

Cao Đăng Nguyên
(chủ biên)

Giáo trình
Công nghệ Protein

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ
Huế-2007

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 với thời lượng chỉ trong hai đơn vị học trình, 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. <i>Mở đầu</i>	<i>Cao Đăng Nguyên</i>
Chương 2. <i>Amino acid - đơn vị cấu tạo protein</i>	<i>Cao Đăng Nguyên</i>
Chương 3. <i>Peptide - cấu trúc và chức năng</i>	<i>Cao Đăng Nguyên</i>
Chương 4. <i>Cấu trúc và tính chất lý-hóa của protein</i>	<i>Cao Đăng Nguyên</i>
Chương 5. <i>Các phương pháp chiết rút, tinh sạch và xác định protein</i>	<i>Đỗ Quý Hai</i>
Chương 6. <i>Công nghệ sản xuất một số protein</i>	<i>Cao Đăng Nguyên</i>

Chúng tôi chân thành cảm ơn Quỹ nâng cao chất lượng-Dự án giáo dục đại học – Đại học Huế đã hỗ trợ chúng tôi biên soạn giáo trình này; cảm ơn **GS.TSKH Lê Doãn Diên, PGS.TS Lê Đức Ngọc** đã góp ý đề cương chi tiết, **GS. TS Đỗ Ngọc Liên** đã đọc bản thảo và đóng góp những ý kiến quý báu.

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

MỤC LỤC

	Trang
Chương 1. Mở đầu	9
I. Khái quát chung về protein	9
1.1 Những đặc trưng chung của nhóm chất protein	9
1.2. ý nghĩa khoa học và thực tiễn của nhóm chất protein	9
II. Phân loại protein	10
2.1. Protein đơn giản	10
2.2. Protein phức tạp	11
III. Chức năng xúc tác sinh học	11
3.1. Xúc tác và enzyme	11
3.2. Isozyme	14
3.3. Các enzyme di lập thể (allosteric enzyme) và phức hệ enzyme (multienzyme).	16
3.4. Những quan điểm y học về protein	8
Chương 2. Amino acid- đơn vị cấu tạo protein	22
I. Thành phần và tính chất lý-hoá của amino acid	22
1.1. Thành phần và cấu tạo amino acid	22
1.2. Phân loại amino acid	22
1.3. Màu sắc và mùi vị của amino acid	26
1.4. Tính tan của amino acid	
1.5. Biểu hiện tính quang học của amino acid	27
1.6. Tính lưỡng tính của amino acid	28
1.7. Các phản ứng hoá học của amino acid	30
II. Thu nhận amino acid bằng thuỷ phân protein	31
2.1. Thuỷ phân bằng acid	31

2.2. Thủy phân bằng kiềm	32
2.3 Thủy phân bằng enzyme	32
2.4. Các phương pháp theo dõi và xác định tốc độ thủy phân	32
III. Các phương pháp phân tích amino acid	33
3.1. Phương pháp lý -hoá	33
3.2. Phương pháp sắc ký	33
3.3. Phân tích bằng máy tự động	34
3.4. Phương pháp điện di	35
3.5. Phân tích bằng quang phổ khối	35
3.6. Phương pháp đồng vị	36
3.7. Phương pháp enzyme	36
3.8. Phương pháp vi sinh vật	36
Chương 3. Peptide - cấu trúc và chức năng	38
I. Tính chất chung của peptide	38
1.1.Cấu tạo của peptide	38
1.2. Cách gọi tên và phân loại peptide	40
1.3. Các phản ứng đặc trưng của peptide	41
II Các phương pháp tách phân lập và xác định peptide	41
III. Sự tồn tại tự nhiên và vai trò chức năng của peptide	42
3.1. Khái niệm chung	42
3.2. Glutathion và các chất tương tự	42
3.3. Các hormon có bản chất peptide và protein	43
3.4. Các peptide kháng sinh	49
3.5. Các peptide có ý nghĩa sinh lý tế bào	51
3.6. Các peptide có chức năng bảo vệ	51
Chương 4. Cấu trúc và tính chất lý hoá của protein	53

I Các quan điểm khác nhau về nghiên cứu protein	53
II. Thành phần và liên kết trong cấu trúc protein	53
2.1. Liên kết cộng hoá trị	53
2.2. Liên kết yếu	54
III. Hình dạng kích thước và cấu trúc phân tử protein	57
3.1. Hình dạng kích thước	57
3.2. Cấu trúc sơ cấp	57
3.3. Cấu trúc thứ cấp	58
3.3 Cấu trúc không gian.	62
IV. Tính chất lý -hoá của protein	67
V. Biến tính protein	72
Chương 5. Các phương pháp chiết rút, tinh sạch và xác định protein	67
I. Khái niệm	75
II. Các biện pháp cần thiết để nhận protein nguyên thể	75
2.1. Nhiệt độ	75
2.2. Nồng độ proton	75
2.3. Tác nhân hoá học	77
III. Phá vỡ tế bào và chiết rút protein	79
3.1. Phá vỡ tế bào	79
3.2. Chiết rút protein	79
IV. Tinh sạch protein	80
4.1 Loại tạp chất	80
4.2. Các kỹ thuật thông thường trong tinh sạch protein	80
V. Định lượng và đánh giá độ sạch của chế phẩm protein	89
5.1.Các phương pháp xác định hàm lượng protein	89

5.2. Đánh giá tính đồng thể của protein	92
Chương 6. Công nghệ sản xuất một số protein	95
I. Mục đích yêu cầu	95
1.1. Ý nghĩa của protein đối với quá trình sinh học	95
1.2. Nhu cầu khoa học và xã hội đối với protein	96
1.3 Tình hình nghiên cứu và sản xuất protein có hoạt tính sinh học	97
II. Sản xuất protein bằng con đường vi sinh vật	100
2.1. Sản xuất protein đơn bào	100
2.2. Sinh tổng hợp các hormon bằng vi sinh vật	104
2.3. Sản xuất các cytokin	107
2.4. Sản xuất các chất miễn dịch và các vaccine	107
III. Sản xuất protein từ nguồn thực vật	111
3.1. Cơ sở sinh hoá và ý nghĩa của nuôi cấy mô và tế bào	111
3.2. Các thành tựu sản xuất protein thực vật trên thế giới	113
IV. Sản xuất protein từ nguồn động vật	114
4.1. Các nguyên tắc và điều kiện sản xuất protein	114
4.2. Sản xuất kháng thể đơn dòng	115
4.3. Sản xuất các hormon, enzyme và protein khác	118
V. Sản xuất protein từ nguồn phế thải	125
5.1. Sản xuất cystine và các amino acid	126
5.2. Sản xuất protein đơn bào từ bã mía	127

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 hoá học, thông thường trong cấu trúc của chúng gồm bốn nguyên tố chính là C H O N với tỷ lệ C \approx 50%, H \approx 7%, O \approx 23% và N \approx 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 \approx 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

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

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:

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
Chymotrypsin (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
γ -globulin (ngựa)	149.000	1.250	4
Glycogen-phosphorylase (cơ thỏ)	495.000	4.100	4
Glutamate-dehydrogengenase (bò)	1.000.000	8.300	40
Synthetase của acid béo (men bia)	2.300.000	20.000	21
Virus khảm 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), chymotrypsin gồm 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 hoà tan trong nước hoặc trong dung dịch đệm 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, Na_2SO_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 amoniac 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). Tùy 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. Tùy 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 hoá 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 hoá 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 enzyme xúc tác lớn hơn nhiều so với chất xúc tác vô cơ thông thường. Ví dụ: 1mol Fe^{3+} chỉ xúc tác phân ly được 10^{-6} mol H_2O_2 /phút. Trong khi đó một phân tử catalase có một nguyên tử Fe xúc tác phân ly 5.10^6 mol H_2O_2 /phút; 1 gam pepsin trong 2 giờ thủy phân được 5 kg protein trứng luộc ở nhiệt độ bình thường. Tương tự 1gam phân tử β -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, thủy phân, v.v...

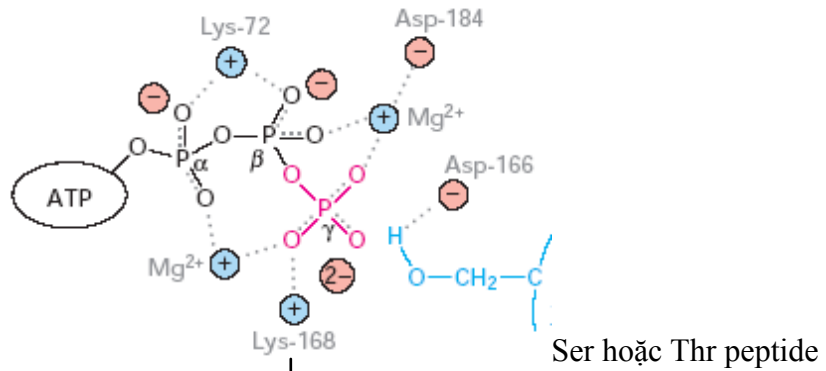
- Đặc hiệu cơ chất. Là khả năng kết hợp của cơ chất vào trung tâm hoạt động của enzyme và bị chuyển hoá dưới tác động của chúng. Dựa vào mức độ đặc hiệu người ta lại chia ra một số kiểu như: đặc hiệu tuyệt đối, là enzyme chỉ tác dụng trên một cơ chất duy nhất; đặc hiệu tương đối, là enzyme có khả năng 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.

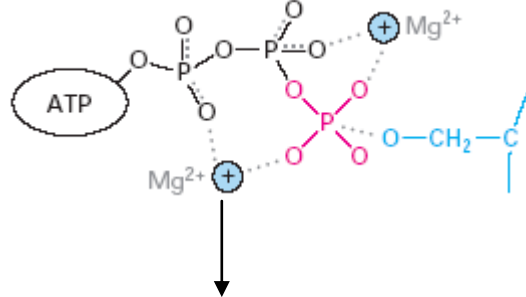
Hoạt tính của enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nồng độ enzyme, nồng độ cơ chất, nhiệt độ và ion kim loại v.v...

3.1.3. Cơ chế xúc tác của một vài enzyme.

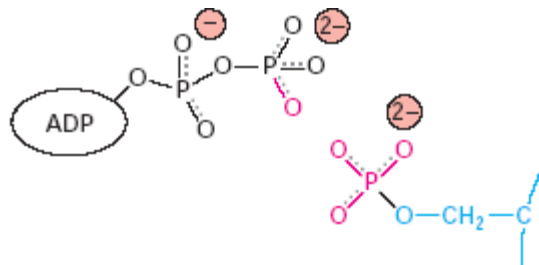
Giai đoạn đầu tiên



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, chymotrypsin 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 (organel) 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 adenyltransferase, 5'-nucleotidase.
- Trong ty lạp thể có chứa hầu hết các enzyme liên quan đến quá trình chuyển hoá 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 hoá, nhưng do sự tồn tại các dạng phân tử khác nhau nên có một số tính chất lý, hoá 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:

LDH₁: HHHH

LDH₂: HHHM

LDH₃: HHMM

LDH₄: HMMM

LDH₅: MMMM

Trong điện di theo chiều từ âm sang dương thì LDH₁ chạy nhanh nhất rồi đến LDH₂, LDH₃, LDH₄ và LDH₅ 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 hiệu quả 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 “khóa” 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 thể còn gặp 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 bị 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 dịch được nhắc đến nhiều hơn cả là các kháng thể, bổ 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. Tùy 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 từ 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.

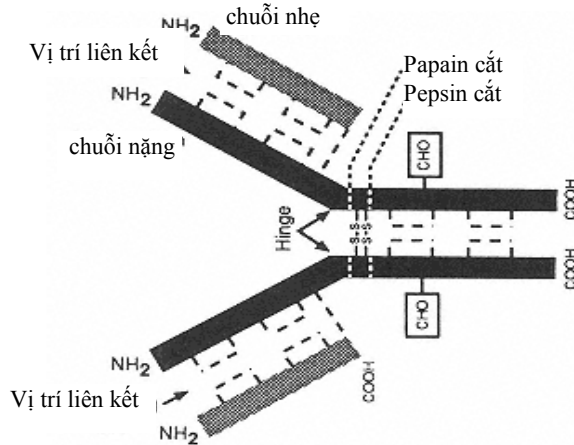
Các phân tử Ig có đặc tính hoạt động miễn dịch theo hai chức năng:

- 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_2 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 $F(ab)_2$ tương ứng.



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

b) Bộ thể (complement).

Là những protein huyết tương phản ứng với nhau nhằm tấn công các dạng tác nhân gây bệnh. Hệ thống bộ 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 bộ thể được cố định lên tất cả các kháng thể để thực hiện chức năng miễn dịch. Các thành phần của bộ thể tương tác giữa chúng với nhau và các yếu tố khác của hệ thống miễn dịch.

c) Các cytokine.

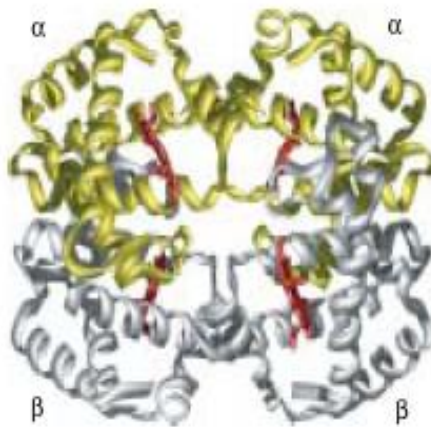
Là toàn bộ các phân tử được tiết ra bởi các tế bào của hệ thống miễn dịch, tham gia vào hoạt động tín hiệu giữa các tế bào trong hoạt động đáp ứng miễn dịch. Tất cả các cytokine đều có bản chất protein hay glycoprotein và được phân loại như sau:

- Các interferons (IFN): có các dạng α -IFN, β -IFN và γ -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.

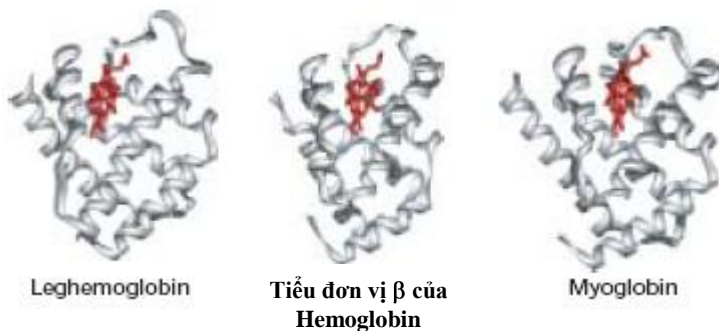
- Các chất dẫn truyền sinh học (mediator): là những protein của giai đoạn đáp ứng miễn dịch cấp tính.

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, hemocianin vận chuyển O_2 , CO_2 và H^+ 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 $M_r=8,5$ KDa trong khi đó loài sam biển châu Á (*Tachypleus tridentatus*) có $M_r=700$.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 mùng, có khối lượng phân tử khoảng 16.KDa có cả hoạt tính của enzyme α -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...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu những đặc trưng chung và ý nghĩa khoa học thực tiễn của nhóm chất protein.
2. Phân loại và chức năng sinh học của protein?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chấn, Đỗ Đình Hồ, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục
3. Phạm Thị Trân Châu, Lê Minh Châu, Lâm Chi, Nguyễn Lâm Dũng, Đỗ Đình Hồ, Lê Ngọc Tú. 1983. Những hiểu biết mới về enzym. Tập 8. NXB KH & KT Hà nội.
4. Đỗ Đình Hồ, 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, 3rd Rev Edit.
7. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th 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. 5th ed. W.H Freeman.
10. Virella G., 1998. Introduction to medical immunology, Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong kong. 4th. ed.

Chương 1

Trao đổi chất và năng lượng sinh học

1.1. Khái niệm chung về trao đổi chất

Mỗi cơ thể sống đều tồn tại trong môi trường và liên hệ mật thiết với môi trường đó. Hiện tượng cơ thể lấy một số chất từ môi trường kiến tạo nên sinh chất của mình và thải ra ngoài những chất cặn bã được gọi là sự trao đổi chất.

Sự trao đổi chất ở giới vô sinh khác với giới hữu sinh. Ở giới vô sinh, trao đổi chất làm cho các chất hữu cơ và vô cơ bị phân huỷ. Ví dụ, đá vôi (canxi carbonate) bị xói mòn vì H_2CO_3 có trong nước tác dụng với đá vôi thành canxi bicarbonate, mỡ bị ôi hoá thành một số chất khác là do tác dụng với oxy.

Ở thế giới sinh vật, mỗi cơ thể sống luôn luôn trao đổi chất với môi trường, lấy thức ăn vào chuyển hoá thành các chất sử dụng cho cơ thể và thải ra ngoài các chất cặn bã. Quá trình đó được thực hiện là do các biến đổi hoá học liên tục xảy ra trong cơ thể. Toàn bộ các biến đổi hoá học đó được gọi là sự trao đổi chất.

Quá trình trao đổi chất gồm nhiều khâu chuyển hoá trung gian. Mỗi chuyển hoá là một mắt xích của một trong hai quá trình cơ bản: đồng hoá và dị hoá.

Đồng hoá và dị hoá là hai quá trình đối lập, nhưng lại thống nhất với nhau trong một cơ thể: chúng xảy ra đồng thời và liên quan mật thiết với nhau. Các chất được tổng hợp nên trong quá trình đồng hoá là nguyên liệu cho quá trình dị hoá (ví dụ glucit là sản phẩm của quá trình quang hợp, là nguyên liệu cho quá trình hô hấp). Năng lượng giải phóng ra trong quá trình dị hoá được sử dụng một phần cho quá trình tổng hợp.

1.2. Năng lượng sinh học

Hệ thống sống cần năng lượng để chuyển động, lớn lên, tổng hợp các phân tử sinh học và vận chuyển ion, phân tử qua màng.

Các cơ thể lấy năng lượng từ môi trường sống và sử dụng năng lượng đó để thực hiện các quá trình sống có hiệu quả.

Để nghiên cứu năng lượng sinh học đòi hỏi phải có hiểu biết về nhiệt động học, một số định luật, nguyên lý mô tả nguồn, trao đổi nhiệt, năng lượng và vật chất trong hệ thống nghiên cứu.

Nhiệt động học cho chúng ta xác định quá trình hoá học và phản ứng có thể tự xảy ra hay không.

Mặc dù nhiệt động học là khái niệm phức tạp, nhưng nó dựa trên ba định luật tương đối đơn giản và dễ hiểu.

Một vài nguyên lý của nhiệt động học cơ bản được đưa ra trong chương này bao gồm phân tích nguồn nhiệt, sản sinh entropy, hàm năng lượng tự do và mối liên quan giữa entropy và thông tin.

Chương này cũng đề cập đến ATP và những hợp chất cao năng khác.

Khái niệm về nhiệt động học cơ bản

Bất kỳ sự quan tâm nào của nhiệt động học cũng phải phân biệt giữa hệ thống và môi trường.

Hệ thống là một phần của vũ trụ mà chúng ta quan tâm, trong khi đó môi trường là gồm tất cả những gì còn lại. Có ba trạng thái cơ bản: hệ thống cô lập, hệ thống đóng và hệ thống mở.

Hệ thống cô lập: Không có sự trao đổi chất và năng lượng với môi trường.

Hệ thống đóng: Có trao đổi năng lượng, nhưng không có trao đổi chất với môi trường.

Hệ thống mở: Có trao đổi chất và năng lượng với môi trường.

Cơ thể sống là hệ thống mở điển hình có trao đổi chất (dinh dưỡng và sản phẩm thải ra) và năng lượng (nhiệt từ trao đổi chất) với môi trường.

Định luật 1: Nhiệt, công và các dạng năng lượng khác

Trước đây trong sự phát triển của nhiệt động học người ta cho rằng nhiệt độ có thể biến đổi thành những dạng năng lượng khác và tất cả các dạng năng lượng một cách cơ bản có thể biến đổi thành một số dạng khác.

Định luật 1 nói rằng: tổng năng lượng của một hệ thống cô lập là không thay đổi.

