

## Lời nói đầu

Trong những năm gần đây công nghệ sinh học phát triển như vũ bão, hàng loạt công nghệ mới ra đời như genomics, proteomics... và đã được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm v.v... đặc biệt là lĩnh vực y-dược học.

Giáo trình công nghệ protein được biên soạn trên cơ sở cập nhật những kiến thức hiện đại, những thành tựu mới nhất về proteomics trong nghiên cứu cơ bản và ứng dụng thực tiễn trên thế giới và ở Việt nam, nhằm phục vụ cho việc giảng dạy và học tập cho các ngành sinh học và cũng là tài liệu tham khảo của những ngành học liên quan khác.

Giáo trình biên soạn có 6 chương với hai nội dung chính:

- Những kiến thức cơ bản về protein như thành phần, cấu trúc, tính chất hóa - lý, các phương pháp tách, tinh sạch và xác định protein.
- Công nghệ sản xuất một số loại protein.

Giáo trình biên soạn được phân công cụ thể như sau:

Chương 1. Mở đầu	Cao Đăng Nguyên
Chương 2. Amino acid - đơn vị cấu tạo protein	Cao Đăng Nguyên
Chương 3. Peptide - cấu trúc và chức năng	Cao Đăng Nguyên
Chương 4. Cấu trúc và tính chất lý-hóa của protein	Cao Đăng Nguyên
Chương 5. Các phương pháp chiết rút, tinh sạch và xác định protein	Đỗ Quý Hai
Chương 6. Công nghệ sản xuất một số protein	Cao Đăng Nguyên

Giáo trình được xuất bản lần đầu tiên chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Các tác giả xin chân thành cảm ơn và rất mong được sự góp ý của các đồng nghiệp và bạn đọc để khi tái bản sẽ được hoàn thiện hơn

## Các tác giả

# Chương 1

## Mở đầu

### I. Khái quát chung về protein

#### 1.1. Những đặc trưng chung của nhóm chất protein

Protein được phát hiện lần đầu tiên ở thế kỷ XVIII (1745 bởi Beccari); mới đầu được gọi là albumin (lòng trắng trứng). Mãi đến năm 1838, Mulder lần đầu tiên đưa ra thuật ngữ protein (xuất phát từ chữ Hy lạp proteos nghĩa là “đầu tiên”, “quan trọng nhất”. Biết được tầm quan trọng và nhu cầu xã hội về protein, đến nay nhiều công trình nghiên cứu và sản xuất hợp chất này đã được công bố, đã đem lại nhiều ý nghĩa hết sức to lớn phục vụ cho nhân loại. Vì vậy, nhiều nhà khoa học trên thế giới đã vinh dự nhận được giải thưởng Nobel về các lĩnh vực nghiên cứu liên quan đến protein.

Như đã biết protein là hợp chất hữu cơ có ý nghĩa quan trọng bậc nhất trong cơ thể sống. Về mặt số lượng, nó chiếm không dưới 50% trọng lượng khô của tế bào. Về thành phần cấu trúc, protein được tạo thành chủ yếu từ các amino acid qua liên kết peptide. Cho đến nay người ta đã thu được nhiều loại protein ở dạng sạch cao có thể kết tinh được và đã xác định được thành phần các nguyên tố hóa học, thông thường trong cấu trúc của chúng gồm bốn nguyên tố chính là C H O N với tỷ lệ C ≈ 50%, H ≈ 7%, O ≈ 23% và N ≈ 16%. Đặc biệt tỷ lệ N trong protein khá ổn định. Nhờ tính chất này để định lượng protein theo phương pháp Kjeldahl, người ta tính lượng N rồi nhân với hệ số 6,25. Ngoài ra trong protein còn gặp một số nguyên tố khác như S ≈ 0-3% và P, Fe, Zn, Cu...

Khối lượng phân tử, ký hiệu là Mr (được tính bằng Dalton)\* của các loại protein thay đổi trong những giới hạn rất rộng, thông thường từ hàng trăm cho đến hàng triệu. Ví dụ: insulin có khối lượng phân tử bằng 5.733, glutamat-dehydrogenase trong gan bò có khối lượng phân tử bằng 1.000.000 (bảng 1.1).

#### 1.2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của nhóm chất protein

Từ lâu, đã biết rằng protein tham gia mọi hoạt động sống trong cơ thể sinh vật, từ việc tham gia xây dựng tế bào, mô, đến tham gia hoạt động xúc tác và nhiều chức năng khác v.v... Ngày nay, khi hiểu rõ vai trò to lớn của protein đối với cơ thể sống, người ta càng thấy rõ tính chất duy vật và ý nghĩa của định nghĩa thiên tài của Anghen F.: “sống là phương thức tồn tại của những thể protein”. Với sự phát triển của khoa học, vai trò và ý

nghĩa của protein đối với sự sống càng được khẳng định. Cùng với acid nucleic, protein là cơ sở vật chất của sự sống.

## II. Phân loại protein

Protein gồm hàng trăm, hàng ngàn amino acid nối với nhau bằng liên kết peptide tạo nên một hay nhiều chuỗi polypeptide có cấu trúc rất phức tạp.

Căn cứ sự có mặt hay vắng mặt của một số thành phần có bản chất không phải protein mà người ta chia protein thành hai nhóm lớn:

\*1 Dalton = 1/1000 Kilodalton và được kí hiệu là kDa

**Bảng 1.1 Khối lượng (Mr) và cấu trúc phân tử của một số protein**

protein	Khối lượng (Dalton)	số gốc amino acid	số chuỗi polypeptide
Glucagon	3482	29	1
Insulin	5733	51	2
Ribonuclease (tụy bò)	12.640	124	1
Lysozyme (lòng trắng trứng)	13.930	129	1
Myoglobin (tim ngựa)	16.890	153	1
Chymotripsin (tụy bò)	22.600	241	3
Hemoglobin (người)	64.500	574	4
Albumin (huyết thanh người)	68.500	550	1
Hexokinase (men bia)	96.000	800	4
Tryptophan-synthetase (E.coli)	117.000	975	4
$\gamma$ -globulin (ngựa)	149.000	1.250	4
Glycogen-phosphorylase (cơ thở)	495.000	4.100	4
Glutamate-dehydrogenase (bò)	1.000.000	8.300	40
Synthetase của acid béo (men bia)	2.300.000	20.000	21
Virus khám thuốc lá	40.000.000	336.500	2.130

### 2.1. Protein đơn giản

Protein đơn giản là những phân tử mà thành phần cấu tạo của nó gồm hoàn toàn amino acid. Thí dụ một số enzyme của tụy bò như

ribonuclease gồm hoàn toàn amino acid nối với nhau thành một chuỗi polypeptide duy nhất (có 124 gốc amino acid, khối lượng phân tử 12.640), chymotripsin gồm hoàn toàn amino acid nối với nhau thành chuỗi polypeptide (có 241 gốc amino acid, khối lượng phân tử 22.600)v.v...Dựa theo khả năng hòa tan trong nước hoặc trong dung dịch đậm muối, kiềm hoặc dung môi hữu cơ người ta có thể chia các protein đơn giản ra một số nhóm nhỏ như:

-Albumin: tan trong nước, bị kết tủa ở nồng độ muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  khá cao (70-100%).

-Globulin: không tan hoặc tan ít trong nước, tan trong dung dịch muối loãng của một số muối trung tính như NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ..., và bị kết tủa ở nồng độ muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bán bão hoà.

-Prolamin: không tan trong nước hoặc dung dịch muối loãng, tan trong ethanol, isopropanol 70-80%.

-Glutein: chỉ tan trong dung dịch kiềm hoặc acid loãng.

-Histon: là protein có tính kiềm dễ tan trong nước, không tan trong dung dịch amonic acid loãng.

## 2.2. Protein phức tạp

Protein phức tạp là những protein mà thành phần phân tử của nó ngoài các α-amino acid như protein đơn giản còn có thêm thành phần khác có bản chất không phải là protein còn gọi là nhóm thêm (nhóm ngoại). Tuỳ thuộc vào bản chất của nhóm ngoại, người ta chia các protein phức tạp ra các nhóm nhỏ và thường gọi tên các protein đó theo bản chất nhóm ngoại:

-Lipoprotein: nhóm ngoại là lipide.

-Nucleoprotein: nhóm ngoại là acid nucleic.

-Glycoprotein: nhóm ngoại là carbohydrate và dẫn xuất của nó.

-Phosphoprotein: nhóm ngoại là acid phosphoric.

-Cromoprotein: nhóm ngoại là hợp chất có màu. Tuỳ theo tính chất của từng nhóm ngoại mà có những màu sắc khác nhau như đỏ (ở hemoglobin), vàng (ở flavoprotein)...

## III. Chức năng sinh học của protein

### 3.1. Xúc tác và enzyme

#### 3.1.1. Quan điểm về xúc tác enzyme

Hầu hết tất cả các phản ứng xảy ra trong cơ thể đều do các protein đặc biệt đóng vai trò xúc tác, những protein đó được gọi là các enzyme.

Mặc dù gần đây người ta đã phát hiện được một loại RNA có khả năng xúc tác quá trình chuyển hóa tiền RNA thông tin (pre-mRNA) thành RNA thông tin (mRNA), nghĩa là enzyme không nhất thiết phải là protein. Những enzyme xúc tác sinh học có bản chất là acid nucleic được gọi là ribozyme. Nhưng định nghĩa có tính chất kinh điển: enzyme là những protein có khả năng xúc tác đặc hiệu cho các phản ứng hóa học, là chất xúc tác sinh học vẫn có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Hiện nay người ta biết được khoảng 3.500 enzyme khác nhau, nhiều enzyme đã được tinh sạch, kết tinh và nghiên cứu cấu trúc.

3.1.2. Những khác biệt về đặc tính xúc tác, giữa xúc tác vô cơ và xúc tác enzyme.

Enzyme là chất xúc tác sinh học, ngoài khả năng xúc tác giống như chất xúc tác vô cơ bình thường nó còn thể hiện một số tính chất sau đây:

a) Hiệu suất xúc tác rất lớn.

Sự chuyển hoá cơ chất khi sử dụng emzyme xúc tác lớn hơn nhiều so với chất xúc tác vô cơ thông thường. Ví dụ: 1mol  $\text{Fe}^{3+}$  chỉ xúc tác phân ly được  $10^{-6}$  mol  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{phút}$ . Trong khi đó một phân tử catalase có một nguyên tử Fe xúc tác phân ly  $5 \cdot 10^6$  mol  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{phút}$ ; 1 gam pepsin trong 2 giờ thuỷ phân được 5 kg protein trứng luộc ở nhiệt độ bình thường. Tương tự 1gam phân tử  $\beta$ -amilase sau 1 giây có thể phân giải 4.000 liên kết glucoside trong phân tử tinh bột, cao hơn nhiều so với xúc tác bằng chất vô cơ.

b) Tính đặc hiệu cao.

Tính đặc hiệu cao là một trong những khác biệt chủ yếu giữa xúc tác bằng enzyme và xúc tác bằng các chất vô cơ khác. Mỗi enzyme chỉ xúc tác cho sự chuyển hoá một hay một số chất nhất định, theo một kiểu phản ứng nhất định. Dựa vào sự tác dụng có tính chọn lọc, người ta có thể chia ra một số kiểu đặc hiệu sau:

- Đặc hiệu kiểu phản ứng. Đặc hiệu này thể hiện ở chỗ mỗi enzyme chỉ xúc tác cho một trong các kiểu phản ứng chuyển hoá một chất nhất định. Ví dụ: phản ứng oxy hoá khử, chuyển vị, thuỷ phân, v.v...

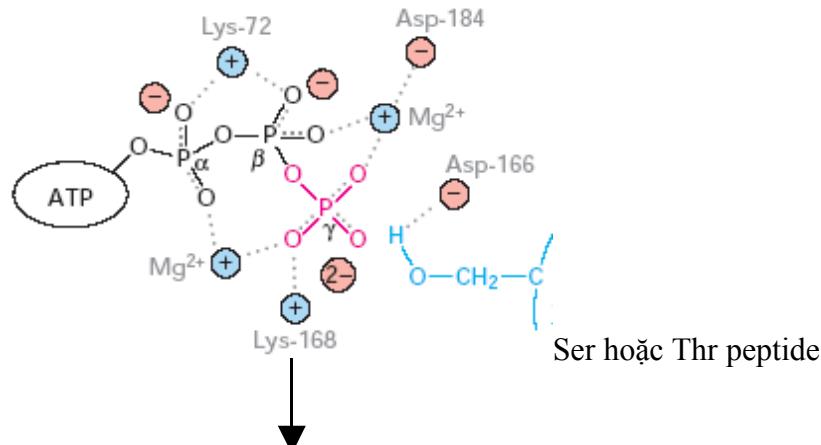
- Đặc hiệu cơ chất. Là khả năng kết hợp của cơ chất vào trung tâm hoạt động của enzyme và bị chuyển hoá dưới tác động của chúng. Dựa vào mức độ đặc hiệu người ta lại chia ra một số kiểu như: đặc hiệu tuyệt đối, là enzyme chỉ tác dụng trên một cơ chất duy nhất; đặc hiệu tương đối, là enzyme có khả năng tác dụng lên một kiểu liên kết hoá học nhất định của phân tử cơ chất mà không phụ thuộc vào cấu tạo của các phân tử tham gia tạo thành mối liên kết đó; đặc hiệu nhóm, là enzyme có khả năng tác

dụng lên một kiểu liên kết hoá học nhất định với điều kiện một trong hai phần tham gia tạo thành liên kết phải có cấu tạo xác định.

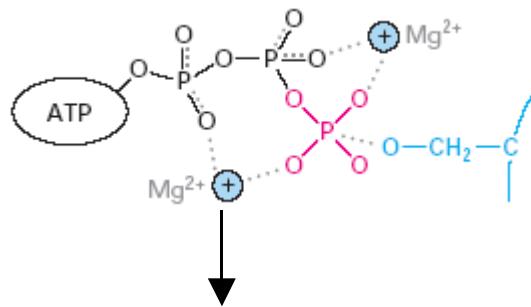
Hoạt tính của enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nồng độ enzyme, nồng độ cơ chất, nhiệt độ và ion kim loại v.v...

### 3.1.3. Cơ chế xúc tác của một vài enzyme.

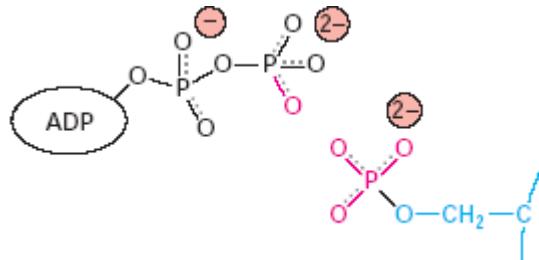
#### Giai đoạn đầu tiên



#### Giai đoạn trung gian



#### Giai đoạn cuối cùng



Hình 1.1 Cơ chế chuyển nhóm phosphate của protein kinase A

Hiện nay người ta đã biết rõ cơ chế hoạt động của nhiều enzyme như carboxypeptidase, chymotripsin v.v..., một enzyme cũng được nghiên cứu khá kỹ thuộc nhóm phosphotransferase xúc tác quá trình chuyển vị nhóm phosphate đó là protein kinase A (hình 1.1)

### 3.1.4. Sự phân bố enzyme trong tế bào.

Trong cơ thể enzyme có mặt ở mọi mô, mọi tế bào. Nhưng tùy theo chức năng của mô mà các tế bào trong mô thường có những hệ thống enzyme riêng biệt. Sự khác nhau đó không chỉ ở giữa các loại tế bào mà ngay trong một tế bào cũng tùy theo chức năng của từng bào quan (organell) riêng biệt để có những hệ thống enzyme đặc hiệu. Sự sắp xếp các enzyme một cách hợp lý trong tế bào đã tạo ra sự phối hợp nhịp nhàng trong hệ thống phản ứng dây chuyền liên tục cho hoạt động sống của cơ thể:

- Trong nhân tế bào có các enzyme như ATP-ase, nucleosidase, nicotinic-mononucleotide adenylyltransferase, 5'-nucleotidase.
- Trong ty lạp thể có chứa hầu hết các enzyme liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng như hệ enzyme của chuỗi hô hấp tế bào và quá trình phosphoryl hoá tạo ATP, các enzyme của chu trình Krebs,v.v...
- Trong lysosome có chứa nhiều enzyme thuỷ phân (hydrolase).
- Trong ribosome có chứa các enzyme cho quá trình tổng hợp protein.
- Trong bào tương chứa nhiều loại enzyme, đặc biệt có tất cả các enzyme của quá trình đường phân.
- Trên màng tế bào cũng như màng của nhiều bào quan có những loại enzyme giúp cho sự vận chuyển một số chất qua màng và một số hoạt động khác của màng.

## 3.2. Isozyme

### 3.2.1. Đặc tính phân tử

Isozyme là các dạng phân tử khác nhau của cùng một enzyme, xúc tác cho một phản ứng sinh hóa. Mặc dù cùng xúc tác cho cùng một loại phản ứng sinh hóa, nhưng do sự tồn tại các dạng phân tử khác nhau nên có một số tính chất lý, hóa và miễn dịch khác nhau. Ví dụ: lactatdehydrogenase (LDH) là enzyme khử hydrogen thuận nghịch giữa lactate và pyruvate có khối lượng phân tử 130.-140.KDa, cấu trúc gồm 4 tiểu đơn vị (subunit), các tiểu đơn vị này được dịch mã từ 2 gene khác nhau được ký hiệu là H và M (từ chữ tiếng Anh H- Heart và M-Muscle).

Hai loại chuỗi polypeptide đã tạo nên 5 dạng phân tử khác nhau là:

- LDH<sub>1</sub>: HHHH
- LDH<sub>2</sub>: HHHM
- LDH<sub>3</sub>: HHMM
- LDH<sub>4</sub>: HMMM
- LDH<sub>5</sub>: MMMM

Trong điện di theo chiều từ âm sang dương thì LDH<sub>1</sub> chạy nhanh nhất rồi đến LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> và LDH<sub>5</sub> chạy chậm nhất.

### 3.2.2. Vai trò chức năng của các isozyme.

Các kết quả nghiên cứu thu được đã chỉ ra rằng, tỷ lệ các dạng isozyme có thể thay đổi tùy theo tuổi tác, trạng thái sinh lý và bệnh lý. Sự tồn tại của nhiều dạng phân tử khác nhau của cùng một enzyme là một hiện tượng sinh học rất quan trọng cả về mặt lý luận và thực tiễn. Chẳng hạn sự phân bố khác nhau về LDH trong cơ thể của các loài có xương sống, loại chuỗi H chủ yếu tìm thấy ở cơ tim và loại M chủ yếu tìm thấy ở cơ xương. Bởi vì loại chuỗi H thường bị ức chế bởi pyruvat với nồng độ quá thừa. Nhưng acid pyruvic trong mô tim được oxy hoá hiếu khí một cách đều đặn trong ty thể để cung cấp năng lượng cho mô này, và thông thường không có sự ứ đọng của acid pyruvic. Trái lại tuy mô cơ xương có rất nhiều LDH dạng M vì mô này có nhiều hoạt động bất thường gây nên những ứ đọng pyruvat nhất thời, nhưng dạng M lại không bị ức chế bởi acid pyruvic.

### 3.3. Các enzyme di lập thể (allosteric enzyme) và phức hệ enzyme (multienzyme).

Trong cơ thể sống còn gặp những enzyme ngoài trung tâm hoạt động xúc tác còn có một loại trung tâm khác làm nhiệm vụ điều chỉnh hoạt tính của enzyme còn gọi là enzyme di lập thể. Tuy trung tâm điều chỉnh và trung tâm xúc tác có tác dụng hỗ trợ nhau, nhưng là hai loại cấu trúc khác biệt nhau. Trong nhiều trường hợp có thể “khoá” trung tâm di lập thể mà vẫn giữ được hoạt động xúc tác của trung tâm hoạt động. Các enzyme này thường được cấu tạo từ các đơn vị nhỏ kết hợp với nhau bằng các liên kết yếu, nên rất mềm dẻo có thể tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau và có thể biến đổi thuận nghịch từ trạng thái này sang trạng thái khác một cách dễ dàng. Một trong những loại enzyme này được nghiên cứu kỹ nhất là aspartate-transcarbamylase (ATC-ase) xúc tác quá trình tổng hợp carbamylaspartate. Enzyme này gồm hai đơn vị nhỏ xúc tác và 3-4 đơn vị nhỏ điều hoà.

Ngoài enzyme di lập thê còn gấp phức hệ đa enzyme (multienzyme). Đó là những phức hợp gồm nhiều enzyme có liên quan đến nhau trong một quá trình chuyển hoá nhất định. Ví dụ phức hợp enzyme trong quá trình tạo acetyl-CoA từ acid puruvic được gọi là phức hệ pyruvatedehydrogenase. Phức hợp này gồm ba loại enzyme là pyruvate dehydrogenase, dihydrolipoyl transacetylase và dihydrolipoyl -dehydrogenase.

### *3.4. Những quan điểm y học về protein*

#### 3.4.1. Protein là những phần chức năng của cơ thể.

Ngoài vai trò là thành phần chính trong cấu trúc của tế bào và mô, protein còn có nhiều chức năng phong phú khác quyết định những đặc điểm cơ bản của sự sống như sự truyền đạt thông tin di truyền, sự chuyển hoá các chất đó là các enzyme, các kháng thể chống lại bệnh tật, các hormon dẫn truyền các tín hiệu trong tế bào v.v... đều có bản chất là các protein.

#### 3.4.2. Hình thành chức năng mới trên cơ sở cấu trúc protein.

Sự phát triển của sinh học phân tử dựa trên lý thuyết trung tâm “DNA → RNA → Protein”. Như vậy, sự biến đổi DNA sẽ dẫn đến sự biến đổi cấu trúc của phân tử protein và do đó chức năng sinh học của nó sẽ bị biến đổi kéo theo những thay đổi có liên quan đến toàn bộ cơ thể. Trong quá trình tiến hoá của sinh vật sự hình thành và thích nghi một chức năng mới diễn ra ở một giai đoạn lịch sử lâu dài. Sự xuất hiện một protein mới biến dạng (mất hoạt tính hoặc đột biến cấu trúc) thường luôn đi kèm bệnh tật.

#### 3.4.3. Sự xuất hiện các protein bệnh lý.

Y học là ngành khoa học về sự sống, ngày nay với tiến bộ của khoa học, những hiểu biết về bệnh lý ở mức độ phân tử đã vượt ra khỏi giới hạn của giải phẫu tế bào hoặc cơ quan. Sinh học phân tử ra đời đã tạo ra cuộc cách mạng trong các quan niệm về bệnh. Từ đó, sự phát triển của bệnh học phân tử luôn luôn đi kèm với sinh học phân tử.

Sự biến đổi cấu trúc của một protein hay sự xuất hiện các enzyme có cấu trúc bất thường đều do yếu tố di truyền gây nên. Dựa theo các biểu hiện di truyền người ta chia các protein bệnh lý ra làm hai loại lớn:

a) Những biến đổi về số lượng của protein: Đó là sự thay đổi do sự tăng hoặc giảm protein nào đó, thậm chí xuất hiện những protein mà tế bào bình thường không tổng hợp một cách thường xuyên. Những protein này vẫn có cấu trúc bình thường và như vậy không có những biến đổi của gene cấu trúc. Những lệch lạc này do rối loạn quá trình điều hoà sinh tổng

hợp protein. Do protein vẫn có cấu trúc bình thường mà chỉ thay đổi về số lượng nên chúng vẫn có chức năng bình thường và chỉ thay đổi về mức độ hoạt động. Trong trường hợp là protein enzyme thì những lệch lạc về số lượng enzyme sẽ dẫn đến những rối loạn dây chuyền chuyển hoá.

b) Những biến đổi về chất lượng protein: Đó là những rối loạn về cấu trúc protein do gene bi biến đổi, dẫn đến cấu trúc protein thay đổi kéo theo sự thay đổi chức năng sinh học của protein đó. Ví dụ, sự biến đổi cấu trúc của hemoglobin (Hb) là protein có chức năng vận chuyển oxygen trong máu dẫn đến bệnh thiếu máu, hay như bệnh thiếu máu do hồng cầu hình lưỡi liềm...

#### 3.4.4. Cấu trúc và chức năng của protein miễn dịch.

Tham gia vào hệ thống miễn dịch có nhiều cơ quan, nhiều loại tế bào và đặc biệt nhiều loại protein thực hiện các chức năng riêng biệt tạo nên hiệu quả miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu. Các protein miễn được nhắc đến nhiều hơn cả là các kháng thể, bô thể và các cytokine.

##### a) Các kháng thể (antibody).

Tất cả các phân tử kháng thể đã được chứng minh là các globulin có chức năng miễn dịch (viết tắt là Ig: Immunoglobulin) và có bản chất là glycoprotein. Các kháng thể được chia thành 5 lớp. Tuỳ theo cấu trúc và chức năng miễn dịch là IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Cấu trúc của phân tử kháng thể được hình thành từ hai loại chuỗi polypeptide là chuỗi nặng (ký hiệu: H=Heavy chain) có khối lượng phân tử từ 53-59 kDa và chuỗi nhẹ (ký hiệu:L=Light chain) có khối lượng phân tử 22-26 kDa. Cả bốn chuỗi được gắn với nhau bằng cầu disulfid (S-S). Trung tâm hoạt động là phần liên kết với kháng nguyên (hình 1.2) nằm ở vùng tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có cấu trúc chỉ khoảng 8-10 amino acid.

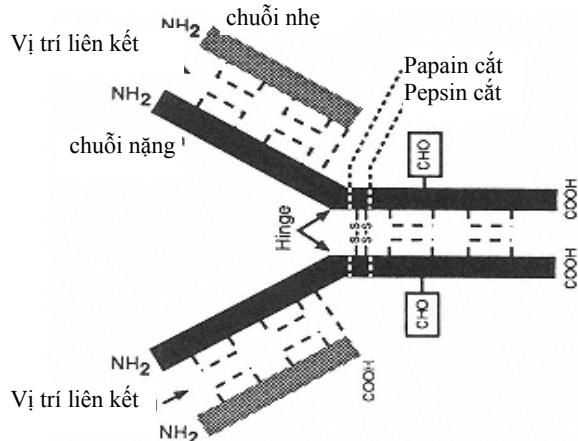
Các phân tử Ig có đặc tính hoạt động miễn dịch theo hai chức năng:

- Có khả năng liên kết với kháng nguyên ít nhất ở hai vị trí tiếp nhận đối với kháng nguyên nhờ sự biến đổi kỳ diệu của phần tận cùng NH<sub>2</sub> trên phân tử kháng thể.

- Phần tận cùng COOH của phân tử kháng thể có khả năng thực hiện một số lớn các hoạt động sinh học dưới ảnh hưởng của sự liên kết với thụ thể trên bề mặt của tế bào. Tất cả các kháng thể đều có cùng một cấu trúc phân tử nhưng khác nhau ở mức độ của vùng liên kết với kháng nguyên.

Nhìn chung phân tử kháng thể được chia làm hai phần: phần Fab là phần liên kết với kháng nguyên, phần Fc là phần dễ kết tinh phản ứng với các tế bào của hệ thống miễn dịch qua thụ thể của các tế bào. Dùng

enzyme papain hay pepsin có thể cắt kháng thể thành hai mảnh Fab và Fc, hoặc F(ab')<sub>2</sub> tương ứng.



**Hình 1.2 Cấu trúc chung của phân tử kháng thể (Ig)**

b) Bổ thể (complement).

Là những protein huyết tương phản ứng với nhau nhằm tấn công các dạng tác nhân gây bệnh. Hệ thống bổ thể bao gồm khoảng 40 protein có chức năng đáp ứng miễn dịch, chống vi sinh vật và đáp ứng viêm. Về chức năng, các kháng thể tương tác đặc hiệu với tác nhân truyền nhiễm bệnh, còn hệ thống bổ thể được cố định lên tất cả các kháng thể để thực hiện chức năng miễn dịch. Các thành phần của bổ thể tương tác giữa chúng với nhau và các yếu tố khác của hệ thống miễn dịch.

c) Các cytokine.

