh không biểu hiện (không bị bệnh) vì ở dạng thể dị hợp như bố mẹ.

Ở người bệnh Đào, cặp nhiễm sắc thể 21 có đến 3 chiếc (không phải 2 như bình thường), bị dị hình, si đần bẩm sinh, lùn, cổ rút, má phệ, không có khả năng sinh dục. Vợ chồng có con bị bệnh Đào nay lại tiếp tục có thai có thể nhờ kỹ thuật chọc ối, chẩn đoán sớm trước khi sinh về kiểu hình di truyền tế bào, để biết có nên sinh hay phải dùng liệu pháp sảy thai.

3. Chẩn đoán phát hiện các tác nhân gây bệnh ngoại lai

Ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong lĩnh vực này có nhiều thuận lợi hơn các phương pháp cổ điển. Thứ nhất, có thể rút ngắn được thời gian nhờ ứng dụng kỹ thuật PCR, chẳng hạn chẩn đoán bệnh HIV-1, dùng phương pháp PCR chỉ mất một ngày so với 3-4 tuần nuôi cấy của phương pháp truyền thống. Thứ hai, đối với các tác nhân gây bệnh khó nuôi cấy hay không thể nuôi cấy thì kỹ thuật sinh học phân tử là giải pháp duy nhất, chẳng hạn *Chlamydia*, *Brucella*, viêm gan B... Thứ ba, việc tạo dòng một gen dùng làm probe đơn giản hơn việc sản xuất kháng thể đặc hiệu, hơn nữa với một probe người ta có thể phát hiện tất cả các kiểu huyết thanh

(serotype) của tác nhân gây bệnh, điều mà chỉ một kháng thể không thể làm được. Cuối cùng, nếu trước kia phải cần đến nhiều kỹ thuật (quan sát dưới kính hiển vi, nuôi cấy trên một loạt môi trường, miễn dịch học...) thì hướng chẩn đoán bằng sinh học phân tử chỉ cần một kỹ thuật (lai phân tử hoặc PCR). Ngoài ra, chúng ta có thể tạo dòng ngay chính gen gây bệnh để sản xuất ra mẫu thử tương ứng.

Đối với tác nhân là virus, các kỹ thuật lai phân tử và PCR đã cho phép chẩn đoán nhiều nhóm như papillomavirus, HBV, HIV. Đặc biệt phương pháp lai tại chỗ còn cho phép xác định trực tiếp virus trên lát cắt sinh thiết.

Đối với các tác nhân vi khuẩn, đã có nhiều bộ kit chẩn đoán sinh học phân tử được thương mại hóa cho các loài: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella*, ...

Đối với các tác nhân ký sinh trùng, người ta cũng đã thành công trong chẩn đoán *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Leishmania* bằng lai phân tử. Phương pháp PCR còn cho phép phát hiện tác nhân ngay trong vật trung gian truyền bệnh.

Phương pháp chẩn đoán bằng lai phân tử và PCR không chỉ giới hạn trong y học mà nó còn được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực vật. Chẩn đoán các virus gây bệnh thực vật có ý nghĩa quan trọng trong bảo vệ cây trồng. Ví dụ: phát hiện các viroid ở thực vật, vì chúng không có vỏ protein nên không thể phát hiện bằng các kỹ thuật miễn nhiễm như ELISA.

4. Chẩn đoán các bệnh di truyền

Cho đến nay, người ta đã biết được hàng trăm bệnh di truyền do gen lặn. Các bệnh này hầu như chưa có cách chữa trị, hiện chỉ hy vọng liệu pháp gen.

Chiến lược hiện nay ở nhiều nước là dự phòng. Trước kia, việc phát hiện gen lặn ở cả cha lẫn mẹ đều dị hợp tử rất khó thực hiện và chỉ biết được khi đứa trẻ ra đời. Hướng giải quyết trong các trường hợp này là chẩn đoán sớm bệnh ở thai nhi trong bụng mẹ để cho sảy thai sớm.

Phương pháp PCR đã làm tăng đáng kể hiệu quả chẩn đoán phân tử. Nhờ sự khuếch đại nucleic acid không cần tạo dòng, nên chẩn đoán phân tử có thể thực hiện thậm chí với một tế bào thôi.

Corner và cộng sự (1983) đã xây dựng phương pháp phân tích có hiệu quả và trực tiếp để xác định đột biến ở các gen hemoglobin α và β . Hai đoạn

oligonucleotide (gần 19 nucleotide mỗi đoạn) đã được tổng hợp, một trình tự bổ sung với đoạn gen có đầu NH₂ của β -globin (β A) bình thường và đoạn kia bổ sung cho β -globin (β S) bệnh hồng cầu hình liềm. Các oligonucleotide được đánh dấu phóng xạ và sử dụng để phân tích Southern blot. Trong các điều kiện thích hợp các mẫu có thể phân biệt giữa allele bình thường và bệnh. DNA của cá thể đồng hợp tử bình thường chỉ lai với mẫu β A và dị hợp tử lai với cả hai mẫu, người bệnh hồng cầu hình liềm đồng hợp tử lai với mẫu β S. Các kết quả này cho thấy các mẫu lai oligonucleotide có thể phân biệt một bắt cặp sai của đoạn lai. Phương pháp này có thể áp dụng cho nhiều chẩn đoán khác nhau, chẳng hạn hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy (X-Fragile syndrome).

Hiện nay, trong y học lâm sàng nhiều bệnh di truyền và sai hỏng bẩm sinh được chẩn đoán ở các bà mẹ mang thai hoặc trẻ sơ sinh. Tuy nhiên, tiến bộ kỹ thuật làm nảy sinh nhiều vấn đề xã hội liên quan đến đạo đức sinh học (bioethics). Ví dụ: giả sử khi phát hiện có locus tính dục đồng tính (homosexuality) thì có nên cho sảy thai hay không?

5. In dấu DNA (DNA fingerprinting)

In dấu DNA được sử dụng trong phân tích phả hệ ở chó, mèo và trong lai tạo giống. Ở người, nó được dùng để xác định nguồn gốc và sự di cư của các quần thể người cổ. Tuy nhiên, kỹ thuật này còn được sử dụng đặc biệt nhiều trong pháp y (forensis science). Phương pháp in dấu DNA sử dụng trong xác định tội phạm có nhiều ưu thế:

- Vết máu, lông hay tinh trùng trên áo trước đó nhiều năm có thể dùng xác định nhân thân.

- Mẫu bản vẫn sử dụng được.

- Tính đặc hiệu cao.

Lần đầu tiên phương pháp này được sử dụng ở Anh và đến nay đã bắt đầu lập thư viện in dấu DNA của nhiều người. Sau đó, Mỹ và nhiều nước phương Tây khác sử dụng rộng rãi. Có nhiều ví dụ rất rõ về tiềm năng của phương pháp này:

Chẳng hạn, năm 1984 một đứa bé người Ghana bị từ chối nhập cư vào Anh vì nghi nó không phải là con, mà là cháu một người đàn bà được phép nhập cư. Việc phân tích protein huyết tương, các kháng nguyên và enzyme

của máu không xác định được là con hay cháu. Sau đó, phương pháp in dấu di truyền được thực hiện. Kết quả phân tích bằng điện di cho thấy trong 61 đoạn DNA hiện dấu, đứa bé có 25 đoạn đặc hiệu giống với những đoạn của người đàn bà. Phân tích in dấu DNA chứng minh chắc chắn đứa bé là con với xác suất trùng hợp các đoạn DNA rất cao.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Hồ Huỳnh Thùy Dương.** 1998. Sinh học phân tử. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
2. **Khuất Hữu Thanh.** 2004. Liệu pháp gen-nguyên lý và ứng dụng. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội.
3. **Bains W.** 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press Inc.* New York, USA.
4. **Coleman WB and Tsongalis GJ.** 1997. Molecular Diagnostics (For The Clinical Laboratorian). *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey, USA.
5. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
6. **Marshak DR, Gardner RL and Gottlieb D.** 2001. Stem Cell Biology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, USA.
7. **Pollard JW and Walker JM.** 1997. Basic Cell Culture Protocols. *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey, USA.
8. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
9. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall Inc.* New Jersey, USA.
10. **Walker JM and Rapley R.** 2002. Molecular Biology and Biotechnology. 4th ed. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.

Chương 9

Các ứng dụng trong môi trường

I. Mở đầu

Như chúng ta biết, môi trường sống hiện đang bị ô nhiễm trầm trọng, giải quyết nạn chất thải vẫn là vấn đề hết sức nan giải, đặc biệt là chất thải công nghiệp ảnh hưởng rất lớn đến môi sinh. Ngoài ra, một khối lượng lớn chất thải dân dụng, rác thành phố, phế phẩm nông nghiệp... cũng đã và đang gây ô nhiễm nặng nề môi trường sống. Dân số của thế giới lại không ngừng tăng, nhu cầu tiêu thụ hàng hóa càng lớn, khối lượng hàng hóa phải sản xuất ra ngày càng nhiều, vì thế lượng rác do sản xuất và tiêu thụ thải vào môi trường là không nhỏ.

Cùng với sự phát triển của khoa học-kỹ thuật, loài người đang phải bắt đầu tìm cách giải quyết vấn đề bảo vệ môi trường bằng nhiều 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: 1) Phân hủy các độc chất vô cơ và hữu cơ; 2) Phục hồi các chu trình trao đổi chất của C, N, P và S trong tự nhiên; 3) Thu nhận các sản phẩm có giá trị ở dạng nhiên liệu hoặc các hợp chất hữu cơ.

Hiện tại có hai vấn đề cơ bản được đặt ra: 1) Giải quyết tiêu hủy một khối lượng khổng lồ các loại chất thải ngày càng nhiều mà không ảnh hưởng đến môi trường. 2) Vô hiệu hóa các loại chất độc sinh ra trong quá trình phân hủy các loại chất thải công nghiệp, đã gây ô nhiễm nghiêm trọng đất, nước, không khí, và gây nguy hiểm đến sức khỏe con người và động vật.

Với sự phát triển của công nghệ sinh học nói chung và công nghệ DNA tái tổ hợp nói riêng, việc nghiên cứu và ứng dụng thành tựu công nghệ sinh học để giải quyết vấn đề môi trường được đặt ra cấp bách và thực sự đang được ứng dụng ngày càng rộng rãi.

II. Xử lý nước thải

Cho đến nay, các chất thải trong hoạt động sống của con người đều được xử lý một cách tự nhiên nhờ vi sinh vật. Nhìn chung, quá trình này bao

gồm một số giai đoạn sau: 1) Loại bỏ phần rắn, tủa và cặn. 2) Phân hủy các chất hữu cơ tan trong nước nhờ vi khuẩn hiếu khí để tạo ra bùn non (còn gọi là bùn hoạt tính), bùn non sau đó bị loại bỏ hoặc được đưa vào bể phản ứng để tái sử dụng. 3) Tạo tủa và tách P và N (giai đoạn này có khi không cần thiết). 4) Xử lý bùn tạo ra ở giai đoạn 1 và 2 bằng phân hủy yếm khí. Quá trình này làm giảm thể tích cặn, số lượng vi sinh vật gây bệnh, làm mất mùi hôi và tạo ra nhiên liệu sinh học chứa khí methane, còn gọi là biogas.

1. Xử lý hiếu khí bằng hệ thống bùn hoạt tính

Công nghệ xử lý chất thải bằng bùn hoạt tính có công suất lớn hơn nhiều so với xử lý bằng bộ lọc thấm. Tuy nhiên, nó cũng có một số nhược điểm sau: do cường độ sử dụng lớn hơn, nên mức tiêu thụ năng lượng để khuấy trộn không khí cũng như số lượng sinh khối được tạo ra lớn hơn (Bảng 9.1). Công nghệ này thích hợp để xử lý nước thải cho các điểm dân cư đông đúc, vì nó chiếm ít diện tích hơn so với hệ thống xử lý theo công nghệ lọc thấm.

Bảng 9.1. So sánh các quá trình xử lý nước thải khác nhau

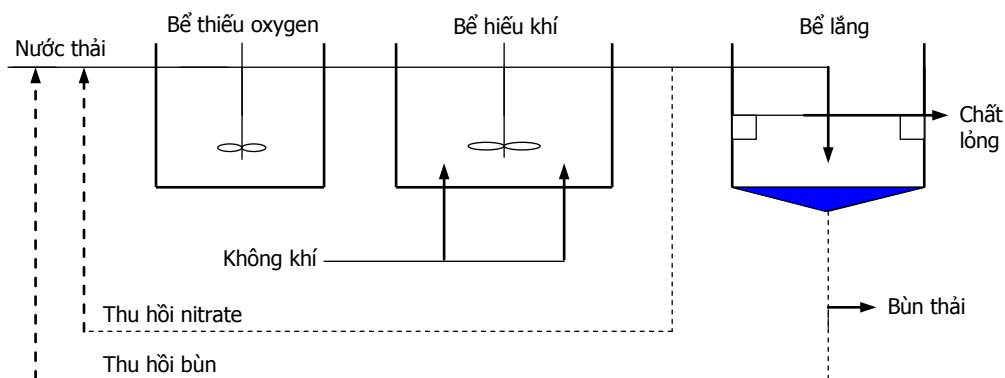
	Xử lý hiếu khí		Xử lý yếm khí
	Bùn hoạt tính	MBR	UASB
BOD còn lại	Thấp	Rất thấp	Cao
N và P còn lại	Thấp	Thấp	Cao
Sản xuất bùn	Cao	Rất thấp	Rất thấp
Năng lượng	Cao	Cao	Thấp
Diện tích đáy	Lớn	Rất nhỏ	Rất nhỏ
Độ tin cậy	Phần lớn là bùn	Thô	Nổi hạt nhỏ

Chú thích:

MBR: bể phản ứng sinh học màng (membrane bioreactor)

UASB: bể phản ứng kiểu lớp phủ bùn thái yếm khí chảy lên (upflow anaerobic sludge blanket reactor).

Thực tế có khá nhiều hệ thống xử lý theo công nghệ này. Thiết kế của chúng khác nhau tùy thuộc vào hệ số thông khí và cách thức cung cấp khí (Hình 9.1). Bùn non trong hệ thống xử lý này chứa nhiều nước hơn so với bùn non trong bộ lọc thẩm, vì vậy chứa ít chủng loại vi sinh vật hơn. Để quá trình xử lý đạt kết quả, việc xác định thành phần và nồng độ các chất trong nước thải là vấn đề quan trọng bậc nhất nhằm tạo điều kiện cho nhiều nhóm vi sinh vật tham gia quá trình xử lý. Các vi sinh vật quan trọng nhất là nhóm vi khuẩn tự dưỡng chất hữu cơ như: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* và *Moraxella*. Trường hợp nước thải có hàm lượng chất vô cơ cao, thì cần sự có mặt các loại vi khuẩn như: *Thiobacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* và *Ferrobacillus*, chịu trách nhiệm oxy hóa S, NH_3 và Fe.



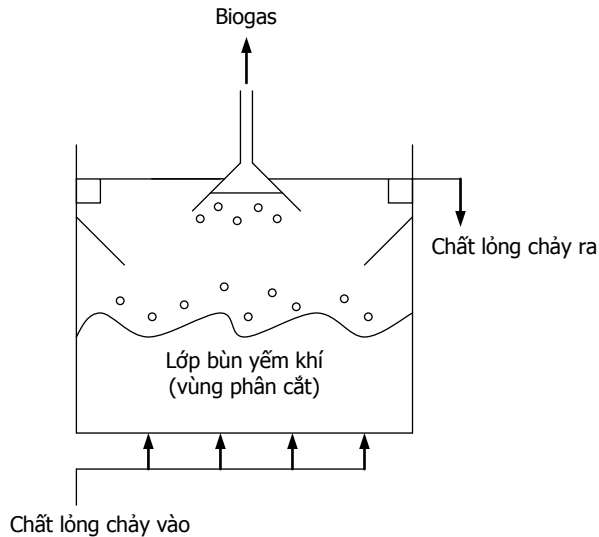
Hình 9.1. Sơ đồ dòng chảy của bùn hoạt tính với sự loại bỏ N sinh học

2. Xử lý yếm khí

Trong quá trình xử lý yếm khí chất thải (lên men tạo khí methane) có ba nhóm vi khuẩn tham gia: 1) Nhóm vi khuẩn chịu trách nhiệm thủy phân và lên men. 2) Nhóm vi khuẩn tạo H_2 và acetic acid. 3) Nhóm vi khuẩn tạo khí methane tự dưỡng sử dụng H_2 . Để nâng cao hiệu suất của quá trình lên men, hiện nay người ta vẫn tiếp tục hoàn thiện các loại giống, chủng vi khuẩn lên men yếm khí bằng biện pháp chọn lọc tự nhiên hoặc nhờ phương pháp công nghệ DNA tái tổ hợp. Đặc biệt, về mặt công nghệ người ta cần phải chú ý khắc phục các yếu tố giới hạn tốc độ phân hủy cơ chất có mặt trong chất thải như cellulose, tinh bột... và tốc độ tạo khí methane. Cần lưu ý

một số sản phẩm cuối của quá trình lên men như H_2 , CO_2 và H_2S thường có tác động ức chế ngược làm giảm hoạt động của vi khuẩn tạo khí methane.

Trong thực tế có rất nhiều kiểu thiết bị lên men yếm khí. Từ những dạng cấu tạo đơn giản hoàn toàn thủ công, cho đến các hệ thống xử lý có cấu tạo khá phức tạp hiện đang hoạt động ở một số nước phát triển. Dưới đây là kiểu thiết bị lên men yếm khí tương đối điển hình và đang được sử dụng khá rộng rãi (Hình 9.2).



Hình 9.2. Sơ đồ của bể phản ứng UASB

3. Thu hồi nước (water recycling)

Hiện nay, trên thế giới vấn đề thiếu nước ngày càng trở nên trầm trọng, do đó việc sử dụng lại nước thải sau khi được xử lý sẽ là một hướng ưu tiên trong các thập kỷ tới.

Ở các nước thuộc thế giới ba việc sử dụng nước thải thô của chăn nuôi để tưới trực tiếp cho cây trồng lương thực khá phổ biến. Một hệ thống vòng khép kín như thế có khả năng gây nhiễm bẩn rất lớn các cây trồng lương thực với các virus gây bệnh hoặc prion. Đây cũng là một thách thức lớn trong việc thực hiện các công trình có giá trị kinh tế nhằm sản xuất nước tưới an toàn vệ sinh mà không loại bỏ các chất có thể sử dụng làm phân bón

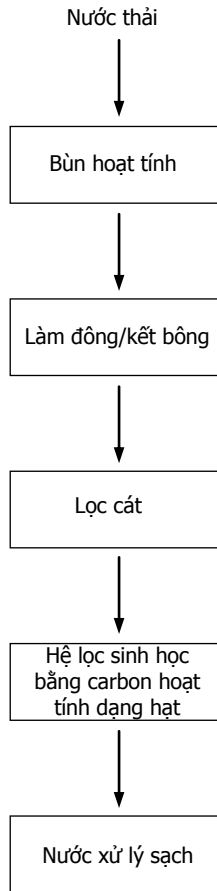
như là N và P. Trong trường hợp này, sự phân hủy yếm khí là rất có triển vọng.

Một hoạt động sử dụng nước rất nhiều nữa là sản xuất công nghiệp, chẳng hạn công nghiệp thực phẩm, kim loại, dệt và giấy. Hiện nay, các hoạt động sản xuất này đang phát triển các hệ thống xử lý mới cho phép thu hồi nước thải của họ trong một hệ thống vòng khép kín. Đặc trưng, là một hệ thống các quy trình sản xuất nước chất lượng cao từ nước thải của quá trình sản xuất. Quy trình này thường phối hợp các xử lý sinh học ở giai đoạn đầu và các xử lý hóa-lý ở bước cuối cùng. Ví dụ: nhà máy sản xuất chip khoai tây sử dụng một chuỗi các quá trình bao gồm xử lý hiếu khí và yếm khí, lọc, khử trùng bằng khí ozone và thẩm thấu ngược. Một hệ thống xử lý phức tạp như thế cần thiết được thực hiện để loại bỏ hoàn toàn các carbohydrate, thuốc diệt cỏ và vi sinh vật.

Thực tế cho thấy, để sản xuất một tấn thép người ta cần 280 tấn nước. Trong trường hợp này, những cố gắng thu hồi nước từ các lò luyện than cốc thông qua xử lý bùn hoạt tính đã bị đe dọa bởi sự nhiễm độc bùn thải nhanh khi hơn 50% nước xử lý đã được tái sử dụng. Nguyên nhân do sự tích lũy các hợp chất hữu cơ độc tính cao, vì vậy nó cũng chỉ ra sự cần thiết phải nghiên cứu cẩn thận về các hợp chất hữu cơ còn thừa và thậm chí các sản phẩm vi sinh vật đã làm tăng quá trình chuyển hóa không hoàn toàn. Nhiều thiết bị xử lý ướt nguyên liệu dệt hiện nay đang nâng cấp các hệ thống xử lý nước thải của nó để thu hồi nước. Do thành phần hóa học của các chất thải lỏng thay đổi rất lớn (tùy thuộc vào loại vải và thuốc nhuộm đang được xử lý), cho nên ít có hai nhà máy dệt cùng áp dụng một phương thức để xử lý nước thải của họ (Hình 9.3).