Các nhà nhiệt động học đã mô phỏng thành một hàm toán học để nghiên cứu sự biến đổi nhiệt và sử dụng công trong những hệ thống nhiệt động học. Hàm này được gọi là năng lượng nội năng, thường ký hiệu là E hoặc U . Năng lượng này chỉ phụ thuộc vào trạng thái hiện tại của một hệ thống và vì vậy được coi là hàm trạng thái. Năng lượng nội năng không phụ thuộc vào hệ thống xảy ra như thế nào và vì vậy không phụ thuộc vào đường hướng. Nói một cách khác là chúng ta có thể thay đổi hệ thống bằng bất cứ con đường nào và cho đến khi nào hệ thống trở về trạng thái ban đầu, năng lượng nội năng sẽ không thay đổi.

Năng lượng nội năng, E của hệ thống có thể thay đổi nếu nguồn năng lượng vào hoặc ra khỏi hệ thống ở dạng nhiệt hoặc công cho quá

trình nào biến đổi một trạng thái này (1) sang một trạng thái khác (2) thay đổi năng lượng nội năng là:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = q + w \quad (1.1)$$

q là lượng nhiệt được hệ thống hấp thụ từ môi trường

w là công thực hiện trên hệ thống do môi trường

Công cơ học được định nghĩa là sự chuyển động từ chỗ này đến chỗ khác, gây ra do sử dụng lực. Cả hai phải xảy ra công mới được thực hiện.

Ví dụ: Một tàu chở khách đã chứa đầy khách nhưng không di chuyển, theo định nghĩa nhiệt động học công không được thực hiện.

Trong hệ thống hoá sinh học và hoá học công thường liên quan với áp suất và thể tích của hệ thống. Công cơ học được xác định $w = -P\Delta V$

Trong đó P là áp suất, ΔV là sự thay đổi thể tích, $\Delta V = V_2 - V_1$

Công có thể được thực hiện ở nhiều dạng: cơ học, điện, từ và hoá học. ΔE , q, w phải có cùng đơn vị: calorie (cal) và kilocalorie (kcal) được sử dụng theo truyền thống, nhưng theo đơn vị SI: Joule được đề nghị nên dùng.

Enthalpy: Hàm có nhiều tiện lợi cho hệ thống sinh học

Nếu định nghĩa công được giới hạn bởi công cơ học, trong trường hợp này ΔE chỉ là thay đổi nhiệt ở thể tích không đổi. Vì vậy nếu V không đổi, công không được thực hiện. $\Delta E = q$. Vì vậy ΔE là một định lượng rất tiện lợi trong quá trình thể tích không thay đổi. ΔE không cần thiết bằng biến đổi nhiệt. Vì lý do này các nhà hoá sinh học, hoá học đã xác định một hàm đặc biệt phù hợp cho quá trình áp suất không đổi. Nó được gọi là enthalpy, H được định nghĩa: $H = E + PV \quad (1.2)$

Nếu áp suất không thay đổi chúng ta có:

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V = q + w + P\Delta V = q - P\Delta V + P\Delta V = q \quad (1.3)$$

Rõ ràng ΔH tương đương với biến đổi nhiệt trong quá trình áp suất không đổi.

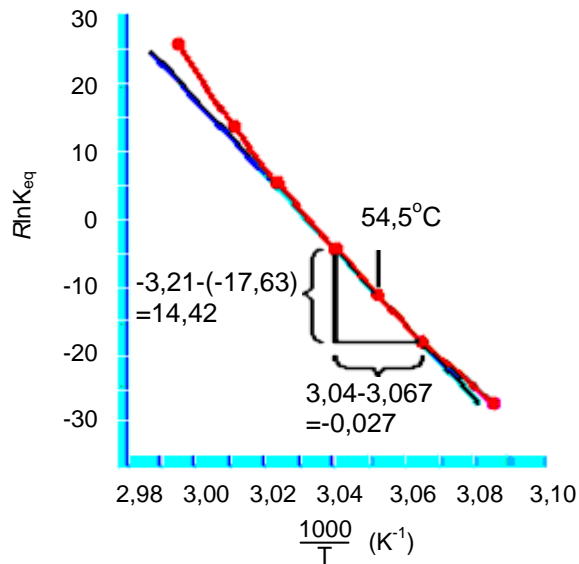
Vì các phản ứng hoá sinh thường xảy ra trong thể lỏng hoặc rắn hơn là thể khí nên thay đổi thể tích là nhỏ và enthalpy và năng lượng nội năng thường là như nhau.

Để thuận lợi khi so sánh các chỉ số nhiệt động học của các phản ứng khác nhau thì người ta xác định ở điều kiện tiêu chuẩn. Một dung dịch hoà tan ở trạng thái tiêu chuẩn, thường sử dụng đơn vị đơn giản là nồng độ 1M. Enthalpy, năng lượng nội năng và những định lượng nhiệt động học khác thường đưa ra hoặc xác định cho những điều kiện tiêu chuẩn và được ký hiệu là ΔH^0 , ΔE^0 ...

Enthalpy thay đổi ở các quá trình hoá sinh có thể được xác định bằng việc đo nhiệt độ hấp thụ (hoặc tỏa ra) bằng một calorimeter.

Mặt khác cho bất kỳ quá trình nào $A \rightleftharpoons B$ ở trạng thái cân bằng, sự thay đổi enthalpy ở trạng thái tiêu chuẩn được xác định từ sự phụ thuộc vào nhiệt độ và hệ số cân bằng:

$$\Delta H^0 = \frac{d(\ln K_{eq})}{d(1/T)} \quad (1.4)$$



Hình 1.1 Sự thay đổi enthalpy, ΔH^0 của 1 phản ứng được xác định độ dốc của sơ đồ $R \ln K_{eq}$ ngược với $1/T$. Để minh họa phương pháp này những giá trị hai bên của 327K (54,5°C) được nêu ra. Số liệu được sử dụng để tính ΔH^0 ở 54,5°C.

Ở đây R là hằng số khí = 8.314 J/mol K

Ví dụ: trong sự biến tính nhiệt của protein chymotripsinogen (quá trình thuận nghịch).

Trạng thái nguyên thủy (N) \rightleftharpoons Trạng thái biến tính (D)

$$K_{eq} = [D] / [N]$$

John F. Brandts đo hằng số cân bằng cho sự biến tính của một số protein ở một số giá trị pH và nhiệt độ khác nhau (bảng 1.1).

Giá trị ΔH^0 có ý nghĩa gì đối với biến tính của protein? Giá trị dương của ΔH^0 biểu diễn sự bẻ gãy liên kết hydro cũng như giải phóng

những nhóm ưa nước từ bên trong phân tử protein ban đầu trong quá trình biến tính, như vậy sẽ nâng năng lượng của dung dịch protein.

Bảng 1.1 Các chỉ số nhiệt động học cho sự biến tính protein

Protein (và điều kiện)	ΔH^0 kJ/mol	ΔS^0 kJ/mol.K	ΔG^0 kJ/mol	ΔG_p kJ/mol.K
Chymotrypsinogen (pH 3; 25°C)	164	0,440	31	10,9
b- Lactoglobulin (5 M urea; pH 3; 25°C)	-88	-0,300	2,5	9,0
Myoglobin (pH 9; 25°C)	180	0,400	57	5,9
Ribonuclease (pH 2,5; 30°C)	240	0,780	3,8	8,4

Định luật thứ hai và entropy:

Định luật thứ hai của nhiệt động học được mô tả và thể hiện trong nhiều cách bao gồm những điểm sau:

Hệ thống có xu hướng tiến từ trạng thái trật tự sang trạng thái không trật tự (tăng entropy).

Entropy của hệ thống + môi trường là không đổi bởi quá trình thuận nghịch. Entropy của hệ thống + môi trường tăng do quá trình không thuận nghịch.

Tất cả các quá trình xảy ra trong tự nhiên hướng tới trạng thái cân bằng, đó là trạng thái năng lượng nhỏ nhất.

Một số điểm của định luật 2 dẫn đến khái niệm entropy, đó là thước đo sự mất trật tự của hệ thống, trong đó trạng thái mất trật tự là trạng thái có entropy cao.

Entropy có thể được xác định theo một vài cách. Nếu W là số cách để sắp xếp thành phần của một hệ thống mà không thay đổi năng lượng nội năng hoặc enthalpy (đó là số lượng của trạng thái kính hiển vi được đưa ra ở nhiệt độ, ánh sáng và tổng vật chất). Entropy được tính:

$$S = k \ln W \quad (1.5)$$

k là hằng số Boltzmann = $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K

Định nghĩa này tiện lợi cho tính toán thống kê, nhưng dạng phổ biến hơn liên quan entropy đến sự biến đổi nhiệt trong một quá trình là:

$$dS_{\text{thuận nghịch}} = \frac{dQ}{T} \quad (1.6)$$

$dS_{\text{thuận nghịch}}$ là thay đổi entropy của hệ thống trong một quá trình thuận nghịch,

q là nhiệt độ được biến đổi, T là nhiệt độ ở đó sự biến đổi nhiệt xảy ra.

Định luật 3: Tại sao "0 tuyệt đối" quan trọng như vậy?

Định luật 3 của nhiệt động học nói rằng: entropy của bất kỳ chất nào hoàn toàn có trật tự, tinh thể phải tiến đến 0. Ở nhiệt độ tiến đến 0 K và $T=0$ K entropy chính xác = 0. Dựa trên điều này có khả năng thiết lập một hệ thống tỷ lệ entropy tuyệt đối, số lượng

$$S = C_p \int_0^T d \ln T \quad (1.7)$$

C_p : khả năng biến đổi nhiệt ở áp suất không đổi. Khả năng nhiệt của một chất là tổng số nhiệt của 1M có thể dự trữ khi nhiệt độ của chất đó được nâng lên 1 độ. Đối với quá trình áp suất không đổi nó được mô tả bằng toán học

$$C_p = \frac{dH}{dt} \quad (1.8)$$

Nếu khả năng nhiệt có thể được tính ở tất cả nhiệt độ giữa 0 K và nhiệt độ nào đó, entropy tuyệt đối được tính đối với quá trình sinh học thay đổi entropy có nhiều tiện lợi hơn entropy tuyệt đối. Thay đổi entropy cho một quá trình có thể được tính nếu thay đổi enthalpy và năng lượng tự do đã biết.

Năng lượng tự do: Một giả thuyết nhưng là công cụ tiện lợi

Một câu hỏi quan trọng đối với nhà hoá học, đặc biệt đối với nhà hoá sinh học là: Phản ứng sẽ xảy ra theo hướng từ phải sang trái? Gibbs, một trong những người xây dựng nên nhiệt động học nhận thấy câu trả lời cho câu hỏi này nằm trong sự so sánh thay đổi enthalpy và thay đổi entropy ở một nhiệt độ nào đó, năng lượng tự do Gibbs được định nghĩa như sau:

$$G = H - TS \quad (1.9)$$

Cho bất kỳ quá trình $A \rightleftharpoons B$ ở nhiệt độ và áp suất không đổi.

Sự thay đổi năng lượng tự do được tính:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1.10)$$

Nếu ΔG gần = 0 quá trình ở cân bằng, không đi theo hướng thuận hoặc ngược lại khi $\Delta G = 0$

$\Delta S = \Delta H/T$ và thay đổi enthalpy và entropy là cân bằng chính xác.

Bất kỳ quá trình với ΔG khác 0 thực hiện tự động đến trạng thái cuối cùng

có năng lượng tự do thấp. Nếu ΔG âm thì quá trình xảy ra theo hướng từ trái sang phải.

Nếu $\Delta G > 0$ phản ứng xảy ra theo hướng ngược lại (ký hiệu và giá trị của ΔG cho phép xác định quá trình sẽ xảy ra nhanh như thế nào). Nếu quá trình có ΔG âm thì quá trình tự xảy ra, nếu ΔG dương thì quá trình không tự xảy ra (hay tự xảy ra theo chiều nghịch).

Thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn

Thay đổi năng lượng tự do ΔG cho bất kỳ phản ứng nào phụ thuộc vào chất tham gia phản ứng và sản phẩm phản ứng và cũng bị ảnh hưởng bởi điều kiện phản ứng kể cả nhiệt độ, áp suất và pH và nồng độ của chất phản ứng và sản phẩm.

Nếu thay đổi năng lượng tự do cho một phản ứng là nhạy cảm với điều kiện hoà tan, điều gì đặc biệt có ý nghĩa cho sự thay đổi năng lượng tự do ở trạng thái tiêu chuẩn. Để trả lời cho câu hỏi này xem xét một phản ứng giữa hai chất A và B để tạo nên sản phẩm C và D



Thay đổi năng lượng tự do cho nồng độ không ở trạng thái tiêu chuẩn là

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]} \quad (1.12)$$

$$\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]} = K_{eq}$$

Ở trạng thái cân bằng $\Delta G = 0$

Chúng ta có

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (1.13)$$

hoặc logarit cơ số 10

$$\Delta G^0 = -2,3 RT / \log_{10} K_{eq} \quad (1.14)$$

$$\text{Nó được biến đổi } K_{eq} = 10^{-\Delta G / 2,3 RT} \quad (1.15)$$

Trong bất cứ dạng nào mối liên hệ cho phép xác định thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn cho bất kỳ quá trình nào nếu hằng số cân bằng được biết.

Quan trọng hơn, điều đó nói rằng cân bằng thiết lập cho một phản ứng trong dung dịch là một hàm của sự thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn cho quá trình, nghĩa là ΔG^0 là cách viết khác của hằng số cân bằng.

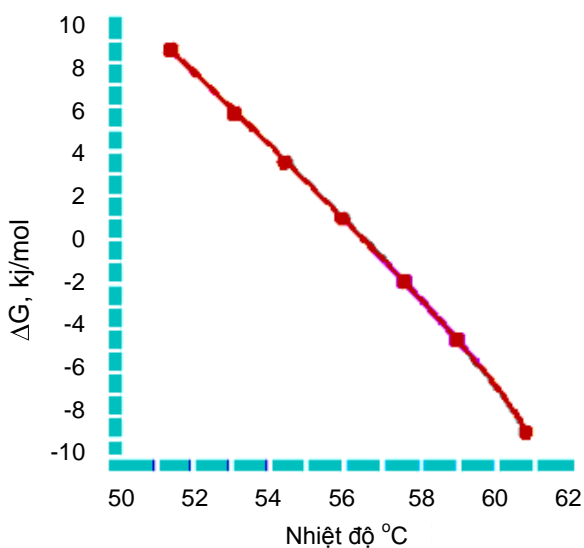
Ví dụ hằng số cân bằng xác định bởi Brandts ở một số nhiệt độ với sự biến tính của chymotrypsinogen có thể được dùng để tính sự thay đổi năng lượng tự do cho quá trình biến tính. Ví dụ hệ số cân bằng ở 54,5⁰C là 0,27, như vậy

$$\Delta G^0 = - (8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K} (327,5\text{K}) \ln (0,27)$$

$$\Delta G^0 = - (2,72 \text{ kJ/mol} \cdot \ln (0,27)$$

$$\Delta G^0 = 3,56 \text{ kJ/mol}$$

Ký hiệu dương của ΔG^0 nghĩa là quá trình biến tính không ưu thế. Dạng gập là dạng bền của protein ở 54,5⁰C. Mặt khác độ lớn tương đối nhỏ của ΔG^0 nghĩa là dạng gập chiếm ưu thế nhỏ.



Hình 1.2 Sự phụ thuộc của ΔG^0 vào nhiệt độ trong quá trình biến tính của chymotrypsinogen

Hình 1.2 chỉ sự phụ thuộc của ΔG^0 vào nhiệt độ biến tính ở pH = 3. Tính cả ΔH^0 và ΔG^0 của sự biến tính chymotrypsin, có thể tính ΔS^0 sử dụng phương trình (3.10).

$$\Delta S^0 = \frac{(\Delta G^0 - \Delta H^0)}{T} \quad (1.16)$$

$$\text{Ở } 54,5^{\circ}\text{C (327,5 K)}$$

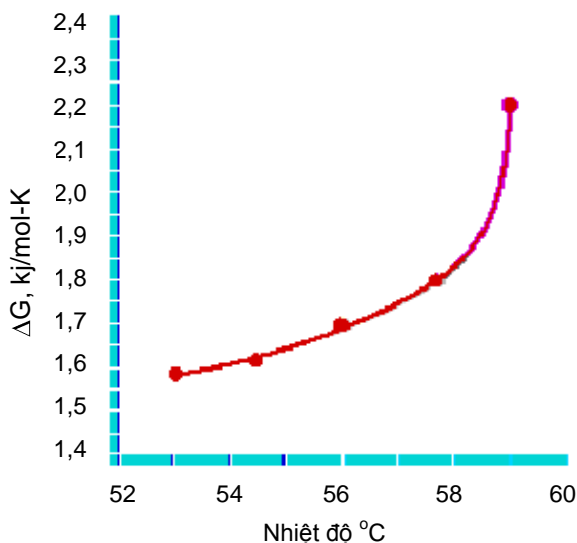
$$\Delta S^0 = - (3560 - 533,000 \text{ J/mol}) / 327,5 \text{ K}$$

$$\Delta S^0 = 1,620 \text{ J/mol.K}$$

Hình 1.3 biểu diễn sự phụ thuộc của ΔS^0 vào nhiệt độ biến tính của chymotrypsin ở pH = 3. Giá trị dương ΔS^0 chỉ rằng dung dịch protein đã trở nên không trật tự khi protein bị biến tính. So sánh giá trị 1,62 kJ/mol.K với giá trị ΔS^0 ở bảng 1.1 chỉ ra rằng giá trị hiện tại cho chymotrypsin ở 54,5^oC là hoàn toàn lớn. Ý nghĩa vật lý của chỉ số nhiệt động học cho sự biến tính của chymotrypsin sẽ rõ hơn trong phần sau.

Ý nghĩa vật lý của đặc tính nhiệt động học

Những chỉ số nhiệt động học cho ta biết những hiện tượng sinh hoá gì? Cách tốt nhất để trả lời câu hỏi này là một chỉ số riêng rẽ (ví dụ ΔH hoặc ΔG) không có nhiều ý nghĩa. Một giá trị dương ΔH^0 cho sự biến tính của một protein có thể phản ánh hoặc là sự gãy các liên kết hydro trong protein hoặc sự xuất hiện các nhóm ưa nước ra bên ngoài. Tuy vậy sự so sánh một số chỉ tiêu nhiệt động học có thể cung cấp những hiểu biết bên trong có ý nghĩa về một quá trình.

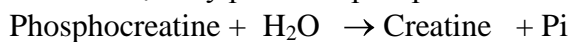


Hình 1.3 Sự phụ thuộc của ΔS^0 vào nhiệt độ trong quá trình biến tính của chymotrypsinogen

Ảnh hưởng của nồng độ đến thay đổi năng lượng tự do thực tế

Phương trình (3.12) chỉ ra rằng thay đổi năng lượng tự do đối với một phản ứng rất khác nhau so với giá trị ở trạng thái tiêu chuẩn nếu nồng độ của chất phản ứng và sản phẩm khác với nồng độ hoạt động (1M cho dung dịch).

Xem xét sự thủy phân của phosphocreatine:



Phản ứng này toả nhiệt rất mạnh và ΔG^0 ở 37°C là $-42,8 \text{ kJ/mol}$

Nồng độ sinh lý của phosphocreatine, creatine và Pi thường là giữa 1 mM và 10 mM.

Cho rằng nồng độ 1 mM và sử dụng phương trình (3.12) ΔG cho thủy phân phosphocreatine là

$$\Delta G = -42,8 \text{ kJ/M} + (8.314\text{J/M}) (310 \text{ K}) \ln \frac{[0,001][0,001]}{[0,001]}$$

$$\Delta G = -60,5 \text{ kJ/M}$$

Ở 37°C sự khác nhau giữa trạng thái tiêu chuẩn và nồng độ 1 mM cho một phản ứng như vậy là khoảng $-17,7 \text{ kJ/mol}$

Tầm quan trọng của các quá trình kết hợp trong cơ thể sống

Nhiều phản ứng cần thiết để giữ tế bào và cơ thể chống lại thế nhiệt động học, đó là theo hướng ΔG dương.

Trong đó có sự tổng hợp ATP và những phân tử cao năng khác và tạo nên gradient ion trong tất cả tế bào động vật có vú. Những quá trình này được thực hiện theo hướng bắt buộc nhiệt động học.

