



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0024605

(51)⁷ C07K 1/36; C07K 14/765

(13) B

(21) 1-2013-02250

(22) 18/08/2011

(86) PCT/CN2011/001373 18/08/2011

(87) WO2012/083579 28/06/2012

(30) 201010597544.2 20/12/2010 CN

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/09/2013 306A

(73) WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP. (CN)

#666 Gaoxin Avenue, East Lake High-Tech Development Zone, Wuhan, Hubei
430079, China

(72) YANG, Daichang (CN); HE, Yang (CN); LI, Guangfei (CN).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP CHIẾT ALBUMIN HUYẾT THANH NGƯỜI TỪ GẠO
CHUYỂN GEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết albumin huyết thanh người từ gạo chuyển gen, bao gồm các bước: 1) nghiền hạt gạo được tách vỏ, sau đó trộn hạt gạo được nghiền với dung dịch đệm chiết và dịch chiết bằng cách khuấy để thu được hỗn hợp I; 2) điều chỉnh độ pH của hỗn hợp I từ 4,0 đến 4,5 và cho kết tủa hỗn hợp trong thời gian từ 1 đến 12 giờ để thu được hỗn hợp II; 3) lọc hỗn hợp II và thu về dịch lọc để thu được dung dịch có chứa albumin huyết thanh người nồng độ cao. Phương pháp đề cập đến cơ sở cho việc tinh sạch thêm rHSA (rHSA - recombinant human serum albumin - albumin huyết thanh người tái tổ hợp).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, và đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp (recombinant human serum albumin – rHSA - albumin huyết thanh người tái tổ hợp) từ gao chuyển gen.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Albumin huyết thanh người (HSA) là chuỗi đơn, protein không glycosyl hóa chứa axit amin 585, có trọng lượng phân tử là 66,5kD và điểm đẳng điện trong khoảng từ 4,7 đến 4,9. Nó là loại protein có nhiều nhất trong huyết tương máu người, chiếm khoảng 60% tổng số protein huyết tương. Có khoảng 40g HSA trong mỗi lít máu người. Bên cạnh đó là sự xuất hiện trong huyết tương, HSA cũng được tìm thấy trong các mô và tiết của cơ thể, da và các khoang bạch huyết. Trong điều kiện sinh lý bình thường, HSA có tác dụng duy trì áp suất thẩm thấu keo huyết tương, nuôi dưỡng, thúc đẩy sự chóng lành vết thương, và là một chất mang, tham gia vào sự vận chuyển của nhiều các phân tử sinh học kỵ nước như kích thích tố, hoạt chất sinh học và thuốc trong máu. Do vậy, HSA là protein điều trị quan trọng mà chủ yếu được sử dụng trong y tế để điều trị chứng giảm protein-huyết gây ra do mất máu, bị đốt, bị bỏng, phẫu thuật thẩm mỹ và bị tổn thương não, cũng như việc điều trị xơ gan, thận phình to, vân vân.

Hiện nay, HSA dùng cho việc sử dụng vào y tế chủ yếu được chiết suất bởi sự chiết và sự tách từ huyết tương người. Tuy nhiên, sự tiếp cận phương pháp chiết suất này xuất hiện nhiều bất lợi sau đây: một mặt, nguồn huyết tương là không đủ, lượng cung cấp máu hạn chế sẽ không thể đáp ứng được nhu cầu của việc sản xuất HSA và sự chiết suất có liên quan của nó; mặt khác, chỉ nói riêng về máu có thể là một yếu tố rủi ro, ví dụ nó có thể chứa mầm bệnh lây nhiễm nguy hiểm như bệnh viêm gan virus, virus suy giảm miễn dịch của người (HIV) và các bệnh tương tự, gây

ra mối lo ngại lớn về việc sử dụng của HSA được chiết từ huyết tương. Do vậy, vấn đề cần thiết ở đây là phát triển một quy trình thay thế để sản xuất HSA.

Với sự phát triển của kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp ADN hiện đại, các nhà nghiên cứu rất quan tâm đến việc sản xuất và ứng dụng của albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA). Cho đến nay, hệ thống biểu hiện khác nhau đã được sử dụng thử nghiệm để sản xuất hàng loạt rHSA. Ví dụ, các nhóm sinh vật có nhân như trực khuẩn ruột kết (Latta, M. các đồng tác giả, *Sinh học/ Công nghệ*, 5:1309-1314, (1987)), trực khuẩn *subtilis* (Saunders, C. W. các đồng tác giả, *J. Bacteriol.* 169: 2917-2925, (1987)), nhóm sinh vật có nhân như nấm men (WO 00/44772, EP0683233A2, US 5612196) và cũng có thể sử dụng nhân giống các tế bào động vật đã được sử dụng để sản xuất rHSA. Tuy nhiên, cách tiếp cận nêu trên không phù hợp cho sản xuất công nghiệp vì mức biểu hiện thấp và chi phí sản xuất cao.

Đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc Số 200510019084 của các tác giả sáng chế bộc lộ phương pháp sản xuất rHSA sử dụng các tế bào nội nhũ gạo làm hệ thống sinh học, bao gồm: sử dụng vùng khởi động và peptit tín hiệu được biểu hiện đặc hiệu trong nội nhũ gạo để ngay lập tức đưa rHSA vào trong hệ thống có màng nội bào của các tế bào nội nhũ của gạo và lưu giữ rHSA trong thể protein của nội nhũ gạo, do đó cho phép rHSA tích lũy nhiều trong mầm hạt và cuối cùng đạt tới mức biểu hiện cao. Mức biểu hiện của rHSA được chứa ít nhất là trên 0,3% dựa trên trọng lượng của mầm hạt. Phương pháp có những ưu điểm về mức biểu hiện cao và chi phí thấp, do vậy giải pháp này đề cập đến khả năng phát triển một chiến lược mới để sản xuất thuốc protein.

Hiện tại, không có quy trình sản xuất đầy đủ để chiết rHSA từ gạo chuyển gen. Phương pháp và quy trình chiết protein từ gạo chuyển gen, cải thiện hiệu quả việc chiết protein đích và giảm hiệu suất chiết của protein không mong muốn là những yếu tố quan trọng của việc nghiên cứu và phát triển công nghệ. Sáng chế đề xuất công nghệ và quy trình chiết hiệu quả cao của rHSA từ gạo chuyển gen ở quy mô lớn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA) từ gạo chuyển gen.

Hiệu quả đạt được của sáng chế:

1. Hiệu quả chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp tăng lên bởi sự kết hợp của độ pH và nồng độ muối khác nhau. Tài liệu cho thấy nồng độ của albumin huyết thanh người tái tổ hợp ở sản phẩm chiết chứa theo sáng chế là từ 0,65 đến 0,66mg/mL, trong khi nồng độ theo kỹ thuật thực hiện trước đó chỉ chứa từ 0,30 đến 0,315mg/mL. Do vậy, để đáp ứng được phương pháp cải tiến của sáng chế, lượng chiết của albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ trọng lượng tương đương của gạo xát tăng 1,15 lần.

