**CHUYÊN ĐỀ “ỨNG DỤNG VI SINH VẬT VÀ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG CÔNG NGHỆ GEN”**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

**A. MỞ ĐÂU**

**I. Lý do chọn đề tài**

**Vi sinh vật** là những [sinh vật](https://vi.wikipedia.org/wiki/Sinh_v%E1%BA%ADt) đơn bào có kích thước nhỏ, không quan sát được bằng [mắt](https://vi.wikipedia.org/wiki/M%E1%BA%AFt) thường mà phải sử dụng [kính hiển vi](https://vi.wikipedia.org/wiki/K%C3%ADnh_hi%E1%BB%83n_vi). Vi sinh vật bao gồm cả [virus](https://vi.wikipedia.org/wiki/Virus), [vi khuẩn](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n), [archaea](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n_c%E1%BB%95), [vi nấm](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=Vi_n%E1%BA%A5m&action=edit&redlink=1), [vi tảo](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_t%E1%BA%A3o), [động vật nguyên sinh](https://vi.wikipedia.org/wiki/%C4%90%E1%BB%99ng_v%E1%BA%ADt_nguy%C3%AAn_sinh).v.v. Và chúng có những đặc điểm chung là:

- Kích thước nhỏ bé.

- Hấp thu nhiều, chuyển hóa nhanh.

- Sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh.

- Năng lực thích ứng mạnh và dễ phát sinh biến dị.

- Phân bố rộng, chủng loại nhiều.

 Với những đặc điểm quan trọng kể trên nên vi sinh vật đã, đang và sẽ có rất nhiều ứng dụng quan trọng trong đời sống của con người đặc biệt dựa trên những hiểu biết về di truyền vi sinh vật cũng đang có nhiều ứng dụng quan trọng.

 Trong công tác giảng dạy Sinh học, qua kinh nghiệm lâu năm dạy các chuyên đề cũng như ôn luyện, bồi dưỡng học sinh giỏi tôi thấy tài liệu về vi sinh vật rất nhiều nhưng tài liệu về ứng dụng vi sinh vật hiện nay chưa có tính chất hệ thống và chỉ mang tính chất liệt kê. Nhằm có một tài liệu hệ thống đầy đủ về các ứng dụng vi sinh vật và để có thể hiểu sâu hơn về công nghệ gen, tôi đã lựa chọn thực hiện viết chuyên đề: ***“Ứng dụng vi sinh vật và ứng dụng vi sinh vật trong công nghệ gen”***

**II. Mục đích của đề tài**

- Hệ thống lại kiến thức lý thuyết về vi sinh vật, đặc điểm chung của vi sinh vật.

- Giới thiệu các ứng dụng của vi sinh vật.

- Làm rõ khái niệm công nghệ gen để thấy được vi sinh vật là đối tượng có vai trò quan trọng trong côn nghệ gen từ đó giới thiệu các ứng dụng của công nghệ gen dựa trên di truyền vi sinh vật.

- Cung cấp hệ thống câu hỏi và bài tập liên quan đến ứng dụng vi sinh vật và lên quan đến công nghệ gen.

**B. NỘI DUNG**

**I. KHÁI NIỆM VI SINH VẬT**

**Vi sinh vật** là những [sinh vật](https://vi.wikipedia.org/wiki/Sinh_v%E1%BA%ADt) đơn bào có kích thước nhỏ, không quan sát được bằng [mắt](https://vi.wikipedia.org/wiki/M%E1%BA%AFt) thường mà phải sử dụng [kính hiển vi](https://vi.wikipedia.org/wiki/K%C3%ADnh_hi%E1%BB%83n_vi). Thuật ngữ **vi sinh vật** không tương đương với bất kỳ [đơn vị phân loại](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=%C4%90%C6%A1n_v%E1%BB%8B_ph%C3%A2n_lo%E1%BA%A1i&action=edit&redlink=1) nào trong [phân loại khoa học](https://vi.wikipedia.org/wiki/Ph%C3%A2n_lo%E1%BA%A1i_sinh_h%E1%BB%8Dc). Nó bao gồm cả [virus](https://vi.wikipedia.org/wiki/Virus), [vi khuẩn](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n), [archaea](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n_c%E1%BB%95), [vi nấm](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=Vi_n%E1%BA%A5m&action=edit&redlink=1), [vi tảo](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_t%E1%BA%A3o), [động vật nguyên sinh](https://vi.wikipedia.org/wiki/%C4%90%E1%BB%99ng_v%E1%BA%ADt_nguy%C3%AAn_sinh).v.v.

Đặc diểm chung của vi sinh vật:

1. Kích thước nhỏ bé. Kích thước vi sinh vật thường được đo bằng [micromet](https://vi.wikipedia.org/wiki/Micr%C3%B4m%C3%A9t).
2. Hấp thu nhiều, chuyển hóa nhanh. Vi khuẩn lactic ([Lactobacillus](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=Lactobacillus&action=edit&redlink=1)) trong 1 giờ có thể phân giải một lượng [đường lactozơ](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=%C4%90%C6%B0%E1%BB%9Dng_lactoz%C6%A1&action=edit&redlink=1) nặng hơn 1000-10000 lần khối lượng của chúng.
3. Sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh. So với các sinh vật khác thì vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng cực kì lớn.
4. Năng lực thích ứng mạnh và dễ phát sinh biến dị.
5. Phân bố rộng, chủng loại nhiều. Vi sinh vật có ở khắp mọi nơi trên trái đất, ngay ở điều kiện khắc nghiệt nhất như ở nhiệt độ cao trong miệng [núi lửa](https://vi.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAi_l%E1%BB%ADa), nhiệt độ thấp ở [Nam Cực](https://vi.wikipedia.org/wiki/Nam_C%E1%BB%B1c), và áp suất lớn dưới đáy đại dương vẫn thấy sự có mặt của vi sinh vật. Vi sinh vật có khoảng trên 100 nghìn loài bao gồm 30 nghìn loài [động vật nguyên sinh](https://vi.wikipedia.org/wiki/%C4%90%E1%BB%99ng_v%E1%BA%ADt_nguy%C3%AAn_sinh), 69 nghìn loài [nấm](https://vi.wikipedia.org/wiki/N%E1%BA%A5m), 1,2 nghìn loài [vi tảo](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_t%E1%BA%A3o), 2,5 nghìn loài [vi khuẩn lam](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n_lam), 1,5 nghìn loài [vi khuẩn](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n), 1,2 nghìn loài [virut](https://vi.wikipedia.org/wiki/Virus_%28%C4%91%E1%BB%8Bnh_h%C6%B0%E1%BB%9Bng%29) và [ricketxi](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=Ricketxi&action=edit&redlink=1)...

**II. ỨNG DỤNG VI SINH VẬT- CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT**

**1. Khái niệm công nghệ sinh học vi sinh vật**

*Công nghệ sinh học (Biotechnology)* là một thuật ngữ khoa học do kỹ sư người Hungary là Karl Ereky nêu ra vào năm 1917 để chỉ quá trình nuôi lợn với quy mô lớn bằng thức ăn là củ cải đường *lên men nhờ các vi sinh vật*. Sau đó vào năm 1961, tạp chí khoa học “*JouARNl of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology”*(Tạp chí kĩ thuật và công nghệ vi sinh sinh hóa) được đổi tên thành “*Biotechnology and Bioengineering”* (“Công nghệ sinh học và kĩ thuật sinh học”). Tuy nhiên, thuật ngữ này ít được nhắc đến trong hơn 50 năm và chỉ được sử dụng rộng rãi sau phát minh ra Kĩ thuật di truyền-Gentic engineering vào đầu những năm 70 của thế kỷ trước, cho nên có lúc người ta coi đó là sự *"bùng nổ"* của công nghệ sinh học.

Trước thập kỷ 70, công nghệ sinh học được hiểu là sự *lên men công nghiệp*(industrial fermentation) vi sinh vật để tạo thương phẩm. Trong những thập kỷ 60 và 70, *công nghệ lên men* đã phát triển thành một *ngành công nghiệp lớn* trên thế giới với doanh số gần trăm tỉ USD/năm. Sự hoàn thiện các trang thiết bị ở tất cả các khâu và sự kiểm soát, điều khiển phản ứng của tế bào ở trình độ cao làm tăng sản lượng đáng kể. Tuy nhiên, khâu quyết định làm giảm đáng kể giá thành là *năng suất chủng giống*. Phương pháp chọn giống cổ điển được thực hiện với những chủng phân lập từ thiên nhiên và sau đó gây đột biến bằng tia tử ngoại, tia phóng xạ hay bằng hóa chất.

Khó kể hết những thành tựu vô cùng to lớn của công nghệ sinh học đến mức mà thế kỷ 21 được mang danh là *thế kỷ công nghệ sinh học.* Ở đây chỉ nêu tiếp một số ứng dụng chủ yếu liên quan đến các đối tượng vi sinh vật gọi là công nghệ sinh học vi sinh vật.

Công nghệ sinh học vi sinh vật (công nghệ vi sinh) là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của vi sinh vật dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều bộ môn khoa học, phục vụ cho việc tăng của cải vật chất của xã hội và bảo vệ lợi ích của con người.

**2. Ứng dụng công nghệ vi sinh:**

**2.1. Ứng dụng trực tiếp:**

- Phân bón vi sinh vật: là sản phẩm chứa một hay nhiều loài vi sinh vật sống đã được tuyển chọn có mật độ theo tiêu chuẩn đã quy định, có tác dụng tạo ra các chất dinh dưỡng hoặc các hoạt chất sinh học có ích cho cây trồng hoặc cải tạo đất. Ví dụ: Chế phẩm Nitragin, Azotobacterin chứa các vi sinh vật có khả năng cố định nitơ tự do trong không khí. Chế phẩm Photphobacterin chứa các vi sinh vật có khả năng phân giải photpho khó tan trong đất. Hoặc các chế phẩm nấm rễ, chế phẩm tảo lam…
- Chế phẩm vi sinh vật dùng bảo vệ thực vật: Hiện nay, việc ứng dụng các vi sinh vật để bảo vệ thực vật đang được quan tâm vì nó ít gây độc hại và đảm bảo cân bằng sinh thái; có thể kể đến một số các chế phẩm sau:

+ Virus gây bệnh cho côn trùng: Người ta thường dùng các virus đa diện ở nhân (NPV) để gây cho côn trùng ngừng ăn, ít hoạt động, trương phù. Hiện nay, người ta đã sản xuất được chế phẩm này để trừ sâu xanh, sâu róm thông…

+ Vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng và chuột: Hiện nay, người ta đã sản xuất được một số chế phẩm từ vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng và chuột như chế phẩm Bt. để trừ sâu tơ, sâu xanh bướm trắng hại rau hoặc chế phẩm Biorat, chế phẩm Miroca để gây bệnh đường ruột cho chuột.

