

CHƯƠNG 8.

CÔNG NGHỆ SINH HỌC PHÂN TỬ VI SINH VẬT

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, SẢN XUẤT SINH KHỐI

1. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ (MOLECULAR DIAGNOSTICS)

+ So sánh các phương pháp phát hiện, chẩn đoán VSV gây bệnh

<i>Phương pháp</i>	<i>Ưu điểm</i>	<i>Nhược điểm</i>
Kính hiển vi	Đơn giản Phát hiện trực tiếp Phân biệt các sinh vật khác hình thái	Chậm, tốn công sức Độ nhạy thấp Không phân biệt hai VSV giống hình thái Cần tay nghề
Nuôi cấy, nhiễm chuột	Chỉ phát hiện ký sinh gây bệnh còn sống Đo lường được mức ác tính và mức nhiễm	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	Nhanh, đơn giản Có thể tự động hóa được Có thể sàng lọc số lượng mẫu lớn	Có trường hợp tính chuyên biệt thấp Không phân biệt được dạng hoạt động và dạng tiềm tàng
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 Có thể tự động hóa	Đắt tiền, nhiều bước Không phân biệt được dạng sống và chết Có thể cho dương tính giả và âm tính giả

1.1. CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH (IMMUNO DIAGNOSTICS)

+ Kỹ thuật ELISA:

- Mẫu xét nghiệm được cố định trên một giá thể rắn;
- Kháng thể chuyên biệt đối với kháng nguyên mục tiêu được bổ sung. Kháng thể này được gọi là kháng thể sơ cấp (bậc một, thường trên thỏ).
- Kháng thể thứ cấp (bậc 2) ở dạng phức hợp (tiếp hợp, conjugate) với một enzyme được bổ sung vào. Kháng thể này là dạng kháng-kháng thể sơ cấp.
- Một cơ chất không màu được bổ sung, sẽ 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.

+ Ứng dụng: kỹ thuật ELISA đã được dùng để phát hiện nhiều loại protein, nhận diện virus, 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:

- Lượng các loại kháng thể khác nhau dao động tùy theo mẻ
- Kháng thể đa dòng không phân biệt được các chủng có chung một yếu tố quyết định kháng nguyên

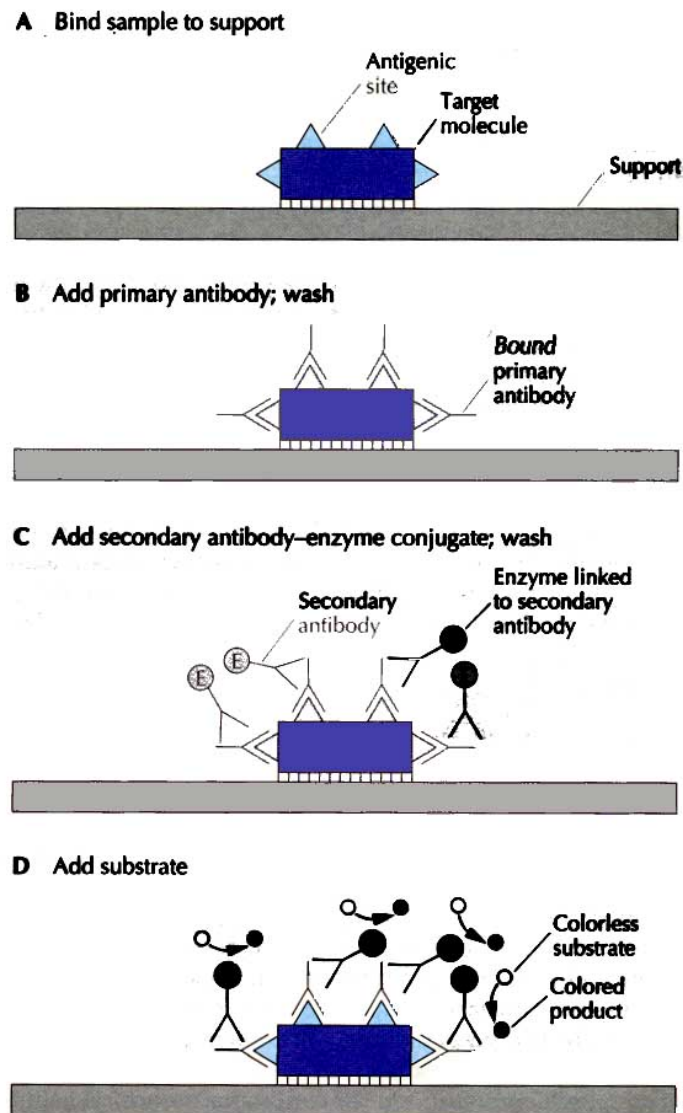


Figure 9.1 Generalized ELISA protocol for detecting a target antigen. The enz (E) is conjugated to the secondary antibody.

1.2. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG (MONOCLONAL ANTIBODY)

+ Kháng thể đơn dòng: 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.

+ Quy 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 ung thư tủy xương bằng polyethylene glycol tạo tế bào lai (hybrid cell). tế bào ung thư tủy xương có kiểu hình HGPRT⁻ (không có enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase). HGPRT cần cho tổng hợp purine (A, G) từ hypoxanthine.

- Chuyển lên môi trường HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine). Aminopterin kìm hãm hoạt tính của dihydrofolate reductase (xúc tác tổng hợp purine)
- Chỉ tế bào lai có đặc tính phân chia của tế bào ung thư và HGPRT của tế bào lách có thể tăng trưởng trên môi trường HAT.
- Tách thu nhận tế bào đơn, nuôi cấy, kiểm tra khả năng tạo kháng thể

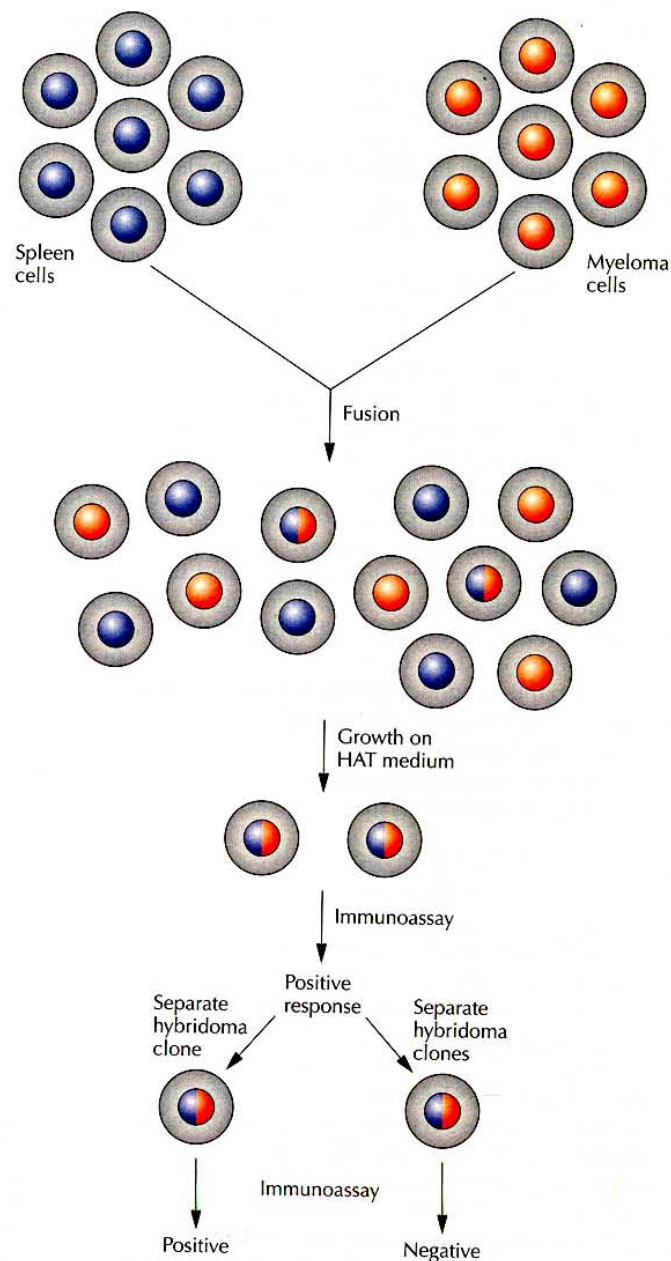


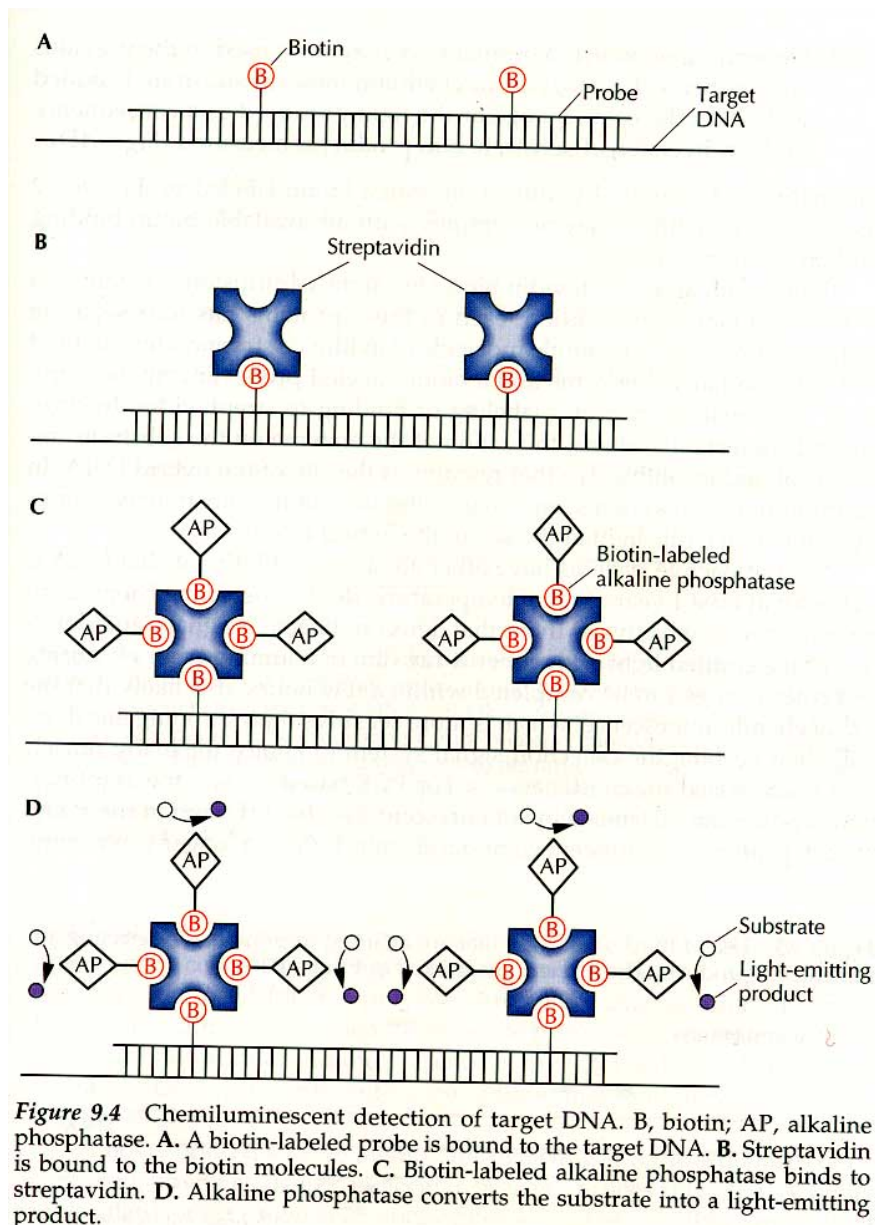
Figure 9.2 Screening for the production of a monoclonal antibody. Spleen cells from a mouse that was immunized with a specific antigen are isolated and fused in culture with myeloma cells that do not produce antibody chains. Fused cells are selected for the ability to grow on HAT medium, which contains hypoxanthine, aminopterin, and thymidine. Cells that produce a specific antibody to the immunizing antigen (hybridomas) are identified by an immunoassay and individually subcultured. A hybridoma, which grows in culture and secretes a single type of antibody molecules, is the source of a monoclonal antibody.

- + Kháng thể đơn dòng (nguyên vẹn hoặc đoạn Fv) tái tổ hợp trong *E. coli*
- + Các phân tử mục tiêu 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

1.3. CHẨN ĐOÁN BẰNG DNA (DNA DIAGNOSTICS SYSTEMS)

1.3.1. 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
- + Đánh dấu và phát hiện mẫu dò bằng phóng xạ: ^{32}P , phát hiện bằng phim X quang
- + Đánh dấu và phát hiện mẫu dò bằng không dùng phóng xạ: dựa vào sự tạo màu hoặc phát quang
 - Đánh dấu gián tiếp: bằng biotin (hoặc digoxigenin)
 - Mẫu dò được đánh dấu bằng cách đưa 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
 - Đánh dấu trực tiếp: mẫu dò được đánh dấu bằng cách tạo phức hợp cộng hóa trị với enzyme (peroxidase)



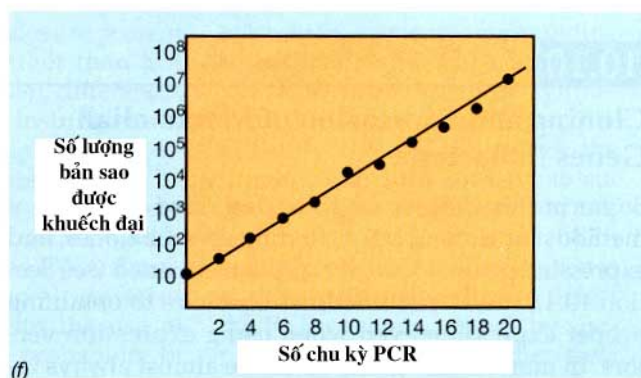
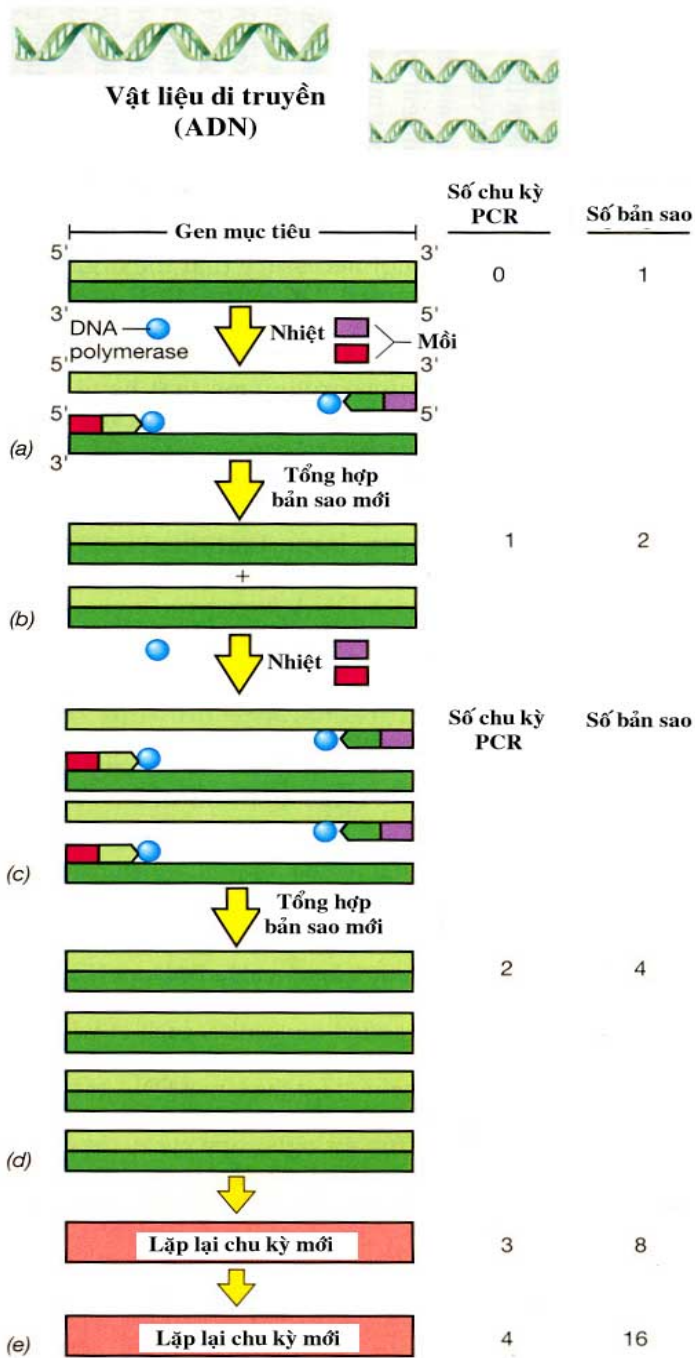
1.3.2. PCR (Polymerase chain reaction)

+ Khuếch đại đoạn gen mục tiêu phản ứng sao mã dựa trên một cặp mồi có trình tự đã được biết ở hai đầu của một đoạn DNA mục tiêu.

+ Quy trình: 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'
- Bắt đầu chu kỳ tiếp theo bằng bước biến tính

+ Phát hiện vạch khuếch đại bằng điện di trên gel agarose, nhuộm bằng chất phát huỳnh quang ethidium bromide và kích thước



1.3.3. Dấu vân tay (DNA finger-printing)

+ Dùng trong xét nghiệm pháp y

+ Qui trình

- Cắt DNA ly trích từ mẫu bằng một enzyme cắt giới hạn
- Phân đoạn các đoạn cắt bằng điện di trên gel agarose
- Chuyển thấm các vạch DNA sang màng lai
- Lai với một bộ 4 - 5 các trình tự minisatellite (10 - 30 trình tự lặp lại, 4 - 10bp/trình tự lặp lại) được đánh dấu phóng xạ
- Phát hiện vạch lai bằng phim X quang

+ Minisatellite có tính đa dạng rất cao nên tần suất trùng lặp các bộ vạch lai là $10^5 - 10^8$ nên đặc trưng ở mức từng cá thể.