2. Hiệu quả chiết của protein không mong muốn bị giảm. Nồng độ của tổng số protein trong dịch chiết ban đầu theo sáng chế là từ 6,90 đến 7,05mg/mL và hàm lượng của tổng số protein là 2,8mg/mL sau bước kết tủa, bị giảm xuống 2,46 lần.

3. Hiệu quả vô trùng hoặc sự tiết trùng tăng lên vì sự cải thiện của bước vi lọc, loại trừ sự tạp nhiễm khuẩn mà có thể được đưa vào bước thanh lọc liên tục và giảm lượng nội độc tố vi khuẩn mà có thể xuất hiện trong quá trình sản xuất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị cho thấy ảnh hưởng của sự kết hợp nhiệt độ chiết khác nhau và số lần trên hiệu suất chiết của tổng lượng protein từ gạo chuyển gen được xát.

Fig.2 là đồ thị cho thấy ảnh hưởng của sự kết hợp nhiệt độ chiết khác nhau và số lần trên hiệu suất chiết của rHSA từ gạo chuyển gen được xát.

Fig.3 là hình ảnh của SDS-PAGE của các mẫu thu được bằng kết hợp trực giao của nhiệt độ và số lần chiết khác nhau.

Fig.4 là đồ thị cho thấy hiệu quả của sự kết hợp độ pH và muối khác nhau. nồng độ của amoni sulfat trên hiệu suất chiết của tổng protein từ gạo chuyển gen được xát.

Fig.5 là đồ thị cho thấy hiệu quả của sự kết hợp độ pH và nồng độ muối amoni sulfat khác nhau trên hiệu suất chiết rHSA từ gạo chuyển gen được xát.

Fig.6 là hình ảnh của SDS-PAGE của mẫu thu được bởi sự kết hợp trực giao của độ pH và muối khác nhau. Nồng độ của amoni sulfat.

Fig.7 là đồ thị cho thấy hiệu quả của nồng độ natri caprylat khác nhau và số lần kết tủa trên hiệu suất chiết của tổng protein.

Fig.8 là hình ảnh của SDS-PAGE của mẫu chiết thu được ở nồng độ khác nhau của natri caprylat và số lần kết tủa.

Fig.9 là hình ảnh của SDS-PAGE của mẫu chiết thu được ở độ pH và số lần kết tủa khác nhau.

Fig.10 là giản đồ cho thấy phần trăm của rHSA ở tổng protein của dung dịch được chiết trước và sau khi lọc bằng cỡ lỗ của màng khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến giải pháp kỹ thuật sau:

Phương pháp chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ gạo chuyển gen, bao gồm các bước sau:

1) loại bỏ vỏ của thóc chuyển gen có chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp, nghiền hạt gạo được tách vỏ, sau đó trộn hạt gạo chuyển gen được nghiền với dung dịch đệm chiết và dịch chiết kết hợp khuấy để thu được hỗn hợp I;

2) điều chỉnh độ pH của hỗn hợp I của bước 1) từ 4,0 đến 4,5 và cho hỗn hợp kết tủa từ 1 đến 12 giờ để thu được hỗn hợp II;

3) lọc hỗn hợp II ở bước 2) và thu về dịch lọc để có dung dịch chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp có nồng độ cao.

Cụ thể, ở bước 1), khi albumin huyết thanh người tái tổ hợp được biểu hiện trong số các hạt tinh bột trong các tế bào nội nhũ gạo, để giảm hiệu suất chiết protein không mong muốn, gạo chuyển gen có chứa rHSA được tách vỏ và hạt gạo được tách vỏ được nghiền thành bột gạo hoặc gạo được nghiền với độ nguyên chất từ 80 đến 120 mesh theo kích thước để tăng hiệu suất chiết của albumin huyết thanh người tái tổ hợp.

Dung dịch đệm chiết bao gồm từ 10 đến 30mM dung dịch đệm phosphat

(PBS), axetat natri từ 10 đến 20mM, amoni sulfat từ 10 đến 50mM và natri caprylat từ 5 đến 40mM, và dung dịch đệm chiết có độ pH từ 6,5 đến 8.

Ở dung dịch đệm chiết, amoni sulfat nêu trên tốt hơn là có nồng độ từ 10 đến 30mM, tốt hơn nữa là từ 15 đến 30mM, và tốt nhất là từ 20 đến 30mM.

Ở dung dịch đệm chiết, natri caprylat nêu trên tốt hơn là có nồng độ từ 5 đến 30 mM, tốt hơn nữa là từ 5 đến 20mM, và tốt nhất là từ 10 đến 20mM.

Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, dung dịch đệm chiết bao gồm dung dịch đệm phosphat (PBS) từ 10 đến 30mM, axetat natri từ 10 đến 20mM, amoni sulfat từ 15 đến 30mM và natri caprylat từ 5 đến 20mM; và dung dịch đệm chiết có độ pH từ 6,5 đến 8.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, dung dịch đệm chiết bao gồm dung dịch đệm phosphat 25mM, natri axetat 20mM, amoni sulfat 20mM và natri caprylat 20mM, và có độ pH là 7,5.

Để thu được hiệu suất chiết cao nhất albumin huyết thanh người tái tổ hợp và cân bằng mối quan hệ giữa thể tích chiết và hiệu quả chiết bột gạo được trộn với dung dịch đệm chiết theo tỉ lệ trọng lượng/thể tích (kg/L, trọng lượng của gạo nghiền/thể tích dung dịch đệm chiết) từ 1:5 đến 1:10, sau đó được chiết kết hợp với việc khuấy 60 vòng trên một phút (rpm) trong thời gian từ 1 đến 3 giờ. Nó được thể hiện qua các thí nghiệm theo tỉ lệ nằm trong khoảng từ 1:5 đến 1:10 không ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả chiết của albumin huyết thanh người tái tổ hợp. Với mục đích để giảm chi phí và thể tích chiết, gạo nghiền chuyển gen tốt hơn là được trộn với dung dịch đệm chiết theo tỉ lệ trọng lượng/thể tích (kg/L) 1:5, và thời gian chiết tốt hơn là từ 1 đến 1,5 giờ.