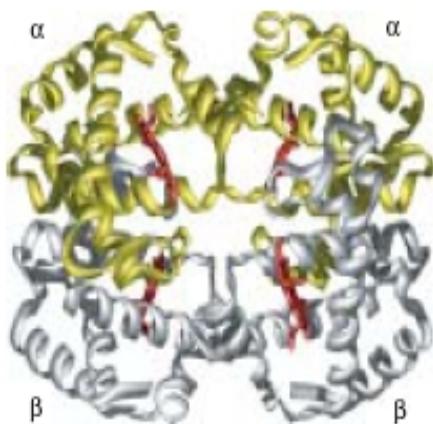
Là toàn bộ các phân tử được tiết ra bởi các tế bào của hệ thống miễn dịch, tham gia vào hoạt động tín hiệu giữa các tế bào trong hoạt động đáp ứng miễn dịch. Tất cả các cytokine đều có bản chất protein hay glycoprotein và được phân loại như sau:

- Các interferons (IFN): có các dạng  $\alpha$ -IFN,  $\beta$ -IFN và  $\gamma$ -IFN, có chức năng ngăn ngừa của một số virus gây bệnh.
- Các interleukin (IL): có các dạng từ IL1 đến IL 13, chúng có nhiều chức năng, nhưng chủ yếu là kiểm tra sự biệt hoá và sinh sản tế bào.
- Các yếu tố kích thích quần lạc (CSF): có chức năng kiểm tra sự phân chia và sinh sản của các tế bào nguồn và các tế bào máu sơ khai.

- Các chất dẫn truyền sinh học (mediator): là những protein của giai đoạn đáp ứng miễn dịch cấp tính.

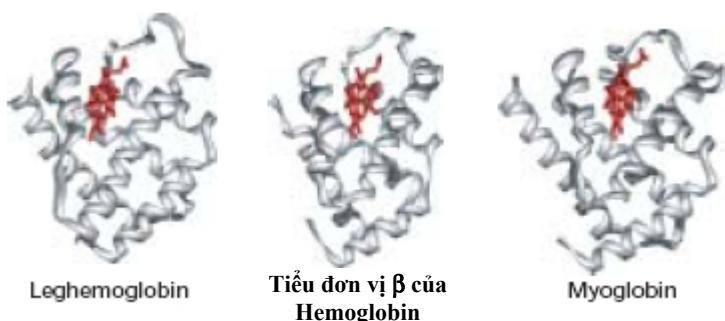
### 3.4.5. Cấu trúc và chức năng của protein vận chuyển.

Trong cơ thể có những protein làm nhiệm vụ vận chuyển như hemoglobin, mioglobin, hemocyanin vận chuyển O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> và H<sup>+</sup> đi khắp các mô, các cơ quan trong cơ thể. Ngoài ra còn có nhiều protein khác như lipoprotein vận chuyển lipid, ceruloplasmin vận chuyển đồng (Cu) trong máu v.v... Một trong những protein làm nhiệm vụ vận chuyển được nhắc đến nhiều nhất đó là hemoglobin. Phân tử được cấu tạo từ bốn tiểu đơn vị (subunit), hai tiểu đơn vị α và hai tiểu đơn vị β.



Hình 1.3

Cấu trúc của phân tử hemoglobin



Hình 1.4 So sánh cấu trúc tiểu đơn vị β của hemoglobin với leghemoglobin và myoglobin.

Mỗi tiểu đơn vị nối với một heme bằng liên kết không phải cộng hoá trị. Khi so sánh với protein cùng chức năng như myoglobin cơ và leghemoglobin thực vật là những protein có cấu trúc chỉ một tiểu đơn vị (monomer) thấy rằng các tiểu đơn vị cấu trúc khá giống nhau (hình: 1.3, 1.4 )

#### 3.4.6. Cấu trúc chức năng và vai trò của lectin.

Lectin là những protein hay glycoprotein không phải nguồn gốc miễn dịch, lectin có khả năng ngưng kết với nhiều loại tế bào, cũng như nhiều loại đường hoặc các hợp chất chứa đường có tính chất chọn lọc. Hầu hết lectin có cấu trúc bậc 4, với khối lượng phân tử giao động trong phạm vi khá rộng từ hàng ngàn cho đến hàng trăm ngàn Dalton. Ví dụ: lectin từ rễ cây *Urtica dioica* (họ gai *Urticaceae*) có Mr=8,5 KDa trong khi đó loài sam biển châu Á (*Tachypleus tridentatus*) có Mr=700.KDa.

Về chức năng, người ta thấy rằng mặc dù lectin không phải là kháng thể chống lại tác nhân gây bệnh nhưng chúng có vai trò bảo vệ cơ thể nhờ tương tác với màng tế bào và gây ngưng kết tế bào của chúng. Họ đã khẳng định rằng lectin có khả năng gắn các tế bào vi khuẩn và kháng nguyên lạ với các đại thực bào, do vậy mà vi khuẩn và kháng nguyên lạ bị đào thải ra khỏi cơ thể. Ngoài ra có những lectin còn có khả năng kích thích sự phân chia và biệt hoá tế bào. Đồng thời người ta cũng phát hiện được nhiều lectin có cả hoạt tính của enzyme, ví dụ lectin hoạt tính khá mạnh, được tách ra từ hạt đậu mung, có khối lượng phân tử khoảng 16.KDa có cả hoạt tính của enzyme  $\alpha$ -galactosidase.

#### 3.4.7. Những chức năng khác của protein.

Trong cơ thể ngoài các protein đảm nhận chức năng xúc tác như enzyme, chức năng vận chuyển như hemoglobin, mioglobin, lipoprotein, và chức năng bảo vệ như các kháng thể miễn dịch, các protein độc tố như enzyme nọc rắn, lectin v.v..., protein còn tham gia nhiều chức năng quan trọng khác như:

- Các protein làm nhiệm vụ kích thích điều hoà quá trình trao đổi chất như các hormon
- Các protein làm nhiệm vụ cấu trúc như vỏ virus, màng tế bào, collagen ở da, fibrolin ở tơ
- Các protein làm nhiệm vụ co rút như myosin, actin ở sợi cơ
- Các protein làm nhiệm vụ dự trữ như casein của sữa, ovalbumin của trứng, v.v...

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chân, Đỗ Đình Hò, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
- 2.Phạm Thị Trần Châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục
- 3.Phạm Thị Trần Châu, Lã Minh Châu, Lâm Chi, Nguyễn Lan Dũng, Đỗ Đình Hò, Lê Ngọc Tú. 1983. Những hiểu biết mới về enzym. Tập 8. NXB KH & KT Hà nội.
4. Đỗ Đình Hò, Đái Duy Ban, 1977. Sinh học phân tử và cuộc cách mạng trong sinh học, NXB KH& KT. Hà nội
5. Đỗ Ngọc Liên. 2004. Miễn dịch học cơ sở. NXB Đại học Quốc gia Hà nội (in lần thứ 2).
- 6.Fersht A.,1998, Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3<sup>rd</sup> Rev Edit.
- 7.Lehringer A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition. W.H Freeman, 2004
8. Liebler D.C., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
9. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5<sup>th</sup> ed.W.H Freeman.
10. Virella G.,1998. Introduction to medical immunology, Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong kong. 4<sup>th</sup>. ed.

## Chương 2

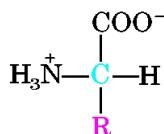
# Amino acid - Đơn vị cấu tạo Protein

## I. Thành phần tính chất lý- hoá của amino acid

### 1.1. Thành phần và cấu tạo của amino acid

Protein là polymer của các amino acid nối với nhau bằng các liên kết cộng hoá trị là liên kết peptide. Protein có thể bị thuỷ phân tạo thành các amino acid tự do bằng nhiều phương pháp khác nhau. Người ta đã xác định protein được cấu trúc từ 20 loại amino acid khác nhau.

Amino acid là chất hữu cơ mà phân tử chứa ít nhất một nhóm carboxyl ( $\text{COOH}$ ) và ít nhất một nhóm amino ( $\text{NH}_2$ ), trừ prolin chỉ có nhóm NH (thực chất là một acid imin). Trong phân tử amino acid đều có các nhóm  $\text{COOH}$  và  $\text{NH}_2$  gắn với carbon ở vị trí  $\alpha$ . Hầu hết các amino acid thu nhận được khi thuỷ phân protein đều ở dạng L- $\alpha$  amino acid. Như vậy các protein chỉ khác nhau ở mạch nhánh, hay còn gọi là chuỗi bên (thường được ký hiệu: R).



**Hình: 2.1** Công thức cấu tạo chung của các amino acid

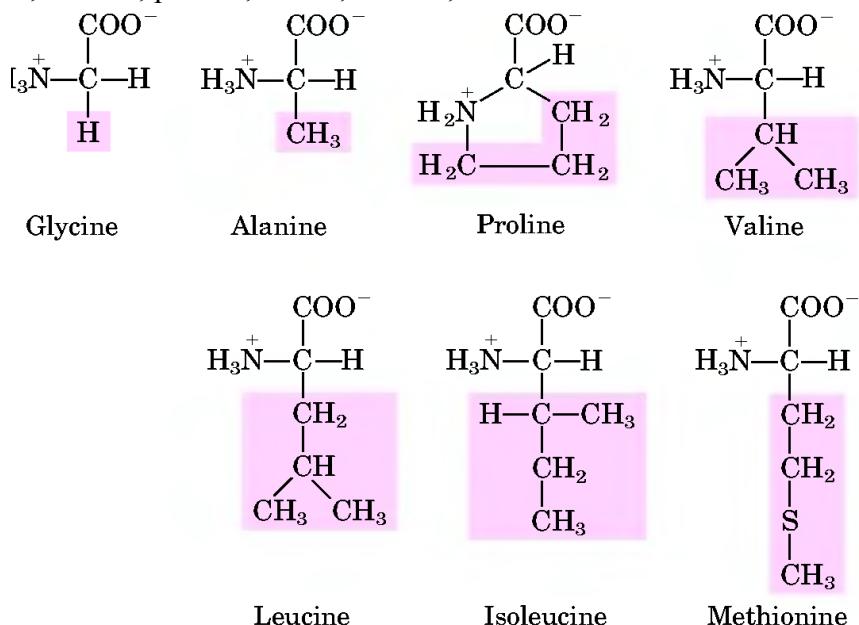
### 1.2. Phân loại amino acid

#### 1.2.1. Các quan điểm về phân loại amino acid.

Hiện nay có nhiều người phân loại amino acid theo nhiều kiểu khác nhau, mỗi kiểu sắp xếp đều có ý nghĩa và mục đích riêng. Tuy nhiên, họ đều dựa trên cấu tạo hóa học hoặc một số tính chất của gốc R. Ví dụ: có người chia các amino acid thành 2 nhóm chính là nhóm mạch thẳng và nhóm mạch vòng. Trong nhóm mạch thẳng lại tùy theo sự có mặt của số nhóm carboxyl hay số nhóm amino mà chia ra thành các nhóm nhỏ, nhóm amino acid trung tính (chứa một nhóm  $\text{COOH}$  và một nhóm  $\text{NH}_2$ ); nhóm amino acid có tính kiềm (chứa một nhóm  $\text{COOH}$  và hai nhóm  $\text{NH}_2$ ); nhóm amino acid có tính acid (chứa hai nhóm  $\text{COOH}$  và một nhóm  $\text{NH}_2$ ). Trong nhóm mạch vòng lại chia ra thành nhóm đồng vòng hay dị vòng v.v... Có người lại dựa vào tính phân cực của gốc R chia các amino acid thành 4 nhóm: nhóm không phân cực hoặc kỵ nước, nhóm phân cực nhưng không tích điện, nhóm tích điện dương và nhóm tích điện âm.

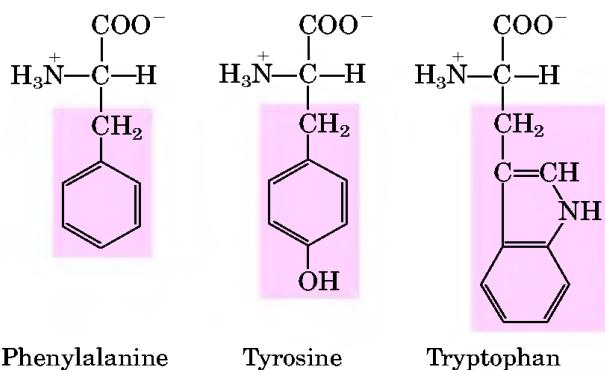
Ở đây xin được giới thiệu cách phân loại các amino acid một cách chung nhất. Theo cách này dựa vào gốc R các amino acid được chia làm 5 nhóm:

Nhóm I. Gồm 7 amino acid có R không phân cực, kỵ nước, đó là: glycine, alanine, proline, valine, leucine, isoleucine và methionine.



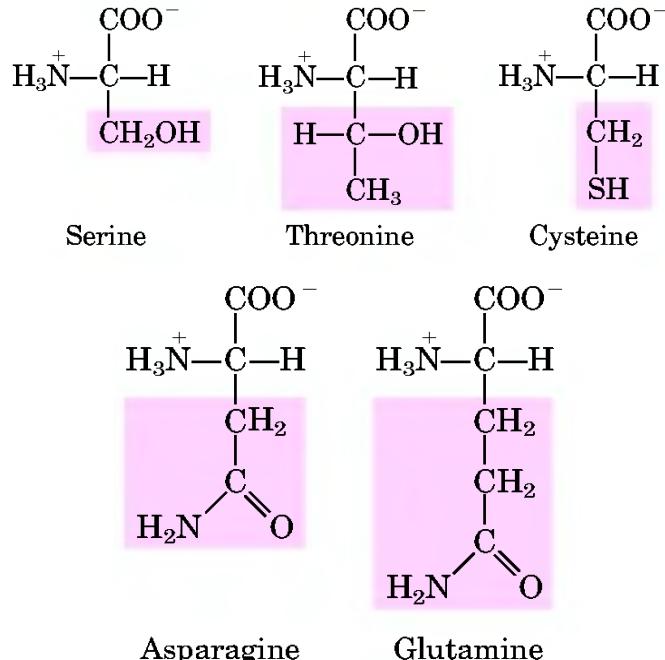
**Hình: 2.2** Công thức cấu tạo các amino acid nhóm I

Nhóm II Gồm 3 amino acid có gốc R chứa nhân thơm, đó là phenylalanine, tyrosine và tryptophan.



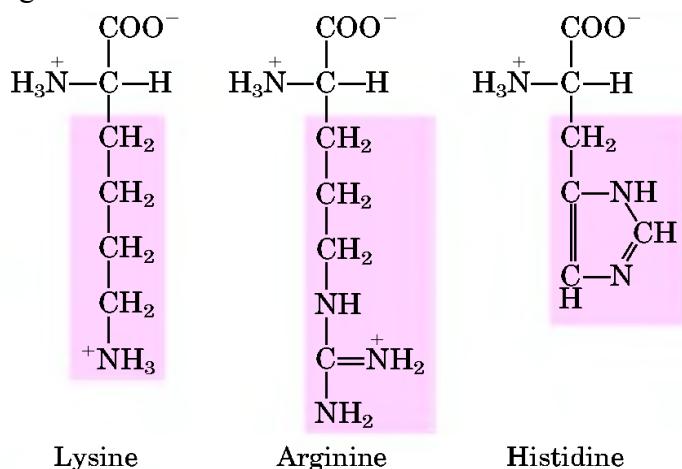
**Hình: 2.3** Công thức cấu tạo các amino acid nhóm II

Nhóm III. Gồm 5 amino acid có gốc R phân cực, không tích điện, đó là serine, threonine, cysteine, asparagine và glutamine.



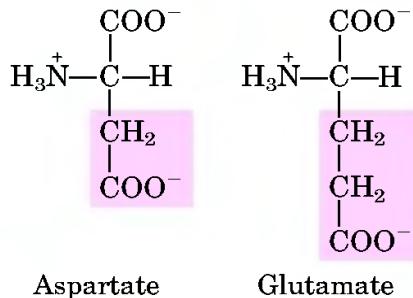
Hình: 2.4 Công thức cấu tạo các amino acid nhóm III

Nhóm IV. Gồm 3 amino acid có R tích điện dương, đó là lysine, histidine và arginine.



Hình: 2.5 Công thức cấu tạo các amino acid nhóm IV

Nhóm V. Gồm 2 amino acid có gốc R tích điện âm, đó là aspartate và glutamate.



**Hình: 2.6** Công thức cấu tạo các amino acid nhóm V

### 1.2.2. Các amino acid thường gặp.

Các amino acid thường gặp là những amino acid thường có mặt trong thành phần của các loại protein. Chúng có khoảng 20 loại và được thu nhận khi thuỷ phân protein. Các loại amino acid này có tên gọi, khối lượng phân tử và ký hiệu được trình bày trên bảng 2.1.

### 1.2.3. Các amino acid không thay thế, hay cần thiết.

Các amino acid được hình thành bằng nhiều con đường khác nhau. Như đã biết, trong phân tử protein có khoảng 20 loại amino acid, tuy nhiên trong cơ thể người và động vật không tổng hợp được tất cả các loại đó mà phải đưa từ ngoài vào qua thức ăn. Những amino acid phải đưa từ ngoài vào đó gọi là các amino acid không thay thế. Ngày nay người ta biết được có khoảng 8-10 loại amino acid không thay thế bao gồm: Met, Val, Leu, Ile, Thr, Phe Trp, Lys, Arg và His, ngày nay người ta còn xem Cys cũng là một amino acid không thay thế.

### 1.2.4. Các amino acid ít gặp.

Ngoài các amino acid thường gặp ở trên, trong phân tử protein đôi khi còn có một số amino acid khác, đó là những loại ít gặp. Các amino acid này là dẫn xuất của những amino acid thường gặp như: trong phân tử collagen có chứa 4-hydroxyproline là dẫn xuất của proline, 5-hydroxylysine là dẫn xuất của lysine v.v... Mặt khác, mặc dù không có trong cấu trúc protein, nhưng có hàng trăm loại amino acid khác chúng có thể tồn tại ở dạng tự do hoặc liên kết với hợp chất khác trong các mô và tế bào, chúng có thể là chất tiền thân hay là các sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hoá trong cơ thể.

**Bảng 2.1 Các amino acid thường gặp**

Tên amino acid	Tên amino acid gọi theo danh pháp hoá học	Tên viết tắt	Ký hiệu	Khối lượng (Mr)
Glycine	$\alpha$ -aminoacetic	Gly	G	75
Alanine	$\alpha$ -aminoprionic	Ala	A	89
Proline	$\alpha$ -pirolidincarboxylic	Pro	P	115
Valine	$\alpha$ -aminoiaovaleric	Val	V	117
Leucine	$\alpha$ -aminonoisocaproic	Leu	L	131
Isoleucine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -metylvaleric	Ile	I	131
Methionine	$\alpha$ -amino- $\gamma$ -metyliobutiric	Met	M	149
Phenylalanine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -phenylpropionic	Phe	F	165
Tyrosine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -hydrogengenxyphenylpropionic	Tyr	Y	181
Tryptophan	$\alpha$ -amino- $\beta$ -idolylpropionic	Trp	W	204
Serine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxypropionic	Ser	S	105
Threonine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -hydrogengenxybutiric	Thr	T	119
Cysteine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -tiopropionic	Cys	C	121
Asparagine	amid của aspartate	Asn	B	132
Glutamine	amid của glutamate	Gln	Q	146
Lysine	$\alpha, \epsilon$ diaminocaproic	Lys	K	146
Histidine	$\alpha$ -amino- $\beta$ -imidazolpropionic	His	H	155
Arginine	$\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidinvaleric	Arg	R	174
Aspartate	$\alpha$ -aminosuccinic	Asp	D	133
Glutamate	$\alpha$ -aminoglutarate	Glu	E	147

### 1.3. Màu sắc và mùi vị của amino acid

Các amino acid thường không màu, nhiều loại có vị ngọt kiểu đường như glycine, alanine, valine, serine histidine, triptophan; một số loại có vị đắng như isoleucine, arginine hoặc không có vị như leucine. Bột ngọt hay còn gọi là mì chính là muối của natri với acid glutamic (monosodium glutamate).

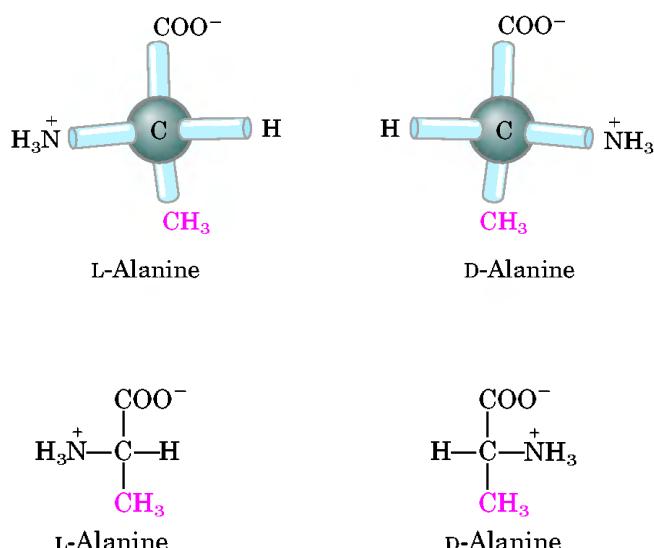
### 1.4. Tính tan của amino acid

Các amino acid thường dễ tan trong nước, các amino acid đều khó tan trong alcohol và ether (trừ proline và hydroxyproline), chúng cũng dễ hòa tan trong acid và kiềm loãng (trừ tyrosine).

### 1.5. Biểu hiện tính quang học của amino acid

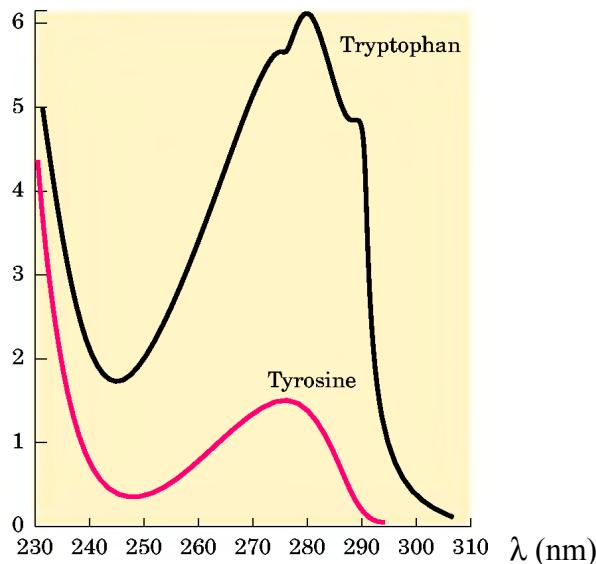
Các amino acid trong phân tử protein đều có ít nhất một carbon bất đối (trừ glycine) vì thế nó đều có biểu hiện hoạt tính quang học, nghĩa là có thể làm quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực sang phải hoặc sang trái. Quay phải được ký hiệu bằng dấu (+), quay trái được ký hiệu bằng dấu (-). Góc quay đặc hiệu của amino acid phụ thuộc vào pH của môi trường.

Tùy theo sự sắp xếp trong cấu trúc phân tử của các nhóm liên kết với carbon bất đối mà các amino acid có cấu trúc dạng D hay L (hình 2.7) gọi là đồng phân lập thể. Số đồng phân lập thể được tính theo  $2^n$  ( $n$  là số carbon bất đối).



### Hình 2.7 ĐỒNG PHÂN LẬP THỂ CỦA ALANINE

Hầu hết các amino acid khác hấp thụ tia cực tím ở bước sóng ( $\lambda$ ) khoảng từ 220 - 280 nm. Đặc biệt cùng nồng độ  $10^{-3}$ M, trong bước sóng khoảng 280 nm tryptophan hấp thụ ánh sáng cực tím mạnh nhất, gấp 4 lần khả năng hấp thụ của tyrosine (hình 2.8) và phenylalanine là yếu nhất. Phần lớn các protein đều chứa tyrosine nên người ta sử dụng tính chất này để định lượng protein.

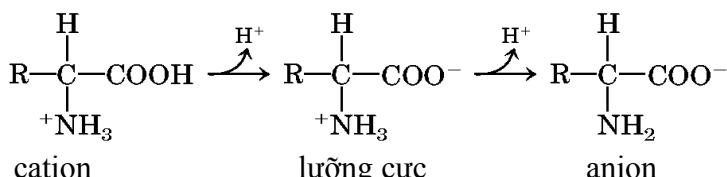


**Hình 2.8 Phổ hấp thụ ánh sáng cực tím của triptophan và tyrosine**

### 1.6. Tính lưỡng tính của amino acid

Trong phân tử amino acid có nhóm carboxyl -COOH nên có khả năng nhường proton ( $H^+$ ) thể hiện tính acid, mặt khác có nhóm amin-  $NH_2$  nên có khả năng nhận proton nên thể hiện tính base. Vì vậy amino acid có tính chất lưỡng tính.

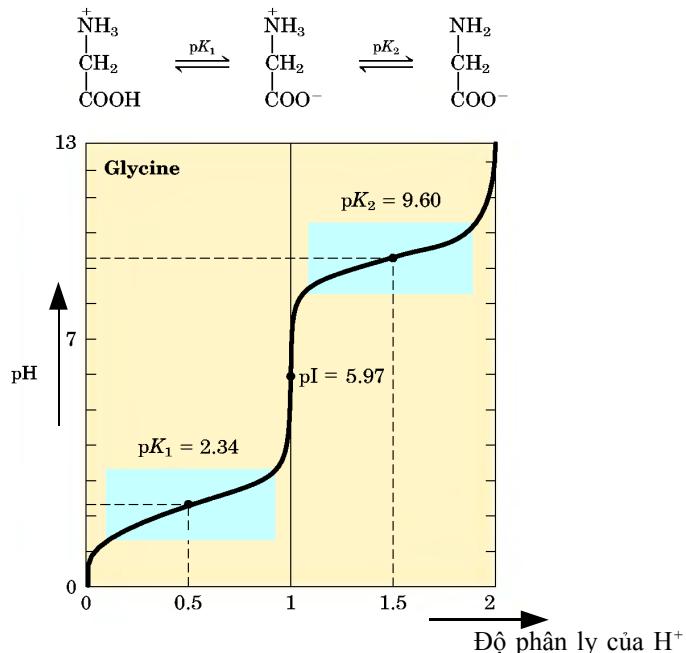
Trong môi trường acid, amino acid ở dạng cation (tích điện dương), nếu tăng dần pH amino acid lần lượt nhường proton thứ nhất chuyển qua dạng lưỡng cực (trung hoà về điện), và tiếp tục tăng pH amino acid sẽ nhường proton thứ hai chuyển thành dạng anion (tích điện âm). Vì vậy đôi khi người ta coi nó như một di-acid.



**Hình 2.9 Tính lưỡng tính của amino acid**

Tương ứng với độ phân ly  $H^+$  của các nhóm COOH và  $NH_3^+$  có các trị số  $pK_1$  và  $pK_2$  (biểu thị độ phân ly của các nhóm được 1/2). Từ đó người ta xác định được  $pH_i$  ( $pI = pH$  đǎng điện) =  $pK_1 + pK_2 / 2$ . Ví dụ: khi hòa tan glycine vào môi trường acid mạnh thì hầu như glycine đều ở dạng

cation. Nếu tăng dần lượng kiềm, thu được đường cong chuẩn độ. Trên đường cong chuẩn độ thấy rằng: glycine lần lượt nhường 2 proton trước tiên chuyển sang dạng lưỡng tính và sau cùng chuyển thành dạng anion



**Hình 2.10 Đường cong chuẩn độ của glycine nồng độ 1 M ở 25°C**

Tương đương độ phân ly của nhóm COOH được một nửa có trị số  $pK_1 = 2,34$  và độ phân ly của  $\text{NH}_3^+$  được một nửa có trị số  $pK_2 = 9,60$ . Như vậy ta có

$$\text{pH}_i = \frac{2,34 + 9,60}{2} = 5,97$$

Mặt khác tại  $pK_1 + 2$  sự phân ly  $\text{H}^+$  của nhóm  $\text{COO}^-$  glycine là 99%, chỉ 1% ở dạng  $\text{COOH}$  và ở  $pK_2 - 2$  dạng  $\text{NH}_3^+$  là 99%, chỉ 1% ở dạng  $\text{NH}_2$ . Như vậy trong vùng pH từ  $pK_1 + 2$  đến  $pK_2 - 2$ , phân tử glycine chủ yếu ở dạng lưỡng tính và kết quả ta có một vùng đáng điện.

