



CHƯƠNG XIII : SINH HỌC PHÂN TỬ -PROTIT

- I. ENZIM VÀ COENZIM
- II. ĐIỆN DI VÀ NHIỀU XA TIA RÖNGEN
- III. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
- IV. TRÌNH TỰ SẮP XẾP CỦA CÁC AXIT AMIN

I. ENZIM VÀ COENZIM

[TOP](#)

Quá trình trao đổi chất mà các nhà bác học hiểu biết một cách sâu sắc vào khoảng giữa những năm 50 có thể coi là một tiêu biểu độc đáo về bản chất men học của tế bào. Bất cứ một phản ứng trao đổi chất nào cũng được xúc tác bằng một men đặc hiệu; đặc tính của quá trình trao đổi chất được xác định bởi bản chất và nồng độ của men có mặt trong tế bào. Do đó muốn hiểu về trao đổi chất thì phải biết về men.

Harden, người phát hiện ra trao đổi chất trung gian vào đầu thế kỷ này, cũng chú ý đến một số khía cạnh của hoạt động men. Ông thả vào nước một cái túi nhỏ làm bằng màng thẩm tích (những phân tử có kích thước nhỏ mới có thể lọt qua màng này), trong túi có dịch chiết xuất của nấm men. Sau khi những phân tử nhỏ của dịch chiết xuất này lọt qua thành túi thì dịch chiết xuất nấm men không có thể phân hủy được đường. Không thể giải thích hiện tượng đó là do chính men đã lọt qua màng thẩm tích vì nước ở trong túi cũng không phân giải được đường. Tuy nhiên, nước kết hợp với dịch chiết xuất nấm men trong túi lại có khả năng phân hủy đó. Do đó có thể rút ra kết luận là ngoài những phân tử lớn, men còn có những phân tử tương đối nhỏ kết hợp với nhau không chặt, nên những phân tử nhỏ này có khả năng đi qua màng bán thấm. Những phân tử nhỏ ấy là một phần cấu trúc của men và rất quan trọng đối với chức phận hoạt động của men (enzim) và có tên là coenzim.

Vào khoảng giữa những năm 20, nhà hóa học Thụy điển là Hans Car August **Ximon Aile (sinh năm 1873)** đã phát hiện nhiều loại enzym khác cũng có chứa coenzim nhưng phải 10 năm sau, người ta mới biết được cấu trúc của các coenzim đó. Cũng lúc ấy người ta xác định được cấu trúc của các vitamin, sau đó, không còn hoài nghi gì nữa, trong thành phần cấu tạo của phần lớn coenzim có những phân tử có cấu trúc tương tự vitamin.

Như vậy, vitamin có lẽ là phần coenzim, không được bản thân cơ thể tổng hợp nên, do vậy phải đưa vitamin vào trong thức ăn. Không có vitamin thì không có coenzim còn không có coenzim thì một số enzym mất hoạt tính, như vậy quá trình trao đổi chất bị rối loạn. Kết quả là xảy ra bệnh thiếu vitamin, có khi dẫn đến tử vong.

Bởi vì enzym và coenzim là những chất xúc tác cần cho cơ thể với một lượng nhỏ cho nên vitamin cũng cần cho cơ thể một lượng nhỏ ấy. Đặc biệt, điều đó có thể giải thích được một thực tế là trong thức ăn có những yếu tố hợp phần nhỏ không đáng kể nhưng cực kỳ cần thiết đối với hoạt động sống bình thường của cơ thể. Một lượng vết của các nguyên tố như đồng (Cu), coban (Co), molybden (Mo),

kẽm (Zn) tạo nên bộ phận chủ yếu của cấu trúc men. Người ta đã tách được các enzym có chứa một nguyên tử hoặc vài nguyên tử của những nguyên tố ấy.

