

**PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP**  
**CÁC HỢP CHẤT ĐẠI PHÂN TỬ**  
**SINH HỌC**

- **Phương pháp chiết tách**
- **Phương pháp làm trong**
- **Phương pháp kết tủa**
- **Phương pháp làm khô mẫu**
- **Phương pháp sắc ký**
- **Phương pháp điện di**
- **Phương pháp tinh chế**
- **Một số quy trình cụ thể cô lập các hợp chất đại phân tử sinh học**

# **Phương pháp chiết tách**

## ***(Extraction)***

- **Dung dịch chứa ĐPTSH , chú ý đối tượng cần khảo sát là loại nội bào hay ngoại bào**
- **Phương pháp ngâm dầm:**
  - **Thu các hợp chất ĐPTSH từ nguyên liệu rắn ban đầu**
  - **Loại bỏ các tạp chất không cần thiết**

## *“like dissolves like”*

- Các ĐPTSH thường tan trong dung môi hữu cơ phân cực
- Sự hòa tan phụ thuộc vào nhiều yếu tố :
  - nhóm chức phân cực, vị trí của những nhóm này trong phân tử
  - kích thước hình dạng phân tử

→ độ hòa tan sẽ giảm khi có sự gia tăng về trọng lượng phân tử, cũng như có sự gia tăng về tính bất đối xứng của phân tử

- **Có thể phân tách bất kỳ protein, glucide hay acid nucleic nào từ những phân tử khác dựa vào một hay một số tính chất lý hóa khác nhau của chúng**
- **Hai tính chất thường dùng nhất để phân tách protein là kích thước và ái lực gắn với phối tử đặc hiệu**

- **Các phương pháp chiết không bao giờ thu được các ĐPTSH tinh khiết, mà cần kết hợp thêm một số phương pháp tinh chế khác như: lọc, ly tâm, thẩm tách, kết tủa phân đoạn....**

**Ví dụ** : protein cần khảo sát là protein ngoại bào hay protein nội bào, protein màng ....

- **Lựa chọn dung dịch đệm dùng trong quá trình phá hủy tế bào:**
  - Dd 0,15M NaCl, pH # 7
  - Dd 20 – 50mM natri phosphate pH = 7 – 7,5
  - Dd 0,1M Tris – HCl, pH = 7,5
- **Làm trong dung dịch chiết**

# **Phương pháp LÀM TRONG** **( *Clarification* )**

- **Áp dụng tại mỗi giai đoạn tinh chế ĐPTSH để loại bỏ các thành phần không cần thiết cho quá trình nghiên cứu**
- **Thường dùng các kỹ thuật: ly tâm, vi lọc, siêu lọc ( riêng rẽ hay kết hợp)**
- **Chú ý kích thước, tỷ trọng, khả năng kháng cự lại khi bị phá hủy của nguyên liệu cần khảo sát**



<b>Loại tế bào</b>	<b>Hình dạng</b>	<b>Kích thước (µm)</b>	<b>Tỷ trọng (Kg.m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Khả năng kháng cự</b>	<b>Kỹ thuật tách</b>
<b>Vi khuẩn</b>	Hình que Hình cầu	0,5 – 3	1050 – 1080 1050 – 1090	Cao Khá cao	Ly tâm Lọc
<b>Nấm men</b>	Hình cầu	5 – 10	1050 – 1090	-	Lọc. Ly tâm
<b>Thực vật</b>	Không đều	20 – 100	1050 – 1090	Thấp	Vi lọc. Ly tâm vận tốc nhỏ
<b>Động vật</b>	Không thể xác định	10 – 40	-	Rất thấp	-
<b>Mảnh vỡ của tế bào</b>	Đủ kiểu loại	0,4	1010 – 1200	Thấp	Siêu lọc. Ly tâm
<b>Protein kết tủa</b>	Đủ kiểu loại	0,1 – hàng trăm	1010 – 1200	Trung bình	Ly tâm. Vi lọc. Siêu lọc