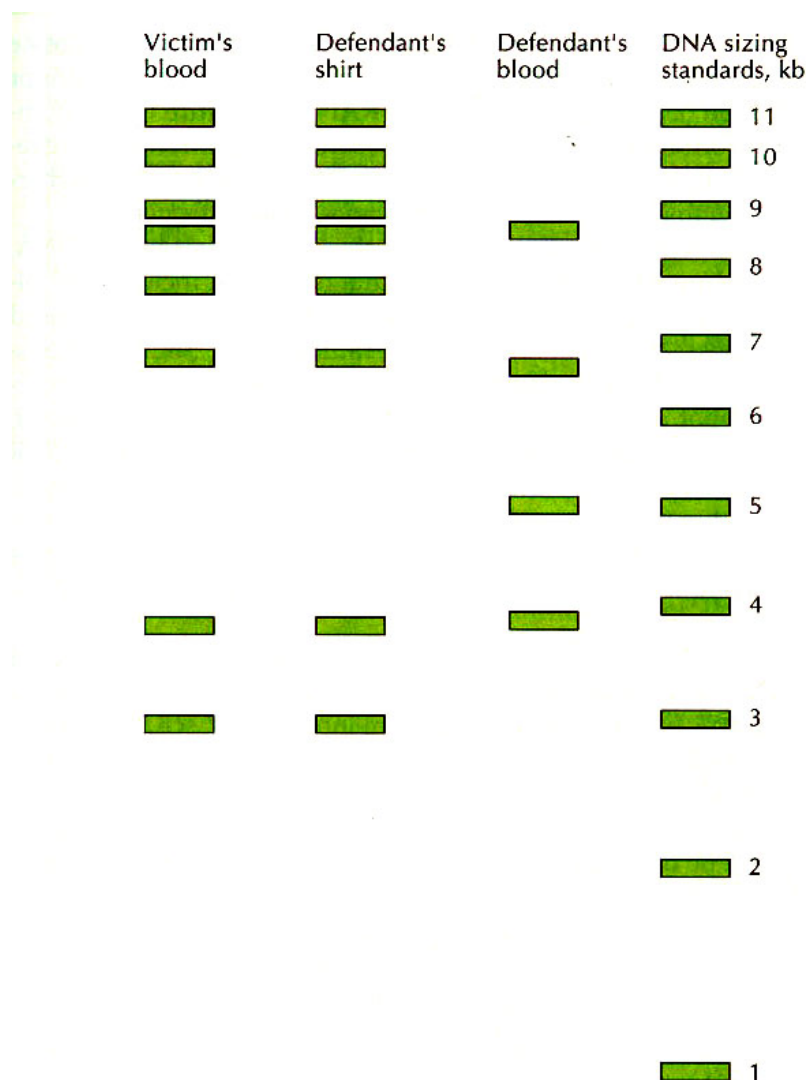


Figure 9.7 Southern blot of a forensic DNA sample. The DNA samples from the victim, the defendant's shirt, and the defendant were treated with the same restriction enzyme. Here, the banding pattern of the DNA extracted from the blood on the defendant's shirt is identical to the victim's DNA banding pattern and different from the defendant's pattern. The sizes of the DNA molecules in these bands are estimated by comparison with the positions of the sizing standards.

1.3.4. Đa hình các đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên RADP (random amplified DNA polymorphism)

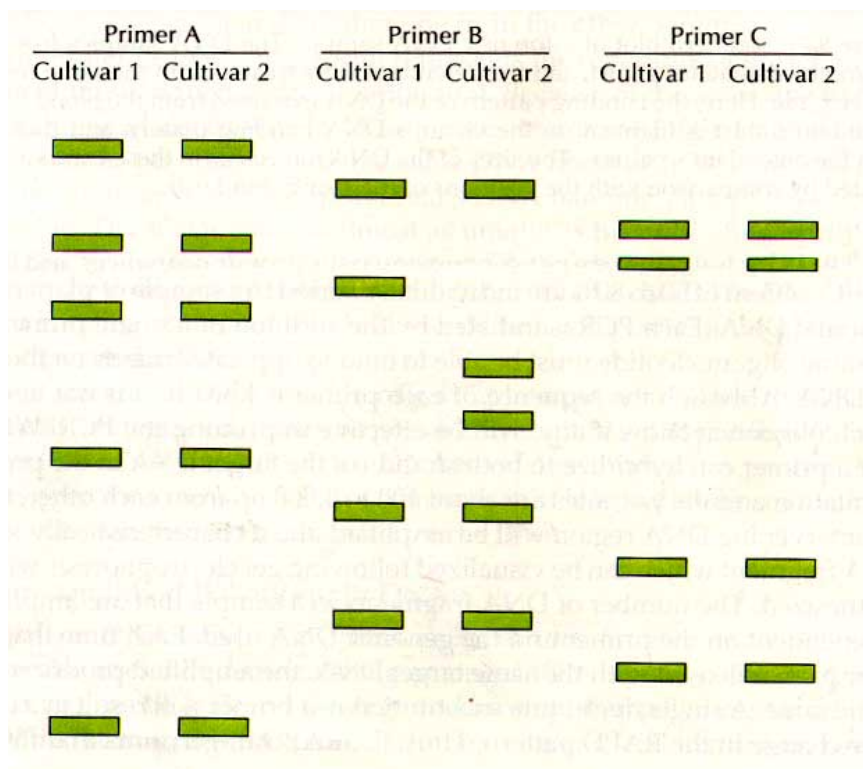
+ Dùng một bộ các cặp mồi có trình tự tùy ý để khuếch đại ngẫu nhiên các đoạn DNA trên DNA bộ gen. Mỗi một bộ primer nhất định sẽ tạo ra một tập hợp các đoạn DNA khuếch đại riêng, đặc trưng cho DNA bộ gen của mỗi loài hoặc nòi, chủng.

+ Qui trình

- Tách DNA bộ gen
- Thực hiện PCR bằng các cặp mồi ngẫu nhiên trong bộ mồi
- Điện di trên gel agarose, nhuộm bằng ethidium bromide
- Ghi nhận bộ các vạch khuếch đại, so sánh với đối chứng
- Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi ngẫu nhiên khác cho đến khi có sự khác biệt

+ Ưu điểm:

- Không phụ thuộc vào mồi
- 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



1.3.6. Các dạng phân tích đoạn DNA khác (DNA fragment analysis)

- Phân tích đoạn DNA: tìm dấu hiệu phân tử (kiểu gen) thay cho dấu hiệu hình thái (kiểu hình) dựa trên bộ đặc trưng các đoạn DNA
- 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

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

+ Xét nghiệm DNA nhằm tìm các đột biến liên quan đến bệnh di truyền. Còn gọi là xác định kiểu gen (genotyping).

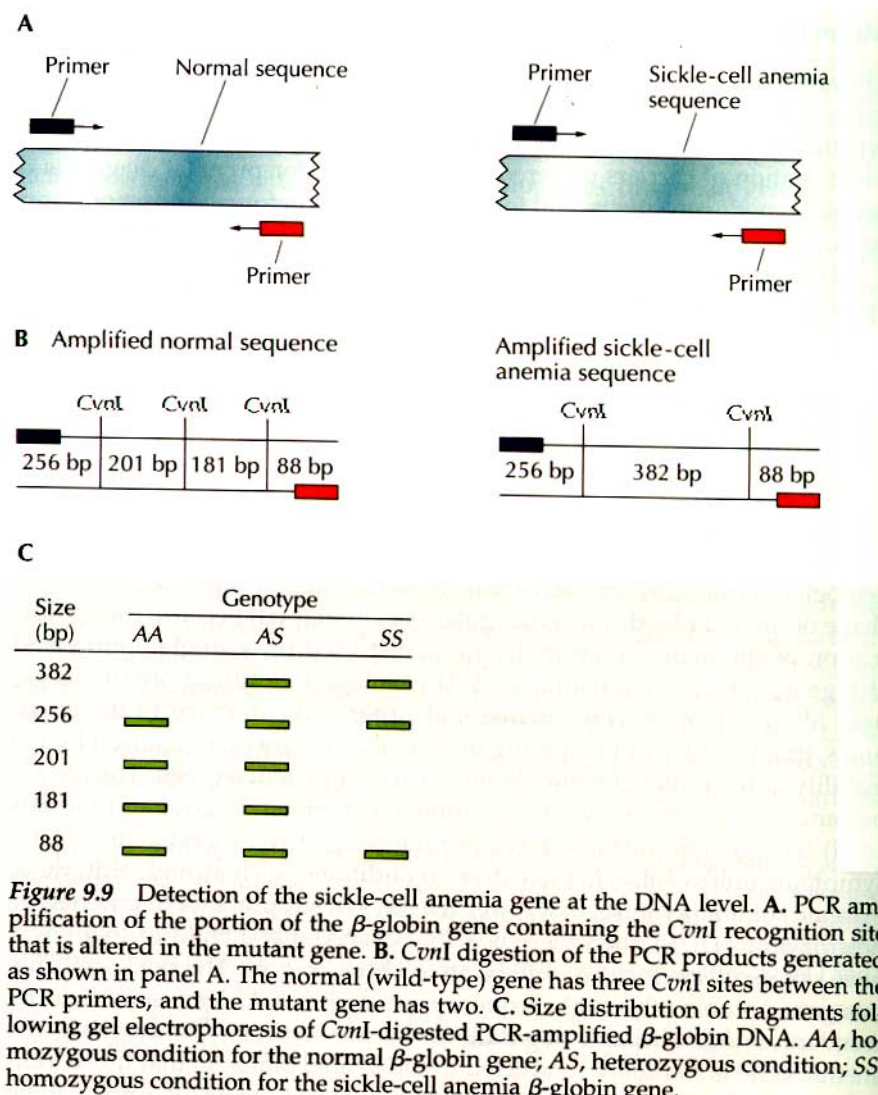
1.4.1. Hồng cầu hình lưỡi liềm

+ Do đột biến thay đổi một base kéo theo sự thay đổi của amino acid thứ 6 (Val thành 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 của dạng bình thường có chứa trình tự nhận biết của *CvnI* (CCTNAGG) là CCTGAGG. Trong khi đó dạng đột biến CCTGTGG.

+ Quy trình phát hiện:

- Tạo một cặp mồi tương ứng với trình tự lân cận ở hai đầu của vị trí *CvnI* trên DNA.
- Cắt sản phẩm khuếch đại bằng *CvnI*
- Điện di trên gel agarose 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



1.4.2. Phát hiện đột biến điểm bằng 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:
 - Khuếch đại đoạn 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
- + Qui trình PCR/OLA nhanh, nhạy, chuyên biệt cao, có thể tự động hóa để thực hiện xét nghiệm 1.200 mẫu/ngày.

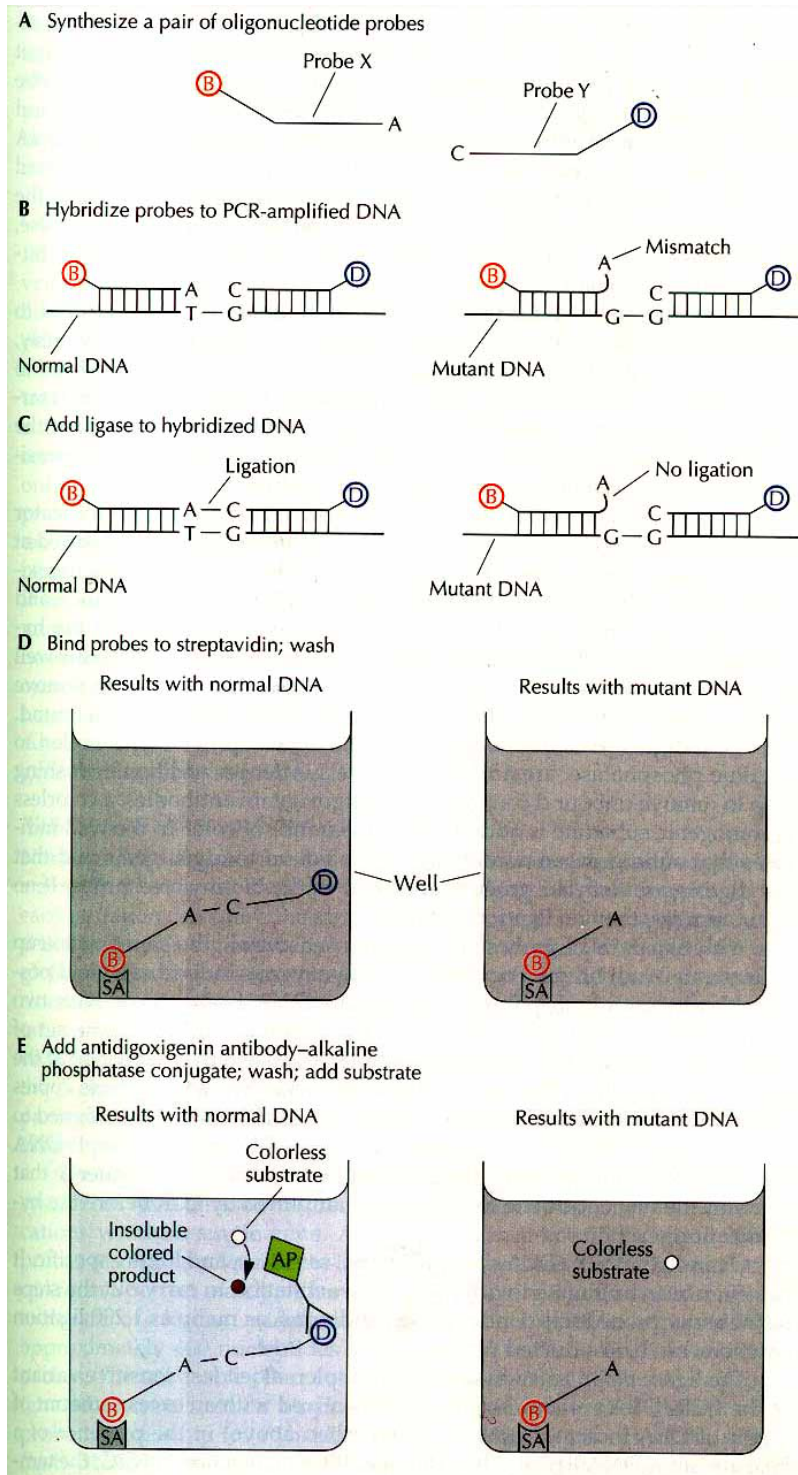


Figure 9.10 PCR/OLA procedure. B, biotin; D, digoxigenin; AP, alkaline phosphatase; SA, streptavidin; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, thymine.

1.4.3. PCR với các mồi đánh dấu huỳnh quang

+ Phản ứng PCR được thực hiện với ba mồi khuếch đại vùng gen có base đột biến:

- Mồi 1 tương ứng với đầu đoạn DNA bình thường được đánh dấu bằng rhodamine phát huỳnh quang đỏ
- Mồi 2 là mồi ngược tương ứng đầu kia của đoạn DNA cần khuếch đại
- Mồi 3 tương đương với mồi 1 nhưng có base bổ sung với base đột biến, được đánh dấu bằng fluorescein phát huỳnh quang lục

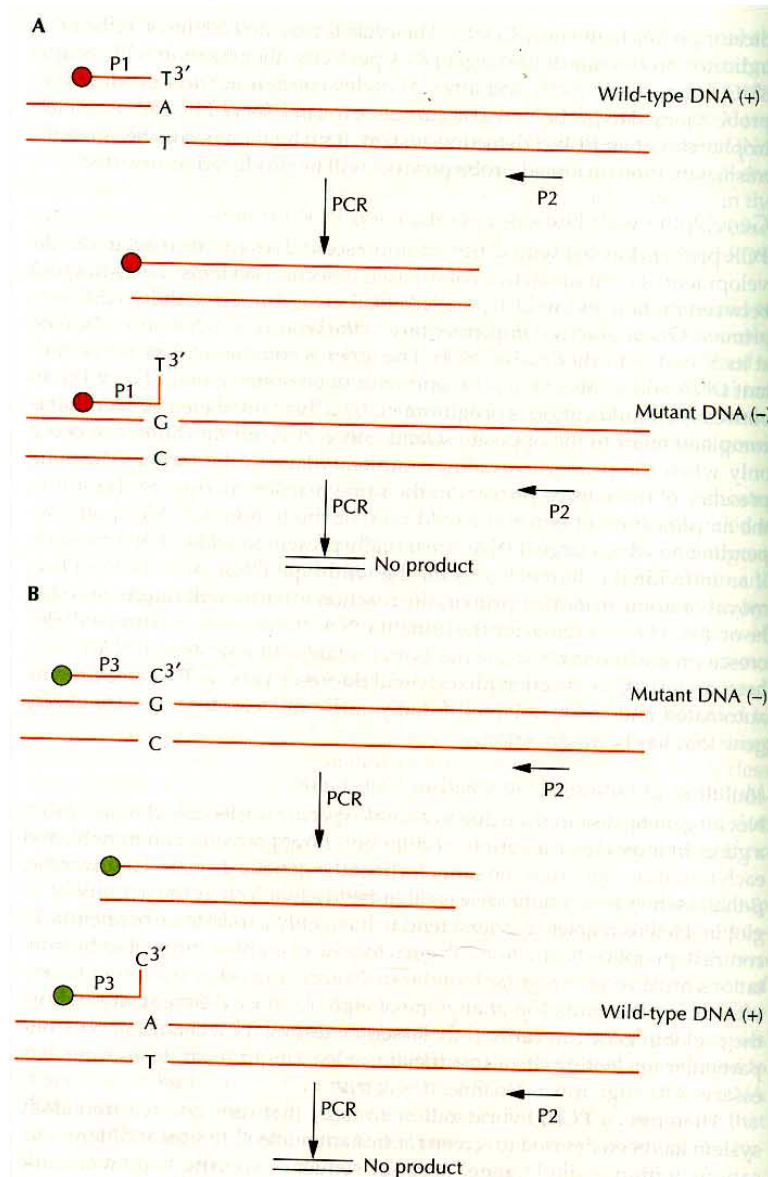


Figure 9.11 Detection of a single-base mutation with fluorescence-labeled PCR primers. **A.** Primers P1 and P2 amplify DNA from the wild-type sequence. The same primers cannot amplify DNA from the mutant sequence because primer P1 mismatches with this DNA. Primer P1 is labeled at its 5' end with rhodamine. Primer P2 is unlabeled. **B.** Primers P3 and P2 amplify DNA from the mutant but not the wild-type sequence. Primer P3 is labeled at its 5' end with fluorescein. Primer P2 is unlabeled. The plus and minus signs denote wild-type and mutant sites, respectively. The genotypes +/+, +/-, and -/- produce PCR products that contain rhodamine only, rhodamine and fluorescein, and fluorescein only and that fluoresce red, yellow, and green, respectively.