Để chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ hạt gạo được nghiền với hiệu quả tối đa, theo tính năng riêng của albumin huyết thanh người có sự ổn định ở nhiệt độ 60°C, sự tăng nhiệt độ chiết rõ ràng là nâng cao hiệu suất chiết của tổng protein và albumin huyết thanh người tái tổ hợp cho thấy HSA không bị biến chất bởi nhiệt độ. Do vậy, xử lý nhiệt được sử dụng trong sáng chế làm tăng đáng kể hiệu suất chiết của albumin huyết thanh người tái tổ hợp. Nhiệt độ chiết đã biết là từ 45

đến 60°C, và tốt hơn là từ 55 đến 60°C.

Khi cả việc chiết của albumin huyết thanh người tái tổ hợp và protein không mong muốn được tăng cường trong điều kiện nhiệt và độ pH cao, loại bỏ protein không mong muốn phụ của quy trình được đề cập ở trên có thể được tiến hành bằng cách cho kết tủa protein đảo của nội nhũ gạo tại điểm đẳng điện của albumin huyết thanh người. Quy trình kết tủa ở bước 2) theo sáng chế cho thấy ở độ pH thấp. Sau khi chiết, hỗn hợp được chiết được điều chỉnh đến độ pH từ 4,0 đến 4,5, sau đó hỗn hợp được kết tủa ở nhiệt độ phòng trong thời gian ít nhất 1 giờ để loại bỏ hiệu ứng âm tính của protein không mong muốn dư thừa được tạo ra bằng quy trình chiết trong điều kiện nhiệt và độ pH cao. Theo một phương án của sáng chế, axit axetic được sử dụng để điều chỉnh độ pH từ 4,0 đến 4,5, tốt hơn là 4,5; thời gian kết tủa là từ 1 đến 12 giờ, tốt hơn là từ 3 đến 12 giờ, và tốt hơn nữa là 6 giờ.

Theo đặc tính vật lý khác nhau giữa các hạt tinh bột tồn tại trong gạo được nghiền và phân chất lỏng, kỹ thuật thông thường và các thiết bị có thể được sử dụng để tách các chất không mong muốn từ việc chiết protein. Hỗn hợp được chiết từ quy trình kết tủa ở bước 2) được xử lý tách rắn-lỏng bằng lọc áp lực hoặc các thiết bị khác tương tự, đạt được mục đích tách tinh bột thải từ protein đích có hiệu quả trên một quy mô lớn. Sáng chế đề cập đến phương pháp đơn giản, nhanh và chi phí thấp để cuối cùng thu được dung dịch có nồng độ cao ở albumin huyết thanh người tái tổ hợp.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình lọc nêu trên bao gồm các bước lọc qua thiết bị lọc áp lực dạng khung phẳng kiểu vải lọc, sau đó đến bằng cách lọc qua vi lọc bằng màng sợi rỗng. Màng sợi rỗng nêu trên được làm từ màng sợi polyetesulfon, có cỡ lỗ từ 0,20µm đến 0,45µm theo đường kính, và tốt hơn là 0,22µm.

Ở dung dịch có chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp được tạo ra theo phương pháp của sáng chế, nồng độ của albumin huyết thanh người tái tổ hợp là từ 0,65 đến 0,66mg/mL; nồng độ ban đầu của tổng protein là từ 6,90 đến 7,05mg/mL và bị giảm xuống còn 2,8 mg/mL sau bước kết tủa; hàm lượng protein không mong

muốn bị giảm đáng kể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các tính năng và lợi thế của sáng chế có thể được hiểu thêm từ các ví dụ sau đây. Các ví dụ chỉ được minh họa và không nên hiểu như sự hạn chế sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Chiết rHSA theo phương pháp được cải tiến của sáng chế

Gạo chuyển gen có thể được điều chế theo phương pháp được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc Số 200510019084 của các tác giả sáng chế. Lúa được tách vỏ để thu được gạo nửa đánh bóng và được nghiền để thu được gạo xát với độ mịn từ 80 đến 100 mesh. Gạo xát được trộn với dung dịch đệm chiết theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích, kg/L), và được chiết trong thời gian 1,5 giờ ở nhiệt độ 60°C. Các thành phần của dung dịch đệm chiết là: dung dịch đệm phosphat 25mM, natri axetat 20mM, amoni sulfat 10mM, natri caprylat 10mM; độ pH 7,5. Hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH 4,5 với axit axetic và được đặt trong thời gian ít nhất 3 giờ để kết tủa protein không mong muốn. Sau đó hỗn hợp thu được tùy thuộc vào sự lọc ép sử dụng thiết bị lọc ép khung phẳng (dạng vải lọc) và vi lọc bằng cột sợi rỗng với cỡ lỗ là 0,22µm, để thu được dịch nổi ở trên có chứa rHSA. nồng độ của rHSA là khoảng 0,66 mg/mL.

Ví dụ 2: Chiết rHSA theo phương pháp trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật

Gạo chuyển gen có thể được điều chế theo phương pháp được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc Số 200510019084 của các tác giả sáng chế. Lúa được tách vỏ để thu được gạo không đánh bóng và được xát để thu được gạo xát với độ nguyên chất từ 80 đến 100 mesh. Gạo nghiền được trộn với dung dịch đệm chiết theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích, kg/L) và được chiết ít nhất trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các thành phần của dung dịch đệm chiết là: dung dịch đệm phosphat 25mM và natri axetat 20mM; độ pH 6,5. Hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH 4,5 với axit axetic và được đặt trong thời gian 1 giờ để tiến hành sự kết tủa. Sau đó hỗn hợp thu được được cho qua sự lọc ép sử dụng thiết bị lọc ép dạng khung phẳng (loại vải lọc) và vi lọc bằng cột sợi rỗng với cỡ lỗ là 0,45µm, để

thu được phần nổi trên bề mặt có chứa rHSA. nồng độ của rHSA là khoảng 0,314 mg/mL. Được so sánh với kết quả theo phương pháp đã được cải tiến của sáng chế, hàm lượng của tổng protein chỉ là 45,5%, và hàm lượng của rHSA là 47,7% (từ Fig.1 đến Fig.3).

Ví dụ 3: Hiệu quả của nhiệt độ chiết và thời gian trên hiệu suất chiết rHSA

Ví dụ này sử dụng dung dịch đệm chiết bất biến và thực hiện kết hợp trực giao ở nhiệt độ khác nhau (lần lượt là 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) và thời gian chiết khác nhau (lần lượt là 20 phút, 40 phút, 60 phút, 80 phút) để thu được các mẫu chiết khác nhau. Phương pháp BCA được sử dụng để xác định nồng độ của tổng protein ở mỗi mẫu và ELISA được sử dụng để xác định nồng độ của rHSA ở mỗi mẫu. Kết quả cho thấy ở Fig.1 và Fig.2, tương ứng. Mỗi mẫu bị lệ thuộc vào SDS-PAGE và ảnh điện được thể hiện ở Fig.3.