+ Ngoài ra, người ta còn nghiên cứu sản xuất các nấm gây bệnh cho côn trùng, động vật nguyên sinh ký sinh côn trùng, tuyến trùng ký sinh côn trùng.

+ Vi sinh vật đối kháng: Ngoài việc ứng dụng các vi sinh vật gây bệnh cho côn trùng và dịch hại như trên, người ta đã nghiên cứu tìm ra các loài nấm, các loài vi khuẩn, các loài virus đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh hoặc cỏ dại tức là khi có mặt những loài vi sinh vật này thì các vi sinh vật gây bệnh mà đối kháng với chúng sẽ không phát sinh, phát triển được. Ví dụ: sử dụng nấm Penicillium (các dạng oxalicum, frequentans, vermiculatum, nigricans, chrysogetum) để đối kháng với các nấm Pythium spp. Rhioctonica solani, Selerotium cepivorum, Vertcillium alboatrum; sử dụng vi khuẩn Steptomyces griseoviridy để đối kháng với bệnh nấm Fusarium...

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất men tiêu hoá cho vật nuôi: Người ta đã sản xuất các men tiêu hoá cho vật nuôi bằng cách sử dụng những vi khuẩn có lợi cho hệ tiêu hoá như vi khuẩn Bacillus subtilis…
**2.2. Ứng dụng gián tiếp**

- Sản xuất phân bón hữu cơ sinh học (compost): Phân bón hữu cơ sinh học là loại phân bón được tạo thành nhờ quá trình lên men các chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải của sản xuất nông lâm nghiệp, phế thải của công nghiệp chế biến, phế thải sinh hoạt…) bằng vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học của chúng tạo thành mùn. Ví dụ lên men bã mía, mùn cưa, rơm rạ, rác thải hữu cơ, than bùn… bằng vi sinh vật hữu hiệu (EM) thành phân bón (gọi là Bokashi).

- Cải tạo giống cây trồng bằng vi sinh vật: Hiện nay, người ta đã dùng vi khuẩn chuyển gen vào cây trồng thông qua các tế bào bị thương để từ đó nuôi cấy nhân nhanh các tế bào này trong môi trường nhân tạo rồi cho tái sinh thành giống cây mới.

- Sản xuất chất điều hoà sinh trưởng từ vi sinh vật: Người ta có thể sản xuất các chất điều hoà sinh trưởng như Gibberellin, Auxin từ vi sinh vật.

- Sản xuất thức ăn cho vật nuôi từ vi sinh vật: Dùng vi sinh vật có ích để lên men thức ăn cho vật nuôi (dạng Bokashi), dạng thức ăn này làm cho vật nuôi tiêu hoá tốt, ngủ
nhiều, tăng trọng nhanh.

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất vaccine và kháng sinh cho vật nuôi: Một phần lớn các loại vaccine và kháng sinh dùng cho vật nuôi hiện nay đều được sản xuất từ vi sinh vật. Ví dụ vaccine phòng bệnh lở mồm long móng đối với gia súc, vaccine phòng bệnh Niu cát sơn ở gia cầm, vaccine gumboro phòng bệnh suy giảm miễn dịch cho gia cầm… Các loại thuốc kháng sinh sử dụng để chữa bệnh cho vật nuôi hiện nay
cũng phần lớn có nguồn gốc từ vi sinh vật.

**2.3. Một số hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong bảo vệ môi trường:**- Khử mùi hôi thối trong môi trường sống: Mùi hôi thối của rác thải, của chuồng trại chăn nuôi là do một nhóm vi sinh vật tạo ra. Người ta đã sử dụng một số nhóm vi sinh vật khác để ức chế sự hoạt động của các vi sinh vật này. Cụ thể, dùng vi sinh vật hữu hiệu (EM) phun vào các bãi rác hoặc chuồng trại chăn nuôi có thể làm giảm tới 70-90 % mùi hôi thối. Hiện nay, tất cả các bãi rác lớn ở Việt Nam đều dùng EM để xử lý. Dùng EM làm cho rác được phân giải triệt để hơn nên kéo dài thời gian sử dụng bãi rác góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế của bãi chứa rác. Ví dụ:

+ Tại Công ty xử lý rác thải thành phố Hồ Chí Minh (HOWADICO) sử dụng chế phẩm EM thứ cấp pha loãng theo tỷ lệ 1/400 phun vào rác thải đô thị sau 3 tuần phun mùi hôi giảm dần; sau 3 tháng theo đánh giá chung của toàn bộ công nhân công trường xử lý rác, mùi hôi giảm khoảng 75-80 %.

- Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Vĩnh Long kết hợp với trung tâm CTA đã tiến hành thử nghiệm sử dụng chế phẩm EM để xử lý mùi hôi trong chăn nuôi với lượng dùng 1 lít dung dịch EM thứ cấp 1 % phun cho 1m2 bề mặt chuồng, sau 24 giờ mùi hôi đã giảm rõ. Sau 3-4 ngày phun liên tục mùi hôi giảm đến 80 %.

+ Tại Công ty TAMICO (TP. Hồ Chí Minh): Dùng EM thứ cấp pha loãng 0,5% phun lên tường, sàn nhà nơi chứa da, nơi thuộc da và toàn bộ mặt bằng sản xuất của Công ty; phun thường xuyên 15 ngày liên tục từ ngày thứ 16 trở đi phun cách nhật. Kết quả là mùi hôi giảm rõ rệt, các thông số kiểm nghiệm môi trường đều đạt ở mức cho phép.

- Phân huỷ chất thải trong môi trường sống: Chúng ta thử hình dung, nếu không có thế giới vi sinh vật thì trên mặt đất hiện nay không còn chỗ đặt chân do đã bị phủ kín bởi rác thải. Xã hội càng phát triển thì rác thải càng nhiều và xử lí rác thải càng trở nên quan trọng hơn bao giờ hết. Có rất nhiều phương pháp xử lí rác thải nhưng dùng vi sinh vật để phân huỷ rác đang được coi là giải pháp hữu hiệu nhất. Tuỳ theo loại rác thải mà người ta chọn lựa các nhóm vi sinh vật khác nhau để phân huỷ chúng.
+ Phân huỷ chất thải hữu cơ: Hiện nay, đối với rác thải hữu cơ thì việc dùng vi sinh vật để xử lí thành phân hữu cơ dùng bón cho cây trồng, cải tạo đất là vấn đề đang được quan tâm. Người ta dùng các vi khuẩn, nấm sợi, xạ khuẩn để phân giải xenluloza, lignin… Ví dụ, người ta sử dụng EM ủ với các chất thải hữu cơ không phải phân
chuồng để chế biến thành phân bón hữu cơ chất lượng cao.

+ Phân huỷ chất thải vô cơ trong công nghiệp: Rác thải vô cơ là loại khó xử lí, ngoài biện pháp tái chế, thiêu huỷ, chôn lấp thì con người cũng đang nghiên cứu tìm kiếm các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ chúng. Ngày nay, người ta đã tìm ra và đang thử nghiệm các chủng vi sinh vật phân huỷ xăng dầu, các kim loại nặng…

**2.4. Một số hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong công nghiệp**

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong chế biến thực phẩm: Việc ứng dụng vi sinh vật trong chế biến thực phẩm đã được con người sử dụng từ rất lâu và ngày càng rộng rãi. Hiện nay, phần lớn các công nghệ chế biến thực phẩm đều có sử dụng vi sinh vật bằng công nghệ lên men. Ví dụ sản xuất bánh mỳ, rượu, bia, sữa chua, nước mắm, chế biến tinh bột, nước uống lên men...

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nguồn năng lượng: Các nhà khoa học đã dự báo nguồn năng lượng bằng than, dầu khí… là những loại năng lượng chính hiện nay con người đang sử dụng nhưng là ngườn tài nguyên không tái tạo nên ngày càng bị cạn kiệt. Ngược lại, nhu cầu của con người về năng lượng lại càng ngày càng tăng nên các nhà khoa học đã nghĩ đến việc tạo ra và sử dụng những nguồn năng lượng thay thế. Trong các hướng đó có hướng sản xuất cồn và khí đốt biogas.

+ Ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong sản xuất cồn công nghiệp: Hướng này là dùng vi sinh vật lên men tinh bột để tạo ra cồn công nghiệp. Hiện nay, nhiều nước đã sản xuất cồn để dùng thay thế một phần năng lượng cho xăng dầu. Theo tôi, nguồn cồn là vô tận vì cách chính để sản xuất ra cồn hiện nay là lên men tinh bột (thế mà nguồn tinh bột sẽ là vô tận, không bị cạn kiệt vì có sự tái tạo). Vấn đề còn khó khăn khi thay thế toàn bộ xăng dầu bằng cồn là chúng ta phải sản xuất ra được cồn 99 % chứ không phải là cồn 96 % như hiện nay.

+ Ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong sản xuất khí đốt biogas: Hướng này là việc ứng dụng vi sinh vật để lên men yếm khí các chất hữu cơ thành khí đốt (chủ yếu là dùng chất thải của vật nuôi). Nó vừa bổ sung cho nguồn năng lượng là khí đốt, vừa có tác dụng góp phần bảo vệ môi trường.