+ Tùy khuôn là DNA có đột biến hay không mà phản ứng PCR sẽ được tiến hành cho sản phẩm khuếch đại từ cặp mỗi 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

1.4.4. 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: kết hợp PCR với lai đồng thời tại tám vị trí có thể đột biến:

- Tổng hợp tám mẫu dò (20 nucleotide/mẫu dò) chứa base có thể xảy ra đột biến. Đầu 3' của mỗi mẫu dò có gắn đuôi polyT (400 nucleotide) để cố định các mẫu dò lên màng lai.
- Dùng PCR khuếch đại đồng thời tám đoạn DNA chứa base có thể xảy ra đột biến, mỗi đoạn được khuếch đại bằng một cặp mồi trong đó mồi tương ứng với đầu 5' được đánh dấu bằng biotin.
- Lai các đoạn khuếch đại với mẫu dò trên màng ở điều kiện chỉ cho phép bắt cặp bổ sung hoàn toàn. Bổ sung phức hợp streptavidin-alkaline phosphatase
- 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

+ Nguyên tắc này cho phép phát hiện đồng thời nhiều đột biến (nguyên tắc của microarray).

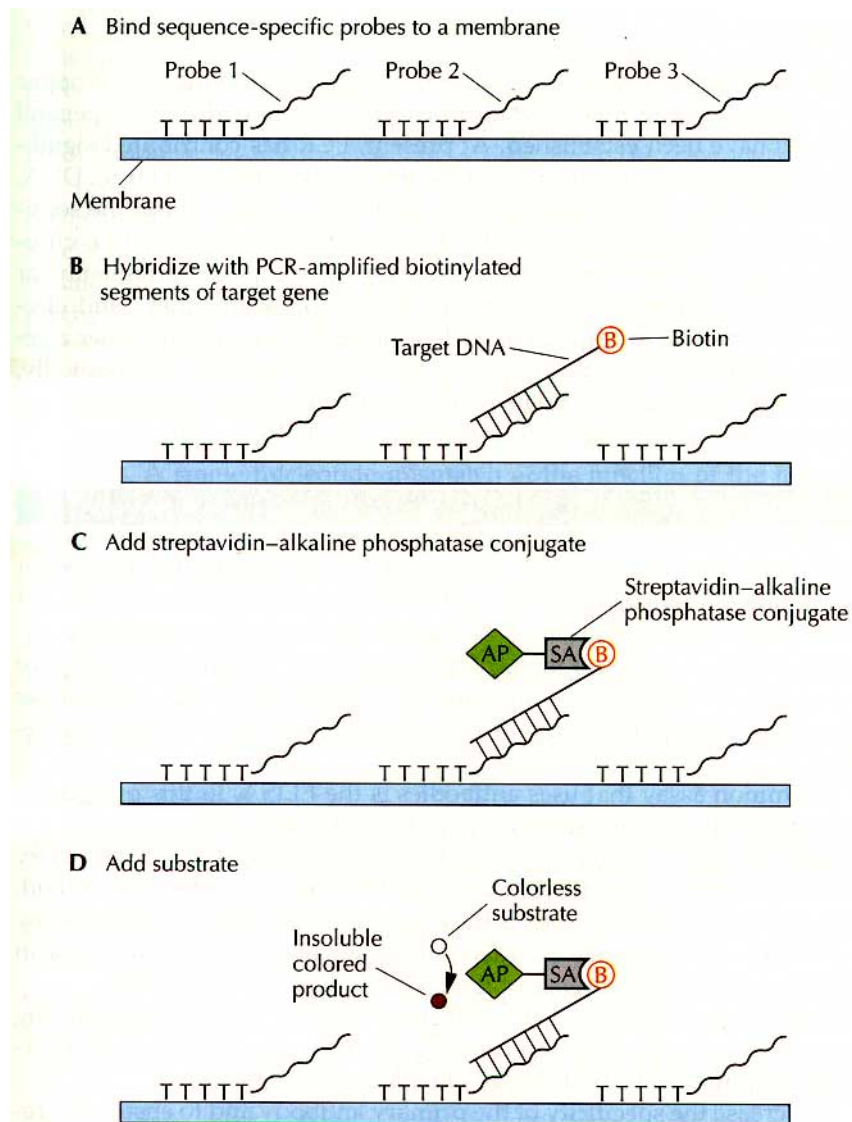


Figure 9.12 Procedure for the detection of mutations at different sites within one gene. B, biotin; TTTTTT, poly(dT) tail; SA, streptavidin; AP, alkaline phosphatase.

2. SẢN XUẤT THUỐC PROTEIN TÁI TỔ HỢP

- + Tần số xuất hiện của một số bệnh di truyền phổ biến
 - Tiểu đường mellitus kiểu A (1/130)
 - Thiếu máu β -thalassemia (1/400)
 - Tiểu đường mellitus kiểu I (1/500)
 - Thiếu máu hồng cầu hình liềm (1/625)
 - Hóa xơ túi mật (1/2000)
 - Bệnh Gaucher's (1/2.500)
 - Bệnh Tay-Sachs (1/3.000)
 - Bệnh niệu phenylketon (1/5.000)
 - Hội chứng Lesch-Nyan (1/10.000)
- + Các protein tái tổ hợp được dùng làm thuốc cho người
 - 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

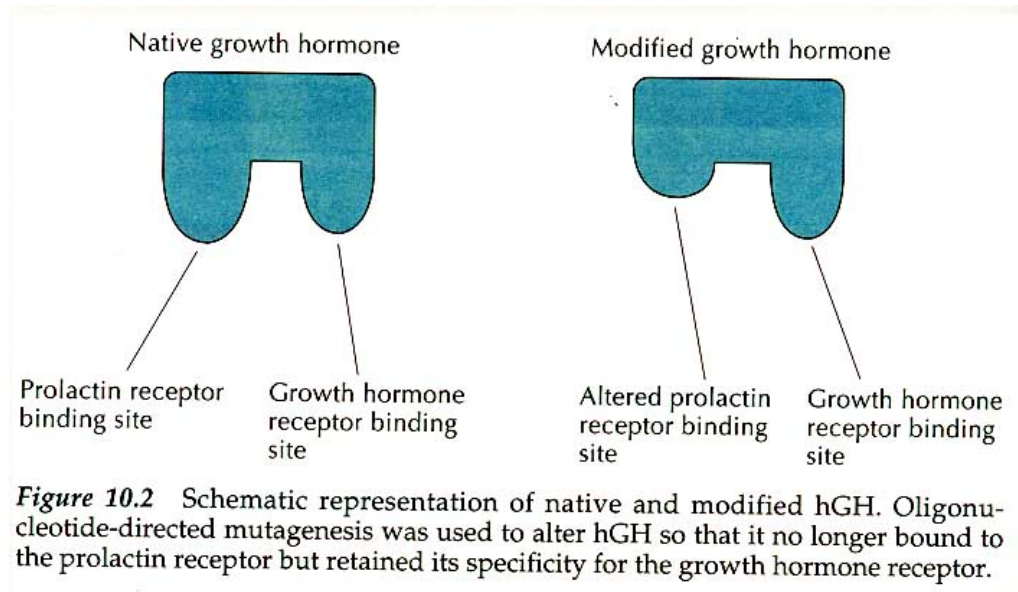
2.1. PROTEIN TÁI TỔ HỢP CÓ NGUỒN GỐC TẾ BÀO EUKARYOTE DÙNG LÀM THUỐC

2.1.1. Quy trình tạo dòng tạo dòng sản xuất protein có nguồn gốc từ tế bào eukaryote dùng làm thuốc

- 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)

2.1.2. Cải biến protein bằng kỹ thuật di truyền

- + Dùng kỹ thuật di truyền để cải tiến được 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



2.1.3. Tạo protein lai protein và độc tố

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

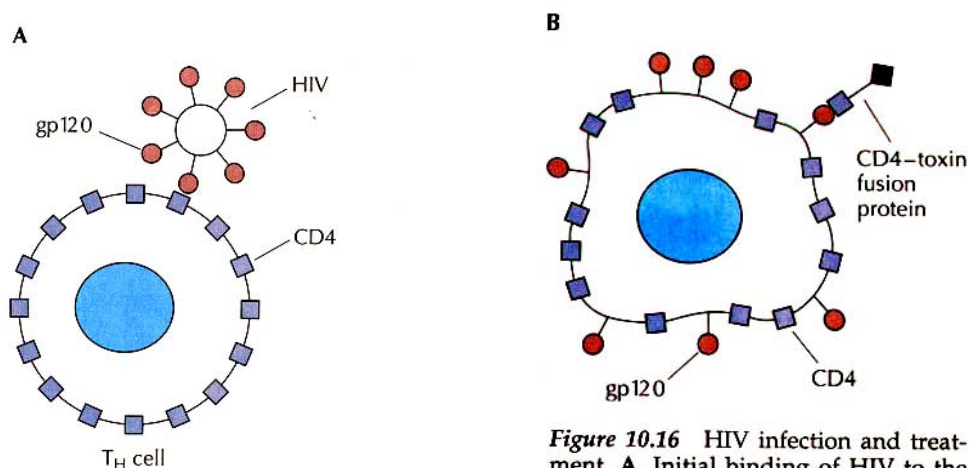


Figure 10.16 HIV infection and treatment. **A.** Initial binding of HIV to the T_H cell is the result of contact between the viral protein gp120 and the CD4 surface protein of the T_H cell. **B.** The HIV-infected cell has gp120 on its surface. Free CD4-toxin fusion protein can bind to the gp120 on the surface of infected cells. Once inside an HIV-infected cell, the toxin portion of the CD4-toxin molecule can kill it.

2.2. KHÁNG THỂ DÙNG LÀM THUỐC

2.2.1. Thành phần cấu trúc và chức năng của 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 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
- 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

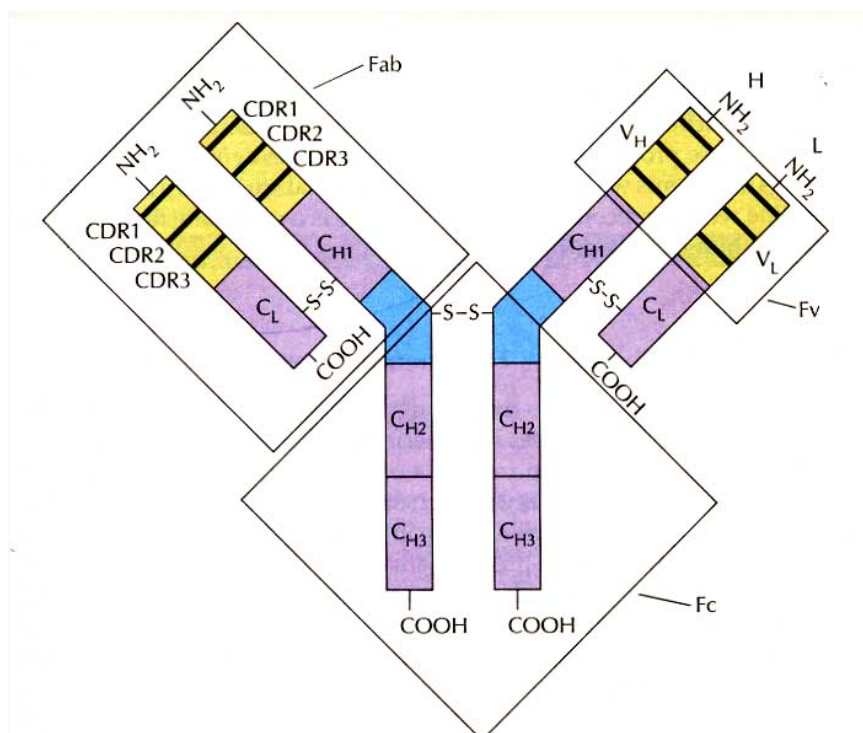


Figure 10.5 Structure of an antibody molecule. The H and L chains contain variable (V_L and V_H) and constant (C_L , C_{H1} , C_{H2} , and C_{H3}) domains with their CDRs (CDR1, CDR2, and CDR3). The Fv, Fab, and Fc portions of an antibody molecule are delineated. The N-terminal (NH_2) and C-terminal ($COOH$) ends of each polypeptide chain are indicated.

2.2.2. 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
- + Dạng kháng thể đơn dòng lai (1): thay Fv của chuột vào vùng tương ứng trên kháng thể của người
- + Dạng kháng thể đơn dòng lai (2): thay các vùng CDR của chuột vào các vùng tương ứng trên kháng thể của người

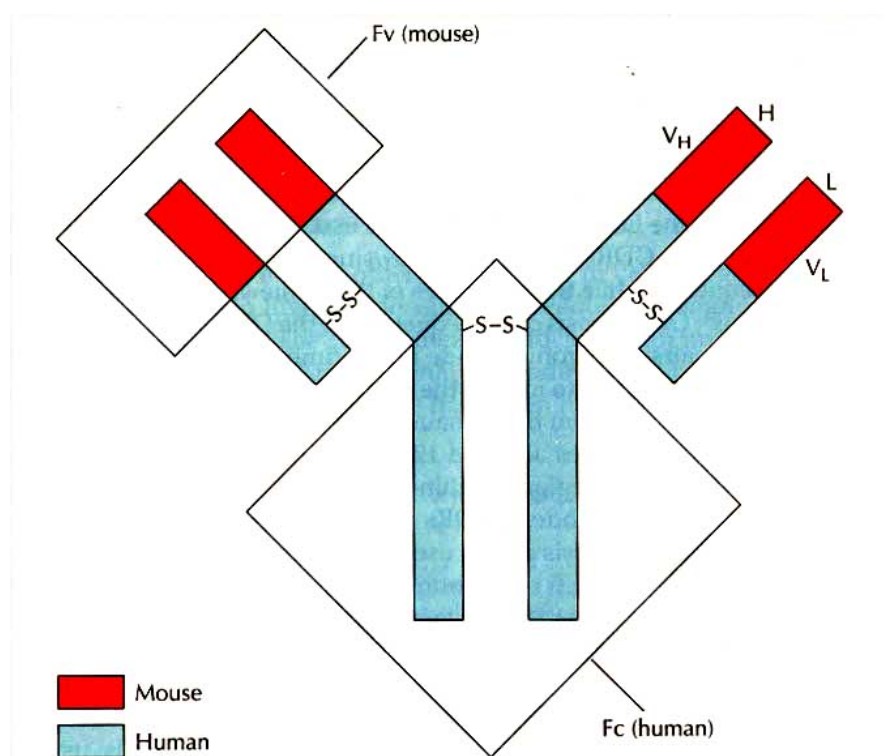


Figure 10.9 Genetically engineered humanized antibody. The V_L and V_H DNA regions from the immunoglobulin L and H genes that encode part of a mouse monoclonal antibody were substituted for the V_L and V_H DNA regions of a human immunoglobulin molecule. The product of the constructed gene is a humanized (chimeric) immunoglobulin with the antigen binding specificity of the mouse monoclonal antibody and both lowered immunogenicity in humans and human Fc effector capabilities.

- + Phương pháp tạo kháng thể đơn dòng lai
 - Ly trích cDNA sợi nặng, cDNA sợi nhẹ từ dòng tế bào hybridoma đơn dòng của chuột
 - Thiết kế 6 cặp mồi 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 mồi 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 vùng 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).
- 50 kháng thể đơn dòng lai khác nhau đã được tạo ra bằng phương pháp này.

Figure 10.10 Genetically engineered humanized antibody. The CDRs (CDR1, CDR2, and CDR3) from the genes for H and L immunoglobulin chains of a mouse monoclonal antibody replace the CDRs of the genes for a human antibody. The product of this constructed gene is an immunoglobulin with the antigen binding specificity of the mouse monoclonal antibody (pink) and all the other properties of a human antibody molecule (light blue).

