



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

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

(11)



1-0026101

(51)⁷ C07K 1/18; C07K 1/36; C07K 14/79;
C07K 1/34

(13) B

(21) 1-2015-03912

(22) 01/04/2014

(86) PCT/CN2014/074539 01/04/2014

(87) WO/2014/169760 23/10/2014

(30) 201310131488.7 16/04/2013 CN

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/02/2016 335A

(73) WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP (CN)

#666 Gaoxin Avenue, East Lake High-Tech Development Zone, Wuhan, Hubei
430079 (CN)

(72) YANG, Daichang (CN); SHI, Jingni (CN); OU, Jiquan (CN).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ ĐỀ TÁCH VÀ TINH CHẾ LACTOFERRIN Ở NGƯỜI
TÁI TỔ HỢP TỪ HẠT THÓC GIỐNG CHUYỂN GEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sắc ký để tách và tinh chế lactoferrin ở người tái tổ hợp (rLF) từ các hạt thóc giống chuyển gen, bao gồm các bước sau: (1) sử dụng chất đệm chiết để tạo ra phần chiết thô rLF bằng cách sử dụng các hạt thóc giống chuyển gen có lactoferrin ở người tái tổ hợp làm nguyên liệu thô; và (2) tách và tinh chế phần chiết thô rLF bằng sắc ký trao đổi cation, để thu được đối tượng đích rLF tinh khiết. Phương pháp sắc ký còn bao gồm bước tái tạo nhựa.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế thuộc về lĩnh vực công nghệ sinh học, và cụ thể đề cập đến phương pháp tách và tinh chế lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lactoferrin (LF) là protein liên kết sắt mà có mặt phổ biến trong sữa và các mô khác nhau, mà được tiết ra bởi các động vật có vú, có nhiều chức năng sinh lý như kháng khuẩn, chống viêm và tăng cường hệ miễn dịch. Các nghiên cứu trong thử nghiệm trên cơ thể sống và thử nghiệm động vật đã thể hiện Lactoferrin có tác dụng phòng ngừa nhiễm vi khuẩn đường ruột, như nhiễm rotavirus hình bánh xe, Giardia, Shigella, Salmonella. Hiệu quả ức chế của lactoferrin trên vi khuẩn gây bệnh đường ruột đạt được chủ yếu qua hai cơ chế: ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn; phá hủy các chức năng của yếu tố độc lực trên bề mặt của vi khuẩn và do đó làm suy yếu khả năng của virus bám vào hoặc xâm nhập các tế bào động vật có vú. Các nghiên cứu đã cho thấy sự bổ sung của Lactoferrin trong thực phẩm công thức dùng cho trẻ nhỏ có ý nghĩa lớn, và có thể không chỉ đáp ứng các nhu cầu tăng trưởng và phát triển của trẻ, mà còn có lợi cho sức khỏe của trẻ em. Các nước phát triển trên thế giới như New Zealand, Thụy Sĩ, Úc, Hà Lan, có nguồn sữa chất lượng tốt nhất trên thế giới, hầu hết sữa bột công thức cho trẻ sơ sinh cao cấp của các nước này chứa lactoferrin, mà đây là thành phần quan trọng trong sữa mẹ.

Do sự hạn chế của nguồn sữa, sự cung cấp lactoferrin không thể đáp ứng được nhu cầu thị trường, nên cần thiết phải tìm ra các cách thay thế để thu được lactoferrin. Vì vậy, nhiều nhà nghiên cứu đã chiết xuất lactoferrin trong một loạt các hệ chiết xuất khác nhau để thu được Lactoferrin tái tổ hợp. Tuy nhiên, các vấn đề như sản lượng thấp, và sự khó khăn lớn khi tinh chế vẫn còn tồn tại. Tài liệu này dành riêng để nghiên cứu hệ chiết xuất gạo và đã chiết thành công lactoferrin ở người tái tổ hợp trong các hạt thóc giống

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sắc ký để tách và tinh chế lactoferrin ở người tái tổ hợp từ các hạt thóc giống chuyển gen. Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký bao gồm các bước sau đây:

1) chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp từ các hạt thóc giống chuyển gen, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp;

2) tiến hành sắc ký trao đổi cation đối với phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp để thực hiện tinh chế sơ bộ, để thu được phân đoạn rửa giải chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp; trong đó, bước sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nhựa trao đổi cation yếu, bước sắc ký bao gồm:

2A) cân bằng cột sắc ký bằng chất đệm chứa Tris 10-25mM, NaAC 10-25mM, NaCl 0-250mM, độ pH=6,0-7,5, với lượng gấp từ 5 đến 15 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ;

2B) sử dụng phần chiết thô ở bước 1) làm mẫu đưa lên cột, trong đó mẫu có độ dẫn là 2-25ms/cm, và độ pH=6,0-7,5; rửa các tạp chất với chất đệm rửa tạp chất, chất đệm rửa tạp chất chứa NaH_2PO_4 3-10mM, Na_2HPO_4 3-10mM, 200-NaCl 300mM, pH 6,5-8,0, và tốc độ dòng rửa giải là 50-200cm/giờ;

2C) rửa giải lactoferrin với chất đệm rửa giải chứa NaH_2PO_4 3-10mM, Na_2HPO_4 3-10mM, 400-650mM NaCl, độ pH=6,5-8,0 ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ, để thu được phân đoạn rửa giải;

3) thu phân đoạn rửa giải ở bước 2), để thu được dung dịch chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình ảnh điện chuyển của sắc ký trao đổi cation trên CM sepharose Fast Flow; trong đó, M: đánh dấu phân tử, S: mẫu đưa lên cột, FT: đỉnh chảy qua, Elu: đỉnh rửa giải rLF, Wash: đỉnh rửa tạp chất.

