

CÔNG NGHỆ SINH HỌC PHÂN TỬ VI SINH VẬT

TRẦN LINH THUỐC
KHOA SINH HỌC
TRƯỜNG ĐH KHOA HỌC TỰ NHIÊN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM

- 1. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ**
- 2. SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP**
- 3. SẢN XUẤT VẮC XIN**
- 4. XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG, CHUYỂN HÓA VÀ SẢN XUẤT SINH KHỐI**
- 5. KÍCH THÍCH TỔ THỰC VẬT**
- 6. THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC**
- 7. SINH TỔNG HỢP CHẤT PHÂN TỬ LƯỢNG NHỎ**
- 8. SẢN XUẤT PROTEIN TÁI HỢP QUI MÔ LỚN**

CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ

**1.1. CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH
(IMMUNO DIAGNOSTICS)**

**1.2. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG
(MONOCLONAL ANTIBODY)**

**1.3. CHẨN ĐOÁN BẰNG DNA
(DNA DIAGNOSTICS SYSTEMS)**

**1.4. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CÁC BỆNH DI TRUYỀN
(MOLECULAR DIAGNOSIS OF GENETIC DISEASE)**

SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Phương pháp

Ưu điểm

Kính hiển vi

Đơn giản

Phát hiện trực tiếp

Phân biệt các sinh vật khác hình thái

Nuôi cấy, nhiễm chuột

Chỉ phát hiện ký sinh gây bệnh còn sống

Đo lường được mức ác tính và mức
nhiễm

Miễn dịch

Nhanh, đơn giản

Cơ thể tự động hóa được

Cơ thể sàng lọc số lượng mẫu lớn

DNA (lai, PCR)

Nhanh, nhạy và chuyên biệt

Phát hiện trực tiếp ký sinh gây bệnh

Phân biệt được các loài khác nhau

Không phụ thuộc vào lần nhiễm trước

Không cần ký sinh sống

Cơ thể tự động hóa

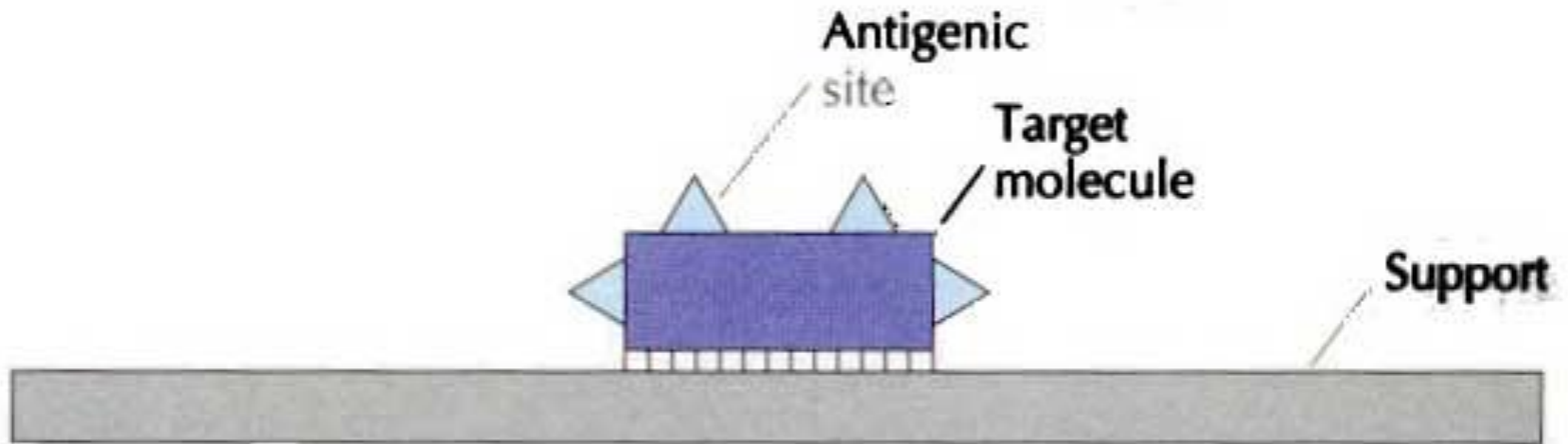
SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Phương pháp	Nhược điểm
Kính hiển vi	Chậm, tốn công sức Độ nhạy thấp Không phân biệt hai VSV giống hình thái Cần tay nghề
Nuôi cấy, nhiễm chuột	Chậm, đắt tiền Các chủng cho đáp ứng khác nhau Tác nhân gây bệnh có thể chết Sử dụng động vật thí nghiệm
Miễn dịch	Có trường hợp tính chuyên biệt thấp Không phân biệt được dạng hoạt động và dạng tiềm tàng
DNA (lai, PCR)	Đắt tiền, nhiều bước Không phân biệt được dạng sống và chết Có thể cho dương tính giả và âm tính giả

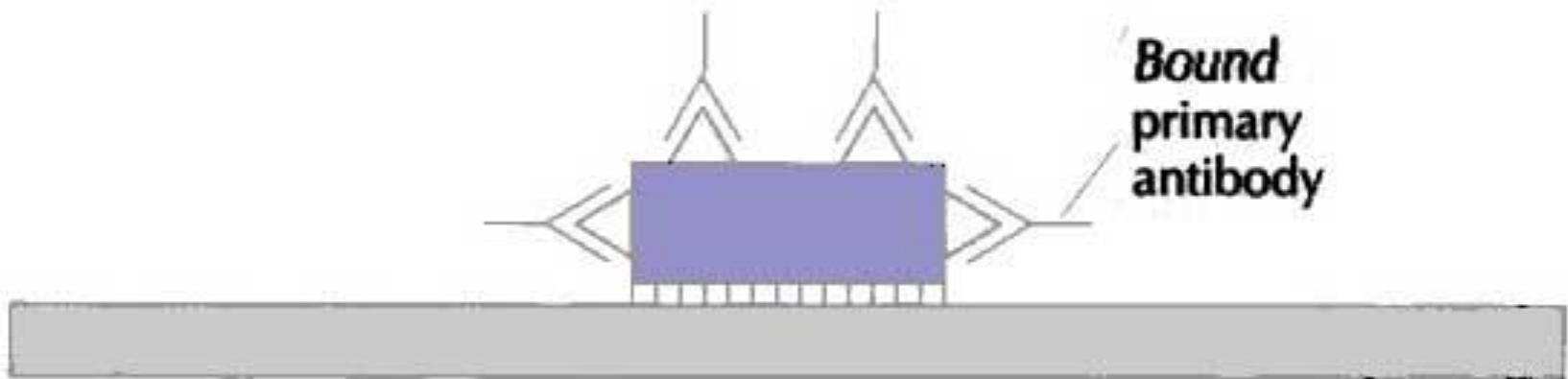
KỸ THUẬT ELISA

- Mẫu xét nghiệm được cố định trên một giá thể rắn;
- Kháng thể chuyên biệt đối với kháng nguyên mục tiêu: kháng thể sơ cấp (bậc một)
- Phức hợp kháng thể thứ cấp (bậc 2) với một enzyme.
- Cơ chất không màu được chuyển hóa thành sản phẩm có màu khi tiếp xúc với enzyme
- Sự xuất hiện của màu là chỉ thị về sự hiện diện của phân tử protein mục tiêu trong mẫu xét nghiệm.

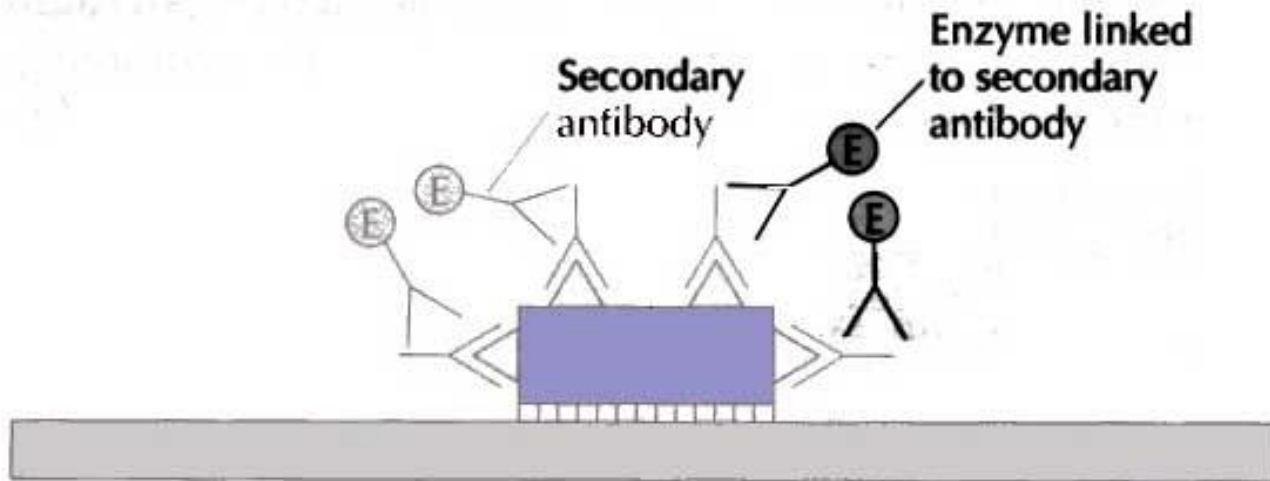
A Bind sample to support



B Add primary antibody; wash



C Add secondary antibody–enzyme conjugate; wash



D Add substrate

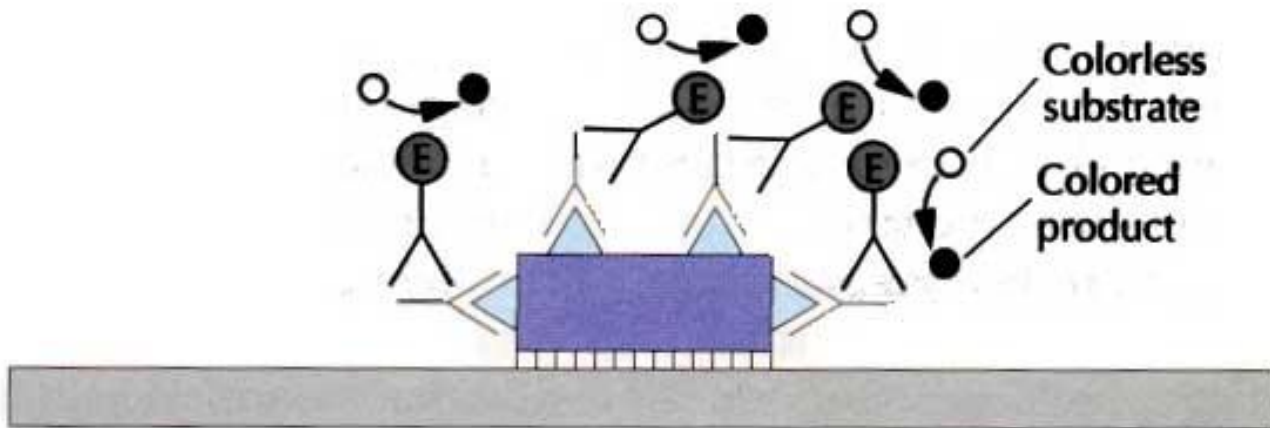


Figure 9.1 Generalized ELISA protocol for detecting a target antigen. The enz (E) is conjugated to the secondary antibody.

KỸ THUẬT ELISA

- + Ứng dụng: dùng để phát hiện nhiều loại protein, nhận diện virút, vi khuẩn, và xác định sự hiện diện của các hợp chất phân tử lượng nhỏ trong nhiều loại mẫu sinh học khác nhau.
- + Nhược điểm của kháng thể đa dòng:
 - Kháng thể đa dòng không phân biệt được các chủng có chung một yếu tố quyết định kháng nguyên
 - Lượng các loại kháng thể khác nhau dao động tùy theo mẻ

CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ (MOLECULAR DIAGNOSTICS)

**1.1. CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH
(IMMUNO DIAGNOSTICS)**

**1.2. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG
(MONOCLONAL ANTIBODY)**

**1.3. CHẨN ĐOÁN BẰNG DNA
(DNA DIAGNOSTICS SYSTEMS)**

**1.4. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CÁC BỆNH DI TRUYỀN
(MOLECULAR DIAGNOSIS OF GENETIC DISEASE)**

KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

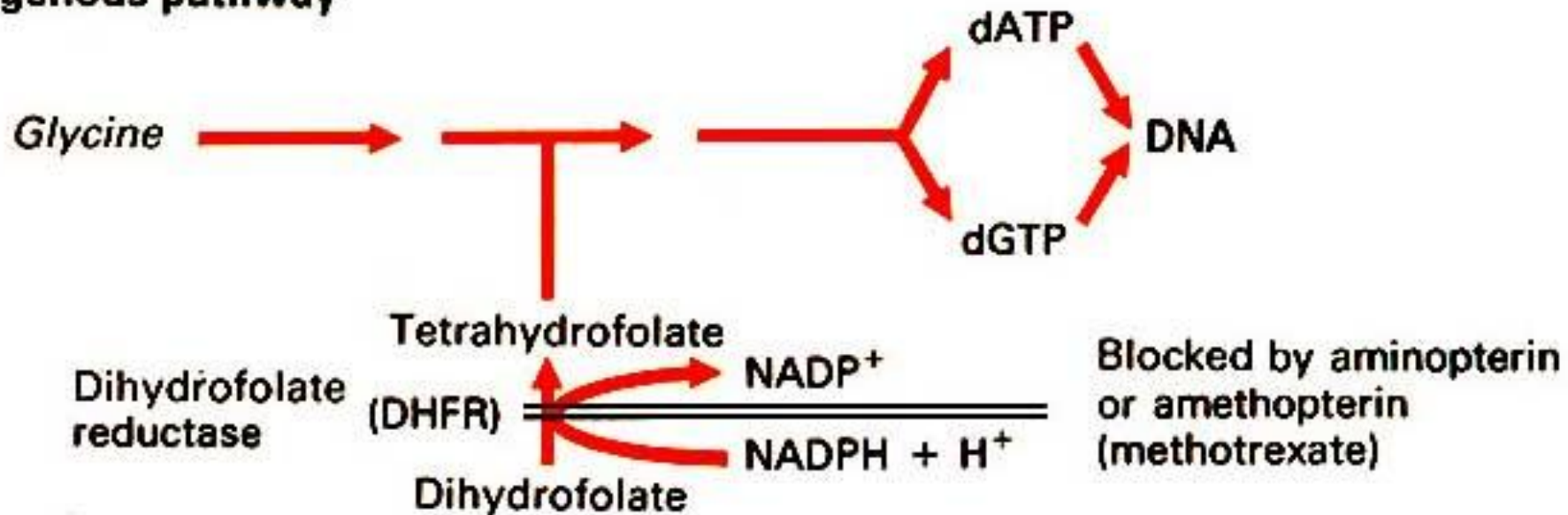
Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody):
một loại duy nhất kháng thể có ái lực với một
kháng nguyên chuyên biệt được tạo ra bởi một
dòng tế bào bạch huyết B, làm tăng tính chuyên
biệt của kháng thể sơ cấp và đảm bảo độ tin cậy
của chế phẩm kháng thể.

QUI TRÌNH TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

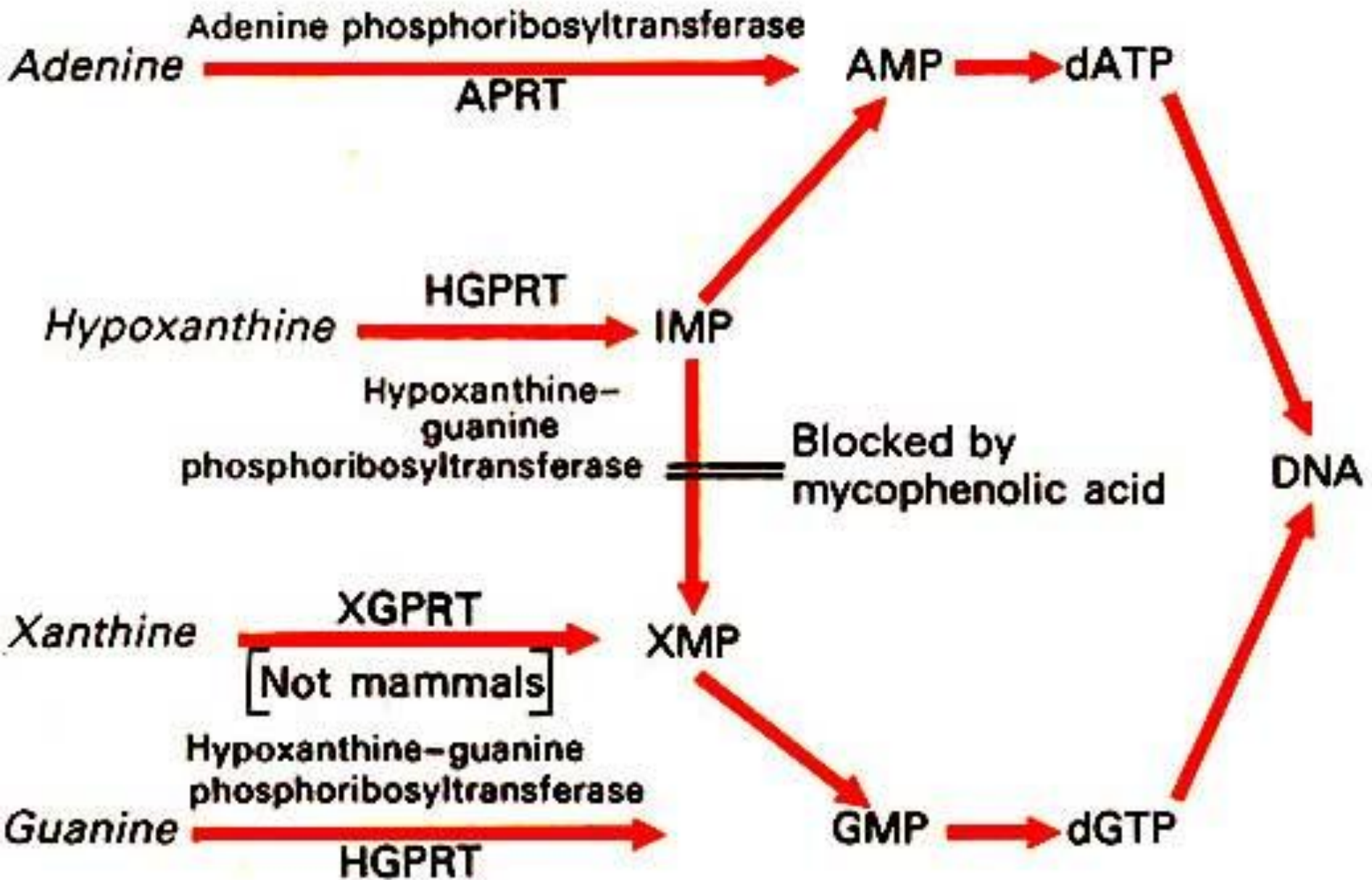
- Gây miễn dịch chuột bằng kháng nguyên mục tiêu
- Thu nhận lách, nghiền tách và thu nhận tế bào B
- Dung hợp tế bào B với tế bào M có kiểu hình HGPRT-
- Tuyển chọn tế bào lai bằng môi trường HAT
- Tách thu nhận tế bào đơn dòng
- Nuôi cấy tạo quần thể tế bào
- Thu nhận kháng thể đơn dòng

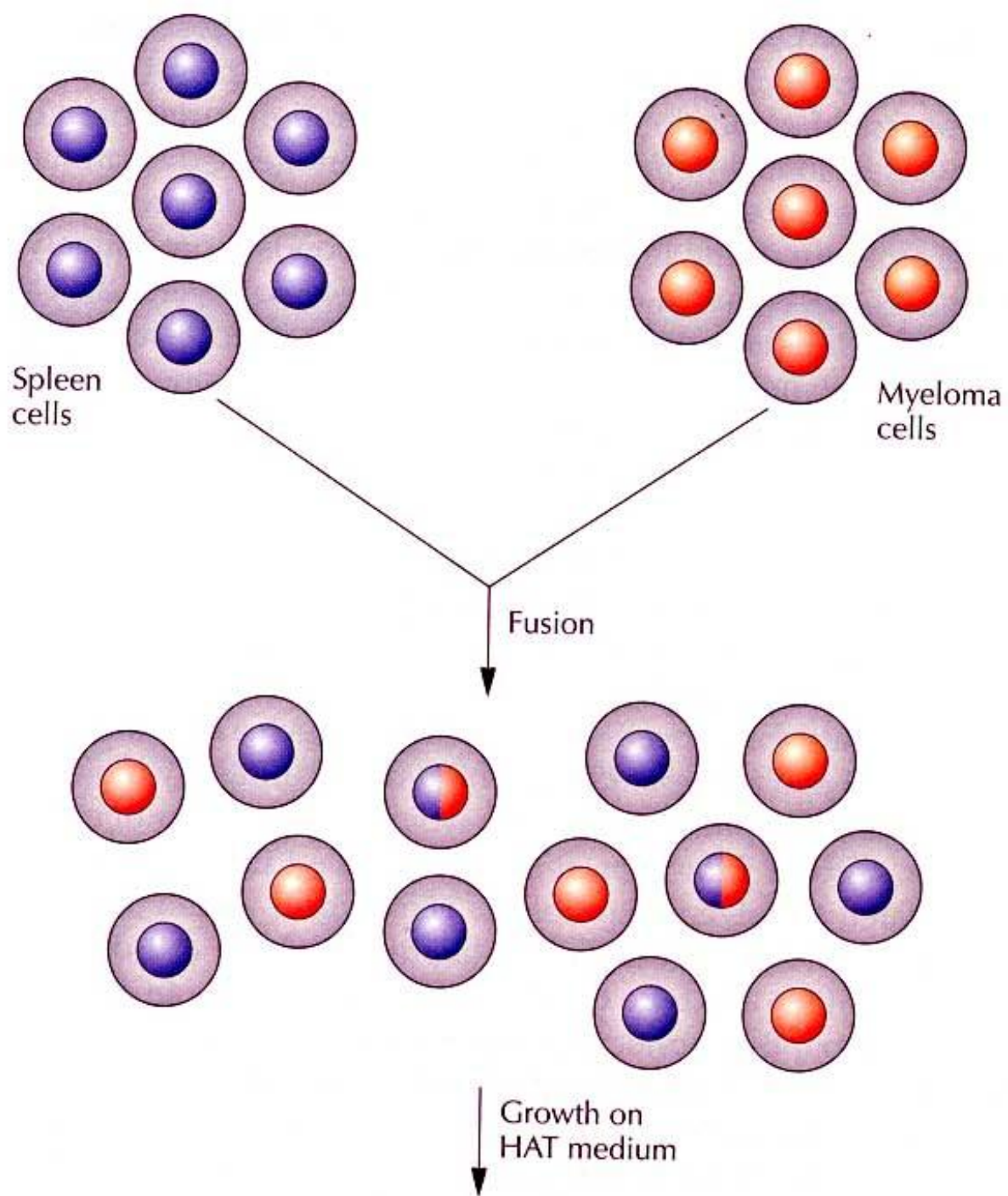
PURINE BIOSYNTHESIS

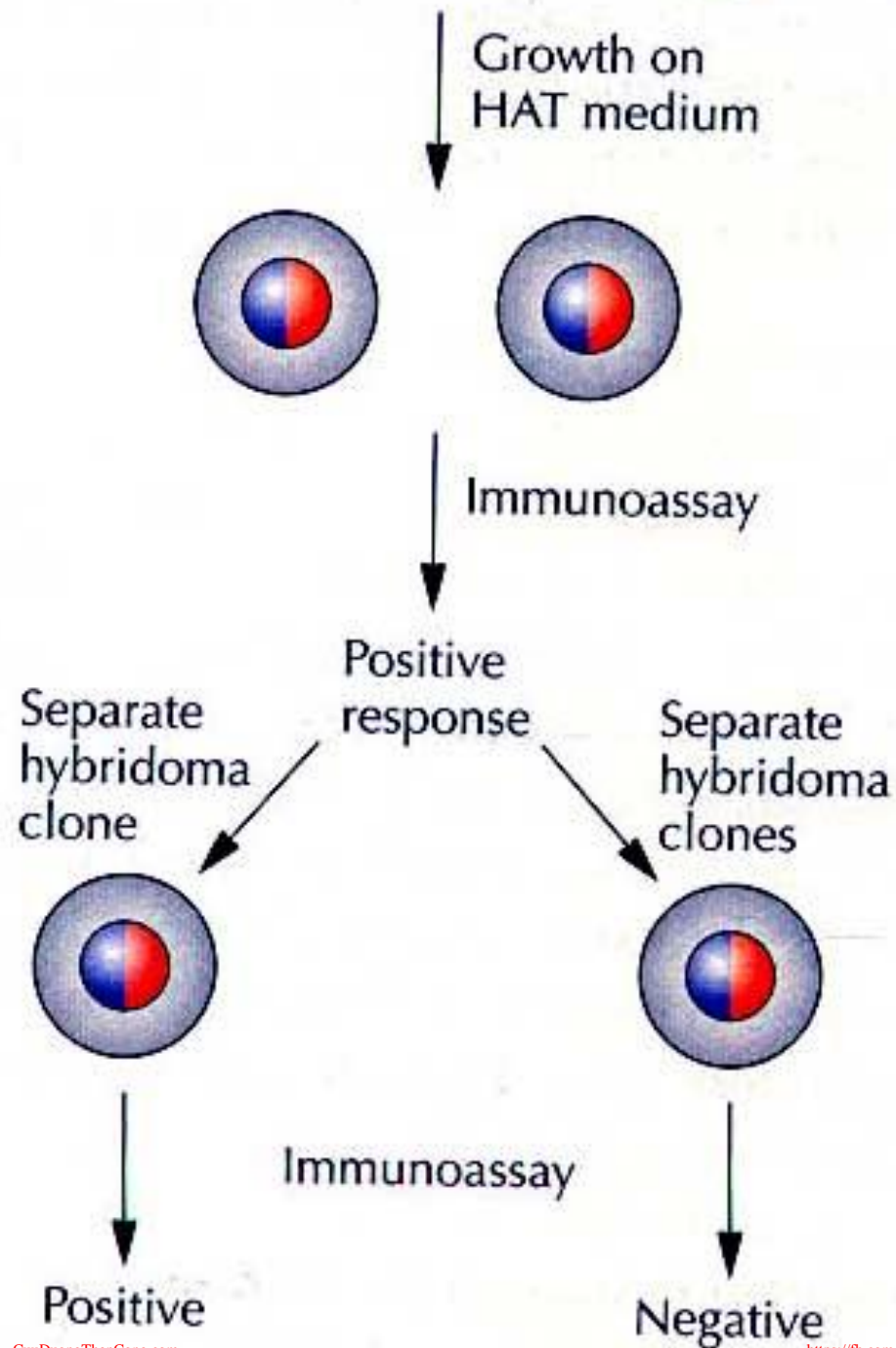
Endogenous pathway



Salvage pathway







KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

- + Kháng thể đơn dòng (nguyên vẹn hoặc đoạn Fv tái tổ hợp trong *E. coli*)
- + Ứng dụng của kháng thể đơn dòng
 - Phát hiện, định lượng hormone
 - Phát hiện tế bào ung thư
 - Định lượng tế bào tố (cytokine)
 - Phát hiện thuốc
 - Phát hiện các chất phân tử lượng nhỏ
 - Phát hiện ký sinh gây bệnh

CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ (MOLECULAR DIAGNOSTICS)

1. CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH (IMMUNO DIAGNOSTICS)
2. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG (MONOCLONAL ANTIBODY)
3. CHẨN ĐOÁN BẰNG DNA (DNA DIAGNOSTICS SYSTEMS)
4. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CÁC BỆNH DI TRUYỀN (MOLECULAR DIAGNOSIS OF GENETIC DISEASE)

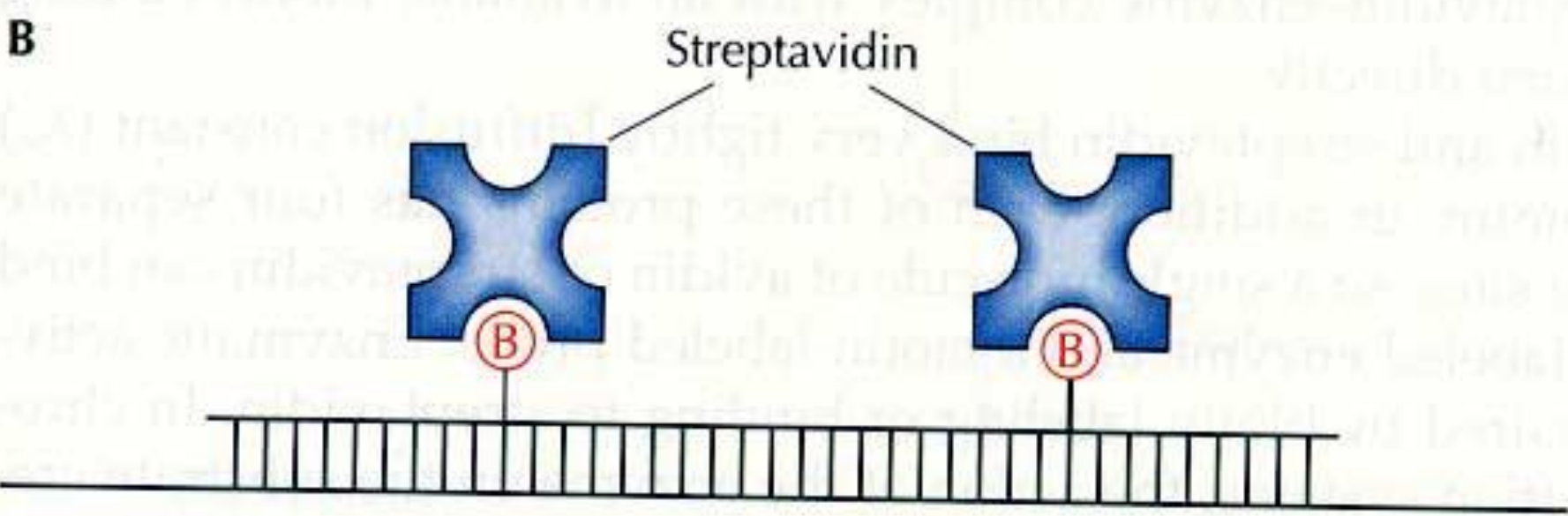
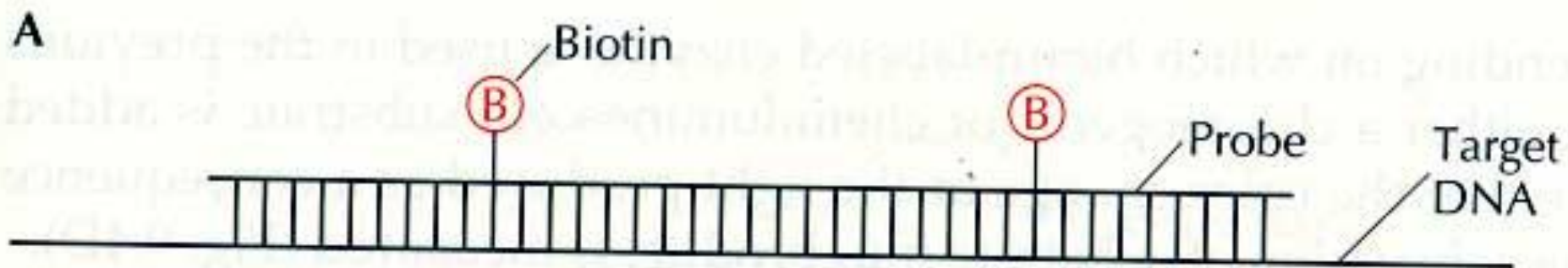
LAI PHÂN TỬ (HYBRIDIZATION)

+ Dựa trên sự bắt cặp bổ sung của hai trình tự đối song song

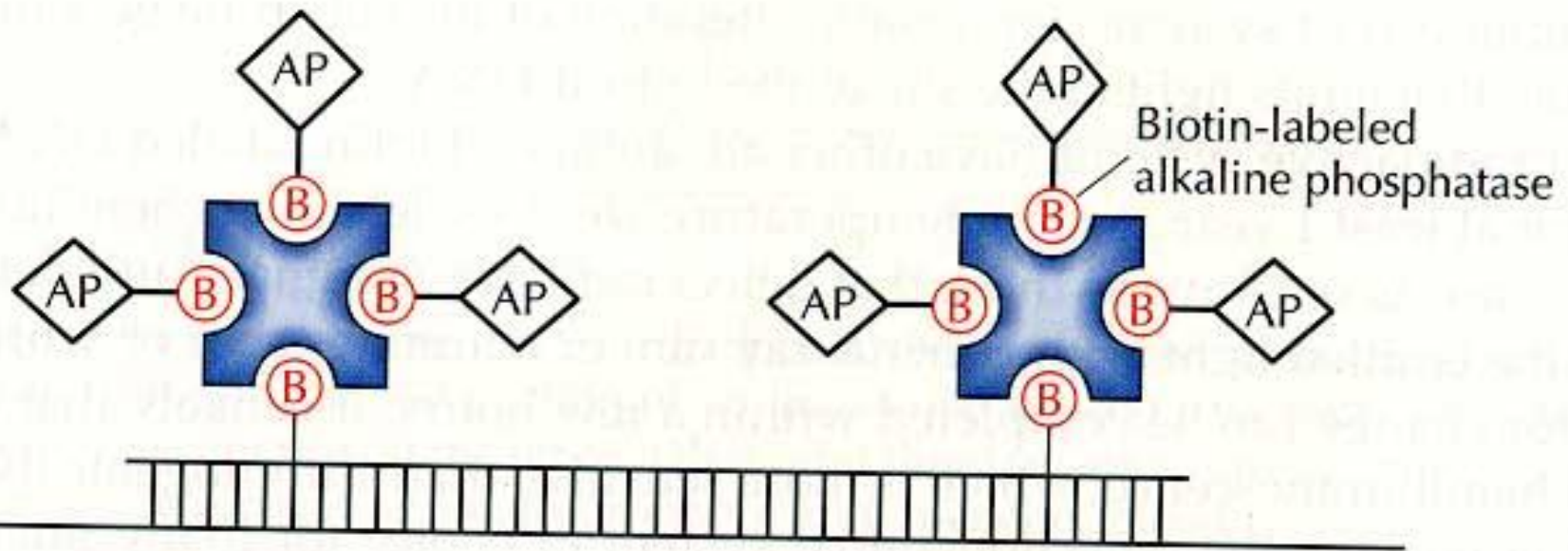
+ Qui trình:

- Gắn sợi DNA kiểm chứng mạch đơn lên màng lai
- Bổ sung mẫu dò (probe) được đánh dấu ở điều kiện thích hợp về nhiệt độ, lực ion để xúc tiến sự bắt cặp chuyên biệt giữa mẫu dò và trình tự mục tiêu.
- Rửa sạch các mẫu dò không lai (bắt cặp)
- Phát hiện vạch lai trên màng