III. Phân hủy bùn hữu cơ

Sản xuất các loại bùn hữu cơ, chẳng hạn như bùn thải hoặc phân động vật, đang tăng lên ở nhiều nơi trên thế giới và chúng thường được sử dụng một cách tùy tiện, ví dụ như các ứng dụng của chúng lên đất nông nghiệp. Vì thế, hiện nay số lượng các nước có lệnh cấm sử dụng tùy tiện đang tăng lên do sự ô nhiễm của nước ngầm. Các quá trình xử lý thân thiện với môi trường hơn cho các loại bùn hữu cơ lại có giá thành cao và/hoặc hiệu quả kém.



Hình 9.3. Sơ đồ dòng chảy xử lý trong công nghiệp dệt. Nước sau khi xử lý được dùng để rửa, tẩy sạch, tẩy trắng, nhuộm và in. Xử lý sinh học kết hợp với xử lý hóa-lý để đạt được sự tinh sạch cần thiết.

Quá trình xử lý cho hiệu quả tốt đối với các bùn thải và phân động vật là sự phân hủy yếm khí trong các bể phản ứng được trộn đều (completely-mixed reactor). Trong suốt quá trình này, khoảng 50% chất rắn được biến đổi thành biogas, trong khi phần còn lại hầu như được ổn định. Sản lượng biogas của các chất phân hủy yếm khí có thể được tăng lên bằng cách đồng phân hủy (co-digesting) phân động vật hoặc bùn thải với 10-20% các chất thải rắn từ công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp, ví dụ: chất thải của lò mổ gia súc, được phẩm, nhà bếp, chất thải lên men hoặc chất thải đô thị.

Các bể phản ứng được trộn đều để xử lý các bùn thải hữu cơ có tốc độ nạp thấp, khoảng từ 2-5 kg chất hữu cơ/m³ bể phản ứng trong một ngày, do các chất hữu cơ dạng hạt phải được hòa tan trước khi chúng có thể thực hiện biến đổi yếm khí (Bảng 9.2). Tốc độ hòa tan các chất thải hữu cơ có thể khá thấp, chẳng hạn cần phải mất 15 ngày mới thủy phân được 90%. Vì thế, cần duy trì thời gian ít nhất là 20 ngày, có khi lên tới 60 ngày hoặc lâu hơn.

Bảng 9.2. Các thông số thiết kế cho các loại bể phản ứng yếm khí

	Bể phản ứng UASB	Bể phản ứng được trộn đều	Bể phản ứng trạng thái rắn
Chất lỏng được xử lý	Nước thải	Bùn hữu cơ	Các chất thải rắn
Nồng độ chất rắn trong bể phản ứng (g/L)	< 50	50-100	200-400
Tốc độ nạp (kg chất hữu cơ/m ³ ngày)	10-30	2-5	20-40
Thời gian giữ nước (ngày)	0,3-1	20-40	10-20
Thời gian giữ chất rắn (ngày)	>20	20-40	10-20

Thực hiện sự phân hủy ở các mức nhiệt độ cao cũng có thể cải thiện được hiệu suất do tốc độ thủy phân của các chất dạng hạt tăng lên cùng với việc tăng nhiệt độ. Nhờ hiểu biết đầy đủ về quá trình phân hủy ưa nhiệt người ta đã xây dựng được một số hệ phân hủy ưa nhiệt quy mô lớn để xử lý phân bón đồng ruộng. Khi thực hiện ở nhiệt độ cao, các bể phản ứng này cho phép thu được chất lỏng không có tác nhân gây bệnh, không giống như trường hợp phân hủy ưa nhiệt trung bình, thường thất bại do còn lại các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ phân. Trước đây, một số hạn chế đã làm cho sự phân hủy ưa nhiệt khó trở thành thông dụng, ví dụ các khó khăn của sự khởi động và độ nhạy đối với một vài nhân tố stress nào đó như NH₃ và H₂S. Đất sét bentonite có thể được dùng để loại bỏ sự

ức chế NH_3 . Mặt khác, H_2S có thể bị phá hủy bằng cách đưa vào các chất nhận điện tử, ví dụ oxygen hoặc nitrate trong bể phản ứng.

Phương pháp kết tủa thông qua điều chỉnh pH bằng vôi là giải pháp hữu hiệu vì độ pH cao cũng có thể giúp loại bỏ ammonium. Phương pháp này cũng có thể được phối hợp với việc bổ sung muối nhôm hoặc muối sắt, tốt nhất là từ một nguồn rẻ tiền như loại nước thải giàu nhôm/sắt từ các thiết bị sản xuất nước uống. Vẫn còn một phương pháp nữa để tối ưu các điều kiện kết tủa MgNH_4PO_4 đó là thông qua làm lạnh và tách CO_2 .

Các công nghệ hiện nay như ổn định yếm khí hoặc hiếu khí, nghiền đất (land disposal) và đốt các bùn thải hữu cơ cung cấp các phương thức làm mất nước (làm khô) bùn thải từ 2-5% tới 25-40% chất khô có thể được phát triển rẻ tiền và hiệu quả hơn. Thách thức chính đối với công nghệ sinh học môi trường là phát triển các enzyme, các sản phẩm và phương thức xử lý cho phép làm mất nước của sinh khối vi sinh vật (bùn dư) tới mức thích hợp. Các phát triển mới đang được ứng dụng thương mại dựa vào sự sinh nhiệt trong quá trình hậu xử lý hiếu khí để bốc hơi lượng nước thừa. Quá trình “làm khô sinh học này” đòi hỏi ít năng lượng hơn các kỹ thuật làm khô bằng nhiệt. Tuy nhiên, còn một khó khăn rất nhạy cảm đó là sự sinh ra mùi thối đã làm ngừng hoạt động của một số nhà máy.

IV. Xử lý chất thải rắn

Các phương pháp xử lý chất thải rắn thường được sử dụng là chôn trong đất (landfilling) hoặc đốt. Hiện nay, phương pháp chôn trong đất ngày càng ít được lựa chọn do chúng ngăn cản sự thu hồi các sản phẩm có thể dùng lại được (plastic, giấy, các vật liệu xây dựng...) và chúng không hiệu quả lắm trong việc thu hồi năng lượng (biogas). Hơn nữa, chôn trong đất ngầm có thể gây ra sự bốc mùi của khí gây ô nhiễm môi trường. Tương tự như thế, các lò đốt không cho phép thu hồi nguyên liệu mặc dù chúng có thể được thiết kế để thu hồi năng lượng từ chất thải. Các lò đốt có nhiều hạn chế như giá thành cao và ngoài ra hệ thống khí của ống khói cần được thiết kế tinh vi để tránh ô nhiễm môi trường.

Hiện nay, một phương thức xử lý chất thải rắn công nghiệp và đô thị khác đang được thực hiện nhờ vào thiết bị phân tách và sản xuất phân ủ. Đây là những thiết bị rất lớn và phức tạp, có năng suất cao (100.000 tới

300.000 tấn chất thải/năm), được thiết kế một hệ phân tách vật lý để thu hồi các vật liệu khác nhau từ các vật bỏ đi, như:

- Cát và sỏi bán lại như vật liệu xây dựng.
- Sắt bán lại cho công nghiệp luyện kim.
- Nhôm và các kim loại không chứa sắt khác có giá trị bán lại cao.
- Giấy và giấy cartoon bán cho công nghiệp giấy.
- Các plastic cứng và mềm được dùng lại hoặc đốt.
- Các chất hữu cơ có thể phân hủy sinh học được biến đổi thành phân ủ và biogas.

Phân đoạn hữu cơ của chất thải rắn đô thị được dùng làm phân bằng phương pháp hiếu khí hoặc yếm khí. Trong khi sản xuất phân hiếu khí là một công nghệ được ứng dụng từ lâu, thì những phát triển gần đây trong sản xuất phân yếm khí cũng đã có một vài tiến bộ (Bảng 9.3).

Bảng 9.3. So sánh các loại phân hiếu khí và yếm khí

	Phân hiếu khí	Phân yếm khí
Chi phí	60 bảng Anh/tấn (năm)	75 bảng Anh/tấn (năm)
Diện tích đất	Lớn	Nhỏ
Cân bằng năng lượng	Tiêu thụ năng lượng	Sản sinh năng lượng
Mùi thối	Có vấn đề	Không có vấn đề
<i>Chất lượng phân</i>		
Hàm lượng phân	Cao (độc)	Thấp
Các tác nhân gây bệnh	Có	Không

Các công ty môi trường khác nhau đã thiết kế các hệ phân hủy yếm khí khác nhau cho chất thải rắn như:

- Nồng độ chất rắn trong bể phản ứng: 50-400 g/L.
- Nhiệt độ thích hợp từ nhiệt độ trung bình (35°C) tới nhiệt độ cao (55°C).

- Số giai đoạn lên men (một hoặc hai).

Một thiết kế như thế đã được thực hiện đó là quá trình DRANCO (dry anaerobic composting) dùng nhiệt độ cao (55°C) ở nồng độ chất rắn lớn (200-400 g/L) trong lên men một giai đoạn. Thực tế, đây là một quá trình tương tự với quá trình phân hủy tự nhiên chất thải chôn trong đất, chỉ khác ở chỗ nó được tiến hành trong bể phản ứng kín được điều chỉnh tốt và ở tốc độ phản ứng lớn hơn nhiều. Các tốc độ phản ứng rất cao có thể đạt tới giúp cho nó có khả năng hoàn thành quá trình phân hủy trong hai tuần (Bảng 9.2) thay cho 20 năm ở trong đất. Vấn đề cốt lõi của quá trình này là nhiệt độ cao và cường lực phối trộn thông qua sự tuần hoàn khép kín cho phép tốc độ phản ứng cao hơn nhiều và cung cấp chất rắn trực tiếp vào trong bể phản ứng không cần bổ sung nước pha loãng. Do khuấy cơ học không đủ khả năng làm khô, nên sản phẩm của bể phản ứng được thu hồi vài lần, với việc bổ sung nguyên liệu sạch cung cấp ở mỗi lần (passage) (Hình 9.4). Vòng thu hồi đảm bảo phối trộn đầy đủ và cho phép đưa nguyên liệu cung cấp vào.

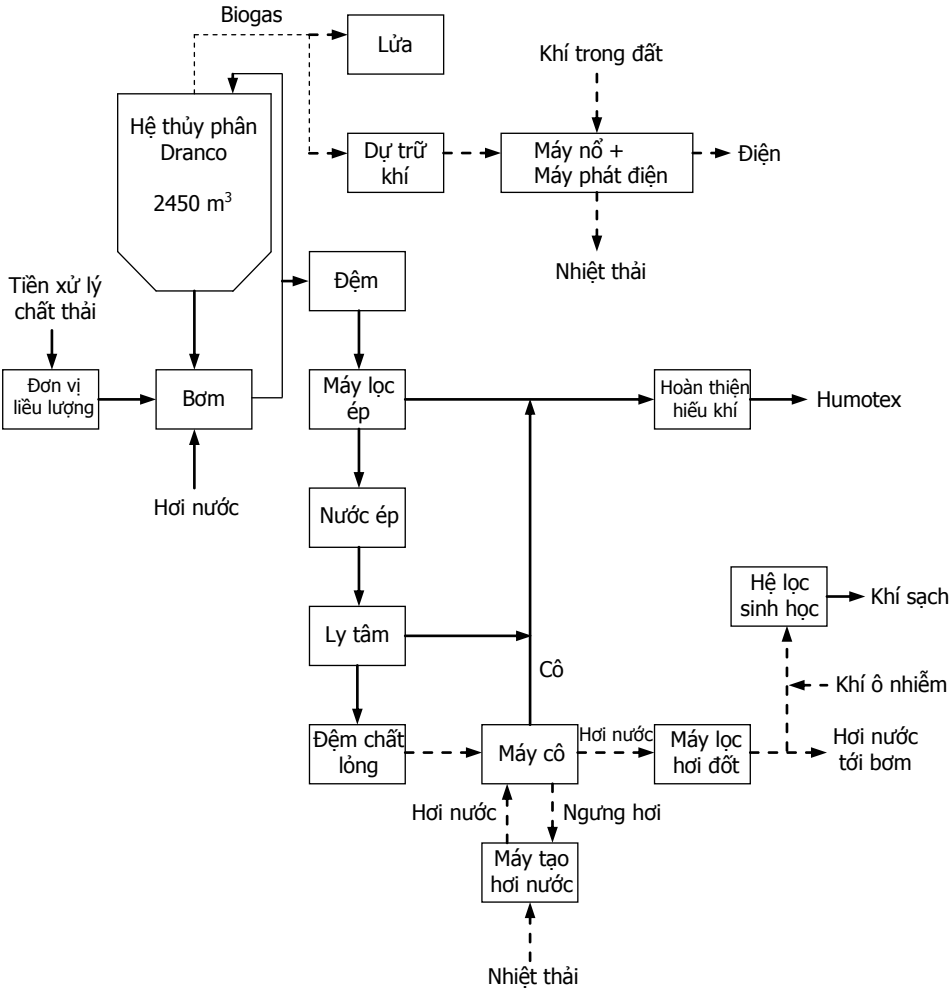
Sản phẩm cuối cùng là đất mùn được dùng làm phân ủ hiệu khí rất tốt trong trồng trọt. Nguyên nhân để các phân ủ hiệu khí có thể gây độc đối với cây trồng là do hàm lượng muối cao của chúng, trong khi đó các phân ủ yếm khí hầu như như ít muối do thực tế là khoảng một nửa trong số chúng bị đào thải bằng nước trong máy nén lọc (Hình 9.4). Hơn nữa, các phân ủ yếm khí chứa ít hạt cỏ dại và các tác nhân gây bệnh vi sinh vật hơn so với phân ủ hiệu khí. Tuy nhiên, giá trị thị trường của các phân ủ khá thấp và hậu xử lý đặc trưng sẽ phải được tìm kiếm cho các ứng dụng khác nhau. Vấn đề sau có thể được thực hiện bằng cách bổ sung các vi sinh vật hữu ích như là cố định nitrogen và các vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật, mycorrhizae hoặc các vi sinh vật điều khiển sinh học (biocontrol). Sự phục hồi các đất bị ô nhiễm cũng có thể hữu ích nhờ bổ sung phân ủ vì chúng có thể giúp phân hủy các hợp chất xenobiotic trong các vùng đất này.

V. Xử lý khí thải

1. Loại bỏ các hợp chất vô cơ dễ bay hơi (volatile organic compounds-VOCs)

Các phương pháp xử lý hóa-lý truyền thống cho các khí thải công nghiệp gây ô nhiễm, như là đốt hoặc dùng các bộ lọc than hoạt tính, có khuynh hướng thải nhiều năng lượng và tạo ra sự ô nhiễm thứ cấp. Để đốt

cháy các khí này (với nồng độ gây ô nhiễm là 100 mL/m^3) trong các lò đốt, ít nhất cần $50 \text{ L methane được bổ sung/m}^3$ để đảm bảo để phá vỡ hoàn toàn cấu trúc. Trong hầu hết trường hợp, một bể phản ứng sinh học có thể thực hiện oxy hóa các VOCs bằng cách cho tiếp xúc khấp kín với các vi sinh vật phân hủy, O_2 , H_2O và các chất dinh dưỡng.



Hình 9.4. Sơ đồ dòng chảy của hệ sản xuất phân trộn yếm khí

Các chất gây ô nhiễm có tốc độ phân hủy sinh học khác nhau:

- **Phân hủy sinh học nhanh:** alcohols, ketones, aldehydes, các acid hữu cơ, N hữu cơ.

- **Phân hủy sinh học chậm:** phenols, hydrocarbons, các dung môi (ví dụ: chloroethene).

- **Phân hủy sinh học rất chậm:** các hydrocarbon đa halogen và đa nhân thơm.

Các thiết kế bể phản ứng khác nhau được sử dụng để xử lý khí bằng phương pháp sinh học (Hình 9.5A). Trong các hệ lọc sinh học, không khí nhiễm bẩn chảy chậm qua một môi trường xốp ẩm (phân ủ, than bùn, vỏ dăm bào) làm giá thể (vật đỡ) cho quần thể vi sinh vật phân hủy sống trong màng nước mỏng bọc vật liệu giá thể rắn. Dòng chảy của lớp không khí bề mặt khác nhau từ 1-15 cm/s. Tốc độ này cho hiệu suất thời gian tiếp xúc (với một đệm nhồi đặc trung cao từ 1-3 cm) từ 10-100 s. Đối với các hợp chất phân hủy sinh học bình thường, có thể đạt được hiệu suất loại bỏ tới 90% với tốc độ nạp từ 0,1-0,25 kg các chất hữu cơ/m³ bể phản ứng trong một ngày. Các ưu điểm của hệ lọc sinh học là:

- Thiết kế đơn giản và rẻ tiền (vật liệu giá thể được thay thế sau 2-4 năm).

- Diện tích mặt trong cao làm cho hệ lọc sinh học thích hợp một cách lý tưởng để loại bỏ các chất ô nhiễm kém hòa tan, chẳng hạn các hydrocarbon.

- Có khả năng đưa vào các vi khuẩn thích nghi đặc biệt để phá vỡ các hợp chất xenobiotic, chẳng hạn chloromethane.

Vấn đề khó khăn nhất là kiểm soát pH trong các hệ lọc sinh học vì H₂S sẽ bị oxy hóa thành H₂SO₄, NH₃ thành HNO₃, và các chất hữu cơ chứa chloro thành HCl. Nhược điểm lớn nhất của hệ lọc sinh học là:

- Cần một không gian nền lớn.

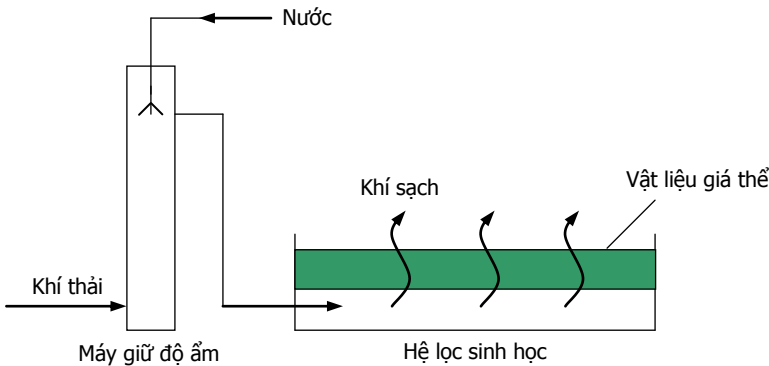
- Không có khả năng điều chỉnh các điều kiện của quá trình, chẳng hạn như pH.

- Các vật liệu giá thể như phân ủ tự chúng sản sinh ra các mùi.

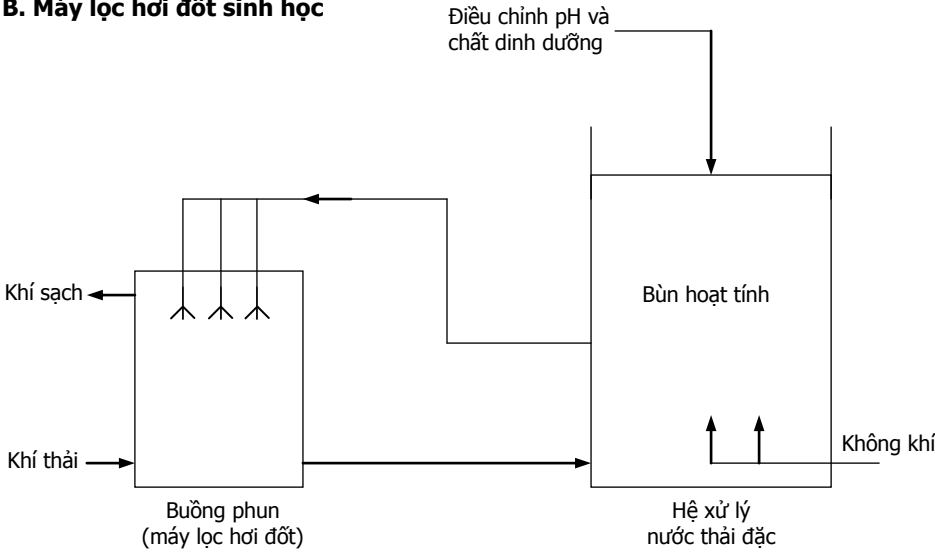
Các nhược điểm này của hệ lọc sinh học có thể khắc phục được trong máy lọc hơi đốt sinh học (bioscrubber) (Hình 9.5B). Một máy lọc hơi đốt truyền thống chuyển một chất hiện diện trong dòng khí tới dòng chất lỏng bằng cách phun chất lỏng trong buồng qua bộ phận mà khí được chuyển qua. Trong máy lọc hơi đốt sinh học, các chất lỏng được phun là dịch huyền phù của các vi sinh vật quay vòng ngược và hướng tới trước giữa buồng

phun và một hệ xử lý nước thải bằng phân hủy sinh học. Các thông số của quá trình như cung cấp chất dinh dưỡng thích hợp và pH được điều chỉnh để đảm bảo hơn nhiều (trong chất lỏng tuần hoàn) so với hệ lọc sinh học, dẫn tới các tốc độ phản ứng nhanh. Trong khi các hệ lọc sinh học đòi hỏi một diện tích đáy lớn vì chiều cao của chúng không được vượt quá 1 m để tránh công kênh, thì các máy lọc hơi đốt sinh học đòi hỏi một không gian ít hơn nhiều bởi vì bể phân hủy sinh học có thể cao một vài mét.