Vậy còn phải nói gì nữa về chính bản thân những men đó? Suốt thế kỷ trước, men được coi là những chất bí ẩn và người ta chỉ biết thông qua tác động của nó. Nhà hóa học người Đức là Leona Mikhaelis (1875 - 1949) đã khám phá ra ***bí mật của men nhờ những định luật và phương pháp của động hóa học (bộ môn*** hóa lý nghiên cứu tốc độ của những phản ứng hóa học). Năm 1913 ông đã thiết lập được mối tương quan phụ thuộc của tốc độ phản ứng do men xúc tác với những điều kiện xác định. Ông giả thiết men hình thành hợp chất trung gian với chất mà men có phản ứng xúc tác. Giả thiết tương tự chứng tỏ men chẳng là cái gì khác ngoài những phân tử chịu tác động bởi các quy luật hóa lý học. Nhưng những phân tử đó là gì? Có lẽ đó là protit vì dung dịch men dễ mất hoạt tính thậm chí khi mới chỉ đun nhẹ mà ai cũng biết, chỉ có các phân tử **protit mới** có tính chịu nhiệt thấp như vậy.

Nhưng toàn bộ những điều trên chỉ là giả thiết. Vào những năm 20, nhà bác học người Đức là Risa Vinsotete (1872 - 1942) đã nêu giả thuyết theo đó nói chung ***men không phải là protit. Thật ra như về sau mới rõ giả thuyết này là sai***, nhưng uy tín khoa học của bản thân người đề ra giả thuyết làm người ta không dám nghi ngờ trong một thời gian dài về điều sai lầm của giả thuyết. Sau đó vài năm vấn đề bản chất protit của men lại được nêu lên lần này là do nhà hóa sinh học người Mỹ là Jem Bitxelo Xamne (1887 - 1955) nêu lại. Xemne đã tách được một loại men từ hạt Canavalium vào năm 1926, men này xúc tác phản ứng phân thủy nước tiểu thành amoniac và khí CO₂. Trong quá trình thu hồi men, ông đã thấy những tinh thể hết sức nhỏ xuất hiện tại một thời điểm nhất định. Sau khi thu được tinh thể và hòa tan tinh thể đó vào nước, ông được một dung dịch có hoạt tính ureasa rất cao. Tất cả những cố gắng tách hoạt tính đó ra khỏi tinh thể đều thất bại. Nhưng tinh thể thu hồi được là men và như các thí nghiệm của Xamne đã chứng tỏ chúng đồng thời còn là protit. Như vậy Ureasa chẳng những là men đầu tiên thu được dưới dạng tinh thể mà còn là men đầu tiên được chứng minh là có bản chất protit. Người ta còn hoài nghi quy luật này có là phổ biến đối với tất cả các loại men hay không. Những nghiên cứu của nhà hóa sinh học người Mỹ là John Havot Noctrop (sinh năm 1891) đã chấm dứt sự hoài nghi này. Năm 1930 ông đã kết tinh được pepxin (men tiêu hóa protit của dịch dạ dày); hai năm sau thu được trepxin và năm 1935 thì được chimotripxin cũng là những protit. Sau đó các nhà bác học khác đã thu được hàng chục loại men khác ở dạng tinh thể và tất cả đều là protit. Vào khoảng giữa những năm 30 người ta đã không có thể tách vấn đề men ra khỏi vấn đề protit nữa.

II. ĐIỆN DI VÀ NHIỀU XẠ TIA RÖNGEN

TOP

Sự phát triển các phương pháp vật lý và hóa học vào nửa đầu thế kỷ trước cho phép các nhà hóa sinh học nghiên cứu một cách chính xác hơn những đại phân tử protit, mà theo những khái niệm của các nhà bác học thì protit là cơ sở của sự sống. Và như vậy một lĩnh vực khoa học mới hình thành - sinh học phân tử, kết hợp trong vật lý học, hóa học và sinh học. Nhiệm vụ chủ yếu của sinh học phân tử là nghiên cứu tỷ mỉ cấu trúc tinh vi và chức năng hoạt động của các đại phân tử sinh học.

Năm 1923, nhà hóa học người Thụy điển là Teodo Xvetberg (sinh năm 1884) ***đã nghiên cứu một phương pháp mới xác định kích thước của các phân tử protit-phương pháp ly tâm. Máy siêu ly tâm do ông thiết kế là một cái ống nhỏ khi*** quay tạo ra lực ly tâm mạnh hơn sức hút của trái đất hàng trăm nghìn lần. Dao động nhiệt của các phân tử nước ở nhiệt độ bình thường đủ để giữ những đại phân tử protit ở trạng thái lơ lửng. Sự dao động này chống lại được sức hút của trái đất, nhưng không có khả năng chống lại sức ly tâm. Trong máy ly tâm đang quay, các phân tử protit bị kết tủa hoặc lắng đọng lại. Trọng lượng phân tử của các phân tử protit có thể xác định bằng tốc độ lắng của phân tử. Chẳng hạn phân tử có kích thước trung bình, ví dụ như phân tử Hemoglobin (của sắc tố của máu) có trọng lượng phân tử bằng 67.600. Trọng lượng này lớn hơn trọng lượng phân tử nước 3.700 lần (trọng lượng phân tử nước là 18). Các phân tử protit khác còn có trọng lượng phân tử lớn hơn nhiều, có tới hàng trăm nghìn đơn vị.