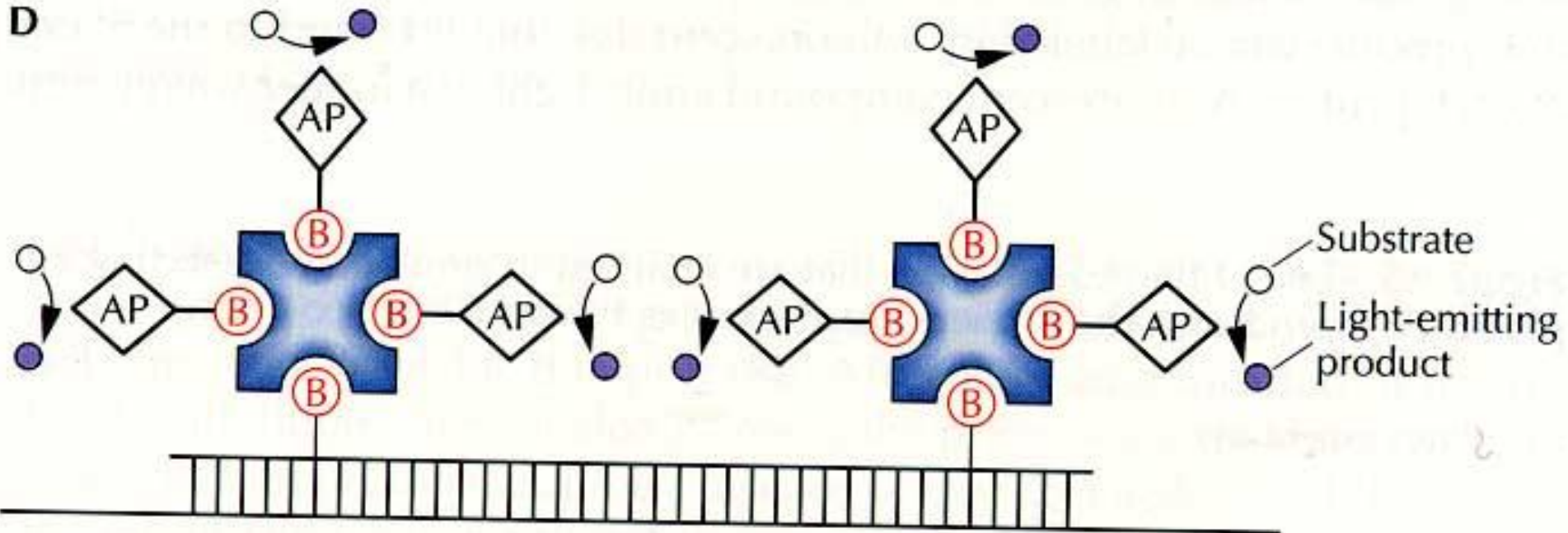
- DNA chip
- DNA array, DNA microarray



C



D

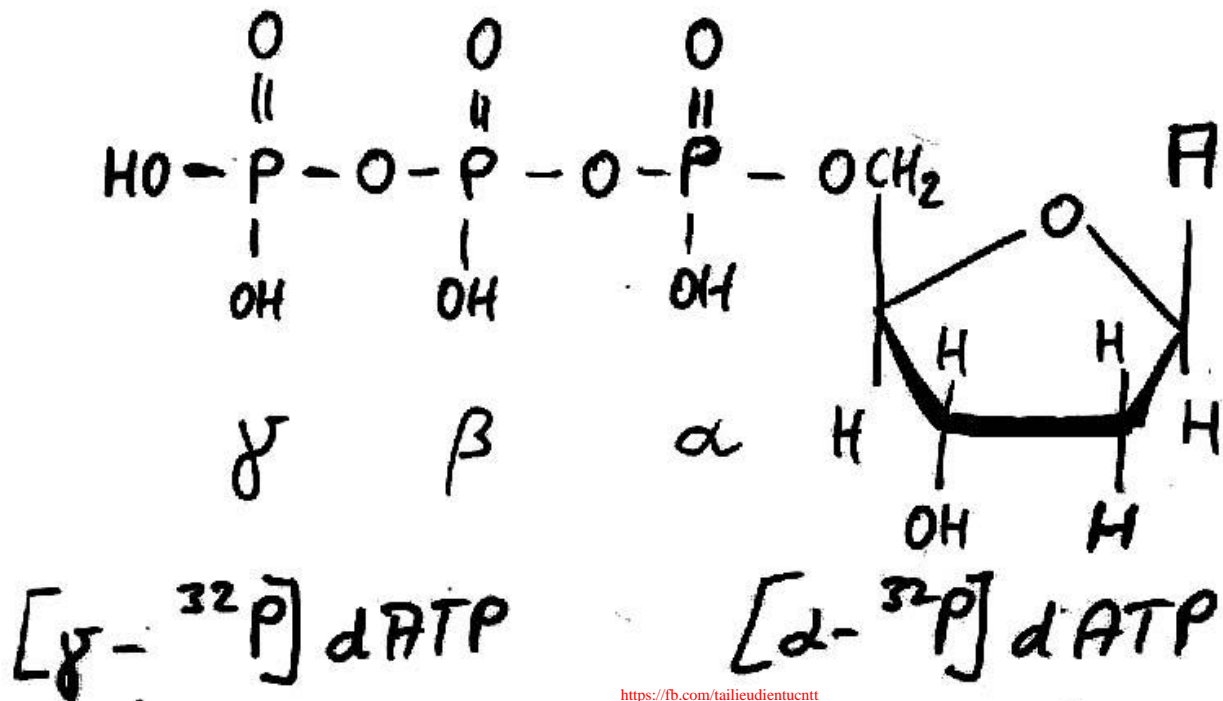
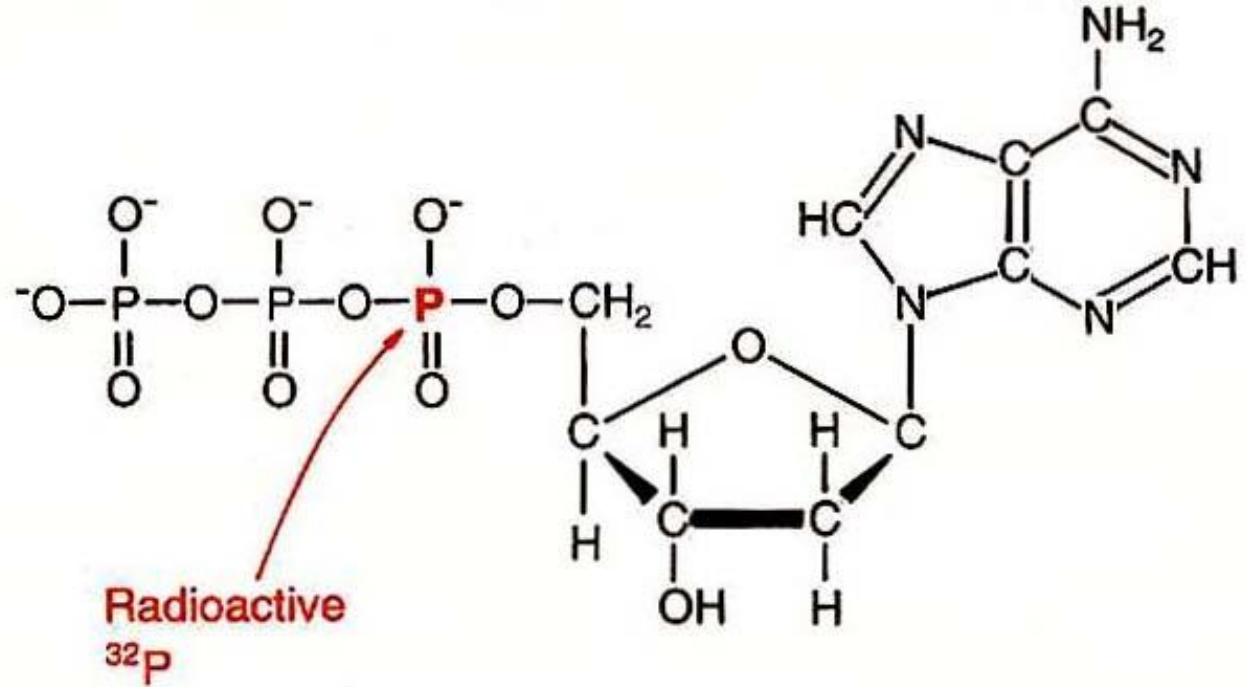


ĐÁNH DẤU VÀ PHÁT HIỆN MẪU DÒ

- Dùng phóng xạ ^{32}P , phim X quang
- Không dùng phóng xạ (dựa vào sự tạo màu hoặc phát quang)
 - + Đánh dấu gián tiếp bằng biotin (hoặc digoxigenin)
 - + Đánh dấu trực tiếp: mẫu dò được tạo phức hợp cộng hóa trị với enzyme (peroxidase)

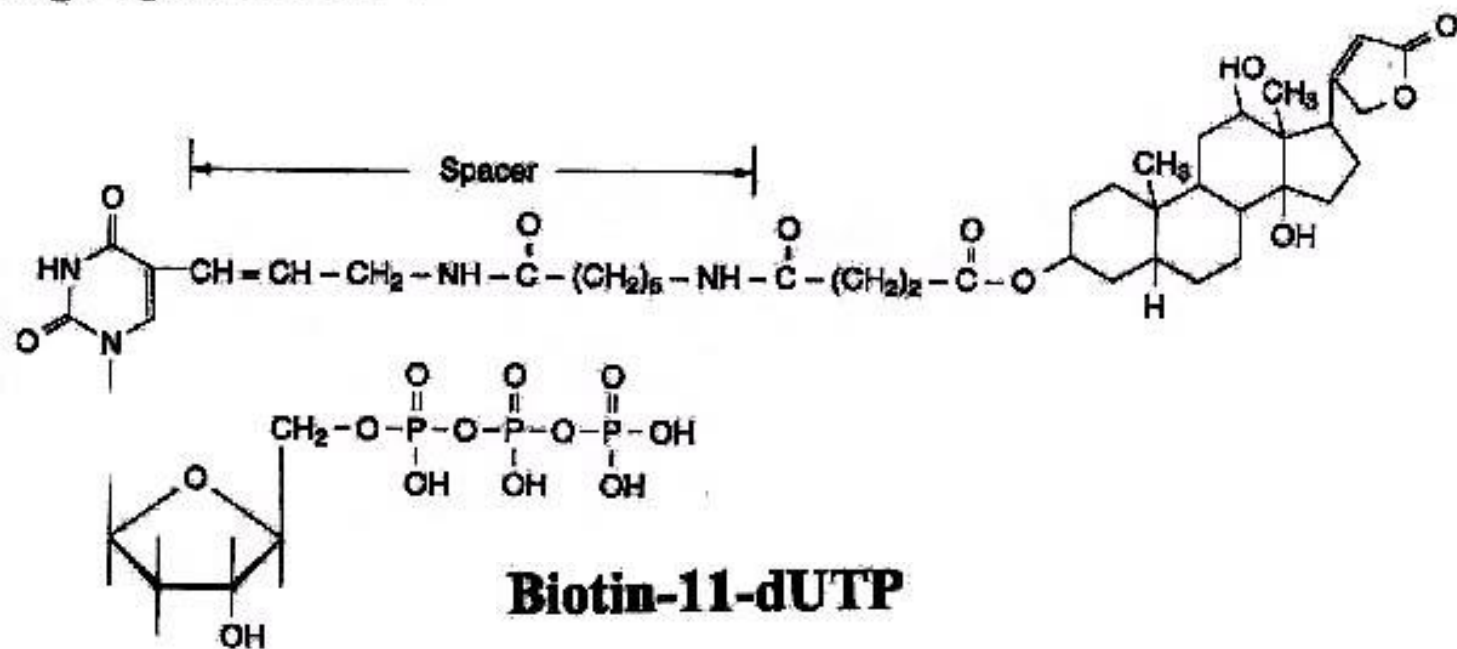
Đánh dấu DNA bằng dATP chứa đồng vị phóng xạ

- Đánh dấu tại các nick bằng DNA Pol I
- Đánh dấu hai đầu 3'OH bằng Klenow fragment

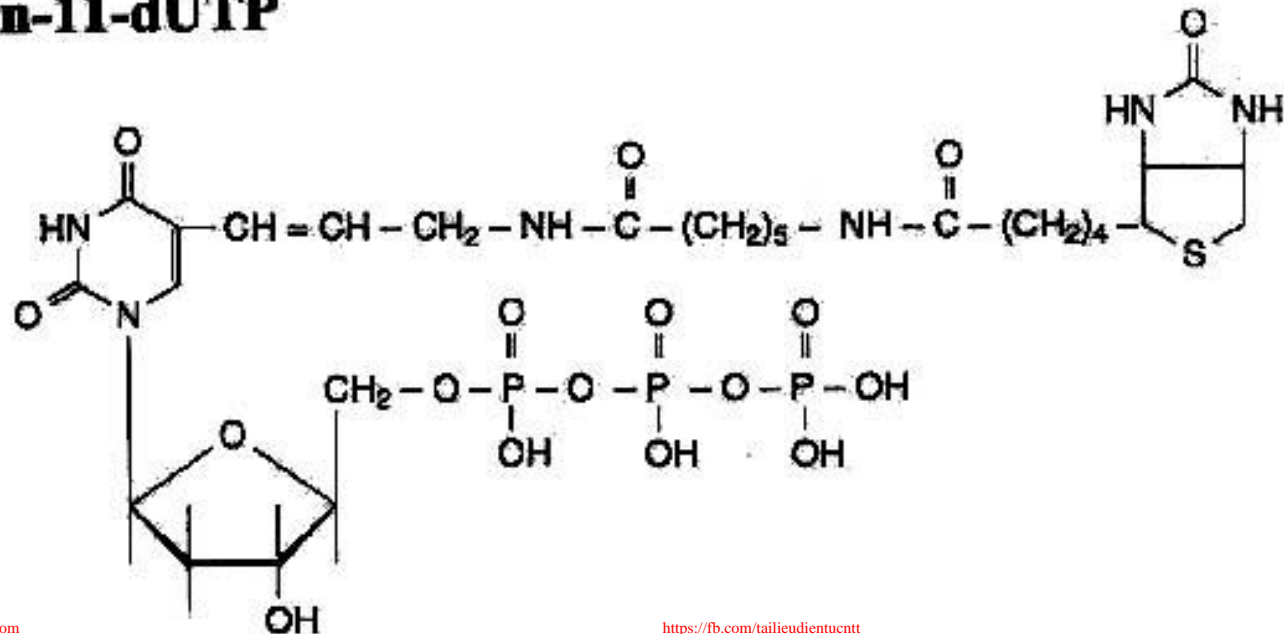


Đánh dấu không đồng vị

Digoxigenin-11-dUTP



Biotin-11-dUTP



ĐÁNH DẤU VÀ PHÁT HIỆN KHÔNG DÙNG PHÓNG XẠ

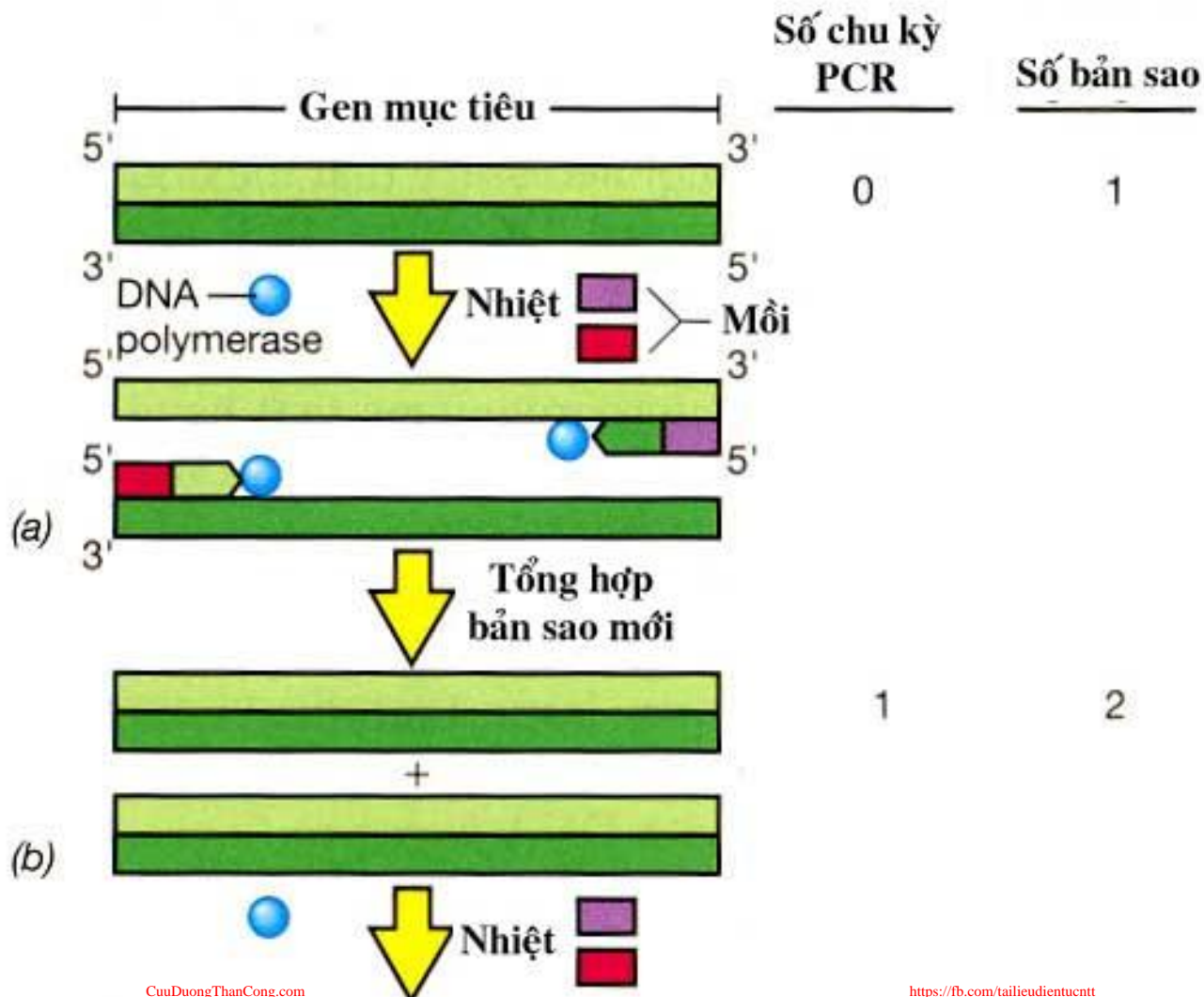
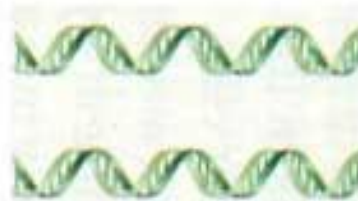
- Mẫu dò được đánh dấu bằng một hoặc vài nucleotide chứa biotin
- Bổ sung mẫu dò đã đánh dấu vào dung dịch lai chứa màng lai
- Bổ sung avidin hoặc streptavidin
- Bổ sung phức hợp biotin-enzyme (peroxidase, alkaline phosphatase)
- Bổ sung cơ chất sinh màu hoặc phát sáng của enzyme

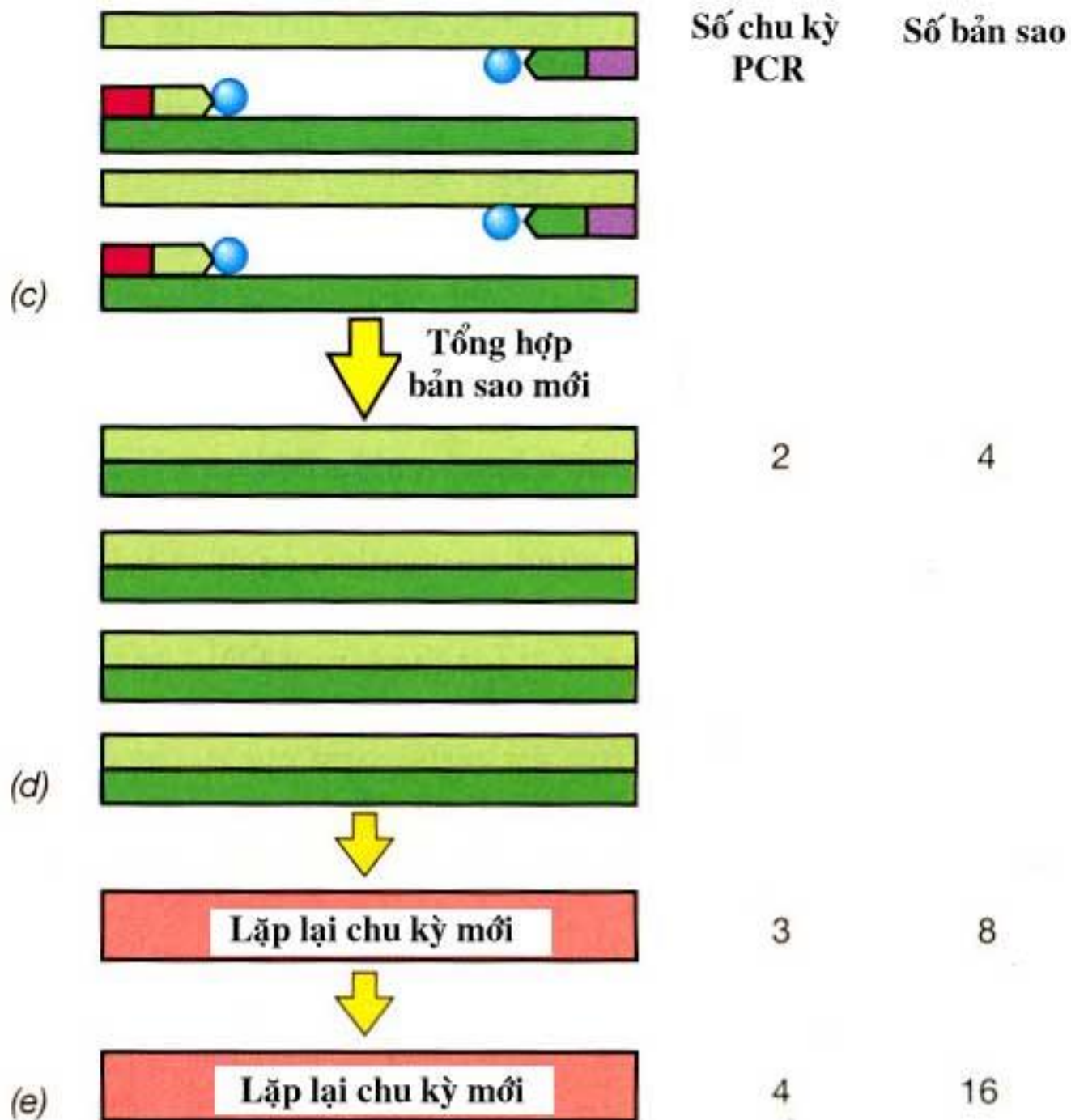
PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

- + Khuếch đại đoạn gen mục tiêu bằng cặp mồi chuyên biệt và DNA polymerase.
- + Gồm 20 - 30 chu kỳ ba bước
 - Biến tính DNA khuôn để tách mạch
 - Bắt cặp giữa mồi và trình tự bổ sung trên khuôn DNA
 - Kéo dài mồi và tổng hợp đoạn DNA bổ sung theo chiều 5'-3'
- + Phát hiện vạch khuếch đại bằng điện di trên gel agarose (AGE), ethyidium bromide và kích thước

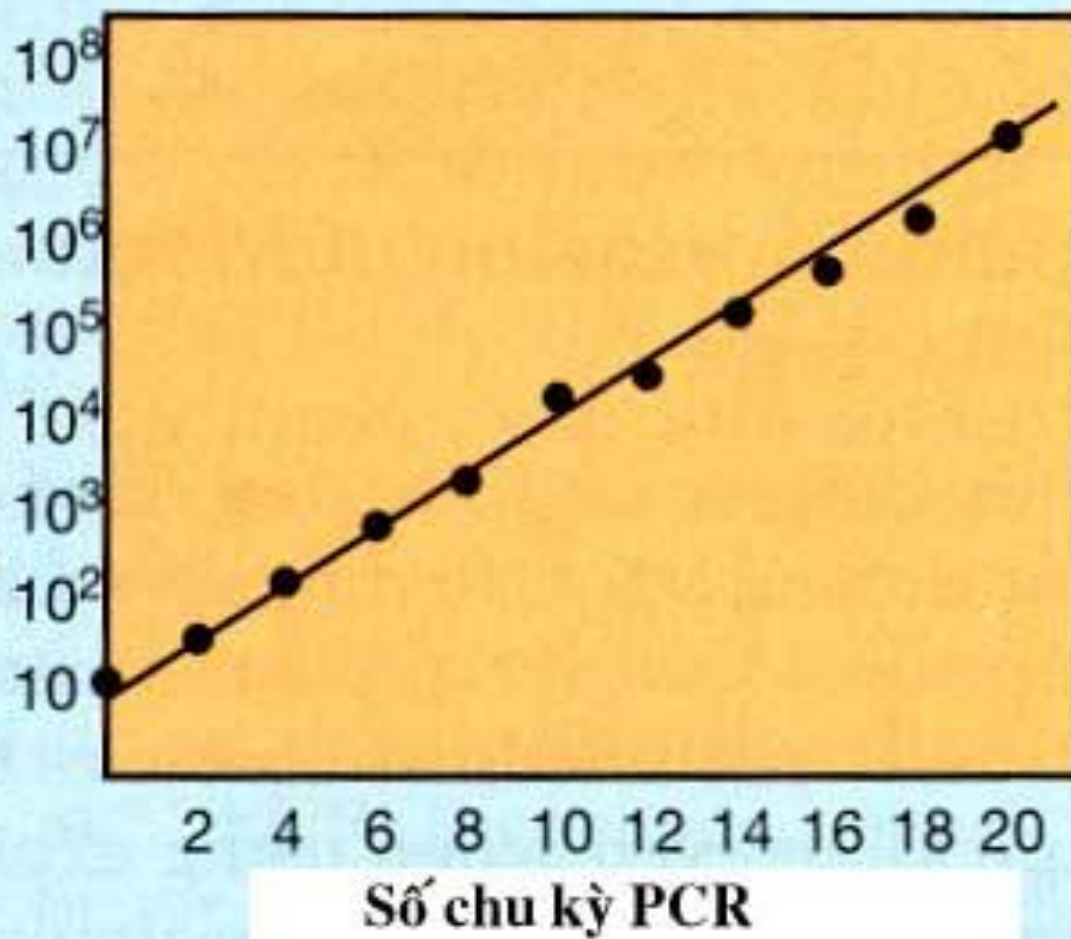


Vật liệu di truyền (ADN)

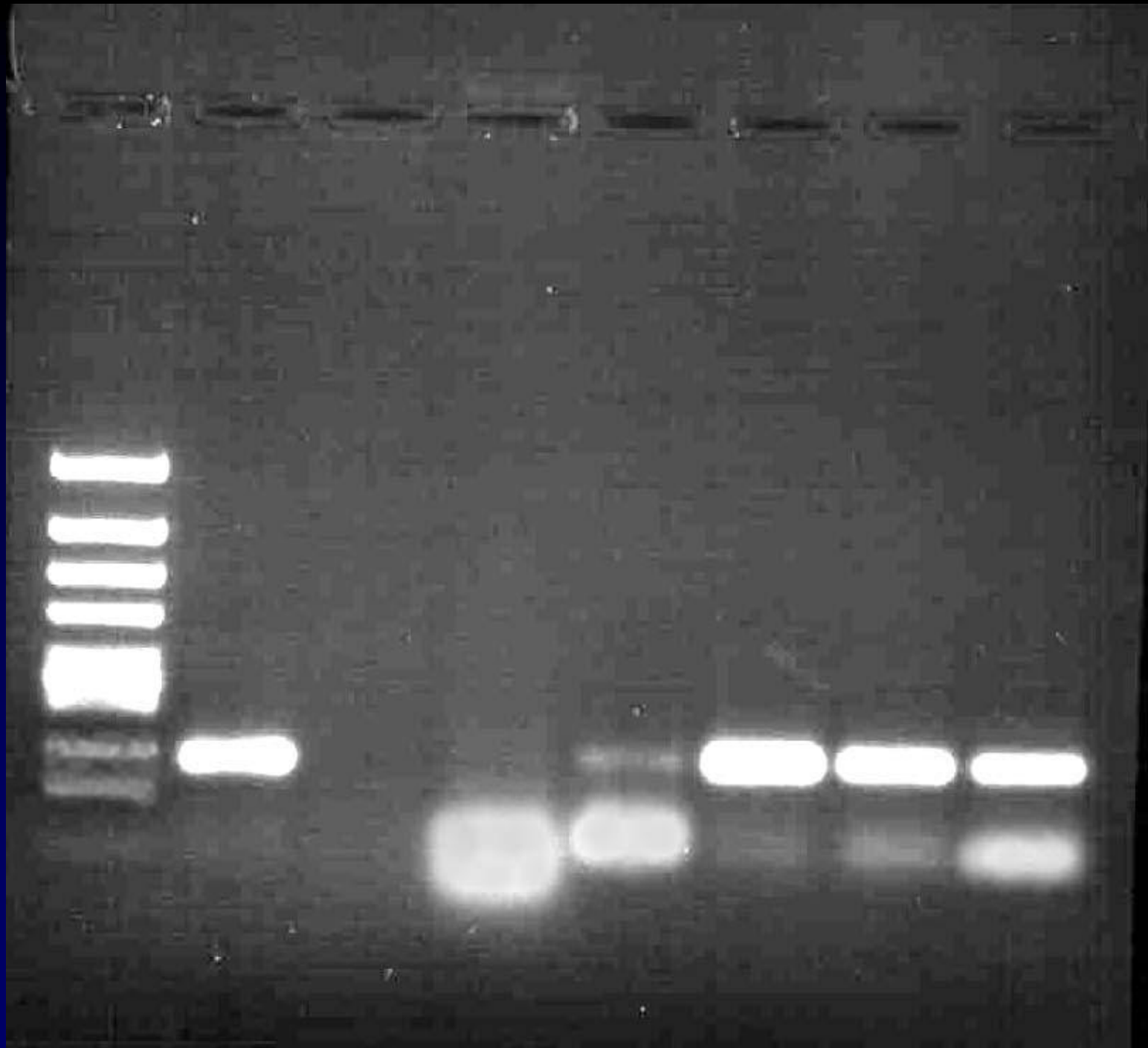




Số lượng
bản sao
được
khuếch đại



(f)



PCR BẰNG MỖI HUỲNH QUANG

- Mỗi được đánh dấu bằng nucleotide phát huỳnh quang
- Sản phẩm khuếch đại được phát hiện dựa vào độ di động điện di và huỳnh quang

Fluorescent dye

P1

DNA

P2

Fluorescent dye

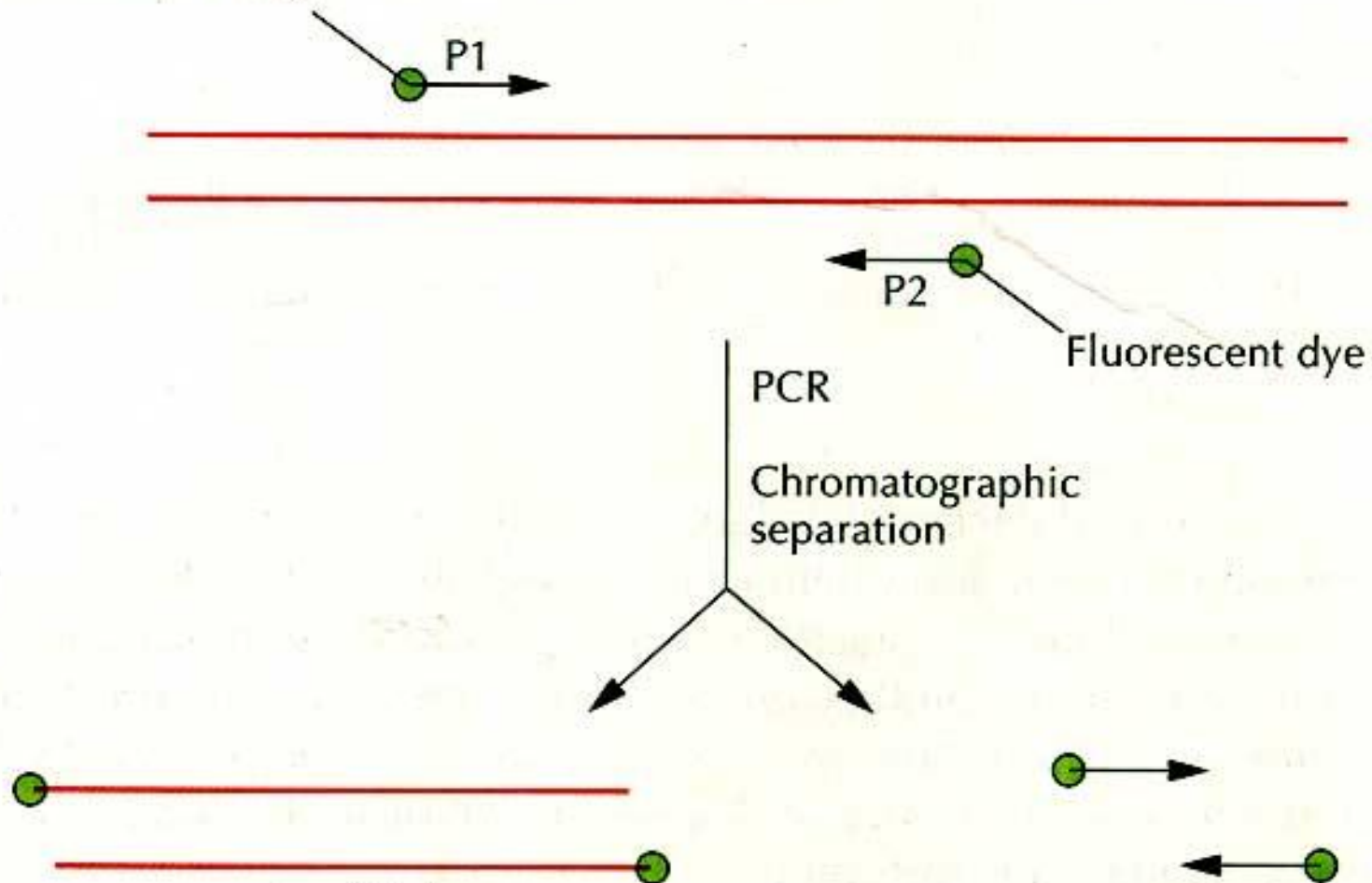
PCR

Chromatographic separation

Amplified product

Detection by fluorescence

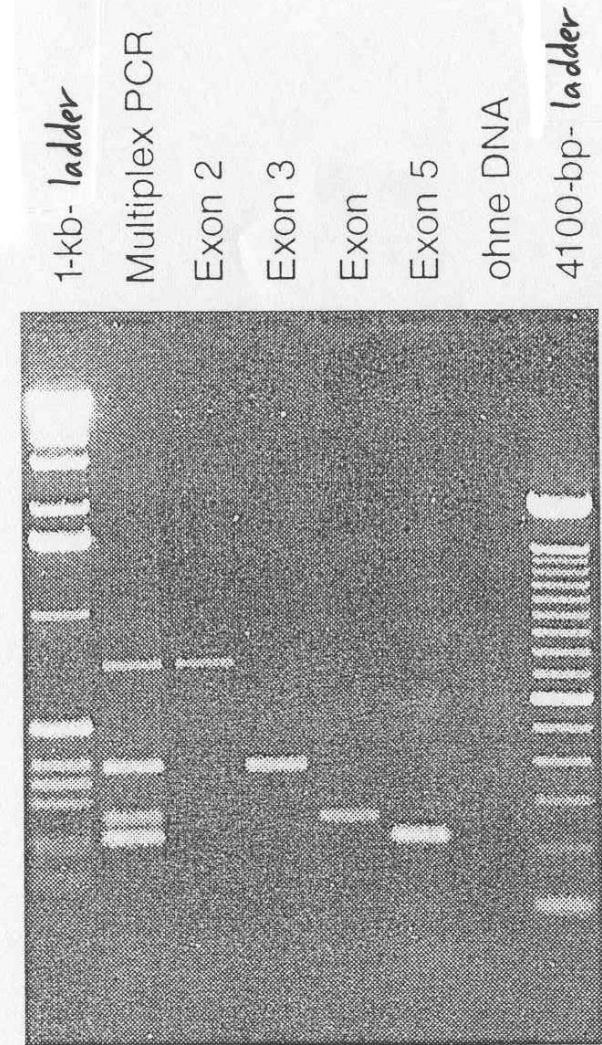
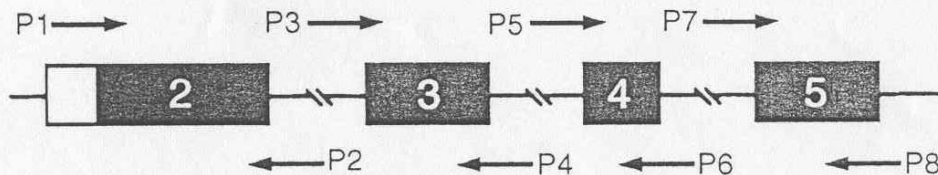
Primers



PCR ĐA CẶP MỒI (MULTIPLEX PCR)

- Sử dụng các cặp mồi chuyên biệt cho các gen mục tiêu khác nhau
- Cho phép khuếch đại đồng thời nhiều gen mục tiêu

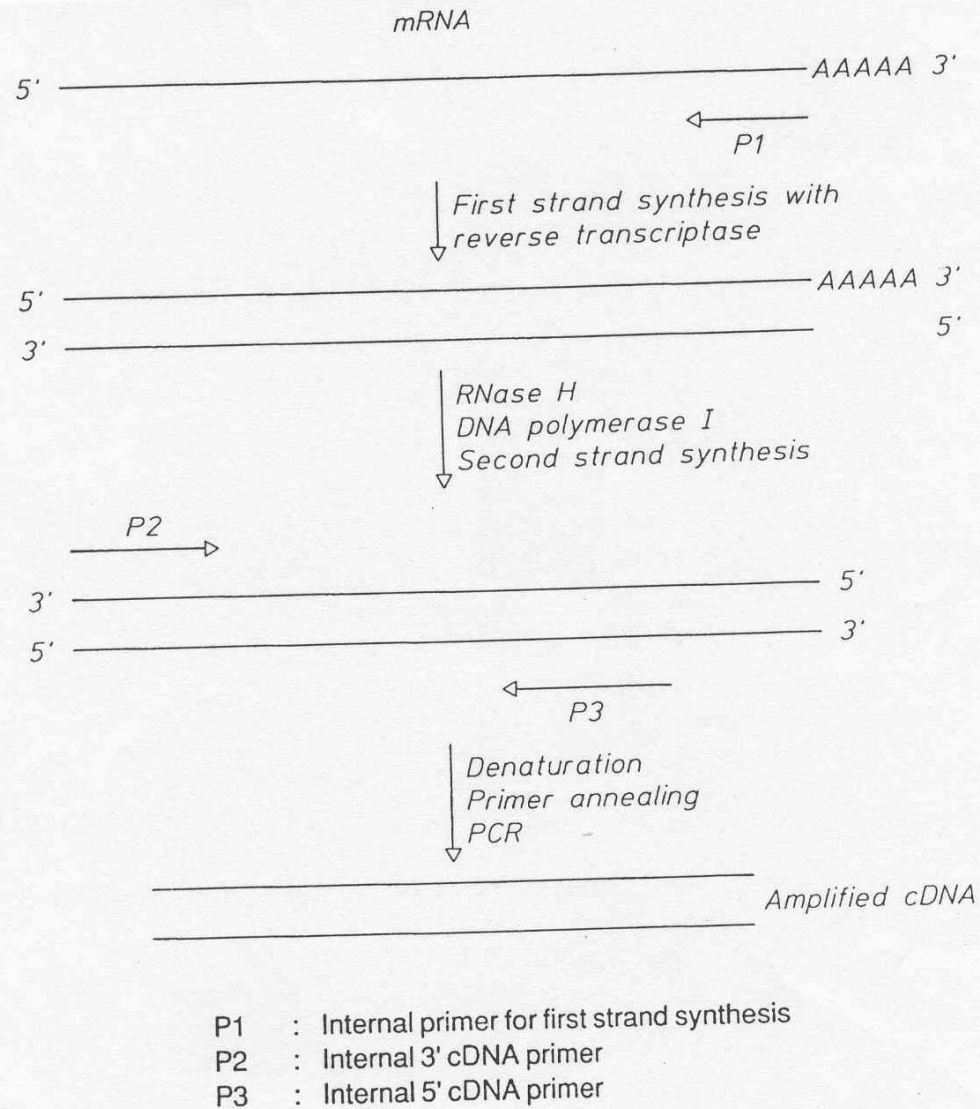
Multiplex PCR với 4 cặp mồi



PCR PHIÊN MÃ NGƯỢC (RT- PCR)