Fig.2 thể hiện hình ảnh điện chuyển của sắc ký trao đổi cation trên UNO Sphere S; trong đó, S: mẫu đưa lên cột, FT: đỉnh chảy qua, CIP: sạch tại chỗ, 20%, 40%, 60%, 100% là các tỷ lệ phần trăm tương ứng của NaCl 1,5M.

Fig.3 thể hiện hình ảnh điện chuyển của việc xác định khả năng nạp mẫu thực tế của CM sepharose Fast Flow; trong đó, M: đánh dấu phân tử, Elu: đỉnh rửa giải rLF, Wash: đỉnh rửa tạp chất, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 430, 450 là thể tích chảy qua của phần chiết thô (ml), L: mẫu đưa lên cột.

Fig.4 thể hiện hình ảnh điện chuyển của bước rửa giải trên CM sepharose Fast Flow;

trong đó, M: đánh dấu phân tử, L: mẫu đưa lên cột, FT: đỉnh chảy qua, 10%, 20%, 40% là các nồng độ muối rửa giải tương ứng.

Fig.5 thể hiện hình ảnh điện chuyển của các điều kiện rửa tạp chất dò tìm trên CM sepharose Fast Flow; trong đó, M: đánh dấu phân tử, L: mẫu đưa lên cột, FT: đỉnh chảy qua, 10%, 20%, 40% là các nồng độ muối để rửa tạp chất tương ứng, Elu: đỉnh rửa giải rLF.

Fig.6 thể hiện độ tinh khiết HPLC của sản phẩm rLF đã tinh chế thu được (RP-HPLC); trong đó, độ tinh khiết là lớn hơn 95%.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký bao gồm các bước sau đây:

1) chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp từ các hạt thóc giống chuyển gen, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp;

2) tiến hành sắc ký trao đổi cation đối với phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp để thực hiện tinh chế sơ bộ, để thu được phân đoạn rửa giải chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp; trong đó, bước sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nhựa trao đổi cation yếu, bước sắc ký bao gồm:

2A) cân bằng cột sắc ký bằng chất đệm chứa Tris 10-25mM, NaAC 10-25mM, NaCl 0-250mM, độ pH=6,0-7,5, với lượng gấp từ 5 đến 15 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ;

2B) sử dụng phần chiết thô ở bước 1) làm mẫu đưa lên cột, trong đó mẫu có độ dẫn là 2-25ms/cm, và độ pH=6,0-7,5; rửa các tạp chất với chất đệm rửa tạp chất, chất đệm rửa tạp chất chứa NaH_2PO_4 3-10mM, Na_2HPO_4 3-10mM, 200-NaCl 300mM, pH 6,5-8,0, và tốc độ dòng rửa giải là 50-200cm/giờ;

2C) rửa giải lactoferrin với chất đệm rửa giải chứa NaH_2PO_4 3-10mM, Na_2HPO_4 3-10mM, 400-650mM NaCl, độ pH=6,5-8,0 ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ, để thu được phân đoạn rửa giải;

3) thu phân đoạn rửa giải ở bước 2), để thu được dung dịch chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Tốt hơn là, nhựa trao đổi cation yếu ở bước 2) là CM Sepharose FF.

Phương pháp sắc ký của sáng chế còn bao gồm các bước tái tạo nhựa sắc ký là:

a) rửa cột bằng dung dịch muối nồng độ cao chứa NaCl 1-2M, độ pH=6,5-10,0 với lượng gấp từ 3 đến 10 lần thể tích cột ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ đến khi UV280 không có sự thay đổi rõ ràng;

b) rửa cột bằng chất đệm chứa natri xitrat 5-25mM, độ pH=2,0 đến 4,0, với lượng gấp từ 3 đến 10 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ.

b) rửa cột bằng dung dịch NaOH 0,5-1,0M, với lượng gấp từ 2 đến 5 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 30-100cm/giờ.

d) rửa cột bằng nước siêu tinh khiết với lượng gấp từ 8 đến 15 lần thể tích cột để độ pH nhỏ hơn 10,0, giữ nhựa trong dung dịch ethanol 20%.

Cụ thể, theo phương pháp sắc ký theo sáng chế, trong đó việc chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp ở bước 1) bao gồm các bước sau đây:

(1) sử dụng các hạt thóc giống chuyển gen chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp làm nguyên liệu thô, xát các hạt thóc thành gạo nguyên cám và nghiền chúng thành bột gạo với độ mịn là từ 80-100 mesh;

(2) trộn bột gạo và chất đệm chiết ở tỷ lệ trọng lượng/thể tích là 1:5-1:10 ở nhiệt độ phòng trong thời gian từ 0,5 đến 2 giờ, để thu được hỗn hợp; chất đệm chiết chứa Tris 10-25mM, NaAC 10-25mM, NaCl 0-250mM, độ pH=6,0-7,5;

(3) lọc hỗn hợp, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Theo phương pháp sắc ký của sáng chế, trong đó bước sắc ký ở bước 2) bao gồm:

2a) cân bằng cột sắc ký bằng chất đệm cân bằng chứa Tris 25mM, NaAC 25mM, NaCl 200mM, độ pH=6,5, với lượng gấp 10 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 150cm/giờ;

2b) sử dụng phần chiết thô ở bước 1) làm mẫu đưa lên cột, trong đó mẫu có độ dẫn là 22,5ms/cm, và độ pH=6,5; rửa các tạp chất với chất đệm rửa tạp chất, chất đệm rửa tạp chất chứa NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 300mM, độ pH=7,5 ở tốc độ dòng là 150cm/giờ;

2c) rửa giải Lactoferrin với chất đệm rửa giải, chất đệm rửa giải chứa NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 600mM, độ pH=7,5 ở tốc độ dòng là 50-200cm/giờ, để thu thập phân đoạn rửa giải chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Sáng chế là đề xuất phương pháp chiết xuất để điều chế lactoferrin ở người tái tổ hợp từ các hạt thóc giống chuyển gen, bao gồm lần lượt các bước sau đây:

(1) sử dụng các hạt thóc giống chuyển gen chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp làm nguyên liệu thô, xay các hạt thóc giống thành gạo nguyên cám và nghiền chúng thành bột gạo với độ mịn là 80-100 mesh;

(2) trộn bột gạo và chất đệm chiết ở tỷ lệ trọng lượng/thể tích là 1:5-1:10 ở nhiệt độ phòng trong thời gian từ 0,5 đến 2 giờ, để thu được hỗn hợp; chất đệm chiết chứa Tris 10-25mM, NaAC 10-25mM, NaCl 0-250mM, độ pH=6,0-7,5;

(3) lọc hỗn hợp, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trừ khi được quy định khác, các máy móc và thiết bị được sử dụng trong các ví dụ sau đây có bán sẵn trên thị trường.

Ví dụ 1: Điều chế phần chiết thô của lactoferrin ở người tái tổ hợp (rLF)

Lúa chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp được xay vỏ để thu được gạo nguyên cám và được nghiền để thu được bột gạo với độ mịn là 80-100 mesh. Bột gạo được trộn với chất đệm chiết ở tỷ lệ 1:10 (trọng lượng/thể tích, kg/L), và được chiết ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Các thành phần của chất đệm chiết là: Tris-HCl 25mM, natri axetat (NaAC) khan 20mM, NaCl 200mM, độ pH=6,5. Hỗn hợp thu được trải qua bước lọc áp lực bằng cách sử dụng bộ lọc nén khung tám loại vải lọc, để thu được phần chiết thô sạch chứa rLF.

Ví dụ 2: Lựa chọn nhựa sắc ký và các điều kiện rửa giải trong sắc ký trao đổi cation

Lựa chọn nhựa sắc ký trong sắc ký trao đổi cation: Vì các hạt thóc giống có hàm lượng sắc tố và polysaccharit cao hơn, nhựa cation có thể tránh sự lắng đọng của các sắc tố trên môi trường sắc ký, nhờ đó cải thiện khả năng sử dụng của nhựa và đảm bảo độ tinh khiết của các mẫu. Ví dụ này đã sử dụng các nhựa trao đổi cation với tốc độ dòng làm việc cao hơn làm nhựa sắc ký, bao gồm UNO Sphere S của công ty Bio-Rad và CM sepharose Fast Flow (CM Sepharose FF) của công ty GE và vv... Phần chiết thô thu được trong ví dụ 1 được sử dụng làm mẫu nạp của sắc ký trao đổi cation.

1. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên CM sepharose Fast Flow

Khoảng 18ml nhựa CM sepharose Fast Flow được đóng vào cột econo 15/20 cột, và cột được làm cân bằng với 200ml chất đệm (Tris-HCl 25mM, natri axetat khan 20mM, NaCl 200mM, độ pH=6,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, đến khi trị số pH và độ dẫn

không đổi đến đường cơ sở. Mẫu có độ dẫn là 22,5ms/cm và độ pH=6,5. Sau khi nạp, mẫu được rửa với chất đệm (NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 300mM, độ pH=7,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ để rửa các tạp chất. Sau khi rửa tạp chất, Lactoferrin được rửa giải với chất đệm (NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 600mM, độ pH=7,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, và các phân đoạn rửa giải được thu thập để thu được phân đoạn chứa rLF. Hình ảnh điện chuyển được thể hiện trên Fig.1.

2. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên UNO Sphere S

Khoảng 18ml nhựa UNO Sphere S được đóng vào cột econo 15/20 cột, và cột được cân bằng với 200ml chất đệm (Tris-HCl 25mM, natri axetat khan 20mM, NaCl 200mM, độ pH=8,0) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, đến khi trị số pH và độ dẫn điện là không đổi đến đường cơ sở. Mẫu có độ dẫn là 22.5ms/cm và độ pH=6,5. Sau khi nạp, mẫu được trải qua bước rửa giải với chất đệm chứa NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, độ pH=7,5 và chứa NaCl 300mM, NaCl 600mM, NaCl 900mM, NaCl 1,5M tương ứng ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, và các phân đoạn rửa giải được thu thập. Hình ảnh điện chuyển được thể hiện trên Fig.2. Trên hình, 20%, 40%, 60%, 100% là các tỷ lệ phần trăm tương ứng của NaCl 1,5M tương ứng với NaCl 300mM, NaCl 600mM, NaCl 900mM và NaCl 1,5M tương ứng.

3. Xác định khả năng nạp mẫu thực tế của CM sepharose Fast Flow

Khoảng 18ml CM sepharose Fast Flow được đóng vào cột econo 15/20 cột, và cột được cân bằng với 200ml chất đệm (Tris-HCl 25mM, natri axetat khan 20mM, NaCl 200mM, độ pH=6,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, đến khi trị số pH và độ dẫn điện không đổi đến đường cơ sở. Mẫu của ví dụ 1 có độ dẫn là 22.5 ms/cm và độ pH=6.5 và tổng thể tích là 450ml. Các mẫu đã được nạp vào trên CM sepharose Fast Flow ở tốc độ dòng là 150cm/giờ. Trị số hấp thụ của UV280 trong khi nạp mẫu được ghi lại đến khi trị số hấp thụ vượt quá mức ngang bằng 10%. Thể tích mẫu được ghi lại và khả năng nạp mẫu thực tế trên mỗi ml CM sepharose Fast Flow dưới tốc độ dòng này được tính toán; sau đó nhựa được tái tạo. Hình ảnh điện chuyển được thể hiện trên Fig.3.