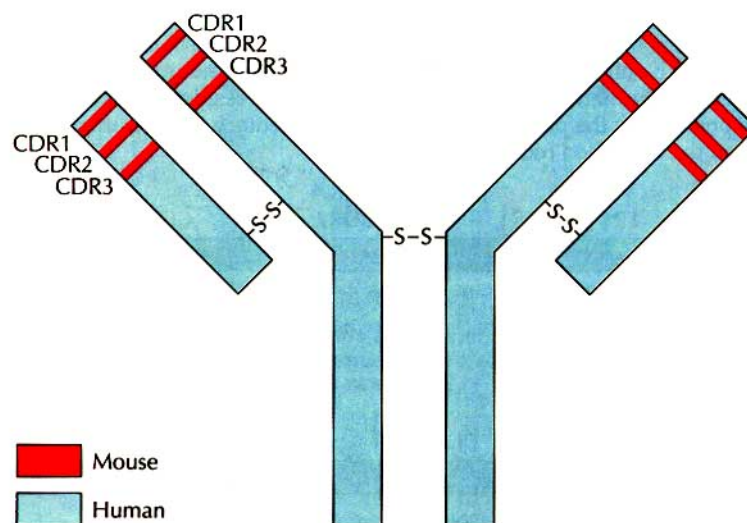
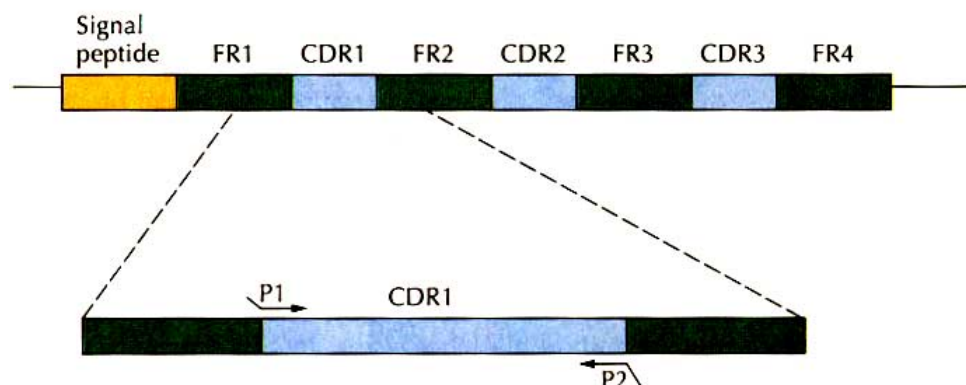


Figure 10.11 PCR amplification of CDR1 from a rodent monoclonal antibody L chain cDNA. The PCR primers P1 and P2 contain oligonucleotides complementary to the rodent CDR1 DNA. In addition, P1 and P2 each contain 12 nucleotides at their 5' end that is complementary to the framework regions of human monoclonal L chain cDNAs. Using six separate pairs of oligonucleotide primers—three for the V_L region and three for the V_H region—each of the rodent CDRs is separately amplified by PCR. Then, by oligonucleotide-directed mutagenesis, the amplified rodent CDRs are spliced into human antibody genes in place of the resident CDRs. This grafting is made possible by the presence of DNA complementary to the human framework regions on the amplified rodent CDR DNAs.



2.2.3. Fv kháng thể người tái 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.

+ Quy trình tạo ngân hàng tổ hợp (combinatorial library):

- Tổng hợp cDNA trên mRNA từ 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 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

+ Tạo dòng sản xuất Fv 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 Fv
- Dòng hóa đoạn gen Fv tổ hợp vào vector plasmid biểu hiện trong *E. coli*
- Biến nạp vào *E. coli* để sản xuất Fv tái tổ hợp

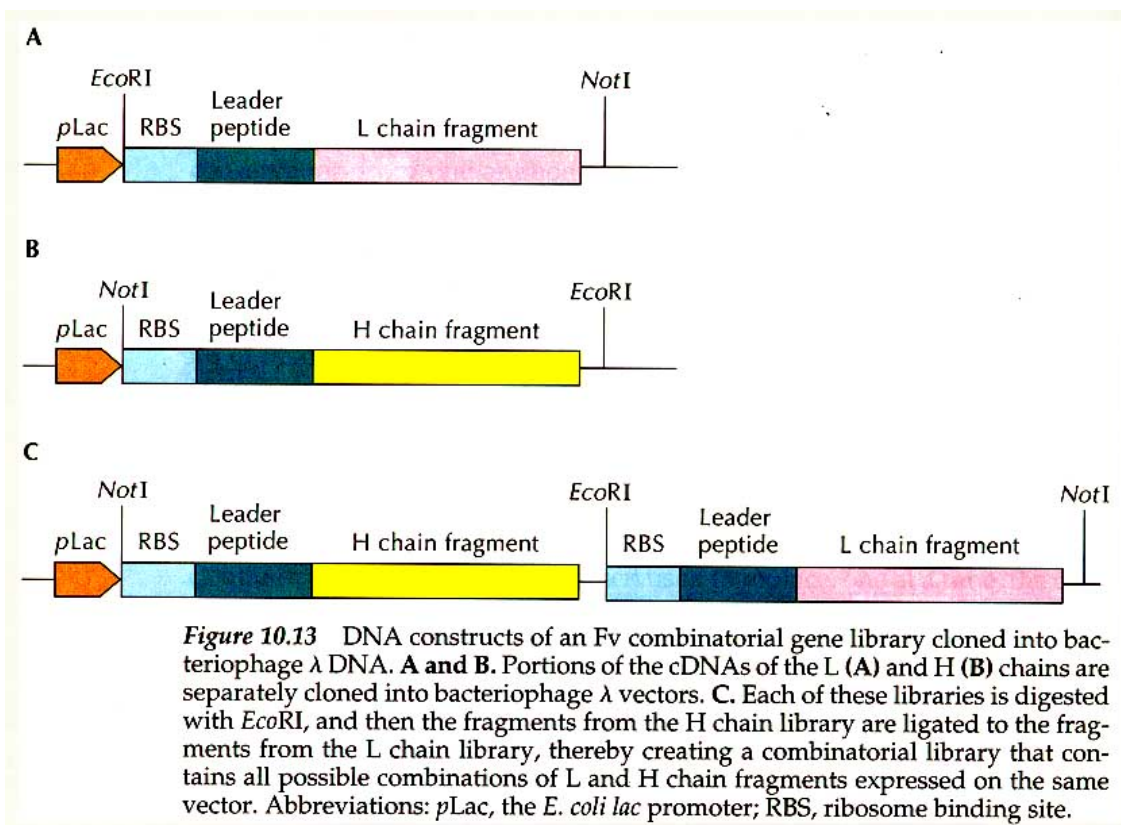
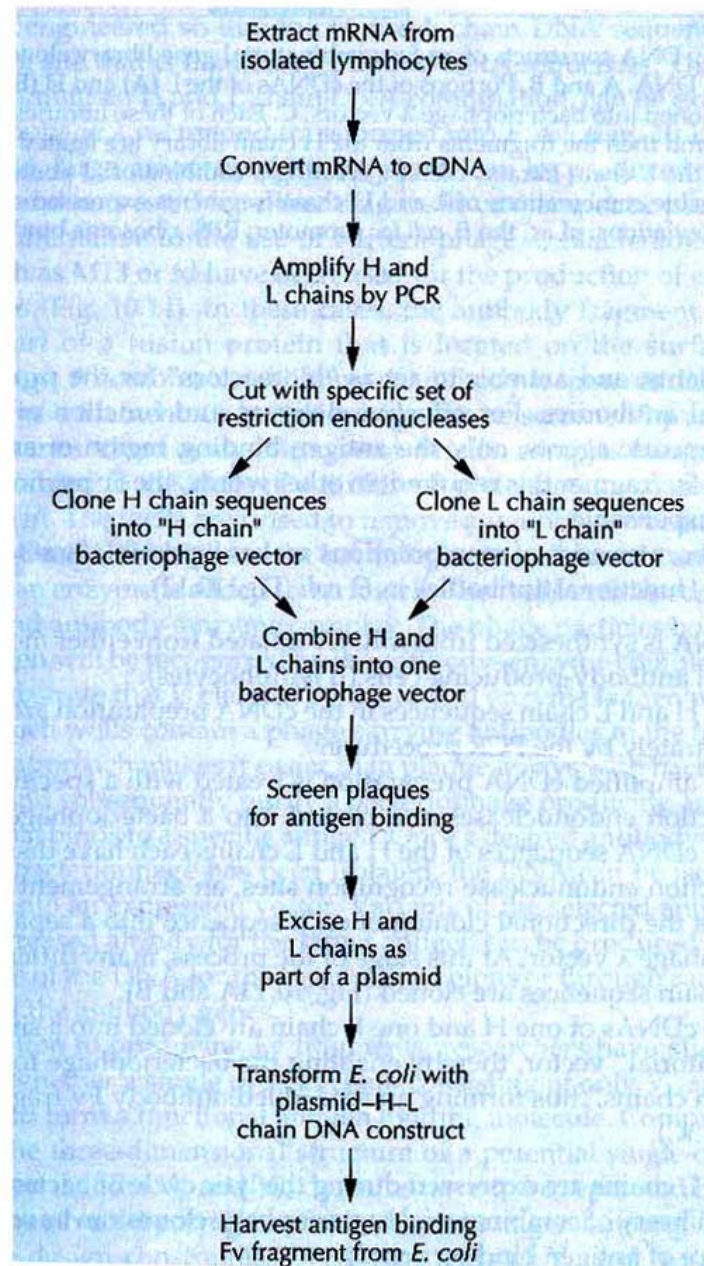


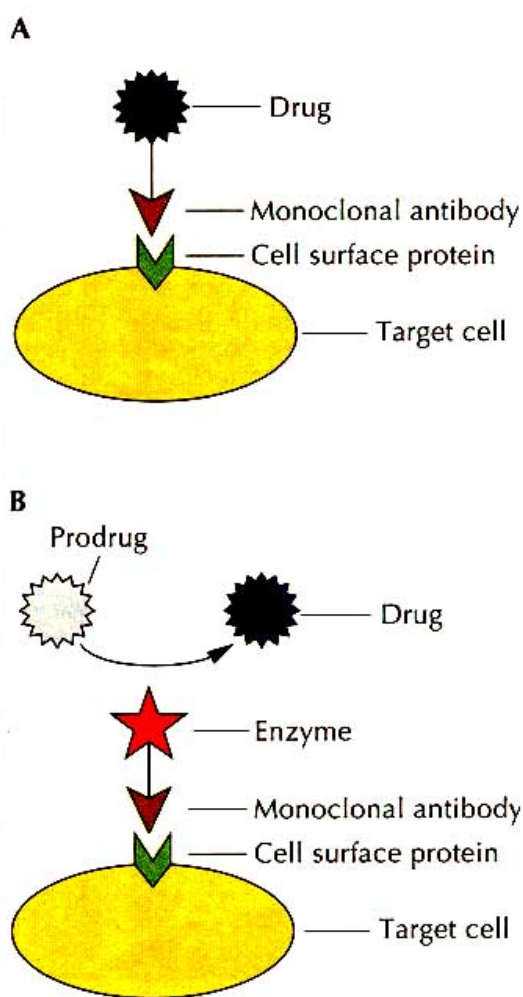
Figure 10.12 Procedure to create in *E. coli* a combinatorial library of the V_L and V_H regions of antibody chains.



2.3.4. 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

Figure 10.6 Schematic representation of monoclonal antibody-based drug delivery system. **A.** The drug is coupled to a monoclonal antibody. **B.** An enzyme that converts an inactive prodrug to an active drug is attached to a monoclonal antibody. The active drug is formed only in the immediate vicinity of the target cells. In both cases, the monoclonal antibody binds to one specific protein on the surface of the target cell.



3. SẢN XUẤT VẮC XIN

3.1. NHƯỢC ĐIỂM CỦA 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).
- + Nhược điểm:
 - Chỉ một số ít vắc xin được sản xuất do không phải mọi tác nhân gây bệnh đều có thể được nhân thành số lượng lớn đủ để sản xuất vắc xin.
 - Cần phải nuôi 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 nhược độc 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.

3.2. 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

3.2.1. Vắc xin tiểu phần (subunit vaccine)

- + Là vắc xin từ một bộ phận chứ không từ toàn bộ tế bào hay phần tử của tác nhân gây bệnh.
- + Kỹ thuật tái tổ hợp DNA giúp tạo được các vắc xin loại này: gen hoặc các gen mã hóa cho vùng quyết định kháng nguyên chính có thể được dòng hóa và biểu hiện vượt mức trong tế bào vi sinh vật, tinh chế để sử dụng làm vắc xin.
- + Ưu điểm: kháng nguyên là protein tinh chế nên chế phẩm vắc xin 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.

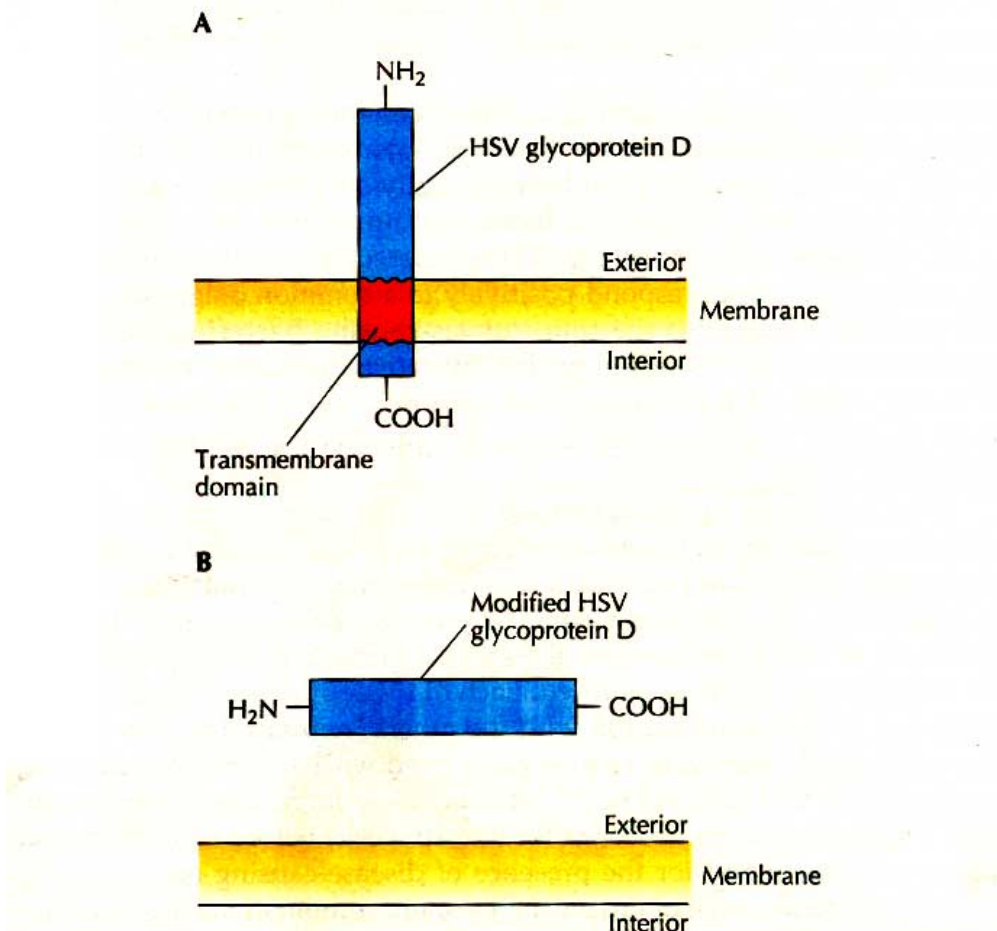
3.2.2. Vắc xin HSV (Herpes Simplex Virus)

- + Gây ung thư, bệnh Herpes, nhiễm trùng mắt cấp tính, encephalitis.
- + 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).

+ Để dễ tinh chế, gD tái tổ hợp tan (không gắn vào màng tế bào) được tạo ra bằng cách loại bỏ vùng trình tự mã hóa cho đầu C của gD (vùng trình tự mã hóa cho vùng gắn lên màng của protein).

+ gD tái tổ hợp có khả năng trung hòa cả HSV-1 và HSV-2.

Figure 11.2 A. Location in the cytoplasmic membrane of HSV-1 gD with the transmembrane domain. B. Extracellular location of a soluble gD without the transmembrane domain.



3.2.3. Vắc xin peptide (peptide vaccine)

+ Trên phân tử protein kháng nguyên gắn ở bề mặt tế bào, các yếu tố quyết định kháng nguyên có thể chỉ hiện diện ở vùng protein phơi ra bên ngoài.

+ Có thể tạo kháng nguyên dựa trên các đoạn peptide ngắn từ vùng này: peptide vaccine.

+ Ví dụ: trường hợp peptide vaccine từ kháng nguyên VP1 (virion protein 1) trên bề mặt virút gây bệnh lở mồm long móng (foot-and-mouth disease virus, FMDV).

- Thực hiện tổng hợp hóa học các đoạn peptide khoảng 10 - 20 amino acid đầu C hoặc đầu N.

- Gắn lên bề mặt một protein trợ (để tăng tính bền đối với protease).

- Đoạn peptide tương ứng với 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.

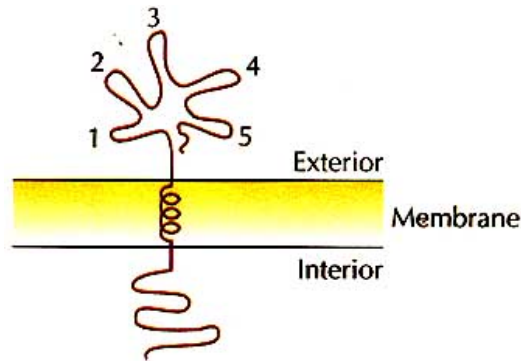


Figure 11.3 Generalized envelope-bound protein with external epitopes (1 to 5) that might elicit an immune response.