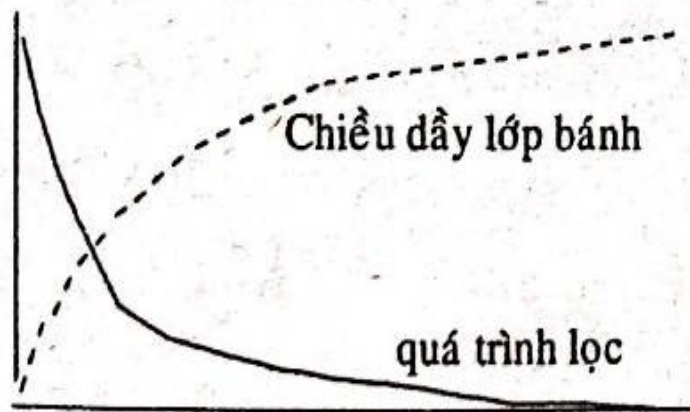
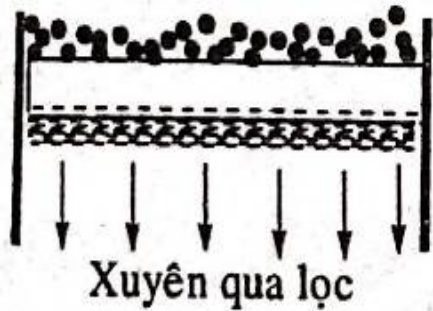
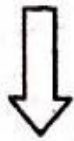
## ***Phương pháp ly tâm***

- **Kỹ thuật đơn giản nhưng khá hiệu quả để tách riêng các phân tử nhỏ ra khỏi đại phân tử hay tách hỗn hợp ban đầu thành những phần có trọng lượng phân tử khác nhau**
- **$V = 3.000 - 4.000$  v/ph (từ 10-15ph) : loại bỏ tế bào, màng tế bào**
- **$V = 10.000 - 15.000$  v/ph (10ph) hay  $5.000$  v/ph (30ph): kết tủa đa số VK, glycogen...**
- **$V = 30.000 - 40.000$  v/ph : kết tủa được các ĐPT có kích thước trung bình**
- **Phương pháp này gặp khó khăn khi tách riêng các ĐPT hình sợi  $\rightarrow$  gel**

# ***Phương pháp lọc ( Filtration )***

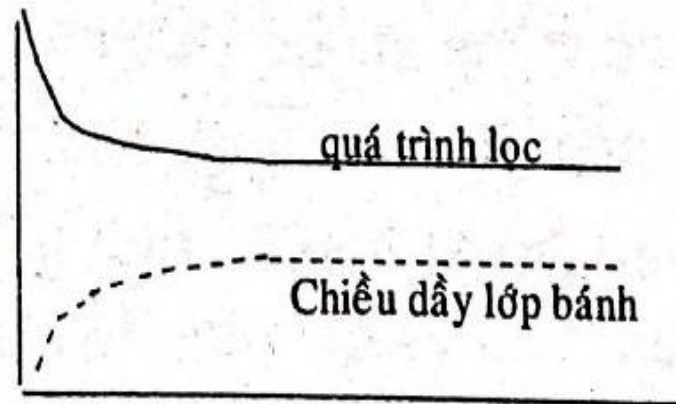
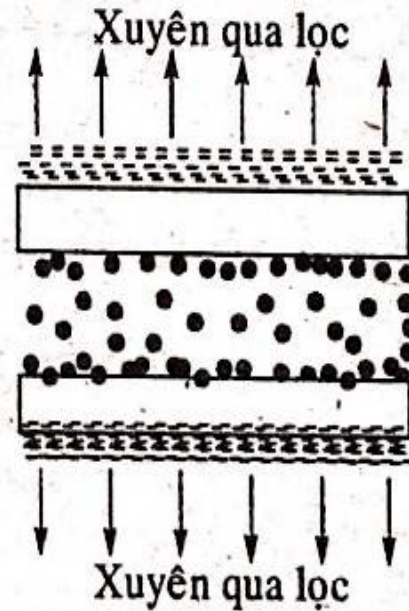
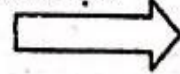
- **Vật liệu lọc: tấm vải sợi, giấy lọc, sợi thủy tinh...**
- **Bột trợ lọc: diatomic và perlit**
- **Kỹ thuật lọc: lọc cổ điển và kỹ thuật lọc thổi ngang**

Hướng di chuyển của  
dung dịch cần lọc



(a)

Hướng di chuyển của  
dung dịch cần lọc



(b)

Mô hình biểu diễn sự lọc cổ điển còn gọi là lọc chết-một-đầu (hình a)  
và sự lọc thổi ngang (hình b)