A. Hệ lọc sinh học



B. Máy lọc hơi đốt sinh học



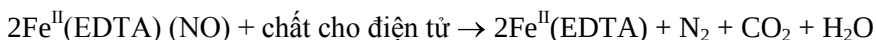
Hình 9.5. Hệ lọc sinh học và máy lọc hơi đốt sinh học được dùng để loại bỏ VOCs khỏi khí thải

Máy lọc hơi đốt sinh học là loại thích hợp nhất cho các dòng chảy khí lớn do áp suất ngược thấp và kích thước nhỏ của chúng. Tuy nhiên, chúng có thể chỉ được dùng để loại bỏ các khí hòa tan hoàn toàn vì tốc độ chuyển khối trong buồng phun của chúng kém hơn trong hệ lọc sinh học. Trường hợp nồng độ các chất nhiễm bẩn thu được ở trong khí thải là quá cao, thì một máy lọc hơi đốt sinh học thứ hai được đưa vào có bổ sung các vi sinh vật có khả năng phân hủy nồng độ chất nhiễm bẩn thấp hơn.

Hiện nay, các nghiên cứu đang tập trung thiết kế một hệ thống có thể phối hợp sự hấp thụ khí trên bề mặt rắn (ví dụ: than hoạt tính) và phân hủy sinh học các hợp chất sorbic. Các màng lọc sinh học loại dòng chảy nhỏ giọt (bio-trickle filters) là các tấm plastic hoặc môi trường giá thể cho các vi sinh vật khác được treo trong dòng chảy không khí bị nhiễm bẩn. Các tấm này được thấm ướt liên tục bằng dòng chảy hồi lưu của nước chứa các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật. Các màng lọc sinh học nhỏ giọt có ưu điểm là tiết kiệm được không gian.

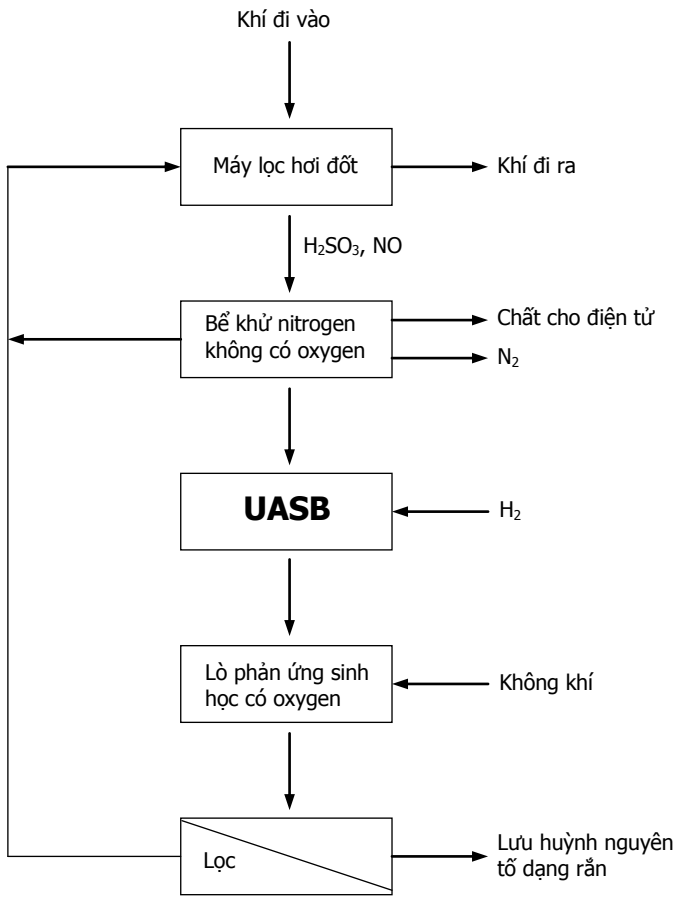
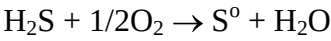
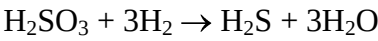
2. Loại bỏ các hợp chất sulphur và nitrogen từ khí ống khói bằng phương pháp sinh học

Các nitrogen oxide (NO_x) và sulphur oxide (SO_2) là các chất ô nhiễm không khí chính được tạo thành trong lúc đốt than đá và dầu giải phóng trong các loại khí ống khói. Có thể phát triển các phương pháp công nghệ sinh học có giá trị kinh tế và hiệu quả để loại bỏ đồng thời các chất gây ô nhiễm không khí này, vì các kỹ thuật hóa-lý truyền thống hoặc là rất đắt hoặc là không hiệu quả. Một hệ thống mới được đề xuất đó là khí ống khói được dẫn qua một máy lọc hơi đốt mà trong đó >95% SO_2 và >80% NO_x hòa tan trong dung dịch NaHCO_3 và Fe(II)-EDTA (hợp chất sau có thể tăng khả năng hòa tan NO_x). Dung dịch đầy N và S được sinh ra trong ba giai đoạn sinh học tuần tự (Hình 9.6). Giai đoạn đầu tiên bao gồm bề phản ứng thiếu oxygen trong đó NO được biến đổi thành khí N_2 trở thông qua quá trình khử nitrogen sinh học.



Một chất cho điện tử, chẳng hạn methanol hoặc ethanol, cần được bổ sung để duy trì phản ứng. Trong hai giai đoạn tiếp theo, H_2SO_3 được khử

sinh học tuần tự thành H_2S và cuối cùng oxy hóa lại từng phần thành lưu huỳnh nguyên tố dạng rắn:



Hình 9.6. Một quá trình sinh học mới được phát triển để đồng thời khử sulphur hóa (desulphurisation) và loại bỏ NO khỏi các khí ống khói được sản xuất trong các thiết bị nhiệt

Phản ứng khử H_2SO_3 xảy ra trong bể phản ứng UASB (Hình 9.2) đã được kết hạt với các vi khuẩn khử sulphate. Các polymer gây kết bông đã được bổ sung, cùng với các chất dinh dưỡng cần thiết và các đường lượng

khử (ethanol hoặc H_2), để điều chỉnh tỷ lệ phân tử BOD/ H_2SO_3 ở một giá trị không đổi. Trong bể phản ứng sinh học thứ ba các vi khuẩn hiếu khí oxy hóa sulphide thành lưu huỳnh nguyên tố (S^0) dạng rắn (sản phẩm cuối). Sự oxy hóa thêm S^0 thành H_2SO_3 và H_2SO_4 bị ngăn cản bởi một lượng giới hạn O_2 . Toàn bộ quá trình là tự động hoàn toàn với khoảng 120 thông số được phân tích liên tục, đa số trong chúng là trực tuyến. Nước cũng được thu hồi liên tục.

VI. Phân hủy chất rắn (solid remediation)

1. Kích thích sinh học (biostimulation) và tăng sinh học (bioaugmentation)

Các vi sinh vật có khả năng phân hủy sinh học các chất gây ô nhiễm thường hiện diện sẵn trong các đất nhiễm bẩn hoặc nước ngầm. Vì vậy, trong nhiều trường hợp, sự phân hủy sinh học chất rắn hoặc nước ngầm được thực hiện bằng cách kích thích sinh học các vi sinh vật, nơi có chất dinh dưỡng hoặc các nhân tố sinh trưởng cần thiết khác của chúng. Các chất hoạt động bề mặt cũng có thể được bổ sung để thuận tiện cho việc chuyển khối các hydrocarbon hòa tan kém vào trong pha nước nơi mà các vi sinh vật sống. Ví dụ của kích thích sinh học là đưa methane vào trong tầng ngầm nước bị ô nhiễm các dung môi được khử trùng bằng chloro hoặc đưa benzoic acid vào trong tầng ngầm nước bị ô nhiễm bởi polychlorobiphenyls (PCBs). Các nguồn carbon được đưa vào như methane và benzoic acid đã kích thích sinh trưởng của các vi sinh vật đặc hiệu sản xuất các enzyme làm đứt gãy cơ chất được đưa vào và chất gây ô nhiễm đang hiện diện.

Giải pháp thích hợp là có thể đưa các quần thể vi sinh vật đặc hiệu (tăng sinh học) vào trong các vị trí bị ô nhiễm nhất định khi chất gây ô nhiễm là một phân tử phức tạp chỉ có thể bị phá vỡ bởi một tổ hợp đặc biệt của các vi sinh vật rất đặc hiệu (được gọi là consortium). Các chất gây ô nhiễm như thế thường là polyaromatic hydrocarbons (PAHs), các hợp chất hữu cơ được halogen hóa, các thuốc trừ sâu nhất định, thuốc nổ TNT, polychlorobiphenyls (PCBs)... Các điều kiện và các chủng vi sinh vật thích hợp cho thấy chúng có ảnh hưởng đến sự phân hủy sinh học của các hợp chất này khi nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm. Ví dụ: sự phân hủy của các chất thơm được khử trùng đơn giản bằng chloro ở trong đất và các thiết bị xử lý nước thải có thể phát huy hiệu quả hơn bằng cách đưa vào nuôi

cây thuần khiết các vi sinh vật được chọn lọc trong phòng thí nghiệm. Các chất ô nhiễm phức tạp hơn, ví dụ PCB, có thể đòi hỏi hoạt động phối hợp của một số chủng vi sinh vật. Trong trường hợp đặc biệt này, việc khử chloro nhờ các consortium phát triển từ các trầm tích bị nhiễm bản đã được thực hiện bằng cách nuôi cấy sinh khối trong dạng hạt ở các bể phản ứng UASB sinh methane. Các hạt này đã cho thấy chúng giúp tăng nhanh hơn sự phân hủy sinh học của PCB *in situ* trong đất và các trầm tích.

Đối với những ứng dụng đặc biệt, sự tăng sinh học có thể được tiến hành nhờ các kỹ thuật biến đổi di truyền vi sinh vật thông qua công nghệ DNA tái tổ hợp. Biến đổi di truyền vi sinh vật có thể giúp ngăn cản sự tạo thành các sản phẩm trung gian độc gây mất ổn định quần thể và ức chế các quá trình phân hủy sinh học. Thách thức lớn nhất trong kỹ thuật biến đổi di truyền vi sinh vật là tăng khả năng sống sót của các chủng gây nhiễm. Theo hướng được mong đợi này, các cơ hội sống sót thường lớn hơn khi chủng xâm nhiễm được phân lập từ vị trí được tăng sinh học.

2. Các kỹ thuật phân hủy chất rắn

Có nhiều kỹ thuật khác nhau của công nghệ sinh học để xử lý chất rắn bị ô nhiễm. Dưới đây là một số kỹ thuật phổ biến nhất:

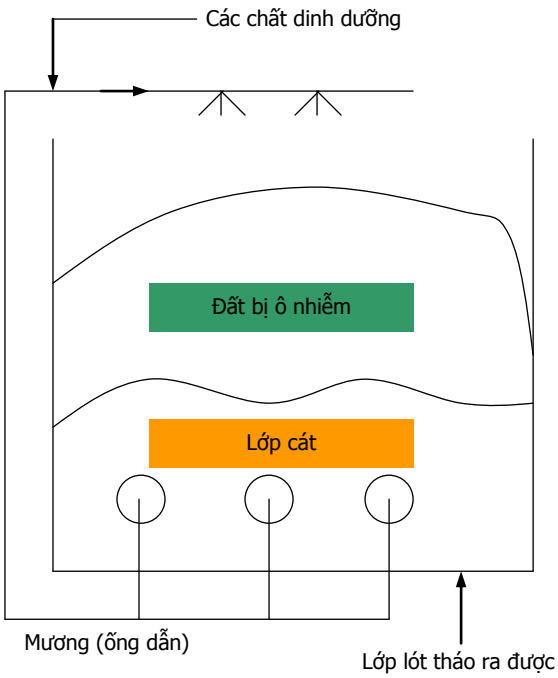
2.1. Phân hủy sinh học tại chỗ (*in situ* bioremediation)

Đây là kỹ thuật sử dụng vi sinh vật và các chất dinh dưỡng để giải quyết các chất thải nguy hiểm, chẳng hạn như đất và các địa điểm sản xuất bị ô nhiễm. Phân hủy sinh học có nhiều lợi ích quan trọng so với các phương pháp khử bỏ chất thải truyền thống; nó có thể được thực hiện tại chỗ, tránh phải vận chuyển và cất giữ các chất thải nguy hiểm và độc hại. Có nhiều vi sinh vật khác nhau có khả năng phân hủy các chất ô nhiễm công nghiệp đặc trưng bao gồm các hydrocarbon mạch thẳng, các hydrocarbon nhiều gốc thơm, các phenol chloro hóa và các phân tử hữu cơ phức tạp khác.

2.2. Landfarming

Có thể loại bỏ các vết dầu loang bằng kỹ thuật landfarming. Kỹ thuật này được thiết lập trên cơ sở phân hủy vi sinh vật (Hình 9.7) và có thể được nâng cấp một ít bằng cách trộn đất với các gốc hữu cơ mới (phân ủ). Nhiệt

độ cao, hoạt tính và sự đa dạng của vi sinh vật đã tăng tốc độ phản ứng. Hơn nữa, các chất đồng tác dụng đặc biệt đã giúp cho sự đồng chuyển hóa xảy ra dễ dàng hơn. Các hệ thống landfarming cũng có thể được nâng cấp bằng cách tiên xử lý yếm khí, ví dụ các đường hầm yếm khí được sử dụng để khử các hợp chất như trinitrotoluene, bằng cách bổ sung các chất dinh dưỡng và các chất đồng tác dụng cho các vi khuẩn tại chỗ. Ở giai đoạn thứ hai hiếu khí, các chất chuyển hóa hoặc được khoáng hóa hoàn toàn hoặc polymer hóa và bất động trong khuôn rắn. Phương thức này cũng được ứng dụng thành công để khử sự nhiễm bẩn các vùng đất bị ô nhiễm chloroethene và các chất thơm BTX (hỗn hợp của benzen, toluene và xylene).



Hình 9.7. Mặt cắt ngang của hệ thống landfarming

2.3. Các bể phản ứng sinh học pha bùn (slurry-phase bioreactors).

Có thể được hướng tới cùng một mức độ làm sạch trong thời gian ngắn. Trong trường hợp này, các đất khai quật bị ô nhiễm được xử lý dưới các điều kiện tối ưu được kiểm soát, đảm bảo sự tiếp xúc hiệu quả giữa chất nhiễm bẩn và các vi sinh vật. Yếu tố sau, trong hầu hết trường hợp, là các

nuôi cấy đặc hiệu vi sinh vật thích nghi. Với toàn bộ tốc độ phân hủy trong phạm vi 0,2-2 g dầu/kg đất/ngày, thời gian lưu của chất rắn là 30 ngày đủ để đáp ứng các mức độ làm sạch.

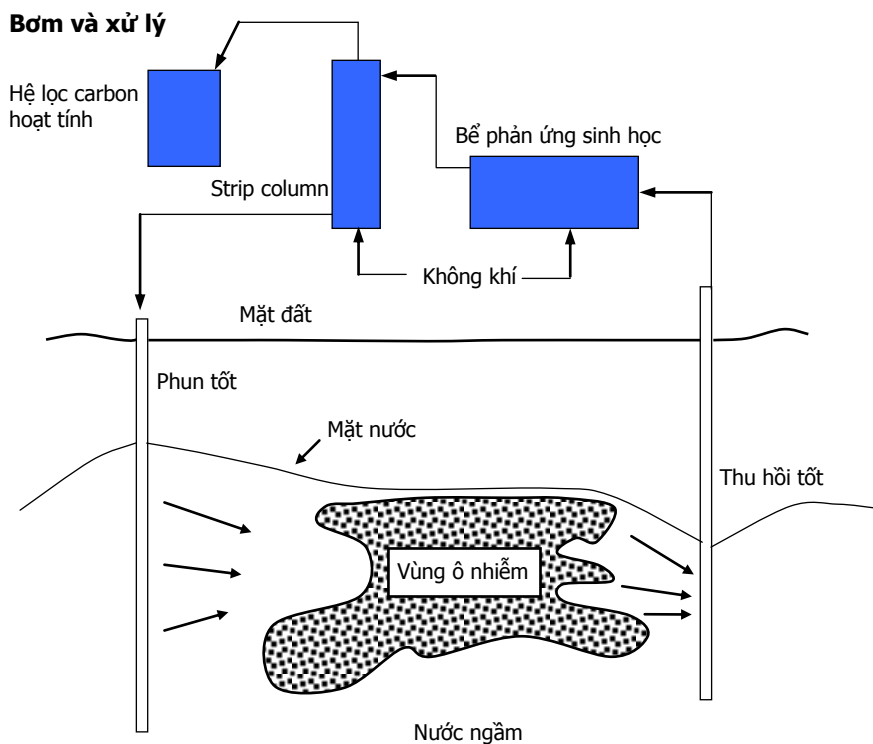
VII. Xử lý nước ngầm

1. Sự phục hồi hoạt động

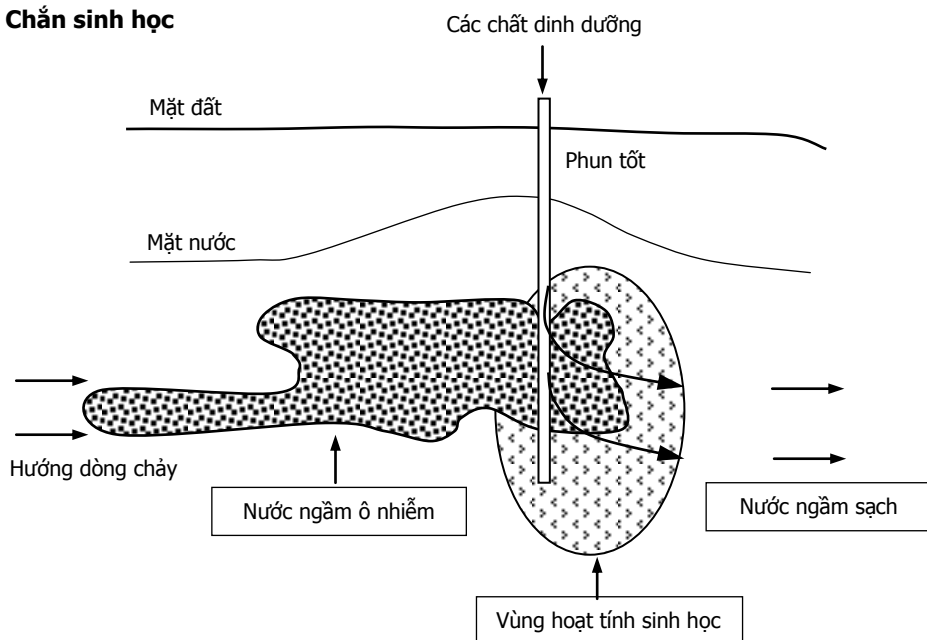
Phương thức phục hồi nước ngầm được ứng dụng nhiều ở Mỹ và châu Âu là kỹ thuật “bơm và xử lý” (pump-and-treat). Hướng này sử dụng chủ yếu các kỹ thuật hóa-lý để loại bỏ các chất ô nhiễm trong các hệ xử lý ở trên mặt đất, ví dụ thông qua hấp thụ không khí và carbon hoạt tính, trong khi các bề phản ứng sinh học được dùng ít hơn 10% trường hợp (Hình 9.8).

Việc sử dụng hạn chế các xử lý sinh học có thể là do kinh nghiệm và các số liệu chứng minh còn quá ít, sự tiếp nhận hạn chế kỹ thuật, nhưng cũng có thể do không thích hợp trong việc hướng tới các mức độ làm sạch như mong muốn. Đến nay, người ta đã thu được nhiều kinh nghiệm khi ứng dụng kỹ thuật phân hủy sinh học ở quy mô hoàn chỉnh trong điều kiện *ex situ* và *in situ* để phân hủy các hydrocarbon của dầu mỏ, bao gồm từ các chuỗi mạch thẳng và mạch nhánh, được bão hòa, không bão hòa và các chất béo mạch vòng tới các hydrocarbon một, hai và đa nhân thơm. Tuy nhiên, thời gian gần đây các kiểu thiết kế bề phản ứng sinh học mới đã được phát triển để loại bỏ các dung môi được polychloro hóa và các chất thơm. Chẳng hạn, các bề phản ứng UASB kết hạt với các bùn thải dạng hạt sinh methane có khả năng khử hoàn toàn chloro của tetrachloroethylene (>99%) hiện diện với 4 mg/L trong nước ngầm bị ô nhiễm. Acetate được dùng làm nguồn carbon và chất cho điện tử. Công nghệ bề phản ứng UASB cũng đang được nâng cấp với bùn thải dạng hạt phối hợp cả hai loại vi khuẩn hiếu khí và yếm khí.

Tuy nhiên, phương thức “bơm và xử lý” không thể làm sạch trong mọi trường hợp và hơn nữa nó đòi hỏi một thời gian làm sạch dài ngày. Trong 77 điểm xử lý theo phương pháp trên (dưới sự kiểm soát của US National Research Council-NRC) vào năm 1992, chỉ có 8 điểm được thông báo là đạt mục tiêu làm sạch (liên quan đến Đạo luật nước uống an toàn). Trong 8 điểm thành công, thì 6 điểm bị ô nhiễm bởi hydrocarbon dầu hỏa cũng được đào thải thông qua sự phân hủy tự nhiên (natural degradation).