Được phát hiện ra từ các thử nghiệm ở trên mà dưới các điều kiện giống nhau của việc nạp mẫu, nhựa trao đổi cation yếu CM Fast Flow thể hiện độ phân giải và hiệu quả phân tách cao hơn, giống như nhựa trao đổi anion mạnh hơn; Trong khi đó CM sepharose

Fast Flow được phát triển sớm hơn, và có quá trình hoàn thiện và độ ổn định hóa học tuyệt vời, tuổi thọ sử dụng lâu hơn và chi phí tương đối thấp. Theo góc độ các yếu tố khác, CM sepharose Fast Flow được sử dụng làm nhựa sắc ký ưu tiên cho sắc ký trao đổi cation.

Tối ưu hóa các điều kiện rửa giải: Sản phẩm chiết chứa rLF được nạp vào cột CM sepharose Fast Flow và trải qua rửa giải gradient bằng cách bổ sung muối (Fig. 4). Kết quả cho thấy, dưới gradient 10% NaCl 1,5M, các băng tạp chất rõ ràng được rửa giải, và không protein đích nào bị mất; dưới gradient 20% NaCl 1,5M, một lượng nhỏ của các băng tạp chất được rửa giải, và tổn hao protein đích là ít; protein đích được rửa giải ở dạng cô đặc dưới gradient 40% NaCl 1,5M; không có đỉnh rửa giải dưới nồng độ muối 60% hoặc cao hơn, điều đó nghĩa là protein đích có thể được rửa giải hoàn toàn dưới 40% NaCl 1,5M. Qua nghiên cứu thêm về nồng độ rửa giải, phát hiện được rằng khi nồng độ muối nhỏ hơn 40%, độ tinh khiết của protein được rửa giải không bị ảnh hưởng. Đỉnh rửa giải có đoạn cuối đỉnh đáng chú ý và tỷ lệ thu hồi giảm. Cuối cùng, 40% NaCl 1,5M đã được lựa chọn làm điều kiện rửa giải xác định.

Tối ưu hóa các điều kiện rửa tạp chất: Dưới các điều kiện cân bằng và điều kiện rửa giải giống nhau, các điều kiện rửa tạp chất là 10%, 15% và 20% được so sánh, tương ứng (Fig.5). Với sự gia tăng nồng độ muối dùng cho rửa tạp chất, tổn hao của protein đích tăng lên, nhưng hiệu quả loại bỏ tạp chất được cải thiện đáng kể. Dưới ba điều kiện, không có khác biệt đáng kể trong tỷ lệ thu hồi protein. Để đảm bảo độ tinh khiết của protein đích, 20% NaCl 1,5M được xác định là điều kiện rửa tạp chất cuối cùng.

Đưa hiệu quả tinh chế và tốc độ thu hồi vào xem xét, NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 300mM, độ pH=7,5 được sử dụng làm các điều kiện rửa tạp chất ưu tiên, và NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 600mM, độ pH=7,5 được sử dụng làm các điều kiện rửa giải ưu tiên của protein đích.

Ví dụ 3: Xác định các điều kiện tái tạo của nhựa CM sepharose FF sau khi tinh chế rLF

Sau khi tinh chế rLF qua trao đổi cation, đã phát hiện thấy sự lắng đọng sắc tố nâu nghiêm trọng trên cột sắc ký trong khi CIP (làm sạch tại chỗ), mà không thể loại bỏ bằng cách tái tạo thông thường với nước, rượu isopropyl 30%, ethanol 70%, HCl 0,01M, NaOH 1M và urê 8M. Được biết đến bởi phân tích sắt mà được liên kết với rLF tạo thành sắt

hydroxit kết tủa dưới kiềm mạnh. Do nhựa không thể chịu được nồng độ cao của axit, cuối cùng các sắc tố lắng đọng đã được loại bỏ thành công qua đặc tính tạo phức ion sắt (III) mạnh của natri xitrat dưới các điều kiện axit.

Trong khi tái tạo CM Sepharose FF bằng cách sử dụng natri xitrat, đã phát hiện thấy natri xitrat chỉ tạo phức sắt trên cột dưới điều kiện pH thấp. Đưa phạm vi pH mà nhựa có thể chịu được vào xem xét, độ pH=3,0 được lựa chọn cuối cùng; dưới việc sử dụng bình thường của dung dịch tái tạo nhựa (khoảng 5 lần thể tích cột), nồng độ xitrat được xác định. Nếu các ion sắt (III) không thể được gỡ bỏ hoàn toàn dưới nồng độ này, trong bước tái tạo NaOH tiếp theo, sự lắng đọng sắc tố nâu có thể có mặt trong cột sắc ký. Nếu không, cột sắc ký sẽ thể hiện màu sắc bình thường. Các kết quả thực nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây:

Nồng độ natri xitrat	Màu cột sắc ký	Sử dụng
10mM	Lắng đọng màu nâu	100ml
20mM	Bình thường	100ml
50mM	Bình thường	100ml
100mM	Bình thường	100ml

Các kết quả cho thấy: 100ml của natri xitrat 20mM có thể tạo phức với các ion sắt (III) trong cột sắc ký hoàn toàn. Do đó nồng độ của natri xitrat được xác định. Tóm lại, theo protein đích cụ thể, quá trình tái tạo của CM sepharose Fast Flow được thay đổi từ việc rửa với muối cao bình thường tiếp theo là bằng NaOH vào trong các bước sau: loại bỏ rLF mà không được rửa giải bằng cách sử dụng muối cao (NaCl 2M, độ pH=7,0), sau đó loại bỏ sắt trong dư lượng rLF bằng cách sử dụng axit natri xitrat (natri xitrat 20mM, độ pH=3,0), sau đó thực hiện quy trình làm sạch bình thường bằng cách sử dụng NaOH 1M. Cột sắc ký mà được đóng với 18ml nhựa CM Sepharose FF cho sắc ký trao đổi cation được sử dụng trong ví dụ 1 đầu tiên được rửa với 100ml dung dịch muối nồng độ cao (NaCl 2M, độ pH=7,0) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ đến khi UV280 không có sự thay đổi rõ ràng; sau đó được rửa với 100ml dung dịch chất đệm (natri xitrat 20mM, độ pH=3,0) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ cho đến khi độ pH giảm xuống dưới 4,0; sau đó cột sắc ký được rửa lại với 100ml dung dịch NaOH 0,5M ở tốc độ dòng là 50cm/giờ; và sau đó được rửa với 200ml nước siêu tinh khiết cho đến khi độ pH nhỏ hơn 10,0; cuối cùng,

nhựa được giữ trong dung dịch etanol 20% trong một thời gian dài.