Điều đó có thể thấy từ Fig.1 và Fig.2 với sự tăng thời gian và nhiệt độ chiết, nồng độ của tổng protein và rHSA ở dịch chiết của gạo nghiền có xu hướng tăng tương ứng. Nhiệt độ chiết có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả chiết hơn thời gian chiết. hiệu quả chiết cao nhất của rHSA đã thu được khi chiết suất được thực hiện tại 60°C trong 60 phút. Điều đó được thấy từ ảnh điện di ở Fig.3, trong điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau, các dải quang phổ của dịch chiết protein có sự khác biệt đáng kể ở nơi mà trọng lượng phân tử lớn hơn rHSA, trong khi các dải quang phổ là giống hệt nhau ở nơi mà trọng lượng phân tử thấp hơn của rHSA ở điều kiện chiết khác nhau.

Ví dụ 4: Hiệu quả của giá trị độ pH của dung dịch đệm chiết và nồng độ muối của amoniac sulfat trên hiệu suất chiết rHSA

Ví dụ này sử dụng điều kiện ổn định cho dịch chiết ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 60 phút. Tỷ lệ gạo xát so với dung dịch đệm chiết (trọng lượng/thể tích, kg/L) là 1:5. kết hợp trực giao được thực hiện trên nồng độ khác nhau của amoniac sulfat (lần lượt là 0, 10, 30, 50mM) và độ pH của dung dịch đệm chiết (lần lượt là độ pH 6,5, 7, 7,5, 8). Phương pháp BCA được sử dụng để xác định nồng độ của tổng protein và ELISA được sử dụng để xác định nồng độ của rHSA ở mỗi mẫu. Kết quả

được thấy ở Fig.4 và Fig.5, tương tự. SDS-PAGE của các mẫu được chứa bởi kết hợp trực giao với nồng độ khác nhau của amoniac sulfat và độ pH của dung dịch đệm chiết được thể hiện ở Fig.6.

Điều đó có thể thấy từ kết quả của Fig.4 và Fig.5 với sự tăng độ pH của dung dịch đệm chiết và nồng độ của muối, nồng độ của tổng protein và rHSA ở dịch chiết của gạo nghiền có xu hướng tăng tương ứng, với độ lệch trong từng trường hợp riêng biệt. Độ pH của dung dịch đệm chiết có ảnh hưởng lớn đáng kể trên hiệu suất chiết của rHSA hơn nồng độ của muối của dung dịch đệm chiết. Trong điều kiện như vậy, nơi mà độ pH của dung dịch đệm chiết là 7,5 và nồng độ của muối là 10mM, hiệu quả chiết của rHSA là cao nhất. Được so sánh với thời gian chiết và nhiệt độ khác nhau, độ pH và nồng độ của muối khác nhau chỉ có chút ảnh hưởng đến dải protein được chiết. Khi ở độ pH cao hơn, có một dải rHSA hơi nhỏ hơn so với dải chính nêu trên, trong khi các dải chính khác lại giống hệt nhau, như được thể hiện trong Fig.6.

Ví dụ 5: Hiệu quả của thời gian kết tủa và nồng độ của natri caprylat trên hiệu suất chiết rHSA

Nồng độ của natri caprylat được đề xuất lần lượt là 10mM, 20mM, 30mM và 40mM để thử nghiệm liệu sự tăng của nồng độ của natri caprylat có tốt hơn hiệu quả bảo vệ trên rHSA. Sau khi chiết, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH là 4,5, và hỗn hợp thu được được cho kết tủa lần lượt trong thời gian từ 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và qua đêm để xác định nồng độ của protein. Hiệu quả của số lần kết tủa khác nhau và nồng độ của natri caprylat trên dịch chiết của tổng protein được thể hiện ở Fig.7. Mô hình SDS-PAGE của các mẫu chứa nồng độ khác nhau của natri caprylat và số lần kết tủa được thể hiện ở Fig.8. Dịch chiết của Fig.7 và Fig.8 dùng để chỉ các mẫu hỗn hợp sau khi dịch chiết trước khi điều chỉnh độ pH.

Có thể thấy từ Fig.7 và Fig.8 rằng số điều chỉnh độ pH của dung dịch chiết đến 4,5 dẫn đến nhiều rHSA kết tủa. Thời gian kết tủa tăng, một phần rHSA kết tủa được tái hòa tan. Sau khi cho kết tủa qua đêm, nồng độ trung bình của tổng protein là 78% dựa trên giá trị trước khi cho kết tủa và không có hiện tượng giảm sau khi

cho kết tủa qua đêm. Trong khi đó các dải bị giảm và protein không mong muốn cũng kết tủa nhiều trong suốt quá trình kết tủa. Có thể thấy rằng natri caprylat 20 mM có hiệu quả bảo vệ tốt nhất, trong khi nồng độ cao hơn gây ra sự kết tủa tăng.

Ví dụ 6: Hiệu quả của độ pH và thời gian về hiệu quả kết tủa

Để xác định hiệu quả của độ pH và thời gian kết tủa trên hiệu quả kết tủa, gạo nghiền được trộn với dung dịch đệm chiết (dung dịch đệm phosphat 25mM, amoni sulfat 10mM, natri caprylat 10mM, độ pH 7,5) theo tỉ lệ (trọng lượng/thể tích, kg/L) là 1:5, sau đó được chiết ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ kết hợp với khuấy. Kết quả chiết của hạt gạo nghiền được chia thành sáu phần, chúng được lần lượt điều chỉnh đến độ pH 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0. Các chất chiết điều chỉnh độ pH được lắc trên thiết bị lắc ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 và 2 giờ, lần lượt theo các mẫu. Khung SDS-PAGE của các mẫu được thể hiện ở Fig.9. Dịch chiết của Fig.9 dùng để chỉ mẫu hỗn hợp sau khi chiết, nhưng trước khi điều chỉnh độ pH.

Có thể nhìn thấy từ khung SDS-PAGE ở Fig.9 khi độ pH giảm, hiệu quả kết tủa của protein không mong muốn được tăng cường, cùng với sự giảm của rHSA. Sự kéo dài thời gian kết tủa có tác động tích cực đối với hiệu quả kết tủa. Ở độ pH dưới 4,1, dải phân tử được kết tủa hoàn toàn. Xem xét các yêu cầu kỹ thuật của hệ thống quy trình và giảm thiểu sự giảm của rHSA đích, cho kết tủa ở độ pH 4,5 là phù hợp.