Bằng sự kết hợp với các quá trình có khả năng tự xảy ra nhiều quá trình gắn liền với nhau được đề cập ở phần sau của chương này. Chúng rất quan trọng trong trao đổi chất trung gian, phosphoryl hoá oxy hoá và vận chuyển qua màng.

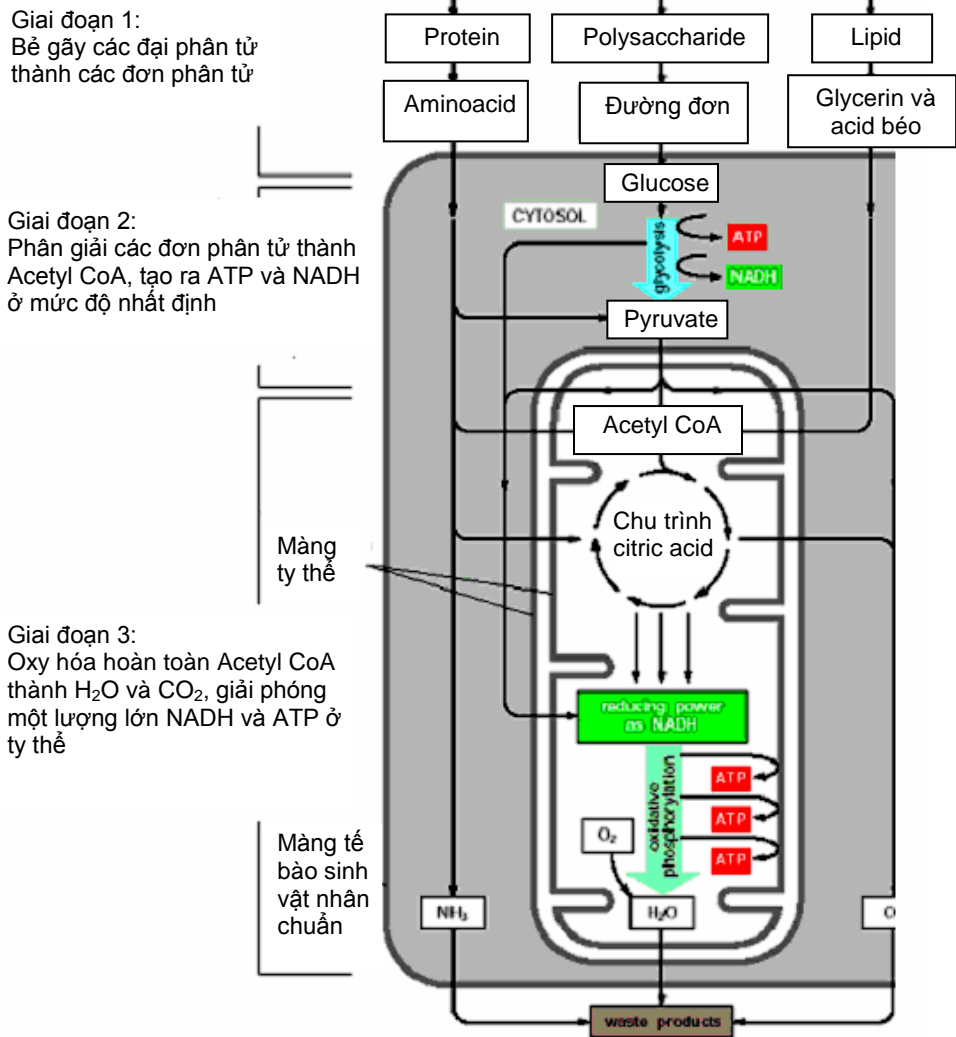
Chúng ta có thể đoán những cặp phản ứng kết hợp sẽ xảy ra tự động bằng sự thay đổi tổng năng lượng tự do cho mỗi phản ứng. Ví dụ, xem xét phản ứng từ quá trình đường phân liên quan đến sự biến đổi phosphoenolpyruvic acid đến pyruvat. Sự thủy phân PEP giải phóng năng lượng và được sử dụng để phosphoryl hoá ADP thành ATP, một quá trình mà về mặt năng lượng không tự xảy ra.

1.2.1 Đặc tính năng lượng của sự trao đổi chất

Năng lượng của các quá trình trao đổi chất (năng lượng sinh học) khác với năng lượng được thực hiện trong bản chất không sống ở ba đặc điểm sau đây:

Đặc tính thứ nhất là sự chuyển hoá năng lượng thành công và thành những dạng khác mà không kèm theo sự chuyển hoá sơ bộ năng lượng này thành nhiệt năng. Xuất phát từ nguyên tắc này chúng ta cần xem hệ thống sống như là một động cơ hoá động học chứ không phải là động cơ nhiệt.

Đặc tính thứ hai là việc giải phóng năng lượng trong các quá trình oxy hoá sinh học sinh ra từ từ, từng phần một, trong một chuỗi dài các quá trình kế tiếp nhau cho đến khi nào tất cả các nguyên tử hydro và cacbon đều biến thành các sản phẩm cuối cùng là CO_2 và H_2O . Ví dụ sự oxy hoá một phân tử gam đường giải phóng ra 686 kcal. Nếu năng lượng này được giải phóng ra cùng một lúc thì sẽ gây tiếng nổ và hệ thống sống không thể sử dụng toàn bộ năng lượng trong một khoảng thời gian ngắn như vậy.



Hình 1.4 Tiến trình giải phóng năng lượng hoá học trong sự trao đổi chất được chia làm 3 giai đoạn

Đặc tính thứ ba là năng lượng hoá học được giải phóng ra khi phân giải glucid, lipid và những hợp chất cao phân tử khác đều có thể được tích lũy trong những hợp chất tích trữ năng lượng đặc thù, được gọi là hợp chất cao năng.

Tiến trình của việc giải phóng năng lượng hoá học cơ bản được chia làm 3 giai đoạn (hình 1.4):

Giai đoạn thứ nhất các hợp chất cao phân tử (tinh bột, glycogen, proteine, lipid...) bị thủy phân thành các chất có phân tử bé

(monosaccharide, amino acid, axit béo, glycerine...). Năng lượng giải phóng ra trong giai đoạn này không đáng kể, chỉ bằng gần 1% dự trữ năng lượng tự do của các chất này được giải phóng ra dưới dạng nhiệt.

Giai đoạn thứ hai là quá trình đường phân, oxy hoá các axit béo và các amino acid. Năng lượng giải phóng ra trong giai đoạn này gần bằng 1/3 năng lượng tự do dự trữ trong các chất đó. Sản phẩm chính của giai đoạn này là acetyl-CoA, α -xetoglutaric acid và oxaloacetic acid.

Giai đoạn thứ ba là oxy hoá tiếp tục các chất trên trong chu trình Krebs. Khoảng 2/3 năng lượng được giải phóng ra ở giai đoạn này.

1.2.2 Các hợp chất cao năng

Những hợp chất cao năng: Tất cả sự sống trên trái đất phụ thuộc vào năng lượng mặt trời, trong những dạng sống có một hệ thống thứ bậc về năng lượng. Một số tiếp nhận năng lượng mặt trời trực tiếp, một số khác nhận năng lượng từ nhóm trên trong những quá trình tiếp theo.

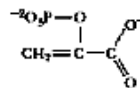
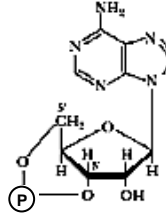
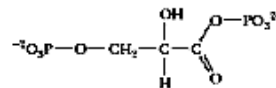
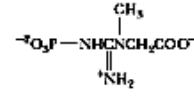
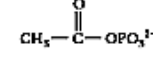
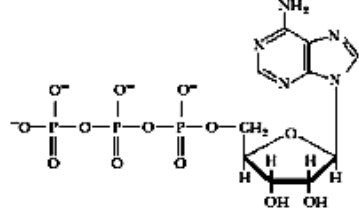
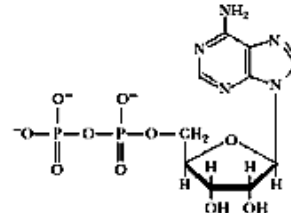
Những sinh vật hấp thu năng lượng ánh sáng trực tiếp được gọi là cơ thể tự dưỡng. Những cơ thể này dự trữ năng lượng mặt trời trong các phân tử hữu cơ khác nhau. Những sinh vật sử dụng những phân tử đó, giải phóng năng lượng dự trữ trong một loạt các phản ứng oxy hoá khử được gọi là sinh vật hoá dưỡng.

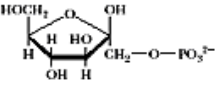
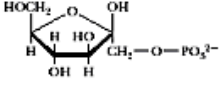
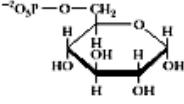
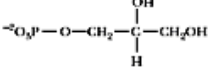
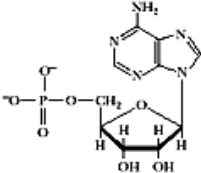
Mặc dù khác nhau cả hai loại đều có cơ chế chung về tái sinh một dạng năng lượng hoá học, năng lượng có thể được giải phóng trong những phản ứng toả nhiệt để thực hiện các quá trình sống đa dạng (cần năng lượng).

Một nhóm nhỏ các phân tử là chất trung gian chuyển năng lượng từ các phản ứng giải phóng năng lượng đến các phản ứng cần năng lượng của cơ thể. Những phân tử này là coenzyme dạng khử, những hợp chất phosphate được gọi là cao năng nếu chúng giải phóng ra năng lượng tự do có giá trị âm lớn khi thủy phân (ΔG^0 có giá trị âm lớn hơn -25 kJ/M).

Ở bảng 1.2 sau đây là danh sách những hợp chất cao năng quan trọng nhất, những phân tử như phosphoric anhydric (ATP, ADP), enol phosphate (PEP), acyl phosphate (acetyl phosphate), guanidinophosphate (creatine phosphate). Cả những hợp chất thioeste, như acetyl CoA không chứa phospho nhưng giải phóng một năng lượng tự do lớn khi thủy phân.

Bảng 1.2 Năng lượng tự do giải phóng khi thủy phân một số chất cao năng

Các chất	ΔG° (kJ/mol)	Công thức cấu tạo
Phosphoenolpyruvat (Pyruvate + P _i)	-62,2	
3',5'-Cyclic adenosin monophosphate (5'-AMP)	-50,5	
1,3-Bisphosphoglycerate (3-phosphoglycerate + P _i)	-49,6	
Creatine phosphate (creatine + P _i)	-43,3	
Acetyl phosphate (acetate + P _i)	-43,3	
Adenosine-5' triphosphate (ADP + P _i)	-35,7	
Adenosine-5' triphosphate (ADP + P _i) (nồng độ Mg ⁺⁺ quá cao)	-30,5	
Adenosine-5' diphosphate (AMP + P _i)	-35,7	

Các chất phosphate năng lượng thấp hơn	ΔG° (kJ/mol)	Công thức cấu tạo
Glucose-1-P (glucose+ P _i)	-21,0	
Fructose-1-P (fructose+ P _i)	-16,0	
Glucose-6-P (glucose+ P _i)	-13,9	
Glycerol-3-P (glycerol+ P _i)	-9,2	
Adenosine-5' monophosphate (adenosin + P _i)	-9,2	

Tổng số năng lượng chính xác giải phóng ra khi thủy phân phụ thuộc vào nồng độ, pH, nhiệt độ... nhưng giá trị ΔG° khi thủy phân những hợp chất này có giá trị dương lớn hơn đáng kể so với những chất trao đổi khác.

Chúng có hai đặc điểm quan trọng:

Những chất phosphate cao năng (*high-energy phosphate compounds*) không phải là chất dự trữ năng lượng lâu dài, chúng là những chất chuyển tiếp năng lượng dự trữ, là chất mang năng lượng từ điểm này sang điểm khác, từ một hệ thống này đến một hệ thống khác.

Năng lượng hoạt hoá được cung cấp đáng kể từ ATP khi thủy phân nhóm γ -phosphat.

Năng lượng để làm gãy liên kết O-P _{α} thường là 200-400 kJ/M, lớn hơn đáng kể so với 30,5 kJ/M khi thủy phân ATP.

Các nhà hoá sinh học quan tâm nhiều đến năng lượng giải phóng thực tế.

Vai trò trung tâm của ATP trong năng lượng sinh học

ATP chứa hai pyrophosphoryl (hình 1.4). Những phân tử có liên kết anhydric, ADP, GTP, GDP và các nucleoside triphosphate khác, nucleotide-đường như UDP-glucose và pyrophosphate vô cơ thể hiện năng

lượng tự do $\Delta G^{0'}$ lớn khi thủy phân. Nguyên nhân hoá học của giá trị $\Delta G^{0'}$ âm lớn là do sự không bền vững của chất phản ứng do sự căng liên kết gây ra bởi sự đẩy tĩnh điện. Sự bền vững của sản phẩm phản ứng do sự ion hoá, sự cộng hưởng và những yếu tố entropy gây ra do thủy phân và sự ion hoá tiếp theo.

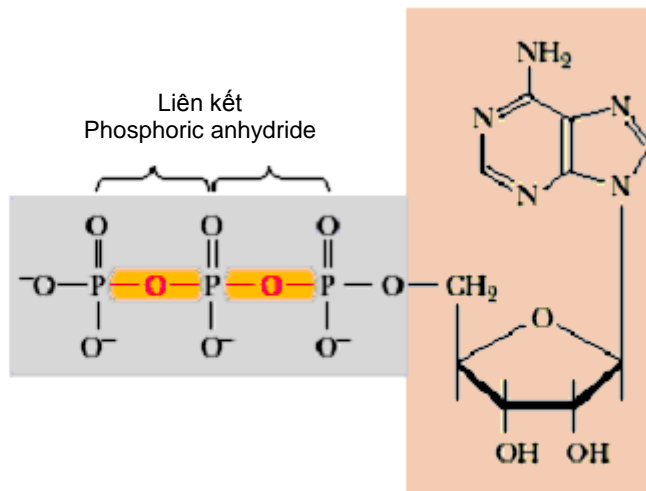
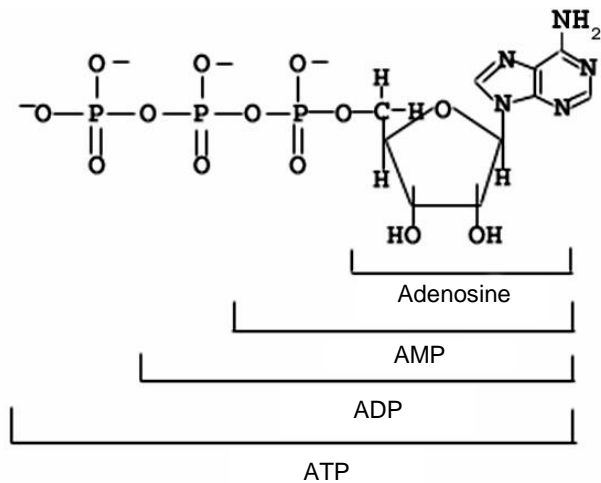
Mặc dù PEP, cyclic AMP, 1,3 DPG, phosphocreatine, acetylphosphate và pyrophosphate đều có giá trị $\Delta G^{0'}$ lớn hơn, nhưng ATP là duy nhất định vị giữa các chất phosphate cao năng, (ATP được tổng hợp khi phân giải các chất hữu cơ) và các chất nhận năng lượng (khi các chất này được phosphoryl hoá để tham gia các phản ứng tiếp theo trong trao đổi chất). Nói một cách khác ATP là mắt xích nối liền hai quá trình ngược nhau, là đồng hoá và dị hoá.

Việc hình thành tất cả các hợp chất cao năng khác cũng xảy ra do sự tiêu phí năng lượng vốn tích lũy trong ATP.

ADP có thể nhận cả phosphate và năng lượng từ các phosphate cao năng.

ATP cho cả gốc phosphate và năng lượng đối với các phân tử có năng lượng thấp. Như vậy ATP có vai trò dự trữ năng lượng cũng như tiêu hao năng lượng.

Xét về cơ chế biến đổi và chuyển hoá năng lượng trong sự phân giải ATP và các hợp chất cao năng tương tự ATP ta thấy năng lượng cần thiết để thực hiện phản ứng hoá học được giải phóng ra ở một điểm, có thể được chuyển đến một điểm khác, ở đây năng lượng được sử dụng một cách trực tiếp. Điều này có nghĩa là trong cơ thể sống không nhất thiết phải tiếp xúc với nhau bằng cách va chạm (đặc trưng cho ngoài cơ thể sống) giữa các phân tử cho và nhận năng lượng.



ATP
(adenosin-5'-triphosphate)

Hình 1.5 Chuỗi ba gốc phosphat của ATP chứa 2 liên kết pyrophosphat, cả hai liên kết này giải phóng nhiều năng lượng khi thủy phân

- Câu hỏi
1. Năng lượng sinh học?
 2. Các đường hướng tổng hợp ATP trong thực vật ?
 3. Các dạng hợp chất cao năng, cho ví dụ?

Chương 2

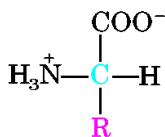
Amino acid - Đơn vị cấu tạo Protein

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 thủy 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 (COOH) và ít nhất một nhóm amino (NH₂), trừ prolin chỉ có nhóm NH (thực chất là một acid imin). Trong phân tử amino acid đều có các nhóm COOH và NH₂ gắn với carbon ở vị trí α. Hầu hết các amino acid thu nhận được khi thủy phân protein đều ở dạng L-α 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

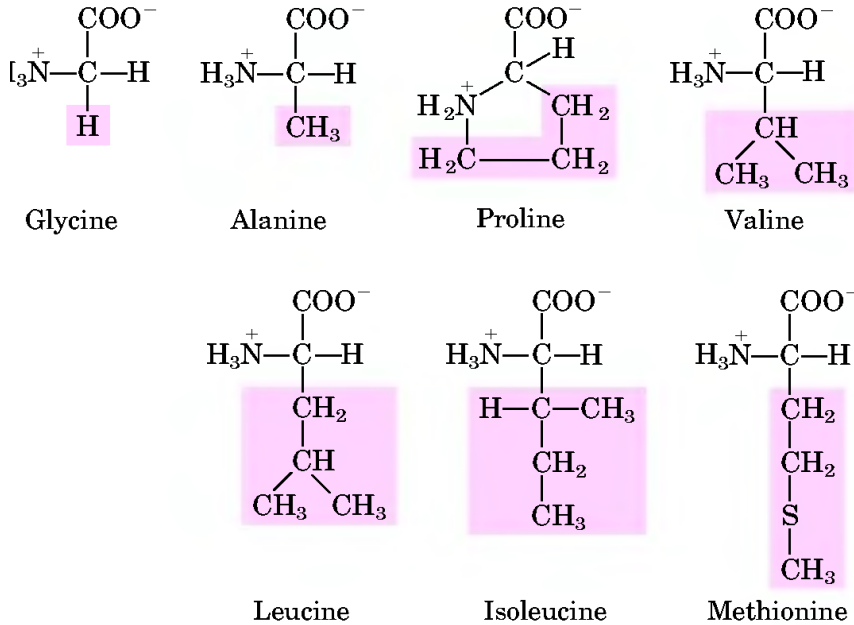
1.2. Phân loại amino acid

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 hoá 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 COOH và một nhóm NH₂); nhóm amino acid có tính kiềm (chứa một nhóm COOH và hai nhóm NH₂); nhóm amino acid có tính acid (chứa hai nhóm COOH và một nhóm NH₂). 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.