- Khuếch đại các gen mục tiêu ở dạng RNA (RNA virus, mRNA)
- Thực hiện phản ứng phiên mã ngược (reverse transcription: RNA → cDNA) trước phản ứng PCR

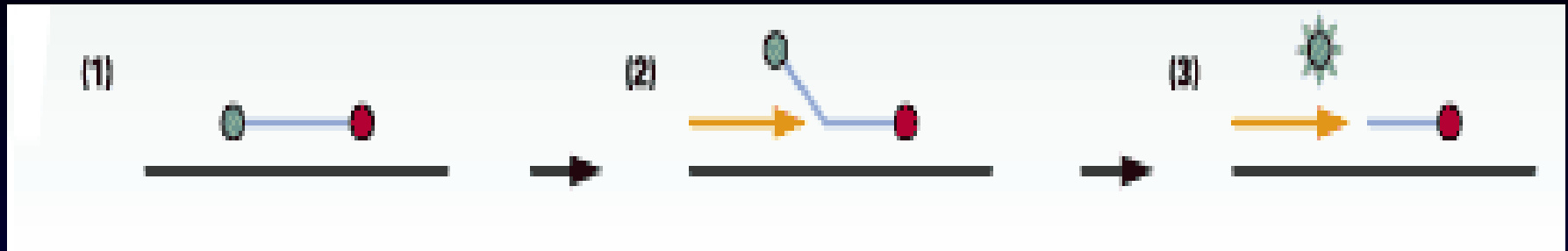
Reverse Transcription PCR



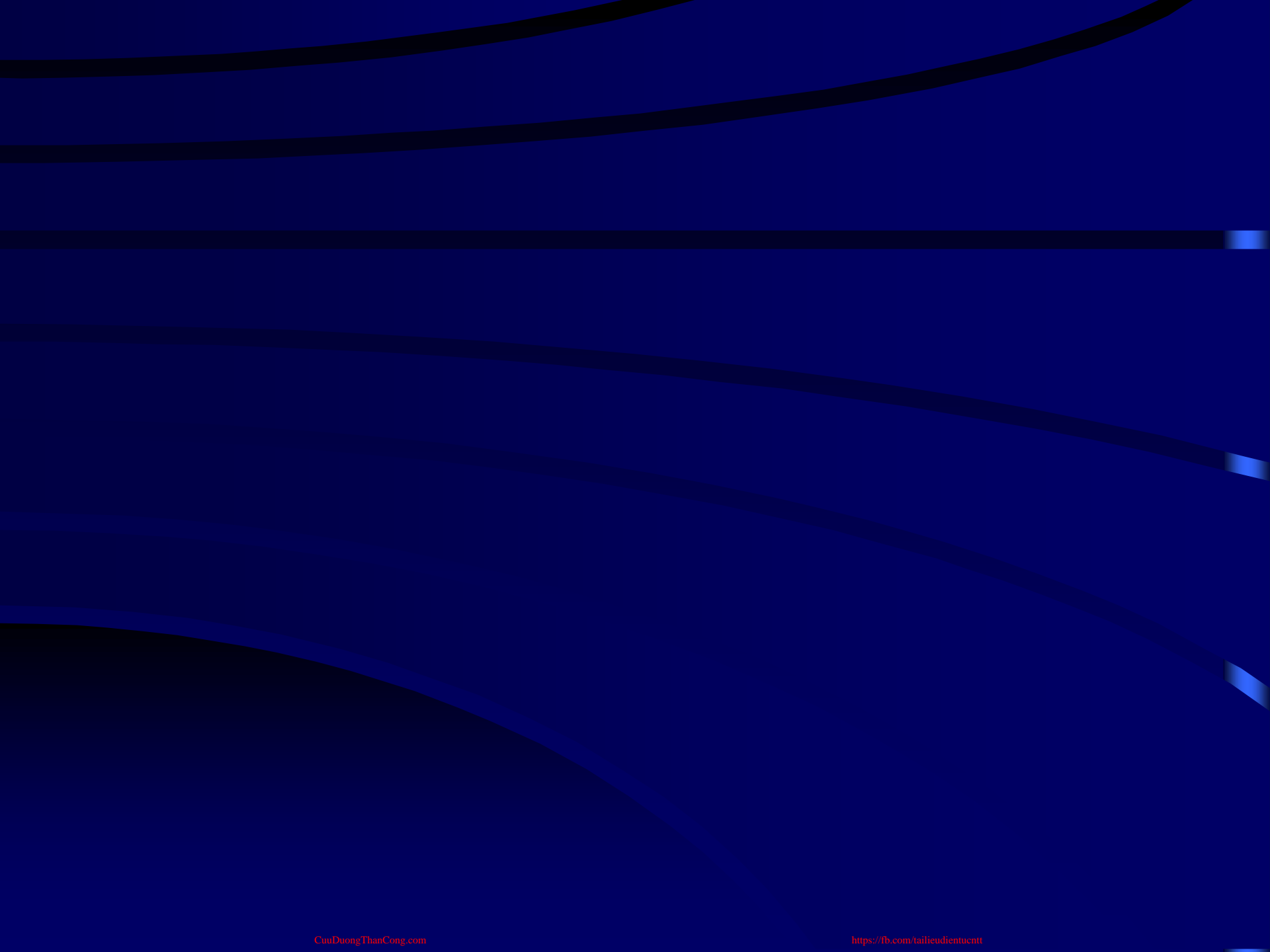
PCR THỰC THỜI (Real time PCR)

- Cho phép định lượng sản phẩm khuếch đại sau mỗi chu kỳ PCR dựa trên cường độ phát quang hoặc phát huỳnh quang
- Còn gọi là PCR định lượng
- Ba phương pháp để định lượng sản phẩm khuếch đại:
 - * TaqMan probes
 - * Molecular Beacons
 - * FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) probes

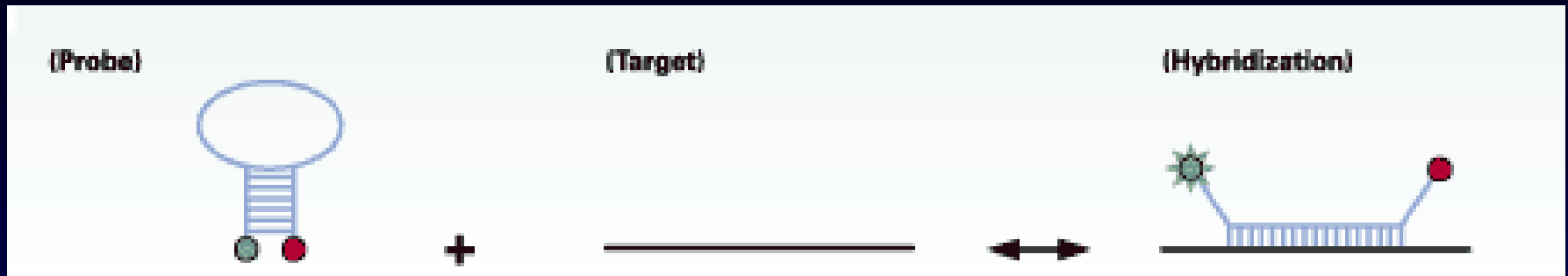
NGUYÊN TẮC TAQMAN PROBES



- Dùng mẫu dò chuyên biệt với gen mục tiêu có đầu 5' đánh dấu huỳnh quang và đầu 3' đánh dấu bằng chức ức chế huỳnh quang - quencher (1)
- Phản ứng PCR làm tách đầu 5' ra khỏi khuôn (2)
- Hoạt tính 5' exonuclease của Taq DNA polymerase sẽ thủy phân đoạn này phóng thích nucleotide đánh dấu và phát huỳnh quang (3) do không bị ức chế bởi quencher ở 3'
- Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với số mol phân tử sản phẩm khuếch đại



NGUYÊN TẮC MOLECULAR BEACON PROBES



- Mẫu dò được thiết kế tự bắt cặp ở hai đầu, mỗi đầu có đánh dấu huỳnh quang và quencher tương ứng
- Sản phẩm PCR sẽ bắt cặp với mẫu dò, làm tách huỳnh quang và quencher, giúp phát huỳnh quang
- Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với số phân tử sản phẩm PCR

NGUYÊN TẮC FRET

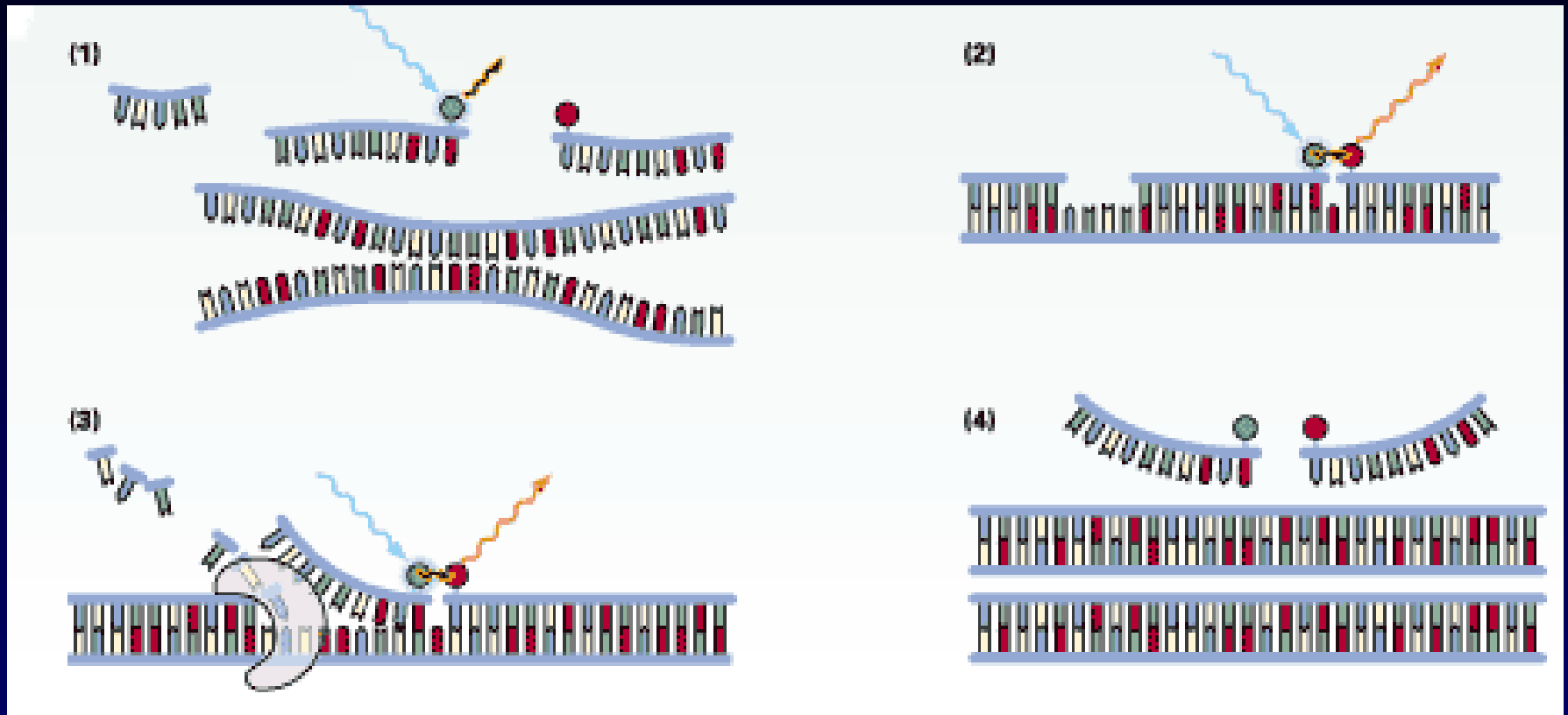
- FRET:

- + hai chất phát huỳnh quang với ánh sáng phát ra của (1) là ánh sáng kích thích của (2)
- + khi (1) và (2) đủ gần nhau thì việc kích thích (1) sẽ làm phát huỳnh quang của (2)

- Ứng dụng FRET trong Real time PCR:

- + Mẫu dò gồm hai đoạn nucleotide liên tiếp nhau, đoạn (1) được đánh dấu đầu 3' và đoạn (2) được đánh dấu 5'. Kích thích (1) sẽ phát huỳnh quang (2)
- + Sản phẩm PCR sẽ làm tách (1) và (2) khỏi khuôn. Khi đó kích thích (1) sẽ phát huỳnh quang (1)
- + Lượng sản phẩm PCR tỷ lệ với cường độ FRET tạo ra (do số lượng khuôn tăng bởi PCR)

NGUYÊN TẮC FRET



CÁC DẠNG PCR KHÁC

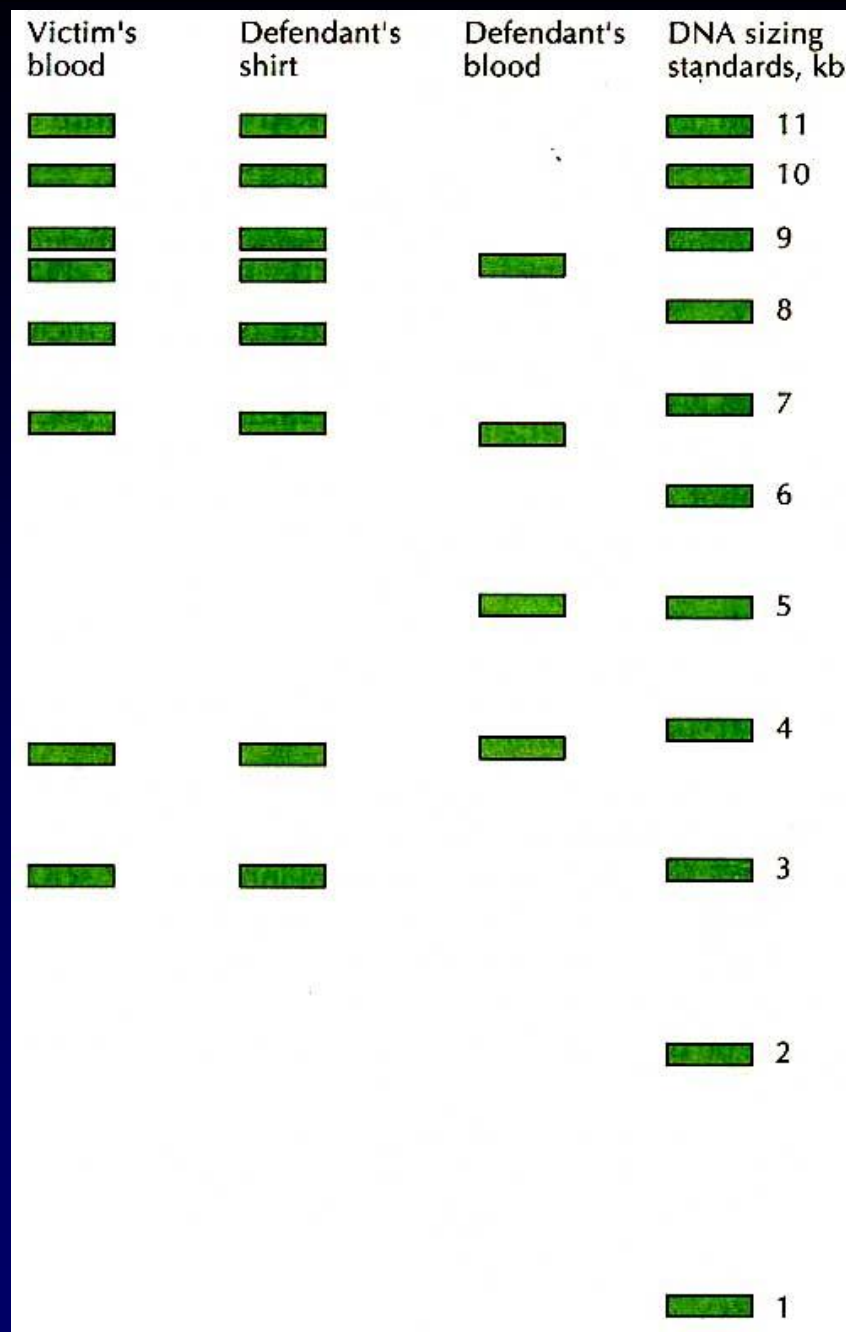
DẤU VÂN TAY (DNA FINGER-PRINTING)

+ Dùng trong xét nghiệm pháp y

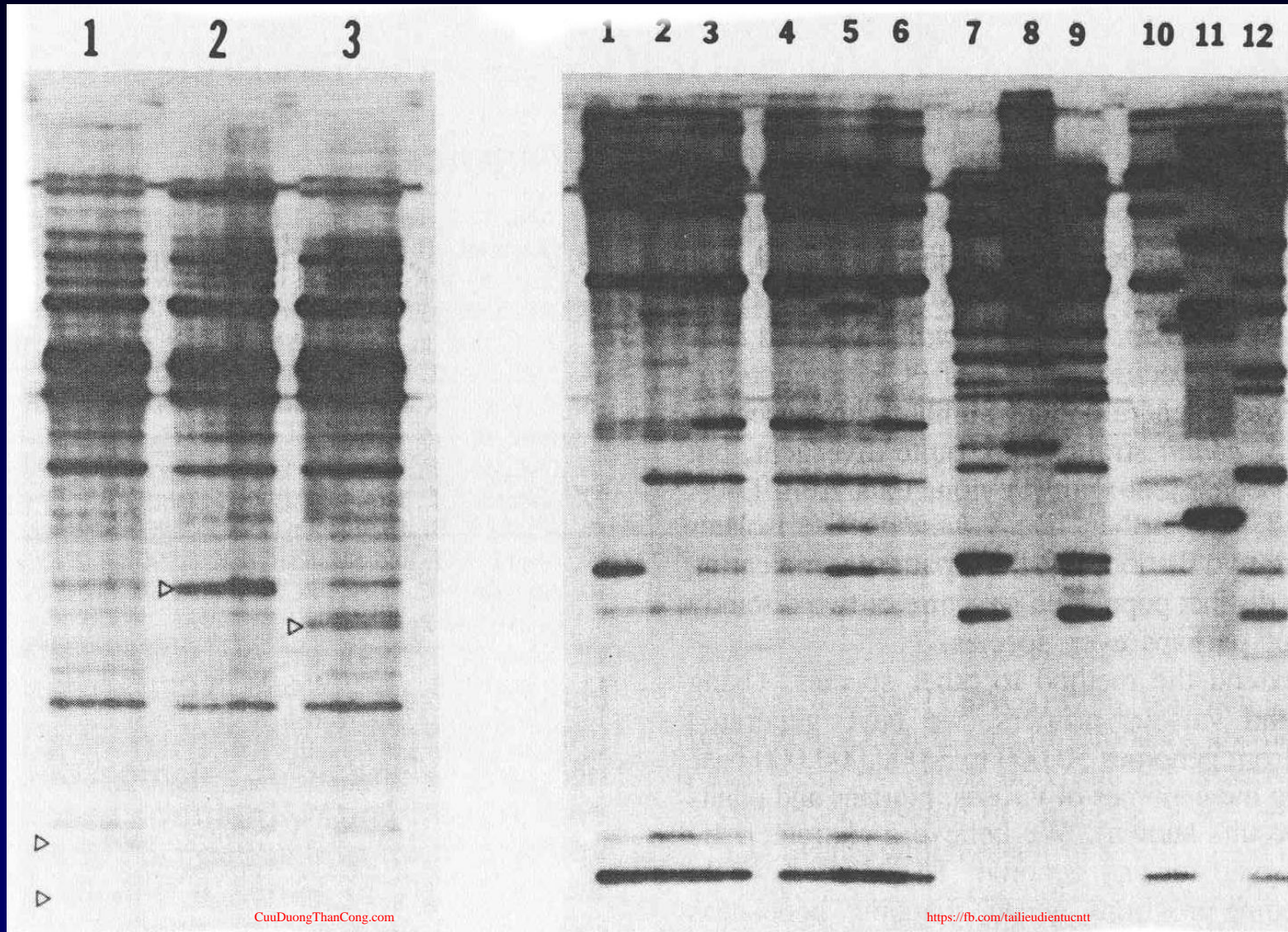
+ Qui trình

- Khuếch đại DNA bằng PCR**
- Cắt DNA bằng một enzyme cắt giới hạn**
- Phân đoạn các đoạn cắt bằng AGE**
- Chuyển thẩm các vạch DNA sang màng lai**
- Lai với một bộ 4 - 5 các trình tự minisattelite đánh dấu phóng xạ**
- Phát hiện vạch lai bằng phim X quang**

+ Phân tích minisattelite dùng để phân biệt cá thể (tần suất trùng lặp các bộ vạch lai là 10^{-5} - 10^{-8}).



VÂN TAY DNA CỦA CÁC CHỦNG LÚA VÀ *Streptococcus*



RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

- + RAPD: các đoạn DNA đa hình khuếch đại ngẫu nhiên**
- + Dùng một bộ mồi có trình tự tùy ý để khuếch đại ngẫu nhiên các đoạn DNA trên DNA bộ gen**
- + Mỗi một bộ primer nhất định sẽ tạo ra một tập hợp các đoạn DNA khuếch đại riêng, đặc trưng cho DNA bộ gen của mỗi loài hoặc nòi, chủng.**

QUI TRÌNH RAPD

- Tách DNA bộ gen
- Thực hiện PCR bằng một môi ngẫu nhiên trong bộ môi
- Khi có sự bắt cặp của một môi ở hai đầu của 1 đoạn DNA thì đoạn này sẽ được khuếch đại
- Điện di AGE, nhuộm bằng ethidium bromide
- Ghi nhận bộ các vạch khuếch đại, so sánh với đối chứng
- Thực hiện phản ứng PCR với các môi ngẫu nhiên khác cho đến khi có sự khác biệt

MỖI CÓ TRÌNH TỰ NGẪU NHIÊN Ở RAPD

(a) 5'ACTGTGTCAATC3' RAPD-Primer

(b) 5'ACTGTGTCAATC3'
3'TCTGGTACAATTAGGACAGTCATGATCGT→5'

5'ACTGTGTCAATC3'
3'GGCGACATGGTTAGAAGCACCGTAGTCGA→5'

5'ACTGTGTCAATC3'
3'AGAACCACAGTTAGCGCGTACGTAAAGCT→5'

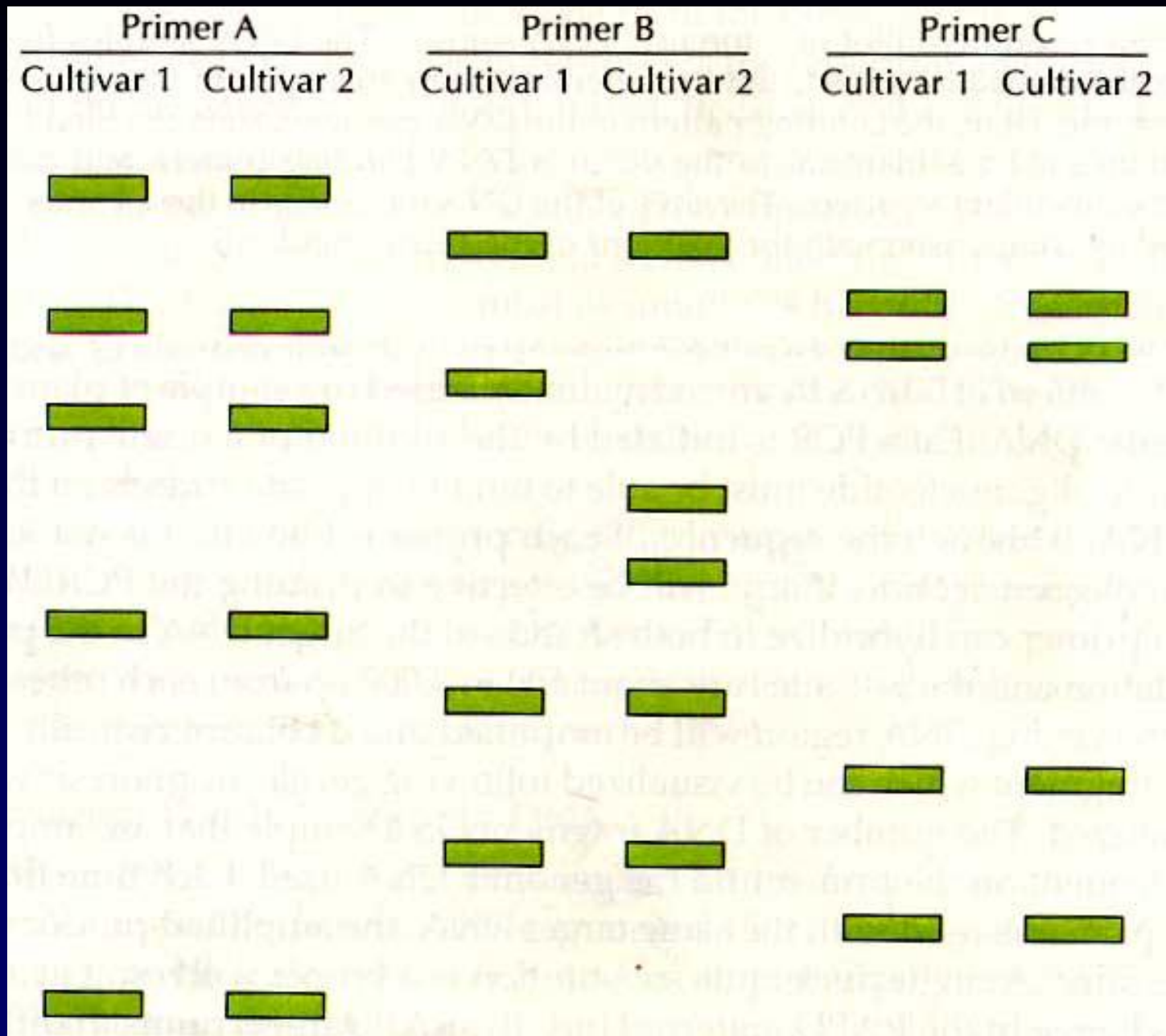
5'ACTGTGTCAATC3'
3'CATGACGTCATTACCACAGCCCCGTTAAT→5'

(c) 5'ACTGTGTCAATCCTGTCAGTACTAGCA→3'
3'TGACACAGTTAGGACAGTCATGATCGT→5'

5'ACTGTGTCAATCTTCGTGGCATCAGCT→3'
3'TGACACAGTTAGAAGCACCGTAGTCGA→5'

5'ACTGTGTCAATCGCGCATGCATTTTCA→3'
3'TGACACAGTTAGCGCGTACGTAAAGCT→5'

5'ACTGTGTCAATCGTGTCGGGGCAATTA→3'
3'TGACACAGTTAGCACAGCCCCGTTAAT→5'



MỘT SỐ ƯU ĐIỂM CỦA RAPD

- Không phụ thuộc vào môi
- Không cần ngân hàng gen, không lai, không cần đánh dấu đồng vị phóng xạ
- Dễ dàng tự động hóa
- Phân biệt ở mức dưới loài

CÁC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA KHÁC

- + Phân tích đoạn DNA (DNA fragment analysis): tìm dấu hiệu phân tử – marker phân tử - (kiểu gen) thay cho dấu hiệu hình thái (kiểu hình)
- + Dấu hiệu đa dạng cao, đặc trưng, dùng để nhận diện cá thể, quần thể, để nghiên cứu di truyền
- + SSCP: single strand conformation polymorphism
- + RFLP: restricted fragment length polymorphism
- + AFLP: amplified fragment length polymorphism
- + STR: simple tandem repeat, microsatellite
- + SNP: single nucleotide polymorphism

CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ (MOLECULAR DIAGNOSTICS)

- 1. CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH (IMMUNO DIAGNOSTICS)**
- 2. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG (MONOCLONAL ANTIBODY)**
- 3. CHẨN ĐOÁN BẰNG DNA (DNA DIAGNOSTICS SYSTEMS)**
- 4. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CÁC BỆNH DI TRUYỀN (MOLECULAR DIAGNOSIS OF GENETIC DISEASE)**

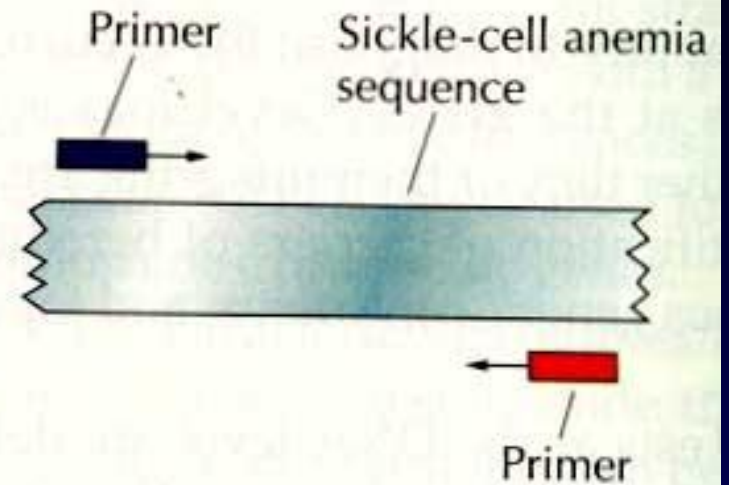
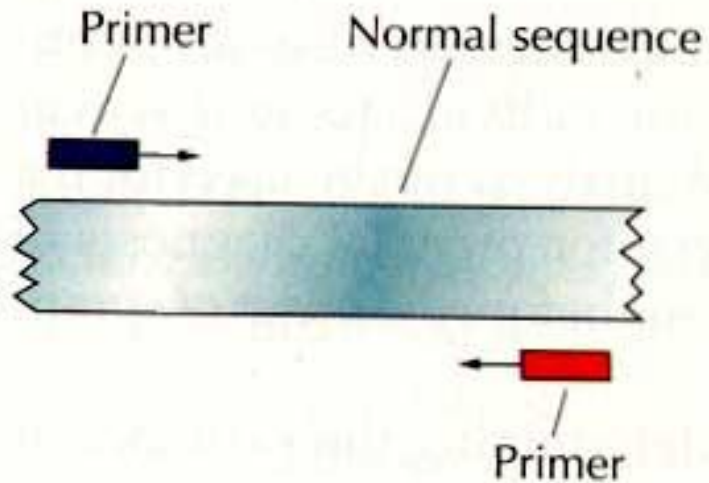
CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CÁC BỆNH DI TRUYỀN

- + Xét nghiệm DNA nhằm tìm các đột biến liên quan đến bệnh di truyền. Còn gọi là xác định kiểu gen (genotyping).
- + Ví dụ bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm
 - Do đột biến thay đổi một base làm Val → Glu trên sợi β .
 - Cá thể đồng hợp tử đột biến (S/S) bị bệnh, các trường hợp khác A/A, A/S không bệnh.
- + DNA bình thường chứa trình tự nhận biết của *CvnI* là CCTG**A**GG, dạng đột biến là CCTG**T**GG.

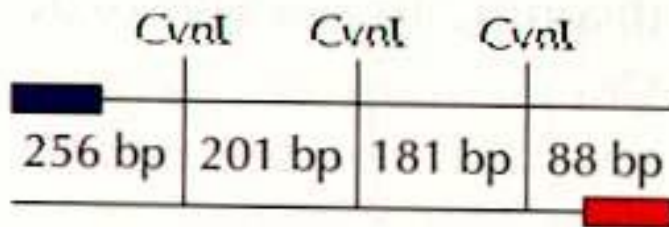
QUI TRÌNH GENOTYPING ĐỘT BIẾN GÂY BỆNH HỒNG CẦU LƯỖI LIÊM

- Tạo một cặp môi tương ứng với trình tự lân cận ở hai đầu của vị trí *CvnI* trên DNA
- Thực hiện phản ứng PCR
- Cắt sản phẩm khuếch đại bằng *CvnI*
- Điện di AGE để phát hiện các vạch DNA
- Dạng bình thường có trình tự nhận biết của *CvnI* sẽ cho bộ các vạch khác với dạng đột biến

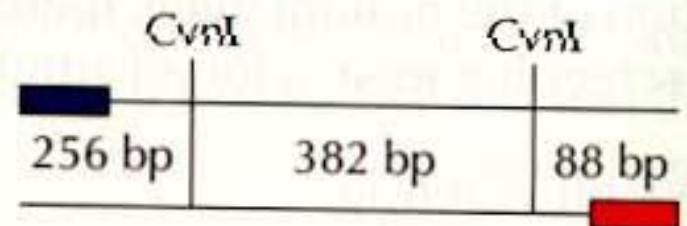
A





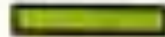









B Amplified normal sequence



Amplified sickle-cell anemia sequence



C

Size (bp)	Genotype		
	AA	AS	SS
382			
256			
201			
181			
88			

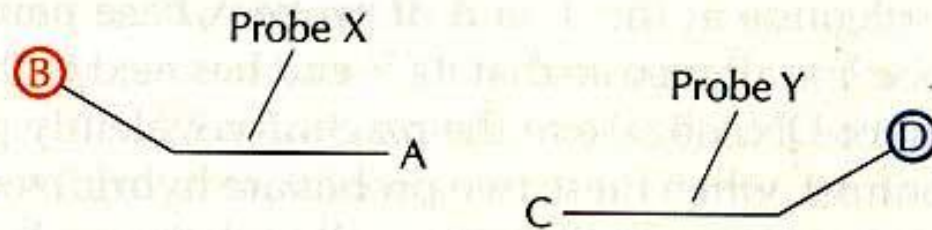
PCR/OLA (Oligonucleotide Ligation Assay)

- + Kết hợp giữa khuếch đại bản sao DNA bằng PCR với lai bằng hai mẫu dò là đoạn nucleotide ngắn (20 nucleotide ở hai phía của base đột biến)
- + Đột biến được phát hiện do không có sự bắt cặp tương ứng tại base đột biến và không thực hiện được phản ứng nối hai mẫu dò
- + Qui trình nhanh, nhạy, chuyên biệt cao, có thể tự động hóa (xét nghiệm 1.200 mẫu/ngày).