Ngoài ra, công nghệ vi sinh vật còn được ứng dụng trong công nghiệp sản xuất các chất tăng hương vị thực phẩm như: amino acid, vitamin, các chất màu thực phẩm, keo thực phẩm; sản xuất các dung môi hữu cơ như: ethanol, acetone…; sản xuất các acid hữu cơ như: acid lactic, acid citric…

**2.5. Một số hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong y tế**

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất vaccine cho con người: Một phần lớn các vaccine phòng bệnh cho con người có nguồn gốc từ vi sinh vật. Vaccine được chế tạo trực tiếp từ các vi sinh vật gây bệnh gọi là vaccine thế hệ cũ. Hiện nay, người ta chế tạo các vaccine thế hệ mới không phải trực tiếp từ các vi sinh vật gây bệnh mà từ ribosome trong tế bào vi khuẩn hoặc các mảnh của virus (như vỏ virus) hoặc dùng kỹ thuật gen để tạo ra các vaccine từ việc tổng hợp kháng nguyên của virus hay vi khuẩn. Các vaccine này an toàn hơn rất nhiều so với vaccine thế hệ cũ.

- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất kháng sinh cho con người và vật nuôi: Kháng sinh chế từ vi sinh vật dùng để chữa bệnh cho con người được người ta sản xuất từ lâu. Từ những loại thuốc kháng sinh được sản xuất từ lâu mà nay vẫn dùng như: steptomycine, penicyline… đến nay con người đã tìm thấy khoảng 2.500 loại thuốc kháng sinh, trong đó phần lớn có nguồn gốc từ vi sinh vật
- Ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất men tiêu hoá cho con người: Đây là một ứng dụng trực tiếp các vi sinh vật có lợi cho hệ tiêu hoá để kích thích tiêu hoá cho con người. Hầu hết các men tiêu hoá hiện nay dùng cho con người trên thị trường đều có chứa các vi sinh vật thuộc nhóm Bacillus subtilis như: Biosubtilic, Bidisubtilic, Antibio, Biofidin, Biobaby…

- Ngoài ra, con người còn ứng dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất kích tố sinh trưởng cho con người (HGH = Human Growth Hormone), là chất có trong tuyến yên của người, giúp cho con người tăng trưởng chiều cao; sản xuất Insulin, là protein có tác dụng điều hoà lượng đường trong máu người; sản xuất Interferon, là một protein có tác dụng giúp cơ thể người chống lại nhiều loại bệnh…

**III. ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG CÔNG NGHỆ GEN**

**1. Khái niệm công nghệ gen**

Đầu thập niên 1970, công nghệ sinh học đã chuyển sang một *giai đoạn mới cao hơn hẵn về chất nhờ kỹ thuật di truyền- công nghệ gen*. Các kĩ thuật mới cho phép *tạo giống trực tiếp nhanh hơn, tận dụng nguồn gen* từ nhiều sinh vật khác nhau để tạo các chủng sản lượng cao, mà ít tốn công sức để phân lập và gây đột biến như trước đây. Nhờ *khả năng vượt giới hạn tiến hóa của kỹ thuật di truyền*, các vi sinh vật, các tế bào động thực vật có thể được sử dụng như các “*nhà máy sinh học*” (biological factories) để sản xuất hàng loạt các protein người như insulin, hormone tăng trưởng, interferon,… Các động vật và thực vật có thể trở thành *bioreactor tự nhiên* tạo các sản phẩm từ gen lạ đưa vào, không cần lai tạo và chọn lọc các biến dị bằng lai trong loài như trước đây. Ngoài ra, *kỹ thuật di truyền* đồng thời cung cấp các phương pháp trị liệu và chẩn đoán mới để chữa trị bệnh ở người. Cần nhấn mạnh rằng, kỹ thuật di truyền- công nghệ gen là *công nghệ cao*, gồm nhiều công đoạn phức tạp và nó thực sự đã tạo nên một cuộc cách mạng.

Công nghệ gen là quy trình tạo ra những tế bào hoặc vi sinh vật có gen bị biến đổi hoặc có thêm gen mới. Công nghệ gen đã khởi đầu cho một cuộc cách mạng trong công nghệ sinh học và trong công nghệ gen thì kỹ thuật tạo ADN tái tổ hợp đề chuyển gen từ tế bào này sang tế bào khác đóng vai trò trung tâm của công nghệ gen. Kỹ thuật chuyển gen, ghép gen là kỹ thuật đưa một gen lạ (một đoạn ADN, ARN) vào tế bào vật chủ làm cho gen lạ tồn tại ở các plasmid trong tế bào chủ hoặc gắn bộ gen tế bào chủ, tồn tại và tái bản cùng với bộ gen của tế bào chủ. Gen lạ trong tế bào chủ hoạt động tổng hợp các protein đặc hiệu, gây biến đổi các đặc điểm đã có hoặc làm xuất hiện những đặc điểm mới của các cơ thế chuyển gen.

**2. Các bước cần tiến hành trong kỹ thuật chuyển gen**

**2.1. Tạo ADN tái tổ hợp**

ADN tái tổ hợp là phân tử [ADN](https://vi.wikipedia.org/wiki/ADN) được tạo thành từ hai hay nhiều trình tự ADN của các [loài sinh vật](https://vi.wikipedia.org/wiki/Lo%C3%A0i) khác nhau. Trong kỹ thuật di truyền, ADN tái tổ hợp thường là được tạo thành từ việc gắn những đoạn ADN có nguồn gốc khác nhau vào trong [vectơ tách dòng](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vect%C6%A1_t%C3%A1ch_d%C3%B2ng). Những vectơ tách dòng mang ADN tái tổ hợp này có thể biểu hiện thành các [protein tái tổ hợp](https://vi.wikipedia.org/w/index.php?title=Protein_t%C3%A1i_t%E1%BB%95_h%E1%BB%A3p&action=edit&redlink=1) trong các sinh vật.

Vectơ tách dòng hay còn gọi là thể truyền là những phân tử ADN nhỏ có khả năng nhân đôi độc lập với hệ gen của tế bào cũng như có thể gắn vào hệ gen của tế bào. Thể truyền có thể là các plasmit, virut (thực chất là ADN của virut đã được biến đổi) hoặc thậm chí là một số NST nhân tạo (như đã làm ở nấm men). Tất cả các thể truyền phải có chung các đặc điểm sau:

- Thể truyền phải đủ lớn để mang ADN ngoại lai nhưng không quá lớn.

- Thể truyền phải chứa các trình tự kiểm soát (control sequences) như khởi điểm tái bản (origin of replication), promoter.
- Thể truyền phải mang một hoặc nhiều vị trí nhận biết của enzym hạn chế.
- Vector phải mang các gen marker chọn lọc (thường là các gen kháng chất kháng sinh). Nhờ đó các tế bào chứa chúng có thể được phát hiện một cách dễ dàng.

Plasmit là các phân tử ADN mạch đôi dạng vòng nằm ngoài ADN nhiễm sắc thể. Chúng thường hiện diện trong [vi khuẩn](https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_khu%E1%BA%A9n), đôi khi cũng có ở [sinh vật có nhân thật](https://vi.wikipedia.org/wiki/Sinh_v%E1%BA%ADt_nh%C3%A2n_chu%E1%BA%A9n) (ví dụ như *vòng 2 micrometre* ở [*Saccharomyces cerevisiae*](https://vi.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)). Plasmit có kích thước khoảng từ 1 đến hơn 400 ngìn cặp nuclêôtit. Plasmit có thể hiện diện chỉ một bản sao, đối với plasmit lớn, cho tới vài trăm bản sao trong cùng một [tế bào](https://vi.wikipedia.org/wiki/T%E1%BA%BF_b%C3%A0o). Plasmit thường chứa các gene hay nhóm gene mang lại một ưu thế chọn lọc nào đó cho tế bào vi khuẩn chứa nó, ví dụ như khả năng giúp vi khuẩn kháng kháng sinh. Mỗi plasmit chứa ít nhất một trình tự ADN có vai trò vị trí bắt đầu sao chép, mang lại cho plasmit khả năng tự sao chép độc lập với ADN nhiễm sắc thể.

Kỹ thuật tạo ADN tái tổ hợp được tiến hành theo 4 bước sau:

**Bước 1:** Chọn và phân lập ADN lạ đầu bằng và plasmit, giả sử ta phân lập plasmit có chứa chuỗi đích được nhận biết bởi enzyme BamHI (G/GATCC). Cắt plasmid bằng enzyme BamHI để tạo plasmid hở có hai đầu dính và cắt ADN lạ bằng enzyme exonuclease theo hướng 5’→ 3’ để tạo ADNcó hai đầu lệch nhau.

**Bước 2:** Ủ ADN lạ với cùng một loại nucleotide dCTP với sự có mặt của enzym giới hạn để tạo đuôi polyC ở đầu 3’(OH) của ADN lạ.

Ủ plasmid với cùng một loại nucleotide dGTP với sự có mặt của enzyme terminal transferase để tạo đuôi polyG ở đầu 3’(OH) của plasmid hở.

**Bước 3:** Đưa ADN lạ vào plasmid với sự có mặt của enzyme ADN ligaza, các đầu mút của homopolymer có trình tự bổ sung (---GGGG 3’/3’CCCC---) sẽ bắt cặp với nhau.

**Bước 4:** Bổ sung enzyme ADN-polymeraza I để gắn các nucleotide tương ứng vào chỗ trống theo nguyên tắc bổ sung. Enzym ligaza nối liên kết photphodieste và cuối cùng tạo được plasmit tái tổ hợp có hai chuỗi đích được nhận biết bởi enzym giới hạn BamHI.



Hình 1: Sơ đồ các bước tạo ADN tái tổ hợp

**2.2. Đưa ADN tái tổ hợp vào trong tế bào nhận**

Có hai hình thức chuyển gen chủ yếu là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp.