Kích thước và tính phức tạp của phân tử protit quy định cách sắp xếp của các nguyên tử trên bề mặt phân tử, các nguyên tử này có khả năng tích điện. Ở đây mỗi loại protit có sự phân bố điện tích dương và điện tích âm đặc trưng riêng của mình, chúng có khả năng tự thay đổi điện tích một cách xác định phụ thuộc vào sự biến đổi pH của môi trường xung quanh.

Nếu đặt dung dịch protit trong một điện trường thì những phân tử protit riêng biệt bắt đầu chuyển động về cực dương hoặc cực âm với tốc độ được xác định bởi đặc tính tích điện, bởi kích thước và hình dáng phân tử v.v... Không có hai protit khác nhau ở trong cùng một điều kiện như nhau lại có cùng một tốc độ. Trên cơ sở quy luật đó, nhà hoá học người Thụy điển là Acne Vinhem Caurin Tizeliut (sinh năm 1902), học trò của Xvertberg, năm 1937 đã thiết kế ra một máy cấu tạo **bằng ống hình chữ U, có chứa hỗn hợp protit có khả năng dịch chuyển dưới tác dụng của điện trường. (Hiện tượng chuyển chỗ trong điện trường của những** hạt lơ lửng trong chất lỏng gọi là điện di). Bởi vì mỗi thành phần của hỗn hợp chuyển động với tốc độ đặc trưng, nên người ta có thể dần dần tách hỗn hợp ra từng thành phần một. Những ống hình chữ U, được lắp bằng những đoạn nối một cách đặc biệt nên có thể dễ dàng tháo rời ra được từng đoạn. Nhờ đó mỗi một thành phần của hỗn hợp nằm ở những đoạn riêng biệt có thể được tách ra khỏi các thành phần khác còn lại.

Dùng những thấu kính hình trụ tương ứng và thay đổi sự phản chiếu tia sáng khi đi qua hỗn hợp huyền phù (theo sự thay đổi nồng độ protit), người ta có thể theo dõi được quá trình phân tách hỗn hợp. Sự thay đổi khúc xạ cho những đường cong hiện sóng trên ảnh. Căn cứ vào những lượn sóng này có thể tính ra khối lượng của từng protit trong hỗn hợp. Thí dụ protit của huyết tương khi chạy điện di được tách ra thành nhiều phân đoạn bao gồm albumin và ba nhóm globulin. Thêm vào đó, phân đoạn (- globulin có chứa kháng thể).

Vào những năm thứ 40, người ta đã hoàn thiện các phương pháp điều chế công nghiệp những phân đoạn protit khác nhau.

Siêu ly tâm và điện di phụ thuộc vào các tính chất chung của phân tử protit. Việc áp dụng tia Ronghen đã cho phép các nhà hoá sinh học nghiên cứu cấu trúc bên trong của phân tử. Chùm tia Ronghen khi đi qua một chất sẽ bị khúc xạ tán. Nếu các phân tử của vật chất được sắp xếp theo một trật tự chặt chẽ (như các nguyên tử trong tinh thể), thì sự khúc xạ tán của tia Ronghen cũng có trật tự. Chùm tia Ronghen đập vào phim ảnh sau khi khúc xạ tán sẽ cho sự sắp xếp đối xứng của các điểm. Dựa vào hình ảnh đó, người ta có thể xác định vị trí của các nguyên tử trong tinh thể.