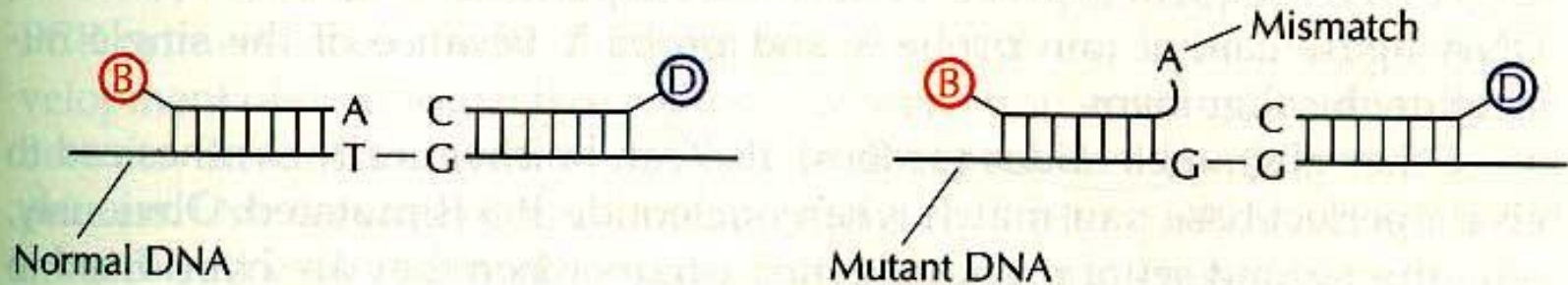
QUI TRÌNH PCR/OLA

- + Khuếch đại DNA chứa base đột biến bằng PCR
- + Bổ sung hai mẫu dò:
 - X được đánh dấu bằng biotin ở đầu 5' có đầu 3' bắt cặp với base bình thường
 - Y bắt đầu bằng base tiếp theo và có đầu 3' đánh dấu bằng digoxigenin
- + Thực hiện phản ứng lai và phản ứng ligase
- + Cho hỗn hợp phản ứng vào đĩa có đáy cố định streptavidin, thực hiện phản ứng màu dựa trên digoxigenin:
 - có màu: DNA bình thường
 - không màu: DNA bị đột biến

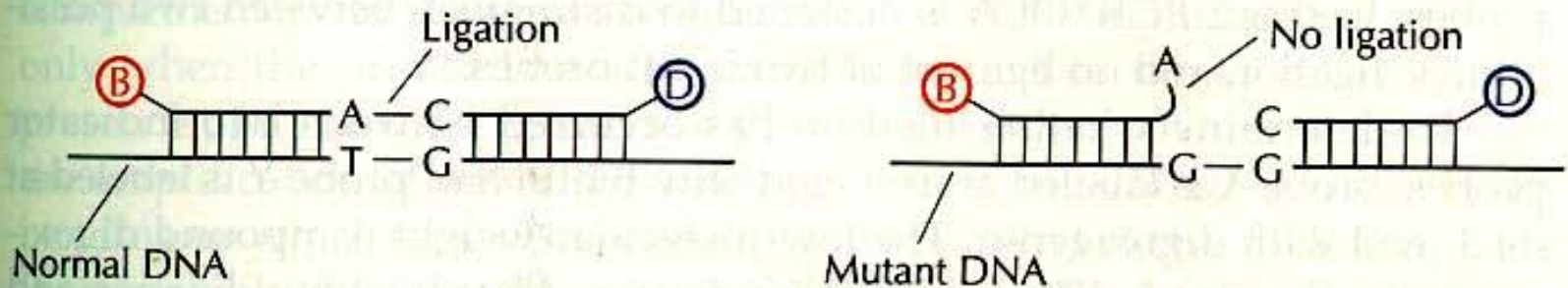
A Synthesize a pair of oligonucleotide probes



B Hybridize probes to PCR-amplified DNA

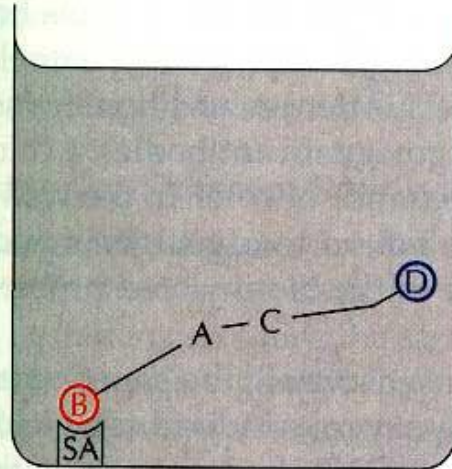


C Add ligase to hybridized DNA

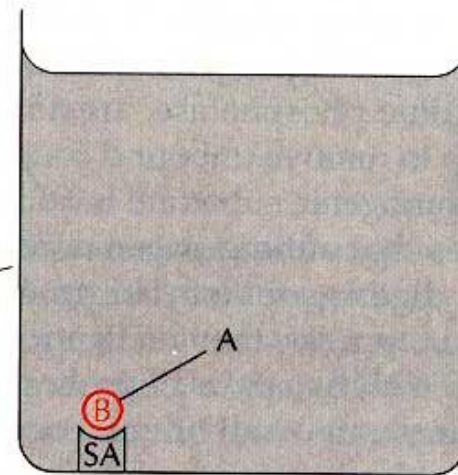


D Bind probes to streptavidin; wash

Results with normal DNA



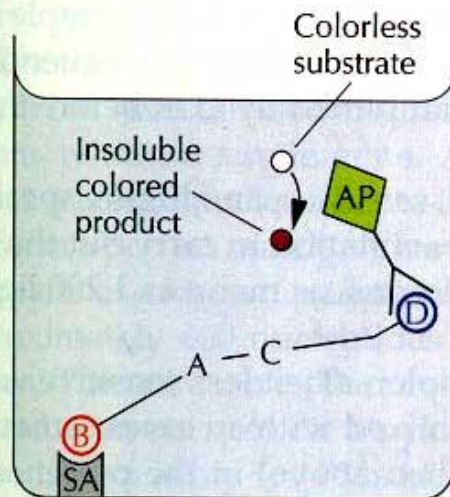
Results with mutant DNA



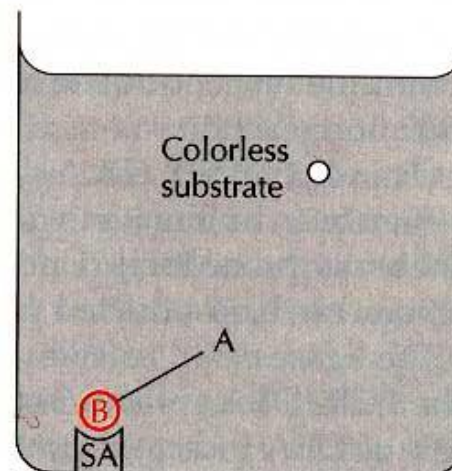
Well

E Add antidigoxigenin antibody-alkaline phosphatase conjugate; wash; add substrate

Results with normal DNA



Results with mutant DNA



PCR VỚI CÁC MÔI ĐÁNH DẤU

HUỖNH QUANG

- + Phản ứng PCR được thực hiện với ba môi khuếch đại vùng gen có base đột biến
- + Môi 1 tương ứng với đầu đoạn DNA bình thường được đánh dấu bằng rhodamine phát huỳnh quang đỏ
- + Môi 2 là môi ngược tương ứng đầu kia của đoạn DNA cần khuếch đại
- + Môi 3 tương đương với môi 1 nhưng có base bổ sung với base đột biến, được đánh dấu bằng fluorescein phát huỳnh quang lục

PCR VỚI CÁC MÔI ĐÁNH DẤU

HUỖNH QUANG

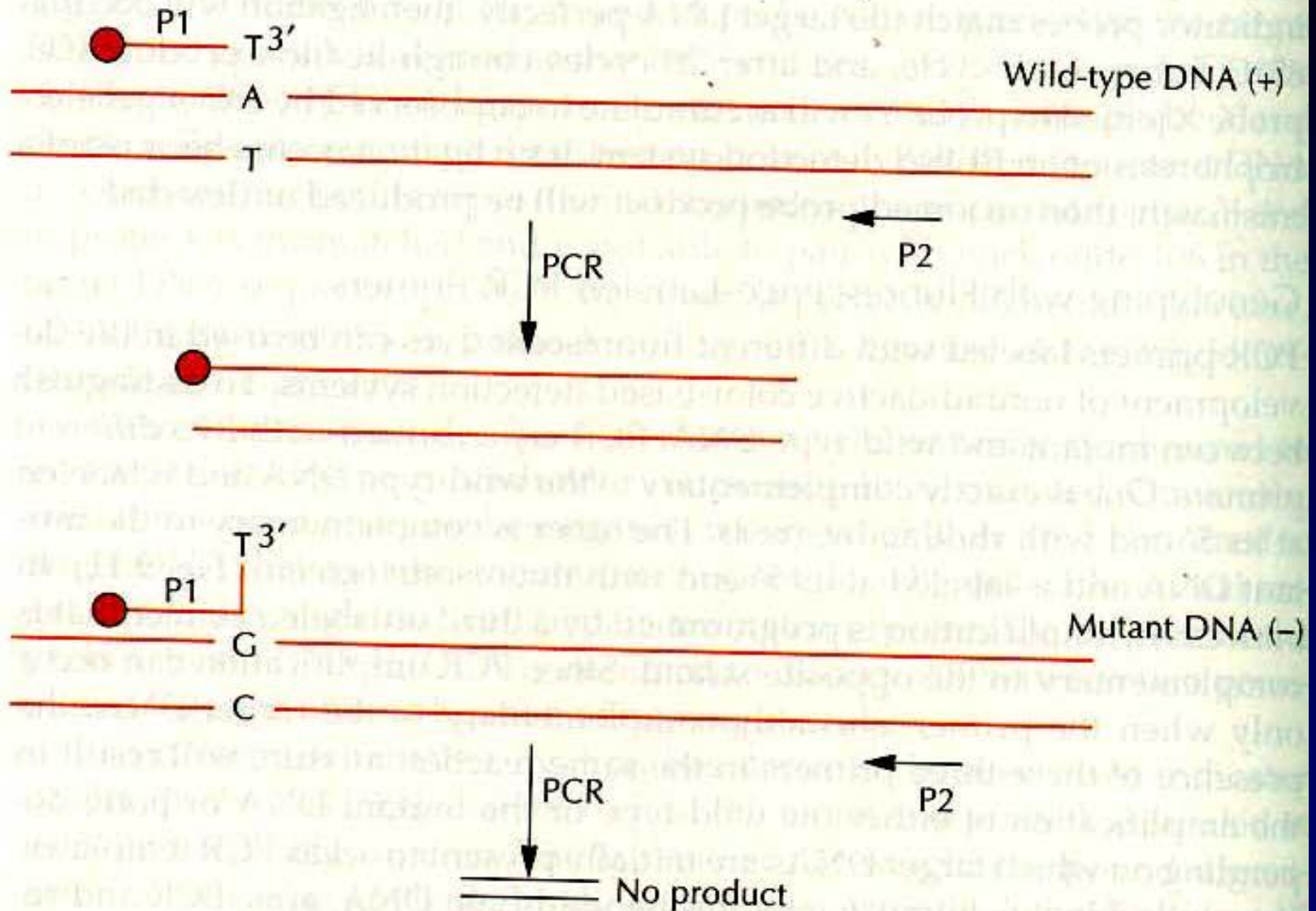
+ Tùy khuôn là DNA có đột biến hay không mà phản ứng PCR sẽ được tiến hành cho sản phẩm khuếch đại từ cặp môi 1-3 hay 2-3 hay (1+2)-3 và cho màu khác nhau như sau:

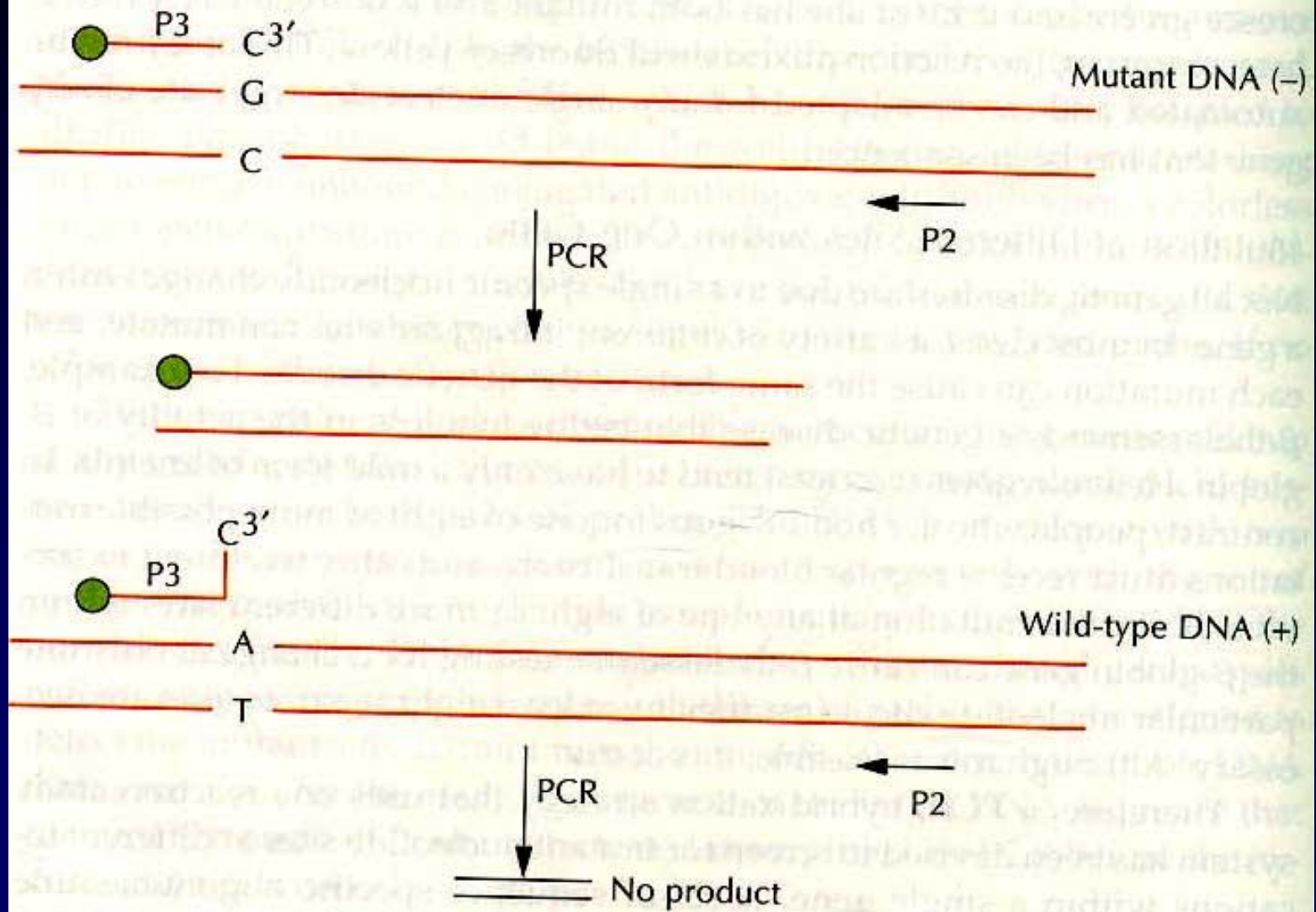
- Cá thể bình thường đồng hợp tử: vạch khuếch đại phát huỳnh quang đỏ

- Cá thể bình thường dị hợp tử: vạch khuếch đại phát huỳnh quang vàng (màu phối hợp của đỏ và lục)

- Cá thể bệnh đồng hợp tử: vạch khuếch đại phát huỳnh quang lục

A



B

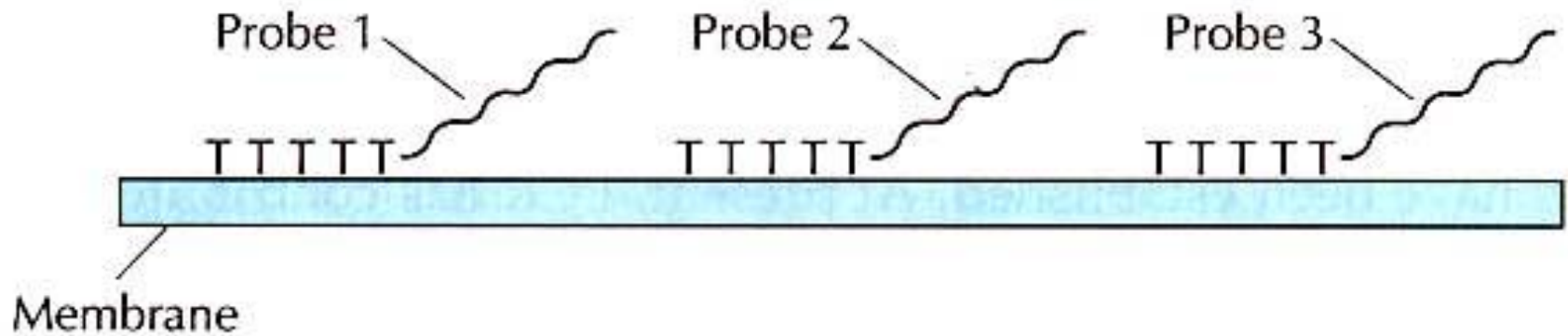
PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN TẠI NHIỀU VỊ TRÍ BÊN TRONG MỘT GEN

- + Nhiều bệnh di truyền do mất chức năng của protein gây ra bởi đột biến tại các vị trí khác nhau trên gen
- + Ví dụ β -thalassemia: β -globulin mất hoạt tính do đồng hợp tử đột biến tại một trong tám vị trí bên trong gen.

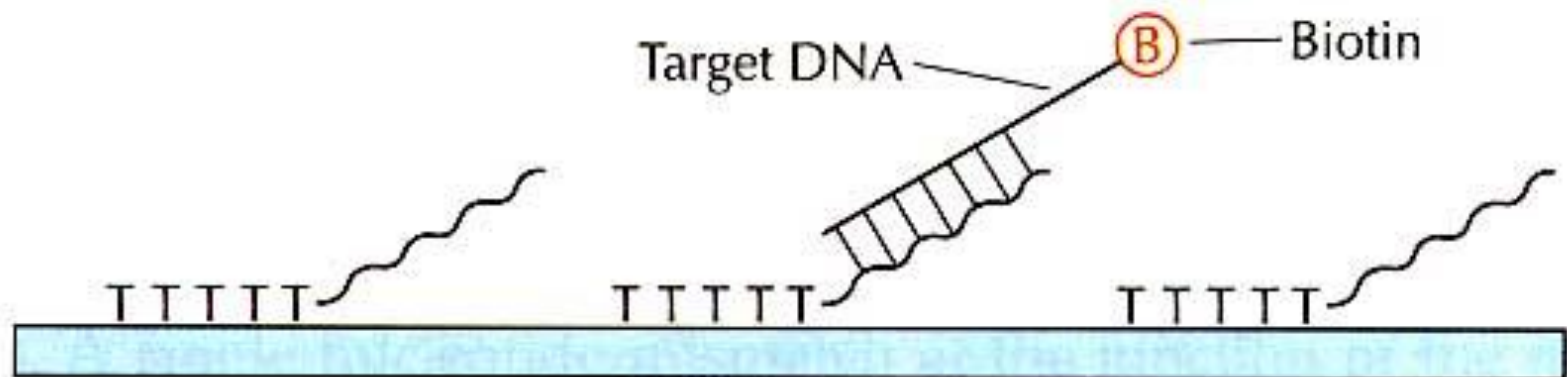
NGUYÊN TẮC PHÁT HIỆN

- Kết hợp PCR với lai tại tám vị trí có thể đột biến:
- Tổng hợp 8 mẫu dò chứa base có thể xảy ra đột biến, đầu 3' gắn đuôi polyT để cố định lên màng lai.
- Khuếch đại đồng thời 8 đoạn DNA chứa base có thể xảy ra đột biến bằng 8 cặp mồi trong đó mỗi đầu 5' được đánh dấu bằng biotin.
- Lai các đoạn PCR với mẫu dò trên màng
- Bổ sung phức hợp streptavidin-alkalinephosphatase
- Rửa màng và bổ sung cơ chất tạo màu
- Tìm vị trí không có màu: đoạn khuếch đại là dạng đột biến nên không có sự bắt cặp bổ sung hoàn toàn với mẫu dò
- Có thể phát hiện nhiều đồng thời nhiều đột biến (macroarray)

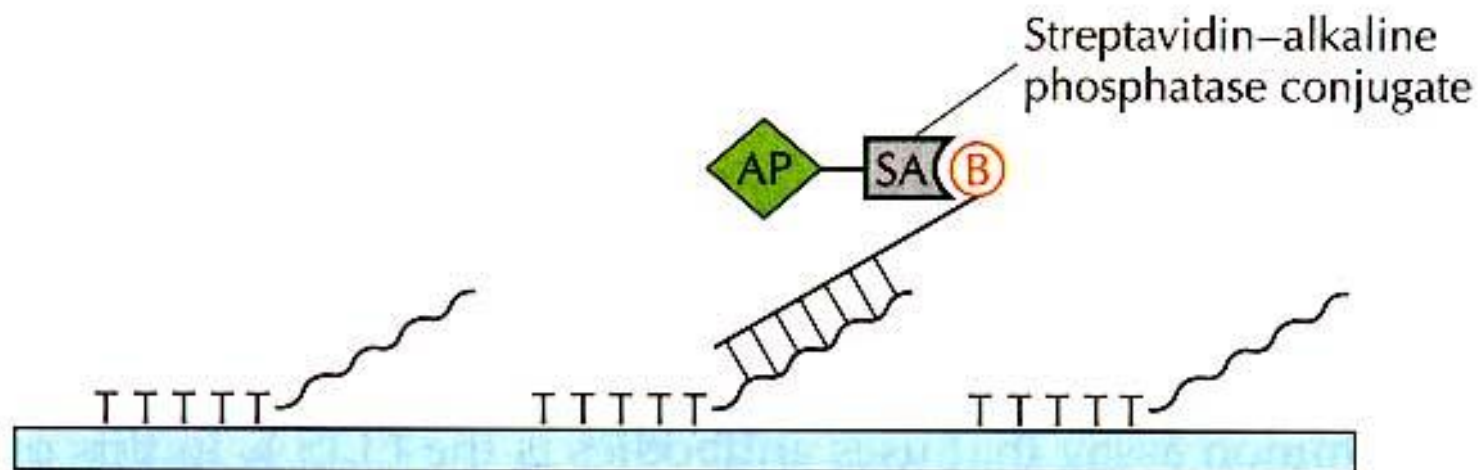
A Bind sequence-specific probes to a membrane



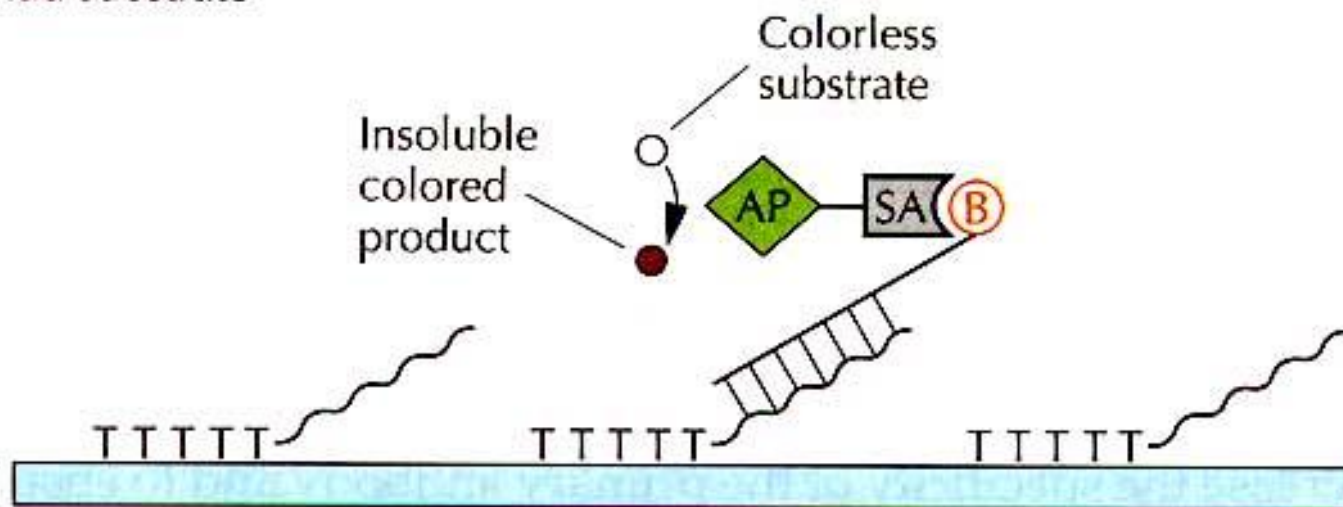
B Hybridize with PCR-amplified biotinylated segments of target gene



C Add streptavidin–alkaline phosphatase conjugate



D Add substrate



1. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ
2. SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP
3. SẢN XUẤT VẮC XIN
4. XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG, CHUYỂN HÓA VÀ SẢN XUẤT SINH KHỐI
5. KÍCH THÍCH TỔ THỰC VẬT
6. THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC
7. SINH TỔNG HỢP CHẤT PHÂN TỬ LƯỢNG NHỎ
8. SẢN XUẤT PROTEIN TÁI HỢP QUI MÔ LỚN

SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP

- 2.1. PROTEIN TÁI TỔ HỢP TỪ TẾ BÀO
EUKARYOTE DÙNG LÀM THUỐC
- 2.2. KHÁNG THỂ DÙNG LÀM THUỐC

TẦN SỐ XUẤT HIỆN MỘT SỐ BỆNH DI TRUYỀN PHỔ BIẾN

- Tiểu đường mellitus kiểu A (1/130)
- Tiểu đường mellitus kiểu I (1/500)
- Thiếu máu β -thalassemia (1/400)
- Thiếu máu hồng cầu hình liềm (1/625)
- Hóa xơ túi mật (1/2000)
- Bệnh Gaucher's (1/2500)
- Bệnh Tay-Sachs (1/3000)
- Bệnh niệu phenylketon (1/5000)
- Hội chứng Lesch-Nyan (1/10000)

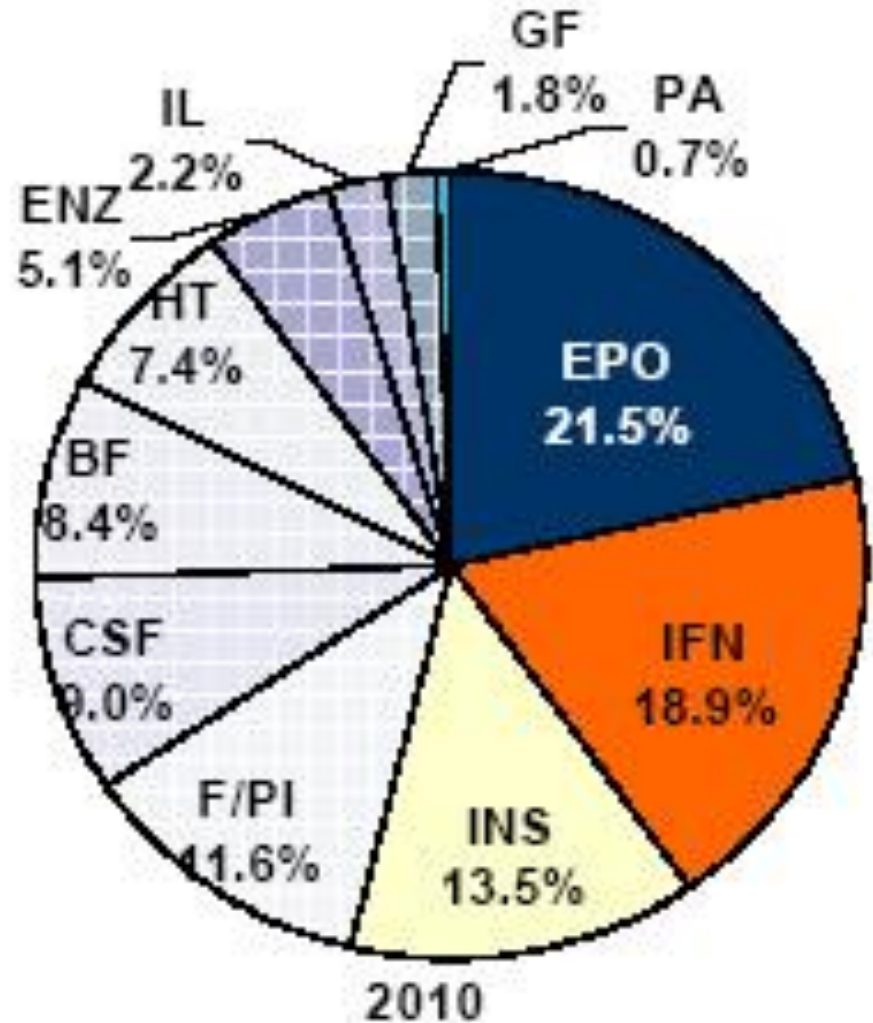
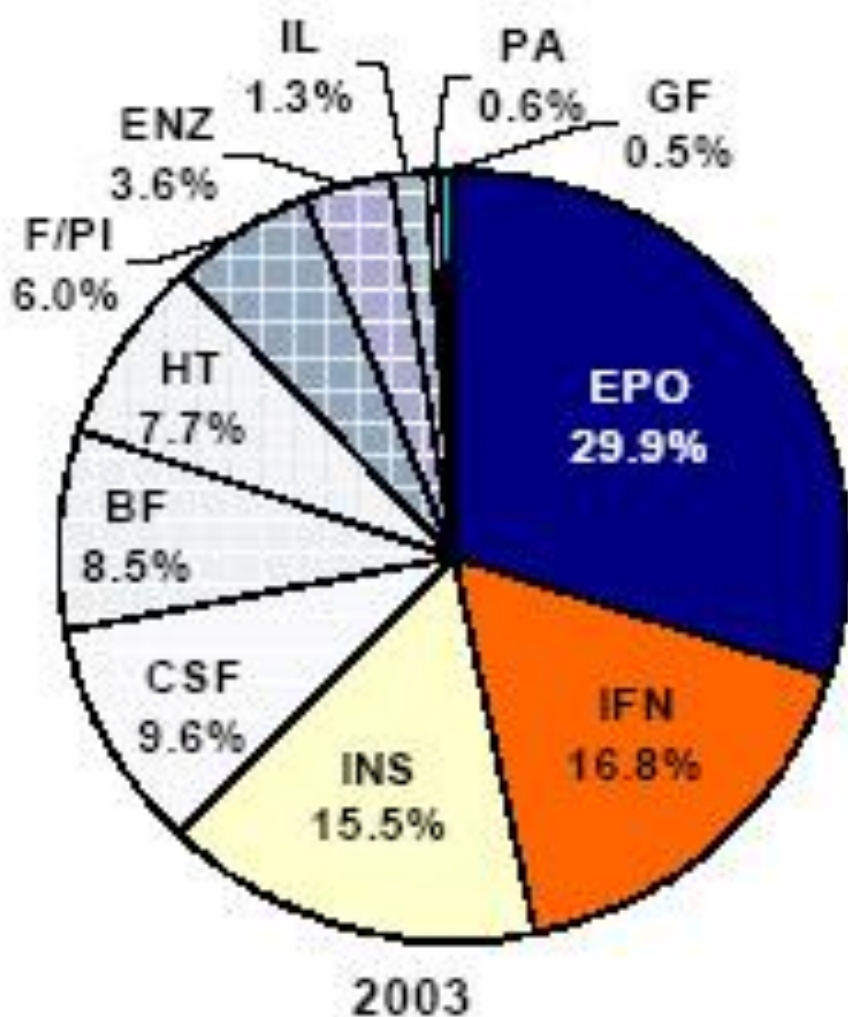
THUỐC ĐIỀU TRỊ TỪ PROTEIN TÁI TỔ HỢP

- Insulin (tiểu đường)
- Erythropoietin (thiếu máu)
- Interferon- α : ung thư AIDS
- Interferon- β : ung thư, viêm khớp thấp
- TNF: ung thư
- Interleukin: ung thư, rối loạn miễn dịch
- Somatotropin: rối loạn tăng trưởng -
Somatostatin: rối loạn tăng trưởng
- Factor VIII: chứng ưa chảy máu A
- Factor IX: chứng ưa chảy máu B
- SOD: tổn thương ôxi hóa khi cấy ghép thận

DOANH SỐ SINH PHẨM DƯỢC TRÊN THẾ GIỚI NĂM 2004

Loại sản phẩm	Doanh số (10 ⁹ USD)
Protein tái tổ hợp	50 (62 - 66%)
Kháng thể đơn dòng (KTTH*)	0,1
Vắc-xin (KTTH*)	6,8
Enzym (KTTH*)	0,5
Tế bào động vật	0,1
Máu và thành phần máu	5,2
Protein huyết tương người	8,4
Protein huyết tương động vật	0,5
Sản phẩm khác	0,1
Tổng cộng	75– 80
Tổng doanh số dược phẩm	550 (15%)

TỶ TRỌNG CÁC SẢN PHẨM PROTEIN TÁI TỔ HỢP



ENZ = enzymes; GF = growth factors; HT = hormonal therapies; IL = interleukins;
PA = plasminogen activators; BF = blood factors; CSF = colony-stimulating factors;
EPO = erythropoietins; IFN = interferons; INS = insulins; PI = fusion/protein inhibitors

Source: Datamonitor

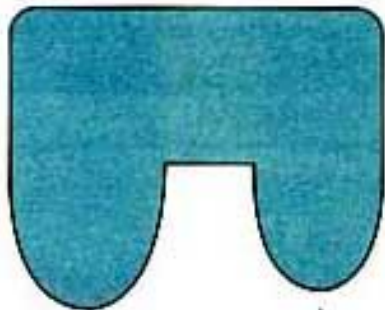
QUI TRÌNH TẠO DÒNG SẢN XUẤT PROTEIN TỪ TẾ BÀO EUKARYOTE

- Ly trích mRNA
- Tạo cDNA từ mRNA
- Thành lập ngân hàng cDNA trong phage
- Chọn dòng cDNA mục tiêu
- Dòng hóa vào một vector biểu hiện thích hợp (plasmid)

CẢI BIẾN PROTEIN BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN

- + Dùng kỹ thuật di truyền để cải tiến dược tính của protein dùng làm thuốc: ví dụ hormone tăng trưởng ở người (hGH, human growth hormone)
 - hGH gắn đồng thời receptor của hGH và của prolactin, gây tác dụng phụ
 - Dùng đột biến điểm để thay một số amino acid có vai trò trong sự gắn của hGH lên prolactin receptor

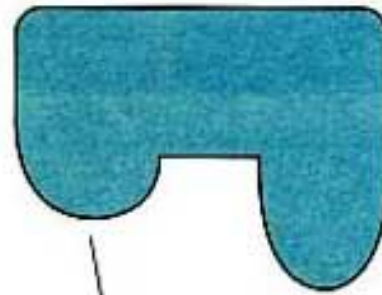
Native growth hormone



Prolactin receptor
binding site

Growth hormone
receptor binding
site

Modified growth hormone



Altered prolactin
receptor binding
site

Growth hormone
receptor binding
site

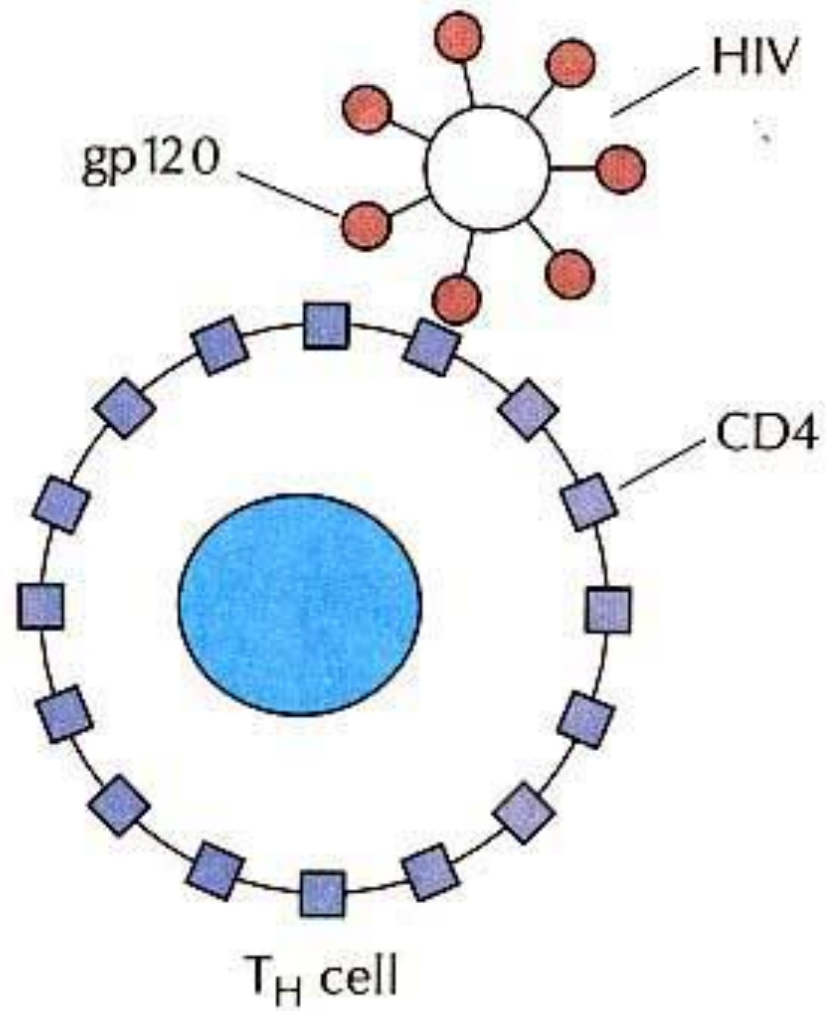
TẠO PROTEIN LAI: PROTEIN-ĐỘC TỐ

- + Tăng cường tính chuyên biệt đích tác dụng (tế bào, mô) của thuốc của thuốc
- + Thành phần protein là một protein nhận diện và gắn chuyên biệt lên receptor của tế bào quan tâm

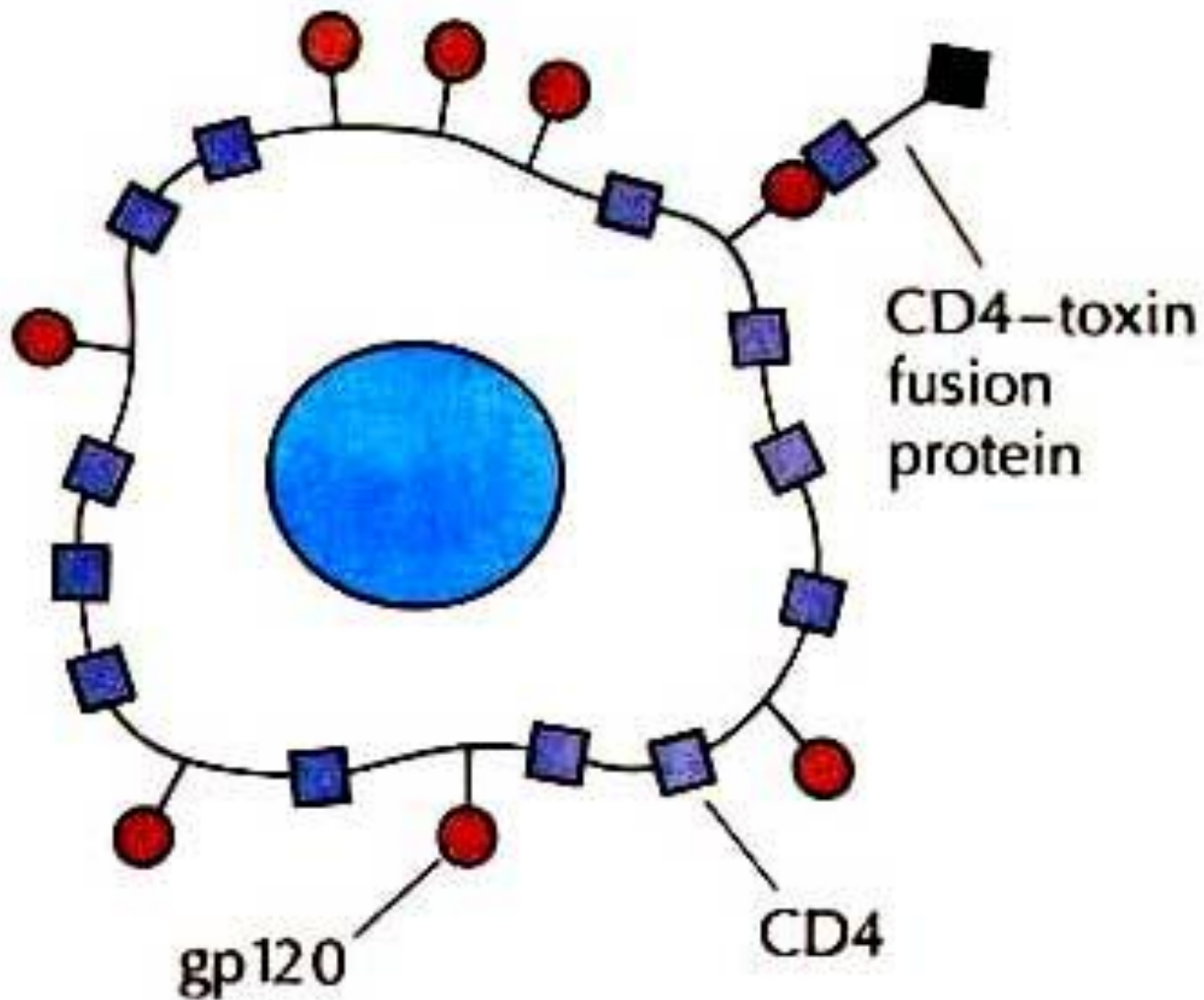
THUỐC PROTEIN LAI DIỆT TẾ BÀO NHIỄM HIV

- + HIV xâm nhiễm tế bào T_h (tế bào CD4) thông qua sự liên kết của protein gp120 ở vỏ virút với receptor CD4 trên tế bào CD4
- + Thuốc: protein là receptor của tế bào CD4 có thể nhận diện và gắn protein gp120 trên bề mặt tế bào nhiễm HIV. Thành phần còn lại là độc tố exotoxin A của *Pseudomonas* hoặc Fc của kháng thể người
 - Exotoxin A tiêu diệt tế bào nhiễm HIV
 - Fc chỉ điểm cho đáp ứng ADCC (antibody-mediated cell cytotoxicity)