Ngoài ra các amino acid trong gốc R có thêm nhóm  $\text{COOH}$  hay  $\text{NH}_2$  sự phân ly của chúng sẽ có thêm một trị số phân ly nữa- $pK_R$  (xem bảng 2.2)

### 1.7. Các phản ứng hóa học của amino acid

Các amino acid đều có nhóm  $\text{NH}_2$  và  $\text{COOH}$  liên kết với  $\text{C}_\alpha$ , vì vậy chúng có những tính chất hóa học chung. Mặt khác các amino acid khác nhau bởi gốc R, vì vậy chúng có những phản ứng riêng biệt. Người ta chia các phản ứng hóa học của amino acid thành 3 nhóm:

**Bảng: 2.2 Các trị số pK của các amino acid thường gặp**

Tên các amino acid	pK <sub>1</sub> (của COOH)	Các trị số pK <sub>2</sub> (của $\text{NH}_3^+$ )	pK <sub>R</sub> (của R)	pI
Glycine	2,34	9,60		5,97
Alanine	2,34	9,60		6,01
Proline	1,99	10,96		6,48
Valine	2,32	9,62		5,97
Leucine	2,36	9,60		5,98
Isoleucine	2,36	9,68		6,02
Methionine	2,28	9,21		5,74
Phenylalanine	1,83	9,13		5,48
Tyrosine	2,20	9,11	10,07	5,66
Tryptophan	2,38	9,39		5,89
Serine	2,21	9,15		5,68
Threonine	2,11	9,62		5,87
Cysteine	1,96	10,28	8,18	5,07
Asparagine	2,02	8,80		5,41
Glutamine	2,17	9,13		5,65
Lysine	2,18	8,95	10,53	9,74
Histidine	1,83	9,17	6,00	7,59
Arginine	2,17	9,04	12,48	10,76
Aspartate	1,88	9,60	3,65	2,77
Glutamate	2,19	9,67	4,25	3,22

#### a) Phản ứng của gốc R.

Do các amino acid có cấu tạo gốc R khác nhau, nên người ta có thể dùng để xác định từng amino acid riêng rẽ nhờ phản ứng đặc trưng của nó, ví dụ phản ứng oxy hóa khử do nhóm SH của cysteine, phản ứng tạo muối

do các nhóm COOH hay NH<sub>2</sub> của glutamte hay lysine, phản ứng tạo ester do nhóm OH của tyrosine v.v...

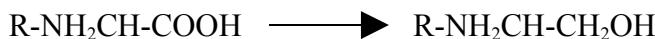
b) Phản ứng chung.

Là phản ứng có sự tham gia của cả hai nhóm α-COOH và α-NH<sub>2</sub>. Khi phản ứng với ninhydrin trong điều kiện đun nóng tạo thành CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> aldehyde và nihydrin bị khử, cuối cùng tạo nên sản phẩm có màu xanh tím.

c) Phản ứng riêng biệt

Có thể chia các phản ứng riêng biệt theo hai nhóm α-COOH và α-NH<sub>2</sub>

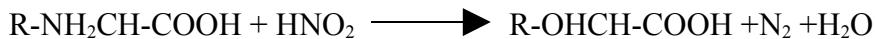
- Các phản ứng của nhóm α-COOH. Ngoài các phản ứng của nhóm COOH thông thường tạo ester, tạo amid, tạo muối... thì nó còn có những phản ứng đặc trưng khác như có thể bị khử thành hợp chất rượu amino dưới sự xúc tác của NaBH<sub>4</sub>.



Nhóm COOH có thể tạo thành phức aminoacyl-adenylate trong phản ứng hoạt hoá amino acid để tổng hợp protein, hay có thể loại CO<sub>2</sub> gấp rất nhiều trong quá trình thoái hoá amino acid, tạo các dẫn xuất amin có hoạt tính sinh học cao như histamine, sevôtnine.

- Các phản ứng của nhóm α-NH<sub>2</sub>. Nhiều phản ứng của nhóm amino được dùng để xác định các chỉ tiêu của amino acid như:

Để định lượng amino acid người ta cho phản ứng với HNO<sub>2</sub> để giải phóng N<sub>2</sub> và định lượng nitrogen



Để định lượng amino acid người ta cho phản ứng với formaldehyde tạo thành base schif.



Sau đó dung NaOH (hoặc KOH) để chuẩn độ nhóm COOH của aminoacid

Để xác định amino acid đầu N-tận cùng người ta cho tác dụng với 2-4 dinitrofluobenzen (phản ứng sanger) hay phenylthiocyanate (phản ứng Edman). Sau đó xác định amino acid N-tận cùng tách biệt khi chúng ở dạng dẫn xuất với hai loại hoá chất trên.

## II. Thu nhận amino acid bằng thủy phân protein

### 2.1. Thủy phân bằng acid

Để thu nhận các amino acid phương pháp thường được dùng nhiều nhất là thuỷ phân bằng acid HCL 6N dư thừa ở nhiệt độ 100-120°C trong khoảng 24 giờ. Sản phẩm thu được chủ yếu là các amino acid tự do dưới dạng hydrogenchlorate. Một số amino acid như serine và threonine bị phá huỷ một phần, tryptophan bị phá huỷ hoàn toàn, glutamine và asparagine phân ly thành acid glutamic, acid aspartic và NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

### 2.2. Thuỷ phân bằng kiềm

Người ta cũng có thể thu nhận các amino acid bằng phương pháp thuỷ phân với NaOH, bằng cách đun nóng trong nhiều giờ. Sản phẩm thu được hầu hết là các amino acid nhưng đều bị racemic hóa, các amino acid cysteine, serine và treonine bị phá huỷ nhưng tryptophan không bị phá huỷ. Vì vậy, phương pháp thuỷ phân bằng kiềm thường chỉ dùng để xác định tryptophan.

### 2.3. Thuỷ phân bằng enzyme

Để thu nhận chế phẩm amino acid ngày nay việc thuỷ phân bằng enzyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau bởi sử dụng enzyme có nhiều ưu điểm như đã nói ở trên.

Các enzyme thuỷ phân protein để tạo thành các amino acid hay các peptid có phân tử thấp được gọi chung là peptidhydrogenlase. Có nhiều loại peptidhydrogenlase, chúng được phân biệt nhau bởi tính đặc hiệu khác nhau với liên kết peptid. Một số loại cắt đứt liên kết peptid ở đầu tận cùng của chuỗi polypeptide được gọi là exopeptidase như carboxypeptidase phân giải liên kết peptide đầu C tận cùng, aminopeptidase phân giải liên kết peptide đầu N tận cùng. Một số khác chỉ cắt đứt các liên kết peptide ở giữa của chuỗi polypeptide được gọi là các endopeptidase như pepsin, tripsin, v.v...

### 2.5. Các phương pháp theo dõi và xác định tốc độ thuỷ phân bằng enzyme

Tốc độ thuỷ phân protein của enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ enzyme, nồng độ cơ chất, các chất kìm hãm, các chất kích hoạt, nhiệt độ và pH của môi trường phản ứng. Để xác định tốc độ thủy phân của enzyme người ta không định lượng enzyme một cách trực tiếp mà thường xác định gián tiếp thông qua hoạt độ của enzyme. Khi thực hiện phản ứng, enzyme có thể làm thay đổi các tính chất vật lý, hoá học, v.v... của hỗn hợp phản ứng. Vì vậy, theo dõi những biến đổi thông qua sự định lượng cơ chất bị mất đi hay sản phẩm của phản ứng enzyme được tạo thành có thể biết được chính xác mức độ hoạt động của enzyme.

Người ta chia ra thành ba nhóm phương pháp:

a) Xác định lượng sản phẩm tạo thành hay lượng cơ chất bị mất đi trong một thời gian nhất định, ứng với lượng enzyme nhất định.

b) Xác định thời gian cần thiết để thu nhận được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm ứng với một lượng enzyme nhất định.

c) Chọn nồng độ enzyme như thế nào để thu được sự biến thiên nhất định về cơ chất hay sản phẩm trong một thời gian nhất định.

Người ta thường sử dụng một số đơn vị để tính hoạt độ như sau:

- Đơn vị enzyme Quốc tế (UI -) là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hoá được một micromol cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn.

$$1 \text{ UI} = 1 \mu \text{ mol cơ chất} (10^{-6} \text{ mol})/\text{phút.}$$

- Katal (Kat) là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hoá được một mol cơ chất sau một giây ở điều kiện tiêu chuẩn.

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol cơ chất/giây}$$

$$1 \text{ UI} = \frac{1}{60} 10^{-6} \text{ Kat} = 16,67 \text{ nKat (nanokatal)}$$

- Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzyme là số đơn vị UI (hoặc số đơn vị Katal) ứng với 1 ml dung dịch hoặc 1mg protein của chế phẩm. Nếu chế phẩm enzyme đã tinh sạch hoạt độ có thể được biểu thị bằng số UI (hoặc Kat) trên 1mg enzyme.

- Hoạt độ riêng phân tử là số phân tử cơ chất cơ chất được chuyển hoá bởi một phân tử enzyme trong một đơn vị thời gian.

### **III. Các phương pháp phân tích amino acid**

#### *3.1. Phương pháp hoá lý*

Đã từ lâu việc phân tích định tính và định lượng amino acid thường là sự kết hợp của nhiều phương pháp hoá lí và sắc ký. Có thể dựa vào phổ hấp phụ các amino acid không giống nhau để phân tích. Hoặc dựa vào cấu trúc của amino acid tự do sau khi chuỗi polypeptide đã bị thuỷ phân, có thể định lượng amino acid đầu N-tận cùng bằng phản ứng Sanger hoặc Edman. Cũng như vậy, có thể xác định amino acid đầu C tận cùng nhờ phản ứng khử nhóm carboxyl với tác nhân khử  $\text{NaBH}_4$ , hoặc sử dụng enzyme carboxypeptidase v.v...

#### *3.2. Sắc ký*

Người ta có thể dùng nhiều phương pháp sắc ký khác nhau, ở đây chỉ giới thiệu nguyên tắc của một số phương pháp thông dụng để phân tích amino acid.

##### a) Sắc ký giấy.

Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào sự phân bố giữa hai pha dung môi: dung môi cố định và dung môi di động. Dung môi cố định thường là nước giữ ở giấy sắc ký (trong điều kiện bảo hoà hơi nước, giấy có thể giữ 15-22% nước tính theo trọng lượng giấy). Dung môi di động thường là một dung môi hữu cơ bảo hoà nước di chuyển trên tờ giấy theo mao dẫn kéo theo các chất trong dung dịch. Tốc độ di chuyển của từng chất không giống nhau và mỗi chất được đặc trưng bởi một trị số nhất định gọi là Rf.

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Trong đó: - a là khoảng cách chuyển dịch của chất phân tích

- b là khoảng cách chuyển dịch của dung môi

Có nhiều kiểu sắc ký giấy khác nhau đó là sắc ký một chiều đi lên, sắc ký một chiều đi xuống, sắc ký vòng nằm ngang và sắc ký hai chiều. Loại giấy thường dùng là Whatman số 1 và Schleicher-Schull 2044 a và b, dung môi gồm các chất như 4 Butanol:1 Acetic acid: 5 Nước (dùng cho chiều thứ nhất); 3 Phenol: 1 Nước (dùng cho chiều thứ hai).

### b) Sắc ký lớp mỏng.

Nguyên tắc của phương pháp này dựa trên lý thuyết của sắc ký giấy, nghĩa là cũng dựa trên sự phân bố các chất giữa hai pha: chất hấp phụ được tráng rộng trên một phiến kính tạo thành một lớp mỏng và pha di động là dung môi thích hợp. Dung môi di chuyển làm dịch chuyển các chất trong mẫu thử. Các chất hấp phụ thường dùng là silicagel, alumin oxyt, sephadex ,v.v...được kết hợp với thạch cao (gypse) để dán vào phiến kính

### c) Sắc ký khí.

Nguyên tắc của phương pháp này là lợi dụng tính chất khó bay hơi của các amino acid nên có thể sử dụng chương trình nhiệt để chuyển chúng thành các dẫn xuất (thường là N-acetyl-amin). Cho tác dụng amino acid với cồn amylic và HBr khan, sau đó cho tác dụng hỗn hợp này với anhydrit acetic.

Cột thường dùng là loại Chromosorb W (60-80 mesh) có một lớp polyetylenglycol 1% (carbowax 1564 hoặc 6000). Chương trình nhiệt giữa 125° C và 155°C, tốc độ chảy 60-240 ml/phút.

### 3.3. Phân tích bằng máy tự động

a) Xác định trình tự (sequence) amino acid trong chuỗi polypeptide

Máy phân tích amino acid trong chuỗi polypeptide tự động dựa trên nguyên tắc của phương pháp Edman, nghĩa là tách tách lần lượt từng amino acid ở đầu N tận cùng và xác định lần lượt theo thứ tự từng amino acid được tách ra đó, vì vậy có thể xác định chính xác trình tự sắp xếp của các amino acid trong chuỗi.

b) Xác định thành phần amino acid trong chuỗi polypeptide bằng máy sắc ký lỏng cao áp-HPLC (High Liquid Pressor Chromatography )

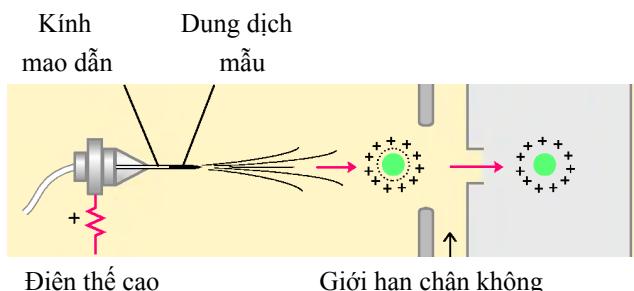
Trước hết protein hay peptide phải được thuỷ phân bằng HCl 6 N ở 110°C trong ống hàn kín chứa nitrogen (để tránh sự oxy hoá phá huỷ amino acid) trong thời gian 12-15 giờ. Sau đó trung hoà hỗn hợp dịch thuỷ phân amino acid và cho vào máy phân tích tự động HPLC thành phần amino acid cùng với mẫu chuẩn amino acid. Máy tự động sẽ cho biết hàm lượng (tỷ lệ %) của từng amino acid dựa theo các đỉnh (peak) của amino acid chuẩn. Cần nhớ máy HPLC chỉ cho biết thành phần (composition) của từng amion acid chứ không cho biết trình tự các amino acid

### 3.4. Điện di

Dựa vào tính chất tích điện của các amino acid trong môi trường có pH nhất định, mà có thể phân tích amino acid bằng kỹ thuật điện di. Dưới tác dụng của điện trường các amino acid tích điện dương (+) sẽ chạy về phía cực (-), các amino acid tích điện âm sẽ chạy về cực (+). Do khả năng tích điện không giống nhau giữa các amino acid vì vậy chúng di chuyển không giống nhau trong điện trường. Kết quả các amino acid phân bố trải ra trên giá thể (giấy hoặc tấm polyamide).

### 3.5. Phân tích bằng quang phổ khói

Quang phổ khói (MS- mass spectrometer) là một công cụ phân tích với độ chính xác cao. Nguyên tắc của phương pháp này là: Dùng một chùm electron bắn vào một lượng chất thử rất nhỏ, các phân tử chất thử



Hình: 2.11 Sơ đồ hoạt động của quang phổ khói

trước hết được phá thành nhiều mảnh ion mang điện dương trong điều kiện chân không. Các mảnh ion nhờ một bộ phận phát hiện và ghi thành pic với cường độ khác nhau tương ứng với khối lượng của mỗi ion -đó là khối phô.

Có nhiều loại máy quang phổ khối với mức độ phân giải khác nhau, máy có độ phân giải cao là máy có khả năng tách được hai mảnh ion có khối lượng chỉ chênh nhau phần trăm đơn vị khối.

### *3.6. Phương pháp đồng vị*

Phương pháp đồng vị có thể sử dụng để xác định một hoặc vài amino acid trong hỗn hợp có nhiều loại amino acid khác nhau, hay một amino acid cần được xác định trong nhiều mẫu của một loạt thí nghiệm. Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào hoạt tính phóng xạ của amino acid cùng một loại đã đánh dấu để xác định vị trí và số lượng của amino acid đó trong chuỗi polypeptide. Ngoài ra người ta có thể dùng phương pháp này để nghiên cứu tính đặc hiệu của các amino-acyl-tRNAsynthetase và tRNA

### *3.7. Phương pháp enzyme*

Có thể xác định amino acid bằng phương pháp enzyme dựa trên nguyên tắc mỗi một loại enzyme có khả năng phân giải đặc hiệu một loại L-amino acid nhất định. Xác định sản phẩm tạo thành sau phản ứng với enzyme tương ứng có thể biết được amino acid trong hỗn hợp.

### *3.8. Phương pháp vi sinh vật*

Một số vi khuẩn sinh trưởng trong một điều kiện thích hợp, chúng rất nhạy cảm với pH để sản xuất ra các enzyme L-amino acid-decarboxylase đặc hiệu với từng loại amino acid và hoạt động của chúng giải phóng CO<sub>2</sub> trong môi trường. Xác định nồng độ CO<sub>2</sub> bằng áp kế Warburg để suy ra thành phần của amino acid.

Phần lớn trường hợp điều kiện pH thích hợp thường nằm trong vùng acid, ví dụ: ở pH 4,5 tạo ra L-glutamate 1-carboxy-lyase; EC 4.1.1.15 xúc tác chuyển hoá L-glutamic → γ-amino butyric; ở pH 5,5 tạo ra L-tyosine-carboxy-lyase EC 4.1.1.25 xúc tác chuyển hoá L-tyrosine → Tyramine v.v...

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chân, Đỗ Đình Hò, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
- 2.Phạm Thị Trần châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục

4. Nguyễn Viết Tựu, 1980. Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. nhà xuất bản Y học. TP Hồ Chí Minh.
5. Copeland R. A., 2000. Enzymes; A Practical Introduction To Structure; Mechanism & Data Analysis. Willey-VCH. A John Willey & Sons, INC., Pub. 2<sup>nd</sup> ed.
6. Daniel L.C., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
7. Fersht A., 1998, Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3<sup>rd</sup> Rev Edit.
8. Hans U. B., 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Second English Edition Academic Press, Inc., New York San Francisco London, Vol., 4.
9. Hollas J. M., 2004. Modern spectroscopy. John Wiley & Sons. Ltd. 4<sup>th</sup> ed.
10. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition. W.H Freeman, 2004
11. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5<sup>th</sup> ed. W.H Freeman.
12. Walker J. M., 1996. The Protein Protocols Hand book. 2<sup>nd</sup> ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

## Chương 3

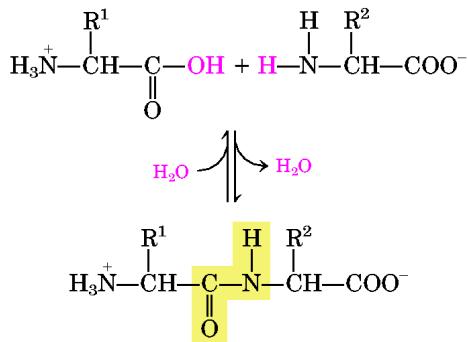
# Peptide - cấu trúc và chức năng

## I. Tính chất chung của peptide

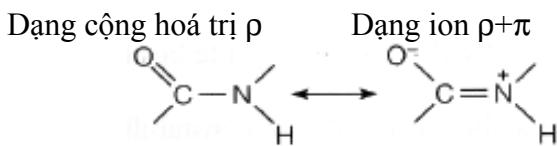
Peptide là những protein thường có cấu trúc đoạn ngắn khoảng từ hai đến vài chục amino acid nối với nhau, có khối lượng phân tử thường dưới 6.000 Dalton. Chúng có thể được tổng hợp trong tự nhiên hoặc được hình thành do thoái hóa protein. Mặc dù có cấu trúc nhỏ nhưng nhiều peptide có vai trò khá quan trọng trong hoạt động trao đổi chất của cơ thể.

### 1.1. Cấu tạo của peptide.

Như đã giới thiệu ở trên các amino acid là những đơn phân tử để xây dựng nên các chuỗi polypeptide. Trong các chuỗi đó các amino acid được liên kết với nhau thông qua liên kết peptide (hình 3.1).



Hình 3.1      Sự tạo thành liên kết peptide

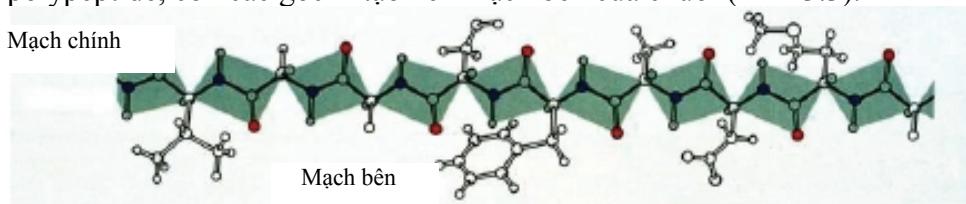


Hình 3.2      Sự tồn tại các dạng của liên kết peptide

Liên kết peptide (peptide bond) có độ bền cao bởi cấu trúc của nó có  $4 e/\pi$ ,  $2e/\pi$  thuộc về liên kết C=O còn  $2e/\pi$  thuộc về bộ đôi e' tự do của nguyên tử N.

Liên kết giữa C-N là liên kết phức tạp, nó có thể chuyển từ dạng  $\rho$  đến dạng lai (trung gian) thì bị một phần ghép đôi của liên kết  $\pi$  (hình 3.2).

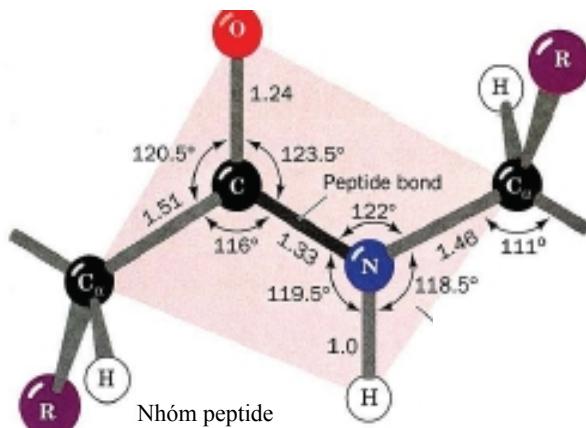
Người ta cho rằng tỷ lệ của liên kết kép này là khoảng 30% đối với liên kết C-N và 70% với liên kết giữa C và O. Như vậy ở đầu của một chuỗi peptide là amino acid có nhóm  $\alpha$ -amino ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>) tự do được gọi là đầu N-tận cùng và đầu kia có nhóm  $\alpha$ -carboxyl ( $\alpha$ -COOH) tự do được gọi là đầu C tận cùng. Liên kết peptide tạo nên bộ khung chính của chuỗi polypeptide, còn các gốc R tạo nên mạch bên của chuỗi (hình 3.3).



**Hình 3.3 Mạch bên và khung của một chuỗi polypeptide**

Như vậy liên kết peptide giữa C-N không giống như liên kết giữa C-N của các chất thông thường, vì vậy kéo theo một số hậu quả sau:

- Các nguyên tử C O N H nằm trên một mặt phẳng và không xảy ra sự quay tự do xung quanh liên kết C-N nếu không có thêm năng lượng, trong đó H của nhóm NH luôn ở vị trí trans so với O của nhóm COOH và cấu hình trans của liên kết peptide là cấu hình ổn định.



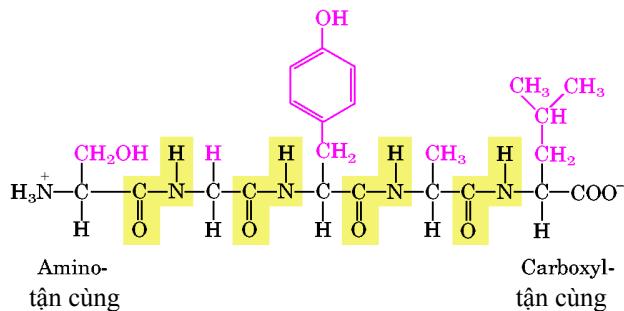
**Hình: 3.4 Mô hình cấu trúc của liên kết peptide**

- Mặt khác khả năng quay tự do giữa C và  $C_{\alpha}$  giữa N và  $C_{\alpha}$  (hình 3.4) là rất lớn, làm cho mạch peptide có khuynh hướng hình thành cấu trúc xoắn.

- Ngoài ra liên kết peptide có tính chất ion một phần đã làm tăng tính linh động của nguyên tử N. Mặt khác liên kết đơn giữa C-N trong liên kết peptide có chiều dài ( $1,33 \text{ \AA}$ ) hơi ngắn hơn so với đa số các liên kết C-C, C-N ( $1,47 \text{ \AA}$ ) và các liên kết khác nên đã tạo cho chuỗi peptide một cấu hình không gian có độ bền cao.

### 1.2. Cách gọi tên và phân loại peptide

Căn cứ vào số amino acid trong peptide để gọi tên của peptide, nếu có 2 amino acid gọi là dipeptide, 3 amino acid gọi là tripeptide, 4 amino acid gọi tetrapeptide, 5 amino acid gọi là pentapeptide v.v... cách gọi tên các peptide theo gốc amino acid bằng cách tên bắt đầu từ amino acid đầu tiên lần lượt đến amino acid cuối cùng. Trừ amino acid cuối cùng còn tất cả đuôi của các amino acid đều bị thay bằng đuôi -yl.

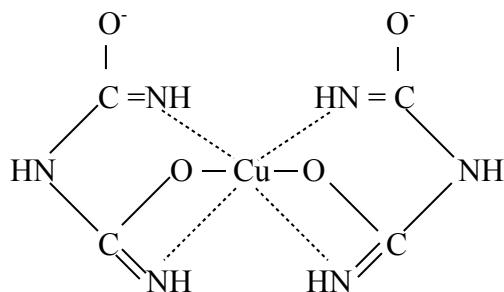


**Hình 3.5 Cấu tạo và cách gọi tên của một pentapeptide  
Seryl-glycyl-tyrosyl-alanyl-leucine**

Người ta cũng có thể dùng ký hiệu viết tắt 3 chữ hoặc 1 chữ theo thứ tự các amino acid để biểu thị thành phần và thứ tự các amino acid trong chuỗi ví dụ pentapeptide ở trên (hình 3.5), có thể viết Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu hoặc SGYAL. Thông thường người ta viết amino acid đầu N tận cùng phía bên trái và amino acid đầu C tận cùng phía bên phải và cũng có thể ghi rõ đâu nào của chuỗi peptide là đầu N-tận cùng hay đầu C-tận cùng và như vậy cũng pentapeptide ở trên có thể viết  $\text{H}_2\text{N-Ser}$  hay  $\text{Leu-COOH}$ . Trong trường hợp có những amino acid ở một đoạn nào trong chuỗi peptide chưa xác định được rõ người ta có thể để các amino acid đó trong ngoặc chẵng hạn Ala- Ser-Gly-(Ala,Leu, Val) Glu-Arg-...

### 1.3. Các phản ứng đặc trưng của peptide

Ngoài phản ứng của nhóm  $\text{NH}_2$  và  $\text{COOH}$  đầu tận cùng, các gốc R của peptide cũng cho những phản ứng màu đặc trưng của các amino acid tự do tương ứng. Một trong những phản ứng màu đặc trưng nhất cho liên kết peptide đó là phản ứng Biure, phản ứng này không xảy ra với amino acid tự do. Trong môi trường kiềm mạnh, liên kết peptide phản ứng với  $\text{CuSO}_4$  tạo thành phức chất màu tím đỏ và có khả năng hấp thụ cực đại ở bước sóng 540 nm. Đây là phản ứng được sử dụng rộng rãi để định lượng protein. Phương pháp xác định protein theo Lowry cũng dựa trên nguyên tắc của phản ứng này bằng cách thêm thuốc thử Folin-Ciocalteau để làm tăng độ nhạy của phản ứng sau khi đã thực hiện phản ứng biure, đồng thời dựa vào các gốc Tyr, Trp nhờ thuốc thử đó để tạo phức màu xanh da trời.



**Hình 3.6** Sự tạo phức màu tím đỏ trong phản ứng Biure

## II. Các phương pháp tách phân lập và xác định peptide

Có một số phương pháp tách phân lập và xác định thành phần, số lượng và trình tự amino acid trong peptide. Nguyên tắc chung của các phương pháp tách phân lập và xác định peptide về cơ bản cũng như đối với protein. Tuy nhiên peptide là những đoạn ngắn của chuỗi polypeptide vì thế có thể bỏ qua giai đoạn cắt chuỗi polypeptide thành các peptide nhỏ mà có thể tách phân lập ngay bằng phương pháp điện di hay sắc ký để tách riêng từng peptide. Sau khi đã tách riêng các peptide người ta tiến hành thuỷ phân nó hoàn toàn thành các amino acid tự do. Từ đó xác định các amino acid đầu N-tận cùng và amino acid đầu C-tận cùng. Các dữ liệu thu được qua phân tích sẽ được so sánh đổi chiều và tổng hợp lại. Ví dụ, Puppy và Bodo phân tích một peptide của dịch khi thuỷ phân Cytochrome C thu được các dữ kiện sau đây:

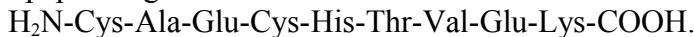
- Thành phần amino acid của peptide sau khi được thuỷ phân hoàn toàn và sắc ký là 2Cys, 1 Ala, 2 Glu, 1His, 1Thr, 1Val, và 1Lys.