Ví dụ 7: So sánh giữa hiệu quả khử trùng sử dụng kích cỡ khác nhau của màng sợi rỗng polyetersulfon (PES) trong bước vi lọc

1. Hiệu quả của vi lọc bằng các màng lọc khác nhau trong việc loại bỏ vi khuẩn trong gạo

Mẫu dung dịch được sử dụng ở ví dụ này được lọc sạch bằng sự lọc ép, thu được bằng cách xử lý gạo nghiền chuyển gen sử dụng quy trình được cải tiến theo sáng chế trong quy mô sản xuất thí điểm. Các mẫu được xử lý bằng cột sợi rỗng nhỏ với cỡ lỗ là 0,20µm và 0,45µm tương ứng. Dung dịch gốc trước quá trình xử lý và được lọc sau xử lý đều được chọn. 0,1ml dung dịch gốc hoặc dung dịch loãng tương ứng của nó được sử dụng trên các đĩa LB để xem xét các hiệu quả khử

trùng của hai màng lọc. Kết quả được thấy ở bảng 1. nồng độ của albumin huyết thanh người tái tổ hợp và tổng protein trong các dung dịch trước và sau khi lọc được xác định, và phần trăm albumin huyết thanh người tái tổ hợp ở tổng protein được tính toán. Đồ thị dạng thanh chỉ phần trăm được thể hiện ở Fig.10.

Bảng 1

Mức độ pha loãng	1,0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	CFU
Mẫu sau khi lọc ép	382	37	2	2	0	1	3800
Mẫu sau khi lọc 0,45 μ m	41	7	0	0	0	0	400-700
Mẫu sau khi lọc 0,20 μ m	0	0	0	0	0	0	0

Có thể thấy từ kết quả của bảng 1 mà 0,45 μ m màng sợi rỗng có thể loại ra 50% đến 90% vi khuẩn sống trong khi lọc từ sự lọc ép, ngược lại 0,20 μ m màng sợi rỗng có thể loại bỏ 100% vi khuẩn sống trong khi lọc từ sự lọc ép, đảm bảo rằng sự nhiễm khuẩn không thể đưa vào bước thanh lọc liên tục thông qua sự lọc, do đó làm giảm hàm lượng nội độc tố vi khuẩn trong quá trình sản xuất.

Đối với Fig.10, so với các mẫu lọc của màng sợi rỗng 0,20 μ m và 0,45 μ m, khi được lọc bằng màng 0,20 μ m, sự giảm albumin huyết thanh người tái tổ hợp là ít hơn nhiều so với tổng protein. Dịch chiết được lọc bằng màng 0,20 μ m có nồng độ tương đối vào của albumin huyết thanh người tái tổ hợp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ hạt gạo chuyển gen, bao gồm các bước sau:

1) loại bỏ vỏ của thóc chuyển gen có chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp, nghiền hạt gạo được tách vỏ, sau đó trộn hạt gạo chuyển gen được nghiền với dung dịch đệm chiết bao gồm 10 đến 30mM dung dịch đệm phosphat, natri axetat từ 10 đến 20mM, amoni sulfat từ 15 đến 30mM và natri caprylat từ 5 đến 20mM, và có độ pH từ 6,5 đến 8 và dịch chiết kết hợp khuấy để thu được hỗn hợp I;

2) điều chỉnh độ pH của hỗn hợp I của bước 1) từ 4,0 đến 4,5 và cho kết tủa trong khoảng thời gian từ 1 đến 12 giờ để thu được hỗn hợp II;

3) lọc hỗn hợp II của bước 2) và thu dịch lọc để thu được dung dịch chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp có nồng độ cao.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 1) hạt gạo chuyển gen được nghiền nêu trên có độ mịn từ 80 đến 120 mesh.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm chiết nêu trên có độ pH từ 7,0 đến 7,5.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm chiết nêu trên bao gồm dung dịch đệm phosphat 25mM, natri axetat 20mM, amoni sulfat 20mM và natri caprylat 20mM, và có độ pH là 7,5.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 1) hạt gạo chuyển gen được nghiền nêu trên và dung dịch đệm chiết nêu trên được trộn với tỉ lệ theo trọng lượng/thể tích (kg/L) nằm trong khoảng từ 1:5 đến 1:10; thời gian chiết từ 1 đến 3 giờ; và nhiệt độ chiết từ 45 đến 60°C.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó ở bước 1) hạt gạo chuyển gen được nghiền nêu trên và dung dịch đệm chiết nêu trên được trộn với tỉ lệ theo trọng lượng/thể tích (kg/L) là 1:5; thời gian chiết từ 1 đến 1,5 giờ; và nhiệt độ chiết từ 55 đến 60°C.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 2) hỗn hợp I nêu trên được điều chỉnh đến độ pH từ 4,0 đến 4,5 và sau đó được kết tủa trong thời gian từ 3 đến 12 giờ ở nhiệt độ phòng.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó ở bước 2) hỗn hợp I nêu trên được điều chỉnh đến độ pH 4,5 và được kết tủa qua đêm.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 3) bước lọc nêu trên bao gồm các bước lọc bằng thiết bị lọc áp lực dạng khung phẳng kiểu vải lọc, sau đó lọc bằng vi lọc với màng sợi rỗng polyetesulfon.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó màng sợi rỗng polyetesulfon nêu trên có kích thước lỗ từ 0,20 μ m đến 0,45 μ m.