A



B



SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP

**2.1. PROTEIN TÁI TỔ HỢP CÓ NGUỒN GỐC TẾ
BÀO EUKARYOTE DÙNG LÀM THUỐC**

2.2. KHÁNG THỂ DÙNG LÀM THUỐC

THÀNH PHẦN CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG KHÁNG THỂ

- + Cấu trúc kháng thể: 2 sợi nặng, hai sợi nhẹ
- + Xử lý bằng papain thu được một Fc, hai Fab
- + Fc có vai trò:

- Gắn trên các receptor của tế bào ADCC hoặc thực bào để chỉ điểm việc thủy phân kháng nguyên hoặc diệt tế bào mang kháng nguyên

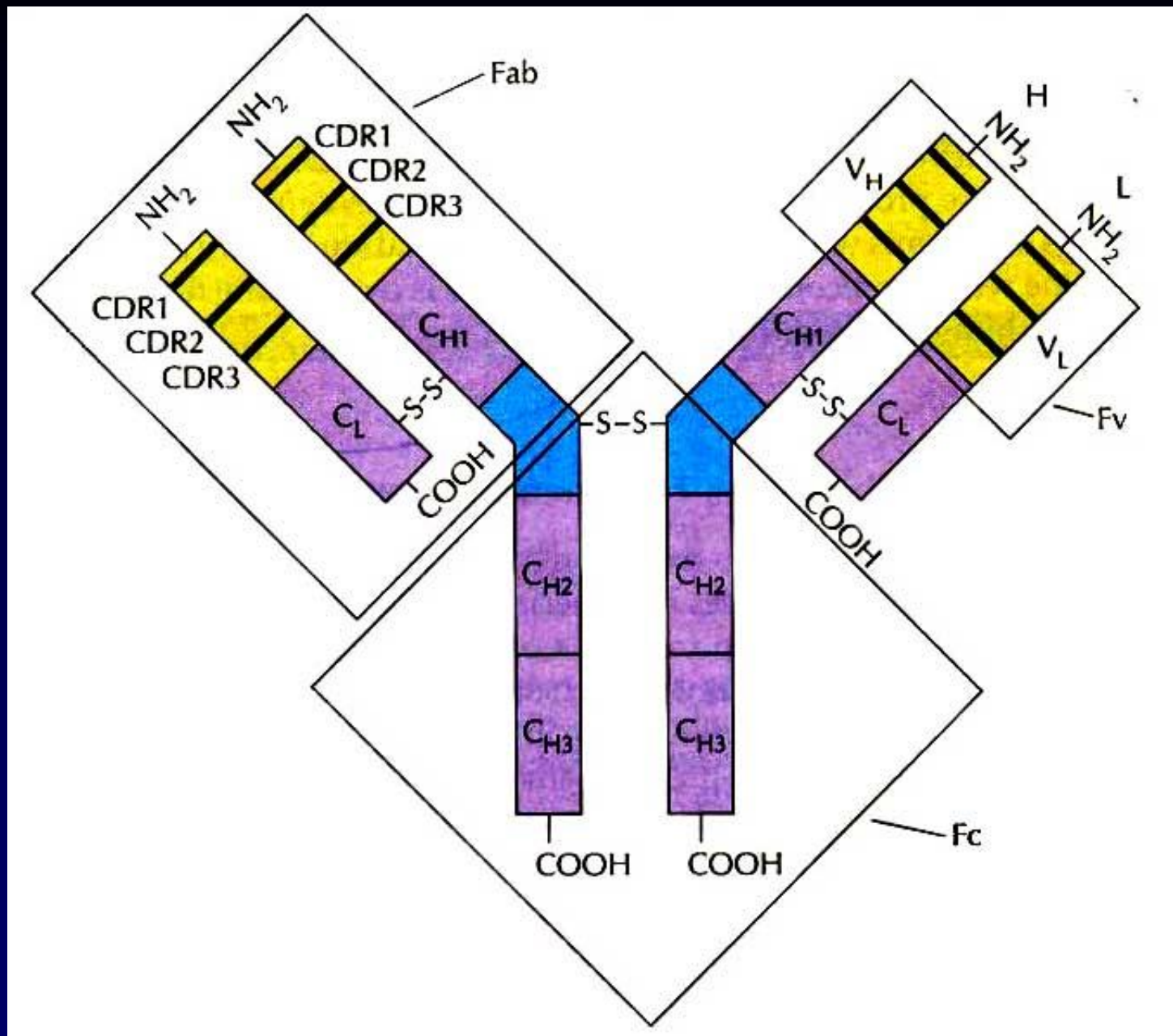
- Fc có mang yếu tố quyết định kháng nguyên

- + Fab có vai trò:

- Nhận diện và gắn kháng nguyên
- Vùng nhận diện và gắn kháng nguyên là Fv

THÀNH PHẦN CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG KHÁNG THỂ

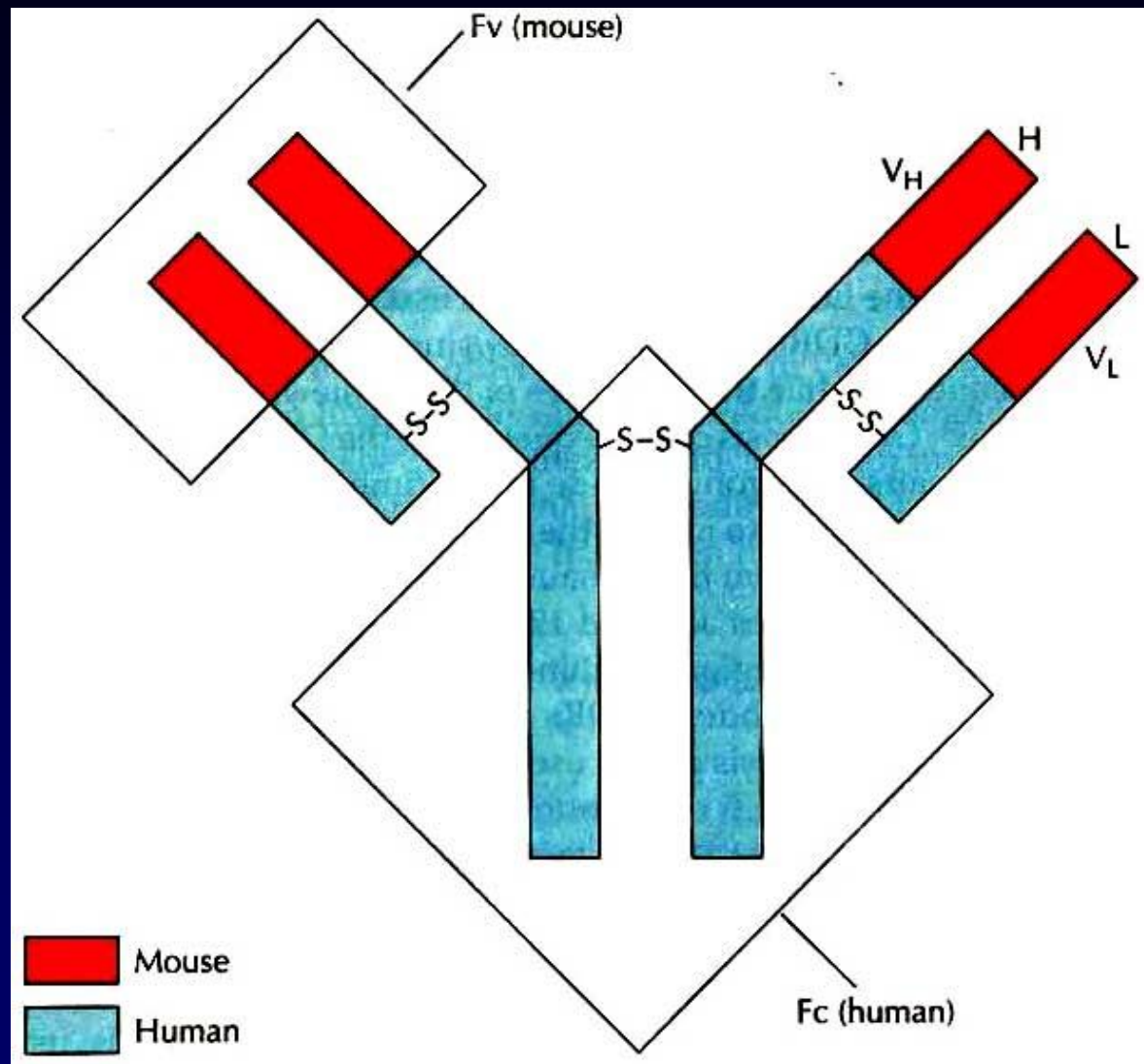
- Fv là vùng thay đổi chứa ba vùng nhỏ có độ biến động lớn là CDR1, CDR2 và CDR3
- Các CDR quyết định tính chuyên biệt nhận diện và gắn kháng nguyên
- Fab không mang yếu tố quyết định kháng nguyên
- + Kháng thể bổ sung từ bên ngoài vào người bệnh có thể tạo đáp ứng miễn dịch thụ động
- + Kháng thể từ chuột khi dùng cho người có thể gây tính quá mẫn cảm do tính kháng nguyên của Fc của kháng thể chuột lên hệ miễn dịch của người



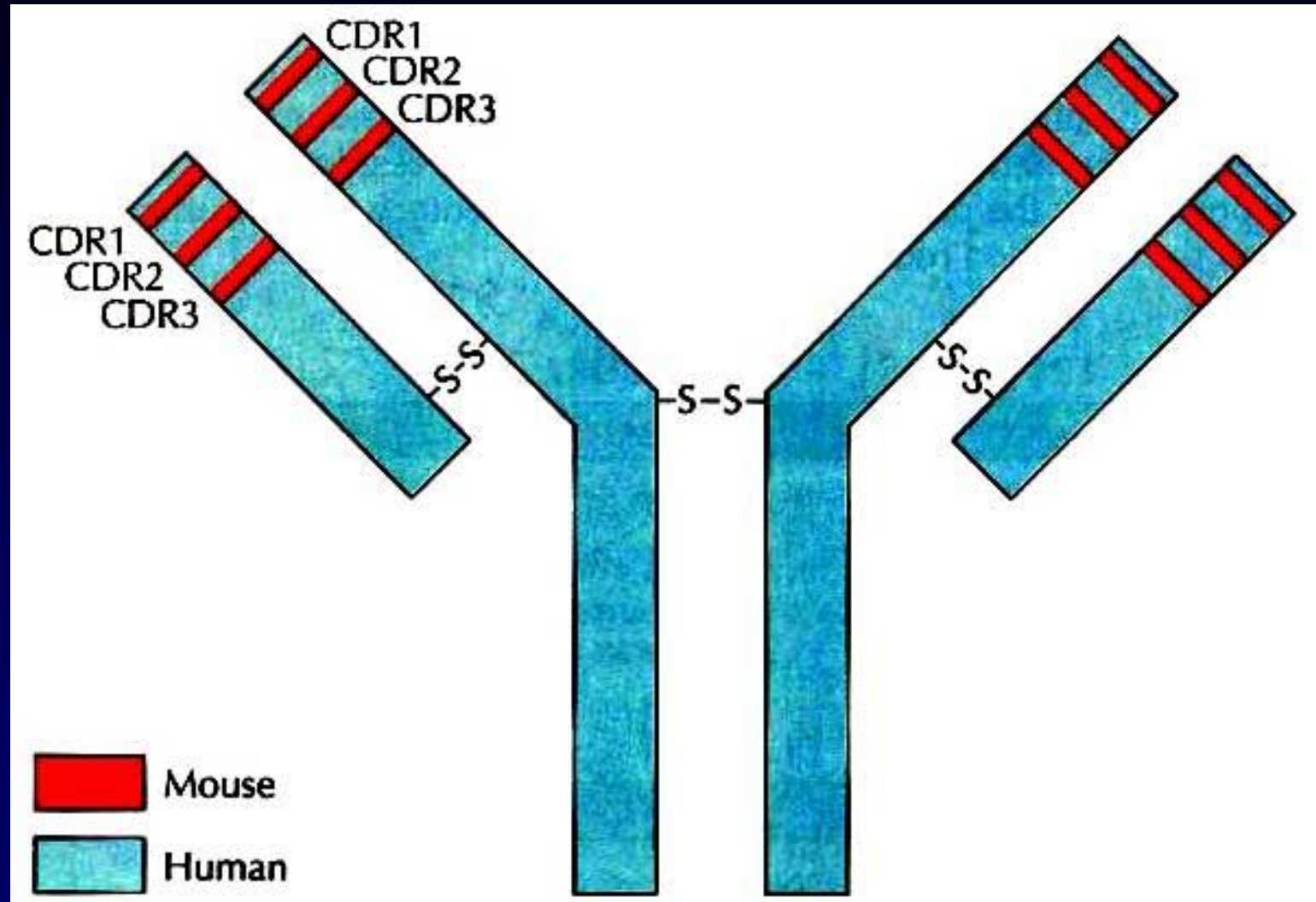
KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LAI DÙNG LÀM THUỐC

- + Kháng thể đơn dòng lai (hybrid monoclonal antibody): chứa thành phần từ kháng thể của người và kháng thể của chuột
- + Thành phần kháng thể của chuột: quyết định tính chuyên biệt kháng nguyên
- + Thành phần kháng thể của người: loại trừ tính quá mẫn cảm trong người
- + Kháng thể đơn dòng lai có thể khắc phục nhược điểm gây quá mẫn cảm và được dùng làm thuốc

KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LAI (1): KHÁNG THỂ CỦA NGƯỜI + F_v CHUỘT

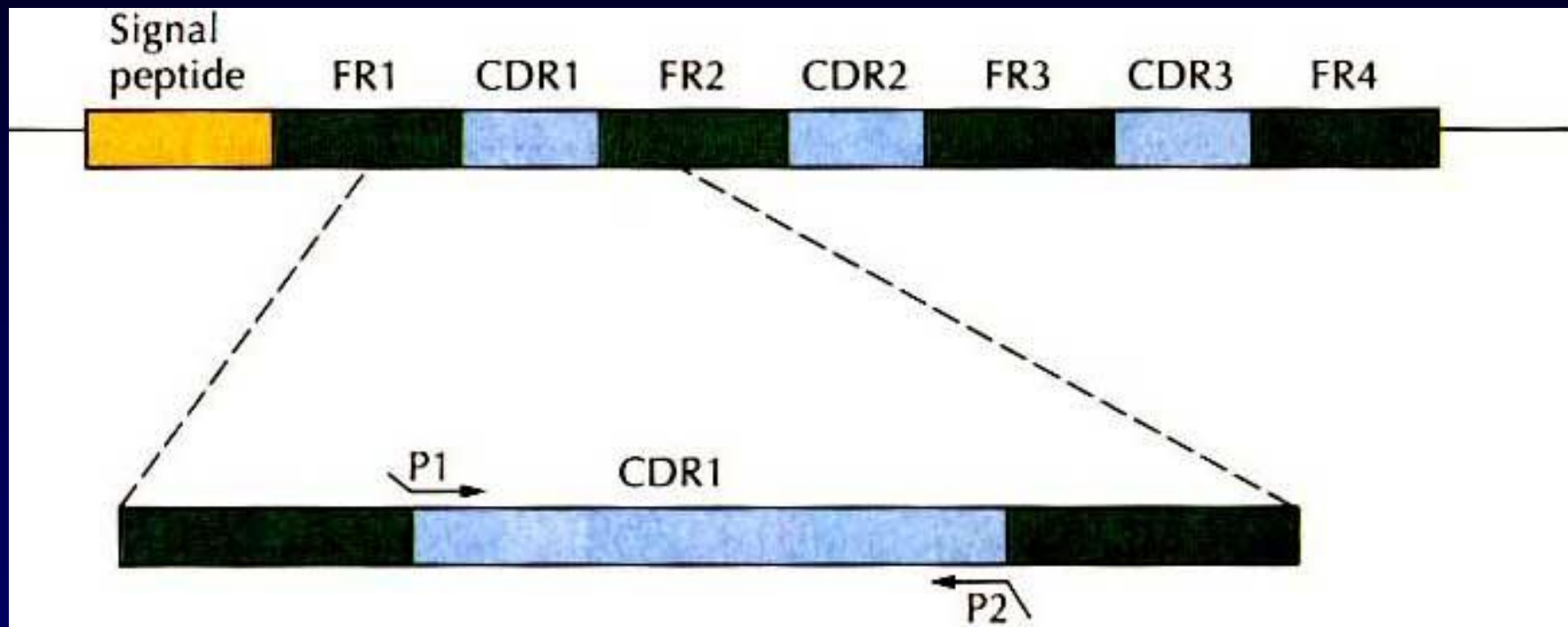


KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LAI (2): KHÁNG THỂ CỦA NGƯỜI + CDR CHUỘT

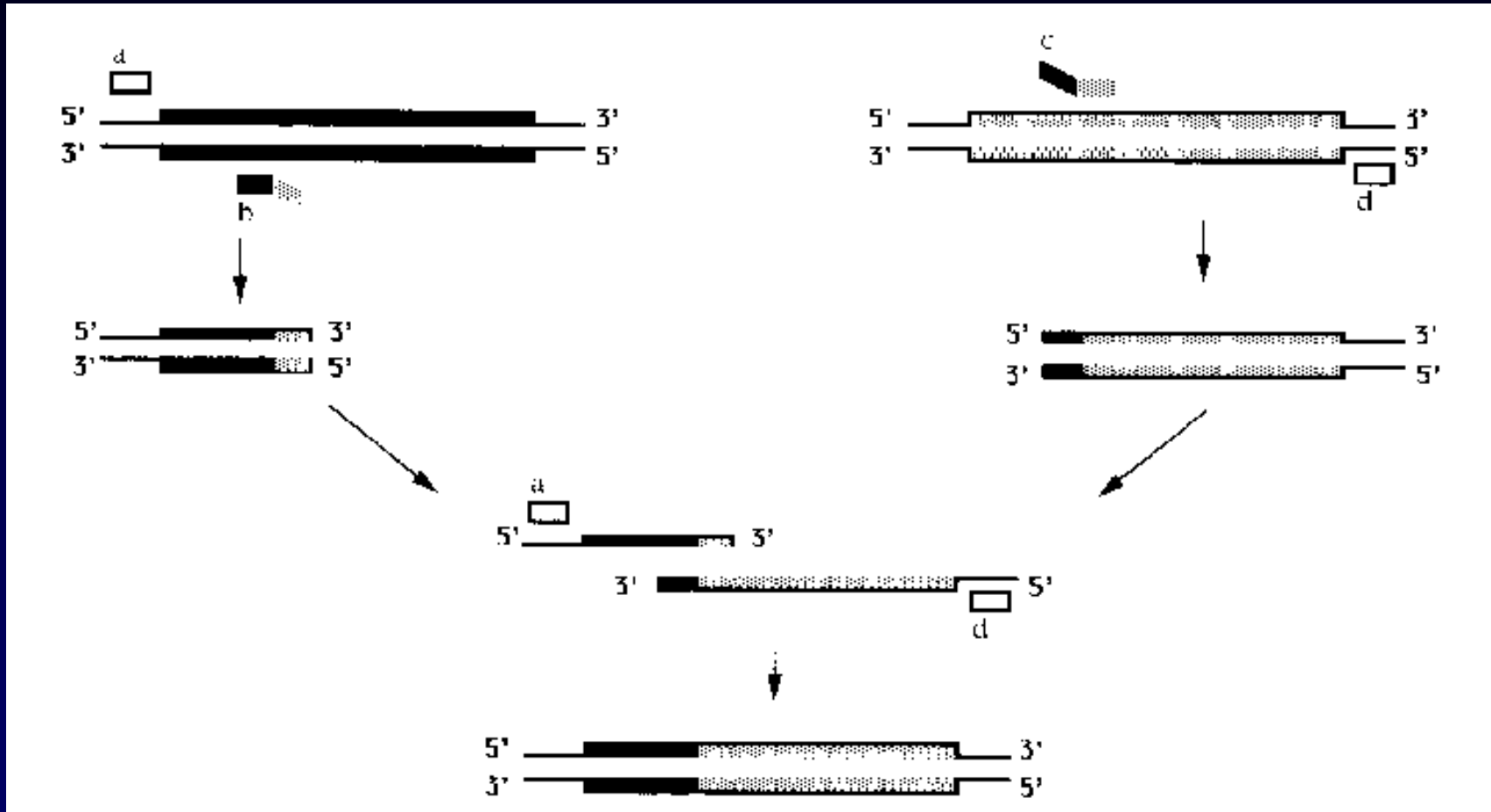


PHƯƠNG PHÁP TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LAI

- Ly trích cDNA sợi nặng, cDNA sợi nhẹ từ dòng tế bào hybridoma chuột
- Thiết kế 6 cặp môi tương ứng hai đầu của mỗi CDR trong vùng biến đổi (3 cặp của sợi nặng và 3 cặp của sợi nhẹ) của kháng thể chuột; mỗi môi chứa 12 nucleotide ở đầu 5' tương ứng với vùng hai bên của mỗi CDR ở người.
- Khuếch đại bằng PCR để thu nhận các CDR của chuột
- Dùng các đoạn khuếch đại này để thay vào vùng tương ứng trên kháng thể người bằng phương pháp đột biến dựa vào đoạn oligonucleotide (oligonucleotide-directed mutagenesis)



Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR



A.N. Warrens et al. (1997) Gene 186: 29.35.

NGÂN HÀNG TỔ HỢP

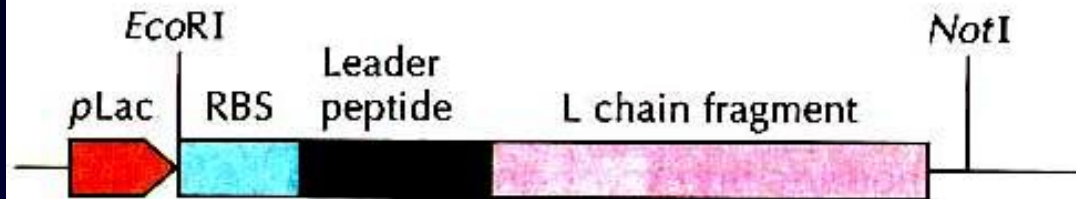
Ngân hàng tổ hợp (combinatorial library): tập hợp các dòng tái tổ hợp trong phage λ mang cDNA tổ hợp của hai trình tự vùng biến đổi của sợi nặng và sợi nhẹ.

Ngân hàng này chứa các Fv của tất cả kháng thể có thể được tạo ra từ tế bào B.

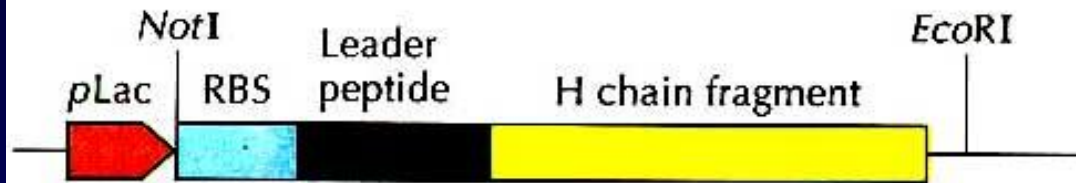
QUI TRÌNH TẠO NGÂN HÀNG TỔ HỢP

- Tổng hợp cDNA từ mRNA tế bào B của người
- Khuếch đại bằng PCR để thu vùng thay đổi tương ứng với Fv của sợi nặng và của sợi nhẹ
- Cắt các cDNA bằng tổ hợp nhất định các enzyme cắt giới hạn
- Dòng hóa riêng biệt các gen tương ứng với sợi nhẹ và các gen tương ứng với sợi nặng vào phage λ để có ngân hàng sợi nhẹ và ngân hàng sợi nặng riêng.
- Dòng hóa từng cặp sợi nhẹ-sợi nặng vào phage λ để tạo ngân hàng tổ hợp: mỗi dòng phage có thể biểu hiện phân tử chứa cả sợi nặng và sợi nhẹ của vùng Fv (kháng thể sợi đơn – single chain antibody)

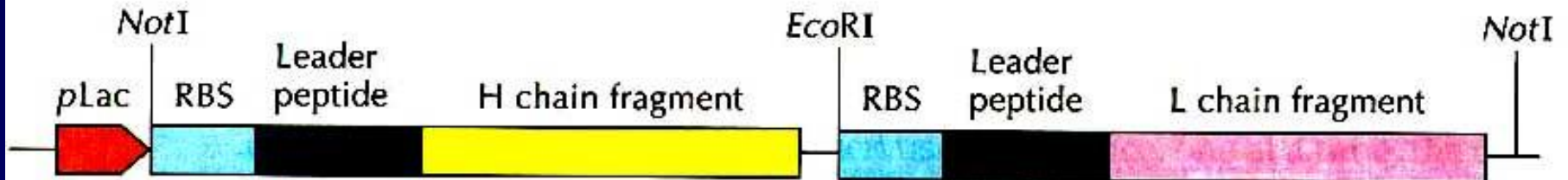
A



B



C



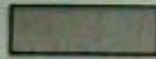
Heavy chain cDNA

↓ PCR

V_H DNA



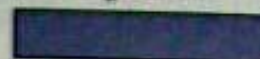
Linker



Light chain cDNA

↓ PCR

V_L DNA

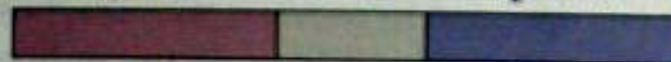


↓ Ligate

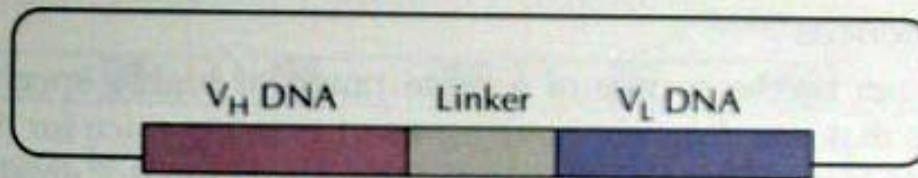
V_H DNA

Linker

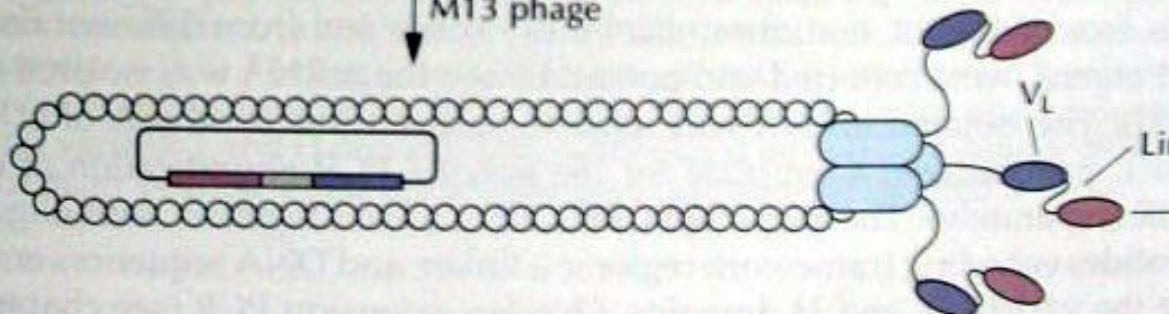
V_L DNA



↓ Insert into gene 3
of bacteriophage
M13



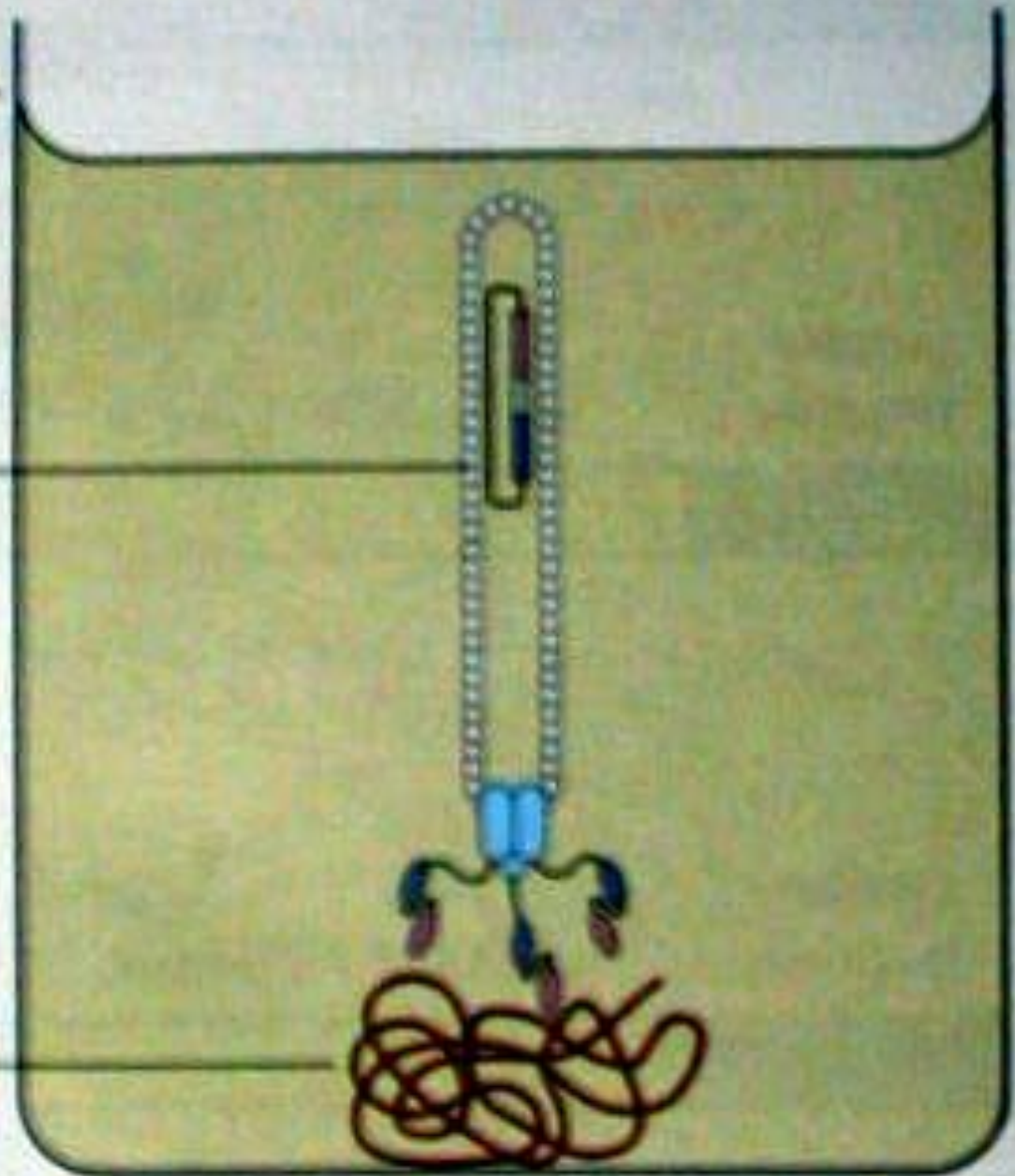
↓ Package modified
M13 DNA into
M13 phage



A well of a
multiwell
plate

Recombinant
bacteriophage

Bound
antigen



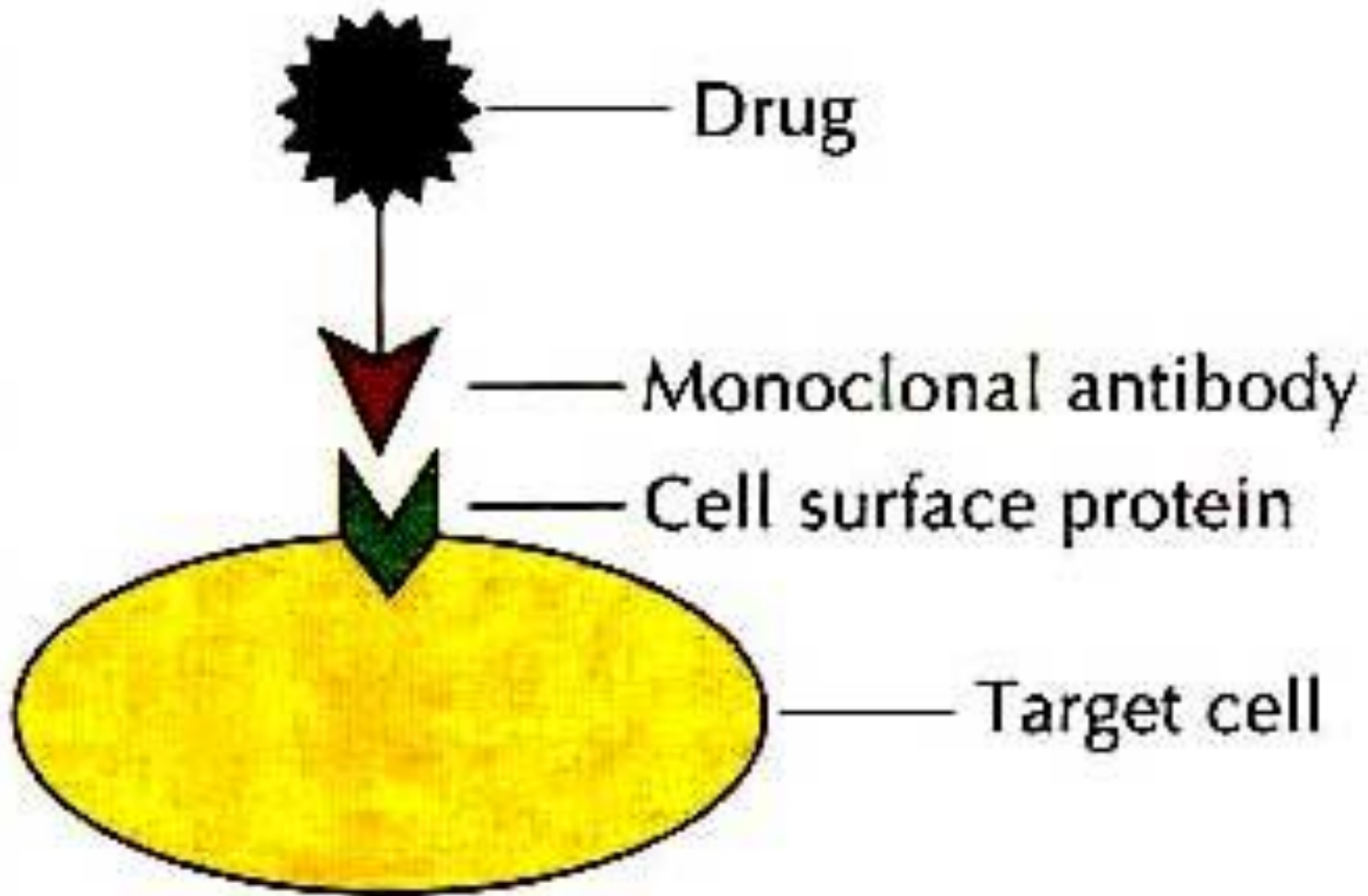
TẠO DÒNG SẢN XUẤT F_v CHUYÊN BIỆT KHÁNG NGUYÊN TRONG *E. coli*

- Tuyển chọn dòng phage cho phản ứng lai miễn dịch với kháng nguyên mục tiêu
- Thu nhận dòng này và tách đoạn F_v
- Dòng hóa đoạn gen F_v tổ hợp vào vector plasmid biểu hiện trong *E. coli*
- Biến nạp vào *E. coli* để sản xuất F_v tái tổ hợp

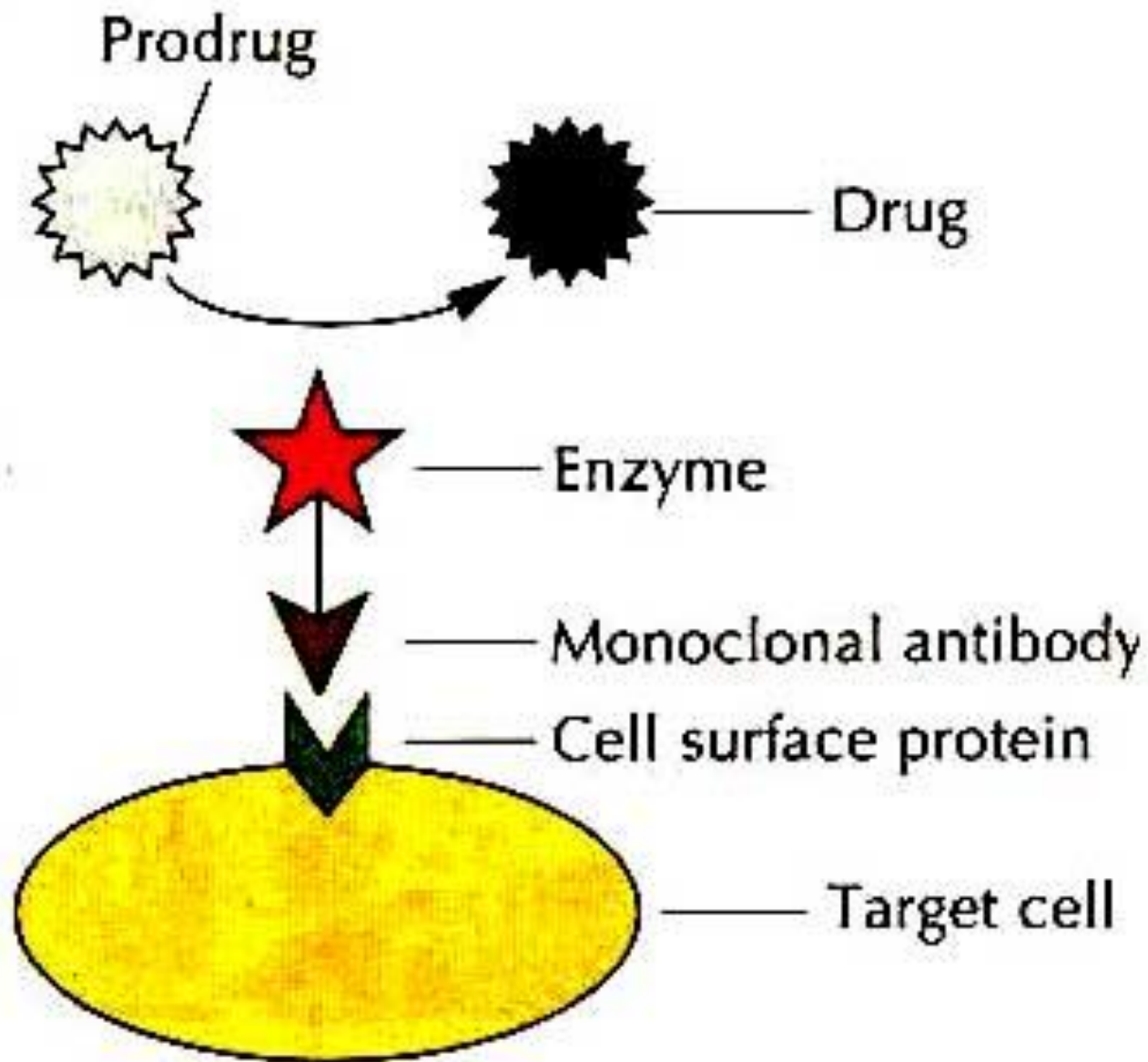
MỘT SỐ CÁCH ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LÀM THUỐC

- Dùng làm phương tiện vận chuyển thuốc đến tế bào mục tiêu: receptor trên bề mặt tế bào là kháng nguyên mục tiêu
- Dùng làm phương tiện vận chuyển một enzyme đặc biệt đến tế bào mục tiêu. Enzyme xúc tác biến tiền chất của thuốc thành thuốc tại tế bào mục tiêu

A



B



1. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ
2. SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP
3. SẢN XUẤT VẮC XIN
4. XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG, CHUYỂN HÓA VÀ SẢN XUẤT SINH KHỐI
5. KÍCH THÍCH TỔ THỰC VẬT
6. THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC
7. SINH TỔNG HỢP CHẤT PHÂN TỬ LƯỢNG NHỎ
8. SẢN XUẤT PROTEIN TÁI HỢP QUI MÔ LỚN

VẮC XIN TRUYỀN THỐNG

- + Vắc xin truyền thống thường là dạng bất hoạt hoặc nhược độc của tác nhân gây bệnh được tiêm để gây phản ứng miễn dịch.
- + Tác nhân gây bệnh được nuôi cấy qui mô lớn, thu nhận, bất hoạt (inactivated) hoặc gây nhược độc (attenuated).