- Dùng phương pháp Sanger xác định được amino acid đầu N-tận cùng là Cys và phương pháp carboxypeptidase xác định được amino acid đầu C-tận cùng là Lys.

- Cấu tạo của peptide nhỏ (bằng cách thuỷ phân từng phần ban đầu và xác định các amino acid, amino acid đầu N-tận cùng và amino acid đầu C-tận cùng của mỗi peptide nhỏ):

Cys- Ala	Glu- Cys	(Val- Glu)
Cys-(Ala,Glu)	Cys- His	Thr (Val, Glu)
Ala- Glu	Glu (Cys, His)	Glu- Lys
	Thr (Val, Glu, Lys)	

Tổng hợp các dữ kiện trên, họ đã xác định được trình tự các amino acid của peptide nghiên cứu là:



Đây là nguyên tắc chung để xác định một trình tự trong peptide. Tuy nhiên đối với những peptide dài việc xác định rất phức tạp.

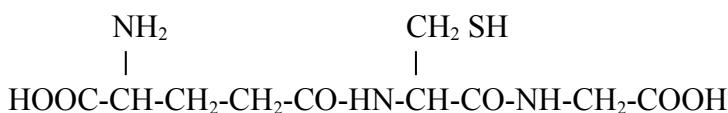
### III. Sự tồn tại tự nhiên và vai trò chức năng của peptide

#### 3.1. Khái niệm chung

Trong tự nhiên tồn tại nhiều dạng peptide có chức năng quan trọng liên quan đến hoạt động sống của cơ thể như là các hormon, các chất kháng sinh hay những chất tiền thân của tế bào vi khuẩn v.v... Bên cạnh đó cũng có những peptide chức năng chưa rõ ràng, có những peptide là sản phẩm thuỷ phân đang còn dang dở của protein. Trong phạm vi của chương trình này xin được giới thiệu một số peptide quan trọng, có nhiều ý nghĩa cho hoạt động sống của sinh vật.

#### 3.2. Glutathion và các chất tương tự

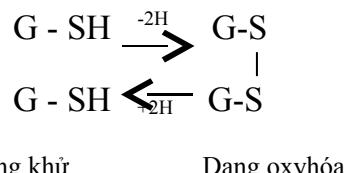
Glutation là một tripeptide  $\gamma$ -glutamyl-cysteyl-glycine với công thức cấu tạo như sau:



Trong cấu trúc nhóm SH của cysteine là nhóm hoạt động, vì vậy người ta thường viết tắt chữ glutation là G-SH. Trong môi trường hoạt động glutation có thể nhường hydroxigen (H) để thành dạng oxy hoá và ngược lại có thể nhận H để thành dạng khử:

Nhờ phản ứng trên, glutathion đóng vai trò của một hệ thống oxy hoá khử (vận chuyển hydrogen). Glutathion là một trong những peptide

nội bào phổ biến nhất, nó phân bố nhiều trong các mô và các cơ quan như: gan, thận, lách, tim, phổi, hông cầu v.v...



### *3.3. Các hormon có bản chất peptide và protein*

### 3.3.1. Adrenocorticotropic hormone (corticotropin, ACTH).

ACTH hay còn gọi là kích tố vỏ thượng thận kích thích sự tổng hợp steroid, adrenocortic ở vỏ thượng thận. Là hormon polypeptide, cấu trúc phân tử bao gồm 39 amino acid, có khối lượng phân tử khoảng 4.500. Nghiên cứu cấu trúc và chức năng thấy rằng, các đoạn trình tự amino acid trong chuỗi peptide đó có những chức năng hoạt động sinh học khác nhau:

- Đoạn 24 amino acid đầu tiên là phần hoạt động sinh học trong đó 13 amino acid đầu tiên tương ứng với chuỗi  $\alpha$ -MSH (melanin stimulating hormone- kích hắc tố) và 5 amino acid từ 6-10 có hoạt động của MSH, 16 amino acid đầu tiên của ACTH đủ để mang tính chất hoạt động tạo ra steroid.

- Đoạn trong chuỗi từ amino acid số 25 đến 39 có sự thay đổi tùy theo loài động vật.

Trong cơ thể ACTH kích thích chủ yếu tách ra hormone chuyển hóa đường (corticosterone, cortisol), ACTH xúc tác phản ứng hydroxyl hóa và đặc biệt là phản ứng cắt chuỗi ngang của cholesterol (tổng hợp steroid), phản ứng 11 $\beta$ -hydroxyl hóa.

### 3.3.2. Các hormon kích thích bài tiết melanin (MSH).

MSH được bài tiết ở thùy giữa tuyến yên. Người ta chia MSH thành hai loại:  $\alpha$  - MSH gồm 13 amino acid, giống với 13 amino acid đầu của ACTH nên có tác dụng yếu của ACTH và  $\beta$ - MSH. Hiện nay người ta đã tổng hợp được MSH hoàn toàn.

Sự điều hoà tổng hợp MSH được thực hiện bởi hai yếu tố: một yếu tố ức chế giải phóng MSH là MIF (melanocyte release inhibiting factor) có cấu tạo là một tripeptide gồm pro-leu-gly-NH<sub>2</sub>; một yếu tố kích thích giải phóng MSH là MRH (melanocyte release stimulating hormone), cấu tạo là một peptide gồm 5 amino acid.

MSH gây tăng sắc tố ở lợn, nhưng MSH không tồn tại như một số hormon riêng biệt ở người. Hiện tượng sạm da của những con bệnh nghiện (addision) có thể do chủ yếu là sự tăng tiết của MSH.

### 3.3.3. Oxytocin, Vasopressin Vasotocin.

Oxytocin là hormon “thúc đê”, gây co dạ con, đó là một peptide có 9 amino acid. Ở động vật có vú, oxytocin chỉ khác ở sự thay đổi của 2 amino acid như sau: amino acid ở vị trí thứ ba là isoleucine và amino acid vị trí thứ tám là leucine (Bảng 3.1). Vasopressin của loài éch nhái có cấu trúc trung gian giữa vasopresin và oxytocin của động vật có vú (amino acid thứ ba là isoleucine và amino acid thứ tám là arginin).

Vasopressin là hormon gây co mạch, đó là một peptide có cấu trúc gồm 9 amino acid. Phần lớn ở động vật có vú amino acid thứ 8 của vasopressin là lysine(lys-Vasopressin), trừ ở lợn và hà mã, amino acid thứ 8 là lysine (lys-vasopressin).

**Bảng 3.1 So sánh cấu trúc hóa học giữa oxytocin và vasopressin  
của một số loài động vật**

Va-	Lysin Vaso- pressin	1    2    3    4    5    6    7    8    9 Cys-Tyr- <b>Phe</b> -Glu-Asn-Cys-Pro- <b>Lys</b> -Gly-NH <sub>2</sub>	Lợn, Hà mã
so-	Argi- nin vaso- pressin	1    2    3    4    5    6    7    8    9 Cys-Tyr- <b>Phe</b> -Glu-Asn-Cys-Pro- <b>Arg</b> -Gly-NH <sub>2</sub>	Phần lớn động vật có vú
pres-	Vaso- tocin	1    2    3    4    5    6    7    8    9 Cys-Tyr- <b>Ile</b> -Glu-Asn-Cys-Pro- <b>Arg</b> -Gly-NH <sub>2</sub>	Động vật có xương sống, không có vú
	Oxy- tocin	1    2    3    4    5    6    7    8    9 Cys-Tyr- <b>Ile</b> -Glu-Asn-Cys-Pro- <b>Leu</b> -Gly-NH <sub>2</sub> ( chỉ khác vasopressin ở chuỗi bên amino acid thứ ba và thứ tám)	Động vật có xương sống, có vú, chim

Ở động vật có vú amino acid thứ 3 là isoleucine; vasopressin có tên là la arginin-vassotocin.

Oxytocin có tác dụng trên cơ trơn của tử cung và tuyến vú, gây co khi tử cung sinh con và kích thích sự tiết sữa khi cho con bú.

Vasopressin có tác dụng chống lợi niệu, tăng cường tái hấp thu nước ở thận, đồng thời làm co mạch, do đó có tác dụng tăng huyết áp.

### 3.3.4. Các hormon sinh trưởng (HGH).

Hormon sinh trưởng của người (human growth hormone) còn có tên gọi STH (somatotropin hormone) là một chuỗi polypeptide bao gồm 191 amino acid có khối lượng phân tử 21 kDa (L. Stryer, 1998). Trong cấu trúc có hai cầu disulfua được tạo thành giữa amino acid 53-165 và giữa amino acid 182-189 (hình 21). Hoạt động sinh học của HGH là ở chuỗi gồm 134 amino acid. HGH có cấu tạo rất giống với hormon lactogen của rau thai (85% amino acid giống nhau) và gần giống prolactin của người (32% amino acid giống nhau).

Hormon sinh trưởng có tác dụng sự tăng trưởng nói chung, kích thích sự tạo sụn hơn là tạo xương, nó cũng là một hormon chuyển hoá. Hormon sinh trưởng kích thích sự tổng hợp protein từ những amino acid đã được vận chuyển dễ dàng vào trong tế bào nhờ HGH, và là hormon gây tăng đường huyết, sinh đái tháo đường (kích thích sự bài tiết glucagon), đồng thời kích thích sự thoái hóa lipid để đảm bảo nhu cầu về năng lượng cho cơ thể, gây tăng acid béo tự do trong huyết tương.

Sự thiếu hụt HGH nếu xảy ra trước tuổi dậy thì sẽ dẫn đến chứng người lùn, sự dư thừa HGH nếu xảy ra trước tuổi dậy thì sẽ xảy đến chứng người khổng lồ, nếu xảy ra sau tuổi dậy thì sẽ dẫn đến chứng người bị to dị thường (phát triển chiều dài của đầu, xương và mặt).

### 3.3.5. Prolactin (PRL- kích nhũ胎)

Prolactin hoặc LTH (luteotropic hormone), là một polypeptide có khối lượng phân tử 23.000. Ở người có cấu trúc 198 amino acid. Ở các loài động vật số lượng amino acid trong chuỗi giống nhau khoảng 70%.

Cấu trúc bậc 1 và hoạt động của PRL có tính chất tương tự HGH và cả hormon tạo sữa nguồn gốc rau thai.

Prolactin được bài tiết liên tục khi có thai, chúng kích thích thẻ vàng bài tiết ra progesteron trước khi progesteron được bài tiết bởi nhau thai. PRL chuẩn bị cho tuyến vú bài tiết sữa. Sau khi đẻ, khi tử cung đã “rỗng” PRL đảm bảo cho sự bài tiết sữa.

### 3.3.6. Hormon tiết (thyrotropin-TRH).

TRH là viết tắt của hormon giải phóng thyrotropin (thyrotropin releasing hormone). Cấu trúc hóa học của TRH đã được Schally và Guilemin xác định (năm 1969 và đạt giải thưởng Nobel 1977) là một peptid ngắn chỉ 3 amino acid là pyroglutamyl-histidyl-proline-NH<sub>2</sub>. TRH có chức năng tham gia vào quá trình tổng hợp và bài tiết TSH (kích giáp trạng tố). TRH có chức năng vừa như một hormon giải phóng, vừa như một hormon kích thích.

### 3.3.7. Insulin.

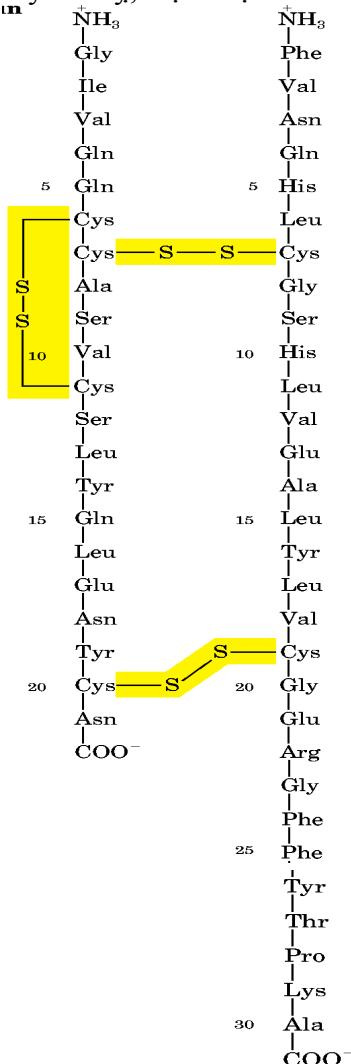
Từ 1953, Sanger (giải thưởng Nobel 1958) đã nghiên cứu, tinh chế và xác định hoàn toàn cấu trúc của phân tử insulin. Phân tử insulin bao gồm 51 amino acid, có cấu trúc gồm 2 chuỗi polypeptide, với khối lượng phân tử 5.700:

Chuỗi A có 21 amino acid.

Chuỗi B có 30 amino acid.

Hai chuỗi được nối với nhau bằng 2 cầu disulfua. Trong chuỗi A cung hình thành 1 cầu disulfua giữa amino acid thứ 6 và amino acid thứ 11. Phần đặc hiệu (đặc trưng của một loài) chỉ tập trung vào các amino acid thứ 8-9-10, 12-14 của chuỗi A và đặc biệt là amino acid thứ 30 của chuỗi B (hình 3.7). Người ta cũng đã xác định được cấu trúc ba chiều của insulin và thấy rằng cấu trúc phân tử insulin được giữ vững bởi nhiều liên kết muối, liên kết hydro và liên kết cầu disulfua giữa chuỗi A và chuỗi B. Insulin có tác dụng rõ nhất trong tất cả các hormon của

tuyến tuy, đặc biệt đối với quá



Hình 3.7 Các amino acid của chuỗi A và B ở insulin bò

trình chuyển hoá glucid, nó có tác dụng hạ đường huyết. Insulin còn kích thích quá trình tổng hợp và úc chế quá trình thoái hoá glycogen ở cơ, gan và mô mỡ. Đặc biệt insulin tăng cường tổng glucose hợp acid béo, protein và kích thích sự đường phân. Tác dụng quan trọng nhất của insulin là kích thích sự xâm nhập glucose, một số đường monose, amino acid trong tế bào cơ và mỡ. Do vậy insulin làm giảm lượng glucose trong máu. Ngoài ra insulin cũng làm giảm sự tạo glucose do làm giảm nồng độ enzyme như pyruvat carboxylase và fructose 1-6 diphosphatase.

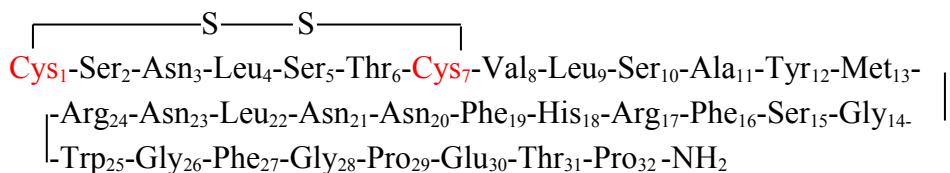
### 3.3.8. Glucagon.

Glucagon là một peptide được tiết ra bởi tế bào alpha của đảo langerhans, cấu trúc phân tử glucagon ở người gồm 29 amino acid, với khối lượng 3.500. Lúc đầu glucagon được hình thành dưới dạng tiền hormon, preproglucagon rồi đến proglucagon có 37 amino acid. Sau khi loại đi 8 amino acid trở thành glucagon.

Glucagon lưu thông trong máu dưới dạng tự do (không kết hợp với protein), chúng có tác dụng làm tăng nồng độ glucose trong máu bằng cách kích thích sự phân huỷ glycogen ở gan qua trung gian của AMP vòng. Glucagon kích thích sự tạo glucose và úc chế sự phân huỷ glucose bằng cách úc chế pyruvate kinase và phospho fructokinase. Nó còn có tác dụng úc chế tổng hợp lipid ở gan, nhưng kích thích sự tạo thành chất cетonic. Đối với protein, glucagon có tác dụng thoái hoá.

### 3.3.9. Calcitonin (CT)

Calcitonin được phát hiện từ năm 1962, người ta đã xác định được cấu trúc của nó là một chuỗi peptide gồm 32 amino acid có một cầu disulfua giữa amino acid thứ 1 và amino acid thứ 7 (hình 3.8).



**Hình 3.8 Sơ đồ cấu trúc calcitonin của lợn**

Calcitonin có tác dụng điều hoà calci máu. Calci huyết tương được duy trì ở nồng độ 10 mg/100 ml nhờ calcitonin (còn có cả PTH: parathormon và vitamin D). Chất đối trọng sinh lý chính của calci là phosphate. Độ hòa tan của calci phosphate rất thấp và sự tăng của một ion

này sẽ gây giảm một ion khác, nếu không phosphate calci sẽ kết tủa. Trong máu một nửa calci kết hợp với protein, một nửa ở dạng tự do và có hoạt động sinh học. Xương chứa trên 99% calci của cơ thể và là kho dự trữ chính của calci để khi cơ thể cần đến.

### 3.3.10. Angiotensin.

Angiotensin có cấu trúc là những peptide có 7 amino acid ( AII-Angiotensin II) hoặc 8 amino acid (AIII-Angiotensin III), chúng được bài tiết bởi tế bào thận. Chúng có tác dụng kích thích lớp vỏ của tế bào thượng thận bài tiết aldosteron làm tăng lượng natri trong máu khi thể tích máu hoặc natri giảm.

### 3.3.11. Cholecystokinin-pancreozymin(CCK-PZ).

Là một peptide có cấu trúc gồm 33 amino acid. Hoạt động sinh học của nó gắn liền chủ yếu ở C tận cùng. Cholecystokinin được bài tiết bởi niêm mạc tá tràng khi có sự tiêu hoá lipid và protein. Trong thực tế nhiều tế bào bài tiết nhiều kiểu CCK khác nhau về số lượng amino acid (có thể là 58; 32; 8 hoặc 4 amino acid). CCK được tổng hợp từ một hormon chung (pre-pro-cholecystokin) có 114 amino acid.

Trong cơ thể CCK có tác dụng kích thích co bóp túi mật, kích thích tế bào nang tụy bài tiết enzyme amylase.

### 3.3.12. Secretin.

Được phát hiện bởi Bayliss và Starling vào năm 1902. là một peptide gồm có 27 amino acid, secretin được bài tiết bởi tá tràng nhờ kích thích của pH acid. Hiện nay người ta đã tổng hợp được hoàn toàn phân tử secretin

Secretin có tác dụng kích thích bài tiết bicarbonate nhằm trung hoà acid của dạ dày (pH từ 1,5-2,5 tăng lên 7,0). Ngoài ra secretin còn có nhiều tác dụng khác như kích thích tiết mật và bài tiết pepsin.

### 3.3.13. Gastrin.

Gastrin được bài tiết bởi tế bào vùng hang vị của niêm mạc dạ dày. Gastrin có cấu trúc là một peptide bao gồm 17 amino acid, được bài tiết từ một hormon có 34 amino acid. Gastrin tổng hợp nhân tạo chỉ gồm 4 amino acid cuối cùng (từ 14 đến 17) có hoạt động đầy đủ của gastrin và được ứng dụng rộng rãi trong lâm sàng (phương pháp gastrin).

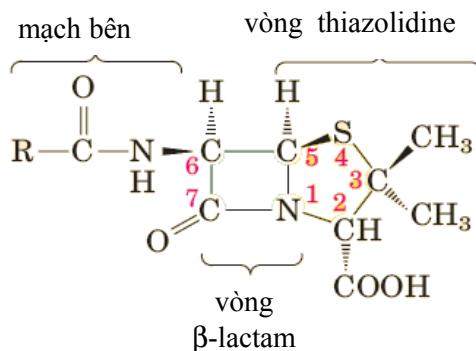
Gastrin có tác dụng kích thích tế bào thành của tuyến dạ dày bài tiết HCl và tế bào chính bài tiết pepsinogen. Ngoài ra gastrin còn kích thích sự vận động của dạ dày, ruột, làm giãn cơ vòng của môn vị.

## 3.4. Các peptide kháng sinh

Đó là những peptide do vi khuẩn hoặc nấm sản sinh ra. Nhiều peptide kháng sinh là peptide vòng chứa các amino acid dạng D và L.

### 3.4.1. Penicillin.

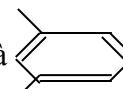
Penicillin được chiết ra từ dịch nuôi cấy nấm *Penicillium chrysogenum*. Penicillin gồm nhiều loại, chúng có cấu tạo gần giống nhau, bao gồm một vòng tiasolidin, một vòng  $\beta$ -lactam, một nhóm amino có gắn với  $\text{CO}_2$  và một mạch bên (R), hình 3.9.

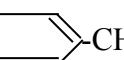


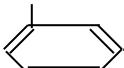
**Hình 3.9 Cấu tạo chung của phân tử penicillin**

Ngày nay, người ta biết được nhiều loại penicillin chúng chỉ khác nhau bởi mạch bên. Ví dụ:

- mạch bên của penicillin F là  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$
- mạch bên của penicillin K là  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_3\text{-CH}_2\text{-}$
- mạch bên của penicillin O là  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-}$

- mạch bên của penicillin G là  - $\text{CH}_2\text{-}$

- mạch bên của penicillin G là HO- - $\text{CH}_2\text{-}$

- mạch bên của penicillin V là  - $\text{O-CH}_2\text{-}$

Penicillin lần đầu tiên phát hiện có tác dụng chống vi khuẩn gram dương *Staphylococcus*, *Diplococcus*...nhưng hầu như không có tác dụng chống vi khuẩn gram âm và nấm men. Vài thập niên trở lại đây đã phát hiện ra nhiều loại penicillin mới trong đó một số có hiệu quả chống lại vi

khuẩn gram âm và nấm men, ví dụ: ở nồng độ cao (10 mg/ml) pencillin có khả năng chống các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đơn bội và *E. coli*.

#### 3.4.2. Gramicidin.

Gramicidin được phát hiện từ năm 1942 và bao gồm hai loại là gramicidin S có 5 amino acid và gramicidin J có 24 amino acid, chúng đều là những peptide có cấu trúc vòng.

Với nồng độ vài mg/ml gramicidin có tác dụng chống được *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus*, *Meningococcus*, *Staphylococcus aureus* và *Neiseria*. Các chất gramicidin được dùng để điều trị các bệnh nhiễm trùng do tụ cầu, liên cầu quàng, nhiễm trùng máu hậu sản, viêm họng, viêm màng não v.v...

#### 3.4.3. Tyrocidin.

Tyrocidin được phát hiện vào năm 1939 bởi Dubos khi lên men vi khuẩn *B. brevis*. Tyrocidin kết hợp với gramicidin tạo thành tyrothricin. Khi thuỷ phân tyrocidin trong môi trường acid thấy có các amino acid của dạng L như sau: ornitine, valine, leucine, proline, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, glutamic, asparaginic. Tyrocidin lai tiếp tục phân huỷ thành các tyrocidin A, B và C.

Cũng giống như gramicidin ở nồng độ vài mg/ml tyrocidin đều có tác dụng chống các loại vi khuẩn như *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus*, *Meningococcus*, *Staphylococcus aureus* và *Neiseria*.

#### 3.4.4. Bacitracin.

Bacitracin được Johnson và cộng sự phát hiện từ năm 1945 từ dịch chiết của vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (thuộc nhóm *B. subtilis*). Bacitracin bao gồm 10 loại khác nhau là : bacitracin A, A<sub>1</sub>, B, C, D, E, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> và G. Trong đó bacitracin A chiếm nhiều nhất (37%). Bacitracin A cấu trúc là một peptide nhỏ chỉ gồm khoảng 10 amino acid sau: L-leucine, L-lysine, -L-isoleucine, L-cysteine, L-asparaginic, glutamic, D-asparaginic D-phenylalanin, D-ornitin.

Bacitracin tuy không có hoạt tính chống vi khuẩn gram âm, nhưng lại có hoạt tính mạnh mẽ chống vi khuẩn gram dương, 1đơn vị /ml có thể chống được *S. pyogenes*, *S. hemolyticus*, *S. albus*, *Clostridium welchii*, ...Bacitracin được dùng nhiều trong chăn nuôi và công nghiệp thực phẩm.

#### 3.4.5. Polymycin.

Polymycin được phát hiện cùng một lúc vào năm 1947 bởi ba nhóm nhà khoa học của Mỹ và Anh từ dịch chiết của vi khuẩn *Bac.*

*Polymixa*. Polymycin là một hỗn hợp bao gồm các chất gần giống nhau gọi là polymycin A, B, C, E và M. Chúng đều là những peptide có tính chất kiềm, dễ tạo thành muối với acid hữu cơ và vô cơ.

Polymycin có hoạt tính mạnh mẽ chống vi khuẩn gram dương và âm, đặc biệt có khả năng chống các vi khuẩn mủ xanh (*Ps.aeruginosa*) đã kháng lại các chất kháng sinh khác.

### *3.5. Các peptide có ý nghĩa sinh lý tế bào*

Các peptide có ý nghĩa sinh lý tế bào thường chủ yếu là các peptide hormon đã được giới thiệu ở trên. Trong phần này chỉ mang tính chất nêu lên những tính chất cơ bản trong hoạt động sinh lý ở tế bào.

Đó là những peptide có từ 3 đến khoảng 200 amino acid. Nó gồm những hormon của các tuyến vùng dưới đồi, tuyến yên, tuyến tuy, v.v... Sự tổng hợp hormon peptide xảy ra ở lưỡi nội chất nguyên sinh dưới dạng một chuỗi polypeptide dài hơn, đó là một tiền hormon (pro-hormon) chẳng hạn như pro-insulin đối với insulin, proglucagon đối với glucagon... Những hormon peptide lưu thông trong máu dưới dạng tự do, có nữa đời sống ngắn (thường dưới 60 phút), thời gian đáp ứng ngắn (vài giây cho tác dụng tăng đường huyết của glucagon hoặc chống lợi niệu của vasopressin). Các hormon peptide không vào trong tế bào “đích” mà tác dụng trên bề mặt của thụ thể (receptor) đặc hiệu ở màng tế bào.

### *3.6. Các peptide có chức năng bảo vệ*

Trong cơ thể động, thực vật có những peptide làm nhiệm vụ bảo vệ cho cơ thể. Loại peptide đầu tiên phải kể đến ở động vật có xương sống đó là các peptide kháng thể trong máu. Chúng là những yếu tố nhận biết đặc lực các tác nhân vi khuẩn, virus và các vật lạ xâm nhập vào cơ thể và để loại trừ chúng ra khỏi cơ thể. Ngoài ra trong máu của động vật trên còn có các interferon với một nồng độ nhỏ có khả năng chống lại sự xâm nhiễm của virus. Trong máu của động vật còn có các peptide chống chảy máu như fibrin v.v... Ở thực vật có nhiều loại tạo ra những peptide độc tố, chỉ với một liều lượng nhỏ cũng đã có khả năng giết chết người và động vật. Ngoài ra trong cơ thể động vật, thực vật và các sinh vật khác nói chung đều tồn tại một hợp chất có bản chất peptide là nhiệm vụ bảo vệ đó là lectin. Vì có khả năng liên kết đường một cách đặc hiệu và chọn lọc, nên lectin có thể kết tủa các tác nhân hay tế bào lạ có cấu trúc đường xâm nhập vào cơ thể để bảo vệ cơ thể. Vì thế nhiều người còn cho lectin là kháng thể thực vật (xem chương 1).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chán, Đỗ Đình Hò, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trần Châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo
3. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyết. 1999. Vi sinh vật học. NXB Giáo dục.
4. Lê Đức Trình. 1998. Hormon. NXB Y học. Hà nội
5. Nguyễn Viết Tựu, 1980. Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc. nhà xuất bản Y học TP Hồ Chí Minh.
6. Copeland R. A., 2000. Enzymes; A Practical Introduction To Structure; Mechanism & Data Analysis. Willey-VCH. A John Wiley & Sons, INC., Pub. 2<sup>nd</sup> ed.
7. Daniel C. L., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
8. Dennison C., 2002. A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
9. Hans U. B. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Second English Edition Academic Press, Inc., New York San Francisco London, Vol., 4.
10. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition. W.H Freeman.
11. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5<sup>th</sup> ed, W.H Freeman.