Ví dụ 4: Tách và tinh chế lactoferrin ở người tái tổ hợp và tái tạo nhựa sắc ký

Việc tinh chế một bước được thực hiện bằng cách trao đổi cation: Khoảng 150ml nhựa CM sepharose Fast Flow được đóng vào cột XK50, và các cột được cân bằng với 2000ml chất đệm (Tris-HCl 25mM, natri axetat khan 20mM, NaCl 200mM, độ pH là 6,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, đến khi trị số pH và độ dẫn không đổi đến đường cơ sở. Phần chiết thô thu được trong ví dụ 1 được sử dụng làm mẫu. Các mẫu có độ dẫn là 22.5ms/cm và độ pH=6,46. Sau khi tải, mẫu được rửa giải với chất đệm (NaH₂PO₄ 4mM, Na₂HPO₄ 6mM, NaCl 300mM, độ pH=7,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ để rửa giải các tạp chất và thu thập phần rửa tạp chất; sau đó mẫu được rửa giải với chất đệm (NaH₂PO₄ 4mM, Na₂HPO₄ 6mM, NaCl 600mM, độ pH=7,5) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, và phân đoạn rửa giải được thu thập để thu được phân đoạn chứa rLF.

Hơn nữa, nhựa được tái tạo bởi các bước sau đây: trước tiên nhựa được rửa với 500ml dung dịch muối nồng độ cao (NaCl 2M, độ pH=7,0) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ đến khi UV280 không có sự thay đổi rõ ràng; sau đó rửa với 500ml dung dịch chất đệm (natri xitrat 20mM, độ pH=3,0) ở tốc độ dòng là 150cm/giờ cho đến khi pH giảm xuống dưới 4,0; sau đó cột sắc ký được rửa lại với 500ml dung dịch NaOH 0,5M ở tốc độ dòng là 50cm/giờ; và sau đó được rửa với 1500ml nước siêu tinh khiết đến khi độ pH nhỏ hơn 10,0; cuối cùng, nhựa được giữ trong dung dịch etanol 20% trong một thời gian dài.

Các rLF thu được từ việc tách và tinh chế được xác định bằng HPLC. Như được thể hiện trên Fig.6 cho thấy độ tinh khiết HPLC của rLF là 98%; và sản lượng rLF có thể đạt $27,24 \pm 0,77\%$, tương ứng với 2,25g rLF trên mỗi kg gạo nguyên cám, cụ thể như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bước tinh chế	Tổng thể tích (ml)	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tổng lactoferrin (mg)	Tổng lượng thu hồi protein (%)	Tổng lượng thu hồi LF (%)
Phần chiết thô rLF	1750	1639	820	100	100
Sản phẩm chiết tinh chế rLF	222	450	427	27,5	52,1

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sắc ký để tách và tinh chế lactoferrin ở người tái tổ hợp từ hạt thóc giống chuyển gen, phương pháp này bao gồm lần lượt các bước sau đây:

1) chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp từ các hạt thóc giống chuyển gen, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp;

2) tiến hành sắc ký trao đổi cation đối với phần chiết thô chứa lactoferrin ở người để thực hiện tinh chế sơ bộ, để thu được phân đoạn rửa giải chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp; trong đó:

sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nhựa trao đổi cation yếu CM sepharose FF, bước sắc ký bao gồm:

2A) cân bằng cột sắc ký bằng chất đệm chứa Tris 10 đến 25mM, NaAC 10 đến 25mM, NaCl 0 đến 250mM, độ pH = 6,0 đến 7,5, với lượng gấp từ 5 đến 15 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50 đến 200cm/giờ;

2B) sử dụng phần chiết thô ở bước 1) làm mẫu đưa lên cột, trong đó mẫu có độ dẫn là 2 đến 25ms/cm và độ pH = 6,0 đến 7,5; rửa các tạp chất bằng chất đệm rửa tạp chất, chất đệm rửa tạp chất chứa NaH_2PO_4 3 đến 10mM, Na_2HPO_4 3 đến 10mM, NaCl 200 đến 300mM, độ pH = 6,5 đến 8,0, và tốc độ dòng rửa giải là 50 đến 200cm/giờ;

2C) rửa giải mẫu bằng chất đệm rửa giải chứa NaH_2PO_4 3 đến 10mM, Na_2HPO_4 3 đến 10mM, 400 đến 650mM NaCl, độ pH = 6,5 đến 8,0 ở tốc độ dòng là 50 đến 200cm/giờ, để thu được phân đoạn rửa giải; và

3) thu phân đoạn rửa giải ở bước 2), để thu được dung dịch chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

2. Phương pháp sắc ký theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước tái tạo nhựa sắc ký như sau:

a) rửa cột bằng dung dịch muối nồng độ cao chứa NaCl 1 đến 2M, độ pH = 6,5 đến 10,0, với lượng gấp 3 từ đến 10 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50 đến 200cm/giờ cho đến khi UV280 không có sự thay đổi rõ ràng;

b) rửa cột bằng chất đệm chứa natri xitrat 5 đến 25mM, độ pH=2,0 đến 4,0, với lượng gấp từ 3 đến 10 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50 đến 200cm/giờ;

c) rửa cột bằng dung dịch NaOH 0,5 đến 1,0M, với lượng gấp từ 2 đến 5 lần thể tích

cột, ở tốc độ dòng là 30 đến 100cm/giờ.

d) rửa cột bằng nước siêu tinh khiết, với lượng gấp từ 8 đến 15 lần thể tích cột, đến độ pH nhỏ hơn 10,0, và giữ nhựa trong dung dịch etanol 20%.