# Các loại màng lọc

- Màng lọc cổ điển:
  - loại lưới được dệt đan bằng sợi tơ với kích thước lỗ rỗng khoảng  $10\mu\text{m}$
  - Đan bằng kim loại như Ni, Cu, Al, thép không gỉ :  $5\mu\text{m}$
  - Ester cellulose hay các polymer khác :  $0,22 - 0,45\mu\text{m}$
- Màng lọc thổi ngang:
  - Màng siêu lọc (ultrafiltration membrane):  $0,001 - 0,1\mu\text{m}$
  - Màng vi lỗ (microporous membrane):  $> 0,1\mu\text{m}$

# Các kiểu cấu trúc màng lọc

- **Đồng nhất:** đường kính các lỗ rỗng nối từ mặt này qua mặt kia của màng lọc không khác nhau nhiều
- **Không đối xứng:** lớp mỏng ngay trên bề mặt màng có các lỗ rỗng rất nhỏ, ngay bên dưới là lớp dày hơn và có các hạt to hơn
- **Hỗn hợp:** giống cấu trúc màng lọc không đối xứng tuy nhiên lớp dày và mỏng của loại màng này được tạo bởi 2 loại nguyên liệu khác nhau

# Cấu tạo hóa học của màng lọc

- Nguyên liệu bằng nhựa hóa học: polycarbonate, polyamid, polyvinylchlorua, polyeter, polyester, polyetylen, polytetrafluoroetylen PTFE ( pH = 1 – 13, các dung môi hữu cơ khác nhau, bền nhiệt < 80<sup>0</sup> C)
- Nguyên liệu vô cơ: zirconium oxyd, thủy tinh borosilicat, ceramic, thép không gỉ, bạc ( bền với các tác nhân hóa học, chịu t<sup>0</sup> # 100<sup>0</sup> C và có thể khử trùng bằng nồi hấp)

*Đặc điểm cấu tạo hóa học của một số màng siêu lọc*

Phân loại hóa học	Nguyên liệu làm màng lọc	Kích cỡ lỗ rỗng ( $\mu\text{m}$ )	Đặc điểm
Plastic	Cellulose acetat, cellulose nitrat	0,2; 5,0	Dùng cho phân tích. Tính ái nước. Có thể hấp tiết trùng dù kích thước lỗ có thể thay đổi
	PTFE (Teflon)	0,2; 1,0	Chậm bị nghẹt. Chịu được hấp tiết trùng. Chịu được dung môi hữu cơ
	PVDF	0,1; 0,2; 0,45; 0,65	Thông dụng nhất. Bền lâu, sử dụng được 1-2 năm. Chịu được dung môi hữu cơ. Thường thường có tính kỵ nước, nhưng có thể biến thành tính ái nước. Chịu được hấp tiết trùng
Loại khác	PVC, nylon, cellulose, polypropylen, polyester, polycarbonat	0,1 - 10	-
Vô cơ	Carbon/Zirconia, thép không rỉ, alumina	0,1 - 30	Rắn chắc. Chịu được nhiệt. Giá đắt tiền. Dòng chảy cao và chịu được áp suất lớn. Luôn luôn là loại màng lỗ rỗng đồng nhất



# Ứng dụng của phương pháp siêu lọc

- **Làm đậm đặc một dung dịch**
- **Thay đổi dung dịch đậm cho đại phân tử**
- **Phân tách hỗn hợp ban đầu thành những phân đoạn có trọng lượng phân tử khác nhau**
- **Lọc tiệt trùng**

# ***Phương pháp thẩm tách Dialysis***

- **Để loại muối hay thay đổi dung dịch đậm**
- **Sự thẩm tách chủ yếu dùng để loại các chất điện phân như các ion:  $\text{Na}^+$ , sulphate, clorua...và các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ, có tính trung tính: đường, urea, alcol...ra khỏi dung dịch ĐPT**
- **Màng bán thấm thường được làm bằng cellulose acetate, với đường kính lỗ rỗng 1 – 20nm, hay các ống tube làm bằng cellophane với đường kính vi lỗ khác nhau**

- Quá trình thẩm tách có nhược điểm là sự cân bằng chậm khiến mất nhiều thời gian và có thể làm mất hoạt tính của hợp chất sinh học
- Thẩm tách điện ly
- Thẩm tách chân không ( hơi giống siêu lọc)
- Loại muối bằng sắc ký gel