## Chương 4 Cấu trúc và tính chất lý-hoá của protein

### I. Các quan điểm khác nhau về nghiên cứu cấu trúc protein

Như đã biết, protein là những phần chức năng của cơ thể, sự hình thành chức năng mới dựa trên cơ sở thành phần cấu trúc của protein, hay nói cách khác giữa chức năng và thành phần cấu trúc trong protein có liên hệ mật thiết với nhau. Từ đó sự nghiên cứu cấu trúc protein có thể dựa trên các quan điểm: nghiên cứu thành phần cấu trúc hoặc dựa vào chức năng sinh học để tìm hiểu cấu trúc của chúng. Chẳng hạn, việc nghiên cứu xác định cấu trúc bậc I của phân tử protein là bước đầu tiên quan trọng để xác định phân tử hoạt tính sinh học và tính chất hoá lý của protein, là cơ sở để xác định cấu trúc không gian của phân tử protein. Dựa vào cấu trúc không gian của các phân tử protein tương đồng, có thể dự đoán sự định vị cầu disulfua, cấu trúc không gian của protein nghiên cứu. Ngược lại sự xuất hiện một bệnh lý đặc trưng nào đó liên quan đến thay đổi chức năng của protein mà nguyên nhân chỉ là thay đổi 1 gốc amino acid trong phân tử. Ví dụ: bệnh thiếu máu hồng cầu hình lưỡi liềm, khi nghiên cứu cấu trúc bậc I của hemoglobin bình thường và bệnh lý đã xác định được đó là do gốc amino acid glutamic ở vị trí thứ 6 trong chuỗi  $\beta$  của hemoglobin A (bình thường) bị thay thế bằng gốc amino acid valine

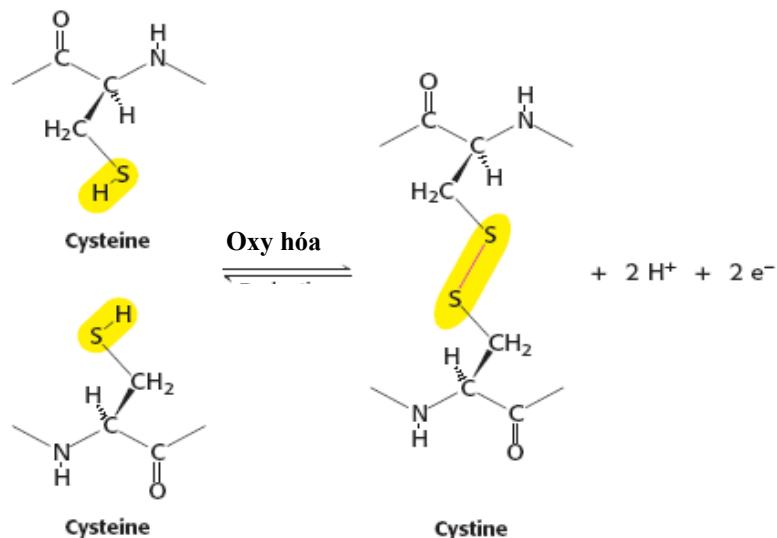
### II. Các kiểu liên kết trong cấu trúc protein

#### 2.1. Các liên kết cộng hoá trị

Trong phân tử protein ngoài các liên kết cộng hoá trị bình thường, người ta thường nhắc đến hai kiểu liên kết cộng hoá trị đặc biệt có ý nghĩa quan trọng đối với cấu trúc và chức năng của chúng đó là:

- Liên kết peptide (xem chương 3).
- Liên kết disulfua (-S-S-).

Liên kết disulfua là liên kết đồng hoá trị tạo thành do sự kết hợp giữa hai phân tử cysteine với nhau loại đi 2H (hình 4.1). Liên kết disulfua (còn gọi là cầu disulfua) có thể hình thành giữa hai phân tử cysteine trong cùng một chuỗi polypeptide hoặc giữa hai cysteine thuộc hai chuỗi polypeptide khác nhau. Cầu disulfua có vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc bậc III của phân tử protein. Những phân tử protein càng chứa nhiều cầu disulfua thì càng chặt chẽ, vững bền. những protein không tan như protein của lông, móng, tóc, sừng rất vững bền với các tác nhân hoá học, chứa tới 12% là cysteine

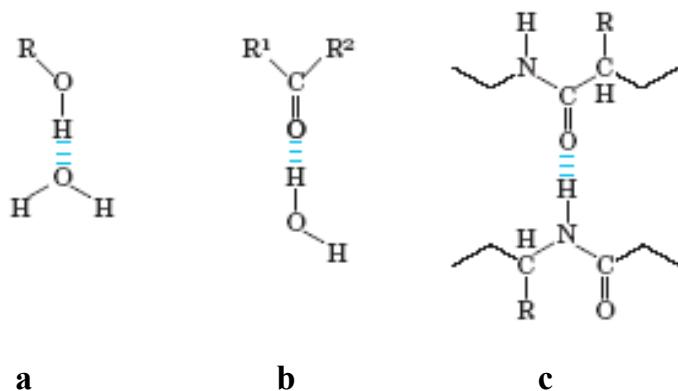
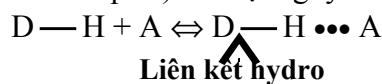


**Hình 4.1** Sự hình thành cầu disulfua giữa hai phân tử cysteine

## 2.2. Các liên kết yếu làm ổn định cấu trúc protein

### 2.2.1. Liên kết hydro

Là tương tác yếu hình thành giữa một nguyên tử mang điện tích âm (gọi là nguyên tử nhận A-acceptor) và một nguyên tử hydro (H) đang nằm

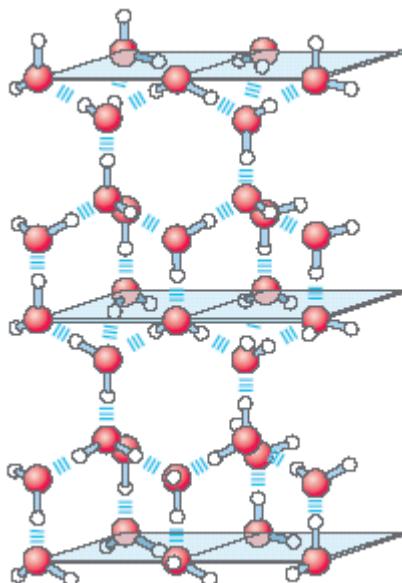


**Hình 4.2** Một số liên kết hydro quan trọng trong hệ thống sống

Ghi chú: a) giữa hydro của một ancohol và oxy của nước; b) giữa nhóm carbonyl keto và nước; c) giữa nhóm peptide trong polypeptide;

trong một nối cộng hoá trị với một nguyên tử khác (gọi là nguyên tử cho D- donor). Nối cộng hoá trị giữa D và H phải là nối phân cực và đam mây điện tử của A phải mang những điện tử không liên kết có khả năng thu hút điện tích  $\delta^+$  của H.

Năng lượng cần để phá vỡ một liên kết hydro là khoảng 5 kcal mol<sup>-1</sup>. Một đặc điểm quan trọng của các liên kết hydrogengen là H, nguyên tử nhận A, nguyên tử cho D đều xếp trên một đường thẳng. Nguyên tử N trong liên kết N-H cũng như O trong liên kết O-H đều là những nguyên tử cho chính. Trong hệ thống sống đó là các nhóm amine (-NH<sub>2</sub>) và hydroxyl (-OH), sự hiện diện của các nhóm này khiến cho các phân tử có mang chúng dễ hòa tan trong nước do có sự hình thành các liên kết hydrogengen giữa chúng. Đặc biệt, các phân tử nước H<sub>2</sub>O - nhân tố chủ yếu của vật chất sống luôn luôn hình thành một mạng lưới đều đặn những hình tứ diện dù ở thể lỏng hay thể rắn.



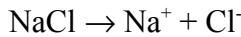
**Hình 4.3 Sơ đồ cấu trúc mạng lưới hình thành bởi các phân tử H<sub>2</sub>O**

- Nguyên tử oxy biểu thị bằng các vòng tròn lớn
- Nguyên tử hydro được biểu thị bằng các vòng tròn nhỏ

### 2.2.2. Liên kết ion

Là tương tác tĩnh điện giữa hai nhóm có điện tích ngược dấu. Trong nhiều trường hợp chất vô cơ, điện tử liên kết luôn bị hút về

phía nguyên tử có độ âm điện cao hơn gây ra sự phân li cation (nguyên tử tích điện tích âm) và anion (nguyên tử tích điện dương), ví dụ:



Vì điện tử liên kết không được phân chia đồng đều cho hai nguyên tử nên liên kết này không được xếp vào loại các liên kết công hoá trị. Khác với các liên kết cộng hoá trị hay liên kết hydro, các liên kết ion không có định hướng trong không gian vì điện trường là không đồng đều quanh ion. Trong môi trường nước, các anion và cation luôn luôn được vây bọc bởi các phân tử  $\text{H}_2\text{O}$  tạo thành một lớp vỏ bọc ngoài nên không thể liên kết trực tiếp với các anion và cation khác. Do đó, người ta cho rằng tương tác tĩnh điện này không đóng vai trò quan trọng quyết định cấu hình không gian của các phân tử hữu cơ.

### 2.2.3. Liên kết Van der Waals

Là các tương tác không đặc hiệu xuất hiện giữa hai nguyên tử khi chúng tiến lại gần nhau. Tương tác này không do sự phân phối lệch của các điện tử giữa hai phân tử mà do các biến động thoáng qua của đám mây điện tử gây ra sự phân cực nhất thời trên phân tử. Liên kết Van der Waals là kết quả của lực hút và lực đẩy. Hai lực này cân bằng ở một khoảng cách nhất định, đặc trưng cho từng loại nguyên tử. Khoảng cách này được gọi là bán kính Van der Waals. Đây là lực liên kết yếu nhất, với giá trị chỉ khoang 1 k cal mol<sup>-1</sup>.

Để liên kết này thật sự có ý nghĩa, nó phải tồn tại một số lượng lớn, nghĩa là bề mặt tiếp xúc giữa hai phân tử phải cực đại. Diễn hình là khi một phân tử có mang một hốc có hình dáng phù hợp với chỗ lồi trên phân tử kia như trường hợp tương tác giữa kháng nguyên - kháng thể, giữa enzyme - cơ chất.

### 2.2.4. Liên kết kị nước (tương tác kị nước)

Các phân tử không phân cực, tức là các phân tử không chứa nhóm ion hoá lẫn liên kết phân cực, đều không hòa tan trong nước, chúng là những phân tử kị nước. Lực thúc đẩy các phân tử hay các vùng không phân cực của các phân tử liên kết với nhau thay vì với các phân tử  $\text{H}_2\text{O}$  (đẩy phân tử  $\text{H}_2\text{O}$  ra ngoài) được gọi là liên kết kị nước. Đây không phải là một lực liên kết đúng nghĩa mà là khuynh hướng loại trừ các nhóm không phân cực ra khỏi mạng lưới nước. Còn liên kết thật sự tồn tại giữa các phân tử không phân cực là liên kết Van der Waals. Các tương tác kị nước đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định các protein, các phức protein với các phân tử khác cũng như sự phân bố các protein trong các màng sinh học.

### **III. Hình dạng kích thước và cấu trúc của phân tử protein**

#### **3.1. Hình dạng kích thước**

Protein có khối lượng phân tử (Mr) tương đối lớn và thay đổi trong một dải rộng từ hơn 10 nghìn đến hàng trăm nghìn dalton (bảng 4.1). Các phân tử protein có thể có dạng cầu (kể cả hình bầu dục) hoặc dạng sợi. Thuộc về dạng cầu hầu hết là những protein có hoạt tính xúc tác hoặc vận chuyển như enzyme, hemoglobin, globulin...tỷ lệ giữa trực dài và trực ngắn của phân tử bé hơn hoặc bằng 20. Ở các protein hình sợi tỷ lệ này lớn hơn nhiều ví dụ tropocolagen (đơn vị cấu trúc cơ sở của collagen) có chiều dài khoảng  $3000\text{ }\text{\AA}^{\circ}$ , đường kính khoảng  $15\text{ }\text{\AA}^{\circ}$ . Các protein hình sợi tương đối trơ về mặt hóa học, chủ yếu giữ chức năng cấu trúc chống đỡ cơ học ví dụ: collagen của da, xương, sụn, gân, răng; keratin của tóc, lông; fibroin của tơ; myosine của cơ v.v...

#### **3.2. Cấu trúc bậc nhất (cấu trúc sơ cấp)**

Cấu trúc bậc I biểu thị thành phần và trình tự các amino acid trong phân tử protein, cấu trúc này được giữ vững bằng liên kết peptide-liên kết cộng hoà trị (xem chương 3). Cấu trúc bậc I là bản dịch của mã di truyền, việc xác định cấu trúc bậc I là cơ sở để tổng hợp nhân tạo protein bằng phương pháp hoá học hoặc bằng các biện pháp công nghệ sinh học. Ví dụ: năm 1953, lần đầu tiên Frederick Sanger (người Anh) đã xác định trình tự sắp xếp các amino acid trong phân tử insulin và đến năm 1966 protein này lần đầu tiên đã được tổng hợp bằng phương pháp hoá học. Ngày nay người ta đã có thể dùng vi khuẩn *Escherichia coli* để tổng hợp insulin (sẽ trình bày kỹ hơn ở chương 6).

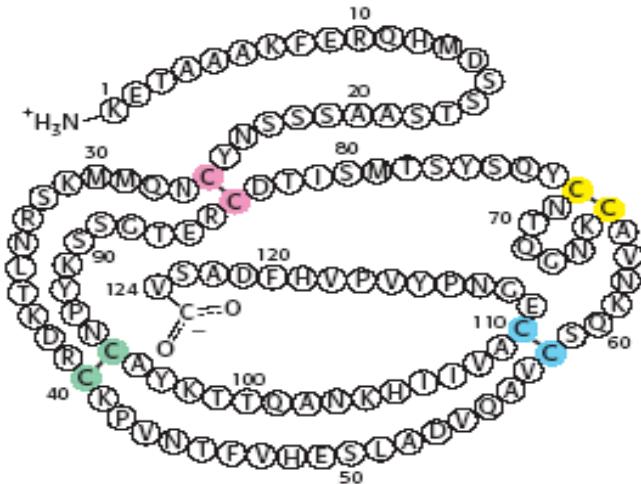
##### **3.2.1. Cấu trúc bậc I của một số protein đã biết**

Bằng các phương pháp xác định trình tự amino acid của protein, ngoài một số loại protein đã biết rõ cấu trúc bậc I như insulin đã được trình bày ở chương 3, hiện nay nhiều loại protein khác đã biết được trình tự các amino acid trong chuỗi polypeptide như: ribonuclease là một protein có 124 amino acid, nối với nhau thành một chuỗi (hình 4.4); hemoglobin là protein có 4 chuỗi polypeptide, 2 chuỗi  $\alpha$  (mỗi chuỗi 141 amino acid) và 2 chuỗi  $\beta$  (mỗi chuỗi 146 amino acid); tripsinogen bò (229 amino acid); chymotrypsin bò (229 amino acid); alcohol dehydrogenase ngựa (374 amino acid); glutamate dehydrogenase bò (500 amino acid) v.v..

##### **3.1.2. Tính quy luật trong cấu trúc bậc nhất của protein**

Những protein đồng thể của những loài khác nhau có một số gốc amino acid tương đối không đổi ở những vị trí đặc biệt và có những gốc amino acid thay đổi, nghĩa là ở những loài khác nhau, các amino acid khác

có thể thay thế cho nhau. Thí dụ insulin của nhiều loài khác nhau có những amino acid khác nhau ở vị trí 8, 9, 10 (bảng 4.1), tương tự như đối với oxytocin, vasopressin, vasotocin ở một số loài động vật khác.



**Hình 4.4 Cấu trúc bậc nhất của ribonucleasae của bò**

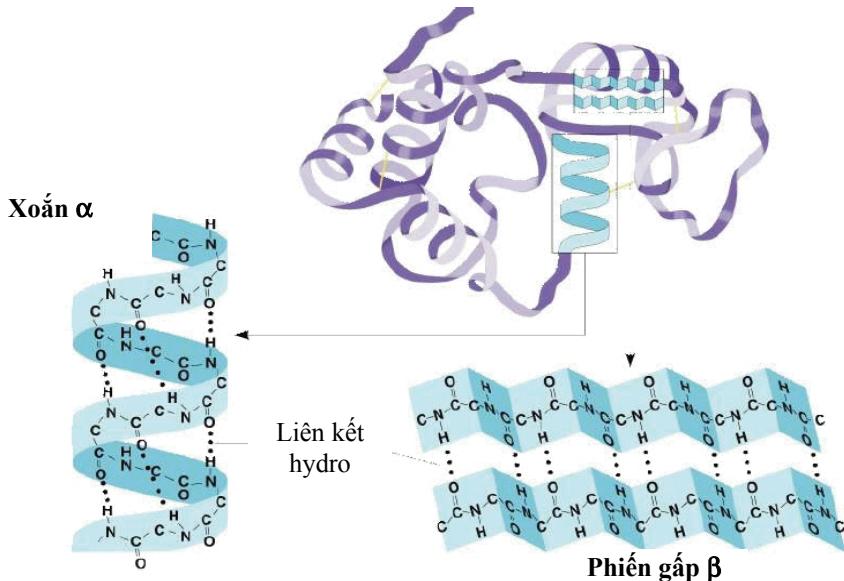
**Bảng 4.1 Sự thay thế amino acid trong chuỗi A của insulin ở một số loài**

Loài	Vị trí của amino acid		
	8	9	10
Bò	Ala	Ser	Val
Lợn	Thr	Ser	Ile
Cừu	Ala	Gly	Val
Ngựa	Thr	Gly	Ile
Cá nhà táng	Thr	Ser	Ile
Người	Thr	Ser	Ile
Chó	Thr	Ser	Ile
Thỏ	Thr	Ser	Ile

### 3.3 Cấu trúc bậc II (cấu trúc thứ cấp)

Biểu thị của cấu trúc bậc II là sự xoắn của chuỗi polypeptide, là tương tác không gian giữa các gốc amino acid ở gần nhau trong mạch polypeptide tạo thành hai dạng xoắn  $\alpha$  và xắn  $\beta$ . Nói cách khác, là dạng không gian cục bộ của từng phần trong mạch polypeptide. Cấu trúc này

được làm bền nhờ các liên kết hydro được tạo thành giữa liên kết peptide ở kề gần nhau, cách nhau những khoảng xác định.



**Hình 4.5 Các kiểu xoắn trong cấu trúc bậc II của protein**

### 3.3.1. Phương pháp nghiên cứu cấu trúc bậc II

Hiện nay người ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau để phân tích cấu trúc bậc II của phân tử protein như phổ hồng ngoại, phổ tử ngoại- khả kiến, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, trao đổi hydro nặng, đo độ chiết quang v.v..., cơ sở của một số phương pháp thường hay được dùng để phân tích cấu trúc bậc II của protein dựa trên những nguyên tắc riêng sau:

- Phổ hồng ngoại: phổ hấp thụ hồng ngoại chính là phổ dao động quay, vì khi hấp thụ bức xạ hồng ngoại thì cả chuyển động dao động và chuyển động quay đều bị kích thích. Phổ quay của phân tử không những là phương pháp quý để nhận dạng các chất mà còn cho phép xác định chính xác khoảng cách giữa các hạt nhân nguyên tử và góc giữa các liên kết.

- Phổ tử ngoại- khả kiến: Khi phân tử hấp thụ bức xạ tử ngoại hoặc khả kiến thì những electron hóa trị của nó bị kích thích và chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Vì thế phổ thu được gọi là phổ tử ngoại khả kiến (Ultraviolet and Visible Spectra, viết tắt là UV-Vis) và cũng được gọi là phổ hấp thụ electron. Mỗi trạng thái electron ứng với một đường cong thể năng và do đó ứng với một giá trị xác định của tần số dao động riêng của phân tử.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Dựa trên nguyên lí sử dụng các neutron và các proton trong hạt nhân nguyên tử, số lượng spin của proton và neutron đều bằng nhau và bằng  $1/2$ . Tuỳ thuộc vào việc các spin của những hạt nucleon đó có cặp đôi hay không mà hạt nhân của nguyên tử có thể được đặc trưng bởi một số lượng tử spin hạt nhân ( $I$ ) bằng không hay khác không. Nếu ở hạt nhân có một spin không cặp đôi thì  $I = 1/2$ , nếu có nhiều spin không cặp đôi thì  $I \geq 1$ . Nếu chiếu vào mẫu dung dịch protein sóng vô tuyến có tần số xác định, thì các hạt nhân ở mức năng lượng thấp sẽ hấp thụ năng lượng của sóng vô tuyến để chuyển lên mức cao. Người ta nói lúc đó đã xảy ra cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance, viết tắt là NMR). Từ đó người ta đã thiết kế máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân bao gồm ống chứa dung dịch mẫu được đặt giữa từ trường của một nam châm mạnh. Một máy phát cung cấp sóng radio. Một máy thu sóng radio theo dõi sự hấp thụ năng lượng thông qua cuộn cảm bao quanh mẫu, tín hiệu cộng hưởng từ được khuếch đại, phân tích và truyền sang bút tự ghi để vẽ phổ. Máy cộng hưởng từ hạt nhân được phát hiện từ năm 1946, ứng dụng vào hoá hữu cơ năm 1953, ngày nay càng được phát triển và hoàn thiện. Nó là công cụ đắc lực cho các nhà hoá học trong việc xác định cấu trúc phân tử protein.

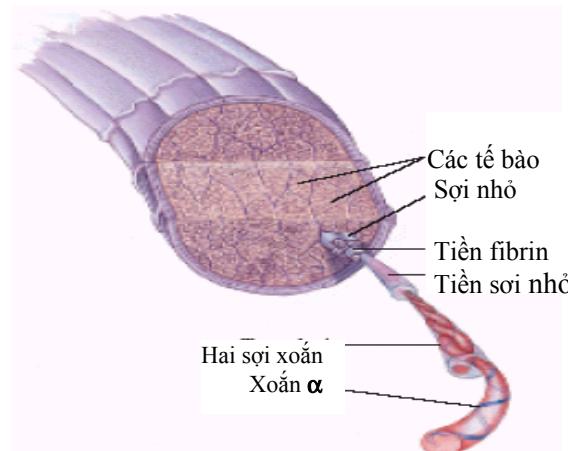
- Trao đổi hydro nặng: Dựa trên nguyên tắc các hydro nặng  $H^2$  (thường được ký hiệu là D-deuterium) và  $H^3$  (thường được ký hiệu là T tritium) để thay thế cho các hydro bình thường đang nằm trong các liên kết trong cấu trúc phân tử protein. Từ đó nhờ hình ảnh phổ đặc trưng được phát ra từ các loại hydro nặng đó để xác định cấu trúc của phân tử.

### 3.3.2. Cấu trúc bậc II của một số protein đã biết

Theo Paulin và Cori (1951) cấu trúc bậc II của protein bao gồm 2 kiểu chính là xoắn  $\alpha$  và phiến gấp  $\beta$

**Bảng 4.2. Số lượng xoắn  $\alpha$  và phiến gấp  $\beta$  trong chuỗi đơn một số protein**

Protein (số gốc)	số gốc (%)	
	Xoắn $\alpha$	Phiến gấp $\beta$
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (397)	38	17
Cytochrom C (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0



**Hình 4.6 Lát cắt ngang sợi tóc với chuỗi xoắn  $\alpha$  keratin**

Ở trong tóc người ta tìm thấy keratin (hình 4.6) là loại protein có hai dạng cấu trúc: dạng  $\alpha$  bình thường và dạng  $\beta$  đuôi thẳng.; cấu trúc phiến gấp  $\beta$  tìm thấy trong fibroin của tơ.



**Hình 4.7 Cấu trúc kiểu xoắn collagen**

Cấu trúc xoắn  $\alpha$  hiện nay được tìm thấy trong nhiều loại protein khác nhau. Mặt khác tỷ lệ % xoắn  $\alpha$

trong các protein khác nhau cũng thay đổi khá nhiều. Ví dụ trong hemoglobin và mioglobin là 75%; lisozym là 35%; ribonuclease là 17% ...

- Ngoài ra còn có kiểu xoắn collagen được tìm thấy trong phân tử collagen (hình 4.7), đơn vị cấu trúc của nó là tropocolagen bao gồm 3 mạch polypeptide bện vào nhau thành một dây cáp siêu xoắn (vì mỗi mạch đơn có cấu trúc xoắn chiều cao của mỗi gốc xoắn trên trực siêu xoắn này là 2,9 anstron, một vòng xoắn là 3,3 gốc amino acid). Ba mạch polypeptide trong “dây cáp” nối với nhau bằng các liên kết hydro.

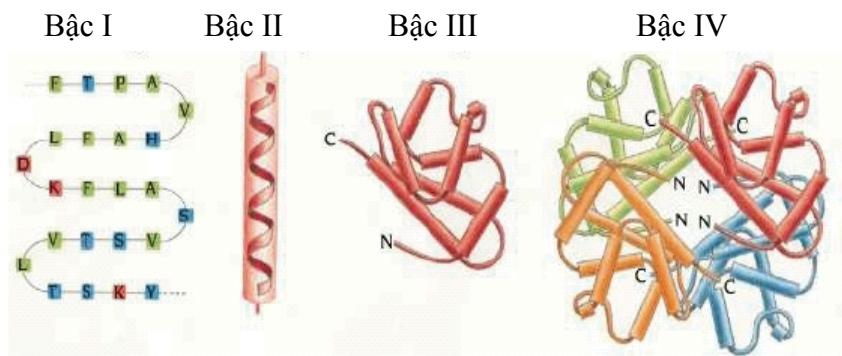


### 3.4. Cấu trúc không gian của protein

#### 3.4.1. Định nghĩa và khái niệm về cấu trúc không gian

Bằng phương pháp nhiễu xạ tia X, người ta đã nghiên cứu cấu trúc không gian ba chiều của các phân tử protein, đó là hình dạng do sự xoắn để tạo xoắn  $\alpha$  và phiên gấp  $\beta$  tạo thành cấu trúc bậc II, đó là hình dạng do

sự cuộn lại của các chuỗi có cấu trúc bậc II để tạo thành cấu trúc bậc III và vị trí của sự sắp xếp các protein có cấu trúc bậc III đó trong không gian để tạo thành cấu trúc bậc IV (hình 4.8).



**Hình 4.8** Sơ đồ các bậc cấu trúc của phân tử protein

Trong cấu trúc không gian ngoài liên kết hydro thì liên kết cầu disulfua trong cấu trúc bậc II và đặc biệt trong cấu trúc bậc III có ý nghĩa hết sức quan trọng để giữ cấu trúc cuộn khúc của chuỗi polypeptide thành khối. Đặc trưng cho protein hình cầu, là tương tác không gian giữa các gốc amino acid ở xa nhau trong mạch polypeptide. Trong nhiều protein cầu có chứa các gốc Cys tạo nên liên kết disulfua giữa các gốc Cys xa nhau trong mạch polypeptide làm cho mạch bị cuộn lại. Ngoài ra cấu trúc bậc III còn được giữ vững bằng các loại liên kết khác như Van der Waals, liên kết hydro, liên kết tĩnh điện giữa các gốc amino acid v.v...

Cấu trúc bậc IV chỉ đặc trưng cho những phân tử protein có cấu trúc từ hai hay nhiều chuỗi protein hình cầu, tương tác với nhau sắp xếp trong không gian tạo nên. Mỗi một chuỗi polypeptide đó được gọi là một tiểu đơn vị (subunit), chúng gắn với nhau nhờ các liên kết hydro, tương tác Van der Waals giữa các nhóm phân bố trên bề mặt của các tiểu đơn vị để làm bền cấu trúc bậc IV.

Như vậy ta có thể định nghĩa một cách ngắn gọn cấu trúc không gian của protein là hình dạng của phân tử protein được cấu thành do sự sắp xếp trong chuỗi và giữa các chuỗi polypeptide trong không gian.

### 3.4.2. Xác định khối lượng phân tử của protein

Để xác định khối lượng của phân tử protein người ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau như: phương pháp khuyếch tán, phương pháp phân tích ronghen, phương pháp tán xạ ánh sáng v.v... Tuy nhiên, các phương pháp khác nhau thường cho những kết quả khác nhau. Sau đây xin giới thiệu một số phương pháp có độ tin cậy cao và thường được sử dụng để xác định khối lượng phân tử protein.