**- Chuyển gen trực tiếp: Chuyển ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ bằng phương pháp biến nạp hoặc tải nạp**

Công đoạn này nhằm mục đích sử dụng bộ máy của tế bào chủ để sao chép vector tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao. Việc chuyển ADN tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn tức là làm cho vi khuẩn trở thành khả biến, nghĩa là có khả năng thấm vector tái tổ hợp. Sự thấm này có thể xảy ra một cách tự nhiên hoặc được cảm ứng. Tuy nhiên, nó sẽ phụ thuộc vào loại plasmit sử dụng làm vector và phụ thuộc vào sự định vị của vùng cài lắp chứa bên trong vector mà người nghiên cứu sẽ chọn phương pháp biến nạp hoặc tải nạp.

Biến nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho sang tế bào thể nhận, không cần sự tiếp xúc giữa hai tế bào hoặc nhân tố trung gian là phage hoặc virut. Biến nạp được thực hiện với vector chuyển gen là plasmit. Có nhiều phương pháp biến nạp như hóa biến nạp, điện biến nạp, biến nạp tế bào trần, phương pháp bắn gen và phương pháp vi tiêm, bằng phương pháp sốc nhiệt…. Các kỹ thuật đó là:

+ Kỹ thuật siêu âm: được sử dụng để chuyển gen vào tế bào trần, siêu âm làm cho các phân tử ADN tái tổ hợp dễ xâm nhập vào trong tế bào chủ.

+ Kỹ thuật điện xung: dùng thiết bị điện xung (electroporation) tạo điện thế cao khoảng 500V/cm với thời gian 4-5 phần nghìn giây tạo nên các lỗ trên màng tế bào trần, khi đó các phân tử ADN tái tổ hợp dễ dàng đi vào tế bào chủ.

+ Kỹ thuật PEG: PEG (polyethylen glycol) là một chất có ái lực cao với nước vì vậy khi ở nồng độ cao, PEG làm cho các phân tử ADN tái tổ hợp dinh vào màng sinh chất của tế bào nhận, khi đó tế bào nhận sẽ “nuốt” các phân tử ADN tái tổ hợp trên màng theo cơ chế amip.

+ Kỹ thuật vi tiêm: là kỹ thuật bơm trực tiếp một lượng nhỏ ADN vào trong tế bào hoặc vào trứng đã thụ tinh ở giai đoạn phôi có từ 4 đến 8 tế bào.

+ Kỹ thuật bắn gen: sử dụng những viên đạn hình cầu có kích thước 0,4 đến 1,2 micromet (bằng vàng hoặc bằng volfram) được bao bọc bởi ADN, khi vào trong tế bào ADN có thể gia nhập cùng với ADN tế bào chủ

+ Kỹ thuật chuyển gen bằng sốc nhiệt: thường được sử dụng để chuyển gen vào trong tế bào vi khuẩn, kỹ thuật này tương đối đơn giản nhưng lại có hiệu quả cao.

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho sang tế bào thể nhận qua nhân tố trung gian là virus. Tải nạp được thực hiện với vector chuyển gen có nguồn gốc là virus như phage, cosmit.

**- Chuyển gen gián tiếp**

+ Chuyển gen nhờ Agrobacterium tumefaciens.

+ Chuyển gen nhờ virus và phage.

**2.3. Phân lập dòng tế bào chứa ADN tái tổ hợp**

Khi đưa ADN tái tổ hợp vào trong tế bào nhận sẽ xảy ra các tình huống: Tế bào vi khuẩn không nhận plasmit tái tổ hợp hoặc tế bào nhận plasmit nhưng không có gen lạ hoặc tế bào vi khuẩn nhận được plasmit tái tổ hợp. Tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu mà người ta có các phương pháp khác nhau để xác định dòng cần tìm. Nếu mục đích là nghiên cứu đoạn gen chưa biết, người ta thường dùng đầu dò. Nếu đoạn ADN đã biết (cADN), công việc sẽ đơn giản và nhanh chóng. Còn trong trường hợp đối với các gen đã biết, các nhà khoa học dùng thể truyền chứa các gen đánh dấu kết hợp với kiểm tra thu nhận sản phẩm của gen tái tổ hợp.

**3. Ứng dụng của vi sinh vật trong công ngệ gen**

**3.1. Tạo dòng vi sinh vật biến đổi gen**

*E. coli, Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng đầu tiên được sử dụng kỹ thuật di truyền để tạo ra các chủng sản xuất các r-protein người, tiếp đó là nhiều vi sinh vật khác. Sau đây là vài ví dụ cụ thể.

**a. Thiết kế trao đổi chất (Metabolic Design)**

Công nghệ gen đã *can thiệp vào quá trình trao đổi chất ở cấp độ gen* để sản xuất các chất phân tử nhỏ. Các ứng dụng đầu tiên của *metabolomics,* công nghệ gen *điều khiển trao đổi chất,*thực hiện ở vi sinh vật. Hai ví dụ điển hình đầu tiên là tạo dòng tế bào *E. coli*sinh tổng hợp các chất, mà vốn nó không có khả năng này, như *xanhindigo* và sắc tố đen *melanin*. Sự tạo dòng một gen từ *Pseudomonas putida* vào *E.coli* làm nó có khả năng tổng hợp *indigo xanh* trong môi trường có tryptophan. Sự tạo dòng *gen tyrosinaz* cho *E. coli*làm nó biến tyrozin thành *dopaquinone* và chất này ngẫu biến thành *melanin* khi có không khí.

Tiếp theo, các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp và thứ cấp được sản xuất từ các dòng thiết kế như *các chủng sử dụng lactoz, chuyển hoá xyloz, sản xuất etanol từ pentoz, phân giải các chất dị sinh (xenobiotics),…*

**b. Công nghệ bề mặt tế bào nấm men**

Các protein trên bề mặt tế bào nấm men cũng được tổng hợp bên trong tế bào, nhưng sau đó chúng được đưa ra gắn lên bề mặt tế bào. Dựa vào sự hiểu biết các gen tương ứng, *công nghệ bề mặttế bào* (cell surface technology) đã ra đời. Sử dụng công nghệ gen để cố định protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nhằm thay đổi và cải thiện chức năng của tế bào. Tiềm năng ứng dụng đa dạng của nó gồm: sản xuất các enzym, kháng thể, kháng nguyên, thụ thể,....

Bước đầu, các nhà nghiên cứu đã thành công trong biểu hiên các enzym như glycosyl hydrolse, glucozamylaz, lipaz,... PTN Công nghệ sinh học phân tử của Đại học KHTN (TPHCM) đã tạo được chủng nấm men gắn protein GFP (green fluorescense protein – protein phát huỳnh quang xanh lục của sứa) và chủng gắn alpha-amylaz.

***c. Sự can thiệp của công nghệ gen vào sản xuất etanol nhiên* *liệu***

Nấm men *S. cerevisiae* và vi khuẩn *Zymomonasmobilis* là 2 vi sinh vật chủ yếu có khả năng sử dụng trong lên men etanol nhiên liệu. Nấm men vẫn giữ vai trò chủ yếu, nhưng nó không lên men xyloz, pentoz và một số lọai đường khác. Do tầm quan trọng chiến lược cấp thiết, hiện tại và trong tương lai có rất nhiều nổ lực được tập trung cho cải thiện chủng giống nhằm sử dụng tốt hơn nguồn nguyên liệu đa dạng và thuận tiện cho quy trình công nghiệp. Các nghiên cứu chủ yếu nhằm thiết kế:

*– Các chủng sử dụng lactoz* để tận dụng phụ phẩm công nghiệp sữa.

*– Các chủng vi sinh có khả năng chuyển hoá xyloz*mà nấm men không đồng hoá*.*

*– Các chủng nấm men phân giải tinh bột*để lên men bột khỏi phải qua đường hoá*.*

*– Các chủng vi sinh vật để sản xuất etanol từ pentoz.*

Ngoài ra, vấn đề quan trọng khác là sản xuất enzym cellulaz giá rẻ để giá thành etanol nhiên liệu đủ sức cạnh tranh với xăng dầu.

*Chuyển hoá sinh khối thực vật thành etanol nhiên liệu* là một điểm nóng của công nghệ sinh học hiện đại.

**d. Cải biến các chủng vi sinh vật sản xuất vitamin**

– Riboflavin (Vitamin B2): Phương pháp mới sử dụng các loài *Candida* hoặc chủng *Bacillus subtilus* tái tổ hợp cho sản lượng 20 – 30g/l.

*– Tổng hợp các tiền chất của vitamin: G*ần đây (1990) đã thành công trong tạo dòng các gen cho sự *sinh tổng hợp carotenoit vòng*, chứa β-caroten từ *Erwinia uredovora*. Sau khi 4 gen sinh tổng hợp β-caroten được chuyển vào *Z. mobilis* và *Agrobacterium tumefaciens*, các khuẩn lạc màu vàng thu được trên các đĩa thạch. Các thể tiếp hợp sản xuất 220 － 350γg β-caroten trên gram khối lượng khô ở phaz ổn định trong môi trường nuôi.

– *Sinh tổng hợp L-ascorbic axit*được cải biến nhờ công nghệ gen. *L-ascorbic axit* (Vitamin C) được hiện tổng hợp thương mại theo một quy trình đắt tiền, bao gồm 1 giai đoạn lên men Vi sinh vật và một số giai đoạn hóa học bắt đầu với D-glucoz. Giai đoạn cuối cùng trong quá trình là sự *chuyển hoá 2-keto-L-glucoznic axit* (2-KLG) thành *L-ascorbic axit* dưới xúc tác là axit. Do đó, cách tốt nhất để chuyển hoá glucoz thành 2-KLG là *chế tạo một Vi sinh vật* có mang tất cả các enzym cần thiết. Việc chuyển hóa D-glucoz thành 2,5-DKG bằng *Erwinia herbicola* bao gồm nhiều bước xúc tác bởi enzym, trong khi đó sự chuyển đổi 2,5-DKG thành 2-KLG do*Corynebacteriumsp.* đòi hỏi chỉ một bước. Chiến lược đơn giản nhất để thiết kế một sinh vật có khả năng *chuyển D-glucoz thành 2-KLG* là tách gen 2,5-DKG reductaz từ *Corynebacteriumsp.* và cho biểu hiện trong *Erwinia herbicola*.