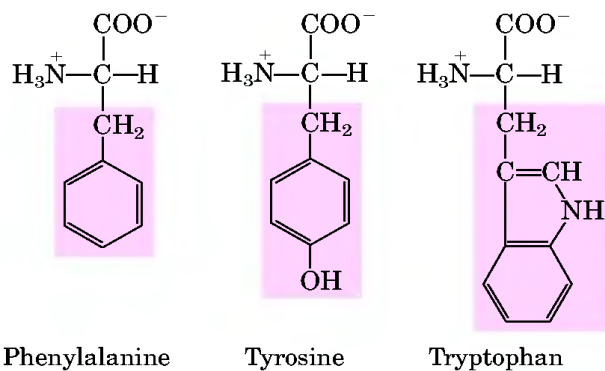
Ở đây xin được giới thiệu cách phân loại các amino acid một cách chung nhất. Theo cách này dựa vào gốc R các amino acid được chia làm 5 nhóm:

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



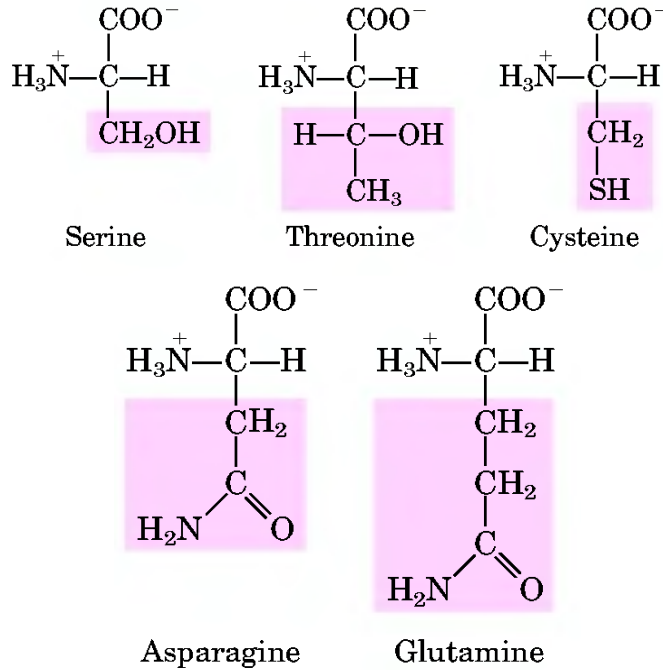
Hình: 2.2 Công thức cấu tạo các amino acid nhóm I

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



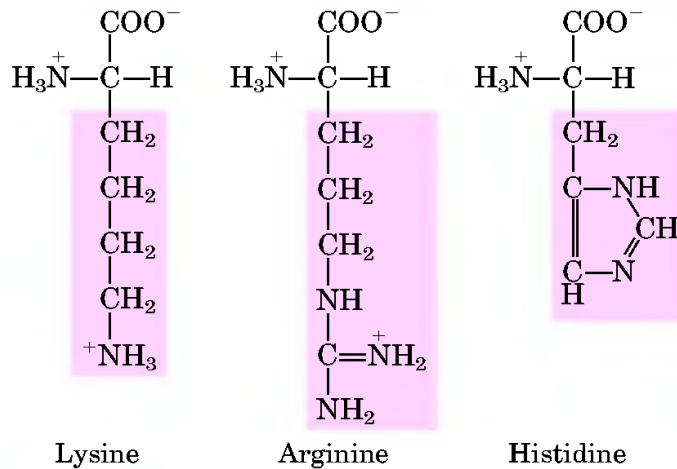
Hình: 2.3 Công thức cấu tạo các amino acid nhóm II

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



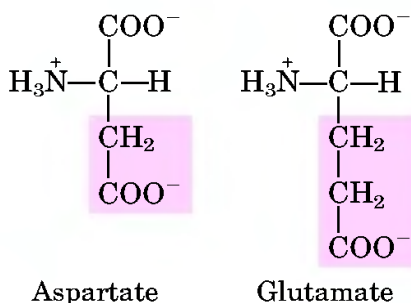
Hình: 2.4 Công thức cấu tạo các amino acid nhóm III

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 thủy 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-hydrogenxyproline là dẫn xuất của proline, 5-hydrogenxylysine 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 hóa 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	α -aminoacetic	Gly	G	75
Alanine	α -aminoprionic	Ala	A	89
Proline	α -pirolidincarboxylic	Pro	P	115
Valine	α -aminoisovaleric	Val	V	117
Leucine	α -aminonoisocaproic	Leu	L	131
Isoleucine	α -amino- β -methylvaleric	Ile	I	131
Methionine	α -amino- γ -methyltiobutiric	Met	M	149
Phenylalanine	α -amino- β -phenylpropionic	Phe	F	165
Tyrosine	α -amino- β -hydroxyphenylpropionic	Tyr	Y	181
Tryptophan	α -amino- β -indolylpropionic	Trp	W	204
Serine	α -amino- β -hydroxypropionic	Ser	S	105
Threonine	α -amino- β -hydroxybutyric	Thr	T	119
Cysteine	α -amino- β -thiopropionic	Cys	C	121
Asparagine	amid của aspartate	Asn	B	132
Glutamine	amid của glutamate	Gln	Q	146
Lysine	α,ϵ diaminocaproic	Lys	K	146
Histidine	α -amino- β -imidazolpropionic	His	H	155
Arginine	α -amino- δ -guanidinvaleric	Arg	R	174
Aspartate	α -aminosuccinic	Asp	D	133
Glutamate	α -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, tryptophan; 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).

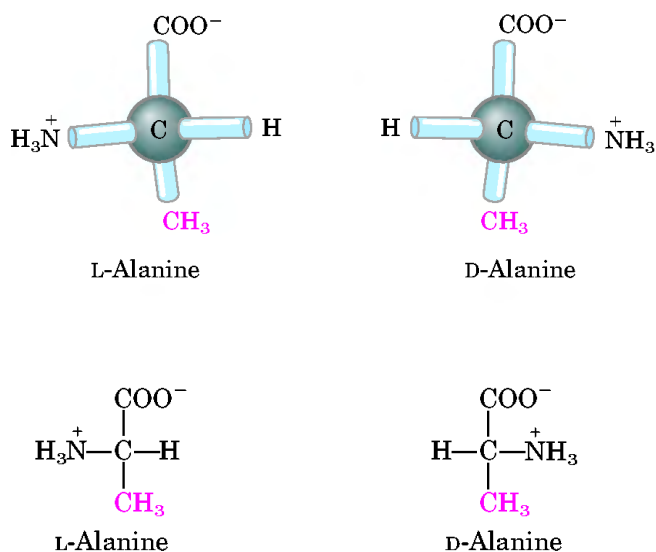
1.4. Tính tan của amino acid

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 hoà tan trong acid và kiềm loãng (trừ tyrosine).

1.5. Biểu hiện tính quang học của amino acid

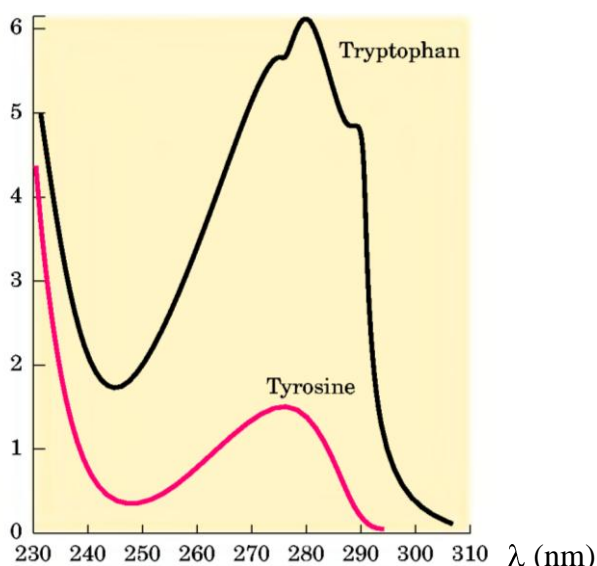
Các amino acid trong phân tử protein đều có ít nhất một carbon bất đối (trừ glycine) vì thế nó đều có biểu hiện hoạt tính quang học, nghĩa là có thể làm quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực sang phải hoặc sang trái. Quay phải được ký hiệu bằng dấu (+), quay trái được ký hiệu bằng dấu (-). Góc quay đặc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

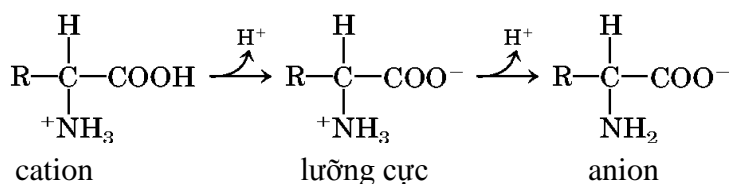


Hình 2.8 Phổ hấp thụ ánh sáng cực tím của triptophan và tyrosine

1.6. Tính lưỡng tính của amino acid

Trong phân tử amino acid có nhóm carboxyl $-\text{COOH}$ 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.

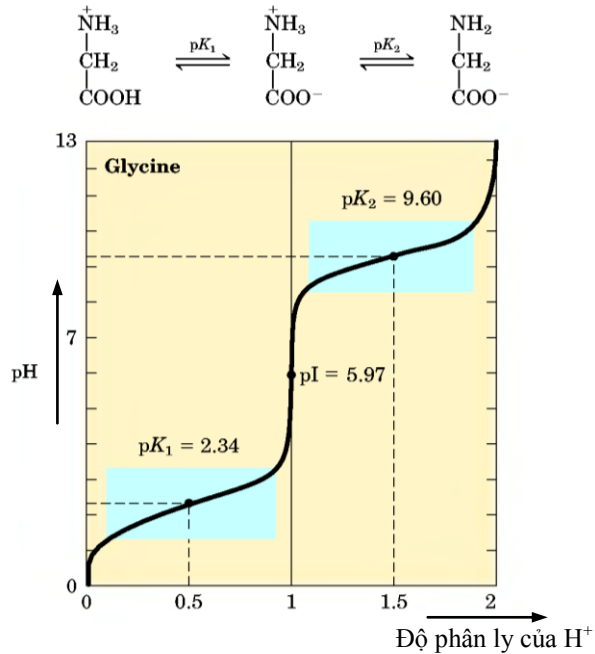
Trong môi trường acid, amino acid ở dạng cation (tích điện dương), nếu tăng dần pH amino acid lần lượt nhường proton thứ nhất chuyển qua dạng lưỡng cực (trung hoà về điện), và tiếp tục tăng pH amino acid sẽ nhường proton thứ hai chuyển thành dạng anion (tích điện âm). Vì vậy đôi khi người ta coi nó như 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 ($\text{pI} = \text{pH}$ đẳng điện) $= \text{pK}_1 + \text{pK}_2 / 2$. Ví dụ: khi hoà 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 25⁰C

Tương đương độ phân ly của nhóm COOH được một nửa có trị số pK₁= 2,34 và độ phân ly của NH₃⁺ được một nửa có trị số pK₂= 9,60. Như vậy ta có

$$pH_i = \frac{2,34 + 9,60}{2} = 5,97$$

Mặt khác tại pK₁ + 2 sự phân ly H⁺ của nhóm COO⁻ glycine là 99%, chỉ 1% ở dạng COOH và ở pK₂ -2 dạng NH₃⁺ là 99%, chỉ 1% ở dạng NH₂. Như vậy trong vùng pH từ pK₁ + 2 đến pK₂ -2, phân tử glycine chủ yếu ở dạng lưỡng tính và kết quả ta có một vùng đẳng điện.

Ngoài ra các amino acid trong gốc R có thêm nhóm COOH hay NH₂ 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 hoá học của amino acid

Các amino acid đều có nhóm NH_2 và COOH liên kết với C_α , vì vậy chúng có những tính chất hoá 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 hoá học của amino acid thành 3 nhóm:

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

Tên các	Các trị số pK			
amino acid	pK_1 (của COOH)	pK_2 (của NH_3^+)	pK_R (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 hoá khử do nhóm SH của cysteine, phản ứng tạo muối

do các nhóm COOH hay NH₂ của glutamate hay lysine, phản ứng tạo ester do nhóm OH của tyrosine v.v...

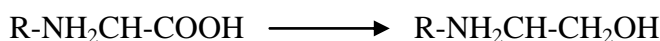
b) Phản ứng chung.

Là phản ứng có sự tham gia của cả hai nhóm α- COOH và α- NH₂ . Khi phản ứng với ninhydrin trong điều kiện đun nóng tạo thành CO₂ , NH₃ aldehyde và ninhydrin 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- NH₂

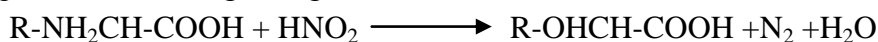
-Các phản ứng của nhóm α- COOH . Ngoài các phản ứng của nhóm COOH thông thường tạo ester, tạo amid, tạo muối ...thì nó còn có những phản ứng đặc trưng khác như có thể bị khử thành hợp chất rượu amino dưới sự xúc tác của NaBH₄.



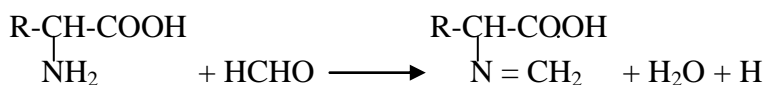
Nhóm COOH có thể tạo thành phức aminoacyl-adenylate trong phản ứng hoạt hoá amino acid để tổng hợp protein, hay có thể loại CO₂ gặp rất nhiều trong quá trình thoái hoá amino acid, tạo các dẫn xuất amin có hoạt tính sinh học cao như histamine, sevôtnine.

- Các phản ứng của nhóm α- NH₂ . 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 HNO₂ để giải phóng N₂ và định lượng nitrogen



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



Sau đó dùng 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 thủy 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_4^+ .

2.2. Thủy phân bằng kiềm

Người ta cũng có thể thu nhận các amino acid bằng phương pháp thủy 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 threonine bị phá huỷ nhưng tryptophan không bị phá huỷ. Vì vậy, phương pháp thủy phân bằng kiềm thường chỉ dùng để xác định tryptophan.

2.3. Thủy phân bằng enzyme

Để thu nhận chế phẩm amino acid ngày nay việc thủy 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 thủy phân protein để tạo thành các amino acid hay các 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 thủy phân bằng enzyme

Tốc độ thủy 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 UI = 1 μ mol cơ chất (10^{-6} mol)/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 Kat = 1 mol cơ chất/giây

1 UI = $\frac{1}{60} 10^{-6}$ Kat = 16,67 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 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 lý 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 thủy 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 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 R_f .

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

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 polyetylen glycol 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)

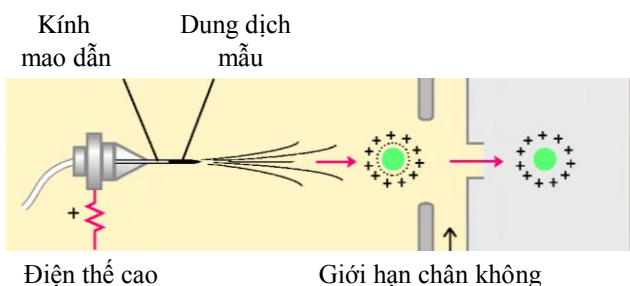
Trước hết protein hay peptide phải được thủy phân bằng HCl 6 N ở 110°C trong ống hàn kín chứa nitrogen (để tránh sự oxy hoá phá huỷ amino acid) trong thời gian 12-15 giờ. Sau đó trung hoà hỗn hợp dịch thủy phân amino acid và cho vào máy phân tích tự động HPLC thành phần amino acid cùng với mẫu chuẩn 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 amino 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 khối

Quang phổ khối (MS- mass spectrophotometer) 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 khối

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

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 CO₂ trong môi trường. Xác định nồng độ CO₂ 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-tyrosine-carboxy-lyase EC 4.1.1.25 xúc tác chuyển hoá L-tyrosine → Tyramine v.v...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu thành phần cấu tạo và tính chất lý hóa của amino acid.
2. Có thể phân chia các amino acid thành mấy nhóm theo cách phân loại chung nhất. Tại sao gọi các amino acid là một di-acid ?
3. Có thể thu nhận và phân tích các amino acid bằng những phương pháp nào?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chấn, Đỗ Đình Hồ, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trân châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục
4. Nguyễn Việt Tựu, 1980. Phương pháp nghiên cứu hoá 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. 2nd ed.
6. Daniel L.C., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.
7. Fersht A., 1998, Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3rd 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 Willey & Sons. Ltd. 4th ed.
10. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004
11. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5th ed. W.H Freeman.
12. Walker J. M., 1996. The Protein Protocols Hand book. 2nd ed. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.

Chương 3

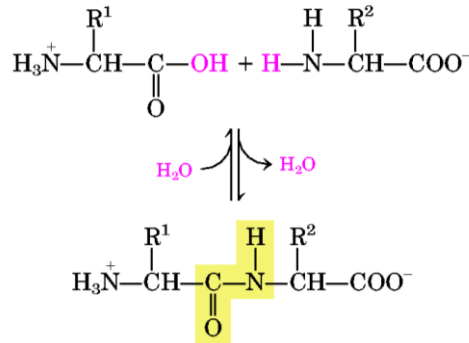
Peptide - cấu trúc và chức năng

I. Tính chất chung của peptide

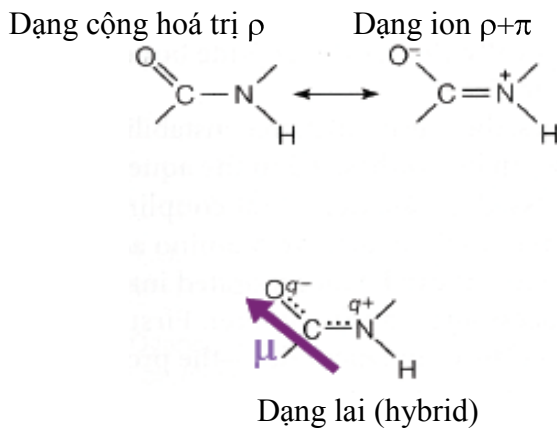
Peptide là những protein thường có cấu trúc đoạn ngắn khoảng từ hai đến vài chục amino acid nối với nhau, có khối lượng phân tử thường dưới 6.000 Dalton. Chúng có thể được tổng hợp trong tự nhiên hoặc được hình thành do thoái hoá protein. Mặc dù có cấu trúc nhỏ nhưng nhiều peptide có vai trò khá quan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

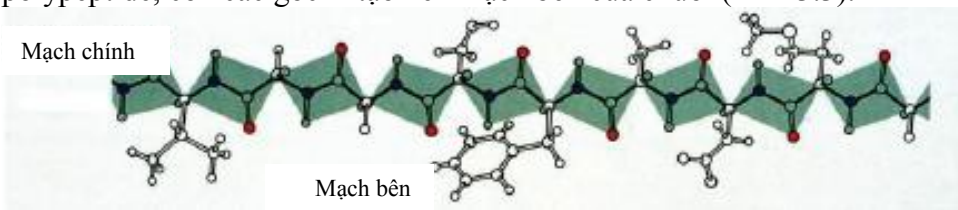


Hình 3.2 Sự tồn tại các dạng của liên kết peptide

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 ρ đến dạng lai (trung gian) thì bị một phần ghép đôi của liên kết π (hình 3.2).

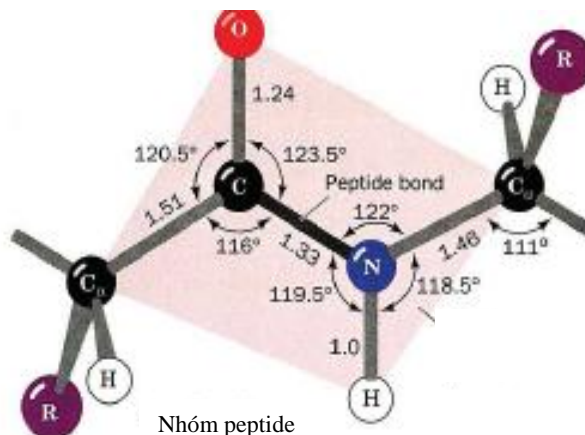
Người ta cho rằng tỷ lệ của liên kết kép này là khoảng 30% đối với liên kết C-N và 70% với liên kết giữa C và O. Như vậy ở đầu của một chuỗi peptide là amino acid có nhóm α -amino (α -NH₂) tự do được gọi là đầu N-tận cùng và đầu kia có nhóm α -carboxyl (α -COOH) tự do được gọi là đầu C tận cùng. Liên 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.