Các phân tử lớn thường được cấu tạo từ những đơn vị nhỏ bé sắp xếp đều nhau trong phân tử. Điều đó đúng với cả các phân tử protit, mà axit amin là những đơn vị cấu trúc của protit. Có thể đánh giá sự sắp xếp của các axit amin trong phân tử protit bằng cách xem chùm tia Ronghen khúc xạ tán như thế nào. Mặc dù đối với protit sự khúc xạ tán tia Ronghen biểu hiện không được rõ như đối với các tinh thể, nhưng cũng có thể dùng để phân tích protit. Vào đầu những năm 30 người ta đã làm sáng tỏ bức tranh chung về sự sắp xếp của các đơn vị axit amin trong không gian. Những nghiên cứu xuất sắc của nhà hoá học người Mỹ là Lainut Pauling (sinh năm 1901), đã làm rõ sự sắp xếp chính xác của các axit amin và chứng minh rằng chuỗi axit amin có hình xoắn ốc.

Các nhà khoa học càng nghiên cứu sâu cấu tạo của protit càng thu được những kết quả phân tích cấu trúc tia Ronghen phức tạp hơn. Đã đến lúc cần những tính toán công phu và phức tạp mà trí nhớ con người không có khả năng làm việc đó. May thay, vào những năm thứ 50, người ta chế tạo được máy tính điện tử có khả năng giải hàng loạt phép tính dài dòng nhất trong thời gian ngắn nhất.

Lần đầu tiên người ta đã dùng máy tính điện tử để nghiên cứu vitamin. Năm 1926, hai thầy thuốc người Mỹ là Jojo Risa Mainôt (1885-1950) và William Peri Mefi (sinh năm 1892) đã nhận thấy cho

thêm gan một cách đều đặn vào khẩu phần ăn kiêng của người bệnh thiếu máu ác tính đã cứu họ thoát khỏi cái chết hiển nhiên. Hai ông giả thiết tính chất cứu sống được người đó là do trong gan có vitamin B12, và năm 1948 người ta đã tách được loại vitamin này. Phân tử của vitamin B12 rất phức tạp bao gồm 183 nguyên tử thuộc 6 nguyên tố khác nhau. Năm 1956, khi dùng những phương pháp vật lý học mới và máy tính, một nhóm bác học dưới sự lãnh đạo của nhà hoá học hữu cơ người Scotland là Alexander Todd (sinh năm 1907) đã làm sáng tỏ cấu trúc chi tiết của vitamin B12 Bởi vì vitamin này chứa nhóm xianua, nguyên tử coban và nhóm amin ở giữa các cấu trúc khác nên vitamin này có tên là xianocobalamin.

Hiển nhiên là để nghiên cứu protit bằng phương pháp nhiễu xạ tia Røgen việc dùng máy tính điện tử là điều không thể thiếu được. Năm 1960, khi dùng phương pháp nhiễu xạ tia Røgen và các máy tính, hai nhà hóa sinh học người Anh là Max Fiedman Perutz (sinh năm 1912) và John Kendrew (sinh năm 1917) đã đưa ra cấu trúc hoàn chỉnh của phân tử miôglôbin (protit của cơ, trong chừng mực nào đó gần giống hemôglôbin nhưng nhỏ hơn hemôglôbin bốn lần) với sự chỉ dẫn chính xác về sự sắp xếp của từng axit amin một

III. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ

TOP

Nếu biết được bản chất hóa học của những tiểu đơn vị cấu thành phân tử và sự sắp xếp của những đơn vị này tuy còn ở dưới dạng chung, thì việc làm sáng tỏ cấu trúc của những phân tử lớn bằng phương pháp nhiễu xạ tia Røgen sẽ dễ dàng hơn nhiều.

Không phải ngay một lúc người ta đã đạt được những tiến bộ trong việc nghiên cứu hóa học protit. Các nhà bác học của thế kỷ trước chỉ có thể nhận định một cách rất thiếu căn cứ là phân tử protit bao gồm các axit amin. Đến đầu thế kỷ XX nhà hóa học người Đức là Emil German Fischer (1852 - 1919) đã chứng minh **được rằng các axit amin kết hợp với nhau thành protit bằng cách nào. Năm 1907** ông đã điều chế được một hợp chất đơn giản tương tự protit bao gồm 18 đơn vị: 15 phân tử của một loại axit amin này và 3 phân tử của loại axit amin khác.