Chăn sinh học



Hình 9.8. Công nghệ phục hồi “bơm và xử lý”

2. Sự phân hủy tự nhiên và sự giám sát (monitoring)

Trong thời gian gần đây, một vài vấn đề đã tạo ra nhiều quan tâm cho các công cụ giám sát mới. Một trong số đó là thực tế các kỹ thuật phân hủy thường không đáp ứng được mục tiêu làm sạch thật sự. Hạn chế này buộc các nhà làm luật phải đánh giá lại các mức độ ô nhiễm ban đầu và tính toán lại việc sử dụng các điểm cuối (sau khi xử lý) dựa trên sự rủi ro (risk-based end-points). Khái niệm mới về các điểm cuối dựa trên sự rủi ro đòi hỏi phát triển các công cụ phân tích mới để đánh giá lại giá trị sinh học, đúng hơn là khái niệm nồng độ ô nhiễm tổng số. Các công cụ mới đặc trưng này dựa vào các xét nghiệm sinh học bởi vì các phương pháp phân tích truyền thống không thể phân biệt giữa các chất gây ô nhiễm là những yếu tố có giá trị đối với các hệ thống sinh học và các chất gây ô nhiễm là những yếu tố đang tồn tại trong các dạng không có giá trị hoặc phức tạp hoặc trơ. Một loại xét nghiệm sinh học đã được dựa trên sự ức chế phát huỳnh quang sinh học tự nhiên của sinh vật biển *Photobacterium phosphoreum*. Tuy nhiên, các xét nghiệm này không đặc hiệu do sự ức chế ánh sáng sẽ xuất hiện khi tiếp xúc với mọi chất độc. Hạn chế này đã được khắc phục nhờ một loại biosensor vi khuẩn mới đặc trưng cho các loại chất độc nhất định. Ví dụ: biosensor có thể phát hiện các kim loại có giá trị sinh học, được xây dựng bằng cách gắn gen chỉ thị *lux* của *Vibrio fischeri* với các gen kháng kim loại nặng trong vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus*. Các chủng tái tổ hợp khi được phối trộn với đất bị ô nhiễm kim loại hoặc nước sẽ phát sáng tỷ lệ với nồng độ các kim loại có giá trị sinh học đặc trưng. Người ta có thể dễ dàng đo được sự phát sáng bằng phương pháp quang phổ.

Một yếu tố khác có thể đáp ứng cho sự quan tâm gần đây trong các công cụ giám sát mới là giá thành cao và tốc độ chậm của các kỹ thuật phân hủy. Một hướng phân hủy thực tế hơn, được gọi là sự phân hủy tự nhiên (hoặc phân hủy sinh học nội tại-intrinsic bioremediation), đang được ủng hộ bởi US Environmental Protection Agency. Sự phân hủy sinh học nội tại dựa vào các quá trình tự nhiên để loại bỏ, cô lập hoặc khử độc các chất gây ô nhiễm mà không có sự can thiệp của con người. Sự phân hủy sinh học nội tại được quan sát thường xuyên nhất với nước ngầm bị nhiễm bẩn các hydrocarbons. Nếu bằng chứng gợi ý rằng một địa điểm đang được cải thiện do sự phân hủy sinh học nội tại, và rằng sự ô nhiễm không đưa ra một đe dọa nào đối với sức khỏe của con người, thì cơ quan quản lý môi trường có

thể cho phép đặt tình trạng “chỉ giám sát” (“monitoring only”). Phương thức này yêu cầu đơn giản hóa việc giám sát từ xa (remote monitoring) để theo dõi các nồng độ nhiễm bẩn lớp dưới bề mặt trong điều kiện *in situ*. Giám sát từ xa có thể được tiến hành với một radar nhìn xuyên qua mặt đất để kiểm tra sự phá vỡ ô nhiễm trong lớp dưới bề mặt dựa trên cơ sở tăng độ dẫn của dung dịch, kèm theo việc phá vỡ các hydrocarbon hoặc các dung môi được chloro hóa.

Một kỹ thuật khác được dùng trong giám sát từ xa là sử dụng kỹ thuật biến đổi di truyền các vi sinh vật để phản ứng với sự hiện diện của các chất nhiễm bẩn đặc biệt. Khi các vi sinh vật này được gắn vào một tế bào quang điện kết nối với một con chip sóng vô tuyến (radio chip), thì các tín hiệu ánh sáng được biến đổi trong các sóng vô tuyến được phát hiện ở một khoảng cách xa. Các bộ cảm biến (sensor) này có thể được rải khắp các địa điểm bị ô nhiễm để giám sát tiến triển của sự phá vỡ các chất gây ô nhiễm.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Trần Văn Nhân và Ngô Thị Nga.** 2002. Giáo trình Công nghệ xử lý nước thải. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội.
2. **Trần Thị Thanh.** 2003. Công nghệ vi sinh. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
3. **Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng.** 1999. Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
4. **Arora M.** 1998. Biological Control of Environmental Pollution. Vol 1, *Anmol Publications PVT, Ltd.* New Delhi, India.
5. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

Một số thuật ngữ cơ bản

Adapter. Một oligonucleotide tổng hợp tương tự linker, nhưng có một đầu bằng và một đầu lồi 5' tương ứng với một vị trí cắt hạn chế cho phép nối cDNA sợi đôi với các plasmid vector hoặc bacteriophage λ vector có đầu tương đồng (xem thêm linker).

Amino acid. Là một phân tử nhỏ mang một gốc amine ($-\text{NH}_3$) và một gốc carboxyl ($-\text{COOH}$) liên kết với cùng một nguyên tử carbon. Amino acid là đơn vị cấu trúc cơ sở của chuỗi polypeptide. Có 20 amino acid khác nhau trên các chuỗi polypeptide có trong tự nhiên. Trình tự sắp xếp của các amino acid trên chuỗi polypeptide quyết định cấu trúc và chức năng của polypeptide và protein mà nó tạo thành.

Ampicillin (Amp). Chất kháng sinh bán tổng hợp được dùng trong môi trường chọn lọc để chọn các tế bào mang đột biến khuyết dưỡng hoặc chọn dòng tế bào (tái tổ hợp) mang đoạn DNA được tạo dòng.

Amylase. Enzyme xúc tác thủy phân các loại carbohydrate dự trữ (ví dụ tinh bột) trong thức ăn thực vật hay glycogen trong thức ăn động vật.

BAC (bacteria artificial chromosome). Nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn dựa trên cơ sở plasmid F-factor, được sử dụng làm vector tạo dòng. BAC có thể tái bản trong *E. coli* với các đoạn chèn DNA có kích thước lên đến 300 kb.

Bản đồ cắt hạn chế (restriction map). Trình tự các vị trí nhận biết (recognition sites) của tất cả các enzyme hạn chế (restriction enzyme hay restriction endonuclease, RE) trên một phân tử DNA.

Base đồng đẳng (analog base). Chất hóa học có cấu trúc phân tử rất giống các base bình thường của DNA. Chúng có thể thay thế các nitrogen base bình thường trong DNA và hoạt động như một tác nhân đột biến. Trong lần sao chép tiếp theo của DNA, base đồng đẳng có thể bắt cặp sai với một base bình thường, tạo nên đột biến điểm. Ví dụ base đồng đẳng của adenine (A) là 2-aminopurine (AP) có thể gắn vào DNA ở vị trí của adenine; trong lần sao chép tiếp theo nó có thể bắt cặp với cytosine (C), trong lần sao chép tiếp theo nữa C kết

cặp với guanine (G). Như vậy đã diễn ra sự thay thế cặp A-T bằng cặp G-C.

Bazơ nitơ (nitrogen base). Loại phân tử cấu tạo nên nucleic acid (DNA và RNA). Các nitrogen base có trong nucleic acid là adenine, guanine, cytosine, và thymine (DNA) hoặc uracil (RNA). Trình tự sắp xếp của chúng dọc theo phân tử nucleic acid đã tạo nên thông tin di truyền của cơ thể sinh vật.

Bắt cặp bổ sung (complementary base pairing). Sự kết hợp thành từng đôi giữa các nitrogen base nằm trên hai mạch đơn của chuỗi xoắn kép DNA-DNA, DNA-RNA hoặc RNA-RNA thông qua các mối liên kết hydrogen. Sự bắt cặp đó mang tính đặc hiệu: guanine bắt cặp với cytosine, còn adenine bắt cặp với thymine trên DNA hoặc uracil trên RNA.

Bất động (immobilization). Kỹ thuật gắn một phân tử sinh học như enzyme, hoặc một tế bào lên bề mặt hoặc nhốt chúng trong chất mang. Kỹ thuật này giúp ổn định và sử dụng nhiều lần các phân tử được cố định.

Biến đổi hậu dịch mã (post-translational modification). Sự thay đổi các liên kết hóa trị xảy ra trong chuỗi polypeptide, sau khi chuỗi polypeptide tách khỏi ribosome và trước khi trở thành protein hoạt động thực sự.

Biến nạp (transformation). Là quá trình truyền DNA ngoại lai vào một tế bào nhận, chẳng hạn sphaeroplast hoặc protoplast, và có thể hợp nhất trong nhiễm sắc thể nhờ sự tái tổ hợp tương đồng hoặc được biến đổi trong một đơn vị sao chép tự trị (autonomous replicon). Sự biến nạp có thể xuất hiện trong các điều kiện tự nhiên ở một số vi khuẩn (ví dụ: *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* và *Streptococcus*), nhưng ở nhiều vi khuẩn (ví dụ *E. coli*) và các cơ thể sinh vật eukaryote sự biến nạp chỉ có thể xuất hiện ở những tế bào "thâm" được DNA bằng các phương pháp nhân tạo như: hóa biến nạp, điện biến nạp...

Biến nạp bằng điện (electroporation). Kỹ thuật dùng xung điện tạo ra các lỗ thủng tạm thời trên màng sinh chất để đưa DNA ngoại lai vào bên trong tế bào vật chủ.

Biến tính (denaturation). Là hiện tượng chuyển từ dạng mạch kép sang dạng mạch đơn của DNA và RNA thường do nhiệt gây nên. Biến tính của protein là hiện tượng chuyển từ cấu hình hoạt động thành dạng không hoạt động.

Biểu hiện của gen (gene expression). Là các quá trình phiên mã (transcription) và dịch mã (translation) của một gen để tạo ra sản phẩm protein của nó.

Cảm ứng (induction). Liên quan đến khả năng tổng hợp một số enzyme (sản phẩm của gen) ở vi khuẩn chỉ khi có mặt cơ chất (substrate) của các enzyme này trong môi trường. Khi sử dụng cho khái niệm điều hòa biểu hiện của gen, thuật ngữ này có nghĩa là sự khởi động quá trình phiên mã do tương tác giữa một chất cảm ứng (inducer) với protein điều hòa. Ví dụ trường hợp operon lac ở *E. coli*, lactose đóng vai trò chất cảm ứng có tác dụng mở operon để các gen trong operon hoạt động (phiên mã và dịch mã).

Cặp base (base pair, bp). Là liên kết A-T hoặc C-G trên một phân tử DNA mạch kép, và là đơn vị đo chiều dài của một phân tử DNA.

Cấu trúc bậc một hay cấu trúc sơ cấp (primary structure). Là trình tự sắp xếp các amino acid trong chuỗi polypeptide.

Cấu trúc bậc hai hay cấu trúc thứ cấp (secondary structure). 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 của từng phần trong chuỗi polypeptide.

Cấu trúc bậc ba (tertiary structure). 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, đây là hình dạng chung của chuỗi polypeptide.

Cấu trúc bậc bốn (quaternary structure). Xuất hiện ở những phân tử protein bao gồm hai hay nhiều chuỗi polypeptide hình cầu (bậc ba). Mỗi chuỗi polypeptide này được gọi là một tiểu đơn vị (subunit) và tương tác không gian giữa các tiểu đơn vị trong phân tử gọi là cấu trúc bậc bốn.

Cầu disulphite (disulphite bridge). Liên kết đồng hóa trị tạo thành giữa hai chuỗi polypeptide qua trung gian của một gốc cystine.

Chất cảm ứng (inducer). Một hợp chất hóa học hoặc một tác nhân của môi trường có tác dụng xúc tiến quá trình phiên mã ở operon của vi khuẩn hoặc các phân tử có tác dụng sản xuất ra số lượng lớn các enzyme trong trao đổi chất.

Chất trao đổi sơ cấp (primary metabolite). Được sản xuất với số lượng lớn hơn các chất thứ cấp và có các chức năng trao đổi đặc biệt. Các chất sơ cấp thu từ sinh vật được sử dụng như là thực phẩm, các phụ gia thực phẩm, và các nguyên liệu thô trong công nghiệp như là các carbohydrate, dầu thực vật, protein và các acid béo.

Chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolite). Thường được tạo thành ở cơ thể sống trong một số điều kiện ngoại cảnh nhất định, đặc biệt là trong các điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Chất trao đổi thứ cấp không tham gia vào quá trình trao đổi chất của cơ thể sống.

Chất ức chế (repressor). Sản phẩm protein của một gen ức chế nằm trong thành phần operon, có tác dụng bám vào vùng chỉ huy của operon làm đóng operon lại, do đó quá trình phiên mã không bắt đầu được và tất cả các gen cấu trúc (gen mã hóa) trong operon đều ngừng hoạt động.

Chiral. Một vài phân tử có dạng “tay phải” và “tay trái” riêng biệt, mặc dù chúng mang các nguyên tử giống nhau và liên kết trong cùng một kiểu nhưng tính chất vật lý lại khác nhau. Một chất như thế được gọi là hợp chất chiral, và hai (hoặc nhiều) dạng hơn thì mỗi dạng được gọi là chất đối hình (enantiomer) hoặc chất đồng phân quang học (optical isomer).

Chu trình sinh tan (lytic cycle). Một kiểu chu trình sống của thực khuẩn thể (bacteriophage) khi nó xâm nhiễm vi khuẩn, điều khiển các hoạt động sinh sản và sinh trưởng bằng các gen của nó và sinh ra các bacteriophage thế hệ con, chui ra khỏi tế bào vi khuẩn sau khi phá vỡ tế bào đó.

Chu trình tiềm tan (lysogenic cycle). Là hiện tượng hệ gen của bacteriophage hiện diện ở trạng thái ổn định và không sinh tan trong tế bào vật chủ sống của nó. Các tế bào vật chủ có thể tiếp tục sinh trưởng và phân chia, và sự sao chép của hệ gen bacteriophage (prophage) được phối hợp với nhiễm sắc thể của vật chủ sao cho khi tế bào phân chia thì prophage cũng được chuyển vào trong cả hai tế bào con. Prophage được duy trì bằng cách hoặc hợp nhất trong nhiễm sắc thể vật chủ (ví dụ bacteriophage λ , bacteriophage $\Phi 105$) hoặc như là một plasmid bên ngoài nhiễm sắc thể (ví dụ bacteriophage P1 và bacteriophage F116). Tế bào vật chủ có thể hoặc không thể biểu hiện ra một kiểu hình biến đổi.

Chuyển gen (transgenic). Quá trình chuyển một đoạn DNA ngoại lai (foreign DNA) bằng các kỹ thuật khác nhau (*Agrobacterium*, vi tiêm, bắn gen, xung điện...) vào một cơ thể vật chủ (vi sinh vật, động vật hoặc thực vật).

Chuyển nhiễm (transfection). Kỹ thuật đưa DNA phage hoặc DNA virus vào các tế bào vật chủ.

Coenzyme. Một chất hữu cơ thường là một vitamin hay một chất tổng hợp từ vitamin để tác dụng lên một cofactor (một chất phi protein như: Cu, Fe hoặc Zn hay một phân tử hữu cơ) giúp enzyme xúc tác một phản ứng trao đổi chất.

Cosmid. Vector lai (hybrid vector) được cấu thành từ các đoạn trình tự của plasmid và các vị trí cos (đầu dính) của bacteriophage λ .

Công nghệ ACCELL (ACCELL technology). Công nghệ phân phối gen dựa trên cơ sở thay đổi cường độ phóng điện thông qua giọt nước nhỏ, vì vậy đã tạo ra một sự thay đổi áp suất không khí rất lớn làm tăng gia tốc của các viên đạn vàng bọc DNA.

Công nghệ DNA tái tổ hợp (DNA recombinant technology). Hệ thống các phương pháp phòng thí nghiệm cho phép cắt đoạn DNA từ một sinh vật để ghép nối vào DNA của một sinh vật khác tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp. Phân tử này được đưa vào các sinh vật khác nhau để tạo ra những giống chủng vi sinh vật, thực vật và động vật mới có những phẩm chất đặc biệt, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của sản xuất và đời sống con người. Công nghệ này có ứng dụng rộng rãi trong y học, dược học, nông nghiệp và nhiều ngành công nghiệp khác.

Công nghệ protein (protein engineering). Là các kỹ thuật cho phép nghiên cứu và biến đổi cấu trúc ba chiều của phân tử protein. Sự biến đổi này được thực hiện bằng phương pháp hóa học, enzyme hoặc gây đột biến điểm định hướng lên gen mã hóa cho protein này, nhằm thu được một cách hiệu quả các protein có tính chất lý-hóa và xúc tác thích hợp hoặc có tính chất mới. Một trong những lĩnh vực của công nghệ protein là mô hình hóa hoặc thiết kế protein.

Công nghệ sinh học (biotechnology). Theo nghĩa rộng là các quá trình công nghiệp có sử dụng vi sinh vật hoặc các tế bào động vật và thực vật (công nghệ sinh học truyền thống). Theo nghĩa phổ biến hiện nay đó là những quá trình sản xuất sử dụng các giống sinh vật mới, được tạo ra bởi công nghệ DNA tái tổ hợp (công nghệ sinh học hiện đại).

Trong công nghệ sinh học truyền thống (lên men sản xuất rượu, bia, ủ chua thực phẩm, làm phomat, trồng trọt, chăn nuôi...) trước tiên con người chọn lựa các đối tượng sản xuất thích hợp (chủng vi sinh vật, cây trồng và vật nuôi) thông qua thực tiễn sản xuất và sau này bằng các phương pháp khoa học như gây đột biến, phân lập...

Ngày nay, bằng cách thay đổi gen nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta đã tạo ra các đối tượng sản xuất thích hợp hơn, có thể thay đổi cả về lượng và chất nhiều quá trình sản xuất bằng công nghệ sinh học truyền thống trước đây, nâng chúng lên vị trí cao hơn và mở ra những triển vọng lớn cho các lĩnh vực hoạt động của công nghệ sinh học.

Cừu Dolly. Con cừu đầu tiên và cũng là động vật bậc cao đầu tiên được tạo ra bằng nhân bản (cloning). Công trình này do Tiến sĩ Ian Wilmut và cộng sự (Viện Roslin, Scotland) thực hiện thành công vào 2/1997. Các tác giả đã cấy nhân của tế bào soma tuyến vú vào tế bào trứng đã hút bỏ nhân của một cừu cái khác. Từ 277 trường hợp chuyển nhân như vậy đã tạo ra con cừu Dolly có kiểu gen và kiểu hình giống với cừu đã cho nhân. Kết quả này mở ra triển vọng nhân giống hàng loạt, chính xác và nhanh chóng các giống vật nuôi mang các tính trạng kinh tế quý ở bò, cừu, lợn...

Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP). Tiền chất đã được triphosphoryl hóa (“năng lượng cao”) cần thiết cho quá trình tổng hợp DNA. N được ký hiệu cho một trong bốn nitrogen base (A, G, T hoặc C).

Deoxyribonuclease (DNase). Loại enzyme nuclease thủy phân (phân hủy) DNA sợi đôi hoặc DNA sợi đơn.

Deoxyribonucleic acid (DNA). DNA là đại phân tử sinh học có cấu trúc xoắn đôi, tồn tại chủ yếu trong nhân tế bào, trên các nhiễm sắc thể, mang thông tin di truyền của sinh vật. Phân tử DNA gồm hai chuỗi polynucleotide, chuỗi nọ xoắn quanh chuỗi kia tạo nên chuỗi xoắn kép. Trong các nucleotide, theo chiều dọc các gốc phosphate nối xen kẽ với các phân tử đường deoxyribose tạo nên bộ khung bên ngoài của chuỗi xoắn kép, theo chiều ngang mỗi phân tử đường đều kết hợp với một trong bốn nitrogen base: adenine, guanine, cytosine hoặc thymine.

DNA không trực tiếp thể hiện chức năng sinh học mà gián tiếp qua protein do nó mã hóa. DNA tạo RNA, RNA tạo protein. RNA cũng là acid nhân (nucleic acid). Nó có thành phần cấu tạo khá giống DNA, ngoại trừ gốc thymine (T) trong DNA được thay thế bởi gốc uracil (U), và RNA ở dạng sợi đơn chứ không phải ở dạng xoắn kép như DNA.

Quá trình đọc mã di truyền chứa trong DNA để tổng hợp protein gọi là sự phiên mã (transcription) tạo ra RNA mang thông tin di truyền là mRNA (messenger RNA). mRNA kết hợp với một cơ quan tử trong tế bào là

ribosome để tạo ra protein trong quá trình dịch mã (translation). Quá trình trên được gọi là quá trình sinh học căn bản.

Năm 1962, Watson (Mỹ) và Crick (Anh) đã chia sẻ Giải Nobel với Wilkins (Anh) về phát minh ra cấu trúc không gian của DNA và ý nghĩa của nó trong việc truyền thông tin di truyền. Điều đáng tiếc là Franklin, người đã có những đóng góp đáng kể cho phát minh này đã mất trước đó. Theo qui định thì Giải Nobel không được phép tặng cho người đã mất.