Các tế bào *Erwinia* được *biến nạp gen 2,5-DKG reductaz* có khả năng *chuyển hoá trực tiếp D-glucoz thành 2-KLG,* vì các enzym nội bào của *Erwini* nằm ở màng trong của vi khuẩn *chuyển glucoz thành 2,5-DKG* và *2,5-DKG reductaz* xúc tác *chuyển 2,5-DKG thành 2-KLG*. Do đó, bằng thao tác gen, khả năng chuyển hoá của 2 Vi sinh vật rất khác nhau lại được kết hợp thành một và do đó có khả năng tạo sản phẩm cuối của *quá trình chuyển hoá được thiết kế*. Sinh vật loại này rất hữu ích như là một nguồn 2-KLG cho sản xuất L-ascorbic axit, bằng cách đó thay thế 3 công đoạn đầu của quy trình hiện đang được sử dụng.

Thông qua *đột biến điểm định hướng* bằng oligonucleotit đã thu được đột biến 2,5-DKG reductaz có hoạt tính cao hơn khoảng 2 lần và bền với nhiệt hơn dạng enzym tự nhiên.

**3.2. Tạo giống cây trồng biến đổi gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens***

**a. Cơ sở khoa học của tạo giống cây trồng biến đổi gen nhờ vi khuẩn *A.***

***tumefaciens***

Mục đích của công nghệ gen thực vật là tạo ra những cây biến đổi gen có những đặc tính mới. Ở đây, ADN ngoại lai được đưa vào tế bào thực vật và tồn tại bền vững trong hệ gen (genome). Các vi khuẩn đất *A. tumefaciens* và một số loài họ hàng của chúng có khả năng chuyển một phần nhỏ ADN vào tế bào thực vật và qua đó kích thích tạo khối u (callus). Những khối u này là không gian sống của vi khuẩn. Khả năng chuyển ADN của *A.tumefaciens* được ứng dụng trong công nghệ gen hiện đại. Việc sử dụng *A. tumefaciens* bắt đầu từ 1970, khi người ta phát hiện vi khuẩn này có khả năng tạo nên khối u ở cây hai lá mầm bị thương, được gọi là khối u cổ rễ. Trong những năm 1970, các nhà khoa học đã tìm thấy trong các chủng *A. tumefaciens* tạo khối u có một plasmit rất lớn kích thước khoảng 200-800kb. Từ những thí nghiệm trên những chủng *A.tumefaciens* không độc (không có plasmit này), người ta đã khẳng định plasmit nói trên cần thiết cho việc tạo khối u. Vì vậy, chúng được gọi là Tiplasmit (tumor inducing-plasmid).

Điều kiện cho việc chuyển T-ADN vào thực vật trước hết là tế bào bị thương. Khi tế bào bị thương chúng tiết ra các hợp chất phenol (acetosyringone), chất có vai trò quan trọng trong việc nhận biết và gắn kết vi khuẩn với tế bào thực vật. Cơ chế nhận biết được giải thích là nhờ tính đặc hiệu của *A. tumefaciens* với cây hai lá mầm, ở cây một lá mầm thì phản ứng này chỉ có ở một ít loài. Vì vậy, *Agrobacterium* chỉ được sử dụng hạn chế cho việc biến nạp gen ở cây một lá mầm. Khi bổ sung syringone người ta có thể biến nạp gen vào nấm nhờ *A. tumefaciens*. Thực vật một lá mầm quan trọng như ngô cũng có thể được biến nạp bằng *A. tumefaciens*.

**b. Các bước thực hiện chuyển gen thực vật nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens***

*-* Bước 1: Thiết kế vectơ mang gen biến nạp

- Bước 2: Nhân dòng vectơ mang gen biến nạp nhờ vi khuẩn *E. coli*

- Bước 3: Chuyển vectơ mang gen biến nạp từ *E. coli* sang *Agrobacterium*

- Bước 4: Lây nhiễm *Agrobacterium* mang gen biến nạp vào tế bào hoặc mô thực vật để thực hiện chuyển gen biến nạp sang tế bào hoặc mô đích.

- Bước 5: Chọn lọc các tế bào hoặc mô được biến nạp thành công.

- Bước 6: Tái sinh tế bào hoặc mô được biến nạp thành công thành cây biến nạp hoàn chỉnh (và đánh giá sự biểu hiện của gen biến nạp).

**c. Các hướng chính của tạo giống cây trồng biến đổi gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens***

**- Cây trồng chuyển gen kháng các nấm gây bệnh**

Nấm bệnh là những tác nhân gây hại cây trồng rất nặng, nhất là ở các nước nhiệt đới có độ ẩm cao. Các enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm chitin và β-1,3 glucan là loại đang được chú ý. Khi chuyển gen chitinase vào cây thuốc lá đã tăng hoạt tính kháng nấm gây hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gen chitinase và glucanase trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm gây hại cao hơn cây có một gen độc lập.

Tương tự, cà chua cho tính kháng nấm Fusarium cao hơn hẳn sau khi được chuyển cả hai gen nói trên. Protein ức chế ribosome (ribosomal inhibition protein-RIP) cũng biểu hiện tính kháng nấm tốt. Cây thuốc lá cho tính kháng nấm rất cao, khi cây được chuyển giao đồng thời gen RIP và chitinase.

**- Cây trồng chuyển gen kháng các vi khuẩn gây bệnh**

Đối với bệnh vi khuẩn, hướng nghiên cứu tạo giống mới bằng công nghệ gen chỉ mới bắt đầu. Về cơ bản có ba hướng :

+ Dùng gen mã hóa enzyme làm thoái hóa thành tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn, gen lysozyme từ các nguồn tế bào động vật hoặc từ thực khuẩn thể T4 (bacteriophage T4) đưa vào cây thuốc lá và khoai tây. Các gen này biểu hiện hoạt tính lysozyme mạnh và các tế bào có khả năng phòng trừ vi khuẩn Erwina carotovora rất tốt.

+ Gen mã hóa *α*-thionin-cystein được chuyển giao sang cây thuốc lá cũng phòng ngừa được vi khuẩn Pseudomonas syringae.

+ Chuyển gen sản xuất protein làm giảm độc tố của vi khuẩn là hướng có nhiều hứa hẹn. Gen này chủ yếu là gen sản xuất các loại enzyme phân hủy độc tố của vi khuẩn, do vậy vô hiệu hóa tác hại của chúng.

**- Cây trồng chuyển gen kháng virus gây bệnh**

Các virus gây ra những thiệt hại đáng kể trong hầu hết các cây trồng lương thực và cây cho sợi trên phạm vi thế giới. Phương pháp chủ yếu để khắc phục tình trạng trên là khai thác tính kháng xuất phát từ các tác nhân gây bệnh. Chẳng hạn, sử dụng các trình tự có nguồn gốc từ virus được biểu hiện trong các cây chuyển gen để cung cấp tính kháng đối với các virus thực vật. Hướng này dựa trên cơ sở các nghiên cứu về sự gây nhiễm (inoculation) hay xâm nhiễm (infection) ở thực vật, khởi đầu với các chủng virus nhẹ tạo ra phản ứng bảo vệ chống lại sự gây nhiễm tiếp theo với cùng loại virus hoặc các virus liên quan gần gũi.

**- Cây trồng chuyển gen kháng côn trùng phá hoại**

Sử dụng hóa chất để phòng trừ sâu bọ côn trùng vừa đắt tiền vừa tác động xấu đến môi trường. Các cây trồng như bông, ngô và khoai tây chuyển gen đang được sản xuất thương mại biểu hiện độc tố của Bacillus thuringensis (Bt) để tạo ra tính kháng đối với các côn trùng loại nhai-nghiền (chewing insects). Vi khuẩn B. thuringensis tổng hợp các protein *δ*-endotoxin tinh thể được mã hóa bởi các gen Cry. Khi côn trùng ăn vào bụng, các prototoxins bị đứt gãy trong dạ dày kiềm của côn trùng để tạo thành độc tố hoạt động. Các liên kết này tạo ra các receptor đặc trưng trong các tế bào biểu mô ruột làm thành các lỗ chân lông và cuối cùng là gây chết côn trùng.

**- Cây trồng chuyển gen cải tiến các protein hạt**

Hàm lượng protein và thành phần amino acid thay đổi rất nhiều trong thực phẩm thực vật. Ngoài protein thì các amino acid không thay thế, phải được tiếp nhận cùng thức ăn vì con người và động vật không tự tổng hợp được. Đặc biệt, trong thức ăn gia súc chủ yếu là đậu tương và ngô, phải bổ sung các amino acid được sản xuất bằng phương pháp lên men như lysine, methionine, threonine và tryptophan. Trong tương lai, không cần thiết phải bổ sung các amino acid này theo phương thức như vậy. Phương thức có khả năng hơn là tạo dòng các gen ở cây đậu tương hoặc ngô mà các gen này mã hóa cho protein giàu những amino acid này.

Người ta đã đưa gen mã hóa cho một loại protein chứa các amino acid có lưu huỳnh cao bất thường vào cây đậu lupin với mục đích biểu hiện ở hạt. Kết quả là tăng 100% hàm lượng protein trong hạt. Hạt này được dùng để nuôi cừu, tăng trọng lượng 7% và sản lượng lông tăng 8% so với cừu nuôi bằng loại hạt bình thường. Thành công này thúc đẩy các nhà nghiên cứu đưa gen này vào biểu hiện ở lá cây cỏ, nhằm cải tiến cân bằng amino acid không thay thế ở dạ cỏ.

**- Cây trồng chuyển gen sản xuất những loại protein mới**

Thực ra việc sản xuất protein trong thực vật dễ dàng, nhưng tinh sạch protein này từ mô thực vật là khó khăn và trước hết là giá thành cao. Vì vậy, người ta hy vọng vào một phương pháp mới, được giới thiệu bởi Raskin và cs (1999). Những gen mã hóa cho protein được gắn với một promoter và đảm bảo cho protein chỉ được tổng hợp ở rễ. Tiếp theo protein tạo thành có một hệ thống tín hiệu, đảm bảo cho nó được vận chuyển vào một vị trí xác định trong tế bào. Trong trường hợp đặc biệt protein được vận chuyển vào mạng lưới nội chất (endoplasmatic reticulum: ER).