Còn cấu trúc phân tử của protit phức tạp mà người ta thường gặp trong thiên nhiên thì như thế nào? Trước tiên con số chính xác của từng loại axit amin trong phân tử protit là bao nhiêu? Người ta trả lời câu hỏi đó một cách đơn giản hơn cả bằng cách tách phân tử protit ra thành các loại axit amin riêng biệt và trên cơ sở phân tích hóa học mà xác định số lượng tương đối của từng hợp phần.

Nhưng những người cùng thời với Fisher không đi theo con đường ấy. Lúc đó, bằng phương pháp hóa học thông thường, người ta không thể phân biệt nổi các axit amin có cấu trúc giống nhau. Giải đáp vấn đề này bắt đầu từ lúc xuất hiện phương pháp mới mà lần đầu tiên vào năm 1903, nhà thực vật học người Nga là **Mikhail Xenenovits Txvet (1872 -1919) đã xây dựng được nguyên lý của phương pháp mới này. Khi nghiên cứu những sắc tố thực vật, Txvet đã rút được một hỗn hợp phức tạp bao gồm những hợp phần giống nhau đến nỗi hầu như người ta không thể tách những chất đó ra bằng các phương pháp hóa học thời ấy. Lúc đó ông đã nhỏ từng giọt dung dịch hỗn hợp vào một ống thủy** tình nhồi bột axit nhôm. Bề mặt của từng hạt bột ôxit nhôm đã giữ lại từng chất khác nhau của hỗn hợp bằng những lực giữ khác nhau. Khi hỗn hợp được rửa bằng dung môi mới cất thì các hợp phần được phân tách ra. Những hợp phần nào liên kết với bề mặt bột ôxit nhôm một cách lỏng lẻo nhất sẽ bị rửa trôi và tách ra trước tiên. Cuối cùng hỗn hợp được chia tách thành những hợp phần riêng biệt khác nhau, mỗi một hợp phần được tách ra là một sắc tố và được đặc trưng bằng một vạch màu xác định trong quang phổ. Phương pháp phân tách theo màu sắc này gọi là phương pháp sắc ký (từ chữ Hy Lạp: chromat- màu sắc và graphen-ghi lại). Đáng tiếc là những công trình của Txvet trôi qua không ai biết tới, và 15 năm sau Vinsote sau khi dùng lại phương pháp của Txvet mới công nhận phương pháp này. Từ đó người ta đã bắt đầu sử dụng rộng rãi phương pháp sắc ký để phân tích các hỗn hợp phức tạp.

Nhưng dùng ống nghiệm có chứa bột oxit nhôm để tách những khối lượng nhỏ bé của một hỗn hợp là một việc hết sức phức tạp. Cần phải có phương pháp phân tách đơn giản và tin cậy hơn.

Năm 1944, người ta đã tìm ra lối thoát khi hai nhà hoá sinh học người Anh là **Actua Zon Pote Martin (sinh năm 1910)** và **Risa Loren Minlington Sanger (sinh năm 1914)** đã dùng giấy lọc đơn giản trong phương pháp sắc ký. Thí nghiệm được tiến hành như sau: Người ta sấy khô một giọt hỗn hợp axit amin chấm ở mép dưới của một băng giấy lọc rồi nhúng nó vào một dung môi đặc biệt. Dung môi này theo định luật mao dẫn sẽ đi ngược lên theo tờ giấy. Khi qua giọt hỗn hợp axit amin đã sấy khô, dung môi kéo theo những axit amin riêng biệt với tốc độ đặc trưng cho từng axit amin cụ thể. Kết quả là hỗn hợp axit amin được tách ra thành một dãy những axit amin khác nhau. Sự sắp xếp của các axit amin trên giấy được phát hiện bằng những phương pháp lý hóa và hóa học đặc biệt. Việc xác định lượng axit amin có trong mỗi vệt giấy sắc ký sẽ không phải là điều khó khăn.