Deoxyribose. Phân tử đường có trong thành phần của DNA.

Dịch chuyển điểm đứt (nick translation). Phương pháp đánh dấu DNA bằng phóng xạ [α - ^{32}P]dCTP nhờ enzyme DNA polymerase I của *E. coli*.

Dịch mã (translation). Sự tổng hợp protein trên khuôn mRNA. Quá trình chuyển thông tin di truyền trong trình tự base của mRNA sang trình tự amino acid của chuỗi polypeptide trong tế bào còn gọi là quá trình sinh tổng hợp protein.

Dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP). Một đồng phân của dNTP dùng để kết thúc một chuỗi DNA trong các thí nghiệm xác định trình tự gen (sequencing).

DNA bổ sung (complementary DNA, cDNA). DNA được tổng hợp trên khuôn mẫu mRNA nhờ quá trình phiên mã ngược (reverse transcription). Do vậy, nó có trình tự sắp xếp các nucleotide bổ sung với trình tự các nucleotide trên mRNA. Ví dụ: trên mRNA trình tự đó là UUGAAG thì trên các DNA bổ sung sẽ có trình tự tương ứng là AACTTC. DNA bổ sung được tổng hợp tự nhiên trong chu trình sống của virus mang vật chất truyền là RNA. Ví dụ HIV, virus cúm và các retrovirus nói chung. DNA bổ sung được tổng hợp nhân tạo trong các phòng thí nghiệm để xây dựng thư viện cDNA (cDNA library).

DNA khuôn mẫu (template DNA). Sợi DNA mà trình tự các nucleotide của nó được dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp nên sợi DNA mới trong quá trình tái bản (sao chép) hoặc khuếch đại DNA (PCR) hoặc để tổng hợp nên sợi RNA mới trong quá trình phiên mã.

DNA polymerase. Enzyme tổng hợp bản sao DNA trên khuôn mẫu DNA bằng cách xúc tác phản ứng gắn từng nucleotide riêng biệt vào đầu chuỗi DNA đang được tổng hợp.

Năm 1959, hai nhà khoa học người Mỹ là Kornberg và Ochoa đã được nhận Giải Nobel về những nghiên cứu đã làm sáng tỏ cơ chế cơ bản của quá trình sao chép DNA liên quan đến DNA polymerase I.

Dòng (clone). Tập hợp các tế bào hoặc phân tử giống hệt nhau cùng bắt nguồn từ một tế bào hay phân tử ban đầu.

Dòng phôi (germ line). Các tế bào có chức năng sinh sản, từ đó sinh ra trứng và tinh bào.

Đánh dấu ở đuôi (end labelling). Bổ sung phân tử phóng xạ vào đuôi của một polynucleotide nhờ T4 polynucleotide kinase.

Đầu bằng (blunt end). Các đầu của DNA sợi đôi không có các đầu 3' hoặc 5' nhô ra (protruding ends).

Đầu dính (cohesive ends hoặc sticky ends). Các đầu của phân tử DNA có các trình tự bổ sung ngắn có thể dính kết lại để nối hai phân tử DNA với nhau. Các đầu dính thường do các enzyme hạn chế tạo ra.

Đầu tận cùng C (C terminus). Gốc carboxyl (COOH) tự do ở vị trí tận cùng của một phân tử protein hoặc chuỗi polypeptide.

Đầu tận cùng N (N terminus). Gốc amine (NH₂) ở vị trí tận cùng của một phân tử protein hoặc chuỗi polypeptide. Tất cả các polypeptide đều được tổng hợp bắt đầu từ đầu này, đến gốc carboxyl tận cùng.

Điểm đứt (nick). Điểm đứt gãy ở một sợi đơn trên DNA sợi đôi.

Điện di trên gel (gel electrophoresis). Kỹ thuật dùng để phân tách các phân tử nucleic acid hoặc protein dựa vào sự dịch chuyển của chúng trên giá thể dạng gel (agarose hoặc polyacrylamide) dưới ảnh hưởng của điện trường. Sự dịch chuyển của các phân tử này phụ thuộc vào điện tích, cấu hình, kích thước và khối lượng phân tử của nucleic acid hoặc protein cũng như dung môi và nồng độ của chất dùng làm giá thể.

Đoạn Klenow (Klenow fragment). Còn gọi là đoạn lớn của DNA polymerase I. Đây là một đoạn của DNA polymerase I (khối lượng phân tử 76.000) của *E. coli* đã bị mất hoạt tính exonuclease 5'→3'.

Đoạn nhồi (stuffer fragment). Còn gọi là vùng đệm hay vùng trung tâm. Là một phần của phage λ có thể được loại bỏ và thay thế bằng đoạn chèn DNA (insert DNA) mà không ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của phage trong tế bào vật chủ.

Đóng dấu (replica plating). Phương pháp chuyển nguyên mẫu các khuẩn lạc hoặc vết tan từ một đĩa thạch gốc sang đĩa thạch mới bằng cách dùng màng nylon (ví dụ màng Hybond-N+) vừa khít áp lên mặt thạch của đĩa gốc để dính lấy các tế bào trong các khuẩn lạc (colony) hoặc vết tan (plaque) của đĩa gốc, rồi đưa màng này áp lên mặt thạch mới.

Độ Tesner (Tesner degree). 1°T = số mL NaOH hoặc KOH cần để trung hòa 100 mL sữa.

Đột biến (mutation). Biến đổi trong trình tự các base của DNA. Có thể được gây nên bởi chèn đoạn, mất đoạn hoặc có các base bị sửa đổi.

Đột biến gen (gene mutation). Còn gọi là đột biến điểm, xảy ra do những biến đổi của từng nucleotide như mất, thêm hay thay đổi vị trí của nucleotide trên phân tử DNA. Là nguyên nhân của sự hình thành protein không bình thường. Phần lớn đột biến là có hại nhưng chúng vẫn thường được giữ lại trong quần thể vì thường là lặn và do đó có thể được duy trì trong kiểu gen mà không ảnh hưởng đến sức sống của sinh vật. Tốc độ đột biến tự nhiên thấp, nhưng tần số đột biến có thể tăng nhờ các tác nhân như phóng xạ ion hóa và các hóa chất gây đột biến gây ra.

Đột biến khuyết dưỡng (auxotrophic mutation). Còn gọi là đột biến hóa sinh. Đột biến làm mất khả năng tổng hợp một chất cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào.

Đuôi polyA (polyA tail). Đoạn trình tự dài 50-200 nucleotide adenine được bổ sung vào đầu 3' của hầu hết các mRNA eukaryote sau khi phiên mã.

***E. coli* (Escherichia coli).** Vi khuẩn thường có trong ruột non của động vật có xương sống. *E. coli* được coi như sinh vật mẫu cho việc nghiên cứu hoạt động của tế bào. Đây là vi khuẩn Gram âm có kích thước genome khoảng 4×10^6 base-pair. Các quá trình biểu hiện gen (phiên mã và dịch mã) đi đôi với nhau, sinh ra sợi mRNA được tổng hợp mới và được sử dụng ngay cho quá trình dịch mã. Không có hiện tượng biến đổi hậu dịch mã (post-translation). Vì thế, *E. coli* được xem là một trong những tế bào vật chủ đơn giản nhất. Rất nhiều thí nghiệm tạo dòng gen đang được thực hiện hàng ngày tại các phòng thí nghiệm đều sử dụng *E. coli* làm vật chủ với nhiều chủng khác nhau về mặt di truyền và cho những ứng dụng đặc biệt.

Endonuclease. Là enzyme nuclease cắt bên trong phân tử nucleic acid, ngược với exonuclease là enzyme phân giải DNA từ một đầu hoặc cả hai đầu. Nuclease thủy phân những liên kết phosphodiester giữa các nucleotide của một phân tử nucleic acid. Các nuclease có thể đặc hiệu đối với DNA (deoxyribonuclease) hoặc đặc hiệu đối với RNA (ribonuclease).

Enzyme. Chất xúc tác sinh học, là các phân tử sinh học có bản chất protein đóng vai trò chất xúc tác cho các phản ứng biến đổi hóa sinh.

Enzyme gắn DNA (DNA ligase). Enzyme dùng để nối các phân tử DNA với nhau bằng cách tạo ra mối liên kết phosphodiester giữa nhóm 5'-PO₄ và nhóm 3'-OH trong quá trình tái bản hoặc sửa chữa DNA.

Enzyme gắn RNA (RNA ligase). Enzyme nối các đoạn RNA với nhau sau khi các intron được cắt rời khỏi tiền thân của mRNA (pre-mRNA) ở các sinh vật eukaryote, tạo ra mRNA hoàn chỉnh sẵn sàng tham gia vào quá trình dịch mã diễn ra trên ribosome.

Enzyme hạn chế (restriction enzyme, RE). Loại endonuclease có khả năng cắt DNA tại những đoạn trình tự nhất định mà chúng nhận biết. Enzyme hạn chế được phát hiện vào năm 1970, chúng tồn tại trong tế bào vi khuẩn, có tác dụng cắt DNA ngoại lai (ví dụ: DNA của phage) tại những điểm xác định, để tiêu diệt DNA này. Cho đến nay hơn 900 enzyme hạn chế đã được tìm thấy. Các enzyme hạn chế được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm thao tác gen như những “chiếc kéo” cắt DNA tại những điểm đặc hiệu. Vị trí cắt phụ thuộc vào loại enzyme hạn chế được lựa chọn.

Năm 1978, Arber (Thụy Sĩ), Nathans (Mỹ) và Smith (Mỹ) đã được nhận Giải Nobel nhờ phát minh ra enzyme hạn chế và những ứng dụng của chúng để giải quyết nhiều vấn đề quan trọng của di truyền học phân tử. Các enzyme này là những “chiếc kéo phân tử” có thể cắt DNA thành những đoạn xác định, đã mở ra một thời kỳ phát triển mới của sinh học hiện đại-Thời kỳ thao tác gen.

Enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). DNA polymerase phụ thuộc RNA (RNA-dependent DNA polymerase) có trong các RNA virus (retrovirus) được dùng để tổng hợp cDNA trong điều kiện *in vitro*.

Epitope. Yếu tố quyết định kháng nguyên, là một trình tự cấu trúc nằm trên phân tử kháng nguyên được nhận biết bởi các kháng thể hoặc các thụ thể của kháng nguyên. Các epitope của tế bào B là những quyết định

kháng nguyên được các tế bào B nhận biết. Các epitope này có cấu trúc gián đoạn, điển hình nghĩa là có cấu trúc không gian nhất định. Epitope của tế bào T là một trình tự peptide ngắn từ một kháng nguyên có bản chất protein được liên kết với phân tử MHC và được nhận biết bởi một tế bào T riêng biệt.

Eukaryote. Sinh vật có tế bào mang nhân điển hình (nhân thật) nghĩa là nhân được bao bọc bởi màng nhân và tham gia vào hai cơ chế phân bào quan trọng là nguyên phân và giảm phân.

Exon. Các đoạn DNA trong gen có chức năng phiên mã. Exon tồn tại ở cả sinh vật prokaryote và eukaryote. Riêng ở sinh vật eukaryote các exon nằm xen kẽ với các đoạn intron. Các intron chiếm tới 90% tổng số DNA của tế bào eukaryote và không có chức năng phiên mã.

Exonuclease. Loại enzyme nuclease chỉ tác động vào đầu tận cùng của phân tử nucleic acid, cắt ra từng nucleotide một theo thời gian. Chúng có thể chuyển hóa theo đầu 5' hoặc 3' của sợi DNA.

Ex vivo. Thuật ngữ dùng để chỉ các thí nghiệm thực hiện trên tế bào nuôi cấy, các tế bào này sau đó sẽ được đưa vào một cơ thể sống.

β -galactosidase. Enzyme được mã hóa bởi gen *lacZ*. Enzyme này thủy phân lactose thành glucose và galactose.

Gây đột biến định hướng bằng oligonucleotide (oligonucleotide-directed mutagenesis). Còn gọi là gây đột biến định hướng điểm (site-directed mutagenesis), là quá trình tạo ra một biến đổi xác định trên DNA bằng cách sử dụng một oligonucleotide tổng hợp (primer) có một vài biến đổi trong trình tự nucleotide.

Gen (gene). Là đơn vị di truyền, yếu tố quyết định một tính trạng cơ thể. Thông tin di truyền của các gen được mã hóa trong DNA quyết định tính biến dị của cá thể và của loài. DNA là một chuỗi bao gồm các đơn vị nucleotide, có bốn loại nucleotide mang bốn nitrogen base khác nhau là adenine (A), guanine (G), cytosine (C), và thymine (T). Trình tự các nucleotide của một gen xác định một polypeptide hoặc một RNA. Gen có khả năng bị đột biến. Các gen chủ yếu nằm dọc theo nhiễm sắc thể ở trong nhân tế bào. Mỗi gen chiếm một vị trí xác định trên nhiễm sắc thể gọi là locus. Gen có thể tồn tại ở nhiều dạng gọi là các allele. Các gen biểu hiện

thông qua các phân tử do chúng sinh ra là RNA (trong quá trình phiên mã) và protein (trong quá trình dịch mã).

Gen cấu trúc (structural gene) hay **gen mã hóa (coding gene)**. Là trình tự mã hóa sản phẩm protein.

Gen chỉ huy (operator). Đoạn DNA ngắn nằm ở đầu operon, kề sát promoter nơi mà protein ức chế có thể bám vào, có tác dụng “mở” hoặc “đóng” operon để cho các gen cấu trúc trong operon hoạt động hoặc ngừng hoạt động.

Gen chỉ thị (reporter gene). Là một gen mã hóa mà sản phẩm của nó được thử nghiệm một cách dễ dàng (ví dụ chloramphenicol acetyltransferase), nó có thể được gắn với bất cứ một promoter nào sao cho sự biểu hiện của gen này được dùng để thử nghiệm chức năng của promoter.

Gen điều hòa (regulatory gene). Một gen mà sản phẩm protein của nó tham gia vào sự điều hòa biểu hiện của một gen khác. Ví dụ gen mã hóa một protein kìm hãm.

Gen gây chết (death gene). Gen làm chết cá thể ở một giai đoạn nào đó trong quá trình phát triển của chúng.

Gen *lacZ*. Gen của *E. coli* mã hóa β -galactosidase thích hợp cho chọn lọc thể biến nạp bằng khuẩn lạc xanh (β -galactosidase sẽ kết hợp với IPTG và X-gal được bổ sung trong môi trường nuôi cấy) và trắng (đoạn DNA ngoại lai xen vào giữa gen *lacZ* làm cho gen này mất hoạt tính vì thế không sản xuất được β -galactosidase).

Gradient. Biến thiên của một đại lượng theo một hướng nào đó. Một gradient mật độ được xác lập trong một số trường hợp ly tâm. Một gradient proton hoặc ion được tạo ra qua một màng nhờ sự vận chuyển tích cực đòi hỏi năng lượng.

Hệ gen (genome). Là tập hợp các gen có trong một tế bào đơn bội eukaryote, trong một tế bào prokaryote hoặc trong một virus. Hệ gen chứa toàn bộ DNA của cơ thể, ví dụ hệ gen người chứa DNA dài khoảng 1,6 m nhưng chỉ rộng khoảng 5 phần tỷ mm. Ở người, số DNA nói trên được chia làm 46 phần có độ dài ngắn khác nhau gọi là nhiễm sắc thể, là tập hợp DNA ở dạng nén chặt đến kích thước đường kính chỉ còn 3-4 phần triệu mét. Tuy nhỏ như vậy, nhưng nhiễm sắc thể người có đến 3 tỷ gốc nucleotide. Sự sắp xếp đặc thù của chúng quyết định bản chất sinh học của cơ thể.

Hệ lên men hay **nồi phản ứng sinh học (fermentor or bioreactor)**. Thiết bị được sử dụng để thực hiện một quá trình sinh học (bioprocessing) có kiểm soát. Tuy nhiên, thuật ngữ hệ lên men thường được dùng để gọi thiết bị nuôi cấy tế bào phát triển tự do. Còn thuật ngữ nồi phản ứng sinh học dùng cho quá trình sản xuất enzyme tinh sạch, dịch chiết tế bào phát triển trên bề mặt vật thể mang.

Hiệu ứng glucose (glucose effect). Hiện tượng khử hoạt tính của operon cảm ứng ở vi khuẩn khi có mặt glucose kể cả khi hiện diện chất cảm ứng operon.

Histone. Nhóm protein kiềm nằm trong phức hợp với DNA ở các nhiễm sắc thể eukaryote và đóng vai trò quan trọng trong việc xác định cấu trúc của nhiễm sắc thể.

Hoạt tố plasminogen mô (tissue plasminogen activator, tPA). Là chất hoạt hóa plasminogen mô có bản chất protein và được sử dụng để làm tan các cục máu đông (huyết khối) trong động mạch của người bị bệnh nhồi máu cơ tim.

Hormone. Là các hợp chất do các tuyến nội tiết tạo ra. Các chất tiết này được truyền đi trong cơ thể, tác dụng lên chất nhận đặc hiệu ở bề mặt các tế bào đích mà nó có thể kiểm soát hoạt động ở động vật.

Hormone thực vật (phytohormone). Là các chất kích thích sinh trưởng thực vật.

Hợp tử (zygote). Sản phẩm đơn bào sinh ra do sự kết hợp các giao tử đực và giao tử cái. Nó phát triển thành phôi thông qua hàng loạt nguyên phân liên tiếp.

Hybridoma. Dòng tế bào được hình thành từ sự dung hợp một tế bào ung thư tủy xương (myeloma) và một tế bào bạch cầu (lymphocyte), hybridoma có khả năng sản sinh các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) một cách vĩnh viễn.

Huyết thanh (serum). Chất lỏng của máu còn lại khi máu đông được tách ra bằng phương pháp ly tâm (nghĩa là huyết tương không có các nhân tổ làm đông máu).

Huỳnh quang (fluorescence). Hiện tượng phát một sóng ánh sáng có bước sóng khác với bước sóng đã được hấp thụ trước đó. Một số phân tử

được gọi là thể huỳnh quang (ví dụ enzyme luciferase ở con đom đóm) do có đặc tính này.

In dấu DNA (DNA fingerprinting) hay in dấu di truyền (genetic fingerprinting). Là phương pháp dùng các mẫu dò phóng xạ hoặc dùng kỹ thuật PCR để nhận dạng các băng DNA có các đoạn lặp lại với tần số cao. Bản mẫu hình các băng DNA là duy nhất đối với mỗi cá thể, và do vậy có thể dùng để xác định đặc trưng cá thể hoặc quan hệ huyết thống.

In dấu chân DNA (DNA footprinting). Phương pháp nhận dạng các vùng DNA mà các protein điều hòa bám vào.

Invertase. Enzyme xúc tác phản ứng thủy phân các disaccharide thành các monosaccharide, đặc biệt thủy phân saccharose thành dextrose và levulose.

Interferon. Protein được sinh ra ở tế bào động vật như là phương tiện để chống lại virus. Nó ức chế sự nhân lên của các virus. Nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp, hiện nay interferon được sản xuất ra từ các vi sinh vật tái tổ hợp với một số lượng lớn thông qua kỹ thuật chuyển gen interferon của động vật vào vi sinh vật.

Gilbert (1980) đã đoạt giải thưởng Nobel nhờ thành công trong việc thu nhận interferon từ *E. coli* đã được tái tổ hợp gen mã hóa interferon. Đến năm 1981, Đại học Washington (Mỹ) đã thành công trong việc thu nhận interferon từ nấm men *S. cerevisiae* có hiệu suất cao gấp 10.000 lần so với tế bào *E. coli* tái tổ hợp.

Intron. Những đoạn DNA nhỏ ở sinh vật eukaryote không mang thông tin mã hóa amino acid, phân bố rải rác dọc theo phân tử DNA. Sau khi thông tin từ DNA được phiên mã sang mRNA thì các intron trên mRNA bị cắt bỏ, các đoạn mRNA còn lại gồm toàn các exon được nối lại với nhau và chuyển đến ribosome để dùng làm khuôn mẫu cho quá trình dịch mã. Intron không thấy có ở sinh vật prokaryote.

In vitro và in vivo. Là thuật ngữ mô tả thí nghiệm trong ống nghiệm (*in vitro*) và trong cơ thể (*in vivo*). Cùng với sự phát triển ứng dụng của máy tính, hiện nay các nhà khoa học còn tiến hành thí nghiệm mô phỏng bằng computer. Quá trình này gọi là thí nghiệm *in silico*.

Kéo dài đoạn mồi (primer extension). Sự tổng hợp một bản sao nucleic acid bắt đầu từ đoạn mồi. Được sử dụng để đánh dấu phóng xạ đoạn DNA làm mẫu dò hoặc khuếch đại một đoạn DNA bằng kỹ thuật PCR.

Kháng nguyên (antigen). Phân tử thường tìm thấy trên bề mặt tế bào, có tác dụng kích thích sự tạo thành kháng thể. Do vậy, nó được dùng để gây nên một phản ứng miễn dịch.

Kháng thể (antibody). Một protein (immunoglobulin) do bạch cầu lympho B của hệ thống miễn dịch sản sinh, có tác dụng nhận biết một kháng nguyên ngoại nhập đặc hiệu và gắn với nó, nếu kháng nguyên nằm trên bề mặt tế bào thì việc gắn kết này sẽ dẫn tới sự kết cụm tế bào và làm bất hoạt kháng nguyên.

Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody). Kháng thể xuất hiện trong phản ứng miễn dịch có nhiệm vụ gắn và tham gia loại bỏ chất lạ (antigen) lọt vào cơ thể. Thông thường, trong phản ứng miễn dịch có mặt hỗn hợp của nhiều loại kháng thể. Tuy nhiên, nhờ tế bào lai hybridoma người ta có thể tạo ra một loại kháng thể gọi là kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng chủ yếu được sử dụng cho mục đích chẩn đoán bệnh.

Khuếch đại (amplification.) Sự sản xuất nhiều bản sao của một trình tự DNA nhờ kỹ thuật PCR.

Khuyết đoạn (deletion, deficiency). Đột biến nhiễm sắc thể dẫn đến làm mất một đoạn vật chất di truyền và thông tin di truyền chứa trong nó rời khỏi nhiễm sắc thể.

Kiểu hoang dại (wild type). Dạng thường thấy nhất của một gen trong quần thể hoang dại. Allele kiểu hoang dại được ký hiệu bằng một chữ in hoa hoặc thêm dấu cộng sau chữ viết thường, ví dụ: A hay a^+ . Allele kiểu hoang dại thường là trội và cho kiểu hình bình thường.

Kilobase (kb). 1000 base (hoặc cặp base), được dùng như đơn vị để đo hoặc xác định chiều dài của các phân tử DNA hoặc RNA.

Kỹ thuật di truyền (genetic engineering). Còn gọi là công nghệ DNA tái tổ hợp. Bao gồm hệ thống các phương pháp di truyền phân tử dùng để thao tác vật chất di truyền, với ba bước chính gồm ba khâu chính. 1) Tách chiết DNA từ những sinh vật khác nhau; 2) Cắt và nối DNA ở những điểm đặc hiệu để tạo ra DNA tái tổ hợp (DNA mang các gen có nguồn gốc khác nhau), ví dụ: DNA plasmid có mang gen của người; 3) Đưa DNA tái tổ

hợp vào hoạt động trong các tế bào hoặc cơ thể sống để sinh ra những sản phẩm đặc biệt cần thiết cho con người, ví dụ DNA plasmid mang gen tạo insulin của người được đưa vào vi khuẩn *E. coli* để sản xuất.

Lai khuẩn lạc (colony hybridization). Kỹ thuật lai *in situ* để xác định vi khuẩn mang vector khảm (chimeric vector) mà DNA của vector này tương đồng với một đoạn mã hóa đặc biệt nào đó.

Lai phân tử (molecular hybridization). Quá trình trong đó hai mạch nucleic acid bổ sung (A-T, G-C) bắt cặp hình thành nên một mạch kép. Đây là một kỹ thuật hữu ích để phát hiện một trình tự nucleotide chuyên biệt.

Lai tại chỗ (*in situ* hybridization). Quá trình bắt cặp giữa mẫu dò (là một trình tự DNA sợi đơn hay RNA) với DNA của tế bào được cố định trên lam kính.

LAK (lymphokine activated killer). Tế bào giết được hoạt hóa bằng lymphokine. Liệu pháp tế bào LAK (liệu pháp IL-2 gián tiếp, được thực hiện bằng cách tách các tế bào lympho (lymphocyte) từ máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư sau đó hoạt hóa và nhân *in vitro* các tế bào này cùng với IL-2 qua một số ngày. Một dòng lympho không phải T sẽ được phát triển có hình thái lympho hạt lớn, các lympho này có độc tính rất cao chống lại các khối u thực nghiệm (gọi là các tế bào LAK) đã được chứng minh làm thuyên giảm một phần hoặc thuyên giảm hoàn toàn trên 20% bệnh nhân bị một số bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư da ác tính và ung thư biểu mô thận.

Land farming. Quá trình xử lý bằng kỹ thuật phân hủy sinh học (bioremediation) được thực hiện ở lớp đất mặt hoặc trong các ô xử lý sinh học (biotreatment). Đất bị nhiễm bẩn, chất cặn hoặc bùn được trộn lại trên bề mặt lớp đất và sau đó định kỳ sẽ được lật lại để thông khí.

Landfilling. Kỹ thuật chôn cất chất thải, là cách thông dụng nhất để khử bỏ các chất thải sinh hoạt, thương mại và công nghiệp. Khoảng 80-90% lượng chất thải trên thế giới sẽ được khử bỏ bằng cách này trong những năm tới. Những địa điểm được sử dụng để chôn cất chất thải có thể là những nơi khai thác mỏ đã kết thúc, các mỏ đá đã bỏ, các vùng đất thấp, các thung lũng... Các nơi chôn cất chất thải cần được lựa chọn và quản lý thật cẩn thận để tránh những sự cố như làm ô nhiễm nước ngầm, để thoát ra các khí có mùi khó chịu, gây ấn tượng xấu về cảnh quan...

Lên men (fermentation). Là quá trình biến đổi sinh học khi sử dụng các vi sinh vật. Đó cũng là những biến đổi bằng con đường sinh học của một chất nền, kể cả các hiện tượng sinh tổng hợp và chuyển hóa sinh học. Hiện tượng lên men cũng dùng để chỉ phương thức chuyển hóa bằng cách phân giải các chất hữu cơ mà cơ thể sống và tế bào sử dụng để tạo ra năng lượng hóa học dưới dạng ATP nhưng không cần đến oxygen.

Liên kết peptide (peptide bond). Mỗi liên kết đồng hóa trị trong chuỗi polypeptide, nối nhóm α -carboxyl của một amino acid với nhóm α -amine của một amino acid kế tiếp.

Liên kết phosphodiester (phosphodiester bond). Một phân tử chứa hai alcol, ester hóa với một phân tử phosphoric acid làm cầu nối giữa chúng với nhau. Ví dụ chuỗi polynucleotide được nối bởi liên kết phosphodiester 5'→3' giữa hai nucleotide cạnh nhau.

Liệu pháp gen (gene therapy). Là phương pháp chữa bệnh (đặc biệt là những bệnh di truyền và bệnh nan y) nhờ kỹ thuật sửa chữa gen hoặc chèn gen lành (bình thường) vào hệ gen của cơ thể bị bệnh.

Liệu pháp gen tế bào sinh sản và tế bào sinh dưỡng (germline and somatic cell gene therapy). Chữa trị gen tế bào sinh dưỡng không tham gia quá trình sinh sản. Ví dụ có thể thay đổi gen để chữa trị tế bào ung thư, mà sự thay đổi này không di truyền lại cho thế hệ sau. Ngược lại, trong chữa trị gen tế bào sinh sản thì sự thay đổi sẽ được di truyền cho thế hệ sau. Do vậy, về mặt đạo đức chữa trị gen tế bào sinh sản không được chấp nhận dễ dàng và hiện bị cấm ở nhiều nước.

Linker. Một oligonucleotide tổng hợp có hai đầu bằng, chứa một hoặc nhiều vị trí cắt hạn chế cho phép nối cDNA sợi đôi với các plasmid vector hoặc bacteriophage λ vector. cDNA sợi đôi trước đó được xử lý với DNA polymerase của bacteriophage T4 hoặc DNA polymerase I của *E. coli* để tạo đầu bằng. Các linker sau khi gắn với hai đầu bằng của đoạn cDNA nhờ DNA ligase sẽ được cắt hạn chế để tạo ra đầu so le tương đồng với hai đầu của vector. Phản ứng gắn giữa đoạn cDNA có mang linker ở hai đầu với vector cũng được xúc tác nhờ DNA ligase.

Ly tâm theo gradient mật độ (density gradient centrifugation). Kỹ thuật tách các hợp chất dựa vào sự khác nhau về mật độ của chúng được

thực hiện bằng phương pháp ly tâm để làm lắng các chất qua một gradient nồng độ của saccharose hoặc CsCl.

Lymphokine. Là những cytokine được sản xuất từ các tế bào lympho.

Lysosome. Một bào quan có màng bao bọc ở trong tế bào chất của những tế bào eukaryote. Lysosome chứa nhiều enzyme thủy phân.

Mã di truyền (codon). Nhóm ba nucleotide nằm kề nhau (bộ ba) trên phân tử mRNA xác định một amino acid trên chuỗi polypeptide, hoặc là tín hiệu kết thúc việc tổng hợp polypeptide.

Mã thoái biến (degenerate codon). Mã di truyền mà ở đó một amino acid được quy định bởi một số bộ ba nitrogen base, chứ không phải chỉ bởi một bộ ba. Thoái biến là đặc điểm vốn có của mã di truyền tồn tại phổ biến ở sinh giới.

Mã vô nghĩa (nonsense codon) hay mã dừng (stop codon). Là codon mà ở đó quá trình dịch mã dừng lại (nơi kết thúc của chuỗi polypeptide). Có tất cả ba codon vô nghĩa với các tên gọi là amber (UAG), ochre (UAA) và opal (UGA)

Maturation. Quá trình trong đó các mRNA vừa được phiên mã trải qua một số biến đổi hóa học để trở thành mRNA hoàn chỉnh sẵn sàng làm khuôn mẫu cho việc tổng hợp protein.

Máy đếm nhấp nháy (scintillation counter). Máy dùng để xác định hoạt tính phóng xạ trong một mẫu thí nghiệm.

Mật độ quang (optical density). Thông số cho phép đo độ hấp thụ ánh sáng ở một bước sóng nào đó của một môi trường hoặc dung dịch.

Mẫu dò DNA (DNA probe). Một đoạn RNA hay DNA chuyên biệt được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hay bằng hóa chất (chất phát huỳnh quang hoặc enzyme), dùng để định vị một trình tự nucleic acid nhất định thông qua kỹ thuật lai phân tử (xem Northern blot, Southern blot...)

Micelle. Hạt ở dạng huyền phù trong một dung dịch keo, được cấu thành từ một tập hợp các hạt nhỏ hoặc đại phân tử.

Monomer. Là các phân tử đơn vị nhỏ, có thể liên kết với các phân tử đơn vị giống nó để hình thành những phân tử lớn hơn (polymer). Ví dụ các nucleotide là các monomer của nucleic acid và các amino acid là monomer của protein.

Môi trường LB (LB medium). Môi trường nuôi cấy *E. coli*, thành phần bao gồm (cho 100 mL): 1 g bacto-trypton; 0,5 g dịch chiết nấm men và 1 g NaCl. Nếu pha chế môi trường rắn để nuôi cấy trên đĩa petri thì bổ sung thêm 1,5 g bacto-agar.

Mồi (primer). Một trình tự DNA hay RNA ngắn, bắt cặp với một mạch của DNA khuôn mẫu và có mang một đầu 3'-OH tự do giúp DNA polymerase bắt đầu tổng hợp một chuỗi DNA mới.

Mucopeptide. Dị polymer đại phân tử chứa hai loại đường amine và một số amino acid. Người ta nhận thấy mucopeptide gắn liền với thành tế bào của prokaryote.

Myeloma. Là một dòng của tế bào khối u có từ một tế bào bạch huyết, thường sản sinh một dòng đơn của immunoglobulin.

Nấm men hướng methyl. Là những nấm men chỉ sử dụng chất dẫn xuất methane như là nguồn carbon và năng lượng chuyển hóa.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Là một vi sinh vật nhân thật được sử dụng nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp. Genome của nấm men *S. cerevisiae* khoảng $1,35 \times 10^7$ base-pair nhiều hơn *E. coli* khoảng 3,5 lần. Nấm men thường được dùng làm tế bào vật chủ để biểu hiện những protein có cấu trúc phức tạp cần quá trình hậu dịch mã mà vi khuẩn *E. coli* không thể đáp ứng.

Northern blot. Kỹ thuật chuyển và cố định RNA từ formaldehyde agarose gel (sau khi được phân đoạn bằng điện di) lên màng lai bằng nylon hoặc nitrocellulose để lai với mẫu dò (probe) được đánh dấu đồng vị phóng xạ [α - ^{32} P]dCTP hoặc digoxigenin-dUTP. Tín hiệu lai sau đó được phát hiện trên phim X-quang (trường hợp [α - ^{32} P]dCTP) hoặc trên màng lai (trường hợp digoxigenin-dUTP).

Nucleic acids. Những polynucleotide sinh học thiên nhiên, trong đó những đơn vị nucleotide được kết hợp với nhau bởi những liên kết phosphodiester thành trình tự DNA hoặc RNA riêng biệt.

Nucleotide. Một nucleoside phosphoryl hóa với một trong những hydroxyl của pentose. Phân tử đóng vai trò cấu trúc cơ sở của DNA và RNA, gồm ba phần: đường pentose (ribose trong RNA, deoxyribose trong DNA), nitrogen base và gốc phosphate.

Nuôi cấy mô và tế bào (tissue and cell culture). Kỹ thuật cấy và nuôi vô trùng mô và tế bào động vật hoặc thực vật trong môi trường nhân tạo bên trong ống nghiệm hoặc bình thủy tinh. Về nguyên lý, giống như nuôi cấy tế bào vi sinh vật. Kỹ thuật này có nhiều ứng dụng thực tiễn, ví dụ ở thực vật được dùng để nhân giống nhanh những cây sinh trưởng chậm hoặc bị phân ly khi sinh sản hữu tính, ngoài ra cũng được sử dụng trong chọn giống; ở động vật kỹ thuật này được dùng để nuôi mô phục vụ cho công tác nghiên cứu và sản xuất các chất có hoạt tính sinh học.

Oliofilm. Cao su xử lý bằng HCl.

Oligo. Tiếp đầu ngữ có nghĩa là “ít”, ví dụ: oligonucleotide (polynucleotide) có ít nucleotide hoặc oligopeptide (polypeptide) có ít peptide.

Oligo(dT)-cellulose. Một đoạn ngắn gồm các gốc deoxy-thymidine liên kết với cơ chất cellulose, được sử dụng để tinh sạch mRNA eukaryote bằng phương pháp sắc ký ái lực.

Oligomer. Thuật ngữ chung để chỉ một đoạn ngắn các monomer.

Oligonucleotide. Một đoạn ngắn các monomer là nucleotide, thường từ 20-30 nucleotide.

Operon. Nhóm các gen ở vi khuẩn chịu sự điều khiển chung của một gen điều hòa. Cấu trúc operon bao gồm: 1) Nhóm gen cấu trúc mà hoạt động của chúng chịu sự điều khiển chung, 2) Gen điều hòa sản sinh ra protein điều hòa, 3) Vùng chỉ huy (operator) và trình tự khởi động (promoter) chịu tác động của protein điều hòa. Protein điều hòa có tác dụng bám vào vùng chỉ huy làm cho nó bị “đóng”, do vậy nhóm gen cấu trúc ngừng hoạt động. Khi trong môi trường xuất hiện cơ chất của các gen cấu trúc thì cơ chất này bắt hoạt hóa protein điều hòa khiến nó không bám vào vùng chỉ huy được nữa, vùng chỉ huy được “mở” và nhóm gen cấu trúc lại hoạt động.

Phage. Viết tắt của bacteriophage (thực khuẩn thể), là loại virus xâm nhiễm và sinh sản bên trong vi khuẩn. Phage thường có vỏ bọc protein, phức hợp bao gồm phần đầu có hình đa diện chứa nucleic acid (DNA hoặc RNA) và đuôi mà qua đó nucleic acid xâm nhập vào vi khuẩn chủ. Sau quá trình nhân lên của nucleic acid của phage, tế bào vi khuẩn chủ thường bị tan biến. Loại phage luôn luôn làm tan tế bào vi khuẩn khi chúng xâm nhiễm vi

khuẩn gọi là phage độc, ví dụ phage T4. Ngược lại, còn có phage ôn hòa, khi xâm nhiễm vi khuẩn nó gây nên phản ứng tiềm tan, nghĩa là hệ gen của phage gắn vào nhiễm sắc thể vi khuẩn và được sao chép cùng với nhiễm sắc thể đó. Hệ gen của phage ở trạng thái gắn như vậy với nhiễm sắc thể vi khuẩn gọi là prophage.

Phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction, PCR).

Phương pháp dùng trong phòng thí nghiệm để khuếch đại các đoạn DNA đặc biệt lên hàng triệu lần trong vòng vài giờ thông qua 20-30 chu kỳ nhiệt, mỗi chu kỳ bao gồm ba mức nhiệt độ: biến tính ở 90-95°C, bắt cặp với mẫu ở 40-65°C hoặc hơn và tổng hợp mạch mới nhờ DNA polymerase chịu nhiệt (Taq polymerase) ở 70-72°C. PCR có ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán y học, phân tích sự đa dạng sinh học, chọn giống và trong nhiều lĩnh vực khác.

Nhà khoa học Mỹ (Tiến sĩ Mullis) người phát minh ra kỹ thuật PCR đã nhận giải Nobel năm 1993. Cùng chia sẻ Giải Nobel với Mullis là Smith (Canada) do có những đóng góp mang tính nền tảng cho việc gây đột biến điểm định hướng, dựa trên các oligonucleotide và việc phát triển chúng trong các nghiên cứu protein.

Phân hóa hay biệt hóa (differentiation). Một khía cạnh của sự phát triển bao gồm sự hình thành các loại tế bào, các loại mô, các loại cơ quan khác nhau từ một hợp tử ban đầu dưới sự điều khiển đặc biệt của các gen.

Phân hủy sinh học (bioremediation). Là quá trình làm sạch môi trường sinh thái nhờ cơ thể sống. Vai trò chính thuộc về vi sinh vật và thực vật phân giải hoặc hấp thụ các chất ô nhiễm gây độc và kim loại nặng có trong mặt đất, nước và không khí.

Phân tích trình tự gen (gene sequencing). Là kỹ thuật xác định trình tự theo cấu trúc bậc một của chuỗi các nucleotide trong một phân tử nucleic acid. Phân tích trình tự của DNA có các phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert và phương pháp enzyme của Sanger. Trong những năm gần đây, một số phương pháp xác định trình tự mới nhờ sự hỗ trợ của máy tính đã xuất hiện. Bên cạnh kỹ thuật thông thường sử dụng các polyacrylamide gel để phân ly các phân tử DNA có độ dài khác nhau, các kỹ thuật mới liên quan đến phát hiện huỳnh quang của các nucleotide được đánh dấu, phân tích

trình tự DNA bằng khối phổ, điện di mao dẫn hoặc lai với các đoạn oligonucleotide được tổng hợp nhân tạo cũng đã ra đời.

Năm 1980, Sanger (Anh) và Gilbert (Mỹ) đã được trao giải Nobel do đã có những đóng góp quan trọng về phương pháp xác định trình tự các nucleotide trong phân tử DNA. Đóng góp này là mốc lịch sử to lớn trong sinh học phân tử, là nguyên lý của tất cả các máy xác định trình tự DNA tự động đang sử dụng hiện nay trên khắp thế giới.

Phiên mã ngược (reverse transcription). Quá trình tổng hợp DNA từ khuôn mẫu mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase).

Phóng xạ tự ghi (autoradiography). Kỹ thuật phát hiện các phân tử có đánh dấu phóng xạ thông qua hiệu ứng tạo ảnh của các phân tử này trên phim X-quang.

Phosphoryl hóa (phosphorylation). Phản ứng tạo thành một dẫn xuất phosphate của một phân tử sinh học dưới tác dụng xúc tác của một enzyme.

Phosphatase kiềm (alkaline phosphatase). Enzyme loại bỏ các nhóm 5'-PO₄ từ đầu của các phân tử DNA và để lại các nhóm 5'-OH.

Phối tử (ligand). Một phân tử hoặc một ion kết hợp với một protein, ví dụ hormone có thể kết hợp với thụ thể (receptor) đặc hiệu của nó.

Plasmid. Là DNA vi khuẩn có cấu trúc mạch vòng kép, nằm trong tế bào chất và ngoài nhân, có khả năng sao chép độc lập đối với nhiễm sắc thể của tế bào. Tồn tại cả ở sinh vật prokaryote và eukaryote. Ngày nay, các plasmid thiết kế nhân tạo được sử dụng rộng rãi như là các vector dùng trong các kỹ thuật tạo dòng và biểu hiện gen.

Polyacrylamide. Là polymer của acrylamide và bisacrylamide có cấu trúc gồm các liên kết chéo tạo ra một mạng xốp (giống bột biển). Các chất phải chui vào lỗ gel mới ra được, vì vậy những chất nào có khối lượng phân tử nhỏ sẽ ra trước và ngược lại.

Polymer. Một đoạn dài các monomer.

Polynucleotide. Trình tự những nucleotide nối đồng hóa trị với nhau, trong đó vị trí 3' của pentose của một trong những nucleotide được nối với một liên kết phosphodiester ở vị trí 5' của pentose của nucleotide tiếp theo.

Polypeptide. Một chuỗi dài những amino acid nối với nhau bởi những liên kết peptide.

Prokaryote. Sinh vật đơn bào không có nhân tế bào điển hình, DNA nằm trong tế bào chất không có màng bao bọc, không có nguyên phân và giảm phân; đại diện điển hình là vi khuẩn.

Prophage. Phage ôn hòa đã xen vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn tiềm tan. Nó sao chép đồng thời với nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn chủ.

Protein. Một phân tử lớn gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptide, mỗi chuỗi có một trình tự amino acid và một khối lượng phân tử đặc trưng. Protein là hợp chất quan trọng bậc nhất đối với cơ thể sống. Về cấu trúc, protein là phân tử mạch dài gồm các đơn vị cấu trúc nhỏ là các amino acid nối với nhau qua mối liên kết peptide. Khối lượng phân tử của protein từ vài nghìn đến vài triệu. Có khoảng 20 loại amino acid. Các loại protein phức tạp hơn có liên kết thêm với các nhóm bổ sung.