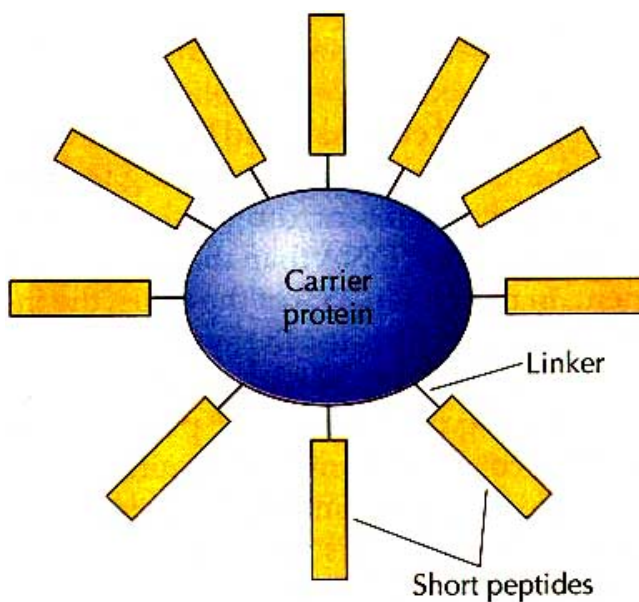


Figure 11.4 Structure of a peptide vaccine composed of identical short peptides bound to a carrier protein.

3.3. Vắc xin nhược độc

+ Kỹ thuật tái tổ hợp gen được dùng để tạo ra vi khuẩn hoặc virus bị biến đổi được dùng làm vắc xin sống:

- Vi khuẩn hay virus 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.

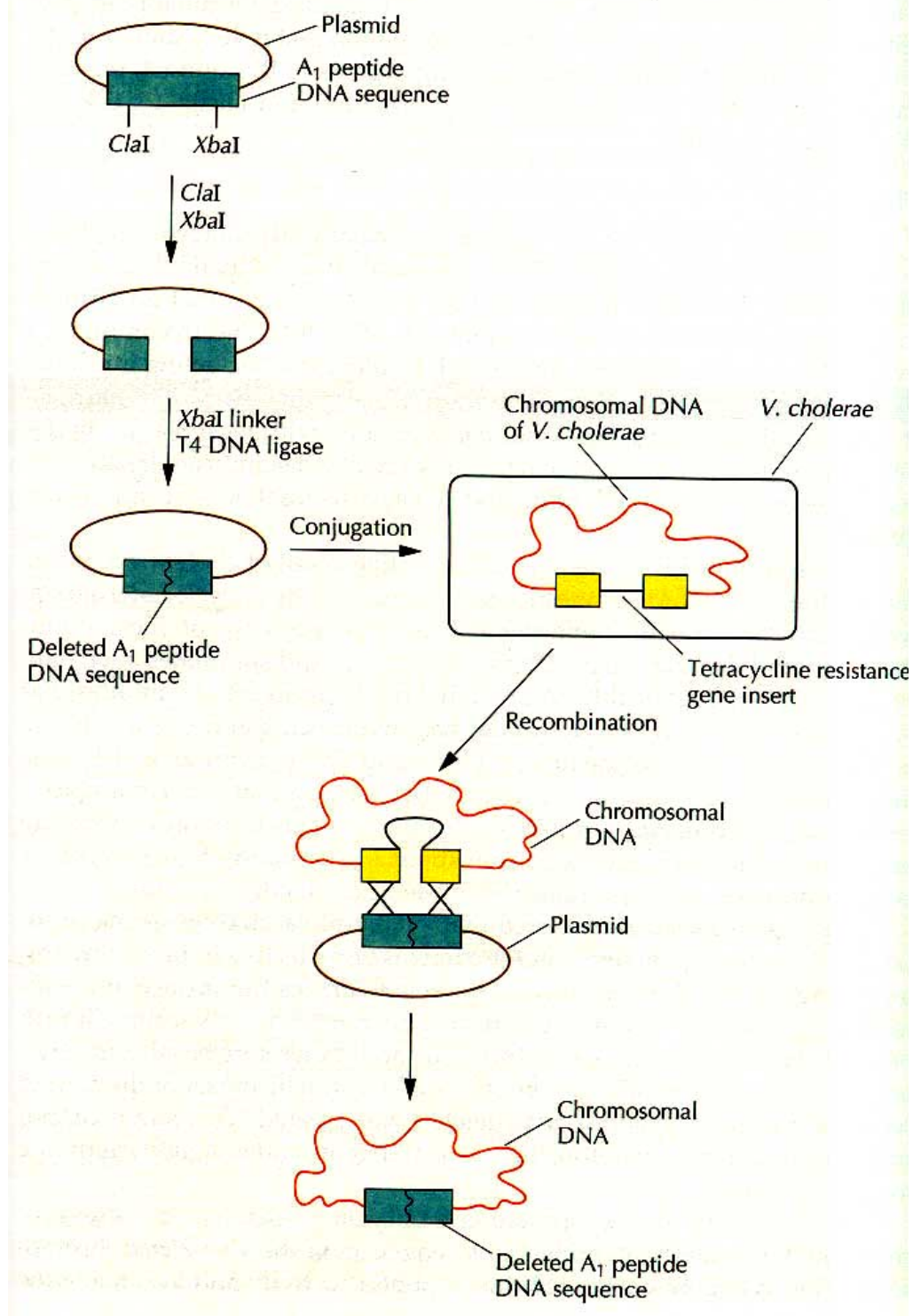
3.3.1. Vắc xin dịch tả nhược độc tái tổ hợp

- + *Vibrio cholerae* gây dịch tả cấp tính.
- + Vi khuẩn gắn, tăng trưởng trên màng niêm mạc ruột non, tiết nội độc tố enterotoxin gây triệu chứng tả.
- + Enterotoxin tả là một protein lục phân: một tiểu phần A và 5 tiểu phần B: tiểu phần A gồm hai tiểu phần: peptide A1 mang độc tính (có hoạt tính ribosyl hóa ADP và hoạt hóa adenyl cyclase) 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.
- + 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.
- + Quy trình tạo Dạng 2:
 - Cắt vùng DNA của A1 mang trên một plasmid bằng enzyme ClaI, XbaI (chỉ có trình tự cắt duy nhất trên đoạn gen A1).
 - Gắn đoạn nối XbaI linker vào đầu ClaI để tạo ra tổ hợp nối XbaI-XbaI (ngăn cản tổ hợp nối ClaI-XbaI tạo ra plasmid chứa A1 nguyên vẹn như ban đầu).
 - Nối bằng T4 DNA ligase. Plasmid tái tổ hợp chứa A1 bị mất một đoạn 550bp.
 - Chuyển plasmid vào *V. cholerae* đột biến chứa gen A1 bị gián đoạn bởi gen kháng tetracycline.
 - Chọn chủng *V. cholerae* miễn cảm với tetracycline. Chủng này có thể xảy ra sự trao đổi đoạn tương đồng thay đoạn chứa gen kháng tetracycline bằng đoạn gen A1 mất 550bp.
 - Chủng thu được dùng làm vắc xin không có khả năng tạo độc tố A1.

3.4.2. Vắc xin dựa trên virút bệnh đậu mùa (vaccinia virus)

- + Thuộc nhóm các vector vaccine là dạng vắc xin sống được phát triển bằng cách tạo ra một virút tái tổ hợp mang và biểu hiện một hoặc vài kháng nguyên mục tiêu của một hoặc vài 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).
- + Do bộ gen vaccinia virút lớn và không có trình tự nhận diện duy nhất của enzyme cắt giới hạn nên khó thực hiện thao tác cắt nối gen. Tuy nhiên, dựa vào tái tổ hợp các đoạn tương đồng có thể tạo ra vắc xin đậu mùa chứa một kháng nguyên mục tiêu đối với một tác nhân gây bệnh khác.

Figure 11.6 Strategy for deleting part of the cholera toxin A₁ peptide DNA sequence from a strain of *V. cholerae*.

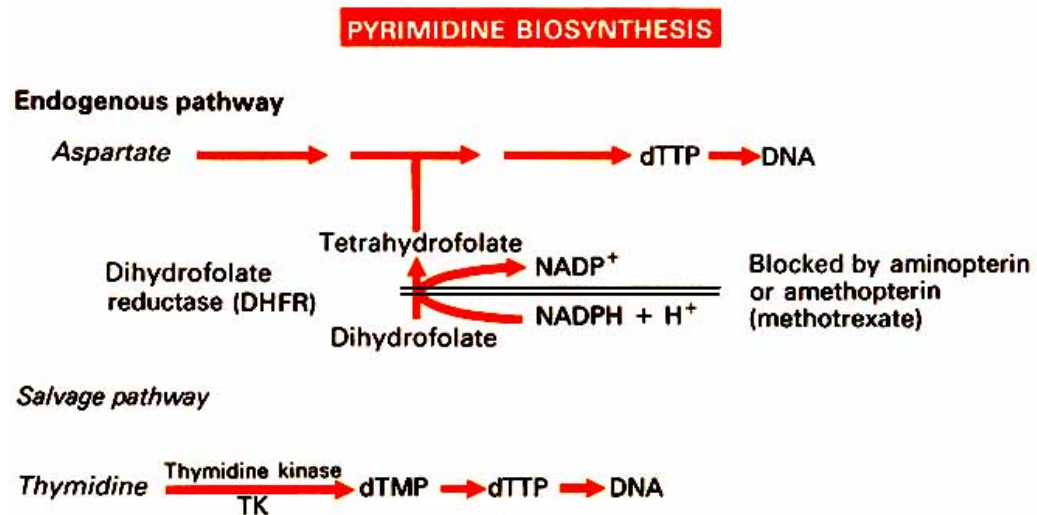
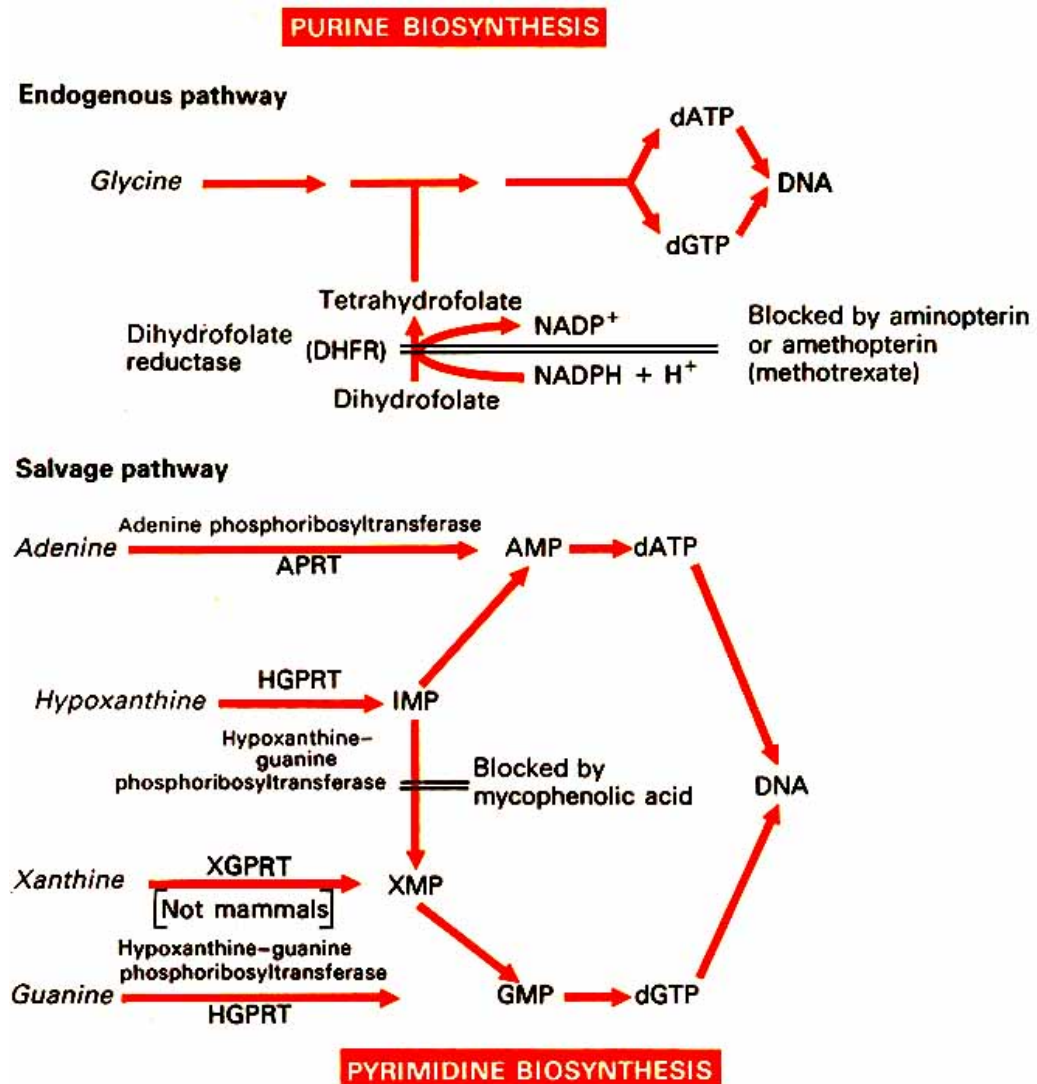


- Đoạn gen mã hóa kháng nguyên được dòng hóa vào một plasmid đặt dưới sự kiểm soát của một promoter của virus nằm chèn giữa gen mã hóa thymidine kinase (TK) của virus trong một plasmid. Các đoạn gen của thymidine kinase có vai trò là đoạn tương đồng dùng trong tái tổ hợp in vivo.

- Biến nạp plasmid này 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 chất đồng dạng của thymidine là BUdR (BrdU, 5-bromo-deoxy-uridine): thymidine kinase xúc tác việc tạo thành DNA đột biến từ BrdU làm tế bào chết.

- Kháng định dòng mang gen mã hóa kháng nguyên mục tiêu bằng lai phân tử.



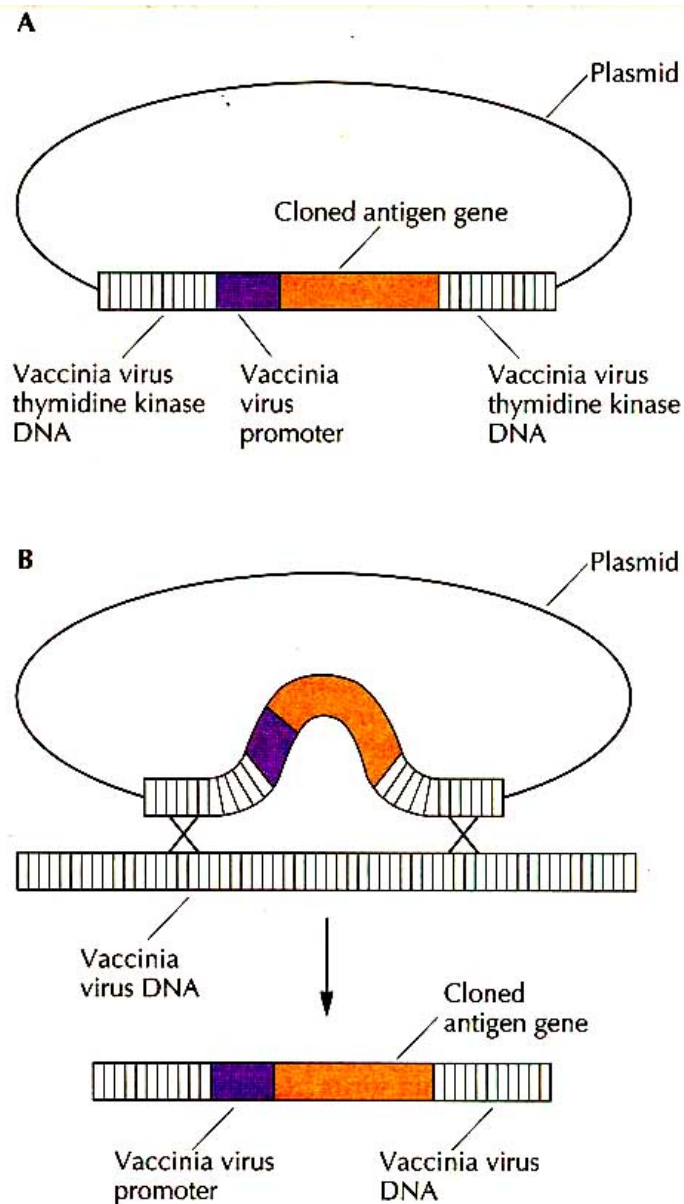


Figure 11.9 Method for the integration into vaccinia virus of a gene whose protein product, generally a viral antigen, elicits an immunological response. **A.** Structure of a plasmid carrying a cloned expressible antigen gene. **B.** A double-crossover event results in the integration of the antigen gene into vaccinia virus DNA.

4. XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG, CHUYỂN HÓA VÀ SẢN XUẤT SINH KHỐI

4.1. THỦY PHÂN CÁC CHẤT DỊ SINH BỞI VI KHUẨN

- + Xử lý sinh học môi trường (bioremediation) là việc ứng dụng vi sinh vật để làm sạch môi trường chứa các chất gây ô nhiễm.
- + Nhiều loài thuộc giống *Pseudomonas* có mang các plasmid (50 - 200kb) mã hóa enzyme thủy phân hơn 100 hợp chất hữu cơ chứa nhân thơm hoặc nhóm Cl.
- + Các chất hữu cơ chứa nhân thơm không bị halogen hóa thường bị vi khuẩn biến đổi thành catechol hoặc protocatechuate sau đó bị ôxi hóa thành acetyl-CoA và succinate hoặc pyruvate và acetaldehyde.
- + Các chất hữu cơ chứa nhân thơm bị halogen hóa là thành phần chính của các loại thuốc trừ sâu, diệt cỏ 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.
- + Bước loại nhóm halogen (dehalogenation) thường được thực hiện bởi phản ứng xúc tác bởi dioxygenase thay nhóm halogen bằng nhóm hydroxyl.