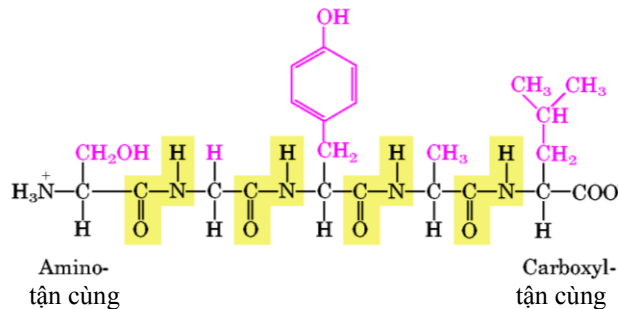
Hình: 3.4 Mô hình cấu trúc của liên kết peptide

- Mặt khác khả năng quay tự do giữa C và C_α giữa N và C_α (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 Å) hơi ngắn hơn so với đa số các liên kết C-C, C-N (1,47Å) 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.

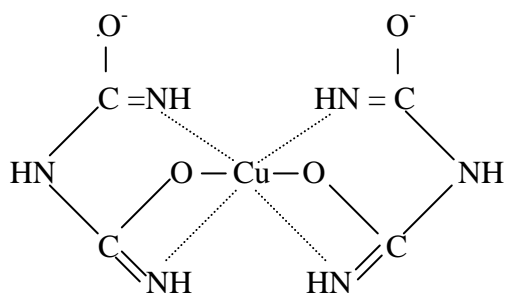


Hình 3.5 Cấu tạo và cách gọi tên của một pentapeptide Seryl-glycyl-tyrosyl-alanyl-leucine

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 đầu nào của chuỗi peptide là đầu N-tận cùng hay đầu C- tận cùng và như vậy cũng pentapeptide ở trên có thể viết H₂N-Ser hay 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 chẳng hạn Ala- Ser-Gly-(Ala,Leu, Val) Glu-Arg-...

1.3. Các phản ứng đặc trưng của peptide

Ngoài phản ứng của nhóm NH_2 và 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 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-Ciocalteu 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 thủy 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 đối chiếu và tổng hợp lại. Ví dụ, Puppy và Bodo phân tích một peptide của dịch khi thủy phân Cytocrom C thu được các dữ kiện sau đây:

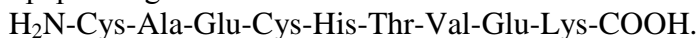
- Thành phần amino acid của peptide sau khi được thủy phân hoàn toàn và sắc ký là 2Cys, 1 Ala, 2 Glu, 1His, 1Thr, 1Val, và 1Lys.

- 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 thủy 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.

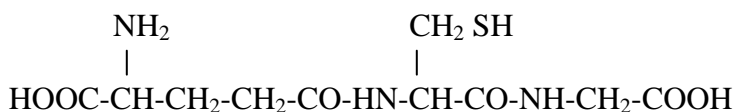
III. Sự tồn tại tự nhiên và vai trò chức năng của peptide

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 thủy 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

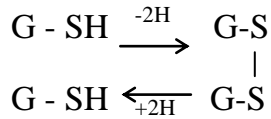
Glutathion là một tripeptide γ -glutamyl-cysteyl-glycine với công thức cấu tạo như sau:



Trong cấu trúc nhóm SH của cysteine là nhóm hoạt động, vì vậy người ta thường viết tắt chữ glutathion là G-SH. Trong môi trường hoạt động glutathion có thể nhường hydrogeng (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, hồng cầu v.v...



Dạng khử

Dạng oxy hóa

3.3. Các hormon có bản chất peptide và protein

3.3.1. Adrenocorticotrophic 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 α -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 tế bào vỏ thượng thận bài tiết ra hormon chuyển hoá đường(corticosteron,cortisol), ACTH xúc tác phản ứng hydrogenxyl hoá và đặc biệt là phản ứng cắt chuỗi ngang của cholesterol (tổng hợp steroid), phản ứng 11 β -hydrogenxyl hoá.

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: α - MSH gồm 13 amino acid, giống với 13 amino acid đầu của ACTH nên có tác dụng yếu của ACTH và β - 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 trpeptide gồm pro-leu-gly-NH₂; một yếu tố kích thích giải phóng MSH là MRH (melnocyte 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 nghiệm (addision) có thể do chủ yếu là sự tăng tiết của MSH.

3.3.3. Oxytocin, Vasopressin Vasotocin.

Oxytocin là hormon “thúc đẻ”, 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 ếch nhái có cấu trúc trung gian giữa vasopressin và oxytocin của động vật có vú (amino acid thứ ba là isoleucin 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 hoá học giữa oxytocin và vasopressin của một số loài động vật

Va- so- pres- sin	Lysin Vaso- pressin	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr- Phe -Glu-Asn-Cys-Pro- Lys -Gly-NH ₂	Lợn, Hà mã
	Argi- nin vasop- ressin	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr- Phe -Glu-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂	Phần lớn động vật có vú
	Vaso- tocin	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr- Ile -Glu-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂	Động vật có xương sống, không có vú
	Oxy- tocin	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr- Ile -Glu-Asn-Cys-Pro- Leu -Gly-NH ₂ (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 hoá 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 dày của đầu, xương và mặt).

3.3.5. Prolactin (PRL- kích nhũ tố)

Prolactin hoặc LTH (luteotropic hormon), 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 thể 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 (tảiotropin releasing hormone). Cấu trúc hoá 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-NH₂. 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.

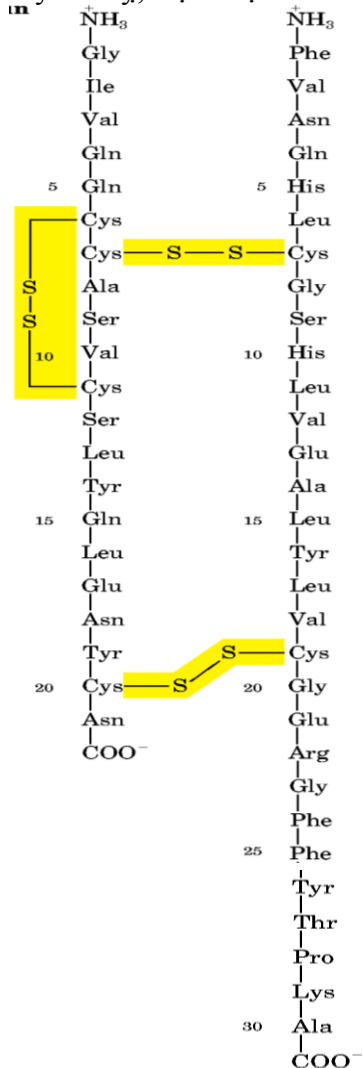
Từ 1953, Sanger (giải thưởng Nobel 1958) đã nghiên cứu, tinh chế và xác định hoàn toàn cấu trúc của phân tử insulin. Phân tử insulin bao gồm 51 amino acid, có cấu trúc gồm 2 chuỗi polypeptide, với khối lượng phân tử 5.700:

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 tụy, 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 ức 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 tân tạo glucose do làm giảm nồng độ enzyme như pyruvat carboxylase và fructose 1-6 diphosphatase.

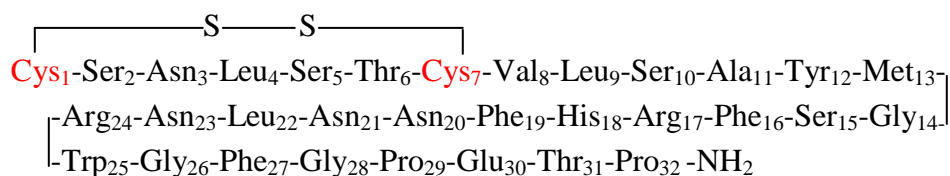
3.3.8. Glucagon.

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 tân tạo glucose và ức chế sự phân huỷ glucose bằng cách ức chế pyruvate kinase và phospho fructokinase. Nó còn có tác dụng ức chế tổng hợp lipid ở gan, nhưng kích thích sự tạo thành chất ceton. 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 hoà 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-pancreozymín(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).

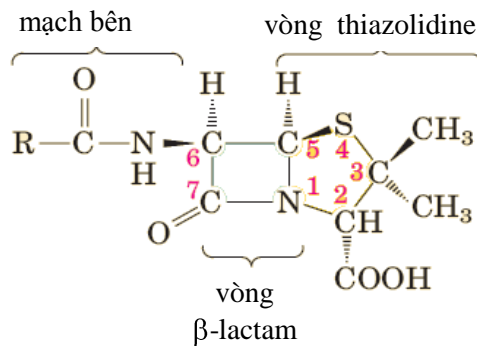
Gastrin có tác dụng kích thích tế bào thành của tuyến dạ dày bài tiết HCl và tế bào chính bài tiết pepsinogen. Ngoài ra gastrin còn kích thích sự vận động của dạ dày, ruột, làm giãn cơ vòng của môn vị.

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 thiazolidin, một vòng β -lactam, một nhóm amino có gắn với CO_2 và một mạch bên (R), hình 3.9.



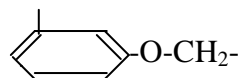
Hình 3.9 Cấu tạo chung của phân tử penicillin

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

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

- mạch bên của penicillin G là 

- mạch bên của penicillin G là 

- mạch bên của penicillin V là 

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) penicillin 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 quầng, 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 thủy 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 lại 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, A₁, B, C, D, E, F₁, F₂, F₃ 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, 1 đơn 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 mũ 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 tụy, v.v... Sự tổng hợp hormon peptide xảy ra ở lưới 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 nửa 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).

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Thế nào là peptide, tính chất chung, các phương pháp tách phân lập và xác định peptide?
2. Trình bày về sự tồn tại tự nhiên, vai trò và chức năng của peptid

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chấn, Đỗ Đình Hồ, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo
3. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. 1999. Vi sinh vật học. NXB Giáo dục.
4. Lê Đức Trình. 1998. Hormon. NXB Y học. Hà nội
5. Nguyễn Việt 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 Willey & Sons, INC., Pub. 2nd ed.
7. Daniel C. L., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.
8. Dennison C., 2002. A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, Lodon, 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, 4th Edition. W.H Freeman.
11. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5th 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 phân 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 disunfua, 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 β của hemoglobin A (bình thường) bị thay thế bằng gốc amino acid valine

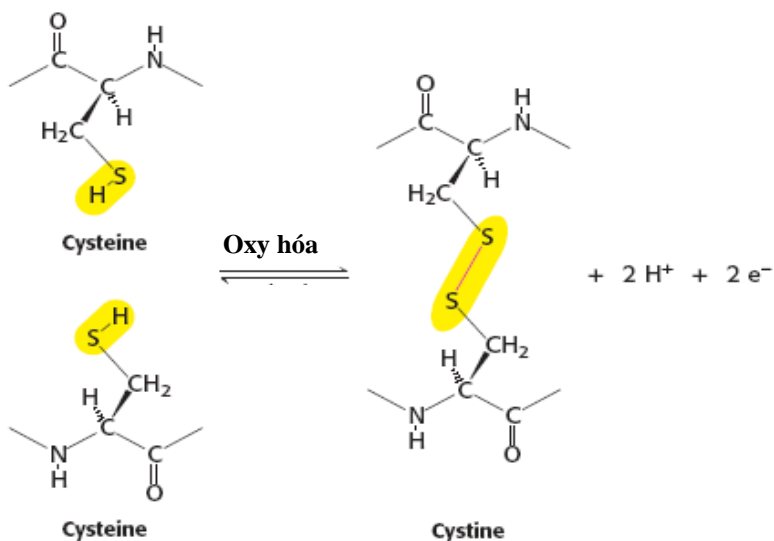
II. Các kiểu liên kết trong cấu trúc protein

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 disunfua (-S-S-).

Liên kết disunfua 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 disunfua (còn gọi là cầu disunfua) 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 disunfua 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 disunfua 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

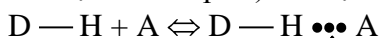


Hình 4.1 Sự hình thành cầu disulfua giữa hai phân tử cysteine

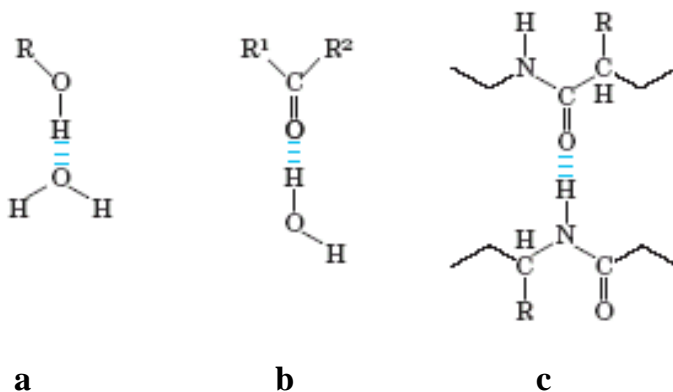
2.2. Các liên kết yếu làm ổn định cấu trúc protein

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



↑
Liên kết hydro

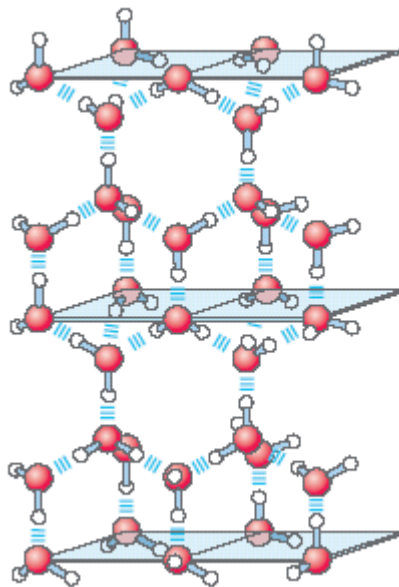


Hình 4.2 Một số liên kết hydro quan trọng trong hệ thống sống

Ghi chú: a) giữa hydro của một ancolol 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 đám mây điện tử của A phải mang những điện tử không liên kết có khả năng thu hút điện tích δ^+ của H.

Năng lượng cần để phá vỡ một liên kết hydro là khoảng 5 kcal mol^{-1} . 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 ($-\text{NH}_2$) và hydroxyl ($-\text{OH}$), sự hiện diện của các nhóm này khiến cho các phân tử có mang chúng dễ hoà tan trong nước do có sự hình thành các liên kết hydrogengen giữa chúng. Đặc biệt, các phân tử nước H_2O - 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.



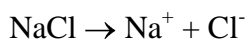
Hình 4.3 Sơ đồ cấu trúc mạng lưới hình thành bởi các phân tử H_2O

- 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 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 cộng 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 H_2O 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 khoảng 1 kcal mol^{-1} .

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. Điển 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 kỵ nước (tương tác kỵ nước)

Các phân tử không phân cực, tức là các phân tử không chứa nhóm ion hoá lẫn liên kết phân cực, đều không hoà tan trong nước, chúng là những phân tử kỵ 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 H_2O (đẩy phân tử H_2O ra ngoài) được gọi là liên kết kỵ 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 kỵ 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 trục dài và trục 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 \AA , đường kính khoảng 15 \AA . Các protein hình sợi tương đối trơ về mặt hoá 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 hoá 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).

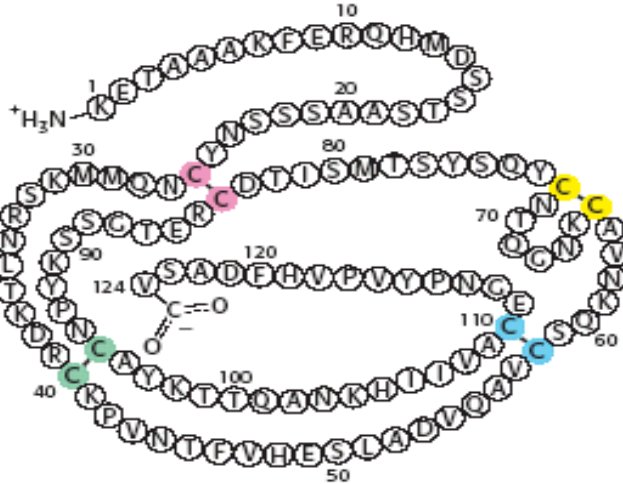
3.2.1. Cấu trúc bậc I của một số protein đã biết

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 α (mỗi chuỗi 141 amino acid) và 2 chuỗi β (mỗi chuỗi 146 amino acid); tripsinogen bò (229 amino acid); chimotrypsin 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 ribonuclease của bò

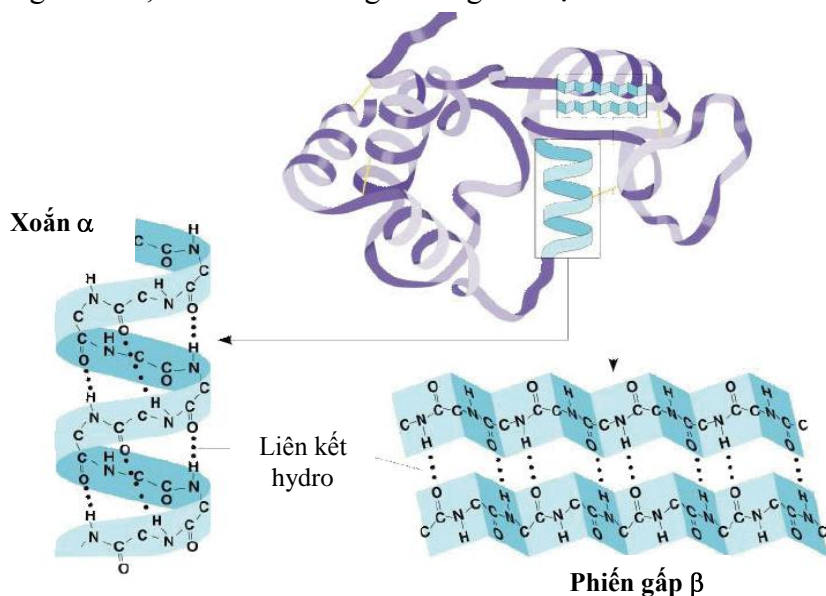
Bảng 4.1 Sự thay thế amino acid trong chuỗi A của insulin ở một số loài

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 α và xoắn β . 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 hoá 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 thế 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. Tùy 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.

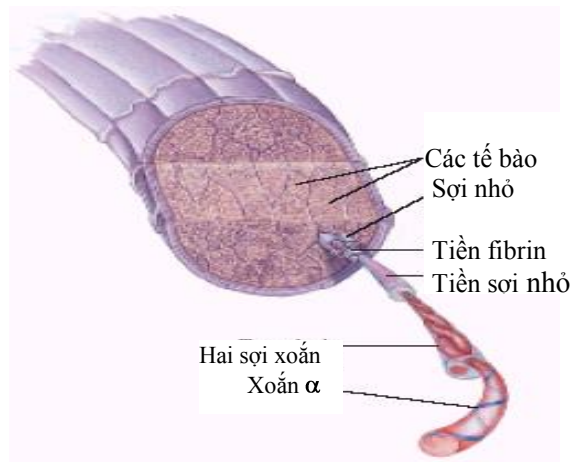
- Trao đổi hydro nặng: Dựa trên nguyên tắc các hydro nặng H^2 (thường được ký hiệu là D-deuterium) và H^3 (thường được ký hiệu là T tritium) để thay thế cho các hydro bình thường đang nằm trong các liên kết trong cấu trúc phân tử protein. Từ đó nhờ hình ảnh phổ đặc trưng được phát ra từ các loại hydro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

Bảng 4. 2. Số lượng xoắn α và phiến gấp β trong chuỗi đơn một số protein

Protein (số gốc)	số gốc (%)	
	Xoắn α	Phiến gấp β
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 α keratin

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



Hình 4.7 Cấu trúc kiểu xoắn collagen

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

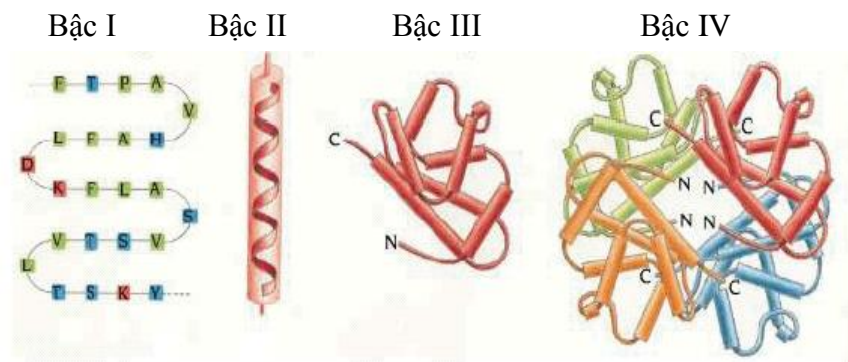
trong các protein khác nhau cũng thay đổi khá nhiều. Ví dụ trong hemoglobin và mioglobin là 75%; lisozym là 35%; ribonuclease là 17% ...