#### - Phương pháp ly tâm siêu tốc

Dựa trên sự xác định tốc độ lắng (hàng số lắng) của protein trong dung dịch chịu sự ly tâm tốc độ rất lớn (hàng trăm ngàn vòng trong 1 phút) rồi tính khối lượng phân tử (Mr) theo công thức

$$Mr = \frac{RTS}{D(1 - VP)}$$

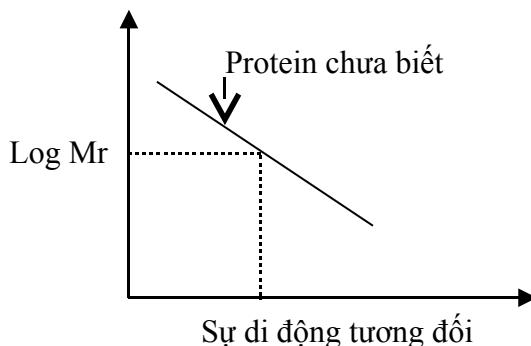
Trong đó R là hằng số khí tính theo erg mol<sup>-1</sup> độ<sup>-1</sup>, T là nhiệt độ tuyệt đối, S là hằng số lắng tính theo đơn vị Svedberg (đơn vị Svedberg được ký hiệu bằng chữ S và bằng 10<sup>-13</sup> giây), D là hệ số khuyếch tán, V là thể tích riêng phần của protein, P là tỷ trọng của dung môi.

**Bảng 4.3 Mối liên quan giữa hằng số lắng (S) và khối lượng phân tử của một số protein**

Protein	Trị số S (đơn vị Svedberg)	Khối lượng (KDa)
Chất úc ché pancreatic trypsin	1	6,520
Cytochrom C	1,83	12,310
Ribonuclease A	1,78	13,690
Myoglobin	1,97	17,800
Trypsin	2,5	23,200
Carbonic anhydrase	3,23	28,800
Concanavalin A	3,8	51,260
Malate dehydrogenase	5,76	74,900
Lactate dehydrogenase	7,54	146,200

### - Phương pháp điện di

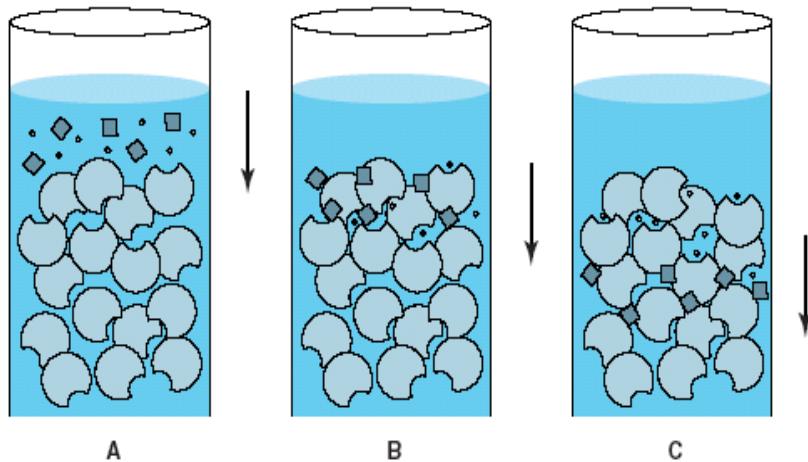
Dựa trên nguyên tắc là khả năng di chuyển và phân bố trên giá thể (thường là gel polyacrylamide hay agarose) của từng loại protein trong điện trường. So sánh với các protein đã biết trước khói lượng (protein chuẩn) để xác định khói lượng protein mẫu cần tìm. Khói lượng (hay trọng lượng phân tử  $Mr$ ) được xác định tương quan với sự di động điện di của một phân tử protein trên gel polyacrylamide chứa SDS (SDS-PAGE). Người ta lập đồ thị chuẩn theo  $\log Mr$  của các protein đã biết khói lượng (marker) tỷ lệ hay tương quan đối với sự di động tương đối của các protein. Căn cứ vào đồ thị này sẽ tính được  $Mr$  của protein chưa biết khói lượng phân tử. Hình 4.9.



**Hình 4.9    Cách lập đồ thị chuẩn để tính  $Mr$  của protein**

### - Phương pháp sắc ký lọc gel (lọc sàng phân tử)

Người ta có thể dùng phương pháp sắc ký lọc gel để phân tách các protein có khói lượng phân tử và kích thước khác nhau. Gel được dùng thường là sephadex. Đó là một polysaccharide đặc biệt, hydrate hoá rất mạnh thành những hạt gồm những phân tử polysaccharide kết hợp với nhau bằng những liên kết ngang tạo nên những lỗ “rây” phân tử trong không gian với các lỗ có kích thước nhất định (liên kết ngang càng nhiều thì lỗ rây càng bé và ngược lại). Sephadex được nhồi vào cột cùng với dung dịch đậm rồi cho hỗn hợp protein chảy qua, dung dịch protein xuống cột theo trọng lực, các phân tử phân tử protein nhỏ có thể lọt vào lỗ rây nên chảy xuống cột chậm hơn các phân tử protein lớn không lọt vào lỗ rây (hình 4.10). Kết quả là hứng được riêng từng loại protein sau những thời gian nhất định. Xác định khói lượng protein bằng cách dùng phương pháp ngoại suy với một số protein mẫu đã biết khói lượng phân tử.



**Hình 4.10 Sơ đồ minh họa sắc ký lọc gel**

- A-Hỗn hợp gồm cả phân tử lớn và nhỏ
- B- Các phân tử nhỏ chui vào sâu trong lỗ gel
- C- Các phân tử lớn đang được rút ra ngoài còn các phân tử nhỏ tạm thời được giữ lại

### 3.4.3. Cấu trúc không gian một số protein đã biết

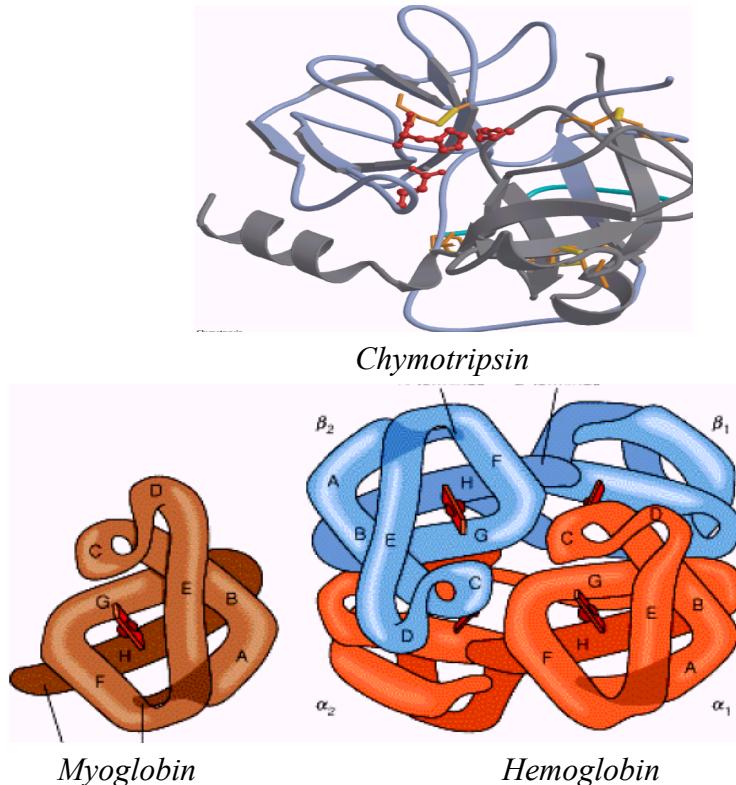
Nhờ sự phát triển ngày càng tiến bộ, ngày nay người ta đã biết cấu trúc bậc I cũng như không gian của nhiều loại protein có vai trò quan trọng trong cơ thể (xem bảng 1.1).

Ngoài cấu trúc không gian của một số protein đã giới thiệu trong phần cấu trúc bậc II ở trên, từ lâu người ta cũng đã biết cấu trúc không gian (bậc III và IV) của nhiều protein có vai trò đặc biệt quan trọng khác như: hemoglobin là protein được nhắc đến nhiều nhất, có khối lượng 64.5 kDa, được cấu trúc từ 547 amino acid nằm trong 4 chuỗi polypeptide, 2 chuỗi  $\alpha$  và 2 chuỗi  $\beta$ ; myoglobin chỉ gồm một chuỗi polypeptide kết hợp với nhân hem và chymotripsin là protein có khối lượng 22.6 kDa, cấu tạo từ 241 amino acid tạo thành 3 chuỗi polypeptide (hình 4.11).

### 3.4.4. Các điều kiện làm bền vững cấu trúc không gian

Như đã biết cấu trúc không gian của phân tử protein được ổn định ngoài nhờ một số liên kết disulfua bền vững, thì phân tử lớn là nhờ các liên kết yếu như liên kết hydro, liên kết Van der Waals v.v... Vì vậy các điều kiện để làm ổn định cấu trúc của protein là phải tránh những tác động có

thể làm phá vở những liên kết đó như: tác động mạnh của cơ học, nhiệt độ, độ pH, các muối kim loại nặng v.v... (sẽ được giới thiệu kỹ hơn trong mục biến tính protein ở phần sau).



**Hình 4.11 Cấu trúc của không gian của một số phân tử protein**

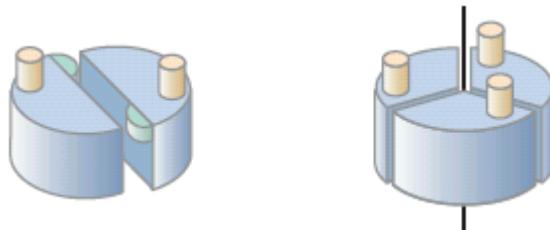
### 3.4.5. Tính quy luật trong cấu trúc bậc IV của protein

Các protein có cấu trúc bậc IV, phân tử có thể được cấu tạo từ hai cho tới hàng trăm tiểu đơn vị. Tuy nhiên phần lớn các phân tử protein được cấu trúc từ các tiểu đơn vị đồng nhất hoặc từ các nhóm tiểu đơn vị giống nhau, vì thế phân tử protein thường được cấu tạo đối xứng.

Ví dụ: cấu trúc không gian protein được xác định đầu tiên là hemoglobin có khối lượng phân tử 64,5 Kda, gồm 4 chuỗi polypeptide, hai chuỗi  $\alpha$  (141 amino acid mỗi chuỗi) và hai chuỗi  $\beta$  (146 amino acid mỗi chuỗi). Nhờ phân tích cấu trúc bằng tia X Max Peutz và John Kendrew (1959) đã phát hiện sự sắp xếp các tiểu đơn vị trong hemoglobin thành cặp đối xứng, mỗi một cặp gồm một tiểu đơn vị  $\alpha$  và một tiểu đơn vị  $\beta$ . Vì

vậy, có thể coi hemoglobin có cấu trúc 4 tiểu đơn vị hay 2 tiểu đơn vị (mỗi tiểu đơn vị gồm cả  $\alpha$  và  $\beta$ ).

Những protein cấu trúc từ các tiểu đơn vị đồng nhất có một hay một số nhất định kiểu đối xứng như đối xứng quay tròn hay xoắn ốc. Như vậy các tiểu đơn vị có thể xếp chồng lên nhau quanh một hoặc một số trục hay là đường xoắn ốc.



**Hình 4.12 Hai kiểu đối xứng vòng tròn trong cấu trúc protein**

Trong cấu trúc đối xứng quay tròn các tiểu đơn vị sắp xếp xung quanh một trục tạo thành dạng cấu trúc đóng, các protein có cấu trúc đối xứng đường xoắn ốc tạo thành cấu trúc dạng mở mà những tiểu đơn vị có thể xếp thêm vào theo đường xoắn ốc. Có nhiều dạng đối xứng quay tròn mà dạng đơn giản nhất là đối xứng vòng tròn, ở đó các tiểu đơn vị được sắp xếp bao quanh một trục duy nhất (hình 4.12). Ngoài ra trong sự đối xứng quay tròn có thể phân bố phức tạp hơn còn được gọi là đối xứng hai mặt, thậm chí hai mươi mặt như ở cấu trúc vỏ của một số loại vius.

Trong một số ít trường hợp phân tử protein có thể gồm nhiều tiểu đơn vị không đồng nhất thì cấu trúc của chúng có thể không mang tính đối xứng và rất phức tạp.

#### **IV. Tính chất lý -hoá của protein**

##### *4.1. Tính tan của protein*

Các loại protein khác nhau có khả năng hòa tan dễ dàng trong một số loại dung môi nhất định, chẳng hạn như albumin dễ tan trong nước; globulin dễ tan trong muối loãng; prolamin tan trong ethanol, glutelin chỉ tan trong dung dịch kiềm hoặc acid loãng v.v...

##### *4.2. Tính ngâm nước của protein*

Trong môi trường nước, protein kết hợp với nước trương lên trở thành dạng keo hay nói cách khác protein ở trạng thái hydrate hoá, các phân tử nước bám vào các nhóm ura nước trong phân tử protein như  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ..., lớp áo nước bao quanh phân tử protein là một trong các yếu tố

làm bền vững cấu trúc, ngăn cách các phân tử protein không cho chúng dính vào nhau để thành tủa.

#### *4.3. Độ nhót của dung dịch protein*

Khi protein hòa tan trong dung dịch, mỗi loại dung dịch của những protein khác nhau có độ nhót khác nhau (bảng 4.3). Người ta có thể lợi dụng tính chất này để xác định khối lượng phân tử của protein (độ nhót càng cao thì khối lượng phân tử càng cao).

**Bảng 4.4 Độ nhót của một số protein**

Protein	Nồng độ % (trong nước)	Độ nhót tương đối (của nước =1)
Gelatin	3,0	4,54
Albumin trứng	3,0	1,20
Gelatin	8,0	14,2
Albumin trứng	8,0	1,57

#### *4.4. Hằng số điện môi của dung dịch protein*

Khi thêm các dung môi hữu cơ trung tính như ethanol, aceton vào dung dịch protein trong nước thì độ tan của protein giảm tới mức kết tủa do giảm mức độ hydrate hoá của các nhóm ion hoá của protein, lớp áo màng nước, các phân tử protein kết hợp với nhau thành tủa. Như vậy, hằng số điện môi của dung môi làm ngăn cản lực tĩnh điện giữa các nhóm tích điện của protein và nước. Mỗi liên hệ đó được đặc trưng bởi biểu thức:

$$F = \frac{L_1 - l_2}{D r^2}$$

Trong đó: D - hằng số điện môi của dung dịch

F- lực tĩnh điện giữa các ion tích điện

$L_1, l_2$  - điện tích các ion, r - khoảng cách giữa các ion

Ở đây lực tĩnh điện giữa các ion tỷ lệ nghịch với hằng số điện môi và khoảng cách giữa các ion protein.

#### *4.5. Tính chất điện li của protein*

Cũng như các amino acid, protein là chất điện li lưỡng tính vì trong phân tử protein có nhiều nhóm phân cực mạnh (gốc bên R) của amino acid ví dụ: nhóm COOH thứ hai của Asp, Glu; nhóm NH<sub>2</sub> của Lys; nhóm OH

của Ser, Thr, Tyr v.v... Trạng thái tích điện của các nhóm này phụ thuộc vào pH của môi trường. Ở một pH nào đó mà tổng điện tích (+) và điện tích (-) của phân tử protein bằng không, phân tử protein không di chuyển trong điện trường thì giá trị pH đó gọi là  $pH_i$  (isoelectric-điểm đẳng điện) của protein. Như vậy protein chứa nhiều Asp, Glu (amino acid có tính acid mạnh) thì  $pH_i$  ở trong vùng acid, ngược lại nhiều amino acid kiềm như Lys, Arg, His thì  $pH_i$  ở trong vùng kiềm.

Ở môi trường có  $pH < pH_i$ , đa số protein là một cation, số điện tích dương lớn hơn số điện tích âm. Ở  $pH > pH_i$  phân tử protein thể hiện tính acid, cho ion  $H^+$ , do đó số điện tích âm lớn hơn số điện tích dương, protein là một đa anion, tích điện âm.

**Bảng 4.5 Giá trị  $pH_i$  của một số protein**

Protein	$pH_i$	Protein	$pH_i$
Pepsin	1,0	Globulin sữa	5,2
Albumin trứng	4,6	Hemoglobin	6,8
Casein	4,7	Ribonuclease	7,8
Albumin huyết thanh	4,9	Tripsin	10,5
Gelatin	4,9	Cytochrom C	10,6
		Prolamin	12,0

Trong môi trường có  $pH = pH_i$ , protein dễ dàng kết tụ lại với nhau vì thế người ta lợi dụng tính chất này để xác định  $pH_i$  của protein cũng như để kết tủa protein. Một khác do sự sai khác nhau về  $pH_i$  giữa các protein khác nhau, có thể điều chỉnh pH của môi trường để tách riêng các protein ra khỏi hỗn hợp của chúng.

#### 4.6. Sự kết muối của dung dịch protein

Muối trung tính có ảnh hưởng rõ tới độ hoà tan của protein hình cầu: với nồng độ thấp chúng làm hoà tan nhiều protein. Tác dụng đó không phụ thuộc vào bản chất của muối trung tính, mà phụ thuộc vào nồng độ muối và số điện tích của mỗi ion trong dung dịch, tức là phụ thuộc vào lực ion  $\mu$  của dung dịch ( $\mu = 1/2 \sum C_1 Z_1^{-2}$  trong đó  $\sum$  là ký hiệu của tổng,  $C_1$  là nồng độ của mỗi ion,  $Z_1$  là điện tích của mỗi ion). Các muối có ion hoá trị 2 ( $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ ...) làm tăng đáng kể độ tan của protein hơn các muối có ion hoá trị 1 ( $NaCl$ ,  $NH_4Cl$ ,  $KCl$ ...). Khi tăng đáng kể nồng độ muối trung tính thì độ tan của protein bắt đầu giảm và ở nồng độ muối rất cao, protein có thể bị tủa hoàn toàn.

Các protein khác nhau tủa ở những nồng độ muối trung tính khác nhau. Người ta sử dụng tính chất này để chiết xuất và tách riêng từng phần protein khỏi hỗn hợp. Đó là phương pháp diêm tích (kết tủa protein bằng muối). Thí dụ dùng muối amonium sulfate 50% bão hoà kết tủa globulin và dung dịch amonium sulfate bão hoà để kết tủa albumin từ huyết thanh.

#### *4.7. Biểu hiện quang học của protein*

Cũng như nhiều chất hoá học khác, protein có khả năng hấp thụ và bức xạ ánh sáng dưới dạng lượng tử hγ. Vì vậy có thể đo cường độ hấp thụ của protein trong dung dịch hay còn gọi là mật độ quang thường ký hiệu bằng chữ OD (Optical Density). Dựa trên tính chất đó người ta đã sản xuất ra các loại máy quang phổ hấp thụ để phân tích protein. Nhìn chung protein đều có khả năng hấp thụ ánh sáng trong vùng khả kiến (từ 350nm-800nm) và vùng tử ngoại (từ 320nm xuống tới 180nm).

Trong vùng ánh sáng khả kiến protein kết hợp với thuốc thử hấp thụ mạnh nhất ở vùng ánh sáng đỏ 750nm (định lượng protein theo Lowry).

Đối với vùng tử ngoại dung dịch protein có khả năng hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở hai vùng bước sóng khác nhau: 180nm-220nm và 250nm - 300nm.

Ở bước sóng từ 180nm-220nm đó là vùng hấp thụ của liên kết peptide trong protein, cực đại hấp thụ ở 190nm. Do liên kết peptide có nhiều trong phân tử protein nên độ hấp thụ khá cao, cho phép định lượng tất cả các loại protein với nồng độ thấp. Tuy nhiên vùng hấp thụ này của các liên kết peptide trong protein có thể bị dịch về phía có bước sóng dài hơn khi có một số tạp chất lẫn trong dung dịch protein. Mặt khác chính các tạp chất này cũng hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở vùng bước sóng ở vùng bước sóng 180nm-220nm. Vì thế trong thực tế thường đo độ hấp thụ của dung dịch protein ở bước sóng 220nm-240nm.

Ở bước từ 250nm-300nm là vùng hấp thụ các amino acid thơm (Phe, Tyr, Trp) có trong phân tử protein hấp thụ cực đại ở 280nm (xem chương 2). Có thể sử dụng phương pháp đo độ hấp thụ của dung dịch protein ở bước sóng 280nm để định tính và định lượng các protein có chứa các amino acid thơm. Hàm lượng các amino acid thơm trong các protein khác nhau thay đổi khá nhiều, do đó dung dịch của các protein khác nhau có nồng độ giống nhau có thể khác nhau về độ hấp thụ ở bước sóng 280nm. Và được đánh giá bằng hệ số tắt, ví dụ: hệ số tắt của albumin huyết thanh bò bằng 6,7 khi cho ánh sáng có bước sóng 280 nm đi qua 1 cm dung dịch có nồng độ 10 mg/ml; trong khi hệ số tắt của kháng thể IgG bằng 13,6. Ngoài ra có nhiều chất khác trong dung dịch cũng có ảnh hưởng đến độ hấp thụ protein. Vì vậy, các phương pháp đo độ hấp thụ ở

vùng ánh sáng tử ngoại thường được dùng để định lượng protein đã được tinh sạch hoặc để xác định protein trong các phân đoạn nhận được khi sắc ký tách các protein qua cột.

#### *4.8. Kết tủa thuận nghịch và không thuận nghịch protein*

Khi protein bị kết tủa đơn thuần bằng dung dịch muối trung tính có nồng độ khác nhau hoặc bằng alcohol, aceton ở nhiệt độ thấp thì protein vẫn giữ nguyên được mọi tính chất của nó kể cả tính chất sinh học và có thể hoà tan trở lại gọi là kết tủa thuận nghịch. Các yếu tố kết tủa thuận nghịch được dùng để thu nhận chế phẩm protein. Trong quá trình kết tủa thuận nghịch muối trung tính vừa làm trung hoà điện vừa loại bỏ lớp vỏ hydrate hoá của protein, còn dung môi hữu cơ háo nước phá hủy lớp vỏ hydrate nhanh chóng. Trong chế phẩm protein nhận được còn lẩn các chất đã dùng để kết tủa, cần sử dụng phương pháp thích hợp để loại bỏ các chất này. Ví dụ có thể dùng phương pháp thẩm tích để loại bỏ muối.

Ngược lại kết tủa không thuận nghịch là phản tử protein sau khi bị kết tủa không thể phục hồi lại trạng thái ban đầu. Sự kết tủa này thường được sử dụng để loại bỏ protein ra khỏi dung dịch, làm ngưng phản ứng của enzyme. Một trong những yếu tố gây kết tủa không thuận nghịch đơn giản nhất là đun sôi dung dịch protein (sẽ nói kỹ hơn trong phần biến tính protein ở phần sau).

#### *4.9. Các phản ứng hóa học của protein*

Cũng như các amino acid và peptide protein có các phản ứng hóa học tương tự đó là: phản ứng của các nhóm -COOH, -NH<sub>2</sub>, gốc R và phản ứng tạo màu đặc trưng của liên kết peptide như phản ứng biure (xem chương 2 và 3). Ngoài ra, còn một số phản ứng màu đặc trưng khác, có ý nghĩa quan trọng trong phát hiện protein và các gốc amino acid trong chuỗi polypeptide:

##### *4.9.1. Phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteau*

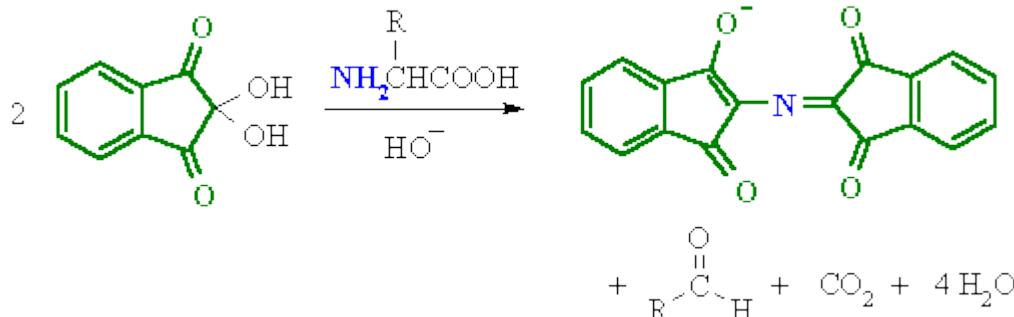
Thuốc thử Folin-Ciocalteau có chứa acid phosphomolipdic và acid phos phovolframic. Các chất này làm tăng độ nhạy của phản ứng biure, mặt khác phản ứng với gốc Tyr và Trp trong phân tử protein. Các gốc amino acid này tham gia trong quá trình tạo phức chất màu xanh da trời.

##### *4.9.2. Phản ứng với ninhydrin*

Tất cả các amino acid trong phân tử protein đều phản ứng với hợp chất ninhydrin tạo thành phức chất màu xanh tím, Phản ứng được thực hiện qua một số bước như sau:

Dưới tác dụng của ninhydrin ở nhiệt độ cao, amino acid tạo thành NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> và aldehit, mạch polypeptide ngắn đi một carbon; đồng thời

ninhhydrin chuyển thành diceto oxy hindrien. Diceto oxy hindrien, NH<sub>3</sub> mới tạo thành tiếp tục phản ứng với một phân tử ninhidrin khác để tạo thành phức chất màu xanh tím (hình 4.12)



Hình 4.12

Phản ứng của protein với ninhydrin

Protein cũng có thể tham gia nhiều phản ứng tạo màu khác như: phản ứng xanthproteic, các gốc amino acid Tyr, Trp, Phe trong protein tác dụng với HNO<sub>3</sub> đặc tạo thành màu vàng và sau khi thêm kiềm sẽ chuyển thành màu nâu; phản ứng Pauli; các gốc Tyr, His trong protein tác dụng với diastobenzosulfate acid tạo thành màu đỏ anh đào; phản ứng Milon gốc Tyr tác dụng với thuỷ ngân nitrate trong HNO<sub>3</sub> đặc tạo thành kết tủa màu nâu đất v.v...

## V. Biến tính protein

### 5.1. Khái niệm chung

Sau khi protein bị kết tủa, nếu loại bỏ các yếu tố gây kết tủa mà protein vẫn mất khả năng tạo thành dung dịch keo bén như trước và mất những tính chất ban đầu, chẳng hạn độ hòa tan giảm, tính chất sinh học bị mất gọi là sự biến tính protein. Vì vậy, đối với việc bảo quản protein, người ta thường để dung dịch protein ở nhiệt độ thấp thường là 0-4°C. Song ở nhiệt độ này dung dịch protein dần dần cũng bị biến tính, biến tính càng nhanh khi dung dịch protein càng loãng. Sự biến tính ở nhiệt độ thấp của dung dịch protein loãng được gọi là sự biến tính “bè mặt”: protein bị biến tính tạo nên một lớp mỏng trên bề mặt dung dịch, phần dưới lớp mỏng là những nhóm ura nước nằm trong dung dịch, phần trên lớp mỏng là những gốc ky nước của amino acid kết hợp với nhau bởi lực Van der Waals. Ở dung dịch đặc các phân tử protein kết hợp với nhau chặt chẽ hơn do đó làm giảm bớt và hạn chế sự biến tính bè mặt. Để bảo quản tốt các ché phẩm protein như enzyme, hormon,  $\gamma$ -globulin kháng độc tố v.v...người ta tiến hành làm đông khô (làm bốc hơi nước của dung dịch

protein ở áp suất và nhiệt độ thấp), bột thu được có thể bảo quản được ngay cả ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong các ống hàn kín.

### *5.2. Các yếu tố gây biến tính*

Có nhiều yếu tố tác động gây ra sự biến tính protein như: nhiệt độ cao, tia tử ngoại, sóng siêu âm, acide, kiềm, kim loại nặng. Vì vậy, trong thực tế người ta rất chú ý ảnh hưởng của các yếu tố có khả năng làm biến tính protein, ví dụ: khi chiết xuất và tinh chế protein, đặc biệt là các protein enzyme, cũng như khi xác định hoạt độ của chúng, phải chú ý để phòng biến tính. Muốn vậy phải đảm bảo những điều kiện thích hợp nhất cho qui trình kỹ thuật, như tiến hành thí nghiệm trong lạnh và đảm bảo pH thích hợp của các dung dịch sử dụng.

### *5.3. Tính chất của protein biến tính*

Những thay đổi dễ thấy nhất ở protein biến tính là thay đổi tính tan, khả năng phản ứng hoá học và hoạt tính sinh học như: hemoglobin bị biến tính không kết hợp với oxy được, trypsin khi bị biến tính không thuỷ phân được protein, kháng thể biến tính mất khả năng kết hợp với kháng nguyên v.v...