4.2. BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CÁC CON ĐƯỜNG PHÂN HỦY SINH HỌC

- + Nhược điểm của các chủng phân hủy chất dị sinh tự nhiên:
 - Một chủng chỉ phân hủy một hoặc một vài chất.
 - Nồng độ chất dị sinh cao thường ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn phân hủy chất dị sinh.
 - Thường có sự ô nhiễm cùng lúc nhiều chất dị sinh khác nhau trong đó có thành phần ức chế sự tăng trưởng của chủng.
 - Nhiều chất dị sinh không phân cực bị hấp phụ lên các chất mang riêng trong đất hoặc bùn hạn chế sự tiếp xúc và tấn công của vi sinh vật phân hủy.
 - Tốc độ phân hủy sinh học thường chậm.
- + Kỹ thuật tái tổ hợp gen cho phép khắc phục một số nhược điểm nêu trên. Trong hầu hết các trường hợp, một plasmid có thể mang nhiều gen mã hóa cho các enzyme cần cho các bước trong con đường phân hủy cơ chất. Bằng cách đưa plasmid từ nhiều chủng *Pseudomonas* khác nhau vào chung trong một tế bào chủ người ta có thể tạo ra một chủng có khả năng phân hủy nhiều cơ chất khác nhau. Ngoài ra, bằng kỹ thuật di truyền có thể làm nổi rộng dải cơ chất có thể bị phân hủy bởi một con đường sinh hóa.

4.2.1. 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.
- Sự tái tổ hợp giữa các plasmid có cùng trình tự tương đồng cho phép tạo ra plasmid dung hợp chứa nhiều gen phân hủy.

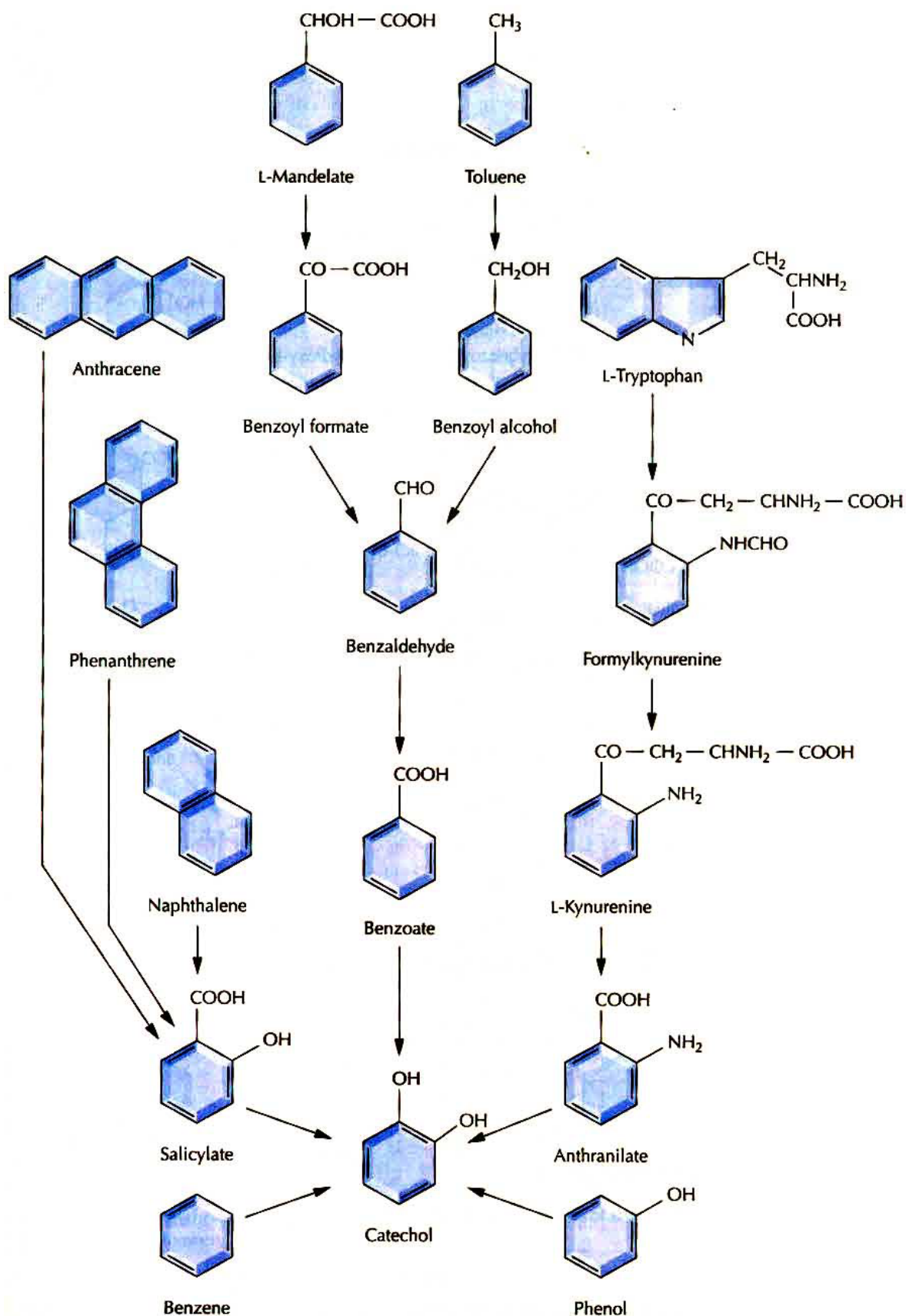


Figure 13.1 Pathways for the enzymatic conversion of aromatic compounds to catechol by degradative bacteria.

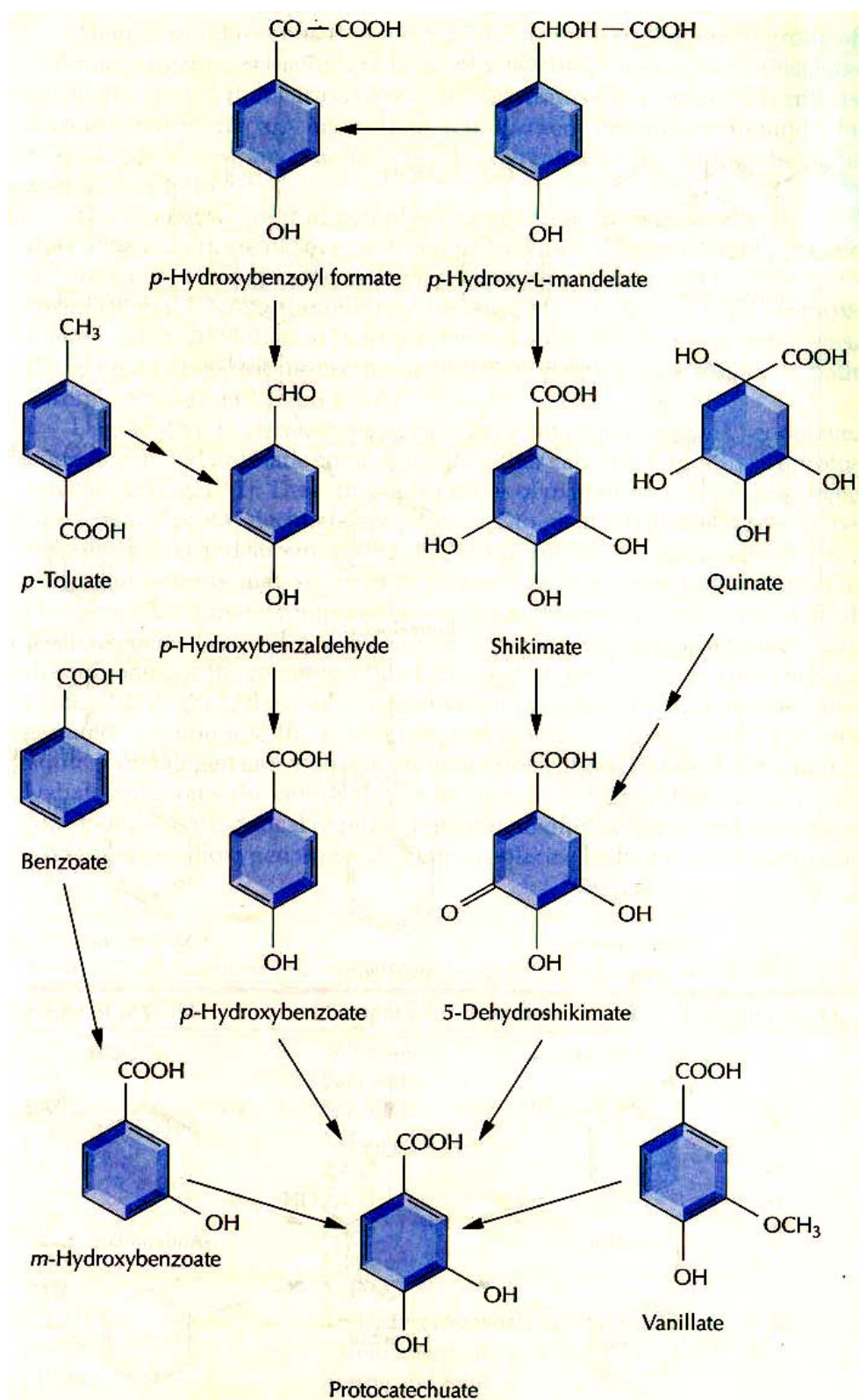
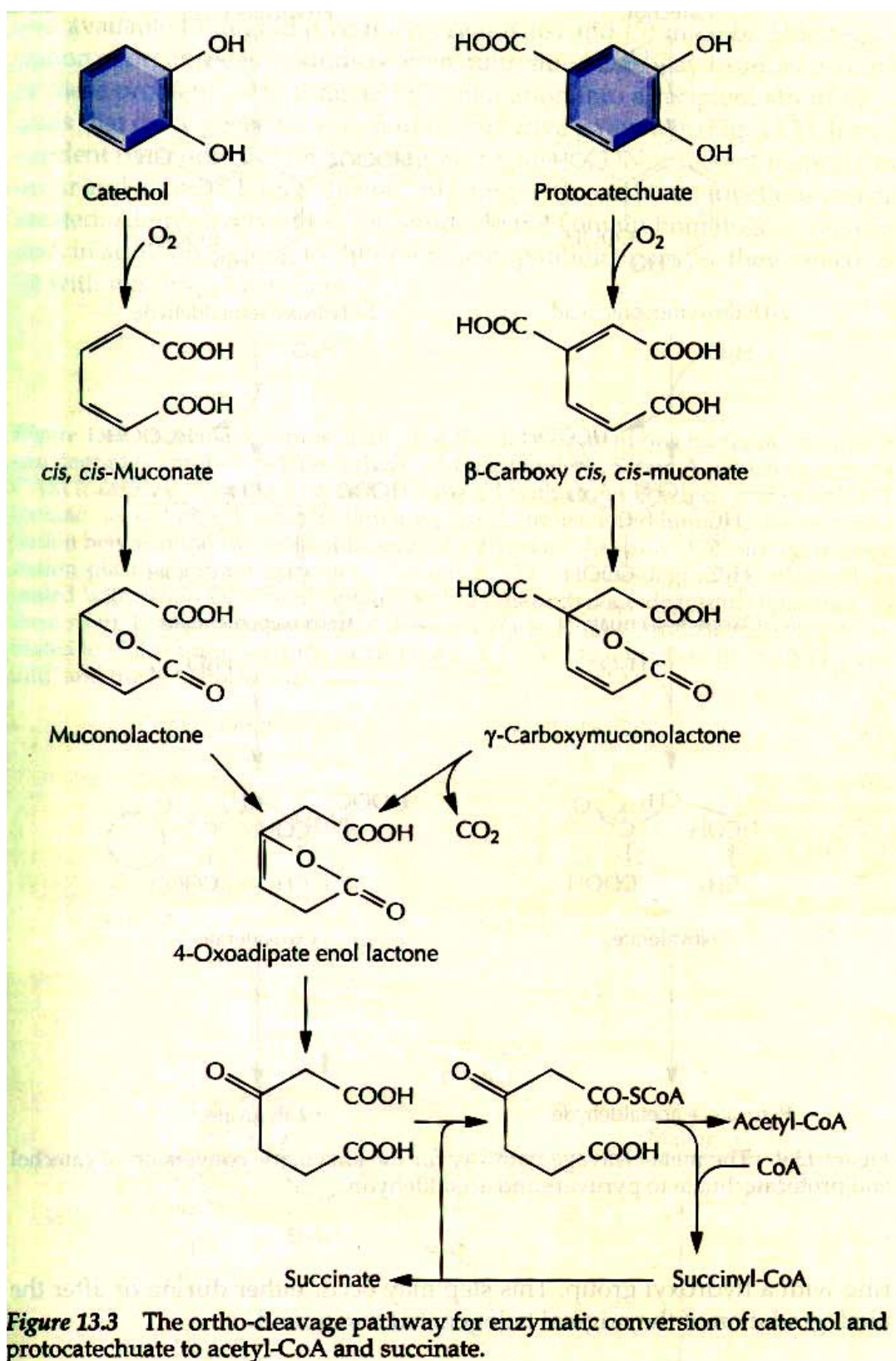


Figure 13.2 Pathways for the enzymatic conversion of aromatic compounds to protocatechuate by degradative bacteria.



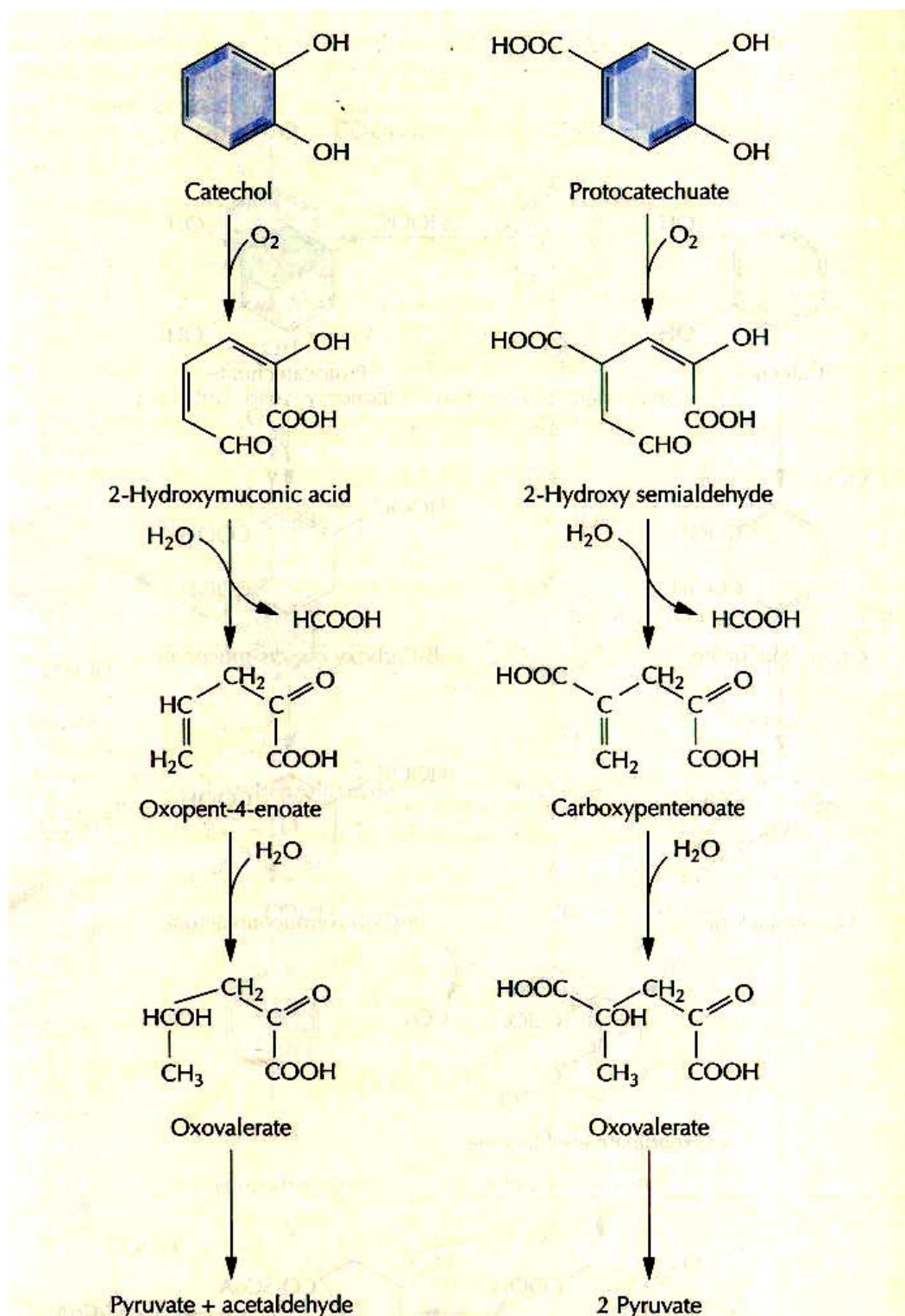
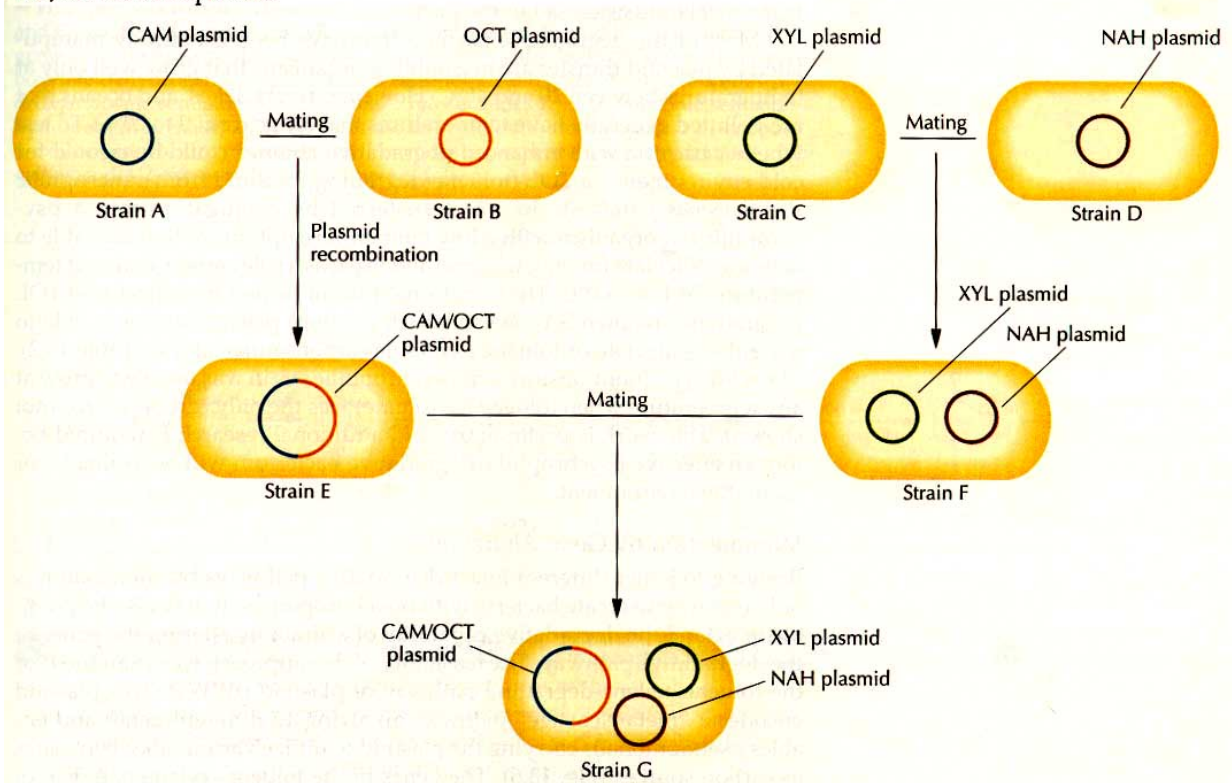


Figure 13.4 The meta-cleavage pathway for the enzymatic conversion of catechol and protocatechuate to pyruvate and acetaldehyde.