- Ngoài ra còn có kiểu xoắn collagen được tìm thấy trong phân tử collagen (hình 4.7), đơn vị cấu trúc của nó là tropocollagen 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 góc xoắn trên trục siêu xoắn này là 2,9 anstron, một vòng xoắn là 3,3 góc 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 α và phiến gấp β 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 khuếch tán, phương pháp phân tích rơnghen, 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 (hằng 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 (M_r) theo công thức

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

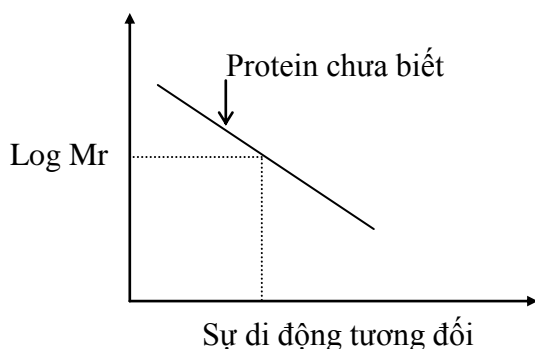
Trong đó R là hằng số khí tính theo $\text{erg mol}^{-1} \text{độ}^{-1}$, T là nhiệt độ tuyệt đối, S là hằng số lắng tính theo đơn vị Svedberg (đơn vị Svedberg được ký hiệu bằng chữ S và bằng 10^{-13} giây), D là hệ số khuếch tán, V là thể tích riêng phần của protein, P là tỷ trọng của dung môi.

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 Svedbrg)	Khối lượng (KDa)
Chất ức chế pancreatic tripsin	1	6,520
Cytochrom C	1,83	12,310
Ribonuclease A	1,78	13,690
Myoglobulin	1,97	17,800
Tripsin	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

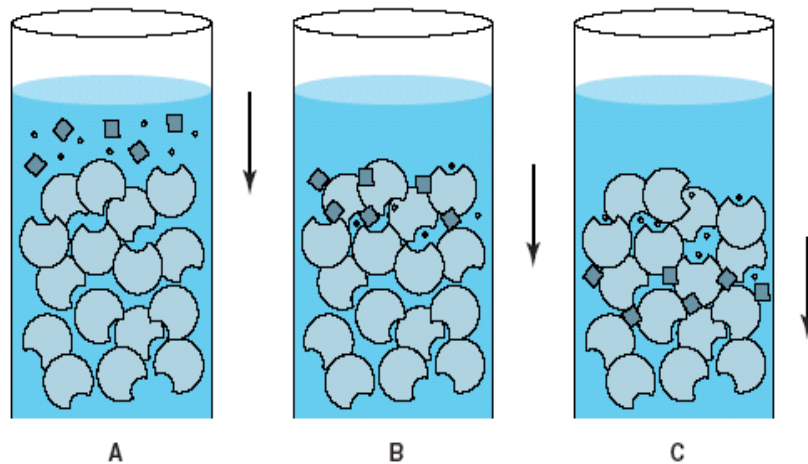
Dựa trên nguyên tắc là khả năng di chuyển và phân bố trên giá thể (thường là gel polyacrylamide hay agarose) của từng loại protein trong điện trường. So sánh với các protein đã biết trước khối lượng (protein chuẩn) để xác định khối lượng protein mẫu cần tìm. Khối lượng (hay trọng lượng phân tử M_r) được 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 $\log M_r$ của các protein đã biết khối 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 M_r của protein chưa biết khối lượng phân tử. Hình 4.9.



Hình 4.9 Cách lập đồ thị chuẩn để tính M_r 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 khối 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 đệm rồi cho hỗn hợp protein chảy qua, dung dịch protein xuống cột theo trọng lực, các 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 khối lượng protein bằng cách dùng phương pháp ngoại suy với một số protein mẫu đã biết khối 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

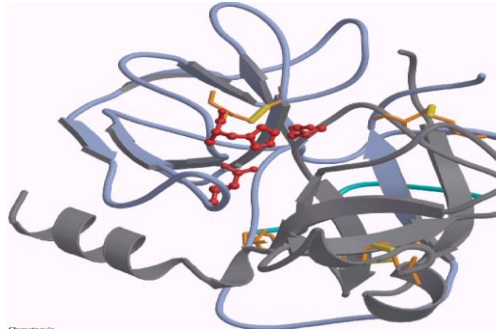
Nhờ sự phát triển ngày càng tiến bộ, ngày nay người ta đã biết cấu trúc bậc I cũng như không gian của nhiều loại protein có vai trò quan trọng trong cơ thể (xem bảng 1.1).

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 α và 2 chuỗi β ; 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).

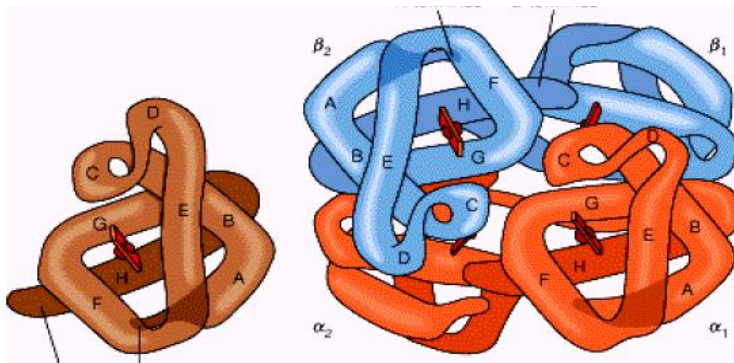
3.4.4. Các điều kiện làm bền vững cấu trúc không gian

Như đã biết cấu trúc không gian của phân tử protein được ổn định ngoài nhờ một số liên kết disulfua bền vững, thì phần 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 vỡ 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).



Chymotrypsin



Myoglobin

Hemoglobin

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

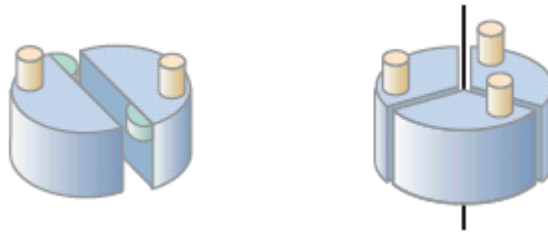
3.4.5. Tính quy luật trong cấu trúc bậc IV của protein

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 α (141 amino acid mỗi chuỗi) và hai chuỗi β (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 α và một tiểu đơn vị β . Vì

vậy, có thể coi hemoglobin có cấu trúc 4 tiểu đơn vị hay 2 tiểu đơn vị (mỗi tiểu đơn vị gồm cả α và β).

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 virus.

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 hoà 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 ngậm nước của protein

Trong môi trường nước, protein kết hợp với nước tương lên trở thành dạng keo hay nói cách khác protein ở trạng thái hydrate hoá, các phân tử nước bám vào các nhóm ưa 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 nhớt của dung dịch protein

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

Bảng 4.4 Độ nhớt của một số protein

Protein	Nồng độ % (trong nước)	Độ nhớt 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 mất 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. Mối 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 NH₂ 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. Mặt 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 μ 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 hạ. 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 lẫn 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 phân 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 hoá học của protein

Cũng như các amino acid và peptide protein có các phản ứng hoá học tương tự đó là: phản ứng của các nhóm $-COOH$, $-NH_2$, 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-Ciocalteu

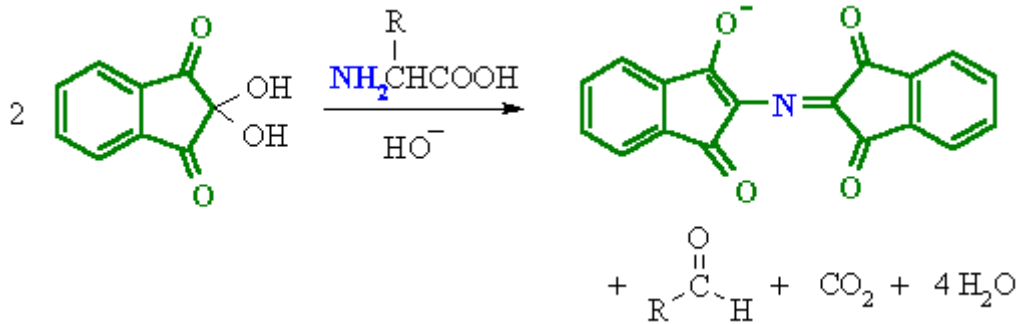
Thuốc thử Folin-Ciocalteu có chứa acid phosphomolipdic và acid phos phovolframnic. Các chất này làm tăng độ nhạy của phản ứng biure, mặt khác phản ứng với gốc Tyr và Trp trong phân tử protein. Các gốc amino acid này tham gia trong quá trình tạo phức chất màu xanh da trời.

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_3 , CO_2 và aldehyt, mạch polypeptide ngắn đi một carbon; đồng thời

ninhydrin chuyển thành diceto oxy hindrien. Diceto oxy hindrien, NH_3 mới tạo thành tiếp tục phản ứng với một phân tử ninhydrin 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_3 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 diasobenzosulfate acid tạo thành màu đỏ anh đào; phản ứng Milon gốc Tyr tác dụng với thủy ngân nitrate trong HNO_3 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 bền như trước và mất những tính chất ban đầu, chẳng hạn độ hoà 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 $0-4^\circ\text{C}$. 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 “bề mặt”: protein bị biến tính tạo nên một lớp mỏng trên bề mặt dung dịch, phần dưới lớp mỏng là những nhóm ưa nước nằm trong dung dịch, phần trên lớp mỏng là những gốc kỵ 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 bề mặt. Để bảo quản tốt các chế phẩm protein như enzyme, hormon, γ -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 đề 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, tripsin 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 tripsin 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 tripsin: đun nóng tripsin ở pH 3 tới 90°C, cấu trúc của phân tử tripsin bị biến đổi (biến tính) nhưng sau khi làm lạnh một thời gian nhất định, tripsin trở lại cấu trúc ban đầu và lại có hoạt tính enzyme.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các bậc cấu trúc của protein.
2. Trong protein có những kiểu liên kết nào? Kiểu liên kết nào ảnh hưởng lớn nhất tới sự ổn định cấu trúc không gian của protein .
3. Trình bày các tính chất lý-hóa học, phương pháp xác định khối lượng phân tử của protein.
4. Nêu các yếu tố ảnh hưởng sự hòa tan và khái niệm biến tính protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ân, Đái Duy Ban, Nguyễn Hữu Chấn, Đỗ Đình Hồ, Lê Đức Trình. 1980. Hoá sinh học. NXB Y học
2. Phạm Thị Trân châu, Trần Thị Áng. 1999. Hoá sinh học. NXB Giáo dục
3. Hồ Huỳnh Thuỳ 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, 2nd 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, 3rd Rev Edit.
9. Lehninger A.L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004
10. Lodish H., 2003. Molecular Cell Biology. 5th ed, W.H Freeman.
11. Walker John M. . 1996. The Protein Protocols Hand book. 2nd 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.

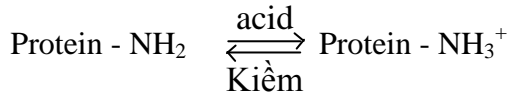
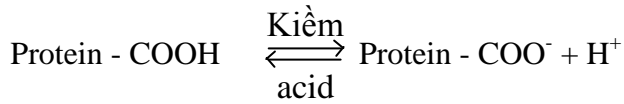
2.1. Nhiệt độ

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 - 70⁰C 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 0⁰C tránh biến tính đặc biệt là protein enzyme.

2.2. Nồng độ proton (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 chức 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 chức 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, ϵ - NH₂ 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 đẳng điện của protein. Điểm đẳng 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 đẳng 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 trichloroacetic 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , 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 rẽ 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 Ca^{++} để làm bền protein enzyme (dùng 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

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

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:

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

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 dầu 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, microsoma, 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 nghiền đồng thể (homogenizator). Thiết bị này có chày thủy tinh gắn với một motor 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 trương 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

tế 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 đổi các dung dịch đệm 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 phân tử 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 dầu 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:

$$\frac{4\pi^2 r n^2}{32,2}$$

Trong đó r là bán kính đến đáy của ống ly tâm tính ra "phút" (foot, 1foot = 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

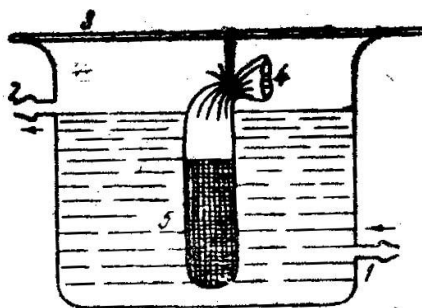
Thông thường có thể làm kết tủa những tiểu phân lớn với lực ly tâm tương đối bé bằng các máy ly tâm để bàn. Để làm kết tủa những tiểu phân bé hơn kể cả những thành phần của tế bào cần có những máy ly tâm đặc hiệu bảo đảm được các giá trị lực ly tâm tương đối cao hơn 15000 x g đối với bất kỳ định lượng 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. Thẩm tích

Thẩm tích là sự khuếch tán vi phân qua màng vốn không thẩm đối với những chất keo hòa tan (protein, một số các polysaccharid) nhưng thẩm đối 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 đệm được pha loãng (ví dụ đệm 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 đệm loãng theo định luật khuếch tán. Như vậy, muối sẽ khuếch tán vào nước hoặc dung dịch đệm loãng (di chuyển theo hướng giảm nồng độ), còn nước hoặc đệm loãng sẽ di chuyển từ dung dịch rửa vào túi chứa protein. Protein là những đại phân tử không thể vượt qua túi thấm 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 tủa protein.

Phương pháp thẩm tích thông thường là cho dung dịch có kết tủa protein vào túi thẩm tích (không quá 2/3 thể tích túi). Cho thuốc sát trùng hoặc toluen 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 $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$ hòa tan trong nước và bị loại dần. Thời gian thẩm tích có thể từ 24 - 48 giờ, làm

thẩm tích lần cuối cùng bằng nước cất.

Có thể tăng tốc độ thẩm 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 thẩm 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)

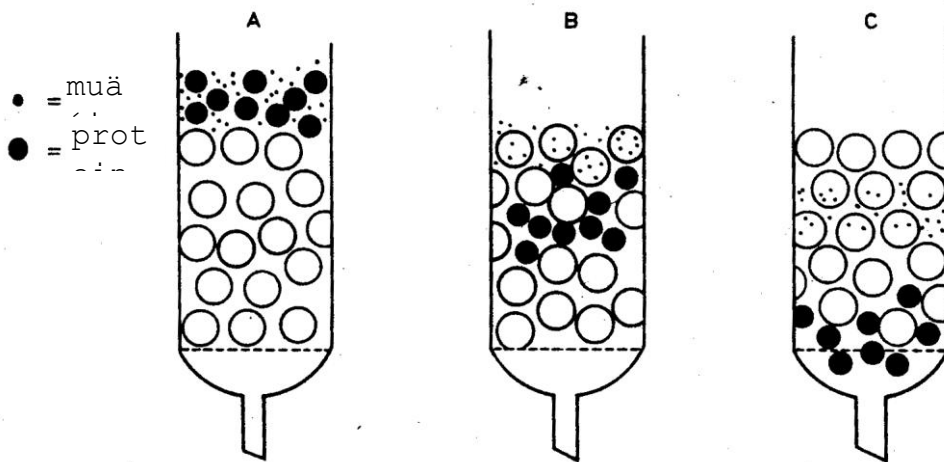
Cơ sở của phương pháp lọc gel là dựa vào sự khác nhau về kích thước, hình dạng và phân tử lượng của protein enzyme có trong hỗn hợp để tách chúng ra.

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 đệm 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. Hãng 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)

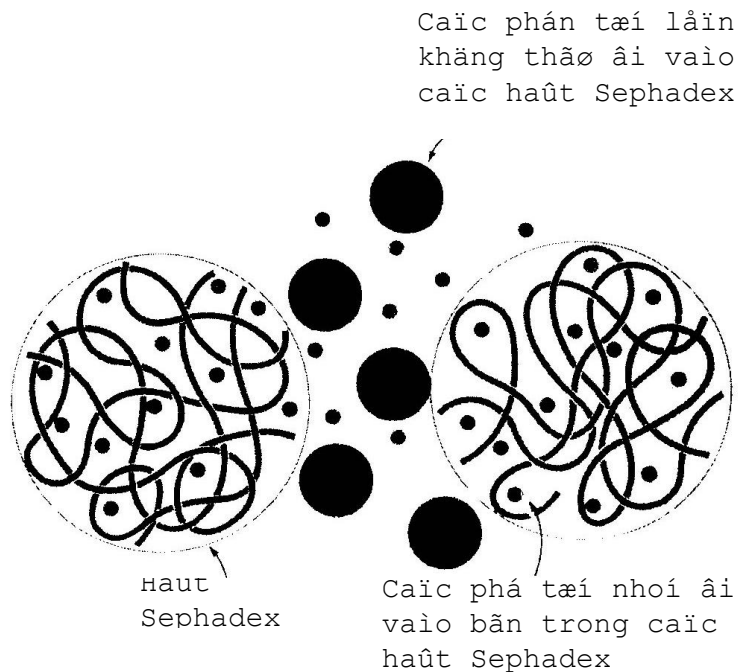


Hình 5.2 Hoạt động của lọc phân tử sephadex.

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)



Hình 5.3 Tách các phân tử theo kích thước bằng sắc ký lọc gel.

hoặc tách các sản phẩm protein được hình thành dưới tác dụng của enzyme phân cắt (như γ - 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 acrilax 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 .

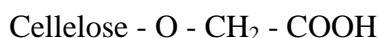
Tóm lại bằng phương pháp lọc rây phân tử người ta thể tách các chất có trọng lượng phân tử khác nhau có trong hỗn hợp (như polimer, polisaccharid, acid nucleic, protein). Người ta có thể dùng kỹ thuật này để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Và hơn thế nữa, trong quá trình tinh chế protein enzyme, 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 đệm 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 trị, không tan trong nước, có bản chất là cellulose hoặc chất gel dextran có lưới phân nhánh (Sephadex, Molselect) hoặc là chất nhựa polistirol. Chất giá trị 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 polistirol (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

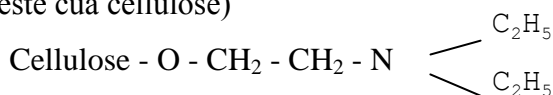
- Cationit CM - cellulose (carboxylmetyl - cellulose)- là một dẫn xuất este của cellulose.



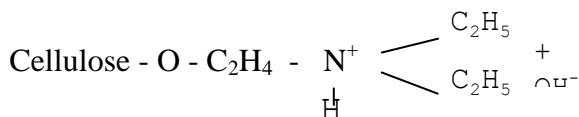
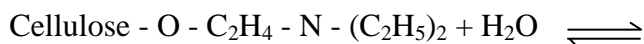
Khi phân li cho ra COO^- . Đây là chất trao đổi cation.

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_2O nó được phân ly:



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

Các anionit được áp dụng để phân tích các protein acid có thừa những nhóm carboxyl tự do. Sự hấp phụ protein trên những ionit như vậy được tiến hành với những dung dịch đệm 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)

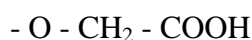
Trong hỗn hợp chất ionit với dung dịch đệm có độ pH tương ứng, các chất ionit đã nói ở trên trở nên tích điện. Vì vậy trên bề mặt lớp chất giá sẽ hình thành một lớp điện tích có dấu phụ thuộc vào kiểu nhóm chức hóa học của nó. Nếu thêm protein enzyme vào dung dịch đệm thì các phân tử protein enzyme mang điện tích sẽ bị các nhóm tích điện trái dấu của chất trao đổi ion kéo lại. Khi dùng một dung dịch đệm 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 Na^+ và Cl^- trong 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 COO^-



↓ phân ly

COO^- : mang điện tích âm → 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 vẩn 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 thấm 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 bằng ở áp suất 0,01-0,001 mm thủy 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 hòa tan trong nước cất 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 μ 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 cấy. 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. Đương 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% nitrogen. 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 lên 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 - Ciocalteu) 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 280nm do các acid amin thơm như tryptophan, tyrosine và phenylalanine. Độ hấp thụ ở 280nm 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 280nm

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

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 chế 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.