Phương pháp sắc ký mới trên giấy rất có hiệu quả và rõ ràng. Nó đơn giản, rẻ tiền, không đòi hỏi những máy móc phức tạp, cho phép tách một cách tỉ mỉ một lượng nhỏ không đáng kể các hợp phần của hỗn hợp. Phương pháp này đã được ứng dụng rộng rãi trong mọi lĩnh vực của hóa sinh học. Riêng Kelvin đã dùng phương pháp này trong những thực nghiệm của ông với hỗn hợp của các tế bào thực vật đang tiến hành quang hợp. Thực chất phương pháp sắc ký trên giấy là không thể thiếu được trong các công trình nghiên cứu. Nhờ phương pháp này đã xuất hiện khả năng xác định một lượng chính xác của các axit amin khác nhau của một protit nào đó. Điều đó, đến lượt mình lại cho phép xác định thành phần axit amin của các loại protit, giống như người ta xác định số nguyên tử trong các nguyên tố khác nhau tham gia trong một hợp chất nào đó.

IV. TRÌNH TỰ SẮP XẾP CỦA CÁC AXIT AMIN

[TOP](#)

Nhưng tất cả chỉ vèn vện có thể thôi thì vẫn chưa đủ. Như đã biết, các nhà hóa học chẳng những lưu ý đến số nguyên tử trong một hợp chất bất kỳ mà còn chú ý cả đến trình tự sắp xếp của chúng. Đối với các axit amin trong phân tử protit cũng vậy. Vấn đề trình tự sắp xếp của các axit amin rất phức tạp. Thậm chí nếu trong một phân tử tổng cộng chỉ có vài chục axit amin thì số kiểu kết hợp có thể có của các axit amin sẽ đạt đến con số khổng lồ. Còn nếu có hơn 500 axit amin ví dụ: trong hemoglobin là phân tử cỡ trung bình, thì số kiểu biểu diễn cách sắp xếp có thể có của các axit amin được thể hiện bằng một con số gồm 600 con số. Làm cách nào chọn đúng được sự sắp xếp có thể có nhất của các axit amin của một protit cụ thể từ một con số nhiều không tưởng tượng được khả năng kết hợp đã nói ở trên?

Rõ ràng là dựa vào phương pháp sắc ký trên giấy vấn đề này đã được giải quyết một cách dễ dàng. Nhưng nhà hóa sinh học người Anh là Frederic Senger đã tách phân tử này thành những chuỗi ngắn rồi dùng phương pháp sắc ký trên giấy xác định các axit amin và trật tự sắp xếp của chúng. Đó không phải là công việc nhẹ nhàng vì thậm chí một đoạn chỉ có 4 cấu tử đã có thể có 24 cách sắp xếp khác nhau. Sau khi phát hiện ra những chuỗi ngắn nào kết thành chuỗi dài, Senger dần dần đã khôi phục lại được cấu trúc của những chuỗi dài hơn. Đến năm 1953 ông đã biết được trật tự sắp xếp chính xác của các axit amin trong phân tử Insulin.

Sau Senger có nhà hóa sinh học người Mỹ là Vinsen Vinhio (sinh năm 1901) **đã dùng phương pháp của Senger để nghiên cứu Oxitoxin là một phân tử rất đơn giản**. Oxitoxin (hocmon thuộc thủy sau của tuyến yên) tổng cộng chỉ có 8 axit amin. Sau khi xác định được trình tự sắp xếp của các axit amin, Vinhio thử tổng hợp một hợp chất sao cho mỗi một axit amin ở vào đúng vị trí cũ trong phân tử oxitoxin. Sự tổng hợp đã thực hiện vào năm 1955-1956; kết quả là ông thu được oxitoxin tổng hợp mà về mặt tính chất không thua kém hocmon (oxitoxin) tự nhiên. Phương pháp phân tích của Senger không khác phương pháp tổng hợp của Vinhio nhưng được lặp lại về sau này trên một quy mô rộng lớn hơn. Năm 1960, các nhà bác học đã xác định được trình tự sắp xếp của các axit amin trong men ribonucleaza bao gồm 124 axit amin, con số này nhiều gấp hai lần rưỡi số axit amin trong phân tử Insulin. Người ta

đã tổng hợp được từng đoạn của ribonucleaza, sau đó nghiên cứu hoạt tính men của chúng. Như vậy, đến năm 1963 người ta đã khẳng định rằng đối với hoạt động chức năng của một phân tử nhất định cần bản chỉ cần axit amin 12 và 13 (hixtidin và metiodin. Đây là bước tiến đáng kể trong việc xác định cơ chế chính xác của sự hoạt động chức năng của phân tử men.

Đến giữa thế kỷ 20, phân tử protit đã trở thành <<quen thuộc>>.