3. Phương pháp sắc ký theo điểm 1, trong đó việc chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp ở bước 1) bao gồm các bước sau:

(1) sử dụng các hạt thóc giống chuyển gen chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp làm nguyên liệu thô, xát các hạt thóc thành gạo nguyên cám và nghiền chúng thành bột gạo với độ mịn là từ 80 đến 100 mesh;

(2) trộn bột gạo và chất đệm chiết ở tỷ lệ trọng lượng/thể tích là 1:5 đến 1:10 ở nhiệt độ phòng trong thời gian từ 0,5 đến 2 giờ, để thu được hỗn hợp; chất đệm chiết chứa Tris 10 đến 25mM, NaAC 10 đến 25mM, NaCl 0 đến 250mM, độ pH= 6,0 đến 7,5;

(3) lọc hỗn hợp, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

4. Phương pháp sắc ký theo điểm 1, trong đó bước sắc ký ở bước 2) bao gồm:

2a) cân bằng cột sắc ký bằng chất đệm cân bằng chứa Tris 25mM, NaAC 25mM, NaCl 200mM, độ pH=6,5, với lượng gấp 10 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 150cm/giờ;

2b) sử dụng phần chiết thô ở bước 1) làm mẫu đưa lên cột, trong đó mẫu có độ dẫn là 22,5ms/cm và độ pH=6,5; rửa tạp chất với chất đệm rửa, chất đệm rửa chứa NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 300mM, độ pH = 7,5 ở tốc độ dòng là 150cm/giờ;

2c) rửa giải mẫu với chất đệm rửa giải, chất đệm rửa giải chứa NaH_2PO_4 4mM, Na_2HPO_4 6mM, NaCl 600mM, pH 7,5 ở tốc độ dòng là 150cm/giờ, để thu thập phân đoạn rửa giải chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

5. Phương pháp sắc ký theo điểm 1, trong đó bước tái tạo nhựa sắc ký bao gồm các bước sau:

a) rửa cột bằng dung dịch muối nồng độ cao chứa NaCl 2M, độ pH = 7,5, với lượng gấp 5 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 150cm/giờ cho đến khi UV280 không có sự thay đổi rõ ràng;

b) rửa cột bằng chất đệm chứa natri xitrat 20mM, độ pH = 3,0, với lượng gấp 5 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50 đến 200cm/giờ.

b) rửa cột bằng dung dịch NaOH 0,5M, với lượng gấp 3 lần thể tích cột, ở tốc độ dòng là 50cm/giờ.

d) rửa cột bằng nước siêu tinh khiết, với lượng gấp 10 lần thể tích cột, đến độ pH nhỏ hơn 10,0, và giữ nhựa trong dung dịch etanol 20%.

6. Phương pháp sắc ký theo điểm 3, trong đó việc chiết lactoferrin ở người tái tổ hợp bao gồm các bước sau:

(1a) sử dụng các hạt thóc giống chuyển gen chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp làm nguyên liệu thô, xát các hạt thóc thành gạo nguyên cám và nghiền chúng thành bột gạo với độ mịn là từ 80 đến 100 mesh;

(2a) trộn bột gạo và chất đệm chiết ở tỷ lệ trọng lượng/thể tích là 1:10 ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ, để thu được hỗn hợp; chất đệm chiết chứa Tris 25mM , NaAC 20mM, NaCl 200mM, độ pH = 6,5;

(3a) lọc hỗn hợp, để thu được phần chiết thô chứa lactoferrin ở người tái tổ hợp.