Nghiên cứu cấu trúc không gian cho thấy khi bị biến tính phân tử protein không còn cuộn chặt như trước mà thường duỗi ra hơn, kết quả là phá vỡ cấu hình không gian cần thiết để thực hiện hoạt tính sinh học. Sự biến tính không làm đứt liên kết peptide mà làm đứt các liên kết hydro, liên kết muối v.v...nối các khúc của chuỗi polypeptide hoặc các chuỗi polypeptide với nhau, vì vậy cấu trúc của nhóm kỵ nước của protein bị đảo lộn, các nhóm kỵ nước quay ra phía ngoài và các nhóm ưa nước quay vào trong, sự hydrate hoá của protein giảm (protein mất lớp áo nước) các phân tử protein dễ kết hợp với nhau, độ tan giảm và có thể kết tủa. Sự biến đổi cấu trúc khiến protein biến tính dễ được tiêu hoá hơn protein nguyên thuỷ, thí dụ trypsin không thuỷ phân ribonuclease nguyên thuỷ, nhưng phân giải rất nhanh ribonuclease biến tính.

Người ta phân biệt hai dạng biến tính: biến tính thuận nghịch (biến tính trở lại dạng ban đầu với tính chất và chức năng nguyên thuỷ của nó, đó là sự hoàn nguyên) và biến tính không thuận nghịch (protein không trở lại dạng ban đầu của nó). Lòng trắng trứng luộc là một ví dụ điển hình về biến tính không thuận nghịch, còn về biến tính thuận nghịch ta có thể nêu trường hợp trypsin: đun nóng trypsin ở pH 3 tới 90°C, cấu trúc của phân tử trypsin bị biến đổi (biến tính) nhưng sau khi làm lạnh một thời gian nhất định, trypsin trở lại cấu trúc ban đầu và lại có hoạt tính enzyme.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chán, Đỗ Đình Hò, Lê Đức Trịnh. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trần châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục
3. Hồ Huỳnh Thuỷ Dương. 1998. Sinh học phân tử. NXB Giáo dục
4. Nguyễn Hữu Đĩnh-Trần Thị Đà 1999, Ứng dụng một số phương pháp phổ nghiên cứu cấu trúc phân tử, Nhà xuất bản giáo dục
5. Copyright by The Mc Graw-Hill Companies, 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, Langer Medical Publishing
6. Coreighton T. 1993. proteins, 2<sup>nd</sup> edition, W.H.Freeman and Company
7. Dennison D., 2002. A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
8. Fersht Alan, 1998, Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3<sup>rd</sup> Rev Edit.
9. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition. W.H Freeman, 2004
10. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5<sup>th</sup> ed, W.H Freeman.
11. Walker John M. . 1996. The Protein Protocols Hand book. 2<sup>nd</sup> edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

## Chương 5    **Các phương pháp chiết rút tinh sạch và xác định protein**

### **I. Khái niệm**

Trong các tổ chức của cơ thể sống, protein có thể ở dưới dạng tự do trong các dịch sinh vật hoặc dưới dạng kết hợp, hoặc bị cầm trong các tế bào. Hơn nữa, trong tế bào có chứa hàng nghìn loại protein khác nhau, nếu ta cần nghiên cứu từng loại protein, trước hết phải chiết rút và tinh sạch chúng. Chính vì vậy, các kỹ thuật chiết rút, tinh sạch và nghiên cứu protein luôn ở vị trí trung tâm của các nghiên cứu hóa sinh và luôn được cập nhật và hiện đại hóa.

### **II. Các biện pháp cần thiết để nhận protein nguyên thể**

Các phương pháp chiết rút và tinh sạch protein đều dựa trên những tính chất hóa lý của protein như độ tích điện, kích thước phân tử, độ hòa tan... của protein cần chiết rút. Nhiều protein còn liên kết với các phân tử sinh học khác nên việc chiết rút các protein này còn phụ thuộc vào bản chất của các liên kết.

Muốn thu nhận được các protein nguyên thể tức là protein có tất cả tính chất tự nhiên đặc trưng của nó, cần sử dụng các biện pháp khác nhau.

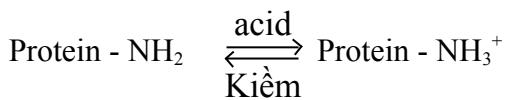
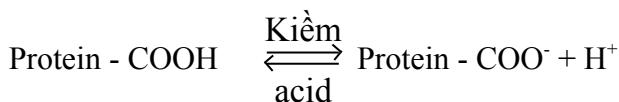
#### *2.1. Nhiệt độ*

Để tách các protein khác nhau dựa trên kết tủa của chúng, người ta có thể sử dụng phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt. Một điều cần lưu ý là chỉ nên dùng đối với trường hợp các protein enzyme bền với nhiệt. Dịch protein enzyme được giữ ở  $50 - 70^{\circ}\text{C}$  trong thời gian xác định, sau đó protein tạp đã bị biến tính được loại bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm. Như vậy, dịch chiết protein thô bền với nhiệt có thể được thu nhận bằng cách cho kết tủa không thuận nghịch phần lớn các protein tạp.

Để thu nhận chế phẩm protein theo phương pháp kết tủa thuận nghịch bằng các muối trung tính, cần tiến hành ở nhiệt độ thấp, đối với dung môi hữu cơ cần tiến hành ở nhiệt độ dưới  $0^{\circ}\text{C}$  tránh biến tính đặc biệt là protein enzyme.

#### *2.2. Nồng độ proton ( $\text{pH}$ )*

Protein là các chất lưỡng tính, vì vậy, trong các dung dịch acid và kiềm chúng sẽ bị phân ly như sau:



Do các acid amin trong chuỗi polypeptide còn tồn tại nhiều nhóm chúc tự do dưới dạng các ion hóa là nguyên nhân tạo ra tính đa điện của protein. Phân tử protein rất dài nên nhóm ion tự do tận cùng của chuỗi polypeptide không đáng kể, chủ yếu các nhóm chúc tự do khác của chuỗi bên (R) quyết định tính chất tích điện của phân tử protein (nhóm cacboxyl của amino acid, OH của Tyrosine,  $\epsilon$  - NH<sub>2</sub> của lysine, guamidin của Arginine, inidazol của histidine)

Mức độ ion hóa của các nhóm này phụ thuộc vào giá trị pH. Các nhóm acid ở dạng anion trong môi trường kiềm, các nhóm kiềm tồn tại ở dạng cation trong môi trường acid.

Như vậy, ở một giá trị pH xác định, mỗi phân tử protein có một điện tích tổng số nào đấy mà độ lớn của nó phụ thuộc vào số lượng các nhóm tích điện dương và tích điện âm. Kết quả là ở giá trị nồng độ ion hydro cố định, các protein khác nhau trong hỗn hợp sẽ có tổng điện tích khác nhau. Nhiều phương pháp dùng để tách các hỗn hợp protein đều dựa vào đặc tính này. Các phân tử protein mang điện tích tổng số (dương hoặc âm) cùng dấu đẩy nhau ra xa nên dễ tan vào dung dịch. Mỗi một protein có một giá trị pH nhất định mà ở đó tổng số điện tích âm và điện tích dương trong phân tử bằng không. Giá trị đó gọi là điểm đắng điện của protein. Điểm đắng điện của các acid amin trung tính có giá trị pH từ 5,6 - 7,0; đối với các acid amin có tính acid (dicarboxylic) là từ 3,0 - 3,2; đối với các acid amin có tính kiềm (diamino) là từ 9,7 - 10,8. Ở điểm đắng điện, độ hòa tan của protein là thấp nhất, protein dễ bị kết tủa. Dựa vào tính chất này, người ta có thể tách từng phần các protein enzyme trong hỗn hợp.

Cũng giống như trường hợp tác dụng của nhiệt độ trong việc tách chiết protein, có thể dùng phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của pH của môi trường. Dịch protein enzyme được giữ ở pH  $\leq 5$  trong thời gian xác định. Protein tạp bị biến tính cũng được loại bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm. Ví dụ citochrom C cũng tan trong acid trichloracetic trong khi đó acid này làm kết tủa phần lớn protein. Như vậy các protein bền với acid có thể được tách chiết bằng cách này.

### 2.3. Tác nhân hóa học

Có thể dùng muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ để tách chiết các protein enzyme. Phương pháp này được tiến hành dựa trên cơ sở: độ hòa tan của protein phụ thuộc vào sự tương tác của các nhóm tích điện trong phân tử protein với các phân tử nước. Sự tương tác đó (còn gọi là sự hydrate hóa) sẽ bị giảm xuống khi thêm vào dung dịch protein enzyme các dung môi hữu cơ hoặc các muối trung tính. Dung môi hữu cơ thường dùng là etanol, isopropanol, acetone hoặc hỗn hợp các loại rượu.

Khi sử dụng các dung môi hữu cơ, cần chú ý tiến hành ở nhiệt độ thấp (từ 5°C trở xuống). Dùng dung môi hữu cơ có thể tiến hành tách phân đoạn dưới 0°C và có thể đến -20°C, như vậy có tác dụng tốt đến độ ổn định của protein enzyme.

Khi đã có kết tủa, chú ý lấy nhanh kết tủa ra khỏi dung môi bằng cách dùng máy ly tâm lạnh.

Các muối trung tính có thể dùng là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ... Tuy nhiên, người ta đã nhận thấy muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  là tốt nhất vì nó không làm hại mà làm ổn định (làm bền) hầu hết các loại protein enzyme. Loại muối này lại rẻ tiền và phổ biến. Độ hòa tan của nó lại rất lớn (bảo hòa 767g/l ở 25°C)

Ngoài ra nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cần thiết để kết tủa protein enzyme khác nhau thì khác nhau nhiều.

Ví dụ: Protease của nấm mốc dễ bị kết tủa ở 70% của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bảo hòa hoàn toàn, còn amilase của mầm lúa bị kết tủa ở 50% độ bảo hòa của dung dịch muối này. Điều đó nói lên tính kết tủa lựa chọn của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cao hơn các muối khác.

Có thể dùng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ở cả 2 dạng: dạng bột và dạng dung dịch bảo hòa. Khi dùng bột, người ta cho từng ít một vào dịch chiết protein enzyme. Cách cho cũng ảnh hưởng lớn đến lượng kết tủa ban đầu của protein enzyme. Khi cho muối vào dịch chiết cần phải có máy khuấy từ để đảm bảo sự hòa tan của muối. Khi dùng dung dịch bảo hòa, trong nhiều sách về phương pháp nghiên cứu, người ta đưa ra bảng tính số lượng muối cần thiết để pha các dung dịch có độ bảo hòa khác nhau ở những nhiệt độ nhất định.

Khái niệm về số phần trăm của độ bảo hòa hoàn toàn đã được đề cập đến. Như ví dụ trên thì protein enzyme có thể bị kết tủa ở 50% (0,5) hoặc 70% (0,7) của độ bảo hòa hoàn toàn của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Khi cho dung dịch

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bão hòa vào dịch chiết protein enzyme thì nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  không tăng đột ngột. Sau khi kết tủa xong người ta thường để lắng khoảng 2 giờ hoặc qua đêm, mục đích là tạo kết tủa hoàn toàn (ở phương pháp dùng dung môi hữu cơ thì không cần để lâu). Kết tủa được lấy ra bằng cách ly tâm hoặc lọc qua phễu Buchner. Khi hòa tan kết tủa lại người ta thường thêm ion  $\text{Ca}^{++}$  để làm bền protein enzyme (dùng  $\text{CaCl}_2$  hoặc  $\text{Ca}(\text{CH}_3 \text{COO})_2$ )

Để tiện lợi, người ta đưa ra công thức cách tính lượng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cho vào dịch có độ bão hòa cho trước ( $S_1$ ) để đạt đến một độ bão hòa cần thiết ( $S_2$ )

Tùy theo trạng thái  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cho thêm vào dịch chiết protein enzyme mà có công thức tính toán khác nhau.

- Đối với  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ở dạng bột

$$x(\text{g}) = \frac{0,515 \cdot V(S_2 - S_1)}{1 - 0,272 S_2}$$

Trong đó  $V$  là thể tích dung dịch,  $S_1$ ,  $S_2$  là độ bão hòa cho trước và độ bão hòa cần đạt (ví dụ:  $S_1 = 0,5$ ;  $S_2 = 0,7$  chẳng hạn).

Người ta cũng có thể dùng bản đồ toán (nomogram) để chiếu và xác định được lượng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  thêm vào để dịch chiết protein enzyme đạt được một độ bão hòa nhất định. Hoặc có thể đối chiếu ở bảng có sẵn. Lượng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  đưa vào để dung dịch có độ bão hòa nhất định có khác nhau tùy theo nhiệt độ thí nghiệm.

- Đối với  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ở dạng dung dịch bão hòa.

Thể tích (tính theo ml) của dung dịch bão hòa cần cho vào 100ml dung dịch có độ bão hòa ban đầu  $S_1$  để đạt đến một độ bão hòa  $S_2$  cần thiết được tính theo công thức sau:

$$V(\text{ml}) = \frac{100 \cdot (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

Như vậy, nếu thêm từng phần các dung môi hữu cơ hoặc từng phần muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (có nồng độ bão hòa khác nhau) thì ta có thể tách từng phần hỗn hợp protein enzyme. Tuy nhiên, để phân chia hoàn toàn những hỗn hợp phức tạp, phương pháp này không cho kết quả tốt vì độ hòa tan của một số protein bị tăng lên. Mặc dù vậy, cách kết tủa từng phần này cũng rất có lợi, đặc biệt là đối với giai đoạn đầu của việc tách chiết và làm

sạch protein enzyme, vì phương pháp khá đơn giản.

Ngoài ra, các tác động khác như cơ học, sóng siêu âm... có ảnh hưởng đến quá trình tách chiết protein enzyme.

### **III. Phá vỡ tế bào và chiết rút protein**

#### *3.1. Phá vỡ tế bào*

Protein enzyme có trong tất cả các cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Sau khi được tổng hợp nó có thể được tiết ra ngoài tế bào tồn tại trong các dịch cơ thể, dịch môi trường (gọi là protein enzyme ngoại bào) hoặc được giữ lại bên trong tế bào (protein enzyme nội bào). Các protein enzyme nội bào có thể tồn tại ở dạng hòa tan trong tế bào chất và các bào quan (nhân, microsome, mitochondria v.v...) của tế bào. Tế bào được bao bọc bằng một lớp màng. Lớp màng này ở vi khuẩn đôi khi rất bền và dày. Người ta còn thấy nhiều protein enzyme liên kết rất chặt chẽ với các bào quan của tế bào. Các phân tử protein enzyme không có khả năng đi qua màng của tế bào và màng của các bào quan của tế bào. Do đó để có thể chiết rút các protein enzyme nội bào, bước đầu tiên là phải phá vỡ cấu trúc của các tế bào có chứa protein enzyme và chuyển chúng vào dung dịch.

Có thể phá vỡ cấu trúc của tế bào bằng các biện pháp cơ học như nghiền với bột thủy tinh hoặc cát thạch anh, làm đồng hóa bằng thiết bị nghiên đồng thể (homogenizator). Thiết bị này có chày thủy tinh gắn với một mô-tơ quay và có thể điều chỉnh được tốc độ quay theo yêu cầu. Các tế bào giữa chày thủy tinh và thành cối sẽ bị phá hủy.

Để việc phá vỡ có hiệu quả, ở mô thực vật, trước khi nghiền, người ta thường thái nhỏ mẫu để vào ngăn đá hoặc cho tr匡ng nước. (ví dụ như đối với mẫu hạt khô). Còn ở các mô của động vật như gan hoặc thận, khi chiết protein enzyme người ta cần cắt bỏ các mô liên kết.

Muốn tách được các protein trong các cấu tử của tế bào, người ta còn phải dùng các yếu tố vật lý và hóa học khác như sóng siêu âm, dùng các dung môi hữu cơ như butanol, acetone, glycerin, ethylacetat... và chất tẩy (detergent). Các hóa chất tốt cho việc phá vỡ các bào quan của tế bào vì trong các cơ quan này thường chứa mỡ.

#### *3.2. Chiết rút protein*

Sau khi đã phá vỡ cấu trúc của các tế bào tiến hành chiết xuất các protein enzyme bằng các dung dịch đệm thích hợp, dung dịch muối trung tính hoặc bằng nước đối với protein enzyme nội bào hoặc bằng ly tâm tách

té bào đối với các protein enzyme ngoại bào: việc chọn phương pháp tách chiết protein enzyme tùy thuộc vào tính chất của protein enzyme cần nghiên cứu.

## **IV. Tinh sạch protein**

### *4.1. Loại các tạp chất*

Trong dịch chiết thô thu được ngoài protein enzyme còn có các protein tạp, các chất cao phân tử khác như polysaccharid, acid nucleic và các chất phân tử nhỏ như đường monose, các chất lipid, muối khoáng v.v... Để loại bỏ chúng phải sử dụng phối hợp nhiều biện pháp khác nhau.

Để loại bỏ muối khoáng và các loại đường... là các tạp chất có phân tử lượng thấp người ta thường dùng phương pháp thẩm tích (dialysis) đối nước hay đối các dung dịch đậm đặc loãng hoặc bằng cách lọc qua gel sephadex.

Để loại bỏ các protein tạp và các tạp chất có phân tử lượng cao khác, người ta hay dùng kết hợp nhiều biện pháp khác nhau: phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt độ hoặc pH của môi trường, phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ (xem 5.2.1; 5.2.2. và 5.2.3), các phương pháp sắc ký trao đổi ion, điện di, phương pháp lọc gel.

### *4.2. Các kỹ thuật thông thường trong tinh sạch protein*

Như trên đã trình bày, sau khi nhận được dịch chiết protein thô, người ta thường sử dụng các phương pháp khác nhau để tách chiết và đồng thời làm tinh sạch protein. Ngoài các kỹ thuật đã được giới thiệu cụ thể ở các phần trên, có thể sử dụng các phương pháp dưới đây phục vụ cho việc tinh sạch các protein.

#### *4.2.1. Ly tâm*

Một trong những kỹ thuật không thể thiếu được trong việc tách chiết và tinh chế protein là ly tâm.

Máy ly tâm được sử dụng để tách các phần khác nhau khỏi dung dịch. Người ta gọi pha lỏng là chất lỏng bên trên kết tủa, pha rắn mà thường lắng kết xuống đáy ống ly tâm được gọi là kết tủa. Thực chất, sự ly tâm tăng tốc độ kết tủa của những tiểu phần rắn nhờ lực ly tâm. Sự sai khác về tỷ trọng của nguyên liệu lơ lửng so với chất lỏng càng lớn thì tốc độ kết tủa sẽ càng cao. Mặc dù người ta coi số vòng quay trong một phút là đơn vị thông thường của lực ly tâm, nhưng quy ước ấy không thỏa mãn.

Chính vì vậy, mức độ tăng lực ly tâm được đo một cách chính xác hơn bằng những bội số của trị số gia tốc của lực hút ở mặt biển, có nghĩa là được đo một lực ly tâm tương đối (relative centrifugal force, RCF) hoặc là được đo bằng các giá trị là bội số của lực hút trọng trường (xg). Công thức để tính lực ly tâm tương đối là:

$$\frac{4\pi^2 rn^2}{32,2}$$

Trong đó r là bán kính đến đáy của ống ly tâm tính ra "phút" (foot, 1 foot = 30,48cm), n là số vòng quay trong 1 giây. Có thể tính giá trị của lực ly tâm tương đối một cách trực tiếp theo công thức:

$$\text{Lực ly tâm tương đối (g)} = 1,1118 \times 10^{-5} \times R \times N^2.$$

Trong đó R là bán kính (cm) nắp ly tâm tính từ tâm của trục đến đáy ống ly tâm, N là số vòng quay trong một phút. Cũng có thể dùng bản đồ toán (nomogram) để tính lực ly tâm tương đối

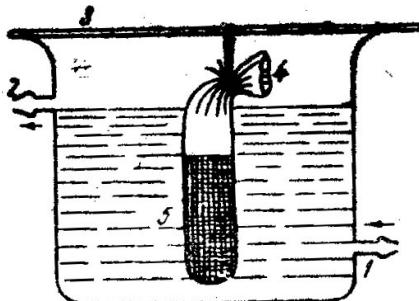
Thông thường có thể làm kết tủa những tiểu phần lớn với lực ly tâm tương đối bé bằng các máy ly tâm để bàn. Để làm kết tủa những tiểu phần bé hơn kể cả những thành phần của tế bào cần có những máy ly tâm đặc hiệu bảo đảm được các giá trị lực ly tâm tương đối cao hơn  $15000 \times g$  đối với bất kỳ định lượng nào. Có những nguyên tắc để làm việc an toàn hơn với máy ly tâm đối với người thao tác cũng như đối với nguyên liệu được xử lý mà lúc thí nghiệm cần chú ý tuân thủ. Đó là nguyên tắc cân bằng đối xứng khi ly tâm và thăng bằng máy ly tâm khi đặt máy làm việc.

Do tính chất không bền với nhiệt của phần lớn các protein enzyme, khi tách chiết tinh chế chúng, cần sử dụng máy ly tâm lạnh. Trong trường hợp điều kiện thí nghiệm có hạn chế, có thể sử dụng một số phương cách nhằm đảm bảo duy trì mẫu ở nhiệt độ thấp. Cần làm lạnh tốt mẫu và ống ly tâm trước khi ly tâm. Nếu trong máy có các ổ đệm thay thế có thể làm lạnh chúng trong tủ lạnh trước khi ly tâm. Cần phải tiến hành ly tâm với thời gian tối thiểu để tránh nóng máy. Có thể đặt trực tiếp máy ly tâm bé vào tủ lạnh, đưa dây dẫn ra ngoài qua lớp đệm của cánh cửa tủ lạnh.

#### 4.2.2. Thảm tích

Thảm tích là sự khuếch tán vi phân qua màng vốn không thẩm đói với những chất keo hòa tan (protein, một số các polysaccharid) nhưng thẩm đói với các dạng dịch các tinh thể. Các tinh thể (các muối, các hợp chất hữu cơ có trọng lượng phân tử thấp...) có thể khuếch tán qua màng

theo định luật Fick. Nước sẽ khuếch tán từ dung dịch có nồng độ thấp hơn (thường là dung dịch rửa) vào dung dịch keo, trong khi đó các ion (cation và anion) và các chất phân tử nhỏ sẽ chuyển vào dung dịch có nồng độ thấp hơn (thường chuyển vào dung dịch rửa). Trong quá trình tách chiết và tinh sạch protein, để loại muối ammonium sulphate ra khỏi dung dịch protein thì cho dung dịch protein vào cái túi đặc hiệu làm bằng nguyên liệu bán thấm. Thông thường người ta hay dùng túi colodion hoặc cellophane (loại sau hay được dùng hơn). Sau đó đặt cả túi vào bình chứa lượng lớn nước hoặc lượng lớn dung dịch đậm được pha loãng (ví dụ đậm phosphate có pH = 7, nồng độ 0,01M). Vì màng cellophane là màng bán thấm, có kích thước lỗ chỉ cho các chất có phân tử đi qua vào các dung dịch đậm loãng theo định luật khuếch tán. Như vậy, muối sẽ khuyến tán vào nước hoặc dung dịch đậm loãng (di chuyển theo hướng giảm nồng độ), còn nước hoặc đậm loãng sẽ di chuyển từ dung dịch rửa vào túi chứa protein. Protein là những đại phân tử không thể vượt qua túi thẩm tích và được giữ lại trong túi. Bằng cách thay đổi thường xuyên dung dịch rửa có thể tẩy sạch muối ra khỏi protein, mặc dầu trong quá trình thẩm tích, nó là dung dịch được pha loãng hơn. Có thể làm giảm bớt hoặc loại trừ sự pha loãng như thế khi tiến hành thẩm tích dưới áp suất, có nghĩa là khi dung dịch được xử lý nằm dưới một áp suất thủy tĩnh đầy đủ, để dòng thủy động học của nước từ dung dịch sẽ cân bằng sự khuếch tán của các phân tử vào dung dịch. Phương pháp này thường đòi hỏi có thiết bị đặc biệt.



**Hình 5.1 Thẩm tích để loại muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  trong kết túi protein.**

Phương pháp thẩm tích thông thường là cho dung dịch có kết túi protein vào túi thẩm tích (không quá 2/3 thể tích túi). Cho thuốc sát trùng hoặctoluen để bảo quản protein (vì thời gian thẩm tích lâu, protein có thể bị thối hỏng). Buộc túi vào một que thủy tinh, gác que thủy tinh lên miệng chậu nước để giữ túi ở giữa chậu. Cho vòi nước chảy nhẹ liên tục vào đáy chậu để thay đổi nước thường xuyên (hình 5.1). Muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hòa tan trong nước và bị loại dần. Thời gian thẩm tích có thể từ 24 - 48 giờ, làm

thảm tích lòn cuối cùng bằng nước cát.

Có thể tăng tốc độ thảm tích khi khuấy dung dịch rửa bằng máy trộn cơ học hay máy trộn từ hoặc là quay chậm túi nhờ động cơ không lớn. Khi thảm tích các protein thường người ta tiến hành tất cả các thao tác ở môi trường lạnh.

#### 4.2.3. Sắc ký lọc gel

Sắc ký lọc gel là một trong những kỹ thuật sắc ký cột được dùng phổ biến trong tách chiết và tinh sạch protein.

Dịch chiết protein enzyme đã được loại bỏ phần lớn các protein tạp nhưng vẫn chưa đảm bảo độ đồng nhất cần thiết được tiếp tục làm sạch bằng phương pháp sắc ký cột. Phương pháp sắc ký (chromatography) là do hai chữ "chroma" là màu sắc và "grapho" là viết, nghĩa là viết bằng màu. Thuở ban đầu, người ta sử dụng phương pháp sắc ký để tách các chất màu và chỉ sau này người ta áp dụng cho việc tách các chất không màu.

Sắc ký lọc gel còn được gọi là phương pháp dùng chất rây phân tử, lọc gel (gel filtration)

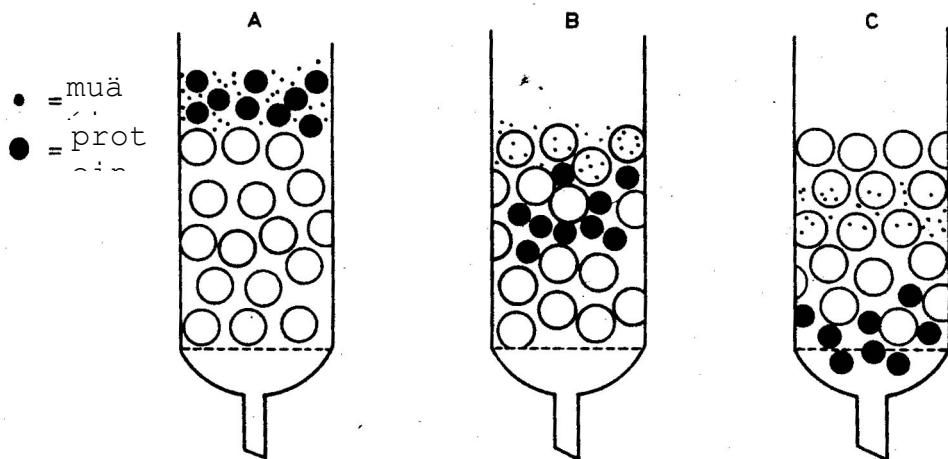
Cơ sở của phương pháp lọc gel là dựa vào sự khác nhau nhau về kích thước, hình dạng và phân tử lượng của protein enzyme có trong hỗn hợp để tách chúng ra.

Để đảm bảo cho việc tách protein enzyme được tốt, chất rây phân tử phải là chất trơ, không phản ứng với protein enzyme. Chất này cũng không hòa tan và tương đối bền với các yếu tố về cơ học cũng như sinh học. Ngoài ra chất được sử dụng cho mục đích lọc phân tử phải là chất không có tính đàn hồi (không co) và phải là chất ưa nước (hidrofil).

Gel sephadex là chất thỏa mãn các yếu tố trên. Sephadex là chế phẩm dextran do các loài vi sinh vật khác nhau là Leuconostoc tạo ra khi chúng được nuôi cấy trên môi trường chứa saccharose. Trọng lượng phân tử của dextran có thể đạt tới hàng triệu và lớn hơn. Phân tử dextran bao gồm các chuỗi do các gốc glucose tạo thành các liên kết 1,6. Sephadex Nhận từ dextran bằng cách xử lý hóa học (do tác dụng của epichlohidrin) để tạo ra các lưới phân nhánh có liên kết ngang gọi là "sàng phân tử" và chất này trở thành không tan trong nước. Số liên kết ngang tạo ra càng nhiều, kích thước của lỗ sàng phân tử càng nhỏ.