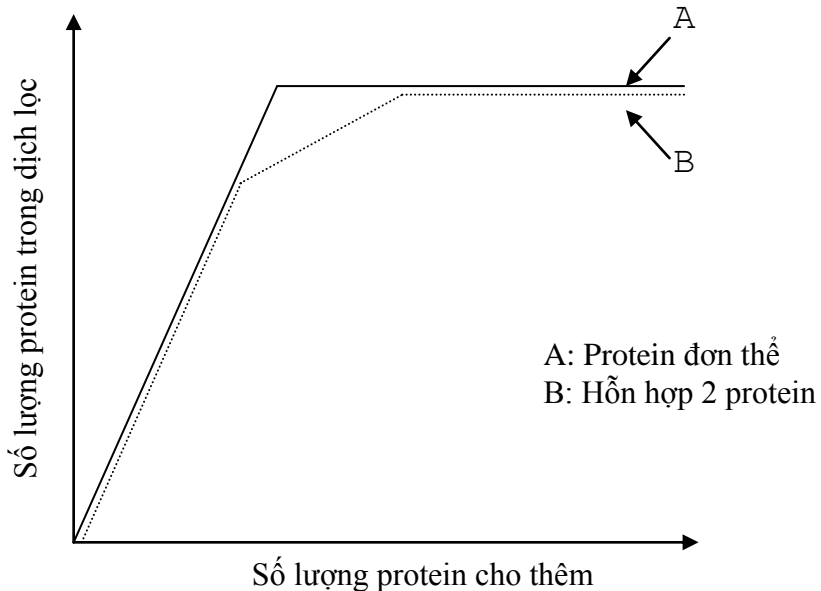
Cách làm như sau: Trong hàng loạt mẫu dùng một thể tích không đổi một loại dung môi (nước hoặc dung dịch muối) lắc với những số lượng enzyme khác nhau. Sau đó lọc và xác định số protein trong dịch lọc. Cuối cùng xây dựng đường đồ thị.

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 phân chế phẩm

protein enzyme mang điện trong điện trường. Dem chế 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 chế 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 hoà 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 như sau:

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.

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 khuếch 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...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Đề thu nhận protein nguyên thể cần có những biện pháp như thế nào?
2. Trình bày các bước và những kỹ thuật trong chiết rút và tinh sạch protein.
3. Để đánh giá độ tinh sạch và định lượng protein người ta hay dùng những phương pháp nào?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

Chương 6

Công nghệ sản xuất một số protein

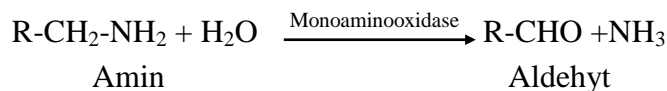
I. Mục đích yêu cầu

Từ những hiểu biết về kiến thức rất cơ bản về bản chất, ý nghĩa của protein, cùng với các phương pháp chiết rút, tách tinh sạch protein thông thường qua các chương đã được giới thiệu ở trên, trong chương này chúng tôi muốn giới thiệu công nghệ sản xuất một số protein từ các nguồn nguyên liệu khác nhau. Trong đó ưu tiên đề cập đến sản xuất một số loại protein tái tổ hợp. Qua chương này yêu cầu sinh viên nắm được nguyên tắc chung và các bước chính của một quy trình sản xuất, trước khi đi vào những vấn đề cụ thể chúng ta cần tìm hiểu thêm một số vấn đề sau đây:

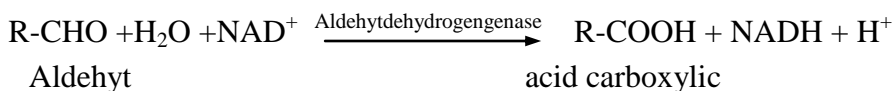
1.1. Ý nghĩa của protein đối với quá trình sinh học

Như chúng ta đã biết, mọi sinh vật tồn tại được nhờ luôn gắn với điều kiện của môi trường thông qua quá trình trao đổi chất. Quá trình trao đổi chất bao gồm nhiều khâu chuyển hoá trung gian, mỗi chuyển hoá trung gian là một mắt xích của các quá trình đồng hoá và dị hoá. Trong các quá trình sinh học đó, ngoài các chất glucid và lipid thì protein và các sản phẩm thứ cấp của nó đóng vai trò hết sức quan trọng, tạo nên một chu trình trao đổi chất và năng lượng cho cơ thể.

Ngày nay người ta biết được 10^{10} - 10^{12} loại protein khác nhau ở các dạng cơ thể sống trên trái đất. Mặc dù trong cơ thể, về cơ bản protein đóng vai trò là các thành phần cấu tạo của chất nguyên sinh và là thành phần cấu tạo chức năng của các enzyme và một số hormon, nhưng các sản phẩm phân giải của chúng vẫn được sử dụng làm chất liệu tổng hợp nhiều chất khác nhau và đặc biệt là việc cung cấp nguồn năng lượng cho cơ thể. Vì kết quả của việc phân giải amino acid tạo thành CO_2 , NH_3 , amin, cetoacid và hàng loạt trường hợp còn tạo ra những chất khá phức tạp thuộc các nhóm hợp chất hữu cơ khác nhau. Đặc biệt trong các sản phẩm đó phải kể đến các quá trình khử amin hoá oxy hoá, các amino acid được chuyển thành acid carboxylic và cung cấp hydrogen theo phản ứng chung sau đây:



Sau đó.



Ví dụ: Khi oxy hoá proline tạo thành pyroline-carboxylic, chất này có thể phân giải theo con đường tạo thành aldehyt glutamic, sau đó chuyển thành acid glutamic hoặc ornithine để cung cấp hydrogen. Bên cạnh đó proline cũng có thể oxy hoá dần dần để tạo thành hydrogenxy-proline, sau một số biến đổi để tạo thành sản phẩm tham gia trong chu trình Kreb để cung cấp ATP. Tóm lại, sự phân giải protein tiếp đến là các amino acid là các phản ứng cung cấp năng lượng cho các quá trình sinh học. Từ chỗ cung cấp hydrogen xuất phát từ nhiều loại cơ chất tạo thành một phức hệ trong trao đổi chất, tựu trung ở các cơ chất, cuối cùng đều nhường hydrogen cho chuỗi hô hấp tế bào để tạo thành các phân tử ATP- nguồn dự trữ năng lượng cho mọi hoạt động sống của sinh vật.

1.2. Nhu cầu khoa học và xã hội đối với protein

Protein là hợp phần chủ yếu quyết định toàn bộ các đặc trưng của khẩu phần thức ăn, chỉ trên nền tảng protein cao thì tính chất sinh học của các cấu tử khác mới thể hiện đầy đủ. Khi thiếu protein trong chế độ ăn hàng ngày sẽ dẫn đến nhiều biểu hiện xấu cho sức khoẻ như suy dinh dưỡng, sút cân mau, chậm lớn ở trẻ em, giảm khả năng miễn dịch chống đỡ của cơ thể với một số bệnh. Thiếu protein sẽ gây ảnh hưởng xấu đến hoạt động bình thường của nhiều cơ quan chức năng như gan, tuyến nội tiết và hệ thần kinh v.v... Thiếu protein sẽ làm thay đổi thành phần hoá học và cấu tạo hình thái của xương như lượng calci giảm, lượng magie tăng cao. Do đó, mức protein cao chất lượng tốt (protein chứa đủ amino acid không thay thế) là cần thiết trong thức ăn của mọi lứa tuổi. Theo các báo cáo của UNO và FAO từ năm 1972, người ta đi đến kết luận rằng việc sản xuất protein của thế giới hoàn toàn đáp ứng nhu cầu của dân số hiện tại trong thời gian đó. Tuy nhiên 2/3 protein sản xuất ra lại chỉ được tiêu thụ bởi 1/3 dân số thế giới. Tốc độ sinh đẻ ở các nước đang phát triển lớn gấp đôi so với các nước phát triển và theo tính toán ở năm 2000 dân số thế giới đã đạt khoảng 7000 triệu người, như vậy nhu cầu của protein cũng phải tăng gấp đôi so với năm 1972. Ngoài ra ở những nước phát triển có mức sống cao, các thức ăn hỗn hợp dành cho động vật cũng đòi hỏi chứa các nguồn protein có chất lượng cao để sản xuất ra trứng, gia cầm, bò, lợn... đủ tiêu chuẩn. Các thức ăn này phải thoả mãn hoàn toàn các nhu cầu dinh dưỡng của động vật và thường là 10- 30% protein tính theo trọng lượng.

Ngoài nhu cầu protein làm thức ăn cho người và chăn nuôi thì trong lĩnh vực y dược, sự hiểu biết về bệnh học ở mức độ phân tử đang phát triển nhanh chóng, nhu cầu sử dụng các chế phẩm từ protein để nghiên cứu chữa bệnh cho người và động vật ngày càng tăng. Ngày nay người ta có thể sản xuất các thuốc men quý hiếm từ protein như các hormon sinh

trường, hormon chống tiểu đường là insulin, các globulin miễn dịch, các yếu tố đông máu, các kích thích tố sinh trưởng hồng cầu, các kháng thể đơn dòng, các loại vaccine v.v...bằng con đường công nghệ gene có thể vừa tạo ra sản phẩm tự nhiên, vừa hạ giá thành, lại có thể tạo ra một lượng lớn nhanh chóng mà trước đây bằng con đường tách chiết hay tổng hợp hoá học không bao giờ đáp ứng kịp nhu cầu trong chẩn đoán và điều trị các bệnh. Hiện nay nhiều công ty tranh nhau để sản xuất các sản phẩm này theo phương pháp kỹ thuật DNA tái tổ hợp (recombinant DNA technology) đã mang lại những lợi nhuận khổng lồ hàng nghìn triệu đô la mỗi năm. Chẳng hạn loại protein albumin huyết thanh người (HSA) được tách ra từ máu người cho và được dùng để điều trị trong bệnh mất huyết tương, thay thế chất lỏng điều trị bỏng, sóc chấn thương hay một số trường hợp bệnh nhân bị phẫu thuật. Loại này trên thế giới mỗi năm tiêu thụ khoảng 300 tấn và thu riêng khoản này tới 1000 triệu đô la mỗi năm.

1.3. Tình hình nghiên cứu và sản xuất protein có hoạt tính sinh học

Insulin là protein hormone kết tinh đầu tiên (Abel, 1925); enzyme đầu tiên được kết tinh là urease (Summer, 1926). Người ta tiếp tục đi sâu vào nghiên cứu cấu trúc và chức phận của protein cũng như mối liên quan giữa chúng. Với công trình nghiên cứu của nhà sinh hoá học người Mỹ J.H. Northrop kết tinh được pepsin (1930), tripsin (1932) và chymotrypsin (1935) và một số công trình khác người ta càng hiểu rõ hoạt tính sinh học của các loại enzyme này. Đến năm 1953, Sanger đã xác định được cấu trúc bậc 1 của insulin gồm có 51 amino acid; tiếp đó Hirs, Stein More và cộng sự (1960) đã xác định được cấu trúc bậc 1 của enzyme ribonuclease gồm 121 amino acid; cũng năm đó Braunitzer đã xác định được hemoglobin người gồm 4 chuỗi polypeptide, hai chuỗi α - mỗi chuỗi 141 amino acid và hai chuỗi β - mỗi chuỗi 146 amino acid và hàng chục các protein khác như cytochrom, papain v.v...Mặc dù từ năm 1953 lần đầu tiên Du Vigneaud tổng hợp được các hormon peptide oxytocin và vasopressin bằng phương pháp hoá học và chỉ 10 năm sau (1963) Trung quốc, Mỹ và Tây Đức đã tổng hợp được insulin theo mẫu cấu trúc bậc 1 của Sanger đưa ra; 1969 tổng hợp được ribonuclease và 1970 tổng hợp được protein sinh trưởng. Từ đó con người bước vào giai đoạn tổng hợp nhân tạo các protein một chất có tầm quan trọng bậc nhất đối với sự sống.

Trong những thập niên 70 việc tách chiết và nghiên cứu chức năng các protein có hoạt động sinh lý, đặc biệt trong lĩnh vực về tính kháng khuẩn của peptide diễn ra mạnh mẽ như: vai trò bảo vệ của các cationic protein trong các hạt bào tương (Zeya, 1971; 1975); protein BPI (bacterial permeability inducing factor) tách từ bào tương bạch cầu trung tính của

bệnh nhân bị bệnh ung thư bạch cầu tuỷ mãn tính. Tính chất cũng như trình tự amino acid của protein này đã được xác định bởi các công trình của Pohl (1990) và Morgan (1991). Vào năm 1993-1996 Shafer công bố nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của một loại peptide tổng hợp hoá học dựa trên cấu trúc bậc nhất của cathepsin G, ông còn cho biết thêm rằng peptide được tổng hợp từ các dạng D-amino acid và dạng L-amino acid có hoạt tính kháng khuẩn tương đương.

Bên cạnh việc tách chiết và nghiên cứu các protein có hoạt tính sinh học trong tự nhiên và bằng tổng hợp hoá học, ngày nay với kỹ thuật di truyền hiện đại các nhà nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp mới để thu nhận các peptide có hoạt tính sinh học cao nhằm chăm sóc và bảo vệ sức khoẻ cộng đồng. Dựa trên trình tự các amino acid đã được xác định từ các peptide tách chiết ngoài tự nhiên hoặc các peptide đã được tổng hợp theo phương pháp hoá học, các nhà nghiên cứu đã tổng hợp các đoạn oligonucleotide hoặc tách và nhân các gene mã hoá các peptide tự nhiên bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction), sau đó tạo các vector tái tổ hợp và biến nạp vào các tế bào để thu nhận các sản phẩm tái tổ hợp có hoạt tính mong muốn. Mục đích sau đó tạo các chủng sản xuất để thu nhận sản phẩm ở mức độ pilot. Đây là phương pháp mới, song cũng có những kết quả đáng khích lệ và đang được tiến hành ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới.

Thành tựu nổi bật nhất trong lĩnh vực sản xuất protein tái tổ hợp là các loại vaccine như phòng chống viêm gan B, sốt xuất huyết, bệnh đậu mùa v.v...cho con người và nhiều loại vaccine cho động, thực vật mà chúng tôi sẽ giới thiệu lồng ghép trong các mục về sản xuất vaccine ở phần dưới.

Vaccine được coi là phương thức hữu nghiệm nhất phòng chống và làm giảm phần lớn tỷ lệ mắc và chết do các đại dịch rủi ro đưa đến. Vì những lý do khác nhau, không có một quốc gia nào có được sự cung ứng vaccine ngay từ đầu đại dịch mà thường là nhiều tháng sau đó. Nên sản xuất vaccine lớn mang tính chất thương mại muốn có vaccine cũng phải có tới 3-6 tháng sau đại dịch virus bùng nổ.

Gần đây, người ta thường nói nhiều đến cúm gia cầm, khả năng sản xuất các vaccine cúm được tập trung nhiều ở châu Âu và Bắc Mỹ. Năng lực sản xuất hiện nay ước tính 300 triệu liều vaccine tam liên (ba thành phần) trong một năm, khả năng này còn kém xa với nhu cầu tăng lên trong đại dịch. Tổ chức y tế thế giới (WHO), qua mạng lưới đặc biệt các phòng thí nghiệm cúm đã quan sát liên tục sự diễn biến của virus H5N1 từ khi ca nhiễm đầu tiên trên người ở Hong Kong năm 1997. Các phòng thí nghiệm

này chuẩn bị chủng vaccine nguyên bản (đầu tiên), nó đang được chứng minh trong một kỹ nghệ như một “gốc giống” để phát triển vaccine. Các phòng thí nghiệm này đã hướng dẫn việc phân tích cấu trúc phân tử của virus, bảo đảm giúp đỡ công việc phát triển vaccine tiến triển. Một phần việc quan trọng là đã khám phá ra sự đột biến của virus trong năm 2005.

Vài trong số 10 nước có các cơ sở sản xuất vaccine nội địa, hiện đang tiến hành phát triển một vaccine cho đại dịch. Một vài nơi trong số các dự án phát triển vaccine đại dịch đã tiến đến giai đoạn thử nghiệm lâm sàng, mong có thời gian ngắn nhất của thử nghiệm lâm sàng đối với các vaccine dự tuyển khác nhau. Một công ty cho biết sẽ báo cáo kết quả thử nghiệm lâm sàng với WHO vào đầu tháng 12 năm 2005.

Hiện tại chưa đưa ra được một công thức vaccine cúm có hiệu quả và kinh tế về việc sử dụng hàm lượng kháng nguyên-thành phần kháng nguyên của vaccine kích thích đáp ứng miễn dịch. Bởi vậy những cuộc thử nghiệm lâm sàng diễn ra với cách kiểm chứng các công thức vaccine khác nhau, kể cả chất hấp phụ. Chất này tăng cường đáp ứng miễn dịch, và về lý thuyết thì nó có thể cho phép bảo vệ thích hợp ở mức hàm lượng kháng nguyên thấp. Xu hướng này cũng đang tiến hành.

Như chúng ta đã biết, vaccine thì cần cho một đại dịch thực sự đang tới gần, mà việc sản xuất thương mại thì không thể bắt đầu khi một đại dịch virus bùng nổ. Bởi vậy, WHO đã khuyến khích về mặt kỹ nghệ và nhưng cơ quan có thẩm quyền đưa ra những quy trình nhanh chóng cho việc cấp giấy phép và sử dụng vaccine đại dịch. Việc này WHO đã thực hiện. Ngoài ra, WHO đang sử dụng diễn đàn Quốc tế cổ vũ cộng đồng quốc tế tìm kiếm nhiều cách tăng khả năng sản xuất và bảo đảm rằng các nước đang phát triển có được một vaccine hiệu quả trong một nỗ lực có thể được về giá cả. Tuy nhiên, theo xu hướng hiện tại hầu hết các nước đang phát triển sẽ chưa có vaccine dùng trong thời điểm bắt đầu đại dịch mà chỉ có được trong thời gian xảy ra đại dịch

Ở Việt nam ta, trong những thập niên vừa qua tình hình nghiên cứu và sản xuất các chất protein có hoạt tính sinh học cũng đã thu được những kết quả đáng kể. Nhiều công trình nghiên cứu phân lập và tách chiết các protein có hoạt tính sinh học đã được công bố. Tuy nhiên, hầu hết các công trình chỉ đề cập đến việc điều tra trong tự nhiên, nghiên cứu cấu trúc, chức năng và ứng dụng, mà chưa đề cập nhiều đến sản xuất các loại protein đó. Mặc dù không nhiều nhưng cũng đã có những ghi nhận bước đầu như việc sản xuất thành công một số loại vaccine phòng bệnh của Viên vệ sinh dịch tễ Trung ương như vaccine virus viêm gan B(kháng nguyên bề mặt- HbsAg), vaccine phòng viêm não Nhật bản, vaccine virus

dại (kháng nguyên G)v.v... Gần đây nhất (2003), bằng kỹ thuật di truyền nhóm tác giả Lê Trần Bình (Viện công nghệ sinh học-TTKH & CNQG) đã thu nhận được một loại peptide tái tổ hợp có hoạt tính kháng khuẩn và một loại protein khác có tên gọi là melittin (loại protein có trong nọc ong dùng để điều trị bệnh nhiễm khuẩn và làm tan các khối u).

II. Sản xuất protein bằng con đường vi sinh vật

Ngay từ thời cổ xưa vi sinh vật đã được con người sử dụng để chế biến và sản xuất thực phẩm, nó là một bộ phận trong khẩu phần ăn của con người và các loài vật nuôi. Ngày nay việc sản xuất protein từ nguồn vi sinh vật không chỉ còn là mục đích chỉ sử dụng để làm thức ăn đơn thuần, mà còn được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau nữa như sản xuất các loại hormon, các peptide kháng sinh và các chất miễn dịch v.v...