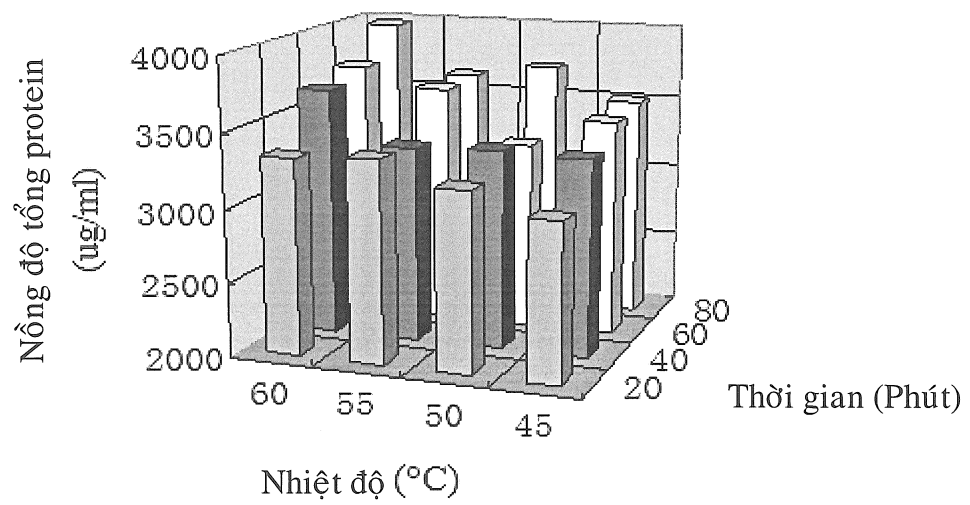


Fig. 1

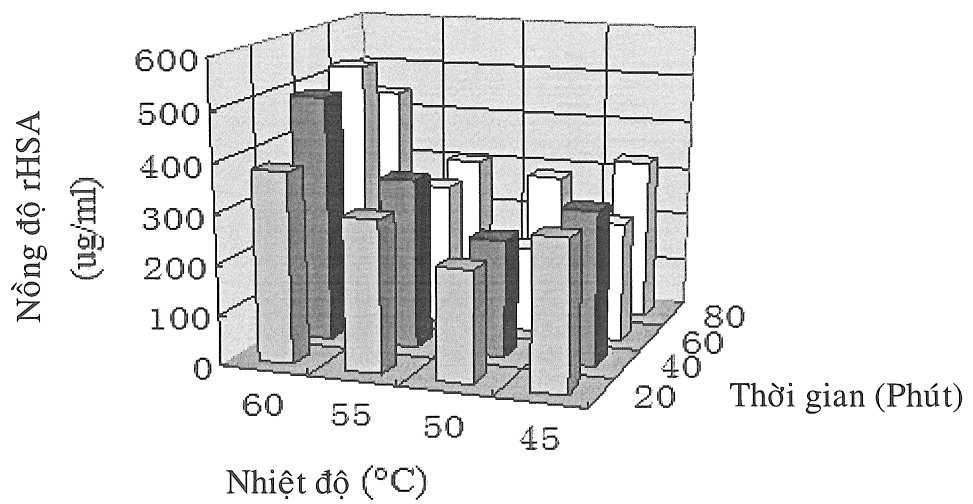


Fig. 2

Nhiệt độ ./ °C	60°C				55°C				50°C				45°C			
Thời gian/Phút	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20