Protein đi vào ER có thể được thải ra bên ngoài và chỉ ở vùng rễ, vì promoter chỉ đặc hiệu cho vùng này. Người ta dùng một số dung dịch muối để tách protein một cách dễ dàng và với giá thành hợp lý.

Một ví dụ điển hình của hướng ứng dụng này: Người ta đã tạo ra được hai loại thuốc lá chuyển gen, mỗi loại có khả năng sản xuất một trong hai mạch immunoglobin nhẹ và nặng. Thế hệ con sinh ra từ sự lai hai loại cây trên biểu hiện được một kháng thể hoạt động gồm hai loại mạch với hàm lượng cao (1,3% tổng protein của lá) và có tất cả các đặc tính của một kháng thể đơn dòng sản sinh từ hybridoma. Thaumatin là những protein được chiết xuất từ thịt quả của cây Thaumatococus danielle, có độ ngọt gấp 1.000 lần đường saccharose. Người ta đã thành công trong việc chuyển một gen mã hóa cho thaumatin (thaumatin II) vào cây khoai tây, tạo một cây khoai tây có lá, thân rễ, củ đều ngọt. Kết quả này mở ra một triển vọng rất lớn đối với cây ăn quả ngọt.

**- Cây trồng chuyển gen mang tính bất dục đực**

Các cây hoa màu đạt năng suất cao hiện nay đều được trồng từ hạt lai qua một quá trình chọn lọc khắt khe. Các hạt này có ưu thế lai cao vì là kết quả của các quá trình lai xa. Ở những cây tự thụ phấn như ngô, trước kia người ta rất tốn công lao động để loại bỏ cờ bắp (cụm hoa đực) nhằm tránh hiện tượng tự thụ phấn.

Tuy nhiên, công trình thử nghiệm mới đã chuyển một phức hợp gồm gen rolC của A. tumefaciens và promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus: virus gây bệnh khảm ở súp-lơ) vào cây thuốc lá và đã thu được cây chuyển gen bất thụ. Kết quả này đang được nghiên cứu và áp dụng trên những loại cây khác.

**- Thực vật biến đổi gen để sản xuất các acid béo thiết yếu**

Như chúng ta biết, nguồn cung cấp chủ yếu về các acid béo thiết yếu là dầu cá và tài nguyên hải sản đang bị cạn kiệt và sự gia tăng độc tố ở các loại hải sản khác nhau cũng đang trở thành một nguy cơ tiềm tàng. Do vậy, việc nghiên cứu sản xuất các acid béo thiết yếu có tiềm năng to lớn trong việc phát triển một nguồn cung cấp thay thế.

Gần đây, các nhà nghiên cứu của Đại học Bristol (Anh) đã thông báo về việc sản xuất hai chuỗi dài acid béo không sản sinh ra cholesterol với số lượng lớn ở thực vật bậc cao. Việc sản xuất ra các loại dầu thiết yếu ở cây Arabidopsis thaliana cho thấy thực vật chuyển gen có thể trở thành nguồn cung cấp các acid béo quan trọng dùng trong ăn uống mà chúng ta thường chỉ nhận được từ cá.

Người ta cũng đã áp dụng thành công kỹ thuật gen đối với cây Arabidopsis thaliana để tạo ra các acid béo thiết yếu khác như arachidonic acid và eiconsapentaenoic acid.

**3.3. Tạo động vật chuyển gen nhờ virut**

**a. Vectơ chuyển gen vào tế bào động vật nhờ vi sinh vật**

**Vectơ retrovirus** là cấu trúc ADN nhân tạo có nguồn gốc từ retrovirus, được sử dụng để xen ADN ngoại lai vào nhiễm sắc thể của vật chủ.

Yếu tố chìa khóa trong việc sử dụng retrovirus làm thể truyền phân phối gen là sự an
toàn sinh học (biosafety). Mục đích chính của thiết kế vector là bảo đảm tạo ra một virus không khả năng tái bản (replication incompetent virus) trong tế bào chủ.

Vector retrovirus là cần thiết cho liệu pháp gen, đã được sử dụng có hiệu quả trong nhiều liệu pháp gen chữa bệnh cho người như suy giảm miễn dịch do thiếu hụt enzyme ADA, ung thư, tiểu đường, thiếu máu,...

Các vector retrovirus khác nhau cũng đã được thiết kế để tạo động vật chuyển gen và gà chuyển gen đặc biệt cũng như được sử dụng để chuyển gen vào noãn bào của bò và khỉ.

**Vector adenovirus** là vector chuyển gen được tạo ra từ các adenovirus tái tổ hợp. Vector virus này không hợp nhất vào nhiễm sắc thể tế bào và nó tồn tại như một episome ở trong nhân.

Adenovirus là một vector chuyển gen an toàn, có thể xâm nhiễm một cách hiệu quả vào các tế bào không phân chia và các tế bào đang phân chia của nhiều loại tế bào khác nhau do các loại tế bào đích này chứa các thụ quan phù hợp với adenovirus. Khi xâm nhiễm vào tế bào chủ, phần lõi mang genome virus và gen ngoại lai đi qua lỗ màng nhân. Trong nhân tế bào chủ, các gen của adenovirus và gen ngoại lai sẽ phiên mã và dịch mã trong tế bào chất để tạo nên các loại protein cần thiết cho virus và protein mong muốn do gen ngoại lai mã hóa.

Adenoviruc người thế hệ thứ nhất đã được sử dụng rộng rãi làm véc tơ chuyển gen invivo. Các vector này đã dược sử dụng để chuyển gen người in vivo vào tế bào mũi, tế bào phổi, tế bào thận, tim, gan, hệ thần kinh trung ương.

Vector episom là vector sử dụng plasmit, cosmis, phage, BAC và YAC. Không có một loại vector nào có thể được sử dụng ở sinh vật nhân thực bậc cao do các yếu tố của chúng không hoạt động trong tế bào động vật. Các vector này được sử dụng chủ yếu là để xây dựng ADN và tạo ADN tái tổ hợp để nghiên cứu chuyển gen vào tế bào động vật.

**b. Các bước tiến hành tạo động vật chuyển gen.**

- Tách chiết, phân lập gen mong muốn và tạo tổ hợp gen biểu hiện trong tế
bào động vật

- Tạo cơ sở vật liệu biến nạp gen: Ở động vật có vú thì giai đoạn biến nạp gen thích hợp nhất là giai đoạn trứng ở giai đoạn tiền nhân, giai đoạn mà nhân của tinh trùng và nhân của trứng chưa dung hợp với nhau, ở giai đoạn này, tổ hợp gen lạ có cơ hội xâm nhập vào hệ gen của động vật nhờ sự tổ hợp ADN của tinh trùng và trứng. Vì vậy để tạo cơ sở cho vật liệu biến nạp gen, người ta kích thích để trứng rụng hàng loạt sau đó cho thụ tinh nhân tạo để tạo ra trứng tiền nhân.

- Chuyển gen vào động vật bằng nhiều phương pháp khác nhau.

- Nuôi cấy phôi trong ống nghiệm (đối với động vật bậc cao).

- Kiểm tra động vật được sinh ra từ phôi chuyển gen.

- Tạo nguồn động vật chuyển gen một cách liên tục. Sau khi thấy gen ngoại lai đã được di truyền ổn định, tiến hành lai tạo và chọn lọc để tạo dòng động vật chuyển gen.

**c. Những hướng nghiên cứu tạo động vật chuyển gen và ứng dụng**

- Taọ ra những động vật có tốc độ lớn nhanh, hiệu quả sử dụng thức ăn cao: Trong hướng này, người ta tập trung chủ yếu vào việc đưa tổ hợp bao gồm gen cấu trúc của hormone sinh trưởng và promoter methallothionein vào động vật. Cho đến nay người ta đã đưa thành công gen này vào thỏ, lợn và cừu. Kết quả là những động vật chuyển gen này không to lên như ở chuột. Tuy nhiên ở Ðức, trong trường hợp ở lợn chuyển gen hormone sinh trưởng lượng mỡ giảm đi đáng kể (giảm từ 28,55mm xuống 0,7mm) và hiệu quả sử dụng thức ăn cao hơn. Ở Australia, lợn chuyển gen hormone sinh trưởng có tốc độ lớn nhanh hơn đối chứng là 17%, hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn 30%. Tuy nhiên động vật nuôi chuyển gen hormone sinh trưởng có biểu hiện bệnh lý lớn quá cỡ và chưa có ý nghĩa lớn trong thực tiễn. Các nhà khoa học ở Granada (Houston, Texas) đã tạo ra được bò chuyển gen tiếp nhận estrogen người (human estrogen receptor) có tốc độ lớn nhanh. Các nhà khoa học ở đây đã thành công trong việc đưa gen hormone sinh trưởng giống insulin bò (bovine insulin like growth hormone) vào gia súc để tạo ra giống gia súc thịt không dính mỡ. Hãng Granada đã chi 20 triệu USD để áp dụng kỹ thuật trên vào lợn, cừu, dê và gà để tạo ra vật nuôi có hiệu quả chuyển hóa thức ăn thành thịt, sữa... cao.

- Tạo ra động vật chuyên sản xuất protein quý dùng trong y dược: Hiện tại đã có 2 protein được sản xuất bằng con đường này là α1-antitripsin người và chất hoạt hoá plasminogen mô người. Chất đầu được sản xuất qua sữa cừu với nồng độ 35g/l, còn chất sau sản xuất qua sữa dê. Hãng Genetech (Mỹ) hàng năm thu được 196,4 triệu USD từ sản phẩm chất hoạt hoá plasminogen mô với giá 2,2 USD/liều. Hormone sinh trưởng người cũng là sản phẩm của kỹ thuật gen do vi sinh vật tổng hợp với mức thu hàng năm 122,7 triệu USD. Hiện tại các nhà khoa học Mỹ muốn giảm giá thành của sản phẩm này bằng cách sản xuất qua sữa thỏ. Người ta dự đoán giá thành sản xuất hormone này qua sữa thỏ chỉ bằng 1/3 giá thành hiện tại sản xuất nhờ vi sinh. Lý do là chu kỳ sinh sản của thỏ ngắn và lượng protein sữa của thỏ lại cao. Trong một năm lượng protein sữa của 6 con thỏ bằng của một con bò. Hiện tại chuột chuyển gen hormone sinh trưởng đã tiết ra protein này với nồng độ 0,5g/l. Tập đoàn Genzyme Transgenic (Mỹ) đã sản xuất ra nhiều loại protein quý từ sữa của chuột và dê chuyển gen .