# Phương pháp KẾT TỦA (*Precipitate*)

- Thường được dùng trong thương mại để tách những protein khác nhau nhờ ưu điểm là tương đối rẻ tiền, sử dụng thiết bị đơn giản, có thể thực hiện liên tục, sản phẩm thu được có tính ổn định trong quá trình tồn trữ
- Tạo tủa bằng thay đổi pH
- Tạo tủa bằng cách làm giảm lực ion của dung dịch
- Tạo tủa bằng cách làm tăng lực ion của dung dịch
- Tạo kết tủa bằng dung môi hữu cơ
- Tạo kết tủa bằng cách làm biến tính
- Tạo kết tủa miễn dịch

# Phương pháp LÀM KHÔ MẪU

- Phương pháp sấy khô chân không
- Phương pháp cô quay chân không
- Phương pháp đông khô chân không
- Phương pháp sấy phun

# Phương pháp sắc ký

- **Sắc ký gel**
- **Sắc ký trao đổi ion**

# Phương pháp ĐIỆN DI

- Điện di trong điều kiện bị biến tính
- Điện di trong điều kiện tự nhiên
- Điện di hội tụ
- Điện di miễn dịch

# Phương pháp tinh chế

- **Tìm các kỹ thuật dựa vào đặc tính : tiềm năng, độ phân giải, hiệu suất sản phẩm thu được và kinh phí thực hiện sao cho chỉ cần qua một vài bước là đạt kết quả mong muốn ( thu lượng tối đa, đạt độ tinh khiết cao nhất, giá thành hợp lý nhất)**



# Một số quy trình cụ thể cô lập các hợp chất đại phân tử sinh học

## Chiết tách và tinh chế enzyme glucoamylase ở VN

- Glucoamylase được thu nhận từ chủng *Aspergillus usami* VKH-114 nuôi cấy trên bề mặt môi trường với thành phần chủ yếu là cám và trấu ( 48h )
- Dùng dd nước muối NaCl 0,5% để chiết glucoamylase ra khỏi môi trường nuôi cấy với điều kiện tối ưu  
pH = 5,0 -6,0 và  $t^0 = 55 - 60^0 \text{ C}$

- Rót ethanol lạnh ( 50% V) vào dd nói trên, các protein tạp khác sẽ tủa. Lọc bỏ tủa bằng ly tâm 10.000 vòng / phút ở 4<sup>0</sup> C trong 15phút.

Dung dịch còn lại sẽ được rót thêm ethanol ( 75%V) thì enzyme sẽ tủa.

Ly tâm để thu enzyme.

- Hòa tan enzyme vào dd đệm acetat 0,1M pH = 5,0 để thực hiện sắc ký trao đổi ion, giải ly cột bởi dung dịch NaCl với nồng độ NaCl tăng dần tuyến tính từ 0,1 – 1,0 M. Thu được 2 đỉnh có hoạt tính glucoamylase, đặt tên là A và B.

- Hai đỉnh này được tách riêng và tiếp tục tinh chế bởi sắc ký lọc gel Sephadex G-100. Từ A thu được  $A_1$  và  $A_2$  . Từ B thu được  $B_1$  ,  $B_2$  và  $B_3$  .
- Sử dụng kỹ thuật điện di SDS-PAGE biết được trọng lượng phân tử của các đại phân tử thu nhận được là :  $A_1 = 70.700$ ,  
 $A_2 = 67.000$ ,  $B_1 = 66.000$ ,  
 $B_2 = 57.300$  và  $B_3 = 43.000$
- Sử dụng máy phân tích Aa tự động cho biết các ĐPT nói trên đều có chứa các Aa: Lys, His, Arg, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Iso, Leu, Tyr và Phe.

# **Độ tinh sạch của glucoamylase sau khi qua nhiều giai đoạn xử lý**

<b>Giai đoạn xử lý</b>	<b>Hoạt tính đặc hiệu (U/ mg protein)</b>	<b>Mức độ tinh sạch (%)</b>
Dung dịch enzyme thô	52,0	1,0
Tủa bởi ethanol	348,8	6,7
Sắc ký DAEA, phân đoạn A	515,8	9,9
Sắc ký DAEA, phân đoạn B	1493,1	28,6
Sắc ký lọc gel, phân đoạn A <sub>2</sub>	1676,1	32,1
Sắc ký lọc gel, phân đoạn B <sub>2</sub>	1941,5	32,2