NHUỢC ĐIỂM CỦA VẮC XIN TRUYỀN THỐNG

- Chỉ một số ít vắc xin được sản xuất do khó nhân thành số lượng lớn đủ để sản xuất vắc xin.
- Cần dùng tế bào người hoặc động vật rất tốn kém để sản xuất vắc xin từ virút ở người và động vật.
- Cần có biện pháp an toàn khi thao tác với số lượng lớn tác nhân gây bệnh.
- Các chủng gây nhược độc bằng phương pháp hóa học có thể trở lại trạng thái cường độc.
- Việc bất hoạt có thể không hữu hiệu gây lan truyền bệnh bởi vắc xin.
- Thời hạn sử dụng ngắn và cần điều kiện bảo quản lạnh.

VẮC XIN TÁI TỔ HỢP

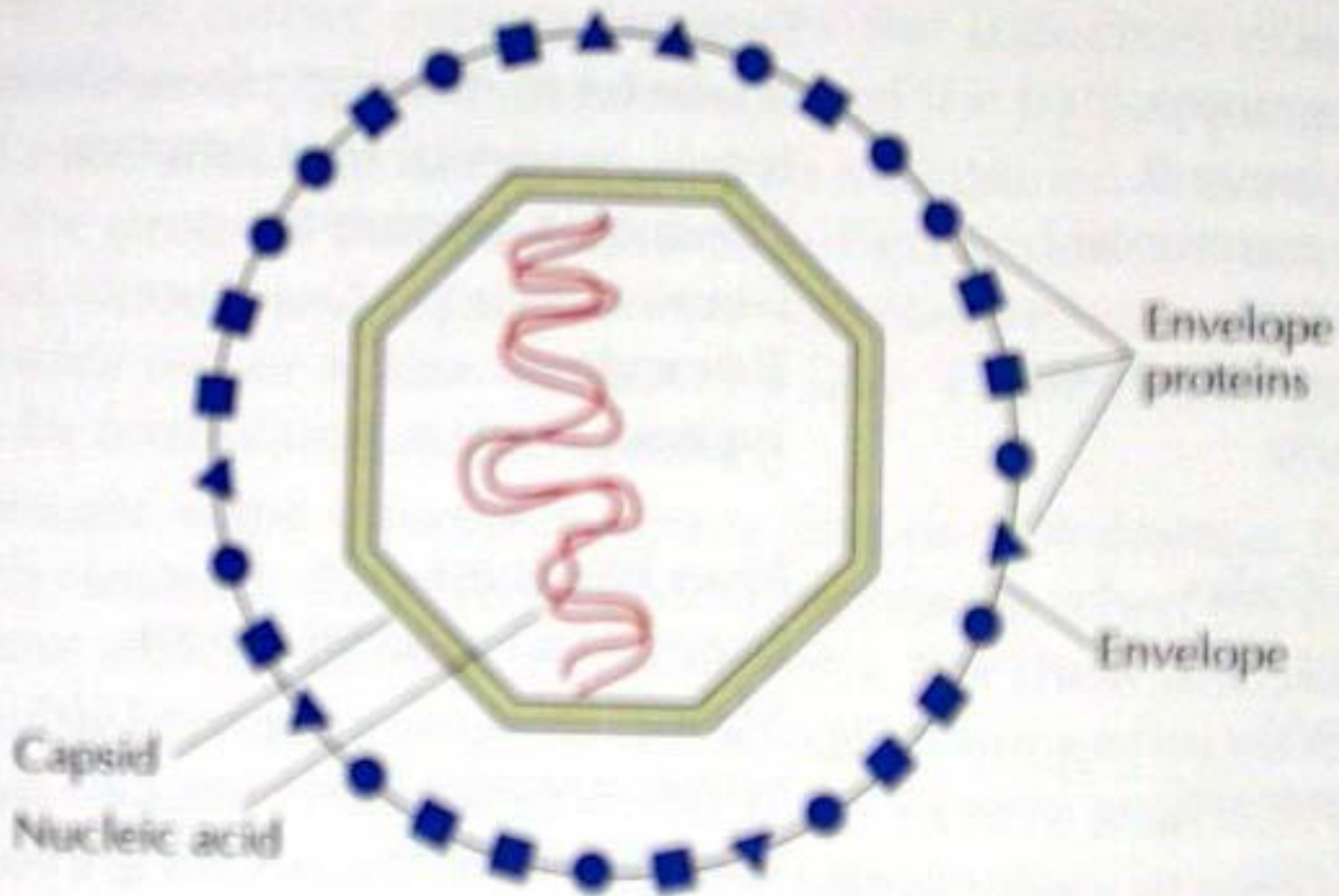
- + Là các dạng vắc xin được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen.
- + Có hai dạng vắc xin tái tổ hợp: vắc xin tiểu phần và vắc xin nhược độc

VẮC XIN TIỂU PHẦN (SUBUNIT VACCINE)

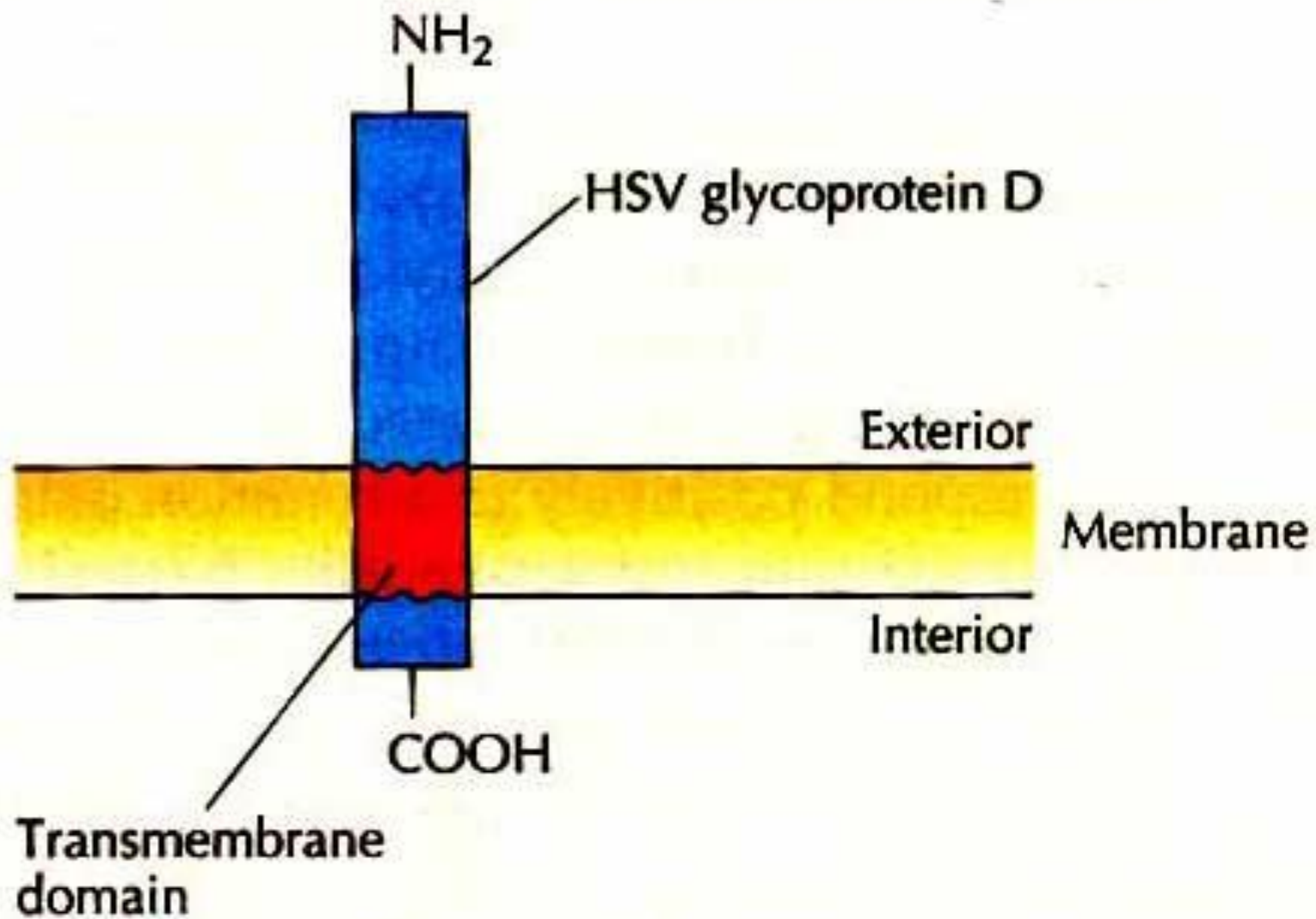
- + Vắc xin từ một bộ phận của tác nhân gây bệnh.
- + Gen mã hóa cho vùng quyết định kháng nguyên được dòng hóa và biểu hiện vượt mức trong tế bào vi sinh vật, tinh chế để sử dụng làm vắc xin.
- + Ưu điểm: bền và an toàn; có thành phần hóa học xác định, không chứa các protein tạp, các nucleic acid có thể gây tác dụng phụ.
- + Nhược điểm: đắt tiền, đôi khi không thu được dạng có hoạt tính.

VẮC XIN HSV (HERPES SIMPLEX VIRUS)

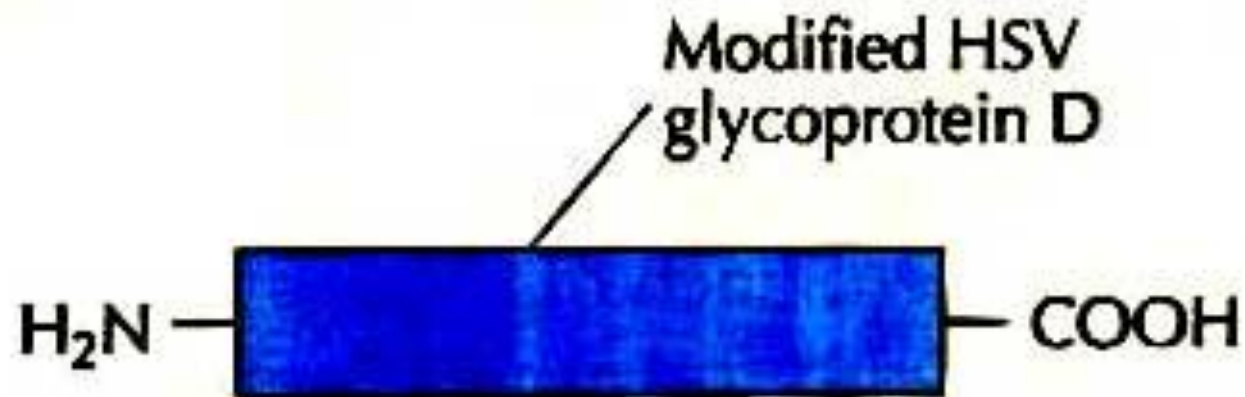
- + Tạo vắc xin tiểu phần không chứa thành phần gây ung thư (bộ gen).
- + Glycoprotein vỏ virút gD có thể gây đáp ứng ở chuột tạo kháng thể trung hòa virút HSV.
- + Gen mã hóa cho gD được dòng hóa vào vector biểu hiện trong tế bào hữu nhũ CHO (Chinese Hamster ovary).
- + Tạo gD tái tổ hợp tan (không gắn vào màng tế bào) không chứa vùng trình tự mã hóa cho đầu C của gD
- + gD tái tổ hợp có khả năng trung hòa cả HSV-1 và HSV-2.



A



B



Exterior

Membrane

Interior

VẮC XIN PEPTIDE (PEPTIDE VACCINE)

+ Vắc xin là đoạn peptide ngắn từ vùng quyết định kháng nguyên trên bề mặt tế bào hoặc vi rút

+ Ví dụ: vaccine từ kháng nguyên VP1 (virion protein 1) trên bề mặt virút FMDV.

- Tổng hợp hóa học đoạn peptide khoảng 10 - 20 amino acid từ 141 - 160 (đầu C) cho hiệu lực kháng nguyên cao.

- Peptide dung hợp giữa hai đoạn 141 - 160 và 200 - 213 cho hiệu lực kháng nguyên cao hơn.

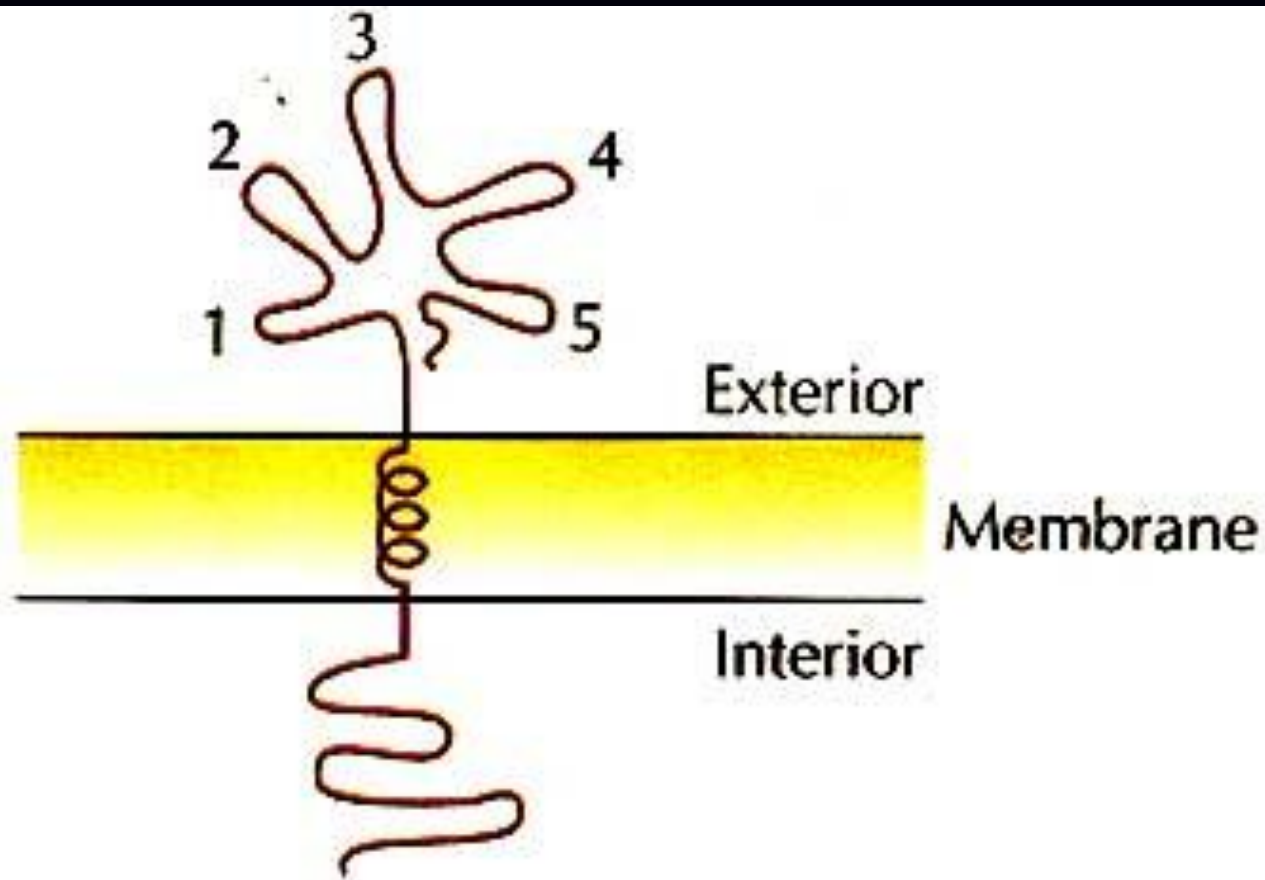
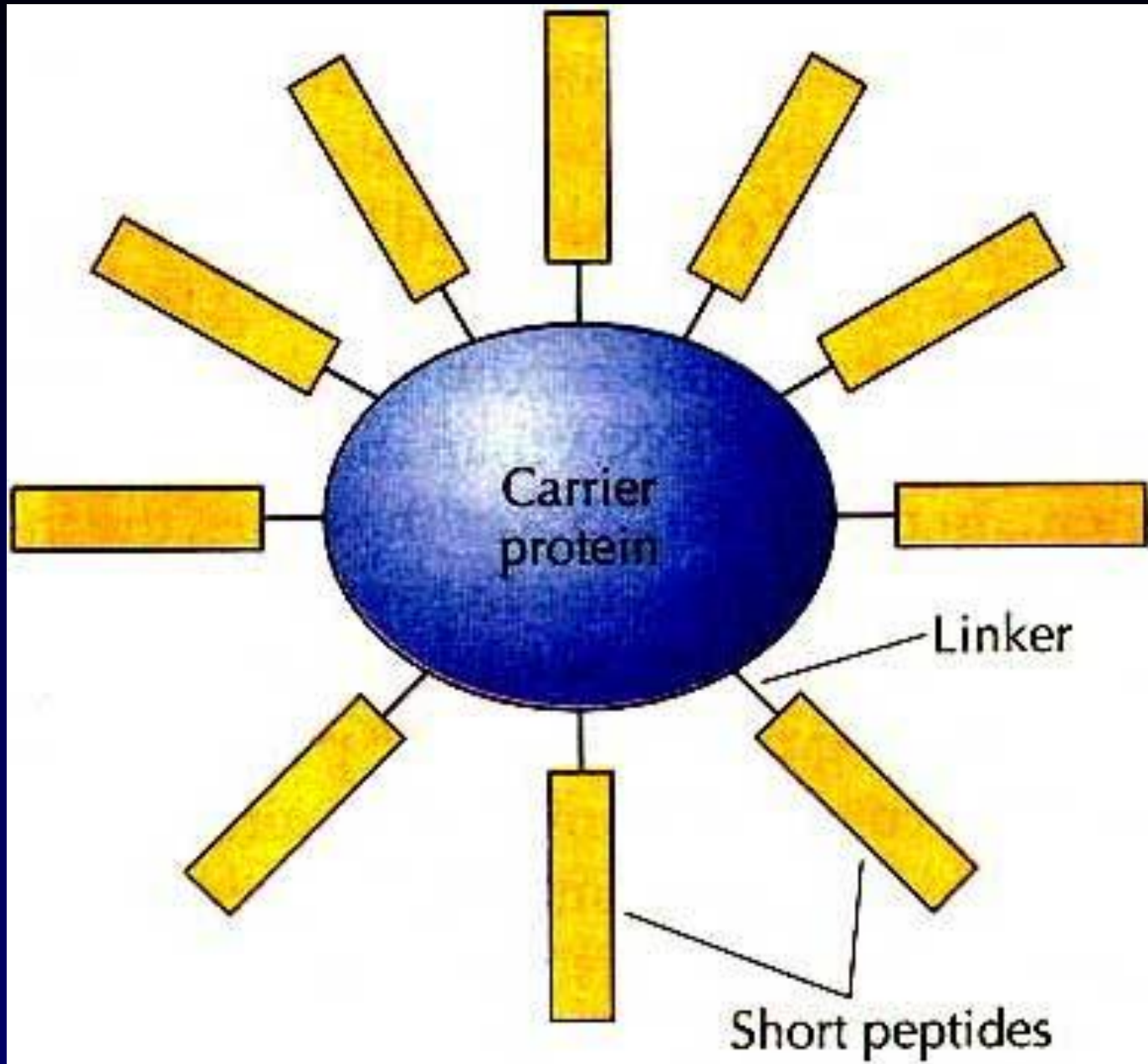


Figure 11.3 Generalized envelope-bound protein with external epitopes (1 to 5) that might elicit an immune response.



VẮC XIN NHƯỢC ĐỘC TÁI TỔ HỢP

- Vi khuẩn hay virút lành được biến đổi di truyền để biểu hiện yếu tố quyết định kháng nguyên của vi sinh gây bệnh;
- Vi sinh gây bệnh bị biến đổi di truyền bằng cách gây đột biến hoặc loại bỏ gen ác tính.

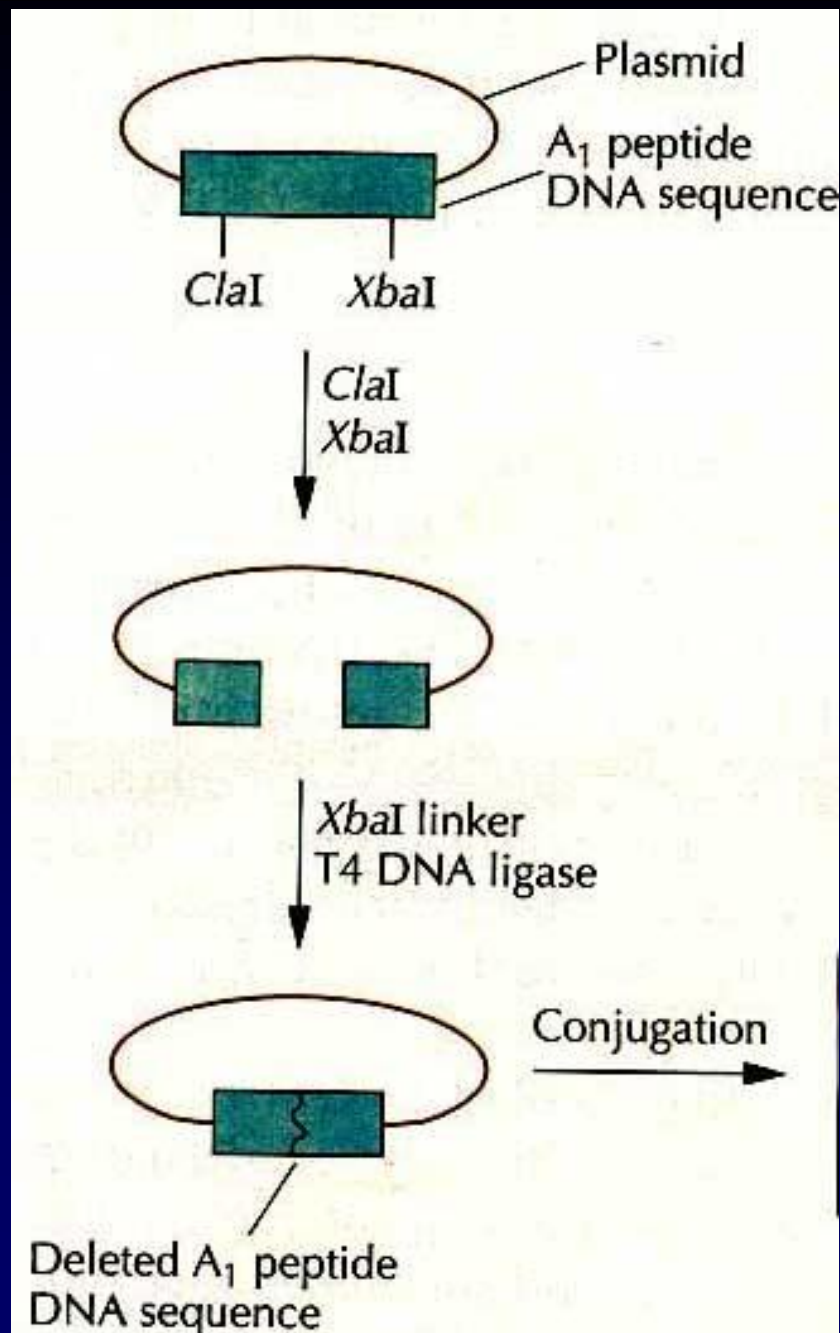
VẮC XIN DỊCH TẢ NHƯỢC ĐỘC TÁI TỔ HỢP

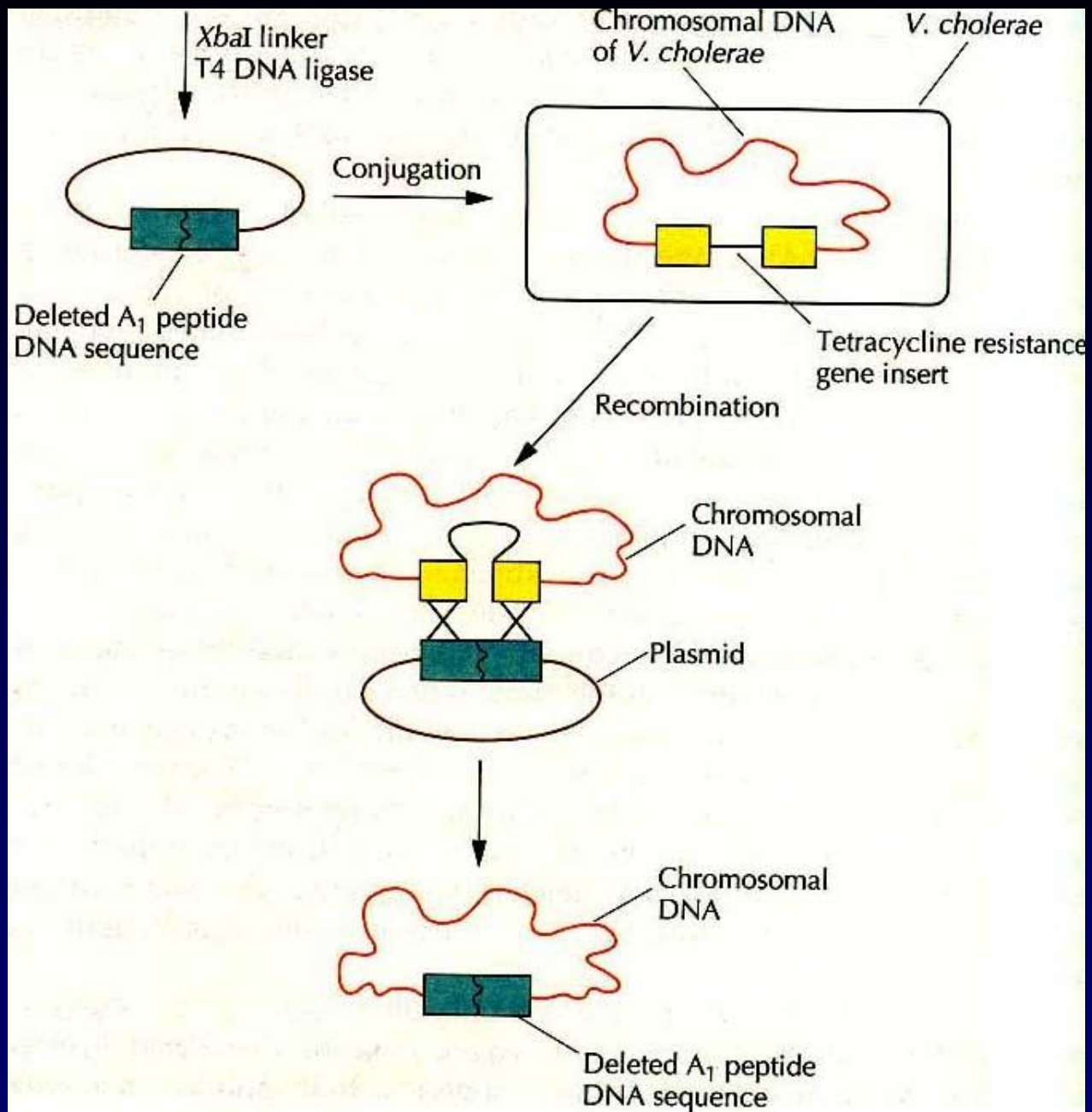
- + *Vibrio cholerae* gây dịch tả cấp tính bằng enterotoxin gây triệu chứng tả.
- + Enterotoxin gồm 01 tiểu phần A và 05 tiểu phần B
 - Tiểu phần A gồm peptide A1 mang độc tính và peptide A2 nối tiểu phần A vào các tiểu phần B.
- + Vắc xin tiểu phần dạng enterotoxin bất hoạt không có tính kháng nguyên cao. Do vậy cần thiết tạo vắc xin tái tổ hợp nhược độc.

VẮC XIN DỊCH TẢ NHƯỢC ĐỘC TÁI TỔ HỢP

+ **Dạng 1:** chèn gen kháng tetracycline vào vùng A1 trên bộ gen của vi khuẩn. Nhược điểm: gen kháng tetracycline có thể bị tách ngẫu nhiên khỏi vùng A1 làm vi khuẩn trở lại có độc tính.

+ **Dạng 2:** thay gen kháng tetracycline của Dạng 1 bằng đoạn A1 đột biến (mất đoạn) bằng tái tổ hợp các đoạn tương đồng. Dạng 2 ổn định không khả năng trở lại dạng độc tính.





VẮC XIN DỰA TRÊN VIRÚT BỆNH ĐẬU MÙA (VACCINIA VIRUS)

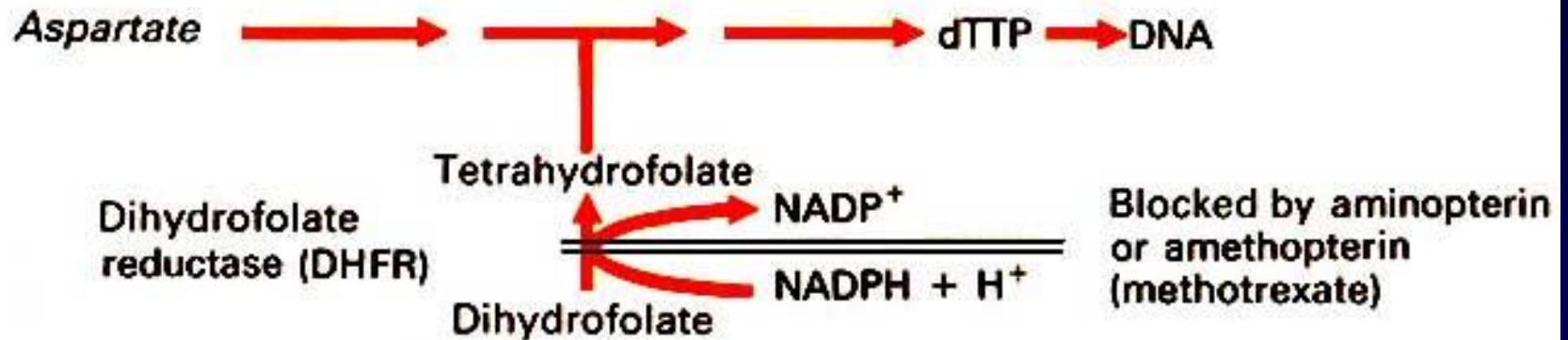
- + Thuộc nhóm các vector vaccine: vắc xin sống biểu hiện kháng nguyên mục tiêu của tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.
- + Một số vắc xin đã được phát triển: vắc xin viêm gan siêu vi B (HBsAg), vắc xin ngừa influenza virus (haemagglutinin).
- + Nguyên tắc: dựa vào tái tổ hợp các đoạn tương đồng

VẮC XIN DỰA TRÊN VIRÚT BỆNH ĐẬU MÙA (VACCINIA VIRUS)

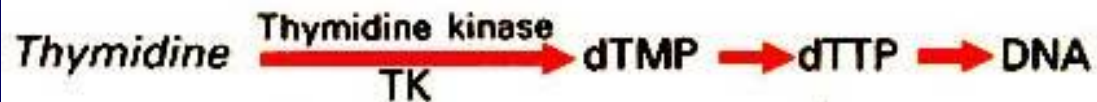
- Tạo plasmid tái tổ hợp: gen *tk*-promoter-gen kháng nguyên-gen *tk*
- Biến nạp vào tế bào động vật (CEF: chicken embryo fibroblast) có kiểu hình TK⁻ đã được nhiễm bằng vaccinia virus hoang dại (TK⁺).
- Chọn lọc dòng tế bào TK⁻ bằng môi trường chứa BUdR (BrdU).
- Khử định dòng mang gen mã hóa kháng nguyên mục tiêu bằng lai phân tử.