- Tạo ra động vật chống chịu được bệnh tật và sự thay đổi của điều kiện môi
trường: Ðến nay người ta đã biết được một số gen có khả năng kháng bệnh và chống chịu được sự thay đổi điều kiện môi trường của vật nuôi. Tiêm gen Mx vào lợn để tạo ra được giống lợn miễn dịch với bệnh cúm. Người ta cũng đã thành công trong việc tiêm gen IgA vào lợn, cừu, mở ra khả năng tạo được các giống vật nuôi miễn dịch được với nhiều bệnh... Ở cá, người ta đã chuyển gen chống lạnh AFP (antifreeze protein) và đã tạo ra được các giống cá có khả năng bảo vệ cơ thể chống lại sự lạnh giá (cá hồi, cá vàng...). Cá chuyển gen AFP có khả năng chịu lạnh tốt hơn cá đối chứng khi nuôi chúng trong môi trường có nhiệt độ thấp. Kết quả này đã mở rộng khả năng sống của các loài cá nuôi vào mùa đông. Ðây là một thuận lợi lớn cho việc nuôi trồng các nguồn thuỷ sản quan trọng.

- Nâng cao năng suất, chất lượng động vật bằng cách thay đổi các con đường
chuyển hóa trong cơ thể động vật: Trong hướng này nổi bật là những nghiên cứu nâng cao chất lượng sữa bò, sữa cừu bằng cách chuyển gen lactose vào các đối tượng quan tâm. Sự biểu hiện của gen này được điều khiển bởi promoter của tuyến sữa. Trong sữa của những động vật chuyển gen này, đường lactose bị thủy phân thành đường galactose và đường glucose. Do vậy những người không quen uống sữa cũng có thể sử dụng được sữa này mà không cần quá trình lên men. Mới đây, các nhà khoa học (Brigid Brophy, 2003) đã chuyển thêm các gen mã hoá ß-casein (CSN2) và kappa-casein (CSN3) bò vào các nguyên bào sợi của bò và tạo ra bò chuyển gen cho sữa có mức ß-casein và kappa-casein cao hơn bình thường: hàm lượng ß-casein tăng lên 8-20%, hàm lượng kappa-casein tăng gấp 2 lần và tỉ lệ kappacasein so với casein tổng số thay đổi một cách đáng kể. Hai loại casein là protein chủ yếu ở trong sữa và là thành phần chính của sữa đông, chìa khoá của sự sản xuất phó-mát và sữa chua. Các protein này rất quan trọng, chúng làm cho sữa có hàm lượng protein cao nhưng chứa nhiều nước.

- Tạo ra vật nuôi chuyển gen cung cấp nội quan cấy ghép cho người: Các nhà khoa học sử dụng các loài để thử nghiệm làm nguồn cơ quan cung cấp cho con người.
Đầu tiên Linh trưởng, bao gồm hắc tinh tinh được cho là thích hợp nhất. Nhưng sau
đó nhận thấy ngay rằng sự lựa chọn này không phải là tốt nhất vì các cơ quan của Linh trưởng bị loại thải sau khi cấy ghép. Vì vậy hiện nay các nhà khoa học cho rằng Lợn có thể là loài tốt có thể sử dụng để cung cấp nội quan cho con người vì lợn có quan hệ gần gũi với con người, ăn tạp và các cơ quan của nó có kích thước tương tự với con người. Người ta cho rằng việc ghép mô khác loài có thể đưa ra một giải pháp nhất thời giúp cho bệnh nhân có thể sống được cho đến khi có được cơ quan người để thay thế. Trong các trường hợp đặc biệt, các tế bào lợn tồn tại không dài hơn một ngày sau khi ghép cho bệnh nhân hoặc có thể được sử dụng trong tuần hoàn máu nhân tạo. Các tế bào gan lợn được sử dụng để ghép cho các bệnh nhân bị viêm gan cấp tính. Các tế bào gan này được duy trì trong một lò phản ứng nhân tạo (extracorporeal reactor) và chúng giải độc cho máu người tuần hoàn trong lò phản ứng này. Các tế bào lợn có thể hoạt động chức năng dài hơn nếu chúng được lấy từ lợn chuyển gen kháng với thể bổ sung của người.

- Tạo ra động vật chuyển gen làm mô hình nghiên cứu bệnh ở người.

**3.4. Tạo vacxin nhờ công nghệ gen.**

Có 2 hướng trong đó công nghệ ADN đã được ứng dụng để phát triển những vacxin virut sống mới: Ứng dụng thứ nhất là tạo ra những biến đổi đặc hiệu hoặc những xoá bỏ ở gen của virut, điều đó sẽ làm cho virut được giảm độc lực một cách vững bền. Như vậy, chúng sẽ không còn có khả năng quay trở lại độc lực. Đây là hướng đi tạo vacxin H5N1 của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương (Hà Nội). Ứng dụng thứ hai của công nghệ ADN cho việc phát triển những vacxin sống mới là làm cho những virut trở thành các vecto của những Polypeptit “ngoại lai” hay những Epitop peptit từ những tác nhân gây bệnh khác của người. Mục đích tạo ra những vecto như vậy là để giới thiệu Polypeptit hay peptit ngoại lai cho hệ thống miễn dịch, trong khuôn khổ của một virut sống, làm sao cho hệ thống miễn dịch đáp ứng với Polypeptit ngoại lai như một kháng nguyên miễn dịch “sống”. Như vậy sẽ phát triển được một miễn dịch rộng rãi hơn (dịch thể, tế bàohay cả hai). Là một phần của một virut sống, Polypeptit ngoại lai được biểu thị bên trongbào tương của tế bào bị nhiễm, được làm gẫy thành những đoạn peptit, rồi được chuyển vận tới bề mặt của tế bào. Từ đó, chúng sẽ kích thích sự đáp ứng của tế bào Limpho T độc với tế bào. Vecto virut mẫu thường được dùng rộng rãi trong việc tạo ra vacxin sống mới là virut đậu mùa. Để làm cho virut này trở thành một vecto, phải tạo ra một plasmid có chứa gen cho polypeptit ngoại lai, với những trình tự nối tiếp hướng sự biểu thị của nó vào trong các tế bào, sự kết hợp đó được gọi là “một cát xét biểu thị”. Virut Vaccinia và cát xét biểu thị được đưa cùng vào nuôi tế bào, các tế bào có thể tiếp nhận cả hai cùng một lúc vào trong bào tương. Ở đó xảy ra quá trình tái tổ hợp, sản xuất ra một virut Vaccinia tái tổ hợp biểu thị ra Polypeptit ngoại lai.

**IV. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP LIÊN QUAN ĐẾN ỨNG DỤNG VI SINH VẬT**

**Câu 1:** Một số loại thực phẩm là sản phẩm của lên men vi sinh vật là những loại nào? Bản chất của vi sinh vật tham gia?

*Gợi ý trả lời:*

Có nhiều loại thực phẩm được tạo ra từ lên men: Phomat, sữa chua, dưa chuột muối, bánh mì, thịt lên men, các loại nấm ăn và dưa bắp cải. Đa số các sản phẩm này là những sản phẩm của các vi khuẩn lactic. Bánh mì là một sản phẩm của quá trình lên men do nấm men, còn các loại nấm ăn là nấm.

**Câu 2**: Vi sinh vật được sử dụng như thế nào trong sản xuất: (a) thịt lên men, (b) bắp cải muối, (c) dưa chuột muối, (d) hạt cà phê, (e) socola, (f) oliu và (g) nước chấm.

*Gợi ý trả lời:*

a. Thịt lên men như xúc xích mùa hè hoặc Lebanon là một sản phẩm của lên men lactic.

b. Các vi khuẩn lactic trong tự nhiên tồn tại thành khu hệ trên bắp cải và việc đặt bắp cải đã thái lát vào điều kiện kị khí trong những bình sẽ kích thích sự sinh trưởng của các vi sinh vật này. Muối được thêm vào để hạn chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn gram âm.

c. Dưa chuột muối cũng là một sản phẩm của lên men lactic và trong trường hợp này nồng độ muối cao được thêm vào để chiết đường ra khỏi dưa chuột rồi trên đó các vi khuẩn lactic sẽ sinh trưởng.

d. Lớp vỏ ngoài bao quanh các hạt cà phê được loại bỏ bởi các vi khuẩn phân giải pectin.

e. Socola được sản xuất nhờ lên men rượu có liên quan tới các nấm men sau khi đã xảy ra lên men axetic . Các quá trình lên men này tạo hương và vị cho sản phẩm socola.

f. Oliu sau khi thu hoạch trước hết được xử lí bằng dung dịch kiềm để loại ancaloit có vị đắng sau đó oliu sẽ được lên men trong các bình gỗ sồi nhờ quá trình lên men lactic.

g. Nước chấm là một sản phẩm sinh trưởng của nấm và lên men lactic dưới sự tham gia của nấm men.

**Câu 3:** Vi sinh vật có ứng dụng gì trong đời sống và vai trò của chúng trong công nghệ sinh học như thế nào?

*Gợi ý trả lời:*

Vi sinh vật có nhiều ứng dụng trong đời sống. Ngay từ xa xưa, mặc dù chưa có khái niệm gì về vi sinh vật, nhưng con người đã biết tận dụng sự hoạt động của chúng để phục vụ cho lợi ích của mình. Họ đã biết cách làm ra rượu vang, phomat, ủ chua thức ăn…Cứ mỗi ngày họ lại tìm ra các tiện ích mới do vi sinh vật mang lại. Danh sách các sản phẩm do vi sinh vật tạo ra mỗi lúc một dài.