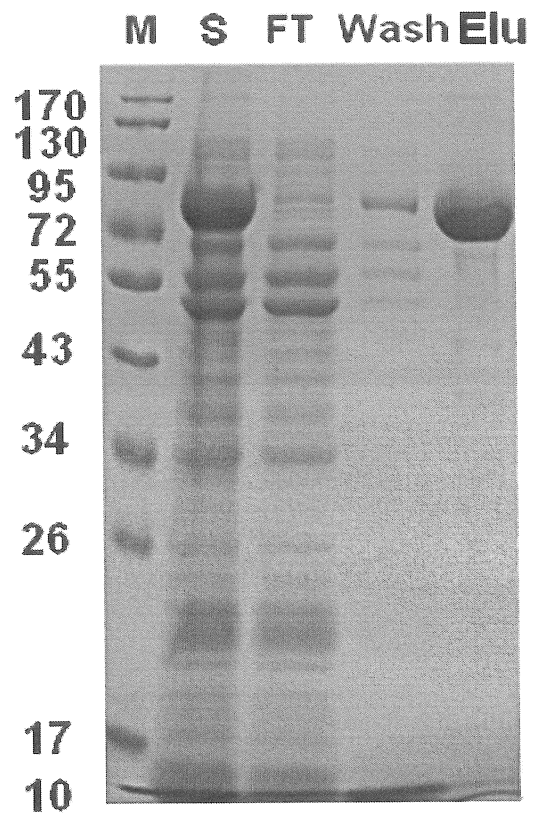


Fig.1

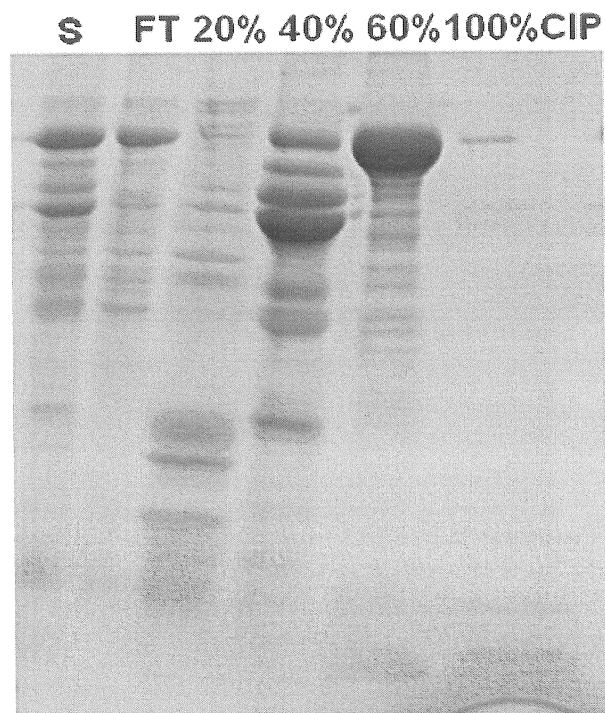


Fig. 2

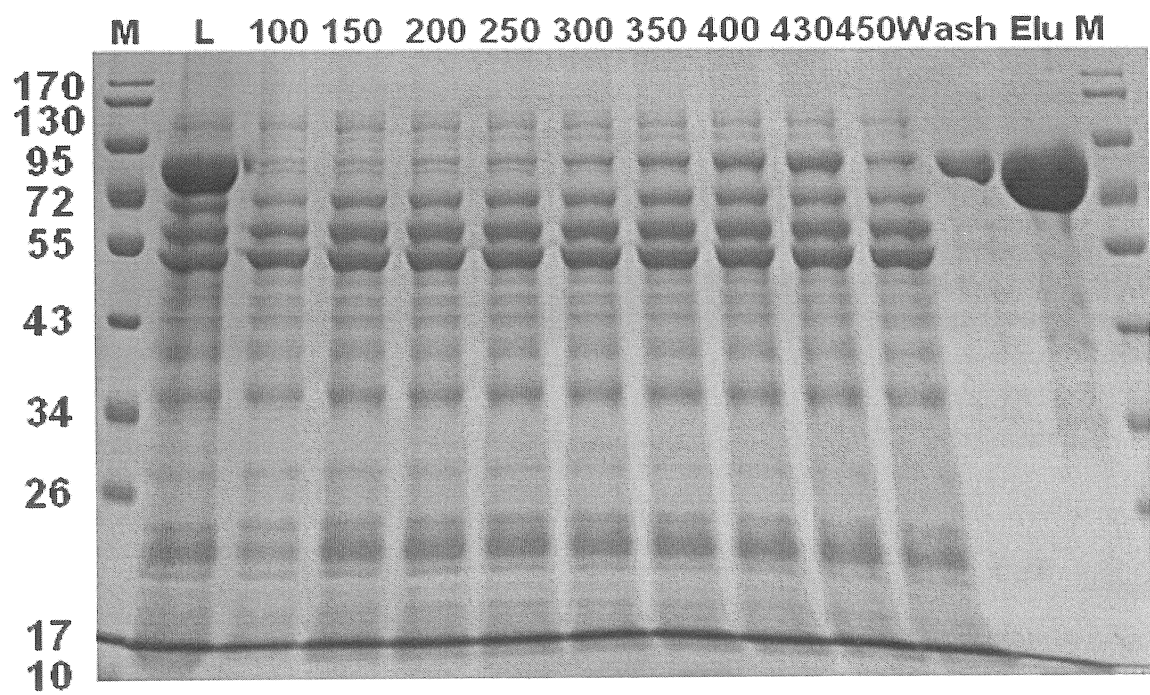


Fig. 3