Protein dung hợp (fusion protein). Là một protein tái tổ hợp lai được mã hóa bởi một gen lai (fusion gene) do sự dung hợp *in vitro* các đoạn gen khác nhau trên plasmid vector và sau đó biến nạp vào vi sinh vật chủ (chẳng hạn *E. coli*). Vì vậy, protein dung hợp sẽ mang trình tự amino acid của hai protein khác biệt được tổng hợp từ đầu N của vector biểu hiện.

Protein nguyên thể (native protein). Là một protein tái tổ hợp được mã hóa bởi một gen ngoại lai (foreign gene) trong vi sinh vật chủ. Khác với protein dung hợp, protein nguyên thể được tổng hợp từ đầu N của nó chứ không phải từ đầu N của vector.

Purine. Một hợp chất dị vòng, kiềm, có nitrogen, là thành phần của những nucleotide và nucleic acid. Purine chứa một nhân pyrimidine kết hợp với một nhân imidazol.

Pyrimidine. Một nitrogen base dị vòng có ở trong các nucleotide và nucleic acid.

Quá trình chuẩn bị cơ chất và nguyên liệu sản xuất (upstream processing). Giai đoạn thiết kế môi trường dinh dưỡng (cơ chất) và sử dụng chủng tế bào (nguyên liệu sản xuất) thích hợp cho một quá trình sinh học (bioprocessing).

Quá trình phân tách và tinh sạch đầu ra (downstream processing). Giai đoạn thu hồi và tinh sạch các sản phẩm của một quá trình sinh học (bioprocessing). Các kỹ thuật thường được sử dụng trong bước này là ly tâm, siêu lọc hoặc sắc ký.

Retrovirus. Là loại virus RNA chứa enzyme reverse transcriptase và sinh sản dưới dạng DNA mạch kép. Chúng có khả năng xâm nhiễm tế bào vật chủ cao. Khi xâm nhiễm nó có khả năng gắn hệ gen của virus với hệ gen của tế bào vật chủ, là cơ sở để thiết kế các vector liệu pháp gen hiệu quả.

Ribonuclease. Enzyme xúc tác đặc hiệu việc phân hủy RNA bằng cách cắt các mối liên kết phosphodiester trên RNA.

Ribonucleic acid (RNA). Thường là phân tử đa phân mạch đơn gồm các đơn vị cấu trúc cơ sở là ribonucleotide. Về mặt hóa học RNA rất giống với DNA. RNA là vật chất di truyền của một số virus và là các phân tử trung gian trong quá trình tổng hợp protein mà thông tin về trình tự amino acid của chúng đã được mã hóa trong DNA.

Ribonucleotide. Đơn vị cấu trúc cơ sở của RNA, gồm ba thành phần: đường ribose, nitrogen base và nhóm phosphate.

Ribosome. Là cơ quan tử khi kết hợp với mRNA tạo ra bộ máy tổng hợp protein. Trong tế bào thường có hàng nghìn ribosome, ribosome của mọi tế bào đều gồm một tiểu đơn vị nhỏ và một tiểu đơn vị lớn. Mỗi tiểu đơn vị có mang nhiều protein và rRNA (trong đó rRNA là thành phần chủ yếu chiếm khoảng 65%) có kích thước khác nhau. Người ta cũng thấy ribosome trong ty thể, ở đó có sự tổng hợp một số protein ty thể.

Ribozyme. Là đoạn RNA có hoạt tính xúc tác phản ứng hóa học giống như enzyme.

RNA bổ sung (complementary RNA). RNA sinh ra bằng cách phiên mã từ khuôn mẫu sợi đơn DNA tương ứng.

RNA kích thước nhỏ của nhân (small nuclear RNA, snRNA). Ngoài mRNA, tRNA và rRNA, tế bào eukaryote còn chứa những phân tử RNA kích thước nhỏ của nhân (chiếm khoảng <1%) tham gia vào ghép nối các exon.

RNA polymerase. Còn gọi là RNA polymerase phụ thuộc DNA (DNA-dependent RNA polymerase), xúc tác việc tổng hợp RNA trên khuôn mẫu DNA trong quá trình phiên mã.

RNA ribosome (ribosomal RNA, rRNA). Là thành phần cơ bản của ribosome, đóng vai trò xúc tác và cấu trúc trong tổng hợp protein. Tùy theo hệ số lắng rRNA được chia thành nhiều loại: ở eukaryote có rRNA 28S; 18S; 5,8S và 5S; còn các rRNA ở *E. coli* có ba loại: 23S, 16S và 5S. rRNA

chiếm nhiều nhất trong bốn loại RNA (khoảng 80% tổng số RNA tế bào), tiếp đến là tRNA khoảng 16%, mRNA chỉ khoảng 2%. Ngoài ra, tế bào sinh vật eukaryote còn chứa những phân tử RNA kích thước nhỏ của nhân (small nuclear, snRNA) chiếm khoảng <1% tham gia vào ghép nối các exon.

RNA thông tin (messenger RNA, mRNA). Một loại RNA được phiên mã từ một trình tự DNA. mRNA truyền thông tin di truyền từ nhiễm sắc thể tới ribosome để tổng hợp protein. Trong quá trình đó một sợi của chuỗi xoắn kép DNA được dùng làm khuôn mẫu, dọc theo nó các nucleotide của mRNA bổ sung được xếp thành hàng, nối với nhau tạo nên một polynucleotide giống hệt sợi DNA không làm khuôn mẫu ngoại trừ thymine được thay bằng uracil. Quá trình này gọi là phiên mã và phân tử mRNA mang mã di truyền được dùng để điều khiển sự hình thành protein trên ribosome.

RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNA). Loại RNA mang các amino acid đến ribosome và sắp xếp chúng dọc theo phân tử mRNA đã nằm sẵn ở đó. Tại đây, các amino acid nối với nhau bằng liên kết peptide để tạo thành phân tử protein. Mỗi amino acid có một phân tử RNA vận chuyển riêng với bộ ba đặc trưng và như vậy các amino acid được sắp xếp theo trật tự của các nitrogen base trên mRNA trong quá trình dịch mã.

Sàng lọc (screening). Kỹ thuật nhận dạng một dòng DNA trong một thư viện hệ gen (genomic library) hoặc thư viện cDNA (cDNA library) bằng một phương pháp lai mẫu dò có đánh dấu [α - ^{32}P]dCTP với các vết tan (trường hợp dùng bacteriophage λ làm vector tạo dòng và cho xâm nhiễm vào vi khuẩn *E. coli*) hoặc khuẩn lạc (dùng plasmid làm vector tạo dòng) của các thư viện đó trên màng nylon hoặc nitrocellulose. Tín hiệu lai được phát hiện bằng phóng xạ tự ghi trên phim X-quang.

Sao chép (replication). Sự nhân bản vật chất di truyền trong chu trình phân bào hoặc sự tổng hợp DNA của phage khi phage sinh sản trong tế bào vi khuẩn.

Sephadex. Là một loại dextran có liên kết chéo giữa các mạch polysaccharide với nhau tạo thành một cấu trúc mạng lưới ba chiều. Sephadex trung hòa điện tích nên không có tương tác cation cũng như anion, nó là một loại bột khô, không tan trong nước, nhưng khi ngâm nước sẽ trương ra và tạo thành gel. Mất lưới của các sephadex gel thường to nhỏ

khác nhau, tùy theo mức độ liên kết. Nếu giữa các chuỗi polysaccharide có ít liên kết thì gel sẽ có mắt lưới lớn, ngậm nước nhiều và ngược lại. Sephadex bền trong môi trường acid yếu và kiềm yếu, trong môi trường acid mạnh và kiềm mạnh thì các liên kết glucoside trong gel sẽ bị thủy phân. Dựa vào độ liên kết người ta chia sephadex làm năm loại: sephadex G-25, G-50, G-75, G-100 và G-200.

Sinh học phân tử (molecular biology). Khoa học nghiên cứu các hiện tượng sống ở mức độ phân tử. Lĩnh vực khoa học trẻ tuổi này là điểm gặp nhau của các khoa học kinh điển như di truyền học, hóa sinh học, tế bào học, vật lý học, hóa học hữu cơ và hóa lý. Theo cách hiểu phổ biến hiện nay, sinh học phân tử là khoa học nghiên cứu các gen và hoạt động của chúng ở mức độ phân tử, bao gồm phiên mã, dịch mã, sao chép, điều hòa biểu hiện gen, tái tổ hợp và chuyển gen...

Sinh tổng hợp protein (protein synthesis). Phản ứng hóa học diễn ra trên ribosome tạo nên các phân tử protein từ các amino acid trên cơ sở thông tin di truyền nhận được từ trong nhân tế bào thông qua mRNA.

Somatotropin. Là một loại hormone sinh trưởng của người, hiện nay hormone này đã được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp để chữa bệnh lùn ở trẻ em do thiếu somatotropin.

Southern blot. Kỹ thuật chuyển và cố định DNA đã biến tính từ agarose gel (sau khi được phân đoạn bằng điện di) lên màng lai bằng nylon hay nitrocellulose để lai với mẫu dò (probe) được đánh dấu đồng vị phóng xạ [α - ^{32} P]dCTP hoặc digoxigenin-dUTP. Tín hiệu lai sau đó được phát hiện trên phim X-quang (trường hợp [α - ^{32} P]dCTP) hoặc trên màng lai (trường hợp digoxigenin-dUTP).

Tái tổ hợp (recombination). Quá trình mà trong đó nhiễm sắc thể hay phân tử DNA đứt ra rồi các phần đứt được nối lại theo một tổ hợp mới. Quá trình này có thể xảy ra trong tế bào sống (qua sự trao đổi chéo trong phân bào giảm nhiễm) hay trong ống nghiệm nhờ các enzyme cắt và nối DNA.

Tạo dòng (cloning). Còn gọi là nhân dòng, tách dòng hay dòng hóa, là sự sản sinh nhiều bản sao của một phân tử DNA, thường là phân tử DNA tái tổ hợp trong plasmid vector, bằng cách sao chép phân tử đó trong một vật chủ thích hợp chẳng hạn vi khuẩn *E. coli*.

Terminal transferase. Enzyme bổ sung các gốc nucleotide vào đầu 3' của oligonucleotide hoặc polynucleotide.

Tế bào khả biến (competent cell). Các tế bào vi khuẩn có khả năng tiếp nhận DNA ngoại lai trong quá trình biến nạp.

Tế bào lympho B (B lymphocyte). Phát triển trong tủy xương (bone marrow) được ký hiệu là B, có chức năng tổng hợp các kháng thể.

Tế bào lympho T (T lymphocyte). Phát triển và thuần thục ở tuyến ức (thymus) nên ký hiệu T.

Tế bào Hfr (high frequency recombination cell). Tế bào giới tính đực ở *E. coli*, có mang nhân tố F gắn liền với nhiễm sắc thể vi khuẩn. Khi nhân tố F thúc đẩy sự tiếp hợp của tế bào Hfr với tế bào cái (F⁻) thì các gen của vi khuẩn được truyền sang tế bào cái với tần số cao.

Tế bào NK. Là những tế bào lympho có hạt lớn, có khả năng nhận biết các tế bào bị ung thư, các vi sinh vật xâm nhiễm và tiêu diệt chúng nên gọi là tế bào giết tự nhiên, được ký hiệu là NK hay T_{NK} (natural killer).

Tế bào mầm phôi (embryonic stem cell). Tế bào phôi chưa biệt hóa, đa thể ở chuột, có thể được nuôi cấy trong một thời gian dài mà vẫn giữ được tính đa thể, nghĩa là khả năng biệt hóa theo nhiều hướng để phát triển thành các tế bào khác nhau như tế bào cơ tim, tế bào thần kinh, tế bào gan...

Tế bào trần (protoplast). Tế bào thực vật đã bị mất thành cellulose do xử lý các enzyme (cellulase, hemicellulase và pectinase), thường được dùng trong các thí nghiệm dung hợp tế bào (protoplast fusion) hay còn gọi là lai tế bào sinh dưỡng (somatic hybridization) để mở rộng nguồn gen tạo ra các giống cây trồng mới mang các đặc tính ưu việt.

Thể Barr. Thể Barr là nhiễm sắc thể X bị bất hoạt và kết đặc có trong nhân tế bào của nữ giới, không có ở nam giới.

Thế biến nạp (transformant). Tế bào hoặc sinh vật nhận được gen của một sinh vật khác trong quá trình biến nạp và biểu hiện chức năng của gen đó ra kiểu hình.

Thế đột biến (mutant). Sinh vật (hoặc gen) mang đột biến di truyền.

Thế khảm (mosaic). Phôi hoặc cơ thể có các tế bào mang các hệ gen không giống nhau.

Thể tái tổ hợp (recombinant). Các cá thể hoặc tế bào mang các tổ hợp gen khác với cha mẹ của chúng do các quá trình tái tổ hợp di truyền sinh ra.

Thông tin di truyền (genetic information). Thông tin được lưu trữ trong các phân tử DNA của sinh vật ở dạng trình tự sắp xếp của bốn nucleotide A, T, C và G đóng vai trò như những "chữ cái" của "ngôn ngữ" di truyền. Trong ngôn ngữ này, mỗi từ chỉ có ba chữ cái gọi là một bộ ba. Nghĩa của mỗi từ là một amino acid có mặt trên phân tử protein tương ứng. Mỗi "câu" của ngôn ngữ di truyền là một gen chứa đựng thông tin di truyền để đảm nhiệm một chức năng trọn vẹn. Mỗi chức năng là một đặc tính sinh lý, hình thái hay cấu trúc của sự sống. Do cơ chế sao chép theo kiểu nửa bảo toàn của DNA mà thông tin di truyền được truyền chính xác từ thế hệ nọ sang thế hệ kia hầu như không thay đổi.

Thư viện cDNA (cDNA library). Tập hợp các dòng DNA được tạo ra từ mRNA của một tế bào hoặc một mô cụ thể trong bacteriophage vector, đại diện cho thông tin di truyền mà các tế bào đó biểu hiện.

Thư viện hệ gen (genomic library). Tập hợp tất cả các đoạn DNA được tạo ra từ phản ứng cắt hạn chế genome trong bacteriophage vector, đại diện được cho toàn bộ cho thông tin di truyền của một hệ gen.

Tính toàn thể (totipotency). Là khả năng sinh sản hoặc tái sinh một cơ thể hoàn chỉnh từ một bộ phận của nó.

Trình tự dẫn đầu (leader sequence). Một trong ba phần chủ yếu của một phân tử mRNA. Trình tự này nằm ở đầu 5' của mRNA và mang thông tin để ribosome và các protein đặc hiệu nhận biết bắt đầu quá trình tổng hợp polypeptide, trình tự dẫn đầu không được dịch mã thành trình tự các amino acid.

Trình tự điều hòa (regulatory sequence). Một trình tự của DNA tham gia vào quá trình điều hòa của gen. Ví dụ promoter hoặc operator.

Trình tự khởi động (promoter). Trình tự nucleotide đặc hiệu nằm trong thành phần operon, có chức năng điều hòa hoạt động của operon, nơi RNA polymerase bám vào để bắt đầu quá trình phiên mã. Trình tự đặc trưng của promoter có khoảng 20-200 nitrogen base.

Trình tự Shine-Dalgarno (Shine Dalgarno sequence, SD). Còn gọi là vùng liên kết ribosome (RBS), là một phần của trình tự nucleotide ở đầu

5' của một mRNA prokaryote có thể kết hợp bổ sung cặp base với đầu 3' của 16S rRNA, dùng làm tín hiệu cho sự khởi đầu dịch mã.

Trình tự tăng cường (enhancer). Trình tự nucleotide dạng *cis* làm tăng cường độ phiên mã của promoter trong gen eukaryote. Nó có thể nằm cách promoter hàng ngàn cặp base và hoạt động theo cả hai hướng ở bất kỳ vị trí nào so với promoter.

Trypsin. Enzyme xúc tác phản ứng thủy phân các liên kết peptide trong protein và thủy phân từng phần protein, dẫn xuất từ trypsinogen dịch tụy tiết vào ruột non, được enzyme ruột non enterokinase tác động chuyển thành.

Vật chủ (host). Tế bào dùng để nhân các phân tử DNA lên nhiều lần.

Vector. Là các phân tử DNA được sử dụng trong tạo dòng và biểu hiện gen, và nhân bản chúng trong tế bào vật chủ (*E. coli* hoặc nấm men). Có ba nhóm vector chính gồm: (1) Nhóm plasmid, (2) Nhóm phage/phagemid, và (3) Nhóm nhiễm sắc thể nhân tạo (artificial chromosome: BAC, YAC...). Ý tưởng về vector chuyển gen bắt nguồn từ các plasmid của vi khuẩn. Vector chuyển gen là các phân tử DNA có khả năng tự tái sinh, tồn tại độc lập trong tế bào và mang được các gen cần chuyển.

Vector biểu hiện (expression vector). Là vector có thể mang các gen ngoại lai mong muốn cho phép thực hiện sự phiên mã của các bản sao được tạo dòng và sự dịch mã các mRNA của chúng trong tế bào vật chủ, ví dụ: *E. coli*. Để biểu hiện các gen ngoại lai trong *E. coli* phải bắt đầu bằng việc gắn nó vào trong vector biểu hiện (thường là plasmid). Vector này phải có đủ các cấu trúc cần thiết sau: (1) Gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) để đảm bảo duy trì vector trong tế bào. (2) Một promoter kiểm soát phiên mã cho phép sản xuất một lượng lớn mRNA từ các gen được tạo dòng. (3) Các trình tự kiểm soát dịch mã như vùng liên kết ribosome được bố trí thích hợp và codon khởi đầu AUG. (4) Một polylinker để đưa gen ngoại lai vào trong một hướng chính xác với promoter.

Vector liệu pháp (therapeutic vector). Có thể sử dụng viral vector hoặc không phải virus. Các viral vector thường dùng là adenovirus, adeno-associated virus (AAV), retrovirus, lentivirus và paramyxovirus. Các vector

không phải virus là các phức hợp cationic liposome như GL67, PEI, plasmid, SecR, Integrin...

Vector tạo dòng (cloning vector). Phân tử DNA mạch kép có khả năng tự sao chép trong tế bào vật chủ. Có thể gắn vào phân tử này một đoạn hoặc một vài đoạn DNA khác nguồn tạo nên phân tử DNA tái tổ hợp dùng để nhân dòng.

Vết tan (plaque). Vòng tròn trong suốt xuất hiện trên thảm đục của các vi khuẩn mọc trên môi trường thạch đặc, do sự tan vỡ lặp lại nhiều chu kỳ của các tế bào vi khuẩn bị bacteriophage xâm nhiễm và sinh tan.

Vi khuẩn hiếu khí (aerobe). Vi khuẩn sống trong không khí và sử dụng oxygen tự do để sinh trưởng.

Vi khuẩn kỵ khí (anaerobe). Vi khuẩn sống trong điều kiện không có không khí hay oxygen tự do, ngược lại với hiếu khí. Trong các quá trình kỵ khí, H_2S có thể được tạo ra gây mùi khó chịu.

Virus. Phức hợp chứa nucleic acid (DNA hoặc RNA) nằm trong một vỏ bọc protein, có khả năng gây nhiễm và tái bản bên trong tế bào vật chủ đặc hiệu, tạo ra nhiều virus, lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác. Virus là dạng sống không có cấu trúc tế bào, có khả năng xâm nhập vào các tế bào sống xác định và chỉ sinh sản ở bên trong các tế bào đó. Giống như tất cả các sinh vật khác, virus có bộ máy di truyền của riêng mình, mã hóa việc tổng hợp các hạt virus từ các chất có trong tế bào vật chủ. Như vậy, virus là những vật ký sinh nội bào. Virus phân bố ở khắp nơi trong tự nhiên, xâm nhập vào tất cả các nhóm sinh vật. Người ta đã biết khoảng 500 loại virus xâm nhập động vật máu nóng, 300 loại xâm nhập thực vật bậc cao. Một số khối u ung thư ở động vật và ở người có thể do virus. Virus tồn tại ở hai dạng: dạng nghỉ hay ngoại bào và dạng sinh sản hay nội bào. Kích thước của các hạt virus từ 15-350 nm, chiều dài của một số loại virus có thể đạt tới 2000 nm. Phần lớn virus chỉ nhìn thấy được qua kính hiển vi điện tử. Chất mang thông tin di truyền của virus là nucleic acid: DNA hoặc RNA. Vì vậy, có thể phân virus thành hai loại: loại mang DNA và loại mang RNA.

Vi tiêm (microinjection). Kỹ thuật đưa DNA vào nhân hoặc vào tế bào chất của tế bào bằng kim mao dẫn và bơm áp lực. Toàn bộ thao tác được tiến hành trên kính hiển vi ngược pha (inverted microscope).

Vị trí *cos* (*cos* site). Vùng được tạo ra khi các đầu dính của DNA phage λ nối lại với nhau.

Vị trí liên kết kháng nguyên đơn nhất (*unique antigen combining site*). Vị trí liên kết với kháng thể nằm trên một phân tử kháng nguyên.

Vòng cặp tóc (*hairpin loop*). Vùng chuỗi đơn bổ sung tạo nếp gấp chứa các cặp base tạo thành xoắn kép, được dùng làm mồi (*primer*) cho quá trình tổng hợp sợi cDNA thứ hai.