PYRIMIDINE BIOSYNTHESIS

Endogenous pathway

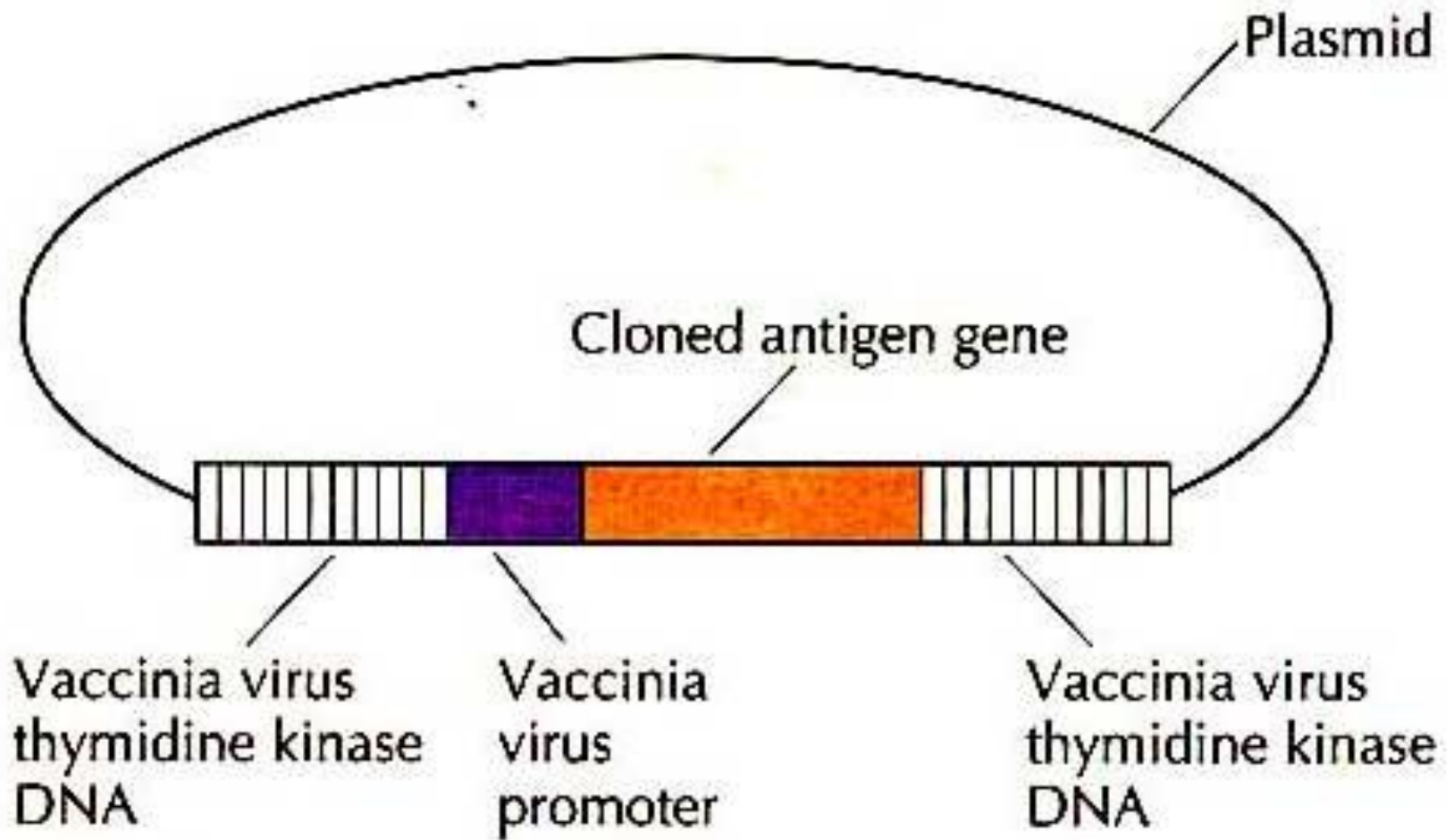


Salvage pathway

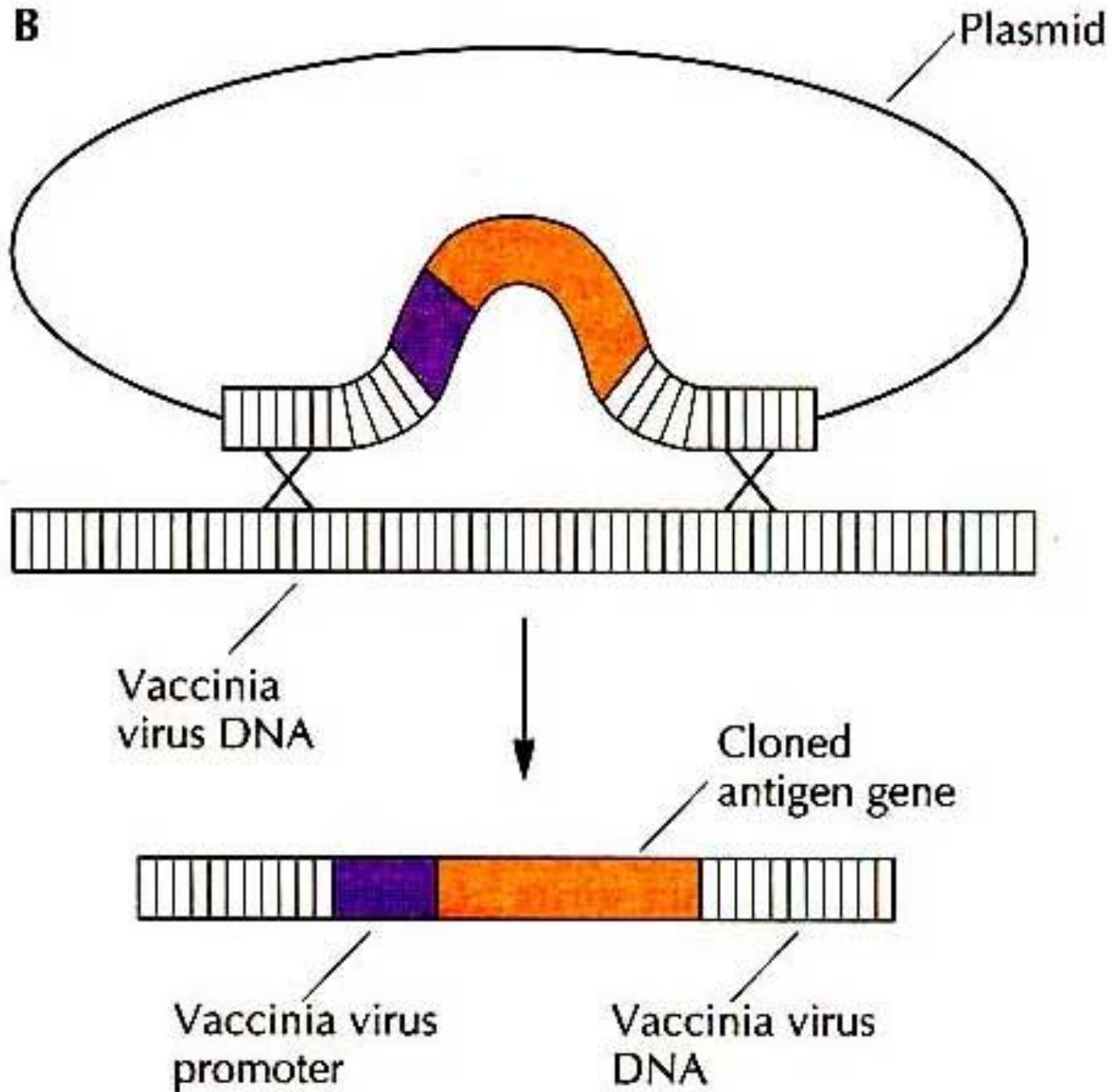


Analog	Substitutes for
<div data-bbox="479 204 830 568"> </div> <div data-bbox="508 621 807 668">5-Bromouracil</div> <div data-bbox="338 682 390 731">(a)</div>	<div data-bbox="1097 204 1483 568"> </div> <div data-bbox="1184 621 1367 668">Thymine</div>
<div data-bbox="425 928 884 1163"> </div> <div data-bbox="508 1268 821 1316">2-Aminopurine</div> <div data-bbox="338 1335 390 1383">(b)</div>	<div data-bbox="1116 863 1472 1163"> </div> <div data-bbox="1193 1268 1367 1316">Adenine</div>

A



B



1. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ
2. SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP
3. SẢN XUẤT VẮC XIN
4. XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG, CHUYỂN HÓA VÀ SẢN XUẤT SINH KHỐI
5. KÍCH THÍCH TỔ THỰC VẬT
6. THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC
7. SINH TỔNG HỢP CHẤT PHÂN TỬ LƯỢNG NHỎ
8. SẢN XUẤT PROTEIN TÁI HỢP QUI MÔ LỚN

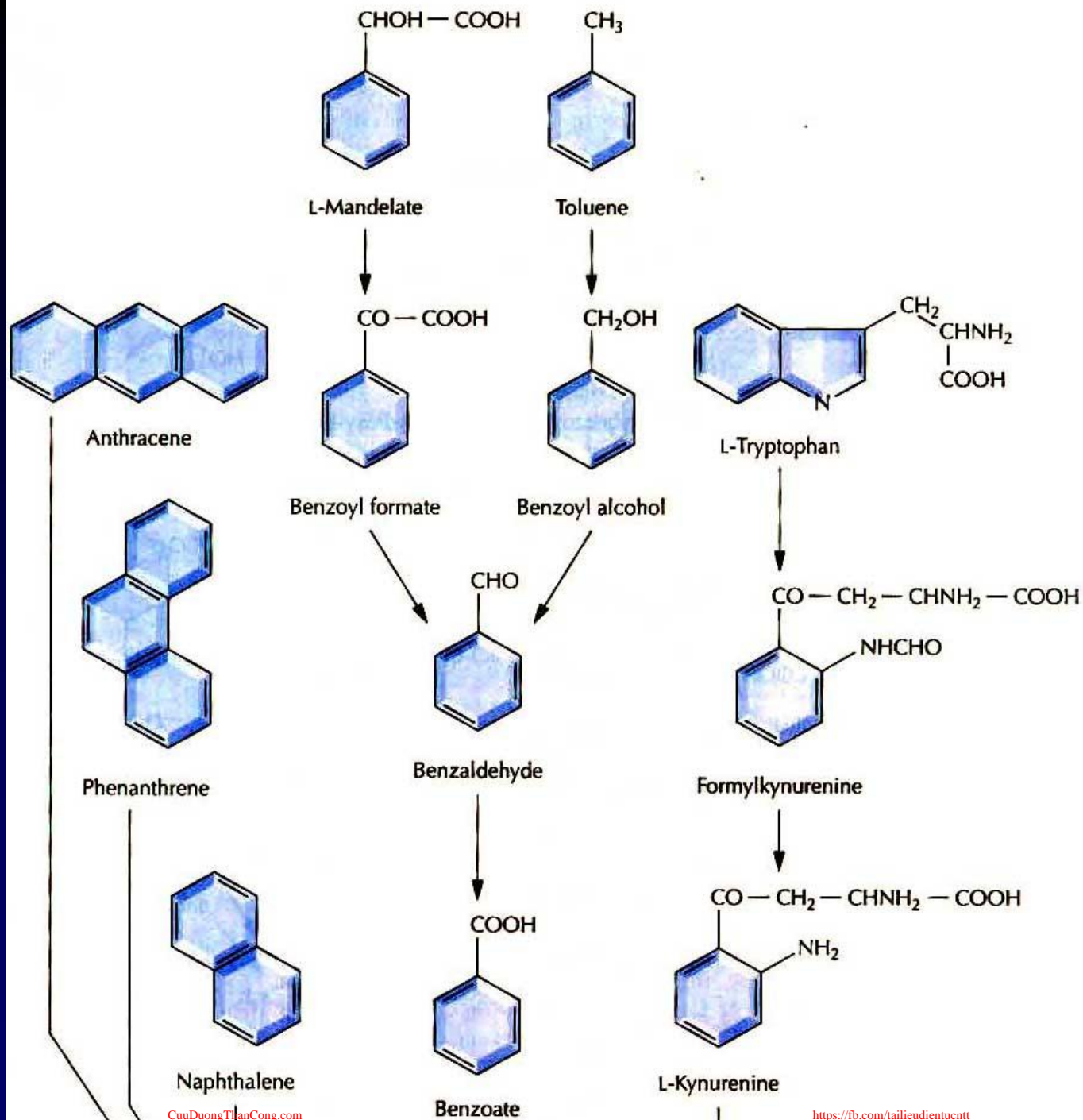
1. PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT DỊ SINH
2. CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG
3. THỦY PHÂN CELLULOSE
4. SẢN XUẤT SINH KHỐI

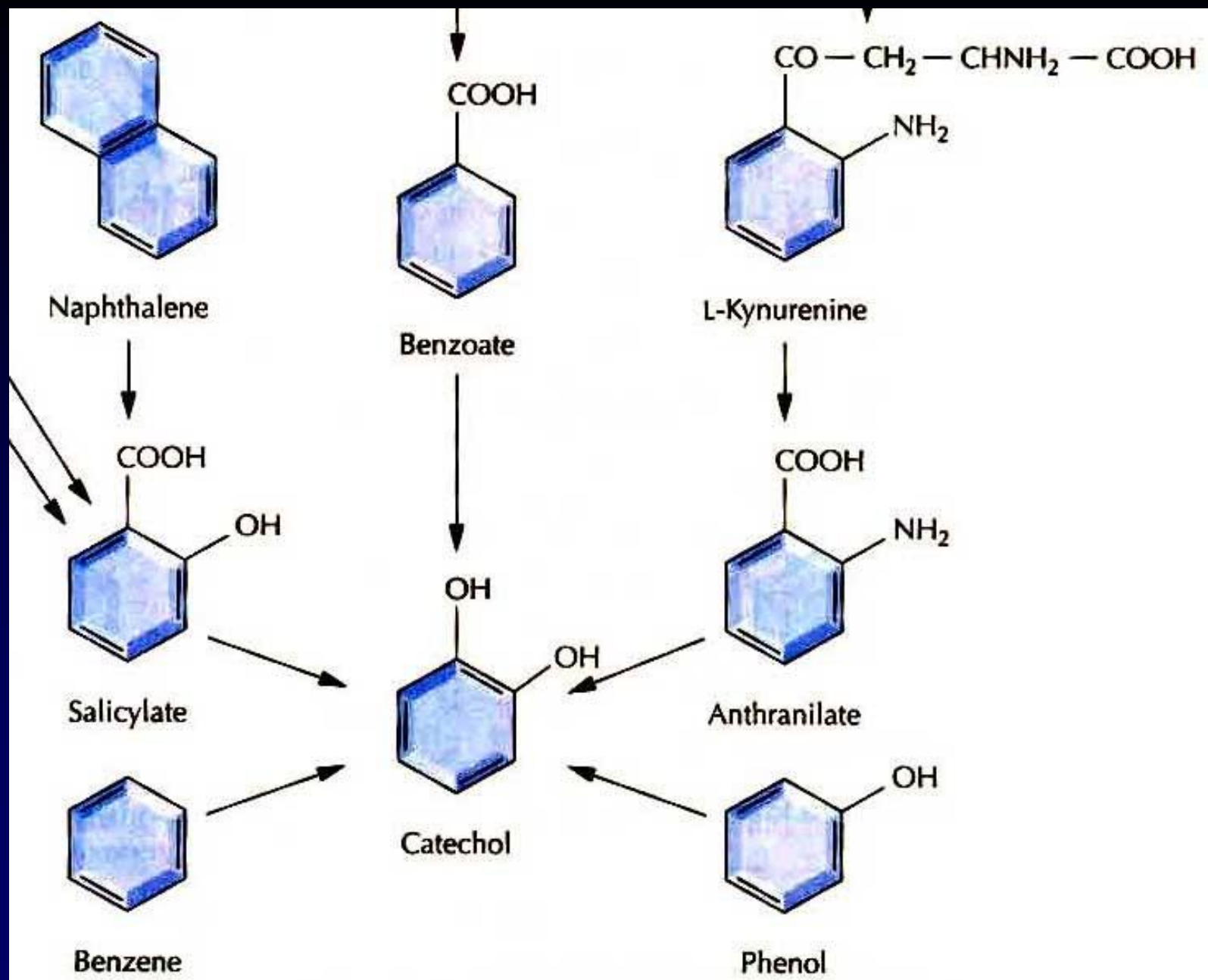
PHÂN HỦY CÁC CHẤT DỊ SINH BỞI VI KHUẨN

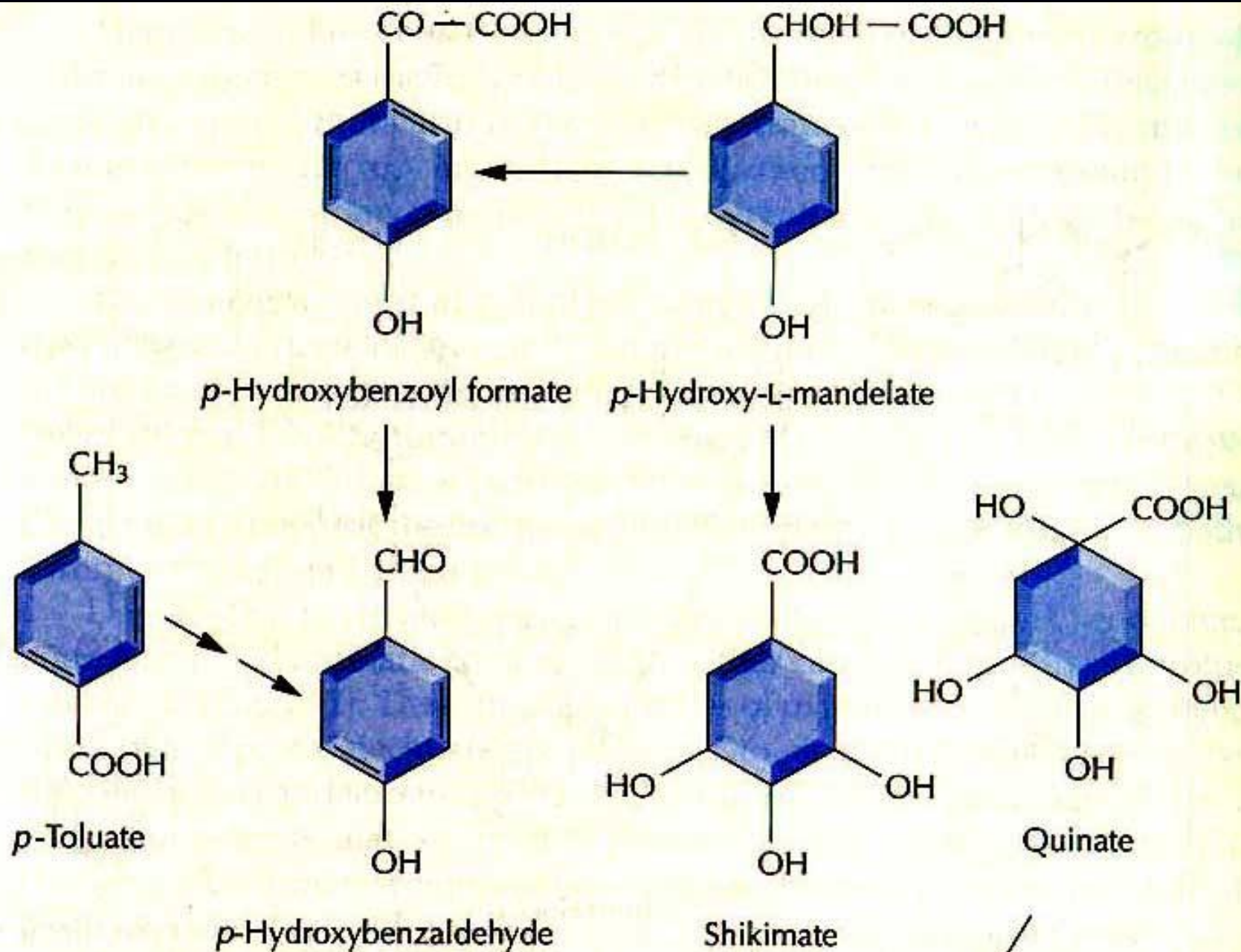
- + Xử lý sinh học môi trường (bioremediation): ứng dụng vi sinh vật để làm sạch môi trường chứa các chất gây ô nhiễm.
- + Giống *Pseudomonas* có các plasmid (50 - 200kb) mã hóa enzyme thủy phân hơn 100 hợp chất hữu cơ chứa nhân thơm hoặc nhóm halogen.

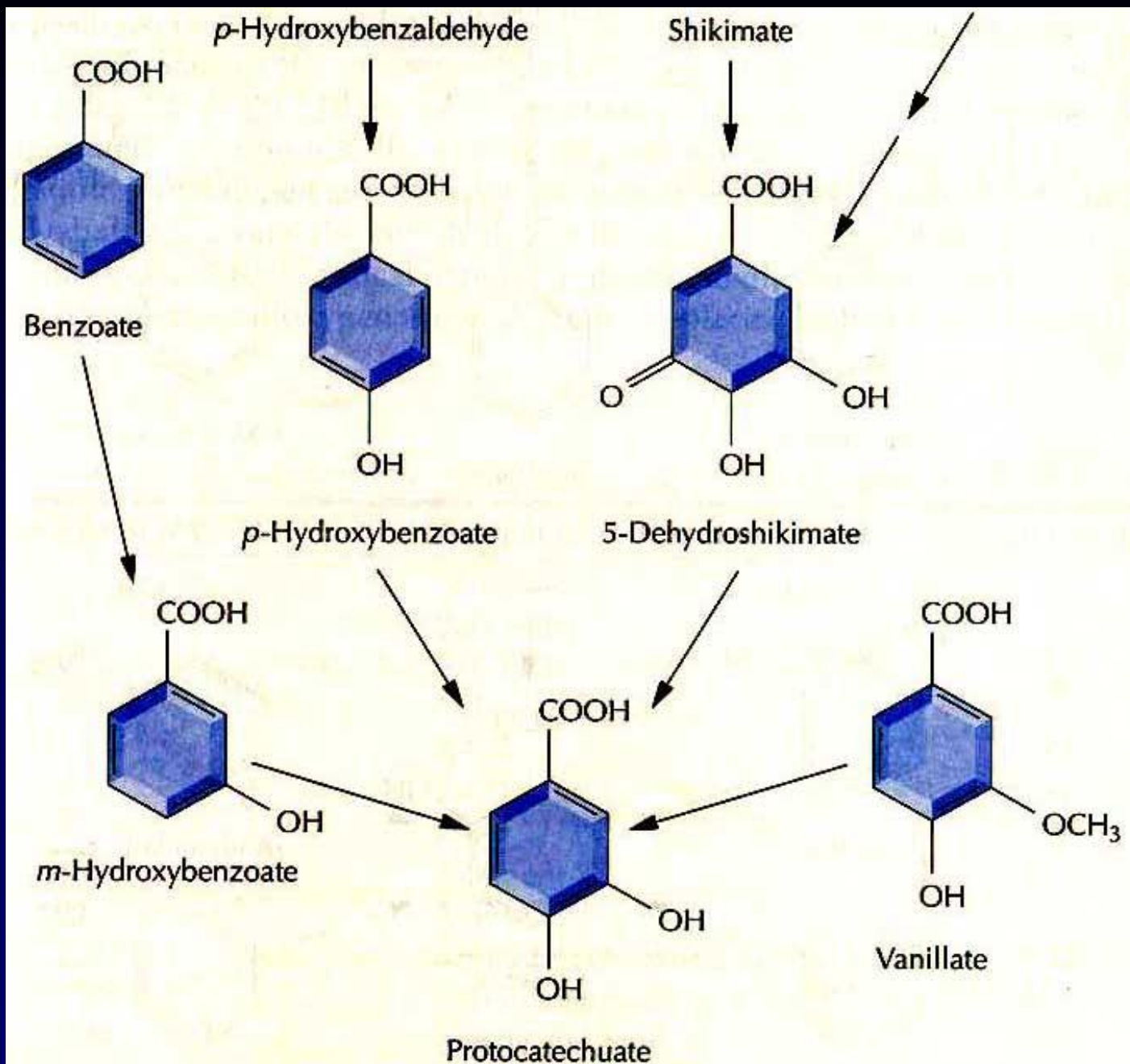
PHÂN HỦY CÁC CHẤT DỊ SINH BỞI VI KHUẨN

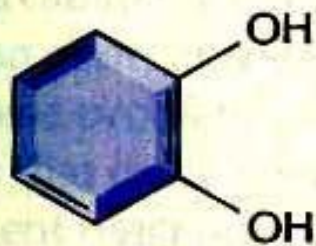
- + Các hợp chất nhân thơm được biến đổi thành catechol hoặc protocatechuate sau đó bị ôxi hóa thành acetyl-CoA và succinate hoặc pyruvate và acetaldehyde.
- + Các hợp chất nhân thơm bị halogen hóa được biến đổi thành catechol, protocatechuate hydroxyquinone hoặc các dẫn xuất halogen tương ứng bằng những enzyme tham gia chuyển hóa các chất hữu cơ nhân thơm bình thường.
- + Nhóm halogen được thay bằng nhóm hydroxyl bởi phản ứng xúc tác bởi dioxygenase.



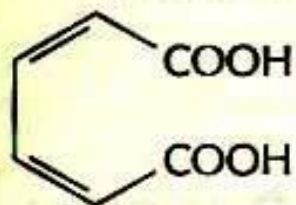
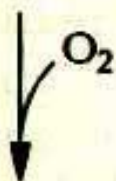




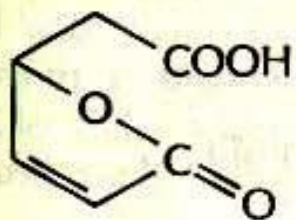




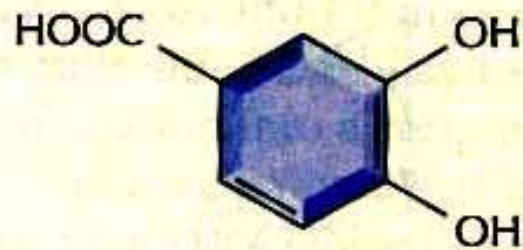
Catechol



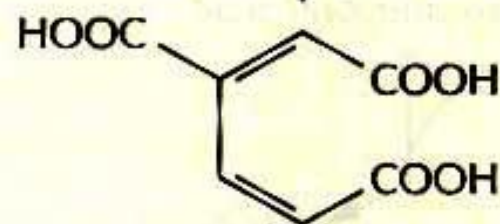
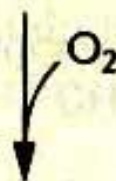
cis, cis-Muconate



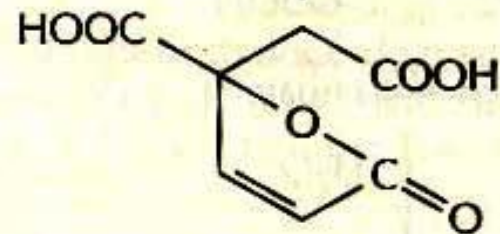
Muconolactone



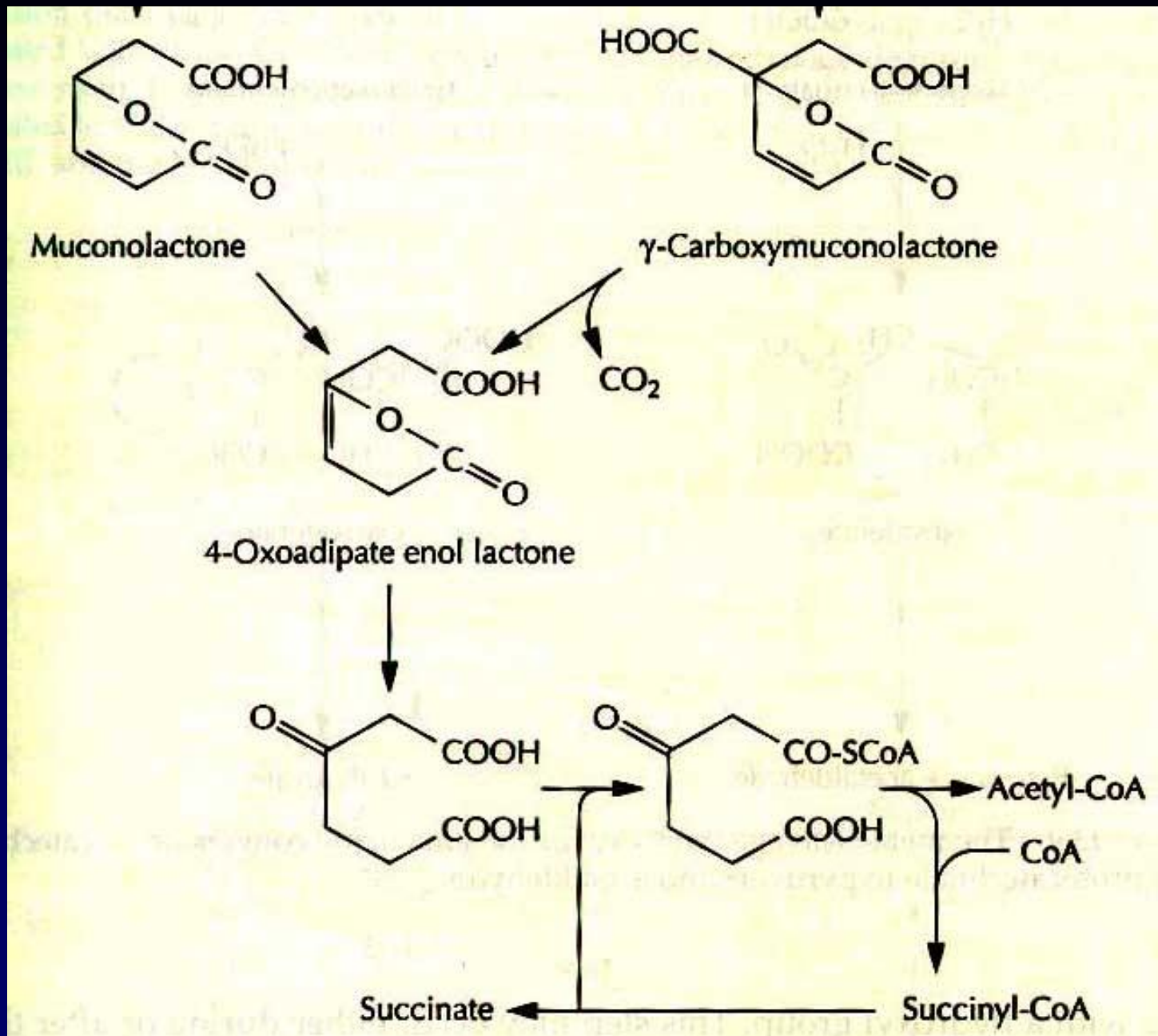
Protocatechuate

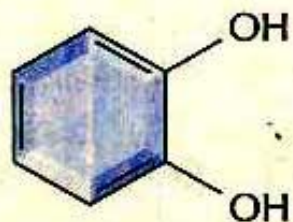


β -Carboxy *cis, cis*-muconate

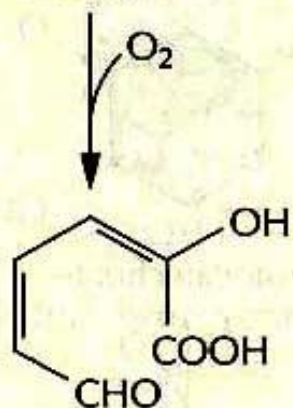


γ -Carboxymuconolactone

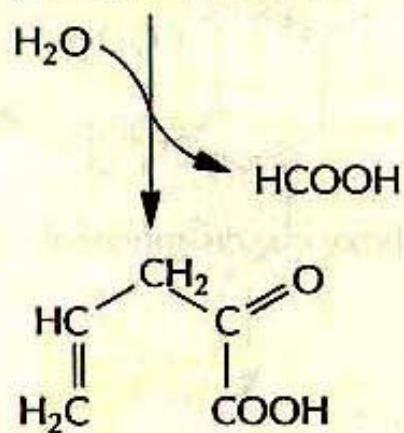




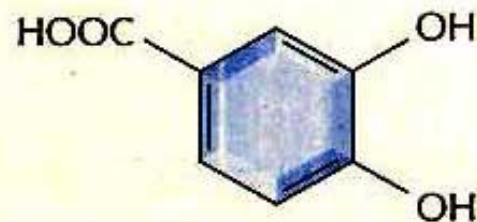
Catechol



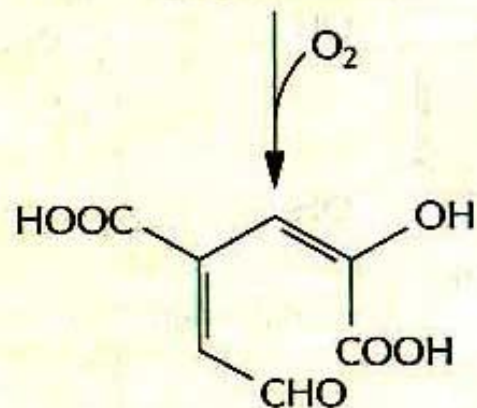
2-Hydroxymuconic acid



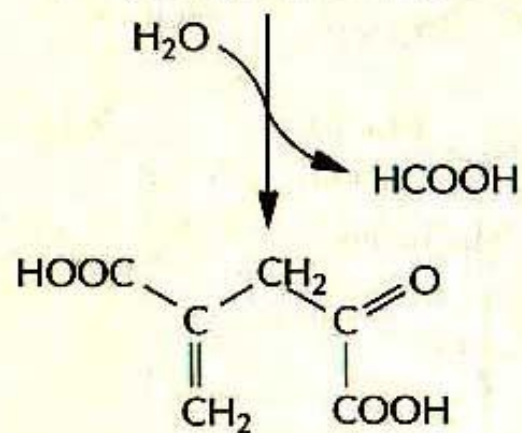
Oxopent-4-enoate



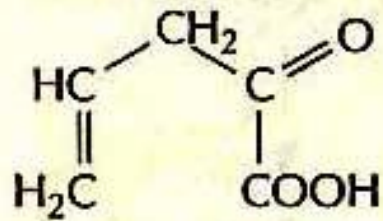
Protocatechuate



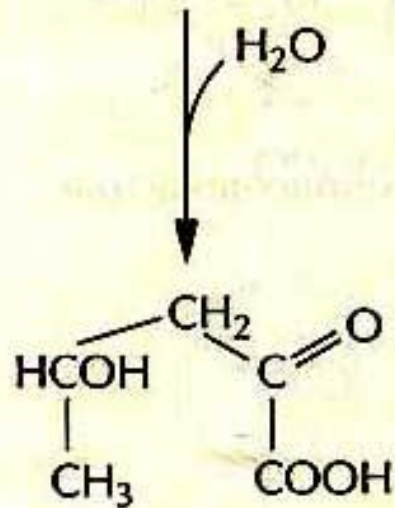
2-Hydroxy semialdehyde



Carboxypentenoate

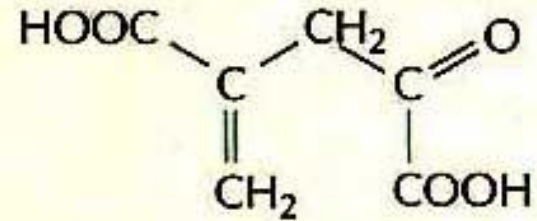


Oxopent-4-enoate

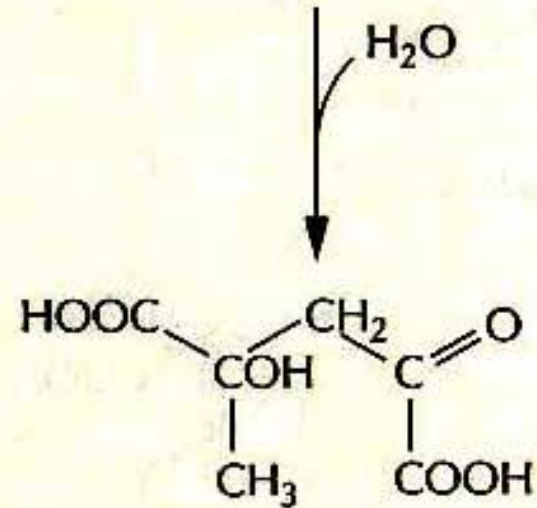


Oxovalerate

Pyruvate + acetaldehyde



Carboxypentenoate



Oxovalerate

2 Pyruvate

NHUỘC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG PHÂN HỦY CHẤT DỊ SINH TỰ NHIÊN

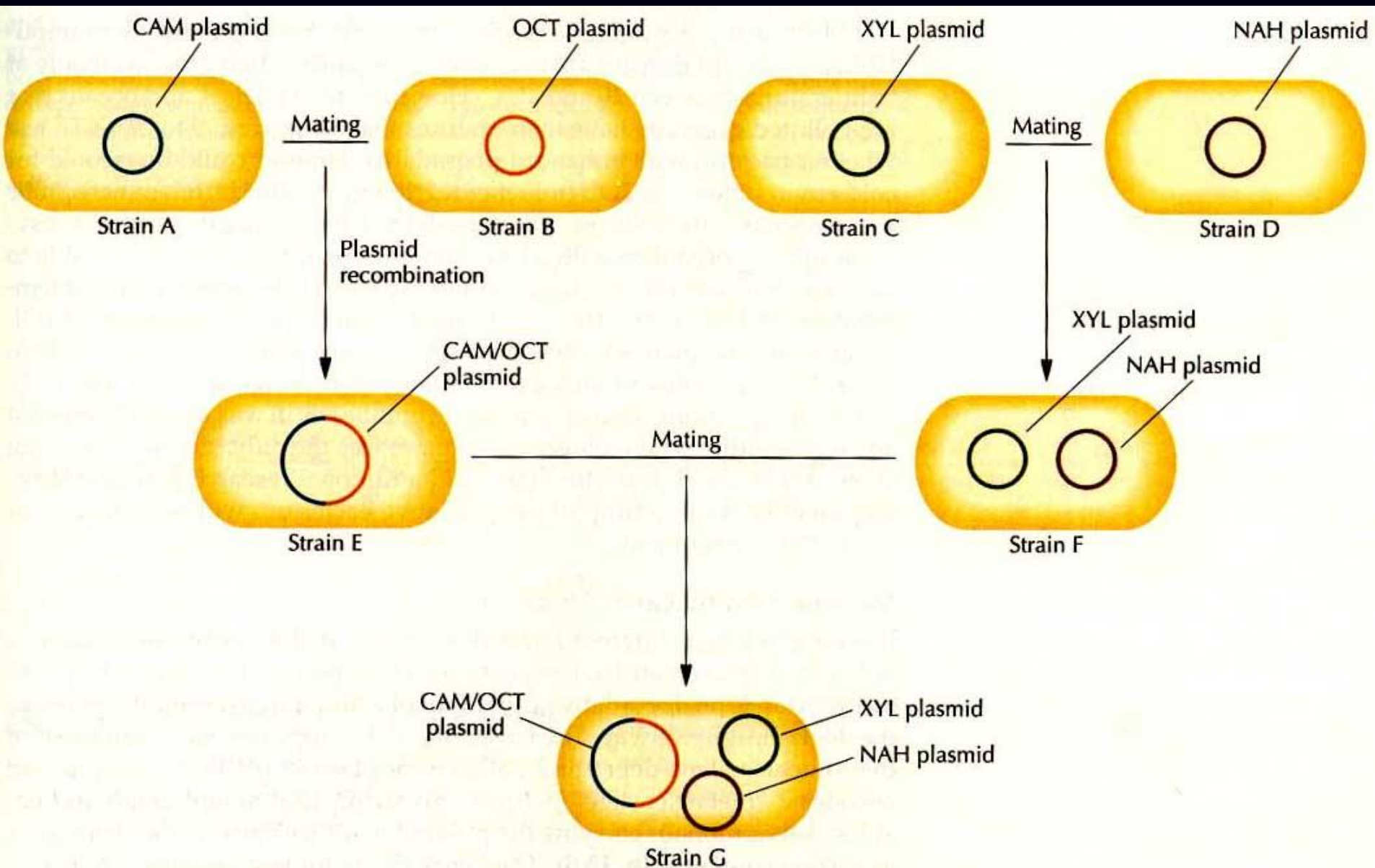
- Mỗi chủng chỉ phân hủy một hoặc vài chất**
- Nồng độ chất dị sinh cao thường ức chế sự tăng trưởng của chủng**
- Thường bị ức chế tăng trưởng bởi chất dị sinh khác cùng hiện diện**
- Sự hấp phụ lên các chất mang trong đất hoặc bùn hạn chế sự phân hủy bởi vi sinh vật**
- Tốc độ phân hủy chậm**

BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CÁC CON ĐƯỜNG PHÂN HỦY SINH HỌC

- Dùng giao nạp hoặc kỹ thuật gen
- Đưa plasmid từ nhiều chủng *Pseudomonas* khác nhau vào chung trong một tế bào chủ tạo ra chủng có khả năng phân hủy nhiều cơ chất khác nhau.
- Nới rộng dải cơ chất có thể bị phân hủy bởi một con đường sinh hóa.