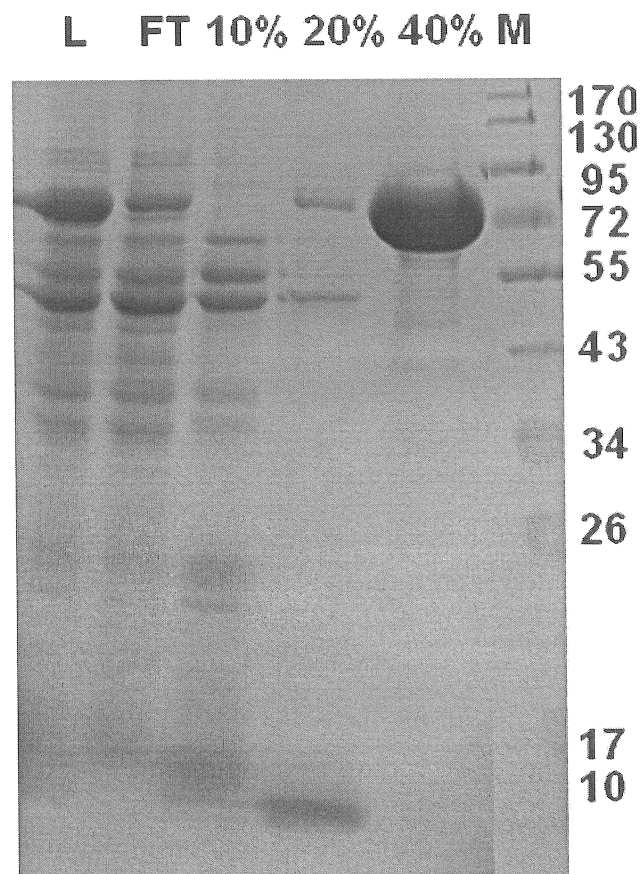


Fig. 4

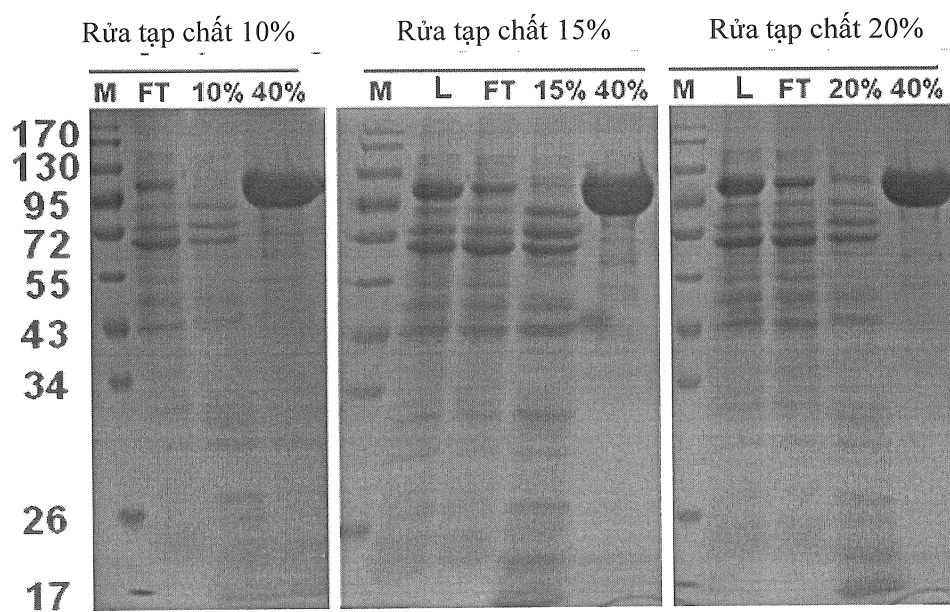


Fig. 5

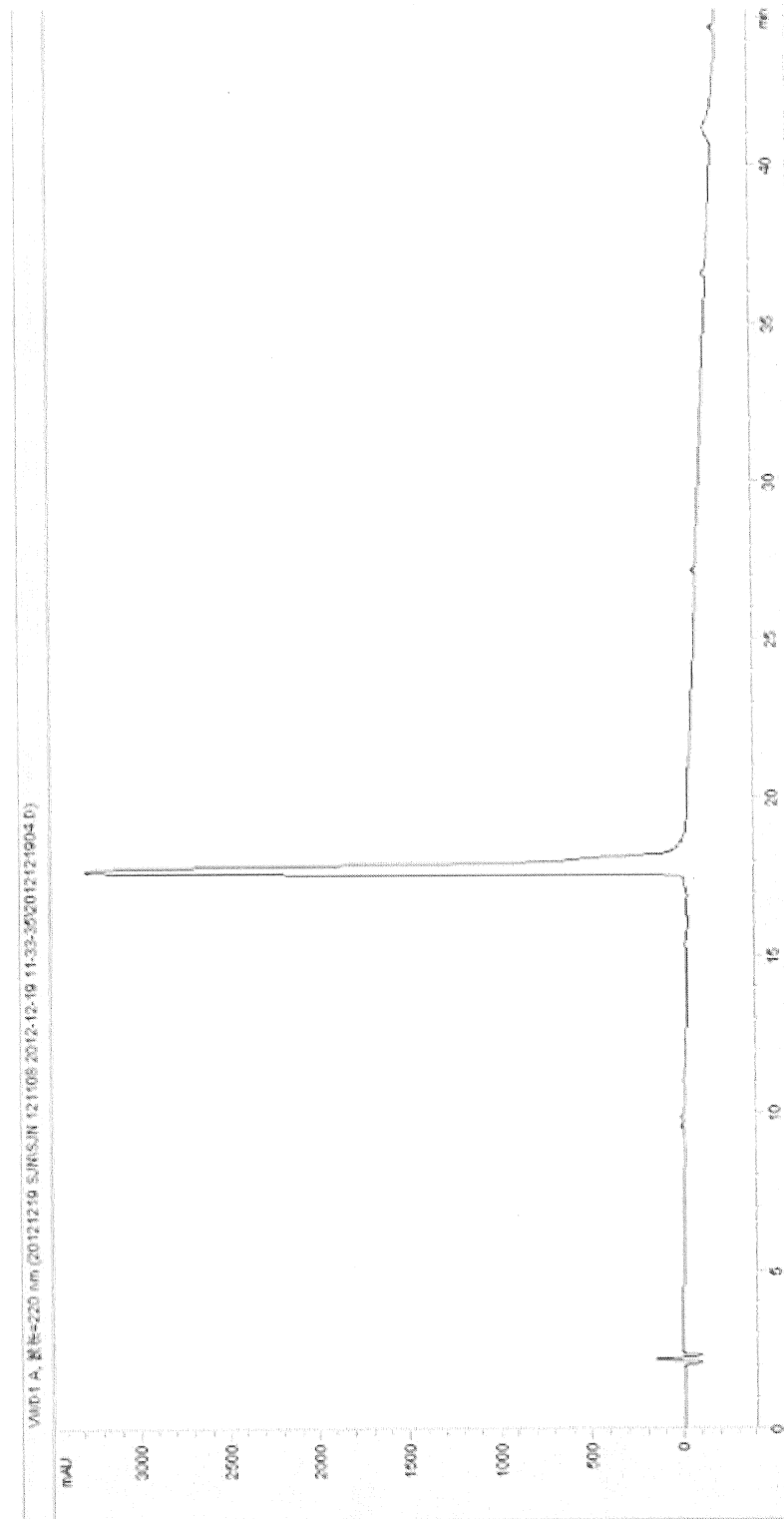


Fig. 6