- Trường hợp các plasmid thuộc nhóm không tương hợp khác nhau: các plasmid có thể hiện diện bên trong cùng một tế bào.
- + Ví dụ: sự tạo thành chủng phân hủy có thể đồng thời phân hủy camphor (CAM), octane (OCT), xylene (XYL), naphthalene (NAH) của dầu thô.

Figure 13.5 Schematic representation of the development of a bacterial strain that can degrade camphor, octane, xylene, and naphthalene. Strain A, which contains a CAM (camphor-degrading) plasmid, is mated with strain B, which carries an OCT (octane-degrading) plasmid. Following plasmid transfer and homologous recombination between the two plasmids, strain E carries a CAM and OCT biodegradative fusion plasmid. Strain C, which contains a XYL (xylene-degrading) plasmid, is mated with strain D, which contains a NAH (naphthalene-degrading) plasmid, to form strain F, which carries both of these plasmids. Finally, strain E and strain F are mated to yield strain G, which carries the CAM/OCT fusion plasmid, the XYL plasmid, and the NAH plasmid.



4.2.2. Biến đổi di truyền bằng kỹ thuật gen

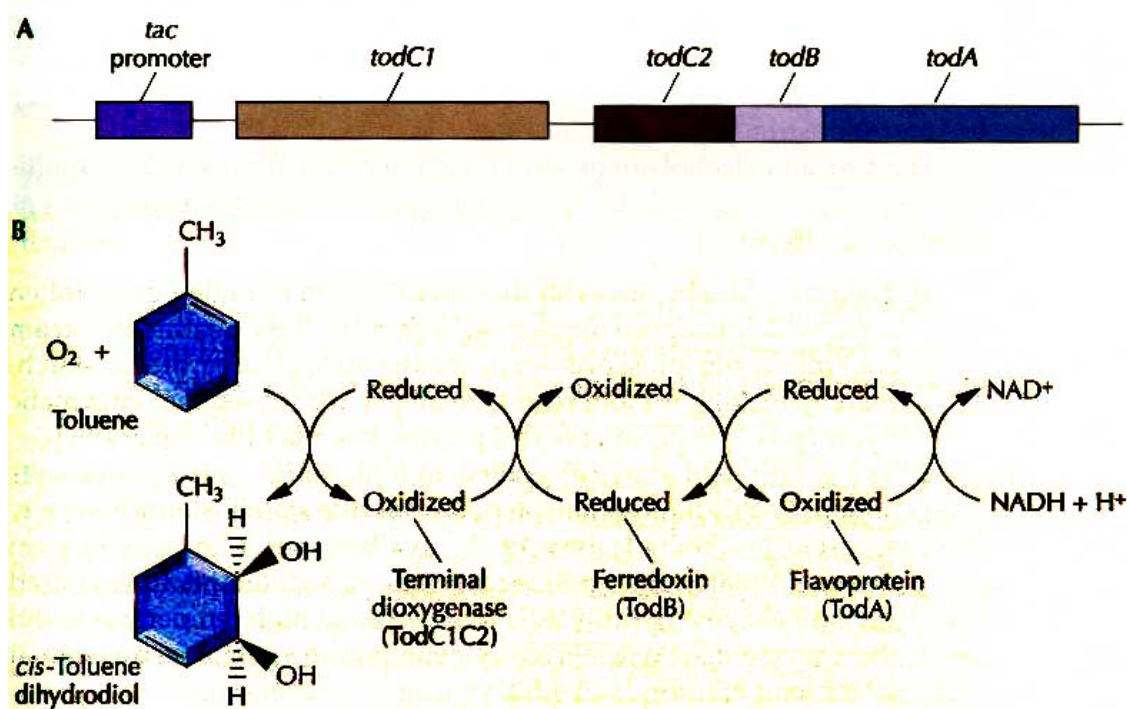
+ Ví dụ: tạo chủng *E. coli* mang operon mã hóa toluene dioxygenase thủy phân toluene và trichloroethylene.

- Các gen *todA*, *todB*, *todC1*, *todC2* có sẵn phẩm tạo thành phức hợp toluene dioxygenase từ *Pseudomonas putida* được dòng hóa vào *E. coli* dưới sự kiểm soát của tac promoter (cảm ứng, hoạt tính mạnh).

- Khi có sự hiện diện của IPTG (isopropyl- β -thio-galactopyranoside (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.

Figure 13.8 A cloned toluene dioxygenase operon under the control of the *tac* promoter in *E. coli*. A. Toluene dioxygenase activity is due to the products of four genes (*todA*, *todB*, *todC1*, and *todC2*). *todA* encodes a flavoprotein that accepts electrons from reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and transfers them to a ferredoxin encoded by *todB*, which reduces the terminal dioxygenase that is encoded by *todC1* and *todC2*. These genes are equivalent to the genes *xylXYZ* shown in Fig. 13.7. B. Toluene is converted to *cis*-toluene dihydrodiol by the concerted enzymatic activities of the Tod proteins.



4.3. CHUYỂN HÓA TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG

+ Tinh bột là polysaccharide cấu tạo bởi các mạch homopolymer không phân nhánh là amylose và phân nhánh là amylose pectin.

- Amylose được tạo thành từ 100 - 40.000 phân tử glucose nối với nhau bằng liên kết α -1,4-glucoside.

- Amylopectin là các đoạn ngắn 17 - 23 glucose nối với nhau bằng α -1,4-glucoside, các sợi này lại nối với nhau bằng liên kết 1,6 hoặc 1,3. Phân tử amylopectin chứa $10^4 - 4 \times 10^7$ đơn phân glucose.

+ Enzyme thủy phân hiệu quả tinh bột dùng trong để sản xuất cồn hoặc fructose (chất làm ngọt thay saccharose) là α -amylase, β -amylase, glucoamylase, glucose isomerase.

- α -Amylase thủy phân một cách ngẫu nhiên các liên kết α -1,4 từ tinh bột tạo ra hỗn hợp glucose, maltose, maltotriose, các đoạn dextrin (α -limit dextrin), thường được dùng trong bước dịch hóa tinh bột.

- β -Amylase thủy phân các liên kết α -1,4 từ hai đầu của amylose và amylopectin tạo ra maltose và các đoạn β -limit dextrin.

- Glucoamylase thủy phân α -1,3, α -1,4 và α -1,6 (nhưng hoạt tính thủy phân α -1,4 kém hơn α -amylase) từ tinh bột, các đoạn β -limit và α -limit dextrin tạo ra glucose; thường được dùng trong bước đường hóa hoặc để thủy phân các đường còn lại trong bia.
- Glucose isomerase được dùng để chuyển glucose thành fructose.

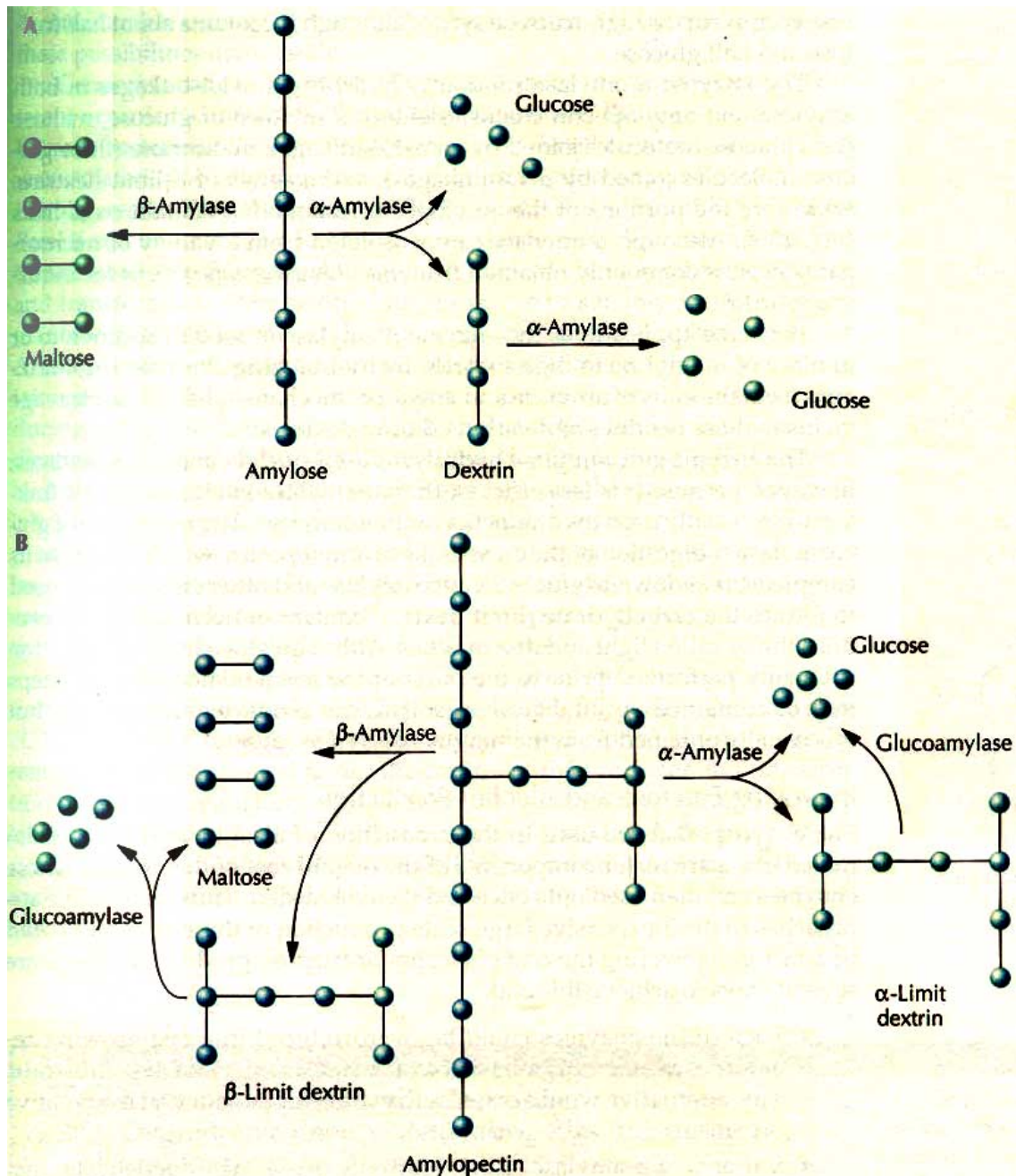


Figure 13.9 A. Pathway for the enzymatic hydrolysis of amylose. B. Pathway for the enzymatic hydrolysis of amylopectin. The blue circles represent D-glucose residues.

+ Enzyme dùng trong sản xuất cồn và fructose chiếm phần quan trọng trong tổng chi phí sản xuất nhưng chỉ dùng được một lần. Một trong những giải pháp làm giảm giá thành là sản xuất được enzyme ở qui mô lớn và rẻ tiền.

- Biểu hiện vượt mức enzyme trong vi sinh vật tăng trưởng nhanh và sử dụng nguồn cơ chất rẻ tiền.

- Sử dụng α -amylase chịu nhiệt (80 - 90°C) tự nhiên hoặc đột biến trong bước hồ hóa để làm giảm thời gian và số lượng enzyme cần thiết.

- Cải biến α -amylase và glucoamylase sao cho có cùng nhiệt độ và pH tối ưu để bước dịch hóa và đường hóa có thể được thực hiện ở một điều kiện chung.

- Sử dụng enzyme có thể thủy phân hữu hiệu tinh bột sống để loại bỏ bước hồ hóa, giảm chi phí năng lượng.

- Tạo chủng nấm men sản xuất được glucoamylase để loại bỏ bước đường hóa trong lên men cồn.

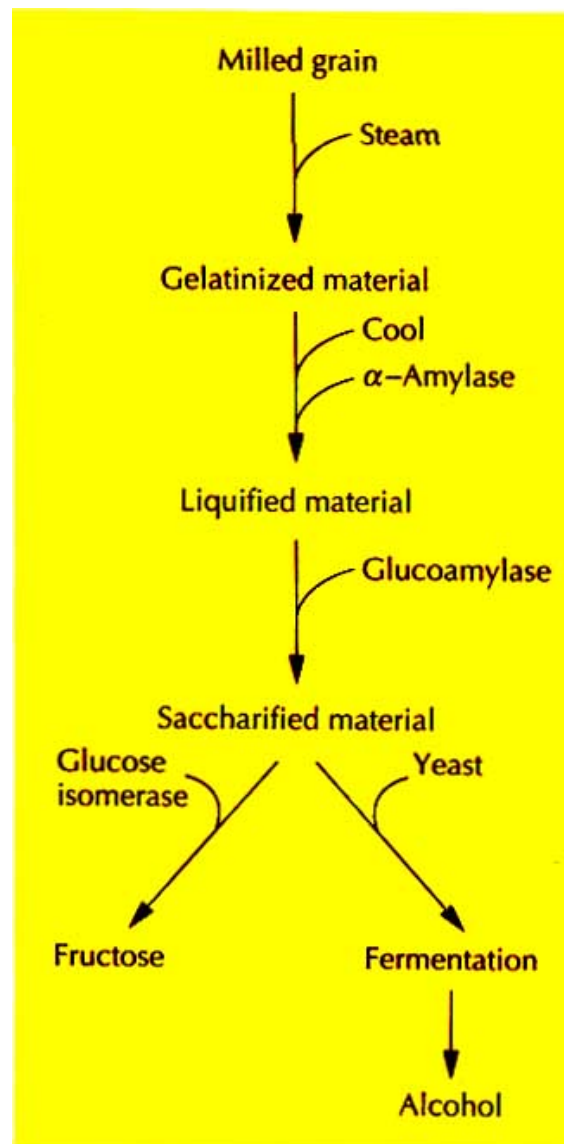


Figure 13.10 Industrial production of fructose and alcohol from starch.

+ Ví dụ: tạo chủng nấm men mang gen mã hóa glucoamylase và biểu hiện glucoamylase trên bề mặt tế bào.

- Gen mã hóa glucoamylase từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* được dòng hóa vào dưới vùng kiểm soát tiết (secreted signal sequence, sss) và trên vùng 3' của gen mã hóa agglutinin (một protein hiện diện 10.000 phân tử trên bề mặt tế bào nấm men).

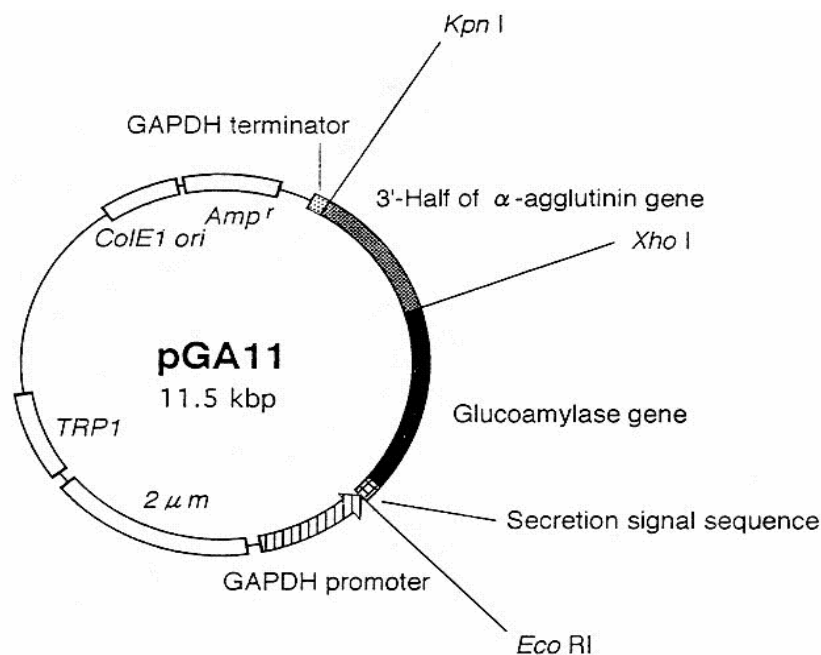
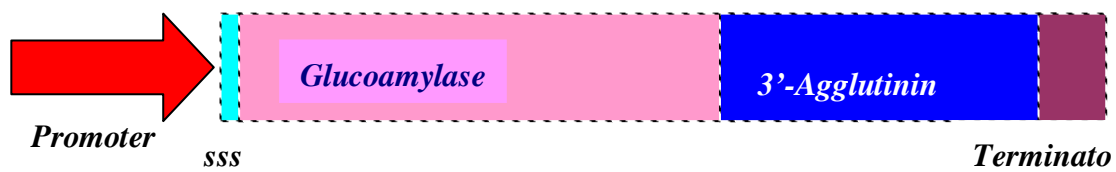
- Tất cả được kiểm soát bằng GAPD promoter (glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase).