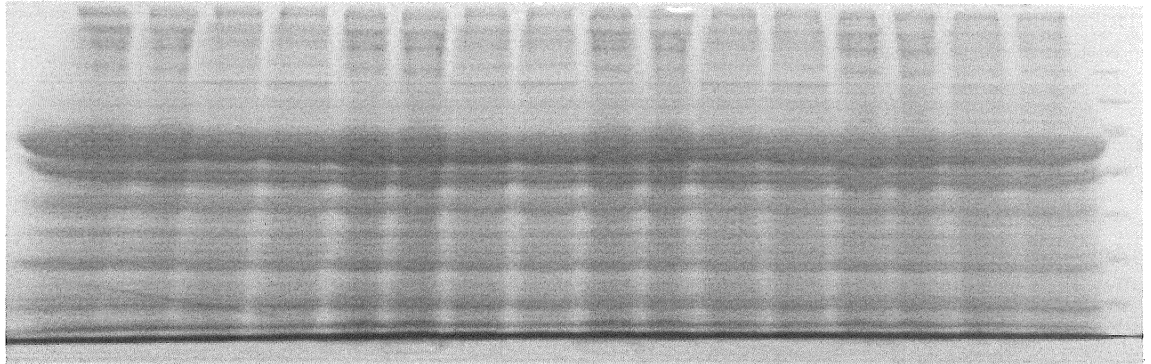


Fig. 3

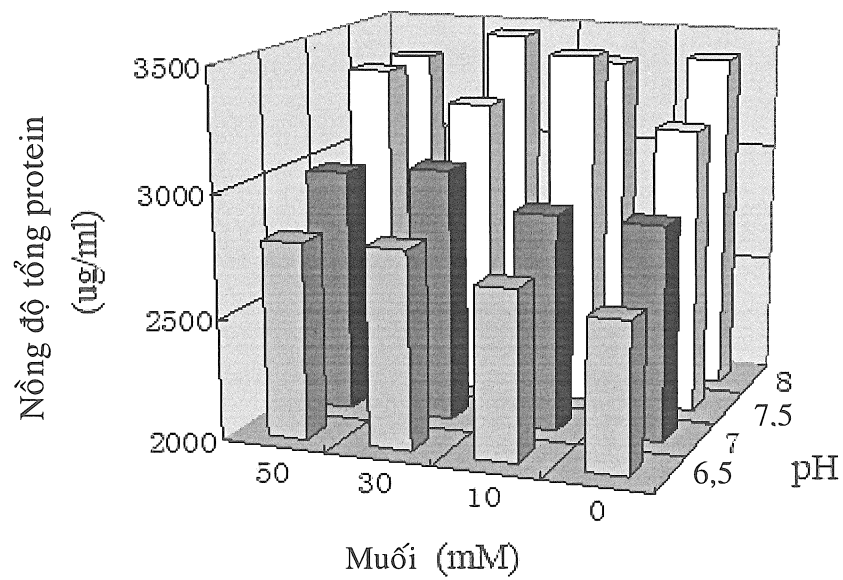


Fig. 4

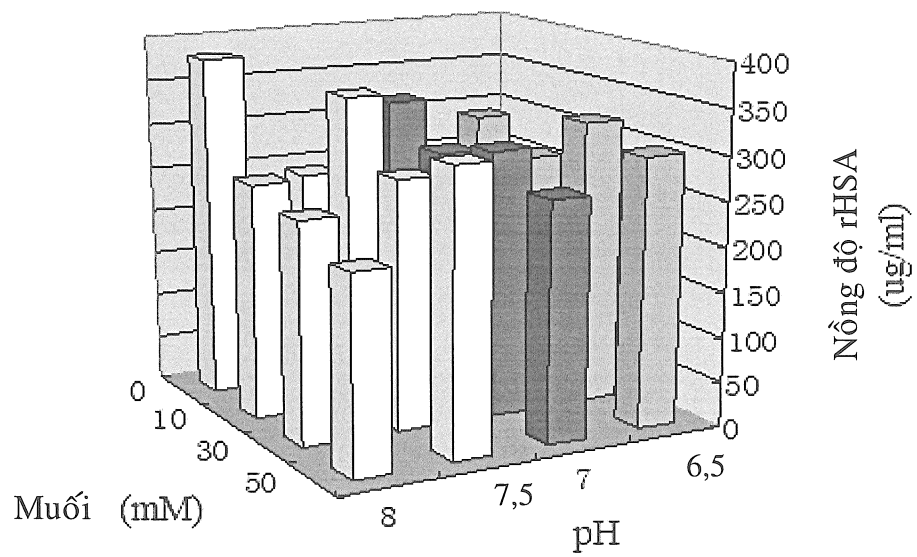


Fig. 5

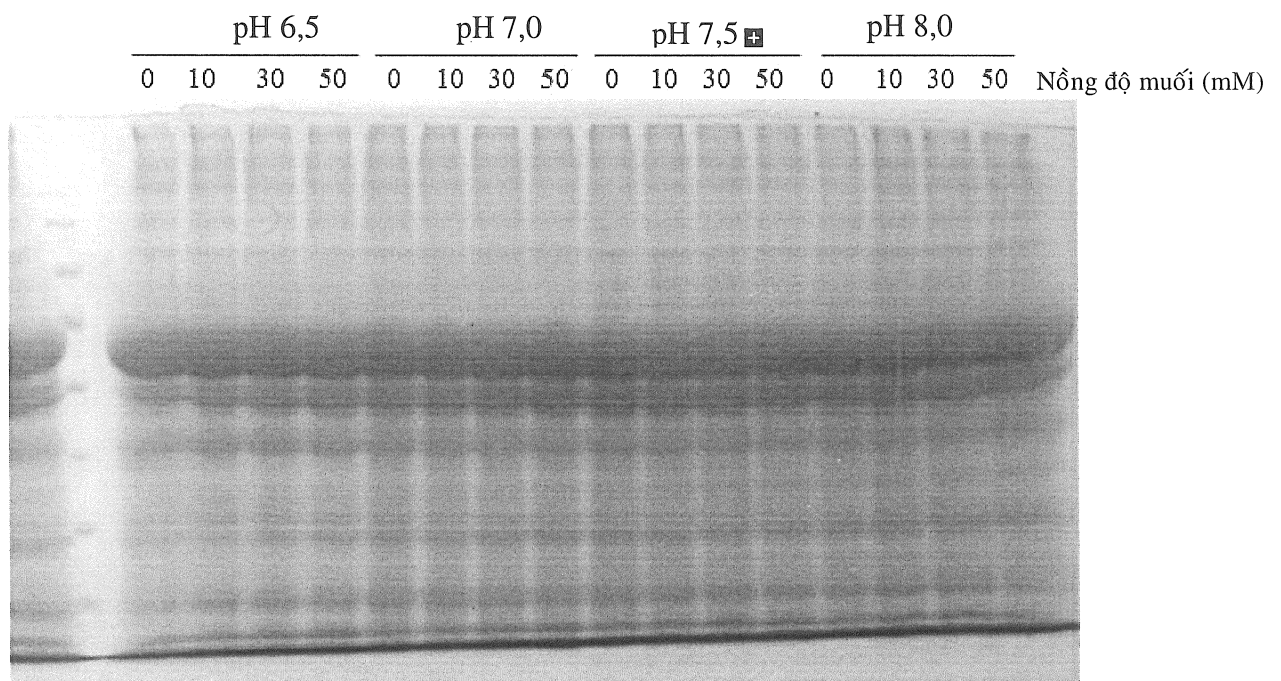


Fig. 6

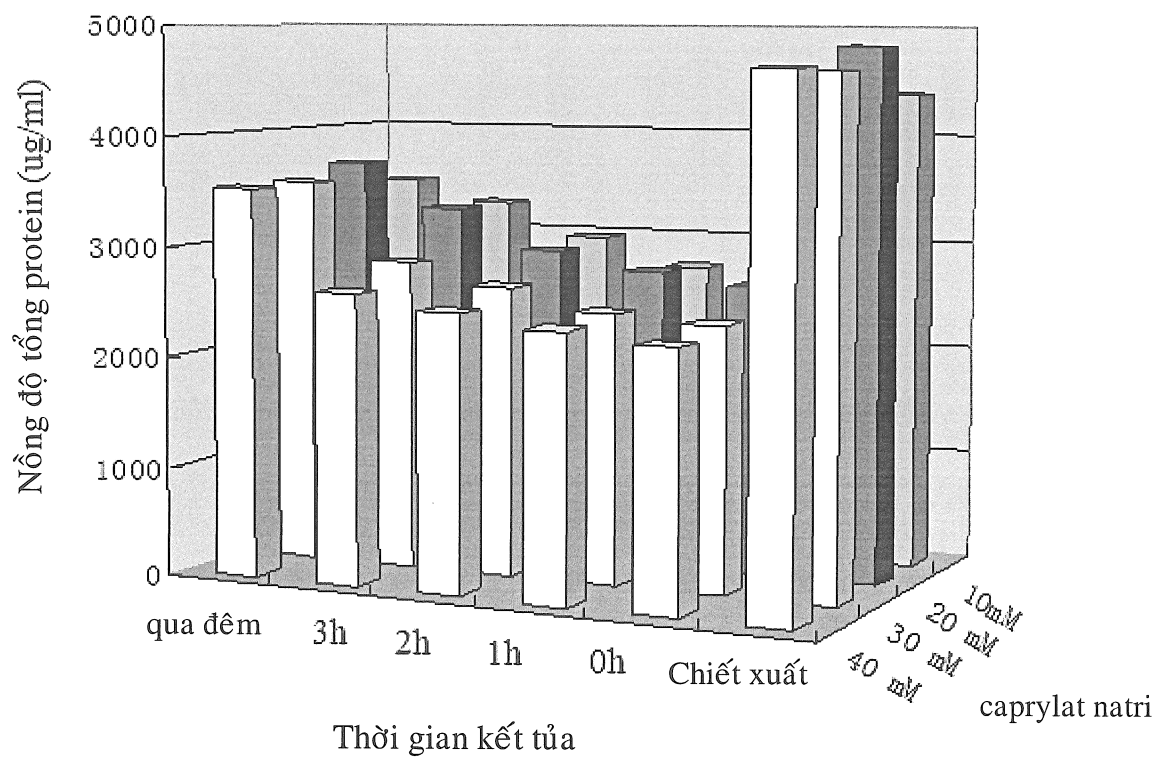


Fig. 7

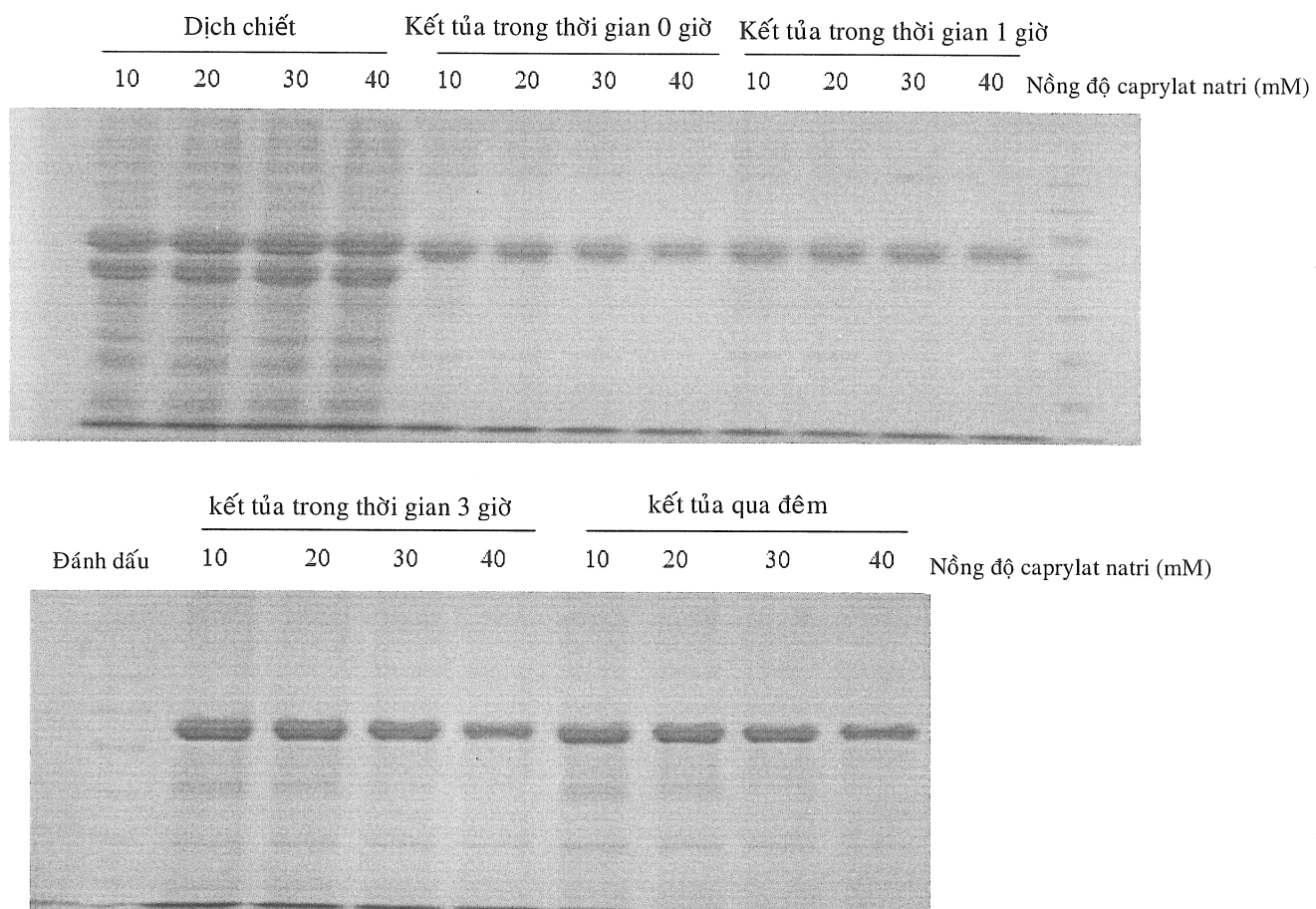


Fig. 8