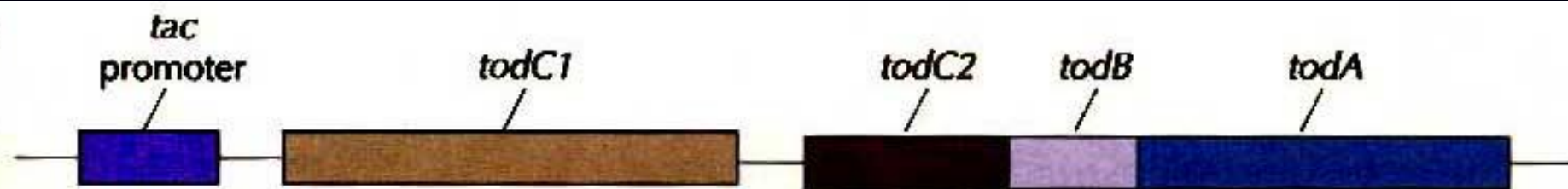
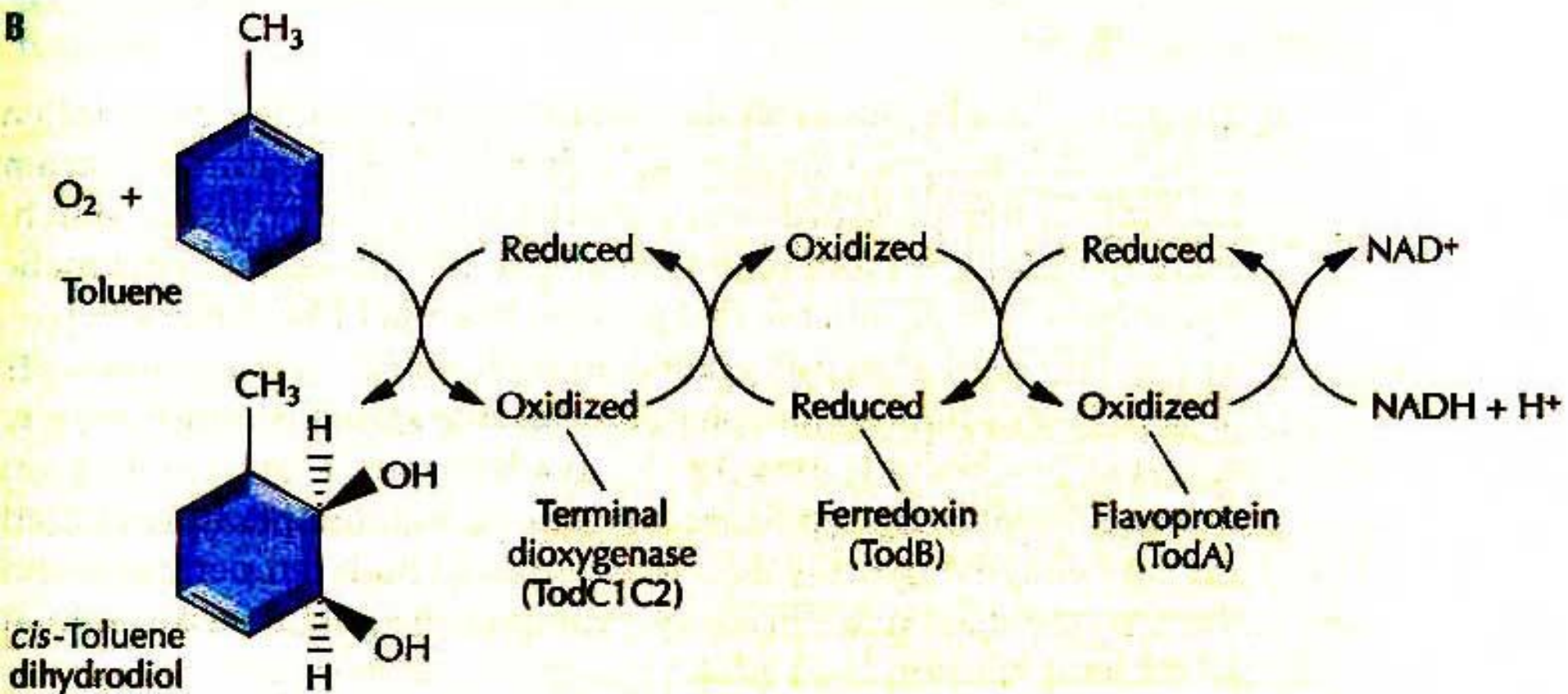
BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN BẰNG GIAO NẠP

- Dùng giao nạp để chuyển vào cùng một chủng nhận nhiều plasmid khác nhau mang các gen của các con đường phân hủy khác nhau.
- Các plasmid tái tổ hợp tương đồng tạo ra plasmid dung hợp chứa nhiều gen phân hủy hoặc cùng hiện diện bên trong tế bào.
- Ví dụ: sự tạo thành chủng có thể đồng thời phân hủy camphor (CAM), octane (OCT), xylene (XYL), naphthalene (NAH) của dầu thô.



BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN BẰNG KỸ THUẬT GEN

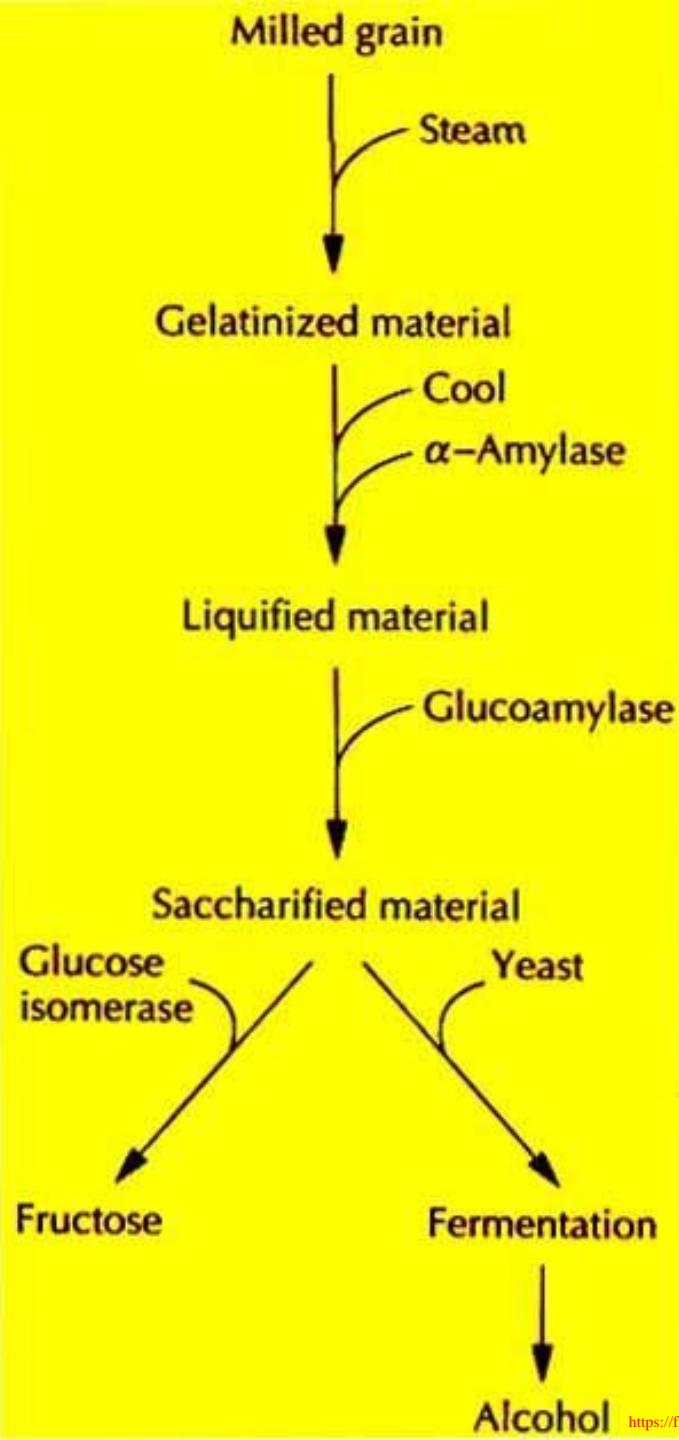
- Tạo chủng *E. coli* mang operon toluene dioxygenase thủy phân toluene và trichloroethylene.
- Các gen *todA*, *todB*, *todC1*, *todC2* từ *Pseudomonas putida* được dòng hóa vào *E. coli* dưới sự kiểm soát của tac promoter.
- Khi được cảm ứng bằng IPTG toluene và trichloroethylene được phân hủy mất hoạt tính.
- Chủng *E. coli* tái tổ hợp này có ưu điểm hơn chủng *P. putida* ban đầu là có khả năng phân hủy cao hơn.

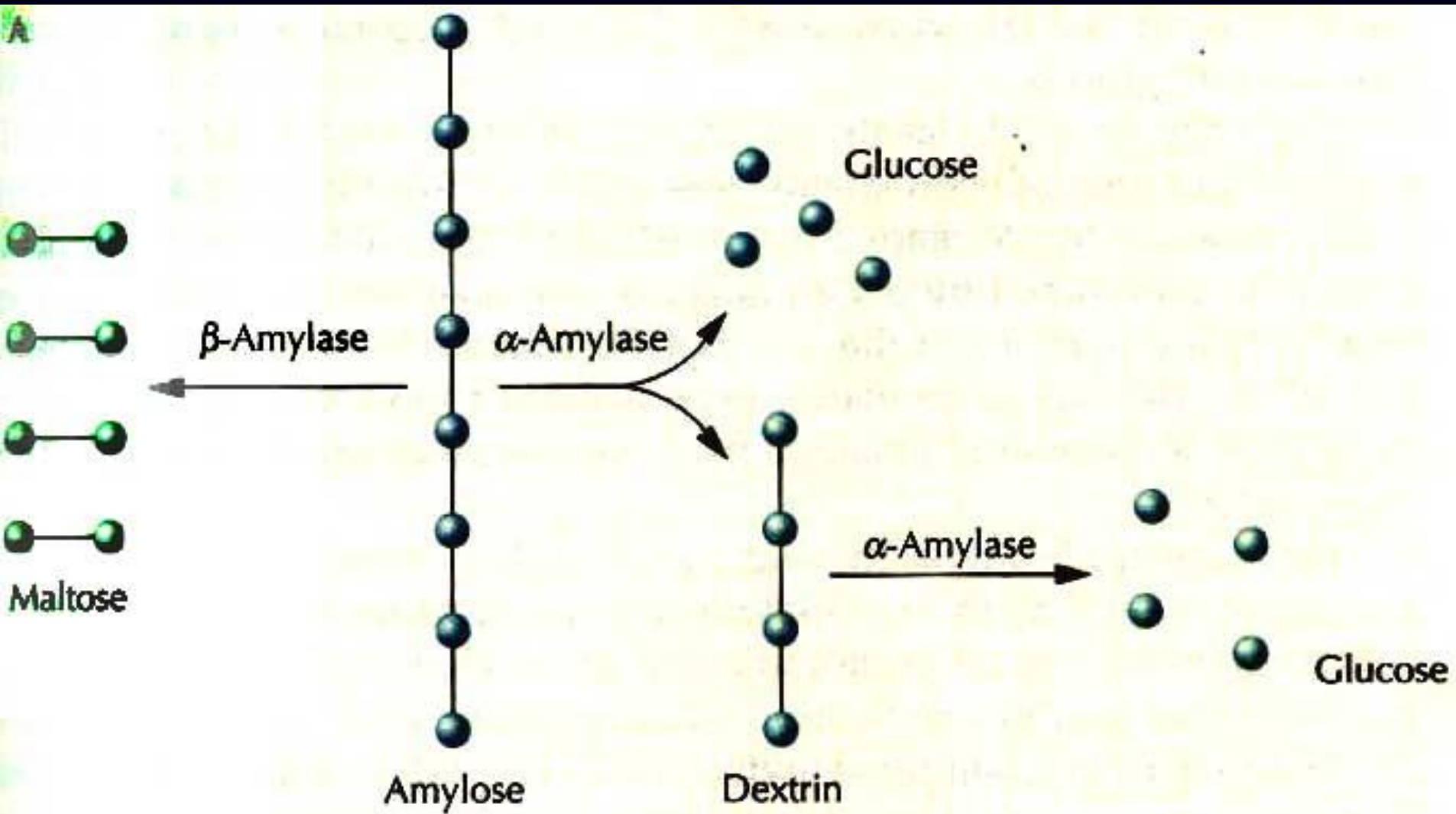
A**B**

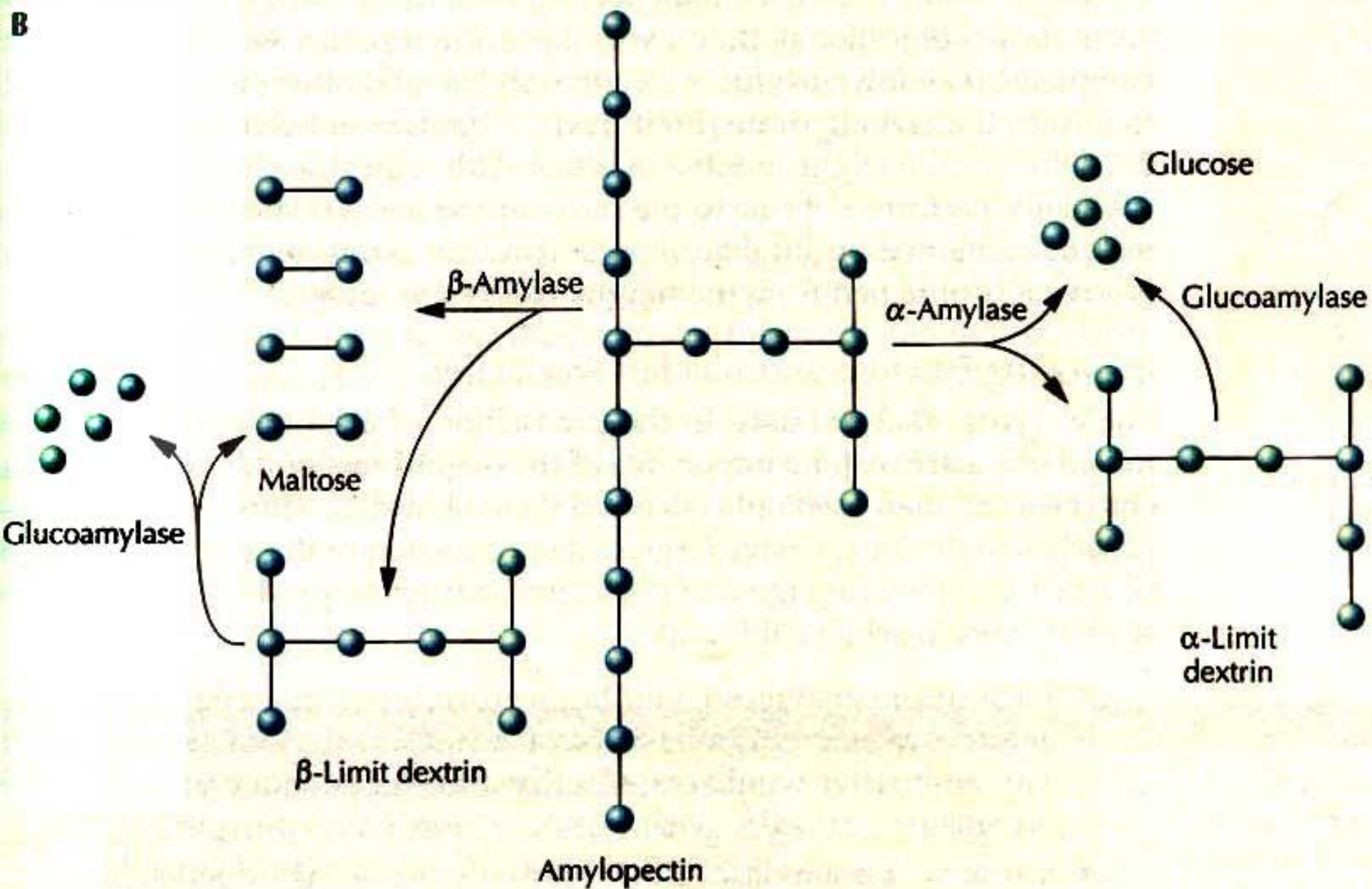
1. PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT DỊ SINH
2. CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG
3. THỦY PHÂN CELLULOSE
4. SẢN XUẤT SINH KHỐI

ENZYZME CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG

- α -Amylase thủy phân ngẫu nhiên liên kết α -1,4 tạo hỗn hợp glucose, maltose, maltotriose, các đoạn α -limit dextrin, dùng để dịch hóa tinh bột
- β -Amylase thủy phân liên kết α -1,4 từ hai đầu tạo ra maltose và các đoạn β -limit dextrin.
- Glucoamylase thủy phân α -1,3, α -1,4 và α -1,6 tạo glucose, dùng để đường hóa tinh bột hoặc thủy phân các đường còn lại trong bia.
- Glucose isomerase được dùng để chuyển hóa glucose thành fructose.





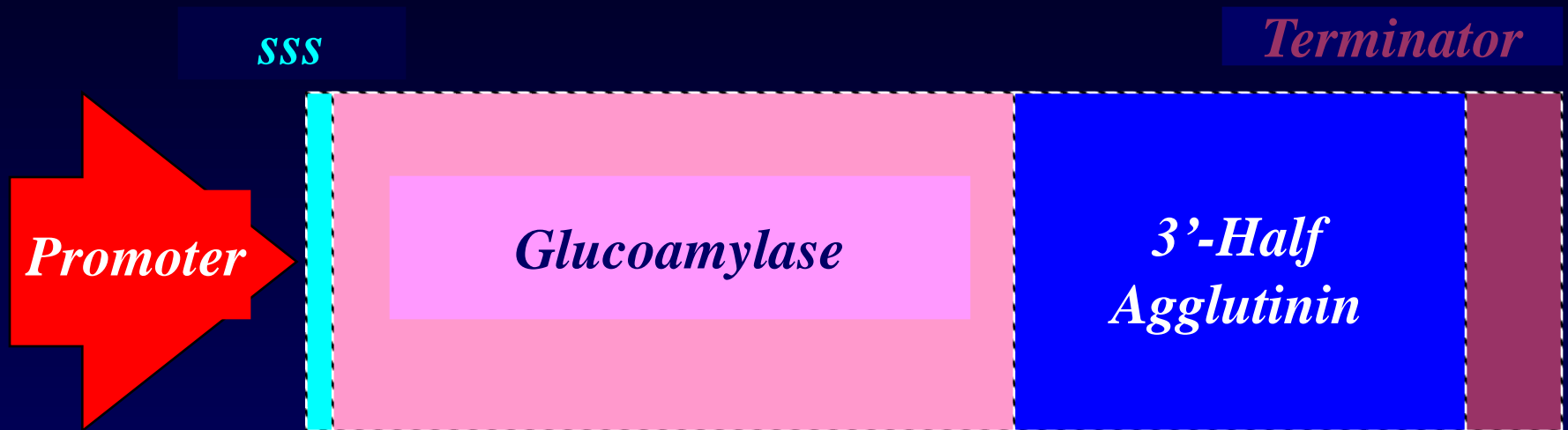
B

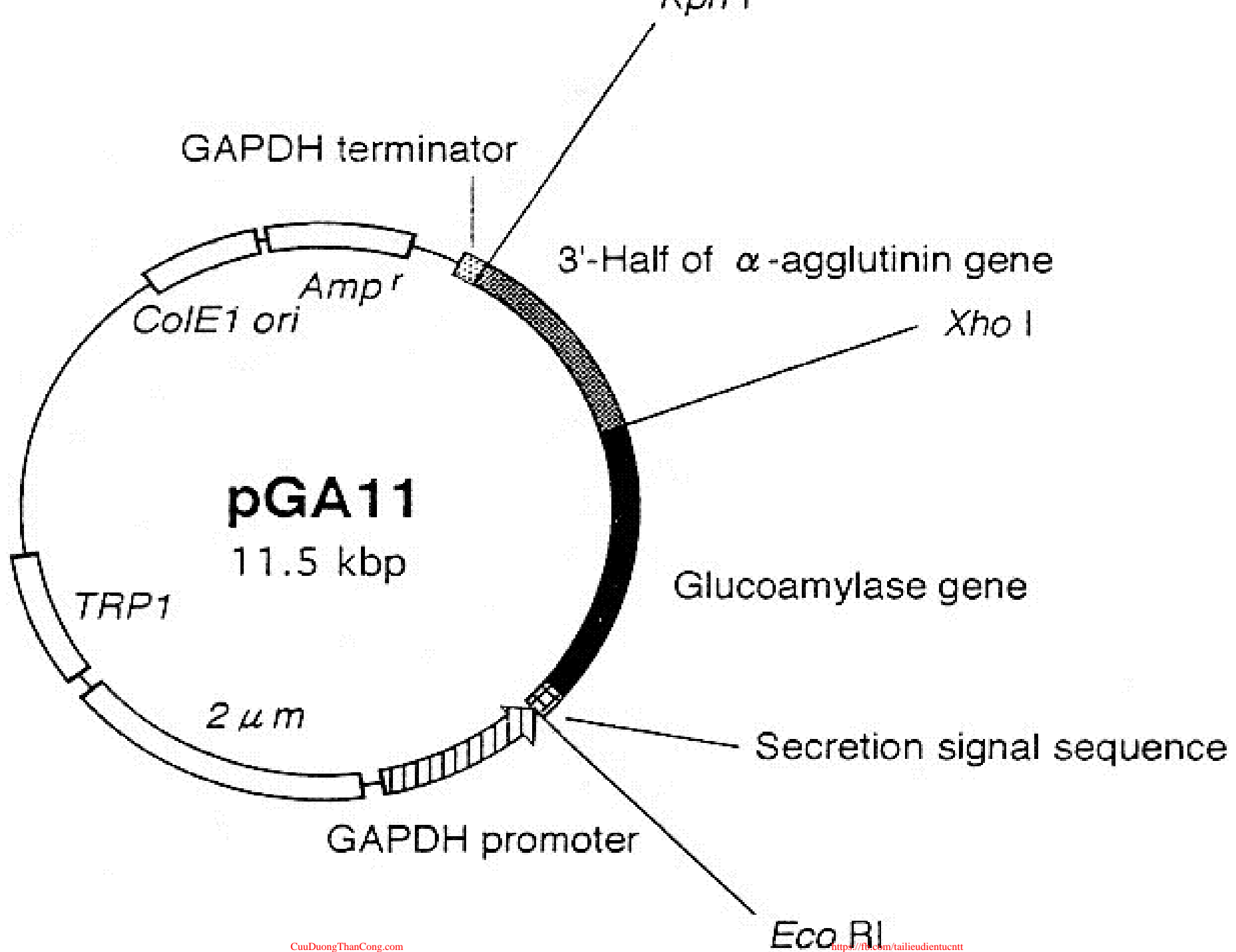
CẢI BIẾN ENZYME CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG

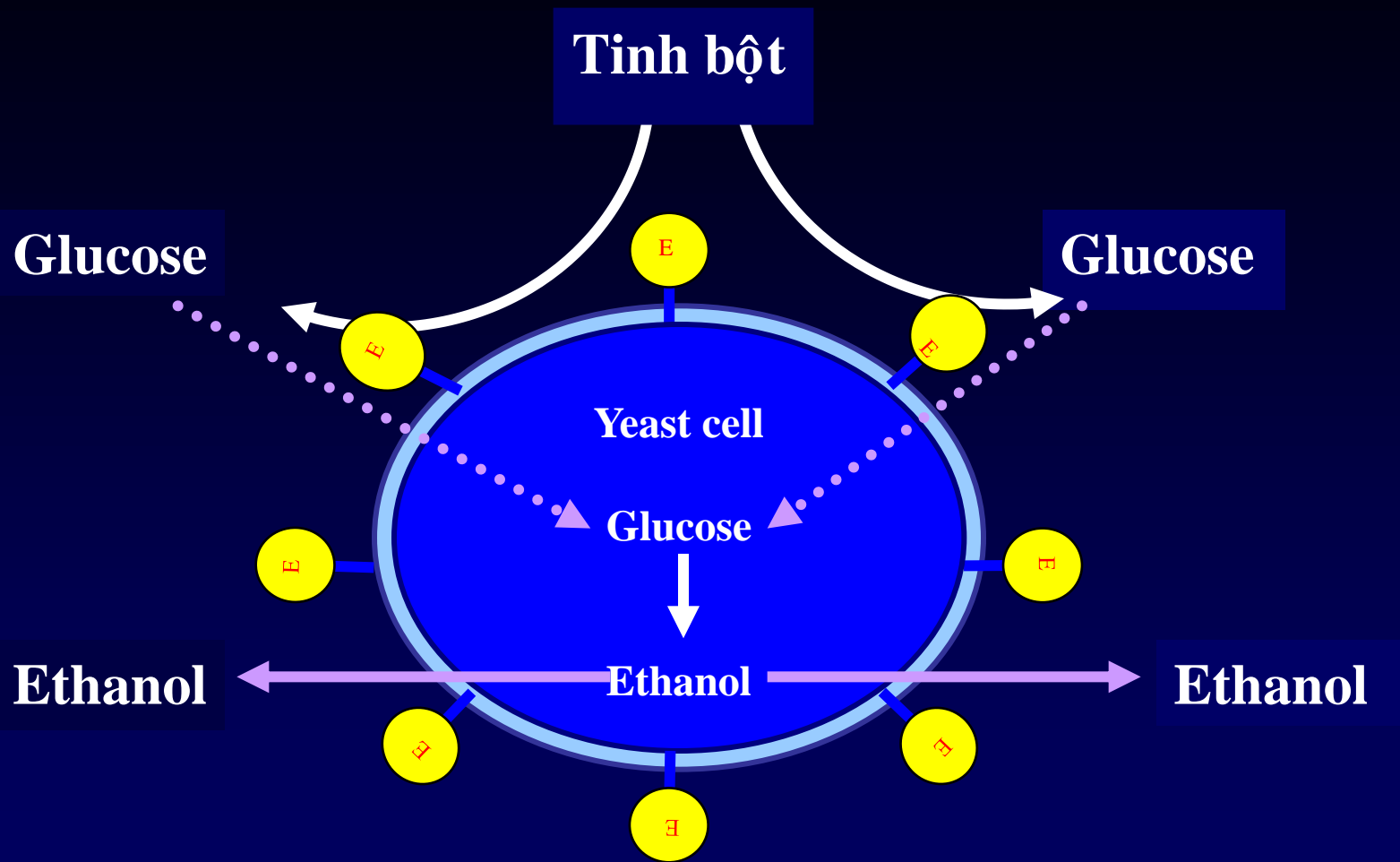
- Biểu hiện vượt mức trong tế bào tăng trưởng nhanh trên cơ chất rẻ tiền.
- Dùng α -amylase chịu nhiệt trong bước hồ hóa để làm giảm thời gian và số lượng enzyme cần thiết.
- Tạo α -amylase và glucoamylase có cùng nhiệt độ và pH tối ưu để thực hiện dịch hóa và đường hóa ở chung một điều kiện.
- Dùng enzyme thủy phân tinh bột sống để loại bỏ bước hồ hóa, giảm chi phí năng lượng.
- Tạo chủng nấm men có glucoamylase để bỏ bước đường hóa trong lên men cồn.

TẠO CHỦNG NẤM MEN BIỂU HIỆN GLUCOAMYLASE TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO

- Gen mã hóa glucoamylase được dòng hóa vào giữa vùng kiểm soát tiết sss và vùng 3' của gen agglutinin, dưới sự kiểm soát của GAPD promoter.
- Đoạn gen tổ hợp này được sát nhập vào nhiễm sắc thể nấm men thông qua trao đổi đoạn tương đồng.
- Chọn lọc dòng tái tổ hợp bằng trp-.
- Nấm men tạo thành có hoạt tính thủy phân tinh bột.





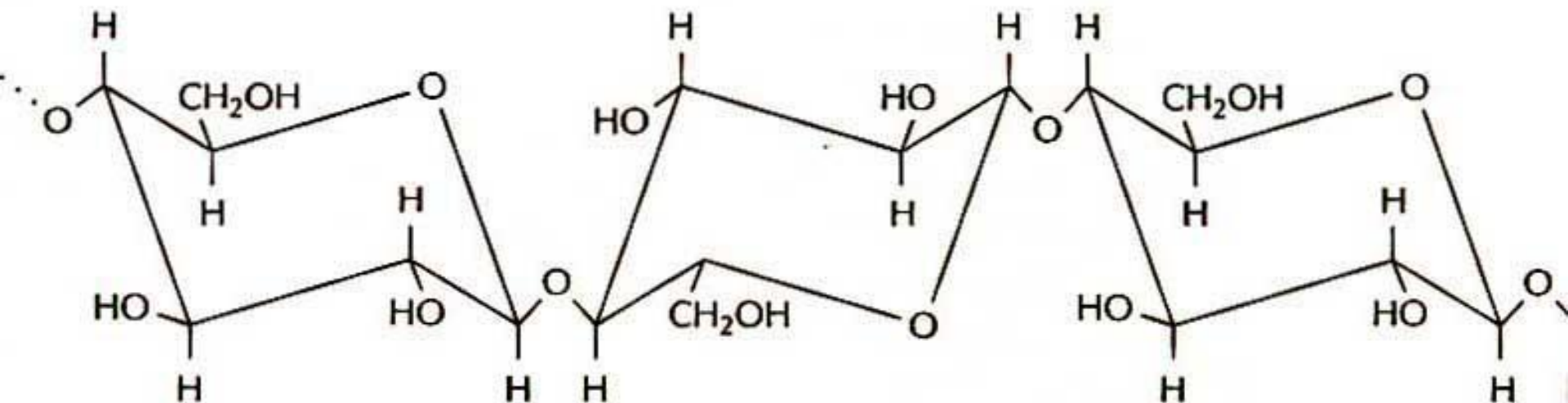


1. PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT DỊ SINH
2. CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG
3. THỦY PHÂN CELLULOSE
4. SẢN XUẤT SINH KHỐI

THÀNH PHẦN VÀ CẤU TRÚC LIGNOCELLULOSE

- Lignocellulose: lignin, cellulose, hemicellulose
- Lignin: polymer của phenylpropane, tạo liên kết hóa học với hemicellulose bao quanh sợi cellulose.
- Hemicellulose: các polymer mạch ngắn của hexose và pentose.
 - + Xylan: sợi poly- β -1,4-xylan với nhánh bên là arabinose, glucuronic acid, arabinoglucuronic acid; thường hiện diện trong gỗ cứng.
 - + Mannan: glucomannan, galactomannan; thường hiện diện trong gỗ mềm.
 - + Arabinogalactan.
- Cellulose: homopolymer của glucose nối với nhau bằng β -1,4-glucoside.

Figure 13.14 Structure of a portion of a cellulose chain. Glucose residues are joined head to tail by β -1,4-linkages.



THỦY PHÂN CELLULOSE BẰNG CELLULASE

+ Cellulase: các enzyme thủy phân liên kết β -1,4-glucoside:

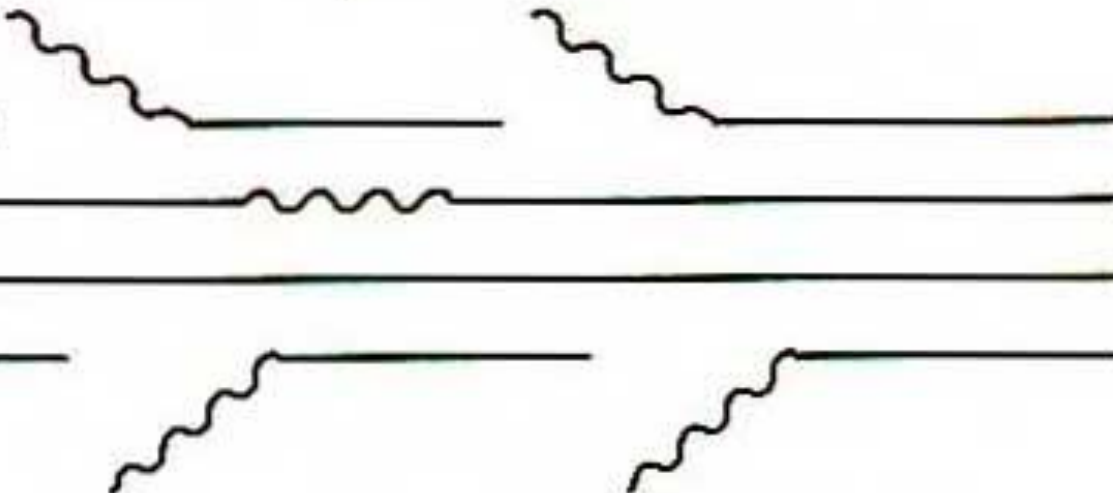
- Endoglucanase: thủy phân β -1,4- giữa hai phân tử glucose trong vùng vô định hình, tạo các mạch ngắn.
- Exoglucanase: thủy phân từ hai đầu tạo glucose, cellobiose (hai glucose), cellotriose (ba glucose).
- Cellobiohydrolase: exoglucanase thủy phân từ hai đầu tạo các mạch khoảng 10 glucose.
- β -Glucosidase (cellobiase): thủy phân cellobiose, cellotriose thành glucose.

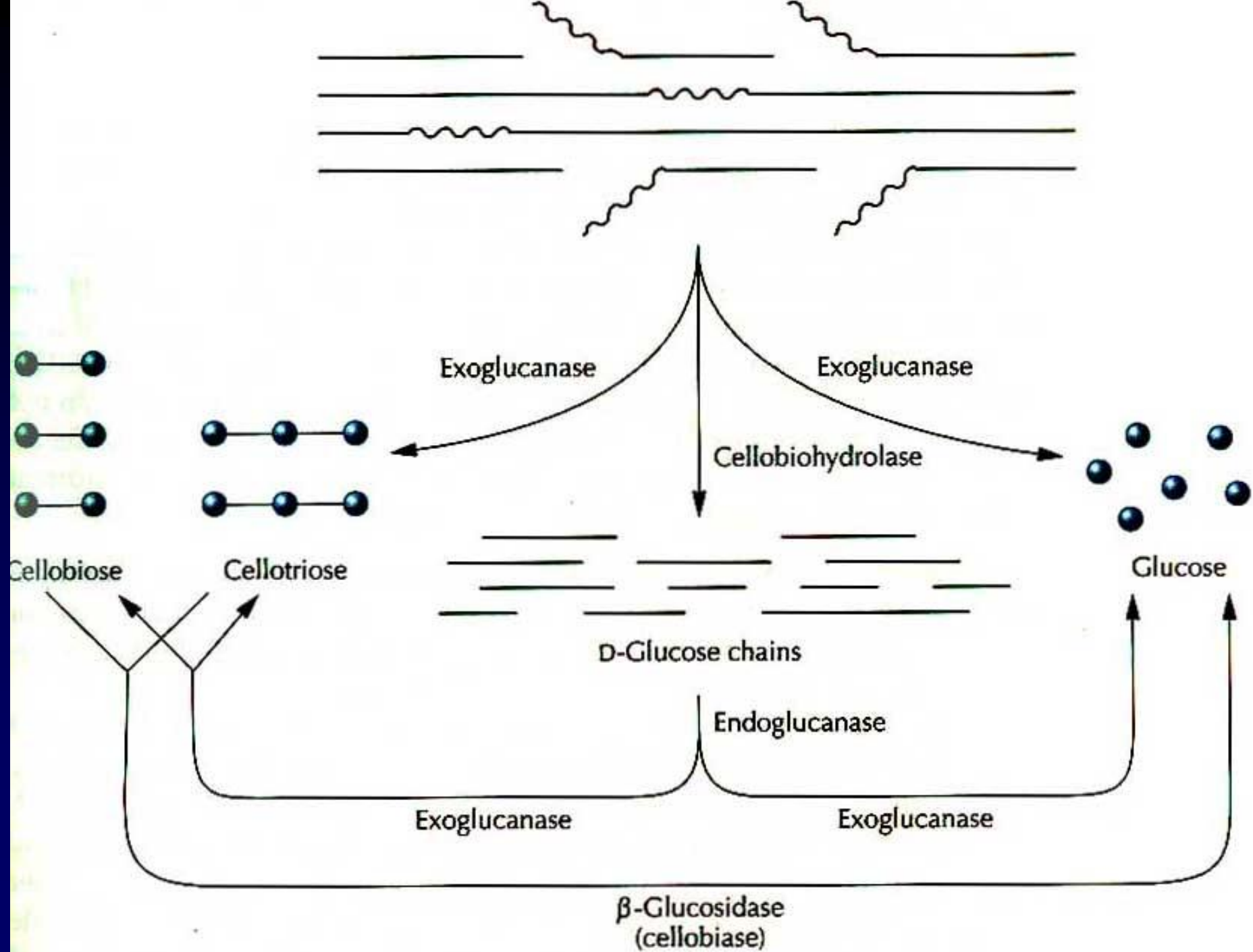
Crystalline region

Amorphous region

Cellulose

Endoglucanase





TẠO DÒNG BIỂU HIỆN GEN CELLULASE

- Tạo ngân hàng bộ gen biểu hiện của đối tượng vi sinh vật quan tâm trong *E. coli*.
- Tuyển chọn dòng biểu hiện cellulase bằng môi trường chứa CMC tạo vòng phân hủy CMC.
- Đối với chủng không tạo cellulase tiết, việc tuyển chọn sẽ dựa trên phương pháp lai miễn dịch hoặc lai Southern.
- Dòng có hoạt tính β -glucosidase được phát hiện bằng môi trường có nguồn C duy nhất là cellubiose hoặc cơ chất tổng hợp là X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside).

1. PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT DỊ SINH
2. CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG
3. THỦY PHÂN CELLULOSE
4. SẢN XUẤT SINH KHỐI

SẢN XUẤT SINH KHỐI

- + Các dạng sinh khối như lúa mì, các alkane từ dầu khí, chất thải cellulose và methane được dùng làm cơ chất để tạo protein đơn bào SCP.
- + SCP dùng làm chất bổ sung thực phẩm cho người và động vật.
- + Có thể tạo ra SCP làm chất bổ sung thực phẩm rẽ tiền bằng con đường kỹ thuật di truyền.