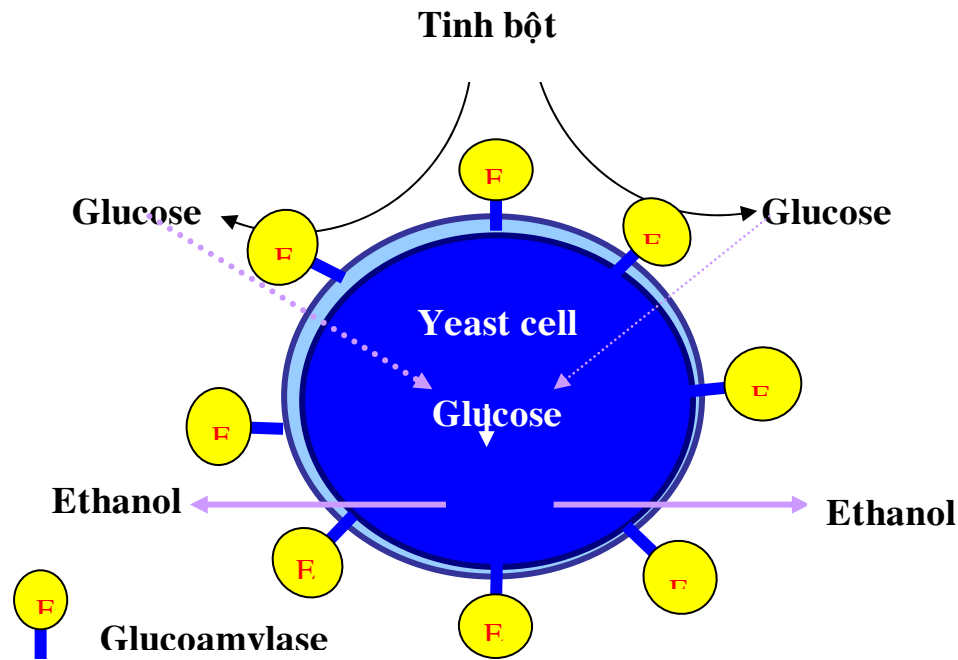
- Chọn lọc dòng tái tổ hợp dựa trên gen *trp*.

- Trên plasmid, đoạn gen ***trp1-GADP promoter-sss-Glucoamylase-Agglutinin-GADP terminator*** được chèn vào giữa một đoạn trình tự nucleotide từ nhiễm sắc thể 11 của nấm men (không được thể hiện trên plasmid).

- Trong tế bào nấm men, đoạn gen ***trp1-2μ-GADP promoter-sss-Glucoamylase-Agglutinin-GADP terminator*** được sát nhập vào nhiễm sắc thể số 11 của nấm men do trao đổi đoạn tương đồng.

- Chủng nấm men tái tổ hợp biểu hiện glucoamylase có thể thủy phân tinh bột và lên men rượu từ tinh bột.





+ Một giải pháp để cải thiện năng suất sản xuất cồn thương mại là tiến hành làm biến đổi di truyền trên vi khuẩn *Zymomonas mobilis* bằng các gen cho phép vi sinh vật này sử dụng nhiều loại hợp chất carbon làm nguồn cơ chất.

4.4. CHUYỂN HÓA CELLULOSE

4.4.1. Thành phần và cấu trúc lignocellulose

+ Các loại đường đa như lignin, cellulose, hemicellulose tổ hợp với nhau ở các tỷ lệ khác nhau thành thành phần khung cấu trúc lignocellulose ở tất cả thực vật. Đây cũng là thành phần chính trong phụ phẩm nông nghiệp, chế biến gỗ, giấy, các chất thải sinh hoạt cần được xử lý để tránh ô nhiễm môi trường hoặc cần được sử dụng như nguồn tài nguyên cho sản xuất.

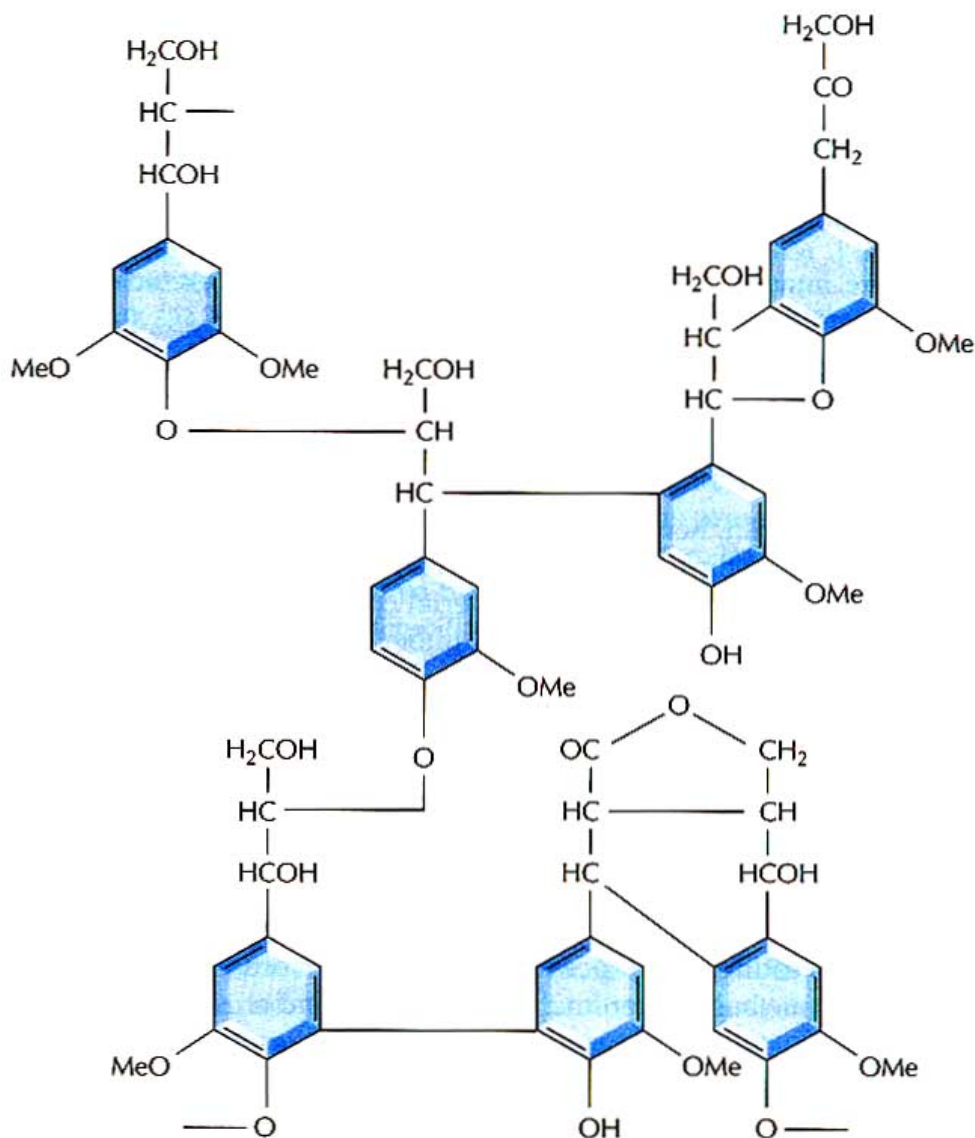
+ Lignin được tạo thành chủ yếu từ phenylpropane tạo thành hợp chất cao phân tử (> 10.000) không tan, rất khó bị phân hủy bằng enzyme và bằng hóa học. Các đơn phân phenylpropane nối với nhau bằng nhiều liên kết hóa học khác nhau được hình thành theo cơ chế gốc tự do. Lignin tạo liên kết hóa học với hemicellulose bao quanh sợi cellulose.

+ Hemicellulose là heteropolymer mạch ngắn gồm các hexose (glucose, mannose, galactose) và pentose (xylose, arabinose). Có ba loại hemicellulose:

- Xylan: có khung là sợi poly- β -1,4-xylan, các nhánh bên là arabinose, glucuronic acid, arabinoglucuronic acid; thường hiện diện trong gỗ cứng.
- Mannan: gồm có glucomannan và galactomannan; thường hiện diện trong gỗ mềm.
- Arabinogalactan.

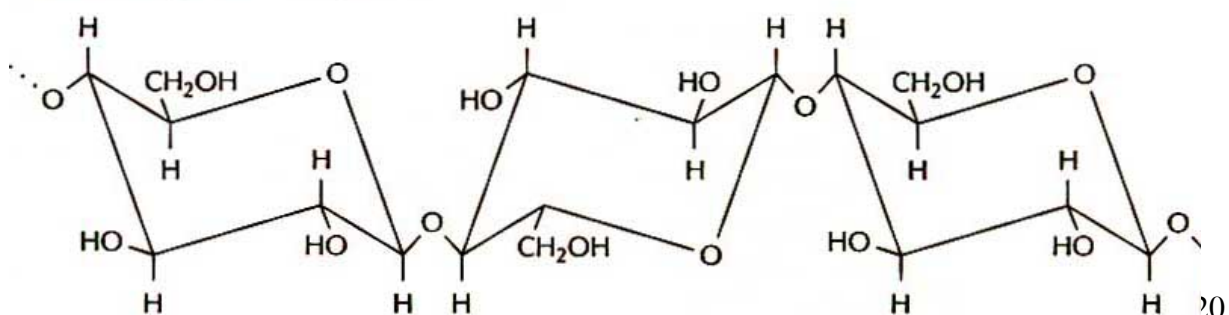
+ Cellulose là thành phần đơn giản nhất trong lignocellulose, là homopolymer của các

Figure 13.13 Representative lignin structure, showing some of the various possible linkages between the phenylpropane (a C_6 aromatic group attached to a C_3 alkyl chain) units. The phenylpropane units are linked in an unorganized, nonrepeating fashion.



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.



4.4.2. Thủy phân cellulose bằng cellulase

+ Cellulase: tên gọi chung của một họ gồm các enzyme thủy phân liên kết β -1,4-glucoside:

- Endoglucanase: thủy phân liên kết β -1,4- giữa hai phân tử glucose trong vùng vô định hình (amorphous region), tạo các mạch ngắn.

- Exoglucanase: thủy phân từ hai đầu tạo glucose, cellobiose (hai glucose), cellotriose (ba glucose).

- Cellobiohydrolase: dạng exoglucanase thủy phân từ hai đầu tạo các mạch khoảng 10 glucose.

- β -Glucosidase (cellobiase): thủy phân cellobiose, cellotriose thành glucose.

+ Các vi sinh vật tự nhiên thường có hoạt tính thủy phân cellulose thấp. Kỹ thuật di truyền được sử dụng để tạo ra các sinh vật, vi sinh vật có khả năng thủy phân cellulose hữu hiệu hơn.

+ Dòng hóa gen mã hóa cellulase từ prokaryote (*Streptomyces*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermomonospora*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Cellvibrio*, *Ruminococcus*, *Cellomonas*, *Fibrobacter*, *Bacillus*):

- Tạo ngân hàng bộ gen biểu hiện của đối tượng vi sinh vật quan tâm trong *E. coli*.

- Tuyển chọn transformant bằng môi trường kháng kháng sinh.

- Bổ sung một lớp môi trường agar mềm chứa carboxymethyl cellulose (CMC, một dẫn xuất tan của cellulose).

- Phát hiện vòng thủy phân cellulose quanh khuẩn lạc bằng cách nhuộm bằng đỏ Congo và dung dịch NaCl (hoặc dung dịch Lugol).

- 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 cách nuôi chủng trên môi trường có nguồn C duy nhất là cellobiose hoặc dùng cơ chất tổng hợp là X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside).

4.5. SẢN XUẤT SINH KHỐI

+ Một số lượng lớn các dạng sinh khối như lúa mì, các alkane từ dầu khí, chất thải cellulose và methane được sử dụng làm cơ chất để nuôi vi sinh vật thành các protein đơn bào (single cell protein, SCP).

+ Các SCP có thể được dùng làm chất bổ sung thực phẩm cho người và động vật. Tuy nhiên, do giá thành cao, thiếu vị ngon, đôi khi có độc tính nên cho đến nay chưa có nhiều công thức SCP trở thành sản phẩm thương mại.

+ Tuy nhiên trong một số trường hợp vẫn còn khả năng tạo ra chất bổ sung thực phẩm dạng SCP rẻ tiền bằng con đường kỹ thuật di truyền.

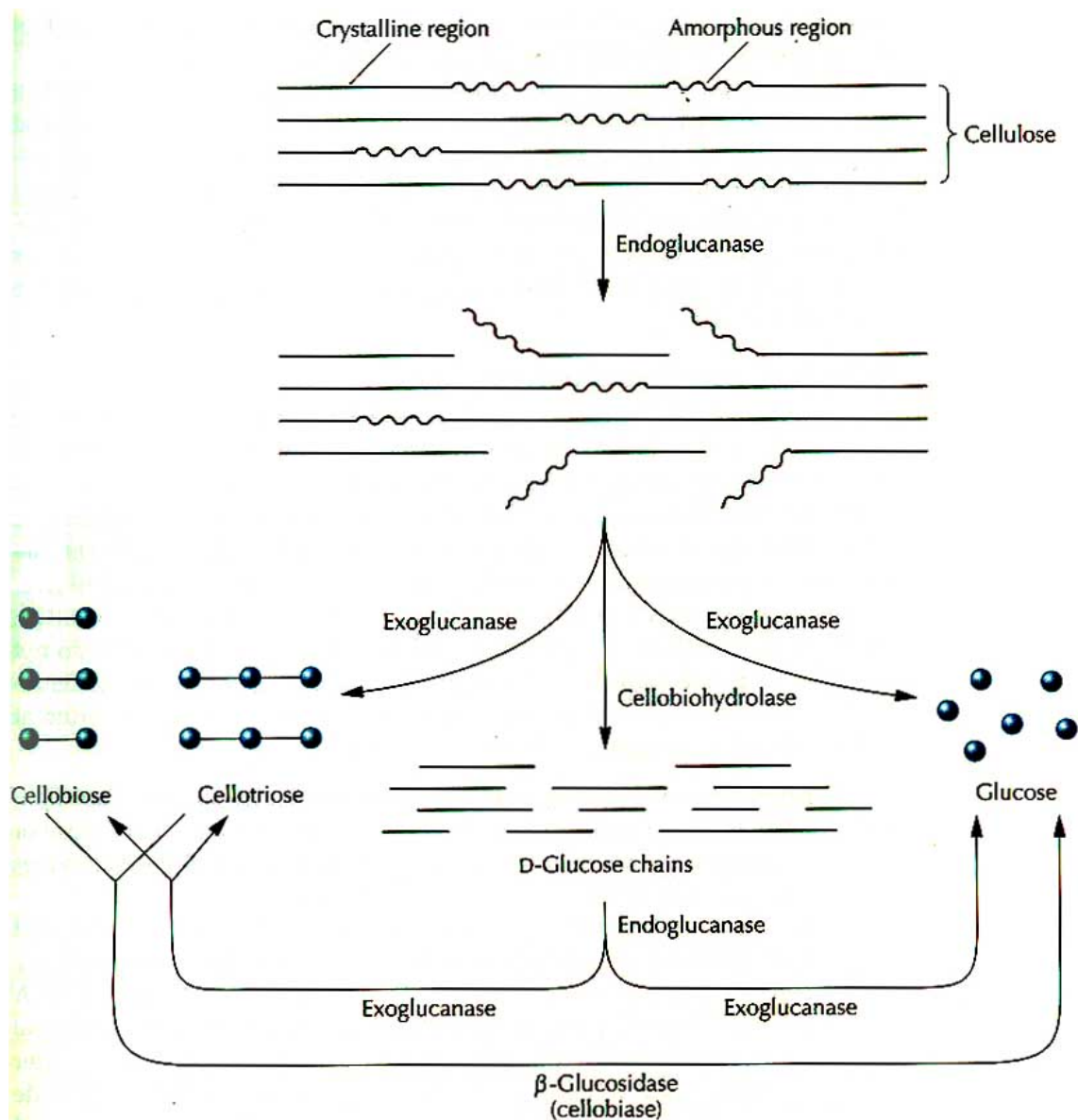


Figure 13.15 Enzymatic biodegradation of cellulose. Cellulose hydrolysis begins with the cleavage of β -1,4-linkages within the accessible amorphous regions of the cellulose chains by endoglucanase(s). This reaction is followed by the removal of oligosaccharides from the reducing ends of the partially cleaved cellulose chains by exoglucanase(s) and cellobiohydrolase(s). The degradation of cellulose is completed when the cellobiose and cellotriose are converted to glucose by β -glucosidase.