Dịch chiết	Kết tủa trong thời gian 1 giờ						kết tủa trong thời gian 2 giờ						(pH)
	4,0	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1	4,0	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1	

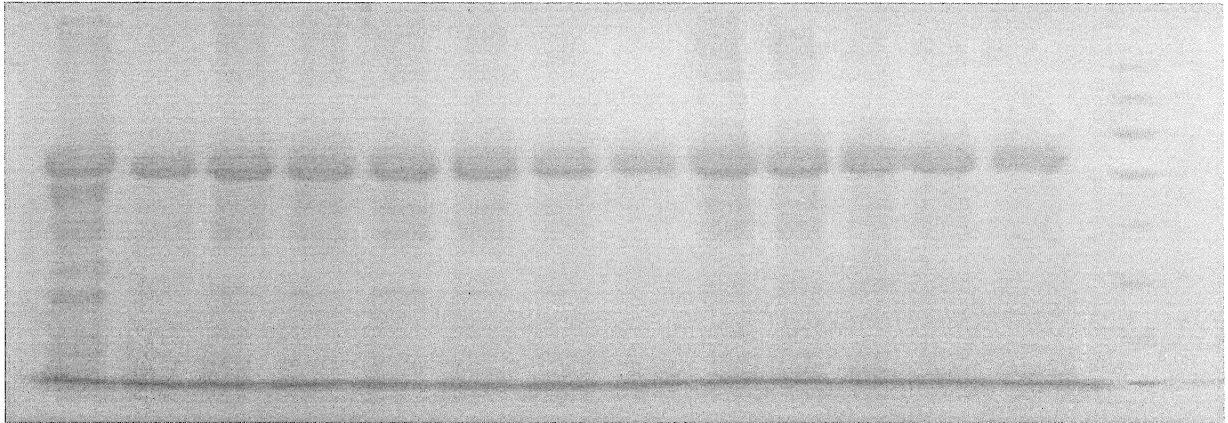


Fig. 9

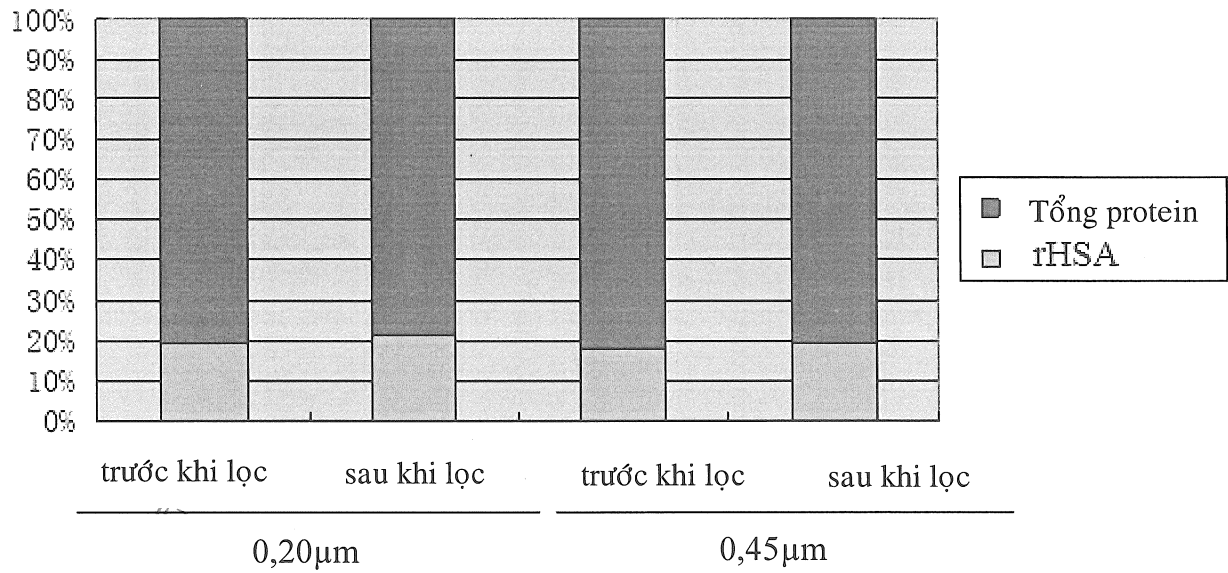


Fig. 10