Phương pháp lọc phân tử trên Sephadex được tiến hành như sau: cho sephadex vào cột thủy tinh dài và cân bằng bằng dung dịch đậm có pH

nhất định. Sau đó cho dung dịch protein enzyme lên cột. Khi lọc và chiết bằng dung môi thích hợp, các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ (ở đây là các muối) sẽ khuếch tán chậm chạp qua các lỗ nhỏ của các hạt Sephadex bị trương phồng, còn chất có trọng lượng phân tử lớn hơn (ở trường hợp này là protein enzyme) không có khả năng đi vào mà lách nhanh qua các hạt sephadex và sẽ được chiết nhanh ra khỏi cột (hình 5.2 và hình 5.3). Vì vậy ta có thể tách được chất có trọng lượng phân tử cao hơn thoát ra khỏi cột gel trước so với chất có phân tử lượng nhỏ. Hàng Sephadex (Pharmacia) của Thụy Điển đã tung ra thị trường các loại sephadex có kích thước khác nhau có ký hiệu từ G10 đến G200. Số ký hiệu để chỉ ra mức độ nhận (hút) nước của chúng. Ví dụ G10 để chỉ khi trương phồng thì 1g gel khô nhận 1ml nước (1ml/g)



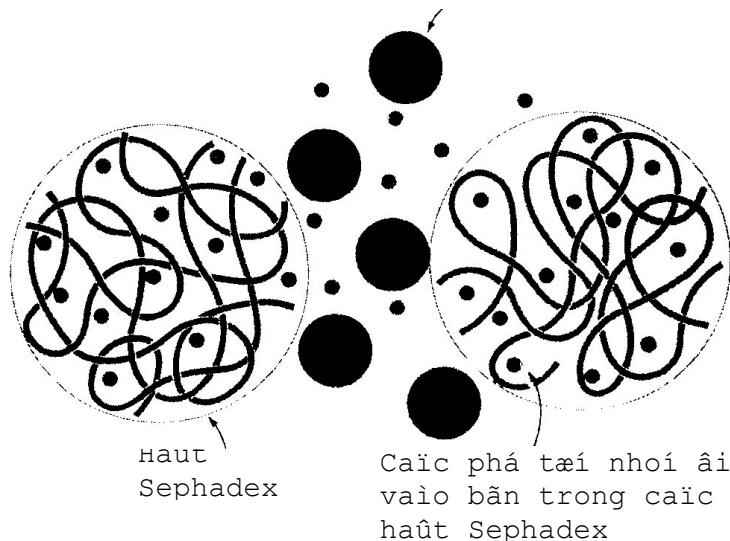
**Hình 5.2 Hoạt động của lọc phân tử sephadex.**

Các sephadex có ký hiệu khác nhau từ G10 đến G200 phục vụ trong việc lọc phân tử cho phép các chất có trọng lượng phân tử khác nhau lọt vào ở các ngưỡng khác nhau.

Người ta còn sử dụng sephadex để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Cùng nhóm chất rây phân tử có nguồn gốc polisacharid, là chế phẩm dextran như sephadex (pharmacia) còn có molselect (Reanal) - là sản phẩm của Hungary được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu.

Có thể dùng để làm cô đặc các chất có trọng lượng phân tử lớn như protein, peptid, loại muối khỏi protein enzyme (dùng nhanh hơn so với thẩm tích), lọc gel tách theo trọng lượng phân tử (như protein huyết thanh)

Caic phán tæi lâin  
khæng thæø âi vaio  
caic haüt Sephadex



**Hình 5.3 Tách các phân tử theo kích thước bằng kỹ lọc gel.**

hoặc tách các sản phẩm protein được hình thành dưới tác dụng của enzyme phân cắt (như  $\gamma$  - G - globulin bị cắt bởi papain). Ngoài nhóm chất rây phân tử là chế phẩm dextran còn có nhóm chất rây phân tử là chế phẩm gel acrilamid bao gồm Biogel (Bio - Rad) và Acrilex (Reanal). Acrilex gel là loại copolimer, sản phẩm của Hungary được tạo ra từ acrilamid và N, N' - metilen bisacrilamid. Các acrilex gel có ký hiệu từ P - 300 dùng để tách các chất có trọng lượng phân tử trong ngưỡng từ 100 - đến 300.000. Có thể sử dụng ở vùng pH từ 2 - 11. Chất thứ ba là agarose gel, đã loại sulphate. Hay phổ biến là loại sepharose (Pharmacia). Người ta thường dùng chất này để tách các phân tử có trọng lượng lớn hơn  $10^6$ .

Tóm lại bằng phương pháp lọc rây phân tử người ta thể tách các chất có trọng lượng phân tử khác nhau có trong hỗn hợp (như polimer, polysaccharid, acid nucleic, protein). Người ta có thể dùng kỹ thuật này để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Và hơn thế nữa, trong quá trình tinh chế protein enzyme, chúng còn được sử dụng để cô đặc dung dịch protein enzyme.

#### 4.2.4. Phương pháp sắc ký trao đổi ion.

Phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa vào sự khác nhau về điện tích tổng số của các protein enzyme. Hay nói cách khác, phương pháp này được dựa trên cơ sở của phản ứng trao đổi ion giữa protein được tan trong nước hoặc dung dịch đậm đặc loãng và các tác nhân trao đổi ion. Tác nhân (hay nguyên liệu) trao đổi ion có thể là chất nhựa có tích nhóm sinh ion hoặc là chất ionit. Đây là những chất giá tro, không tan trong nước, có bùn chất là cellulose hoặc chất gel dextran có lõi phân nhánh (Sephadex, Molselect) hoặc là chất nhựa polystyrene. Chất giá thể này thường kết hợp với các nhóm ion hóa. Các chất trao đổi ion có chất giá là cellulose, sephadex, molselect thông thường được dùng để tách protein enzyme, còn các chất trao đổi ion có chất giá là polystyrene (ví dụ như Dowex, Amberlite) chỉ dùng để tách các peptid có trọng lượng phân tử nhỏ hơn.

\* Các chất trao đổi ion có chất giá cellulose

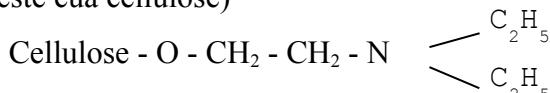
- Cationit CM - cellulose (carboxymethyl - cellulose)- là một dẫn xuất este của cellulose.

Cellulose - O - CH<sub>2</sub> - COOH

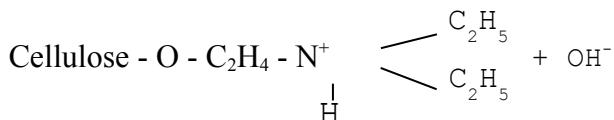
Khi phân ly cho ra COO<sup>-</sup>. Đây là chất trao đổi cation.

Trên những cationit, thì các protein kiềm có thừa những nhóm amin và những nhóm kiềm khác được hấp phụ (liên kết ion). Sự hấp phụ trên các cationit được tiến hành với những dung dịch loãng ở pH 1,5 - 6,5. (Các protein kiềm có chứa các acid amin diamino - mono carboxylic như lys, Arg, His)

- Anionit DEAE - cellulose (diethylamino - ethyl - cellulose) là dẫn xuất este của cellulose)



Trong H<sub>2</sub>O nó được phân ly:



Đây là chất trao đổi anion, bùn thân tích điện dương.

Các anionit được áp dụng để phân tích các protein acid có thura những nhóm carboxyl tự do. Sự hấp phụ protein trên những ionit như vậy được tiến hành với những dung dịch đậm có lực ion thấp (0,005 - 0,1M) ở pH 7,5 - 8,5. (các protein acid có chứa các amino acid monoamin dicarboxylic như glu, Asp)

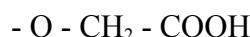
Trong hỗn hợp chất ionit với dung dịch đậm có độ pH tương ứng, các chất ionit đã nói ở trên trở nên tích điện. Vì vậy trên bề mặt lớp chất giá sẽ hình thành một lớp điện tích có dấu phụ thuộc vào kiểu nhóm chức hóa học của nó. Nếu thêm protein enzyme vào dung dịch đậm thì các phân tử protein enzyme mang điện tích sẽ bị các nhóm tích điện trái dấu của chất trao đổi ion kéo lại. Khi dùng một dung dịch đậm để phản hấp phụ có pH khác hoặc khi thêm một loại ion khác có lực ion lớn hơn thì phân tử protein enzyme sẽ bị đẩy ra khỏi chất trao đổi ion. Khi tiến hành phản hấp phụ, thường người ta thêm vào các ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  trong  $\text{NaCl}$  có nồng độ tăng dần theo bậc thang hay theo gradient.

Các phân tử protein enzyme nào có điện tích tổng số nhỏ thì sẽ bị đẩy ra trước do lực liên kết với chất trao đổi ion yếu. Còn những protein enzyme nào có liên kết với ionit lớn hơn thì sẽ bị đẩy ra bằng một lực ion của muối lớn hơn. Như vậy, bằng cách này, chúng ta có thể tách được từng phần các loại protein enzyme. Việc tách từng phần có lựa chọn tốt nhất là khi tăng dần nồng độ các ion thay thế.

Nhờ nồng độ ion của muối tăng dần (gradient) người ta có thể rút ra từ cột các loại protein enzyme khác nhau. Có thể thu nhận dịch chiết enzyme protein sau khi qua cột bằng máy thu phân đoạn tự động. Theo thứ tự từng phần dịch thu được, người ta tiến hành định lượng protein theo các phương pháp Lowry hay phương pháp đo quang phổ và xác định hoạt độ của enzyme.

\* Nếu chất giá là sephadex thì chúng ta có chất trao đổi ion sephadex. Đó là các loại DEAE - sephadex và CM - sephadex. Ưu điểm của loại này là vừa tách được protein enzyme về kích thước và về điện tích tổng số của các protein enzyme.

Trường hợp CM - sephadex trên chất giá sephadex có gắn nhóm  $\text{COO}^-$



$\downarrow$  phân ly

$\text{COO}^-$ : mang điện tích âm  $\rightarrow$  là chất trao đổi cation

#### 4.2.5. Phương pháp dùng chất hấp phụ đặc hiệu sinh học hay là phương pháp sắc ký ái lực (affinity Chromatography).

Cơ sở của phương pháp này là người ta gắn những phân tử gắn (ligand) vào chất mang (chất giá) rắn bằng liên kết cộng hóa trị mà protein enzyme cần tách sẽ tương tác đặc hiệu với nó. Những chất đó có thể là cơ chất (Substrate) hoặc chất ức chế (inhibitor) cạnh tranh. Trong trường hợp hai chất kháng nguyên và kháng thể có ái lực liên kết đặc hiệu với nhau, người ta thay thế vị trí chất gắn vào giá thể giữa kháng nguyên và kháng thể để nghiên cứu từng loại giống như cơ chất, chất ức chế và enzyme đặc hiệu của chúng. Hay nói cách khác dùng chất chỉ có khả năng liên kết đặc hiệu với một enzyme hoặc protein ta nghiên cứu. Chất mang thể rắn có thể là bất kỳ một loại nào phục vụ cho lọc gel như sephadex, nhưng người ta hay sử dụng nhất là gel Sepharose

Ở trên cột giá thể hay chất mang chứa cơ chất cố định ở pH và lực ion phù hợp, chỉ có protein enzyme nào có khả năng chuyển hóa cơ chất mới gắn vào, các protein khác thì chảy xuống cột. Bằng cách thay đổi pH và lực ion phù hợp hoặc có thể bằng cách thêm chất ức chế cạnh tranh đã được hòa tan vào thì có thể tách được protein enzyme khỏi cột ở trạng thái sạch.

#### 4.2.6. Kết tinh protein.

Đây là phương pháp đặc hiệu tốt nhất để tách từng phần protein enzyme ở giai đoạn tinh chế cuối cùng.

Khi protein enzyme đã được làm tinh khiết hoàn toàn, trong những trường hợp riêng biệt, người ta có thể tiến hành kết tinh chúng. Một điều cần chú ý là protein enzyme ở trạng thái tinh thể không thể được coi là bằng chứng về sự tinh khiết. Các tinh thể protein enzyme kết tinh lần đầu đôi khi có độ sạch không vượt quá 50% và có thể chứa các protein enzyme khác. Người ta thường tiến hành kết tinh protein enzyme trong dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Quá trình kết tinh có thể tiến hành từ từ kéo dài vài ngày thậm chí hàng tuần nếu muốn nhận được các tinh thể tốt. Thông thường là thêm muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  vào dung dịch protein enzyme khá đậm đặc cho đến khi làm vẫn đục nhẹ nhàng dung dịch. Sau đó đặt dung dịch vào một nơi, đồng thời tăng rất từ từ nồng độ muối trong dung dịch. Có thể tiến hành tăng nồng độ muối theo nhiều cách, thêm dung dịch muối đậm đặc hơn vào dung dịch protein enzyme theo từng giọt, thêm muối qua màng bán thẩm hoặc có thể cho bay hơi chậm chạp dung dịch protein enzyme. Trong quá trình kết tinh có thể thay đổi chỉ số pH hoặc nhiệt độ. Để kết tinh protein

enzyme được dễ dàng, ở những giai đoạn trước đó, người ta thường tách từng phần các protein enzyme bằng các dung môi hữu cơ. Điều này có lẽ liên quan đến việc các chất cơ bản, chất lipid bị loại ra khỏi dung dịch protein enzyme tạo điều kiện tốt cho quá trình kết tinh.

#### 4.2.7. Làm khô và bảo quản chế phẩm protein.

Tính cố định cấu trúc của protein được bảo đảm nhờ khả năng liên kết nước của chúng. Nếu dung dịch protein enzyme bị khô ở độ nhiệt trong phòng thì đa số protein enzyme bị biến tính. Protein enzyme chỉ có thể được giữ ở dạng khô trong trường hợp nếu việc sấy khô được tiến hành vô cùng nhanh hoặc ở nhiệt độ thấp. Nhiều protein như chúng ta đã biết, ở độ nhiệt thấp có thể được kết tủa bằng rượu hoặc acetone. Nếu kết tủa thu được bằng cách đó đem xử lý bằng rượu tuyệt đối, bằng acetone hoặc bằng ether và sau đó làm khô thật nhanh thì protein sẽ không bị biến tính. Ở dạng khô, bột protein có thể giữ một thời gian lâu, khi hòa tan nó trong nước nó thể hiện những tính chất ban đầu của mình.

Tuy nhiên, nhiều protein không chịu được cách xử lý như vậy. Vì vậy, người ta sử dụng phương pháp làm đông khô là phương pháp làm khô protein thận trọng nhất, phương pháp này có thể sử dụng được cho hầu hết protein.

Dung dịch protein đã được thâm tích được làm đóng băng và làm thăng hoa băng ở áp suất 0,01-0,001 mm thuỷ ngân (được tạo ra nhờ máy hút chân không mạnh). Nơi nước được tạo ra đều được đóng băng trong bầu dự trữ ở độ nhiệt thấp hơn (-70, -80°C). Sau một vài giờ chỉ còn lại bột protein. Sau đó bột này (trong chân không) có thể được giữ ở độ nhiệt cao hơn. Protein đã được làm đông khô bằng cách như thế khi hoà tan trong nước cần sẽ cho dung dịch protein (nguyên thể) ngay sau một vài năm. Người ta đã bảo quản huyết thanh máu bằng phương pháp như thế, huyết thanh khô này có thể được sử dụng trong mục đích truyền máu.

### V. Định lượng và đánh giá độ tinh sạch của chế phẩm protein

#### 5.1. Các phương pháp xác định hàm lượng protein

Protein sau khi đã được tách chiết và làm sạch có thể định lượng được. Nếu protein nghiên cứu là enzyme thì việc định lượng thông qua xác định hoạt độ của enzyme (theo quy ước quốc tế: 1 đơn vị hoạt độ enzyme là lượng enzyme làm chuyển hoá  $1\mu\text{mol}$  cơ chất trong 1 phút ở các điều kiện tiêu chuẩn). Như vậy cứ sau các bước tách chiết và làm sạch protein người ta thấy tổng lượng protein giảm nhưng hoạt độ enzyme tăng

nghĩa là hoạt độ riêng tăng rất cao. Protein được coi là sạch nếu những bước tách chiết và làm sạch sau không làm tăng hoạt độ riêng của chúng nữa, và chỉ khi đó ta mới hoàn thành việc tách chiết và làm sạch protein. Nếu protein không phải là enzyme thì ta có thể định lượng chúng bằng các phương pháp khác. Nếu protein ta nghiên cứu là hormon hoặc các độc tố thì chúng được xác định qua hiệu ứng sinh học mà chúng gây ra; ví dụ như hormon sinh trưởng (growth hormone) sẽ kích thích sự sinh trưởng của các tế bào đích nuôi cây. Nếu là protein vận chuyển thì có thể xác định chúng thông qua nồng độ chất mà chúng vận chuyển. Sau đây là một số phương pháp thường được sử dụng để xác định hàm lượng protein.

#### - Định lượng nitrogen theo phương pháp kjeldahl:

Phần lớn các phương pháp gián tiếp xác định protein đều dựa trên cơ sở xác định lượng nitrogen. Lượng nitrogen có trong các protein là gần giống nhau không phụ thuộc vào chất lượng và nguồn protein. Doong nhiên trên cơ sở lượng nitrogen có thể xác định chỉ các protein đã được tinh sạch hoặc lượng protein của các mẫu nghiên cứu mà ngoài protein ra không chứa những chất chứa nitrogen khác. Trong nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm, protein thô được định lượng bằng cách xác định lượng nitrogen toàn phần và kết quả nhân với 6,25, nghĩa là coi protein luôn luôn chứa 16% nitrgen. Thực tế, trong thực phẩm, bên cạnh protein còn có những chất hữu cơ khác có chứa nitrogen như amid, alcaloid, ammonia (ví dụ như trong thực phẩm lén men) acid nitric... do đó hàm lượng nitrogen toàn phần chính thức cao hơn 16% (16-17%) nhưng ở protein thực vật thì hàm lượng này lại thấp hơn 16%. Hệ số 6,25 là hệ số trung bình thô. Trong một vài trường hợp, muốn có kết quả chính xác, nên dùng những hệ số đặc biệt.

Nguyên lý của phương pháp này là vô cơ hoá mẫu bằng  $H_2SO_4$  đậm đặc và chất xúc tác. Dùng một kiềm mạnh (NaOH hoặc KOH) đẩy  $NH_3$  từ muối  $(NH_4)_2SO_4$ . Sau đó hứng  $NH_3$  vào dung dịch acid có nồng độ xác định. Sau đó dùng kiềm có nồng độ xác định để chuẩn độ acid dư. Từ đó tính được lượng nitrogen có trong nguyên liệu.

#### - Định lượng protein theo phương pháp Lowry:

Phương pháp này dựa trên cơ sở dùng máy đo màu để xác định màu sản phẩm khử của phosphomolipden - phosphowolframate (thuốc thử Folin - Ciocalteau) với phức hợp đồng - protein. Phức màu xanh tạo thành có thể đo ở bước sóng 675nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào đồ thị chuẩn protein (thông thường

dùng tinh thể albumin huyết thanh bò) ta có thể tính được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Phương pháp Lowry được dùng rộng rãi để xác định nhiều loại protein khác nhau. Phương pháp này có độ nhạy cao, cho phép phát hiện được protein trong dung dịch ở nồng độ  $1\mu\text{g/ml}$ . Tuy nhiên cường độ màu còn tùy thuộc nhiều vào loại protein. Ví dụ, ở cùng một nồng độ, dung dịch trypsin cho cường độ màu cao gấp 3 lần gelatin, hemoglobin cho cường độ màu thấp hơn trypsin nhưng cao hơn gelatin.

Ngoài ra, nhiều chất khác có thể làm tăng hay giảm cường độ màu phản ứng, vì vậy phương pháp này cho kết quả chính xác khi xác định protein đã được tinh sạch.

#### - Định lượng protein bằng phương pháp quang phổ:

Phương pháp đơn giản nhất để đo nồng độ protein trong dung dịch là độ hấp thụ tia cực tím của nó. Nếu protein tinh sạch thì nồng độ tuyệt đối của nó được tính theo giá trị đo được. Nếu protein không tinh sạch (ví dụ, dịch chiết từ một sắc ký) thì nồng độ của protein tổng được tính tương đối từ độ hấp thụ. Nguyên tắc của phương pháp này là các protein hấp thụ tia cực tím cực đại ở bước sóng  $280\text{nm}$  do các acid amin thơm như tryptophan, tyrosine và phenylalanine. Độ hấp thụ ở  $280\text{nm}$  thay đổi tùy loại protein nhưng hệ số tắt đo được (nghĩa là độ hấp thụ của dung dịch protein 1% với đường sóng truyền qua 1cm) cho mỗi protein cho phép tính nồng độ của protein tinh sạch.

Với một hỗn hợp các protein hoặc với bất cứ một loại protein nào mà không biết hệ số tắt thì nồng độ protein được tính như sau:

$$\text{Nồng độ protein (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,77 \times A_{260}$$

Trong đó:  $A_{280}$ : độ hấp thụ ở bước sóng  $280\text{nm}$

$A_{260}$ : độ hấp thụ ở bước sóng  $260\text{nm}$

Phương pháp này không dùng được cho các dung dịch có nồng độ protein thấp hơn  $0,1\text{mg/ml}$  hoặc khi có mặt nhiều chất khác mà hấp thụ cùng một vùng cực tím (ví dụ, đệm, acid nucleic và một số chất béo), hoặc khi protein ở trong dịch truyền phù chứ không phải trong dung dịch. (Ví dụ, trong màng hoặc các phức hợp có trọng lượng phân tử lớn). Cũng cần chú ý là nếu tỷ lệ  $A_{280}/A_{260}$  thấp hơn 0,6 nghĩa là dung dịch protein chưa sạch, bị lẫn các chất khác, đặc biệt với acid nucleic thì nên sử dụng phương pháp Lowry để đo nồng độ protein.

Vì vậy, phương pháp đo độ hấp thụ tia cực tím thường được dùng để định lượng protein đã tinh sạch hoặc để xác định protein trong các phân đoạn nhận được khi sắc ký tách các protein qua cột.

### *5.2. Đánh giá tính đồng thể của protein:*

Khi đã nhận được một protein enzyme ở trạng thái kết tinh, người ta phải thử lại mức độ tinh khiết hay tính đồng thể của nó. Độ đồng thể của ché phẩm protein enzyme phải được kiểm tra bằng một số phương pháp dựa trên những nguyên lý khác nhau. Trong một số trường hợp protein enzyme được coi là đồng thể khi ly tâm, nhưng lại có thể phân chia thành một số isoenzyme bằng phương pháp điện di trên gel. Chính vì vậy, nếu dùng nhiều loại phương pháp khác nhau để kiểm tra độ sạch của protein mà kết quả đều cho là đồng thể thì protein đó có thể được công nhận là tinh khiết. Những phương pháp để kiểm tra tính đồng thể hay dùng là xây dựng đồ thị về độ hoà tan, điện di và siêu ly tâm.

- Phương pháp kiểm tra tính đồng thể (hoặc còn gọi là tính đồng nhất) của protein đơn giản và nhạy nhất là xây dựng đường biểu diễn về độ hoà tan.

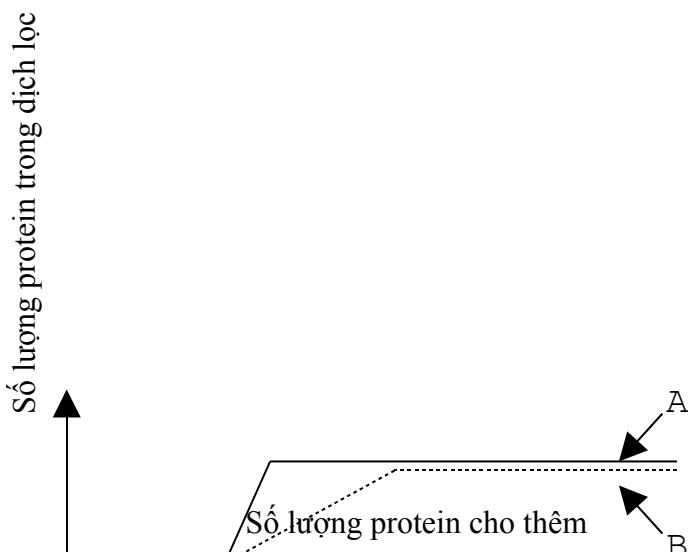
Cách làm như sau: Trong hàng loạt mẫu dùng một thể tích không đổi một loại dung môi (nước hoặc dung dịch muối) lắc với những số lượng enzyme khác nhau. Sau đó lọc và xác định số protein trong dịch lọc. Cuối cùng xây dựng đường đồ thị.

Trong những loại mẫu đầu, tất cả các protein thêm vào bị hoà tan và số lượng protein thêm vào bằng số lượng protein có trong dịch lọc hay dịch ly tâm. Kết quả nhận được biểu diễn là một đường thẳng. Sau đó dung dịch đạt được bão hoà. Nếu protein đem hoà tan là tinh khiết nghĩa là đồng nhất thì khi thêm protein trong dịch lọc sẽ không tăng lên và đường biểu diễn có một điểm uốn. Nếu trong mẫu có một protein thứ hai thì sau khi đạt được độ bão hoà đối với protein ít hoà tan hơn, loại protein thứ hai còn có thể hoà tan được nữa.

Kết quả là có một điểm bão hoà thứ hai và đường biểu diễn có hai điểm uốn. Nếu dịch chiết (hỗn hợp) có nhiều protein enzyme thì sẽ có nhiều điểm uốn. Phương pháp này được Northrop và Kunitz sử dụng rất có kết quả. Nay vẫn còn ứng dụng nhiều.

- Phương pháp thứ hai để xác định độ đồng thể của protein enzyme là phương pháp điện di. Phương pháp điện di là ứng dụng tính chất lưỡng tính của protein, dựa trên cơ sở dịch chuyển của các tiểu phần ché phẩm

protein enzyme mang điện trong điện trường. Đem ché phẩm protein enzyme điện di ở pH và lực ion nhất định. Nếu trên điện di đồ có một băng protein thì chứng tỏ protein enzyme đó là đơn thể. Nếu có hai băng chứng tỏ có hai protein enzyme trong ché phẩm đó. Bản điện di đồ này được đưa vào máy detector để phát hiện không chỉ nồng độ của băng điện di mà còn phát hiện được số lượng các băng vệt.



**Hình 5.4: Đường biểu diễn độ hòa tan protein**

- Phương pháp siêu ly tâm:

Đây cũng là phương pháp rất quan trọng để xác định tính đồng thể của protein enzyme. Phương pháp được thực hiện: **A: Phân tách đơn thể**

Dùng lực ly tâm rất lớn bằng cách tăng số vòng quay ly tâm lên hàng nghìn, hàng vạn vòng trong một phút. Với tốc độ ly tâm rất lớn, người ta có thể tách ra được các phân tử enzyme có trọng lượng phân tử khác nhau. **B: Hỗn hợp 2 protein**

Tốc độ kết tủa của protein enzyme trong máy siêu ly tâm được xác định bằng trọng lượng phân tử của nó. Khi dừng quay thì các phân tử protein lại khuyếch tán vào dung dịch. Bởi vậy, cần phải quan sát tốc độ lắng trong quá trình siêu ly tâm. Chính vì vậy, trong cốc siêu ly tâm, người ta gắn một thiết bị quang học đặc biệt, vẽ các đường ánh sáng của kết quả

phân tích lên một màn. Nếu trong dung dịch có một loại protein enzyme (có một trọng lượng phân tử) thì trên màn sáng sẽ cho đường đồ thị có một đỉnh. Nếu làm việc với hai protein enzyme thì sẽ có hai đỉnh v.v...

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu Chán, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Nghiêm Luật, Hoàng Bích Ngọc, Vũ Thị Phương. 2001. Hóa sinh. Nxb Y học - Hà Nội.
2. Phạm Thị Trần Châu, Trần Thị Áng. 1999. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục - Hà Nội.
3. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyên. 1998. Giáo trình sinh hoá hiện đại. Nxb Giáo dục - Hà Nội.
4. Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chú, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thắng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên. 2002. Hóa sinh công nghiệp. Nxb Khoa học & Kỹ thuật - Hà Nội.
5. Ajtai K., Szilagyi L..1985. Biokémiai gyakorlatok. Tankonyv. Jankonyv Kiado, Budapest.
6. Kerese I. 1984 Methods of Protein analysis. Akademiai Kiado, Budapest
7. Lehninger A.L. 2004. Principles of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition. W.H Freeman, 2004
8. Stryer L., 1981. Biochmistry. W. H. Freeman and company, San francisco.