Ngày nay, công nghệ sinh học vi sinh được coi là một trong những ngành mũi nhọn của công nghệ sinh học, có tác dụng to lớn đến đời sống con người do việc tìm ra hàng loạt các sản phẩm thế hệ mới có chất lượng cao hơn, giá thành rẻ hơn như bia, axit hữu cơ, axit amin, dung môi hữu cơ, vitamin, kháng sinh, vacxin… Công nghệ sinh học vi sinh vật còn được dùng trong xử lí ô nhiễm môi trường, phục hồi đất đai bị ô nhiễm, xử lí chất thải rắn, nước thải…. Tính ưu việt của công nghệ vi sinh là có thể tạo ra các sản phẩm mong muốn trong thùng lên men, mà không phụ thuộc vào đất đai, mùa vụ, thời tiết như cây trồng, vật nuôi. Vi sinh vật là đối tượng chuyển gen lí tưởng mà giá trị của nó là cùng một công cụ nhưng có thể tạo ra các sản phẩm khác nhau, bất kì gen của cơ thể nào mã hóa cho bất kì phân tử nào cũng có thể được biểu hiện trong tế bào vi sinh vật. Chỉ cần tiến hành lên men là thu được sản phẩm chất lượng cao và giá thành hạ. Vi sinh vật cũng được sử dụng làm công cụ chuẩn đoán phục vụ cho công việc chữa bệnh, có thể là công cụ của liệu pháp gen, mang gen lành thay thế cho gen hư hỏng để chữa các bệnh di truyền. Hơn lúc nào hết công nghệ sinh học vi sinh đang ở thời kì phát triển rực rỡ có nhiều thành tựu phục vụ cho lợi ích của con người.

**Câu 4:** Các vi nấm nào được dùng để sản xuất chế phẩm diệt côn trùng gây hại?

*Gợi ý trả lời:*

Có nhiều nấm sợi dùng để diệt côn trùng, điển hình là nấm Metarhizium và Bauveria.

**Câu 5:** Các vi khuẩn nào được dùng để sản xuất chế phẩm diệt côn trùng?

*Gợi ý trả lời:*

Vi khuẩn dùng để diệt côn trùng điển hình là bacillus thuringiensis do có bào tử và tinh thể độc.

**Câu 6:** Có thể dùng vi sinh vật đối kháng nào để tạo chế phẩm chống bệnh cho cây?

*Gợi ý trả lời:*

Có rất nhiều vi sinh vật có thể dùng để sản xuất chế phẩm chống bệnh cho cây. Ví dụ: nhiều loại xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm bệnh, nấm sợi Trichoderma cũng chống nhiều loại nấm bệnh. Vi khuẩn Pseudomonas fluorescens có khả năng diệt vi khuẩn gây bệnh héo xanh…

**Câu 7:** Trong kỹ thuật di truyền, việc lựa chọn vectơ plasmit cần quan tâm đến những đặc điểm nào?

*Gợi ý trả lời:*

 - Plasmit có kích thước ngắn.

 - Có gen chuẩn (gen đánh dấu).

 - Có điểm cắt của enzym giới hạn.

 - Có thể nhân lên nhiều bản sao trong tế bào nhận.

 - Có thể đảm bảo sự biểu hiện di truyền nhờ cung cấp các yếu tố cần thiết như promotơ…

**Câu 8:** Plasmit là gì? Để có thể dùng làm thể truyền (vector) cần phải biến đổi plasmit như thế nào ?

*Gợi ý trả lời:*

 - Plasmit là những phân tử ADN, vòng, sợi kép, tự tái bản, được duy trì trong vi khuẩn như các thực thể độc lập ngoài nhiễm sắc thể.

 - Một số plasmit mang thông tin về việc di chuyển chính nó từ tế bào này sang tế bào khác khác (F plasmit), một số khác mã hóa khả năng kháng lại kháng sinh (R plasmit), một số khác mang các gen đặc biệt để sử dụng các chất chuyển hóa bất thường (plasmit phân huỷ).

 - Để được dùng làm vector plasmit cần phải có:

 + Vùng nhân dòng đa vị chứa các điểm cắt cho các endonucleaza giới hạn, dùng để chèn các ADN nhân dòng.

 + Plasmit chứa gen để chọn (như gen kháng ampicillin,... )

 + Điểm khởi động sao chép hoạt động trong *E. coli*.

 + Promotơ và các yếu tố cần thiết để gen chèn vào có thể biểu hiện trong tế bào nhận.

**Câu 9:** Trong kĩ thuật cấy gen, hãy cho biết:

 - Thể truyền là gì? Vì sao thể thực khuẩn được xem là một trong các loại thể truyền lý tưởng?

 - Thế nào là ADN tái tổ hợp? Nêu tóm tắt các bước tạo ADN tái tổ hợp.

*Gợi ý trả lời:*

Trong kỹ thuật cấy gen...

 - Thể truyền là một phân tử ADN nhỏ có khả năng tự nhân đôi một cách độc lập với hệ gen của tế bào. Thể truyền có thể là plasmit hoặc virut

 Thể thực khuẩn được xem là loại thể truyền lý tưởng vì nó thoả mãn mọi tiêu chuẩn của thể truyền và có khả năng biến nạp vào tế bào nhận

 - ADN tái tổ hợp là một phân tử ADN nhỏ được lắp rap từ các đoạn ADN lấy từ các tế bào khác nhau (thể truyền và gen cần chuyển)

 Các bước tạo ADN tái tổ hợp: Tách chiết và tinh sạch ADN các nguồn khác nhau; Cắt và nối...

**Câu 10:** Trước kia người ta hay chuyển gen của người vào tế bào vi khuẩn để sản sinh ra những protein nhất định của người với số lượng lớn. Tuy nhiên, các nhà sinh học phân tử hiện nay lại ưa dùng tế bào nấm men làm tế bào để chuyển gen của người vào hơn là dùng tế bào vi khuẩn. Giải thích tại sao?

*Gợi ý trả lời:*

 Vì tế bào nấm men là tế bào nhân chuẩn nên có enzym để loại bỏ intron khỏi ARN trong quá trình tinh chế để tạo mARN, còn tế bào nhân sơ như vi khuẩn do chúng không có gen phân mảnh nên không có enzim cắt intron

**Câu 11:** Trong công nghệ gen, người ta có thể sản xuất được các prôtêin đơn giản của động vật có vú nhờ vi khuẩn, chẳng hạn như *E. coli*. Trên cơ sở các đặc điểm khác nhau về cấu trúc gen ở sinh vật nhân sơ và nhân thực, hãy nêu những cải biến cần được thực hiện ở gen được cấy, để tế bào vi khuẩn có thể sản xuất được prôtêin của động vật có vú.

*Gợi ý trả lời:*

 + Cấu trúc gen của sinh vật nhân thực khác của sinh vật nhân sơ ở chỗ:

- Có chứa các intron.

- Trình tự ADN khởi đầu phiên mã.

- Trình tự kết thúc phiên mã.

- Trình tự tín hiệu khởi đầu dịch mã.

+ Vì vậy, để tế bào vi khuẩn có thể sản xuất được protein của động vật có vú, gen động vật có vú trước khi được cấy vào *E. coli* thường

 - Được dùng ở dạng cADN (không chứa intron).

 - Cải tiến phần trình tự khởi đầu phiên mã.

 - Cải tiến phần trình tự kết thúc phiên mã.

 - cải tiến phần trình tự khởi đầu dịch mã.

**Câu 12:** Giải thích vì sap plasmit được xem là dạng thể truyền khá lí tưởng trong kĩ thuật di truyền?

*Gợi ý trả lời:*

- Kích thước nhỏ giúp cho việc phân lập và tách chiết dễ dàng. Mặt khác giúp cho việc xâm nhập vào tế bào dễ được thực hiện qua con đường biến nạp.

- Có khả năng nhân đôi độc lập với ADN trong nhân, tạo nhiều bản sao của gen cấy trong 1 tế bào.

- Có thể được chuyển cho tế bào khác trong quần thể qua cầu tiếp hợp.

- Thường có các gen quy định tính chống chịu trước điều kiện bất lợi của môi trường thuận lợi cho khâu phân lập dòng tế bào trong môi trường chọn lọc.

- Xâm nhập được vào mọi tế bào vi khuẩn (xâm nhập không có tính chọn lọc).

**C. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

Trên đây là hệ thống một số kiến thức lí thuyết cùng các câu hỏi liên quan đến ứng dụng vi sinh vật và ứng dụng vi sinh vật trong công nghệ gen. Kiến thức này tôi vẫn thường dùng để giảng dạy cho học sinh và đã đem lại hiệu quả nhất định. Tuy nhiên trong quá trình viết chuyên đề sẽ rất khó tránh được những thiếu sót, tôi rất mong được sự góp ý chia sẻ của các bạn đồng nghiệp.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Sách giáo khoa Sinh học lớp 12 ban Khoa học tự nhiên- Nhà xuất bản Giáo dục năm 1997.

2. Bồi dưỡng học sinh giỏi trung học phổ thông – Lý thuyết và bài tập vi sinh vật học – Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

3. Tài liệu giáo khoa chuyên sâu – phần vi sinh vật học – Nhà xuất bản Giáo dục.

4. Sách giáo khoa Sinh học lớp 12 nâng cao và sách giáo khoa Sinh học lớp 12 cơ bản - Nhà xuất bản Giáo dục năm 2008.

5. ”Di truyền học” của Phạm Thành Hổ - Nhà xuất bản Giáo dục năm 2002.

6. Giáo trình ”Vi sinh vật học” của PGS. TS. Kiều Hữu Ảnh

7. Các đề thi đại học từ năm 2000 đến năm 2014.

8. Các đề thi chọn học sinh giỏi cấp tỉnh và cấp quốc gia từ năm 2000 đến 2014.

9. Tạp chí kĩ thuật và công nghệ vi sinh sinh hóa.