Vùng cùng hướng (*downtream region*). Đề cập đến vị trí của một đoạn trình tự nào đó nằm ở phía đầu 3' của gen hoặc một đoạn gen quan tâm.

Vùng đa nối (*polylinker* hay *polycloning site*). Một trình tự DNA mạch kép được tổng hợp nhân tạo có mang một loạt các vị trí nhận biết của các enzyme hạn chế. Trình tự này được gắn vào các vector dùng trong kỹ thuật tạo dòng gen (như vùng tạo dòng).

Vùng liên kết ribosome (*ribosome binding site, RBS*). Vùng trên phân tử mRNA giúp cho nó bám vào ribosome trong quá trình dịch mã (xem trình tự Shine-Dalgarno).

Vùng ngược hướng (*upstream region*). Vị trí của một trình tự nucleotide nào đó nằm ở phía đầu 5' của phân tử DNA so với gen quan tâm.

Vùng tạo dòng (*multiple cloning sites, MCS*). Đoạn DNA ngắn trong một vector thể hệ thứ ba (ví dụ: các nhóm pUC, pGEM, pBluescript...) có chứa các vị trí nhận biết cho một số enzyme cắt hạn chế thông dụng, được thiết kế để chèn đoạn DNA ngoại lai vào đây.

Western blot. Kỹ thuật chuyển protein tổng số đã được phân tách bằng điện di SDS trên polyacrylamide gel lên màng nylon hoặc nitrocellulose để lai với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và sau đó là kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme nhằm phát hiện protein kháng nguyên tương ứng của nó.

Xenobiotic. Một loại hợp chất được tìm thấy trong cơ thể sống nhưng không được sản xuất bình thường hoặc mong đợi có mặt trong cơ thể. Nó cũng có thể bao gồm cả các chất hiện diện với nồng độ cao hơn bình thường nhiều lần. Đặc biệt, các loại thuốc như kháng sinh được xem là xenobiotic của người bởi vì cơ thể người không tự sản xuất chúng. Tuy nhiên, trong lĩnh vực môi trường thuật ngữ này thường được sử dụng để chỉ các chất gây

ô nhiễm như các dioxin, các polychlorinated biphenyl..., và các ảnh hưởng của chúng lên khu hệ sinh vật (biota).

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Cơ chất sinh màu với β -galactosidase cho ra sản phẩm có màu xanh lam.

YAC (Yeast artificial chromosome). Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men, được dùng làm vector để tạo dòng những đoạn DNA có kích thước rất lớn trong nấm men.

Yếu tố tác động cis (cis-acting element). Đoạn trình tự DNA chỉ biểu hiện hiệu quả trên chính phân tử DNA mà nó tác động. Ví dụ: hộp CAAT là một phần tử tác động cis đối với quá trình phiên mã ở các sinh vật eukaryote.

Yếu tố tác động trans (trans-acting element). Yếu tố di truyền có thể biểu hiện hiệu quả mà không cần nằm trên cùng một phân tử với đoạn trình tự đích. Thường yếu tố đó mã hóa cho một sản phẩm protein (có thể là một enzyme hay một protein điều hòa) và sản phẩm này có thể khuếch tán đến điểm tác động.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Ban Từ điển-NXB Khoa học và Kỹ thuật.** 2002. Từ điển Bách khoa Sinh học. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội.
2. **Bains W.** 2003. *Biotechnology from A to Z. Oxford University Press Inc.* New York, USA.
3. **Lawrence E.** 1995. *Henderson's Dictionary of Biological Terms.* 7th ed. *Longman Group Ltd.* Singapore.
4. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. *Basic Biotechnology. Cambridge University Press*, UK.
5. **Singleton P and Sainsbury D.** 2001. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology.* 3rd ed. *John Wiley & Sons, Ltd.* UK.
6. **Walker JM and Rapley R.** 2002. *Molecular Biology and Biotechnology.* 4th ed. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.

MỤC LỤC

	Trang
LỜI NÓI ĐẦU	
Phần I. CÁC KHÁI NIỆM VÀ NGUYÊN LÝ CƠ BẢN	5
Chương 1. MỞ ĐẦU	6
I. Định nghĩa công nghệ sinh học	6
1. Định nghĩa tổng quát	6
1.1. Công nghệ sinh học truyền thống	7
1.2. Công nghệ sinh học hiện đại	7
2. Nội dung khoa học của công nghệ sinh học	7
3. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học	9
3.1. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp	9
3.2. Công nghệ sinh học trong y dược	10
3.3. Công nghệ sinh học công nghiệp và chế biến thực phẩm	10
3.4. Công nghệ sinh học môi trường	11
II. Sơ lược lịch sử hình thành công nghệ sinh học	12
1. Giai đoạn thứ nhất	13
2. Giai đoạn thứ hai	13
3. Giai đoạn thứ ba	13
4. Giai đoạn thứ tư	14
III. Một số khía cạnh về khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại	15
1. Về khoa học	15
2. Về kinh tế	16
2.1. Những công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học	16
2.2. Sự lệ thuộc vào các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học	16
IV. Các vấn đề pháp lý của công nghệ sinh học hiện đại	17
1. An toàn sinh học	18
1.1. Sự chuyển gen bằng hạt phấn	18
1.2. Sự bền vững của DNA ở trong đất	19

1.3. Chuyển gen ngang từ thực vật vào vi sinh vật đất	20
1.4. Chuyển gen từ thực vật vào virus	21
2. An toàn thực phẩm	22
2.1. Các chất gây dị ứng	23
2.2. Đánh giá độ an toàn của các thực phẩm	24
3. Đạo đức sinh học	25
4. Quyền tác giả và sở hữu trí tuệ	27
4.1. Quyền tác giả	27
4.2. Sở hữu trí tuệ	28
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	30

Chương 2. CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP 31

I. Mở đầu 31

II. Phân lập đoạn DNA/gen 31

1. Tách các đoạn DNA từ genome 32

2. Sinh tổng hợp cDNA từ mRNA 33

3. Phân lập đoạn DNA bằng phương pháp PCR 33

III. Tạo dòng (gắn) đoạn DNA/gen vào vector 36

1. Enzyme hạn chế 36

2. Các vector được dùng để tạo dòng các đoạn DNA 38

2.1. Plasmid vector 39

2.2. Bacteriophage λ vector 42

3. Gắn đoạn DNA vào vector 43

3.1. Gắn các đoạn cDNA 43

3.2. Gắn các sản phẩm PCR 46

4. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn/tế bào vật chủ 47

4.1. Điện biến nạp 47

4.2. Hóa biến nạp 48

IV. Chọn dòng mang DNA tái tổ hợp 48

1. Lai khuẩn lạc và vết tan 49

2. Khử hoạt tính bằng chèn đoạn 50

3. Tạo dòng định hướng 50

V. Biểu hiện gen được tạo dòng	52
1. Vector biểu hiện	53
2. Xác định mức độ biểu hiện của gen được tạo dòng	55
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	58

Chương 3. CÔNG NGHỆ LÊN MEN VI SINH VẬT 59

I. Mở đầu 59

II. Sinh trưởng của vi sinh vật 59

III. Sinh khối vi sinh vật và công nghệ lên men 64

1. Sinh khối vi sinh vật 64

2. Quá trình lên men 65

IV. Các sản phẩm lên men vi sinh vật 68

1. Lên men rượu 68

1.1. Rượu trắng 68

1.2. Rượu vang 70

2. Sản xuất enzyme 71

2.1. Các loại enzyme vi sinh vật 72

2.2. Sinh tổng hợp enzyme cảm ứng 75

2.3. Những phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzyme 76

2.4. Tách và tinh sạch chế phẩm enzyme 82

3. Sản xuất kháng sinh 83

3.1. Penicillin 83

3.2. Streptomycin 85

3.3. Tetracycline 86

4. Sản xuất acid hữu cơ 87

4.1. Acetic acid 87

4.2. Citric acid 89

V. Công nghệ tái tổ hợp vi sinh vật 89

1. Các vi sinh vật tái tổ hợp 90

2. Các ứng dụng trong công nghệ vi sinh 90

Tài liệu tham khảo/đọc thêm 91

Chương 4. CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT	93
I. Mở đầu	93
II. Nuôi cấy mô và nhân giống <i>in vitro</i>	94
1. Thuật ngữ học	94
1.1. Nuôi cấy đỉnh phân sinh	95
1.2. Sinh sản chồi nách	95
1.3. Tạo chồi bất định	95
1.4. Phát sinh cơ quan	96
1.5. Phát sinh phôi vô tính	96
2. Nhân giống <i>in vitro</i> và các hệ thống nuôi cấy mô	96
2.1. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng	97
2.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus	101
2.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính-công nghệ hạt nhân tạo	102
3. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính <i>in vitro</i>	107
3.1. Giai đoạn I-cấy gây	107
3.2. Giai đoạn II-nhân nhanh	108
3.3. Giai đoạn III-chuẩn bị và đưa ra ngoài đất	110
4. Nhân giống <i>in vitro</i> và việc sử dụng giống ưu thế lai	110
5. Nhân giống <i>in vitro</i> và các đặc điểm không di truyền	111
5.1. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic được lưu lại	111
5.2. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic không lưu lại	112
III. Các kỹ thuật chuyển gen ở thực vật	112
1. Biến nạp gián tiếp thông qua <i>Agrobacterium</i>	114
1.1. Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	114
1.2. Ti-plasmid	115
1.3. Vùng T-DNA	116
1.4. Chuyển DNA ngoại lai vào tế bào và mô thực vật nhờ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	117
2. Các gen chỉ thị chọn lọc và gen chỉ thị sàng lọc	119
3. Chuyển gen bằng vi đạn	122

4. Các ứng dụng của công nghệ chuyển gen	123
4.1. Một số kết quả bước đầu	123
4.2. Triển vọng và hướng phát triển	124
5. Công nghệ di truyền trong kháng chất diệt cỏ	125
6. Công nghệ di truyền trong kháng sâu-bệnh	126
6.1. Kháng côn trùng	126
6.2. Kháng các virus thực vật	127
6.3. Kháng các bệnh nấm	129
6.4. Kháng các bệnh vi khuẩn	130
IV. Sản xuất các dược liệu sinh học	130
1. Các hợp chất tự nhiên	130
1.1. Các alkaloid	132
1.2. Các steroid	132
1.3. Một số chất khác	133
2. Các protein tái tổ hợp	134
3. Vaccine thực phẩm	136
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	138
 Chương 5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐỘNG VẬT	140
I. Mở đầu	140
II. Nuôi cấy tế bào động vật có vú	141
1. Các ưu điểm và hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật	141
1.1 Các ưu điểm của nuôi cấy tế bào động vật	141
1.2. Một số hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật	143
2. Các dòng tế bào động vật có vú và các đặc điểm của nó	143
2.1. Các tế bào dịch huyền phù	143
2.2. Các tế bào dính bám	144
3. Các sản phẩm thương mại của nuôi cấy tế bào động vật có vú	144
4. Glycosyl hóa protein	145
5. Môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú	147
6. Nuôi cấy tế bào động vật có vú trên quy mô lớn	149

6.1. Các điều kiện chung	149
6.2. Nuôi cấy mẻ	150
6.3. Nuôi cấy mẻ có cung cấp chất dinh dưỡng	152
6.4. Nuôi cấy thể ổn định hóa tính	152
6.5. Nuôi cấy perfusion	154
6.6. Số lượng và chất lượng sản phẩm	156
III. Công nghệ di truyền của các tế bào động vật có vú	158
1. Các phương pháp chuyển nạp gen	159
1.1. Phương pháp chuyển nhiễm	159
1.2. Phương pháp lipofection	159
1.3. Phương pháp xung điện	160
1.4. Phương pháp vi tiêm	161
1.5. Phương pháp dùng súng bắn gen	163
1.6. Phương pháp dùng các vector virus	163
2. Các điều kiện cần thiết cho biểu hiện gen ngoại lai	165
3. Các điều kiện thực nghiệm tối ưu	167
4. Đồng chuyển nạp gen chỉ thị và gen thực nghiệm	167
5. Kỹ thuật tế bào mầm phôi, chuyển gen và tái tổ hợp tương đồng	169
IV. Nuôi cấy tế bào mầm để sản xuất cơ quan người	171
1. Ứng dụng tế bào mầm phôi trong nghiên cứu cơ bản	172
2. Nghiên cứu chức năng gen	173
3. Nghiên cứu các mô hình bệnh lý	173
4. Ứng dụng trong y học tái tạo	173
V. Công nghệ phôi động vật có vú	175
1. Cấy truyền hợp tử	175
2. Bảo quản phôi	175
3. Nuôi cấy tạm thời phôi trong cơ thể sống	176
4. Kỹ thuật bọc phôi bằng agar	176
5. Kỹ thuật nuôi cấy tạm thời phôi trong ống dẫn trứng	176
VI. Nhân bản vô tính động vật có vú	177
1. Khái niệm cơ bản	177

2. Nhân bản vô tính ở động vật	177
3. Nhân bản vô tính cừu Dolly	178
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	181
Chương 6. CÔNG NGHỆ PROTEIN	182
I. Mở đầu	182
II. Cấu trúc protein	183
III. Các công cụ	184
1. Nhận dạng trình tự	184
2. Xác định cấu trúc và mô hình hóa	185
3. Biến đổi trình tự	185
4. Phát triển phân tử	188
5. Thiết kế trình tự <i>de novo</i>	190
6. Biểu hiện	190
7. Phân tích	191
IV. Một số ứng dụng của công nghệ protein	192
1. Các đột biến điểm	192
1.1. Betaseron/Betaferon	192
1.2. Humalog	192
1.3. Các tá dược vaccine mới	193
2. Sắp xếp lại vùng	194
2.1. Các vùng liên kết	194
2.2. Trao đổi các vùng protein	195
3. Sắp xếp lại toàn bộ protein	196
4. Các tương tác protein-phối tử	197
4.1. Biến đổi enzyme	197
4.2. Các chất chủ vận hormone	197
4.3. Thay thế các liên kết đặc hiệu	197
V. Sản xuất protein trên quy mô lớn	198
1. Lên men <i>E. coli</i> tái tổ hợp	199
2. Lên men nấm	200
3. Các enzyme vi sinh vật thay thế các enzyme thực vật	200

4. Các nguyên tắc hóa sinh cơ bản	201
4.1. Sự cảm ứng	201
4.2. Ức chế ngược	202
4.3. Ức chế dinh dưỡng	204
5. Công nghệ di truyền	205
VI. Các quá trình tách chiết và tinh sạch protein	207
1. Thu hồi protein	209
1.1. Thu hồi các protein ngoại bào	209
1.2. Thu hồi các protein nội bào	209
2. Tinh sạch sơ bộ	216
2.1. Loại bỏ các mảnh vỡ của tế bào	216
2.2. Ly tâm mẻ	216
2.3. Ly tâm dòng chảy liên tục	217
2.4. Lọc bằng màng	217
3. Hệ phân tách hai pha nước	218
4. Các phương pháp kết tủa	220
4.1. Kết tủa bằng ammonium	220
4.2. Kết tủa bằng các dung môi hữu cơ	220
4.3. Kết tủa bằng các polymer khối lượng phân tử cao	221
4.4. Kết tủa bằng nhiệt	221
5. Các phương pháp sắc ký	221
5.1. Sắc ký lọc gel	222
5.2. Sắc ký trao đổi ion	224
5.3. Sắc ký ái lực	227
5.4. Sắc ký tương tác kỵ nước	230
5.5. Các kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu suất cao	230
6. Siêu lọc	231
7. Thiết kế các protein để tinh sạch	232
7.1. Các thể vùi	232
7.2. Các đuôi ái lực	233
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	236

Phần II. CÁC ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC	237
Chương 7. CÁC ỨNG DỤNG TRONG NÔNG NGHIỆP	238
I. Mở đầu	238
II. Cải thiện và nhân nhanh giống cây trồng	238
1. Nhân giống vô tính <i>in vitro</i>	239
2. Sản xuất cây đơn bội <i>in vitro</i>	240
2.1. Phương pháp tạo thể đơn bội <i>in vivo</i>	240
2.2. Phương pháp tạo thể đơn bội <i>in vitro</i>	241
3. Dung hợp protoplast hay lai vô tính tế bào thực vật	241
3.1. Dung hợp protoplast bằng hóa chất	242
3.2. Dung hợp protoplast bằng điện	242
4. Chọn dòng biến dị soma	243
5. Chuyển gen vào cây trồng	244
5.1. Cây lúa	244
5.2. Cây lúa mì	246
5.3. Cây lúa mạch	247
5.4. Cây đậu tương	247
5.5. Cây đậu tây	248
5.6. Cây bông	248
5.7. Cổ định đạm	249
III. Chăn nuôi và thú y	250
1. Kỹ thuật cấy chuyển phôi	250
2. Tạo chế phẩm phòng tránh bệnh cho động vật	250
3. Chuyển gen vào động vật	251
IV. Chế biến thực phẩm	252
1. Sản xuất sữa	253
1.1. Sản xuất sữa chua	253
1.2. Sản xuất phomat	255
2. Chế biến tinh bột	257
3. Sản xuất nước uống lên men	257
3.1. Sản xuất bia	258

3.2. Sản xuất rượu vang	259
3.3. Sản xuất rượu trắng	262
4. Các sản phẩm chứa protein	265
4.1. Thực phẩm lên men truyền thống giàu protein	265
4.2. Protein vi khuẩn đơn bào	265
5. Chế biến rau quả	268
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	268

Chương 8. CÁC ỨNG DỤNG TRONG Y-DU'ỢC 270

I. Mở đầu 270

II. Vaccine 270

1. Các phương thức tiêm chủng vaccine hiện nay 271

1.1. Các vaccine bất hoạt 271

1.2. Các vaccine sống nhược độc 272

2. Vai trò của công nghệ di truyền trong nhận dạng, phân tích và sản xuất vaccine 272

2.1. Nhận dạng và tạo dòng các kháng nguyên có tiềm năng vaccine 272

2.2. Phân tích các kháng nguyên vaccine 273

2.3. Sản xuất các vaccine tiểu đơn vị 274

3. Cải thiện và sản xuất các vaccine sống nhược độc mới 275

3.1. Cải thiện các vaccine sống nhược độc 275

3.2. Các vector sống tái tổ hợp 275

4. Các hướng tiếp cận khác trong sản xuất vaccine 278

4.1. Các DNA vaccine 278

4.2. Các peptide vaccine 279

4.3. Kháng các kiểu gen cá thể 279

III. Kháng thể đơn dòng 280

1. Sản xuất hybridoma bằng cách dung hợp tế bào sinh dưỡng 280

2. Sản xuất kháng thể đơn dòng bằng công nghệ DNA tái tổ hợp 281

2.1. Phân lập các gen immunoglobulin 281

2.2. Biểu hiện scFV trên bề mặt bacteriophage	282
3. Kháng thể đơn dòng trong nghiên cứu Sinh-Y	282
4. Kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán và điều trị bệnh	283
IV. Liệu pháp gen	284
1. Các loại liệu pháp gen	285
1.1. Liệu pháp soma	285
1.2. Liệu pháp gen tế bào mầm	285
2. Các ứng dụng của liệu pháp gen trong chữa bệnh	286
2.1. Bệnh thiếu hụt miễn dịch phối hợp trầm trọng	286
2.2. Bệnh ung thư	287
2.3. Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm	288
2.4. Bệnh xơ nang	290
2.5. Bệnh HIV/AIDS	291
V. Protein trị liệu	292
1. Sản xuất hormone	292
1.1. Hormone sinh trưởng người	292
1.2. Somatostatin	292
2. Sản xuất enzyme	293
3. Sản xuất thuốc nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp	293
3.1. Sản xuất insulin	293
3.2. Sản xuất interferon	294
3.3. Sản xuất interleukin	295
VI. Chẩn đoán bệnh để can thiệp sớm	296
1. Chẩn đoán sớm giới tính của thai	296
2. Chẩn đoán sớm dị hình, quái thai trước khi sinh	297
3. Chẩn đoán phát hiện các tác nhân gây bệnh ngoại lai	298
4. Chẩn đoán các bệnh di truyền	299
5. In dấu DNA	300
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	301
Chương 9. CÁC ỨNG DỤNG TRONG MÔI TRƯỜNG	302
I. Mở đầu	302

II. Xử lý nước thải	302
1. Xử lý hiếu khí bằng hệ thống bùn hoạt tính	303
2. Xử lý yếm khí	304
3. Thu hồi nước	305
III. Phân hủy bùn hữu cơ	306
IV. Xử lý chất thải rắn	309
V. Xử lý khí thải	311
1. Loại bỏ các hợp chất vô cơ dễ bay hơi	311
2. Loại bỏ các hợp chất sulphur và nitrogen từ khí ống khói bằng phương pháp sinh học	315
VI. Phân hủy chất rắn	317
1. Kích thích sinh học và tăng sinh học	317
2. Các kỹ thuật phân hủy chất rắn	318
2.1. Phân hủy sinh học tại chỗ	318
2.2. Landfarming	318
2.3. Các bể phản ứng sinh học pha bùn	319
VII. Xử lý nước ngầm	320
1. Sự phục hồi hoạt động	320
2. Sự suy giảm tự nhiên và sự giám sát	322
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	323
 Phụ lục. MỘT SỐ THUẬT NGỮ CƠ BẢN	 324
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	355
 MỤC LỤC	 356