Về nguyên tắc chung: để sản xuất protein từ vi sinh vật, tùy theo mục đích riêng để sử dụng loại vi sinh vật (giống) và môi trường nuôi cấy (lên men) thích hợp, nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật tổng hợp tối đa lượng các loại protein mong muốn. Để thu nhận chế phẩm protein từ vi sinh vật, việc tách chiết được tiến hành như việc chiết xuất các protein khác. Dưới đây xin được giới thiệu công nghệ sản xuất một số protein bằng con đường vi sinh vật:

2.1. Sản xuất protein đơn bào

2.1.1. Khái quát chung về sản xuất protein đơn bào.

Protein đơn bào (SCP- Single Cell Protein), là tên gọi theo quy ước để chỉ vật chất tế bào vi sinh vật được sử dụng làm thức ăn cho người và động vật. Thuật ngữ này thật ra không chính xác hoàn toàn, vì lượng sản phẩm tạo ra không phải là một protein thuần khiết mà là các tế bào được xử lý thuộc nhiều loại vi sinh vật khác nhau, cả đa bào lẫn đơn bào và bao gồm vi khuẩn, nấm men nấm sợi và tảo.

So với sản xuất các nguồn protein truyền thống sản xuất SCP có nhiều ưu thế sau đây:

- Tốc độ sản xuất cao.
- Hàm lượng protein cao(30- 80% tính theo trọng lượng khô).
- Có thể dùng các nguồn carbon khác nhau (mà một số vẫn được coi là chất phế thải).
- Các chủng có năng suất cao và thành phần tốt: dễ kiểm, dễ chọn.
- Diện tích sản xuất không lớn, cho sản lượng cao (trù trữ).
- Không phụ thuộc vào mùa vụ, khí hậu.

2.1.2. Quy trình sản xuất SCP.

Quy trình để sản xuất SCP bao gồm các bước chính sau đây:

- Chuẩn bị nguồn C, thường là phải qua một tổ hợp xử lý vật lý và hoá học.

- Chuẩn bị môi trường thích hợp chứa nguồn C và các nguồn N, P và các chất dinh dưỡng khác.

- Ngăn ngừa sự nhiễm tạp của môi trường hoặc thiết bị sản xuất.

- Cây vi sinh vật mong muốn.

- Tách sinh khối tế bào vi sinh vật khỏi môi trường đã tiêu dùng.

- Hậu xử lý sinh khối tinh khiết hay là không.

2.1.3. Những vấn đề cần lưu ý trong sản xuất SCP.

2.1.3.1. Nuôi cấy:

Dù là lên men diễn ra dưới điều kiện vô trùng hoặc điều kiện sạch đều cần phải có biện pháp để tránh tạp nhiễm như: đun nóng hoặc lọc các thành phần môi trường và khử trùng thiết bị lên men; khác với tảo, các quá trình sản xuất SCP đều cần thông khí mạnh; nhiệt tạo ra phải có hệ thống làm lạnh.

2.1.3.2. Thu hồi sinh khối:

Nấm men và vi khuẩn thường được thu hồi bằng ly tâm (vi khuẩn cần năng lượng ly tâm cao hơn), trong nhiều trường hợp cần cả nhân tố vón cục (kết bông/ kết cụm). Các vi sinh vật ở dạng sợi có thể thu hồi nhờ ly tâm vắt (lọc vắt), giá thành sẽ rẻ hơn. Phải loại bớt càng nhiều nước trước khi làm khô để tránh tổn kém trừ những nơi có thể phơi nắng và sử dụng lao động giá rẻ, tuy nhiên sản phẩm sẽ có chất lượng thấp. Tùy thuộc vào loại cơ chất và loại sản phẩm, sinh khối cần được hậu xử lý để loại các thành phần cơ chất hay thường gặp hơn là làm giảm hàm lượng các chất không mong muốn (ví dụ acid nucleic) hoặc thậm chí để tách riêng phần protein. Một nhược điểm quan trọng của SCP là thường chứa hàm lượng acid nucleic cao, đặc biệt là ở vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Nếu các loại SCP dùng để làm thức ăn cho người thì là cả vấn đề, bởi vì con người thiếu enzyme uricase xúc tác cho sự oxy hoá acid uric thành allantoin hoà tan hơn. Ăn nhiều các dẫn xuất purine sẽ làm tăng hàm lượng acid uric trong máu, acid này kết tủa sẽ tạo thành tinh thể trong các khớp và đóng góp vào việc tạo nên các viên sỏi trong đường tiết niệu. Theo Edozien(1970) hàng ngày một người chỉ nên ăn 20 gam nấm men (tính theo trọng lượng khô).

Đã có những phương pháp đề ra nhằm làm giảm hàm lượng acid nucleic trong SCP. Nhưng thường thì các phương pháp xử lý ấy sẽ dẫn

đến làm giảm giá trị sinh học của protein đơn bào. Các phương pháp chính là:

- Thuỷ phân bằng kiềm
- Chiết bằng hoá chất.
- Điều khiển về sinh trưởng và sinh lý tế bào.
- Hoạt hoá RNA ase (bằng xử lý nhiệt ngắn).

Đề phòng để không loại ra khỏi môi trường ngoài những số lượng lớn vi sinh vật kể cả dạng chết lẫn dạng sống. Khi dịch thải có hàm lượng BOD (Biological Organic Demand) cao thì cần phải xử lý để tránh ô nhiễm môi trường. Sau khi xử lý môi trường có thể tái sử dụng, việc này nhằm đồng thời hai mục đích là giảm lượng nước mới cần thiết và giảm giá thành. Theo tính toán, nhu cầu nước cần sử dụng là 18- 45 x 10⁶ lít cho một nhà máy sản xuất 100.000 tấn SCP/ năm.

2.1.3.3. Tuyển chọn vi sinh vật.

Một vi sinh vật được sử dụng cho mục đích sản xuất SCP làm nguồn thức ăn protein cho người hoặc động vật cần phải có một số đặc điểm là:

- Không gây bệnh động thực vật và người.
- Có giá trị dinh dưỡng cao.
- Được chấp nhận như là một loại thực phẩm hoặc thức ăn gia súc.
- Không chứa các độc tố.

- Giá thành sản xuất thấp (nghĩa là phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng; sản lượng; hàm lượng protein; có đòi hỏi bổ sung chất dinh dưỡng hay không; có ưu thế phát triển chọn lọc trên môi trường sản xuất; dễ tách và dễ làm khô) và cụ thể với từng loại vi sinh vật như sau:

a) Đối với tảo.

Ở tảo người ta thường dùng ba chi để sản xuất SCP là: *Chlorella*, *Spirulina* và *Scenedesmus* chúng có thể có phương thức sinh dưỡng là quang hợp, hoá tổng hợp hoặc là dị dưỡng. Phương pháp hay dùng là phương pháp quang hợp. Trong trường hợp này nhân tố giới hạn là ánh sáng, vì vậy kinh tế nhất là dùng các hồ hở dưới ánh sáng mặt trời. Tuy nhiên khi tiến hành nuôi tảo ở các hệ thống có quy mô lớn thì khó có thể giữ được các điều kiện vô trùng với giá thành thấp và trong trường hợp này nguy cơ nhiễm tạp là nghiêm trọng. Mặt khác, mật độ tế bào khi nuôi tảo thường thấp (ở các hệ thống nuôi lớn chỉ thu được 1-2 gam/lít tính theo trọng lượng khô) để có thể đạt được điều kiện chiếu sáng tốt, song điều này sẽ dẫn đến chi phí tốn kém hơn khi thu hoạch. Riêng tảo *Spirulina* có thể thu hoạch kinh tế hơn nhờ biện pháp lọc hoặc vớt.

Thành phần các cao phân tử của tảo thay đổi rất nhiều phụ thuộc vào các điều kiện sinh trưởng. Hàm lượng protein thô ($N \times 6,25$) có thể chiếm tới 60%, thành phần các amino acid cân đối, riêng amino acid chứa lưu huỳnh thấp. Tảo chứa nhiều sắc tố, một ưu điểm khi được dùng làm thức ăn gia súc, song lại không tốt cho dinh dưỡng của người.

Hiện nay SCP của ba chi tảo nói trên có thể dùng làm thực phẩm cho người tuy nhiên với một tỷ lệ thấp. Riêng *Spirulina* từ lâu vẫn được coi là nguồn dinh dưỡng protein lý tưởng và rẻ tiền ở Mehico và vùng bờ bắc hồ Tchad của châu Phi, tảo này ngoài hàm lượng protein cao còn chứa nhiều nguyên tố vi lượng và rất giàu vitamin B₁₂ (gấp 4 lần so với gan bò). Ở đó họ có thể vớt *spirulina* từ các thủy vực tự nhiên.

b) Đối với vi khuẩn.

Vi khuẩn có thể được dùng để sản xuất SCP, tuy nhiên cần chú ý một số ưu và nhược điểm sau đây:

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.
- Dùng được nhiều loại cơ chất.
- pH cần giữ ở 5-7, nếu không sẽ có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn gây bệnh.
- Thu hồi bằng li tâm khó.
- Hàm lượng protein thô có thể rất cao (tới 80%) song hàm lượng bình thường của các acid nucleic đặc biệt là RNA cũng cao (tới 20%) và cần phải được loại bỏ.
- Thành phần amino acid cân đối nhưng hàm lượng amino acid chứa S hơi thấp.
- Khi dùng các vi khuẩn gram âm để sản xuất SCP cần lưu ý khả năng sản sinh độc tố của chúng.

c) Đối với nấm men

Nấm men đã được sử dụng để sản xuất SCP với quy mô lớn từ lâu, đặc biệt là việc sử dụng các loài trong những chi như *Saccharomyces*, *Torulopsis* và *Candida*. Tuy nhiên cũng như vi khuẩn việc sản xuất SCP từ nấm men cần lưu ý các đặc điểm là:

- Thường tốc độ sinh trưởng của nấm men tương đối cao nhưng không bằng các chủng vi khuẩn sinh trưởng nhanh nhất.
- pH trong lên men thường giữ ở 3-5, điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc làm giảm nguy cơ nhiễm trùng.
- Có thể thu hoạch bằng biện pháp ly tâm liên tục.

- Hàm lượng protein nằm vào khoảng 50- 60%, tuy nhiên hàm lượng acid nucleic có thể lên tới 15%, vì vậy cần phải tiến hành các biện pháp để làm giảm lượng acid nucleic.

- Thành phần amino acid cân đối nhưng so với vi khuẩn thì hàm lượng các amino acid chứa lưu huỳnh còn thấp hơn. Để sử dụng cần phải bổ sung thêm methionine.

- Giàu các vitamin nhóm B.

d) Đối với nấm sợi.

Khi chọn giống nấm sợi để sản xuất SCP trước hết cần lưu ý có nhiều loài mang độc tố, chúng thường xuyên đe dọa tính mạng mà đặc biệt gây ung thư cho con người. Ngày nay người ta đã tìm được trên 20 loại hoạt tính khác nhau các độc tố ở nấm sợi

So với vi khuẩn và nấm men, nấm sợi thường có tốc độ sinh trưởng chậm hơn. Gần đây người ta đã phân lập được các chủng có tốc độ sinh trưởng gần bằng nấm men và nấm sợi có một số đặc điểm sau:

- Giới hạn thích hợp cho sinh trưởng khá rộng (từ 3- 8), tuy nhiên trong sản xuất cần giữ pH < 5 để tránh nhiễm khuẩn. Việc nhiễm nấm men thường hay xảy ra nếu môi trường không được khử trùng tốt.

- Khi nuôi cấy chìm nấm sợi thường tạo thành các đám sợi, điều này có ưu điểm là làm cho việc thu hoạch dễ dàng, nhưng lại có nhược điểm là hạn chế sự phân bố đồng đều không khí trong toàn bộ hệ sợi.

- Hàm lượng protein thô nằm trong khoảng 50- 55%, song khi sinh trưởng nhanh hàm lượng acid nucleic sẽ cao (RNA tới 15%).

- Thành phần amino acid của nấm sợi cân đối, tuy nhiên các amino acid chứa lưu huỳnh cũng có mặt ở nồng độ thấp.

2.2. Tổng hợp các hormon bằng vi sinh vật

Cách đây khoảng 60 năm về trước, các nhà khoa học mới biết cách sử dụng nấm để chế tạo thuốc kháng sinh penicillin và chế tạo các loại thuốc kháng sinh khác được sử dụng rộng rãi hiện nay. Hơn 20 năm trước đây đã diễn ra một cuộc đột phá thực sự mang lại lợi ích to lớn cho con người đặc biệt trong lĩnh vực y dược. Lúc đó, các nhà khoa học đã biết cách đưa gen người vào phân tử ADN của vi khuẩn và tế bào động vật, rồi buộc chúng phải sản sinh ra một loại protein có tác dụng chữa bệnh. Sản phẩm đầu tiên của phương pháp đó là insulin (một loại hormon chống bệnh đái tháo đường) được Hãng Eli Lilly&Co phát minh năm 1982 thông qua vi khuẩn biến tính gen *E. coli*.

Ngày nay đã có hơn 130 dược chất sinh học đã được chính thức công nhận bởi Tổng cục kiểm soát tân dược của Mỹ và được sử dụng trong y học. Ở đây đa số khối lượng hàng bán đi thuộc các loại dược phẩm như erythropoetin, interferon, hormon tăng trưởng và insulin con người của một số hãng sản xuất đứng đầu thế giới .

2.2.1. Sinh tổng hợp insulin bằng *E. coli*.

Trước đây insulin được tách từ tuyến tụy của bò, lợn đôi khi gây dị ứng cho người. Trong cơ thể insulin được tổng hợp dưới dạng proinsulin gồm có ba chuỗi polypeptide là A, B và C. Khi chuyển thành insulin thì chuỗi C đã được loại bỏ.

Bằng kỹ thuật tái tổ hợp DNA, người ta chuyển gene mã hoá insulin vào vi khuẩn, và khi được nuôi cấy trong môi trường thích hợp, vi khuẩn *E. coli* sẽ sinh tổng hợp tạo ra loại peptide này. Quy trình sản xuất theo phương pháp này có thể tóm tắt gồm các bước cơ bản sau đây:

- Chuẩn bị đoạn oligonucleotide mã hoá cho insulin: dựa vào trình tự và cấu trúc của các amino acid của insulin gồm có 51 amino acid và 2 chuỗi polypeptide A và B nối với nhau bằng hai cầu disulfua. Người ta tạo dòng gene riêng biệt mã hoá cho hai chuỗi A và B

- Chuẩn bị vector (có thể dùng plasmide của vi khuẩn hoặc nấm men).

- Dùng enzyme hạn chế cắt plasmide và nối đoạn gene mã hoá cho insulin để tạo vector tái tổ hợp (loại thường dùng là pBR 322).

- Chuyển vector tái tổ hợp pBR 322 vào vi khuẩn *E. coli*.

- Nuôi cấy (lên men) vi khuẩn *E. coli* trên môi trường thích hợp.

- Tách chiết và thu nhận sản phẩm là hai loại polypeptide A và B riêng.

- Trộn hai loại peptide lại với nhau và xử lý bằng phương pháp hoá học hay enzyme để tạo cầu disulfua.

- Kiểm tra chất lượng của sản phẩm

Việc tách chiết và tinh sạch insulin có thể tiến hành theo các phương pháp sinh hoá thông thường như kết tủa, ly tâm và sắc ký. Thử hoạt tính của insulin (hiện nay được dùng phổ biến là kỹ thuật ELISA).

Sử dụng vi sinh vật mang gene tái tổ hợp để sản xuất các loại hormon nói chung, có một số vấn đề cần lưu ý đó là:

- a) Các peptide được tạo ra không phải là sản phẩm của gene tự nhiên mà được dẫn ra từ một gene tiền thân (precursor gene).

b) Mặt khác vi sinh vật thì không có cùng cơ chế hoạt động như là cơ thể bậc cao nên không có sự biến đổi sau dịch mã (post-translation modifications) như glycosyl hoá, methyl hoá hay amin hoá v.v...

c) Hơn nữa peptide không bền trong môi trường vi khuẩn, dễ bị thoái hoá bởi sự tiêu hoá của những enzyme để tạo thành những peptide ngắn.

2.2.2. Sản xuất yếu tố giải phóng hormon sinh trưởng.

Yếu tố giải phóng hormon sinh trưởng (GRF- Growth hormon Releasing Factor) là một peptide có 44 amino acid với đầu tận cùng có nhóm NH₂ được bài tiết vùng dưới đồi trong cơ thể. Bằng con đường công nghệ gene có thể thu được GRF 1-44 NH₂ tối đa và có giá thành rẻ hơn so với phương pháp tổng hợp hoá học.

Quy trình sản xuất GRF bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp cũng bao gồm các bước chính tương tự như đối với insulin. Tuy nhiên, đi sâu vào chi tiết kỹ thuật đã biết, hiện nay có ba phương pháp sinh tổng hợp GRF theo con đường công nghệ gene là:

a) Phương pháp 1.

Trước hết cần thiết kế gene tổng hợp nhân tạo cho GRF 1-44 OH. Song cần chú ý rằng amino acid tận cùng không thể thu được bằng amin hoá trực tiếp ở vi khuẩn và gene nhân tạo cần có bộ mã hoá cho Met-GRF 1-44 OH để ở codon mở đầu của gene. Khi thu được GRF 1-44 OH thì Met cần phải được tách ra ngoài. Hơn nữa protein này ngắn dễ dàng bị phân huỷ bởi protease của *E. coli* và như vậy GRF có thể bị thay đổi chút ít trước khi tích tụ đủ một lượng nhất định.

b) Phương pháp 2.

Một hướng khác là liên kết một gene peptide GRF với một gene protein của vi khuẩn, trên cơ sở đó protein của vi khuẩn bảo vệ peptide GRF khỏi bị thủy phân. Sau đó protein này sẽ được tách ra bằng con đường hoá học hoặc enzyme.

c) Phương pháp 3.

Hướng thứ ba là dùng sự chín của enzyme từ α -pheromone trong nấm men. Gene GRF được dung hợp với pheromone và như vậy protein lại chứa những tín hiệu Lys- Arg-(Ala)- 2 hoặc 3 trong đầu của GRF 1-44 OH. Sản phẩm GRF được bài tiết vào môi trường nuôi cấy. Cuối cùng GRF 1-44 OH được tách, làm sạch và amin hoá bằng phương tiện enzyme.

2.3. Sản xuất các cytokin

Cytokin ngày nay đang trở thành mặt hàng kinh doanh lớn cạnh tranh giữa các công ty Tonen (Nhật bản), Genetech (Mỹ), Delta (Anh), Rhone Poulenc (Pháp). Gần đây người ta phát hiện hàng loạt các cytokin được bài tiết ra từ hai nhóm khác nhau của tế bào lymphocyte T. Nhóm Th1 bài tiết interleukin 2 (IL-2) và γ -interferon (IFN- γ); nhóm Th2 bài tiết IL-4, IL-5, IL-6 và IL-10.

Để sản xuất một số lượng lớn cytokin đáp ứng cho nhu cầu chữa bệnh các công ty trên thế giới ngày càng đầu tư mạnh mẽ vào con đường công nghệ gen và công nghệ sinh học. Để sản xuất cytokin tái tổ hợp người ta sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp DNA tiêu chuẩn và những chất biến dị định hướng về oligonucleotide được tiến hành khi dùng hệ thống biến dị *in vitro* của hãng Amesham. Các oligonucleotide được tổng hợp trên máy tổng hợp DNA 391.

Dòng tế bào *E. coli* IB 392 đã được biến hình để biểu hiện vector (vật chủ) chứa đoạn DNA (mã hoá IL-2, IL-1 α và INF- α) của cừu được biến đổi để sản xuất các protein tái tổ hợp. Vi khuẩn được nuôi cấy lớn lên qua đêm trong môi trường Mq ở 30°C rồi hoà loãng 20 lần bằng môi trường tươi, giữ 34°C cho đến khi có DD 600 =1, sự trương phồng plasmide được gây ra bằng ủ tế bào ở 42°C qua 20 phút. Sau đó ủ tiếp 5 giờ ở 37°C để tạo ra các protein tái tổ hợp. Các tế bào được ly tâm 5000 vòng /phút trong thời gian 30 phút và lắng cặn giữ ở nhiệt độ 20°C cho đến khi sử dụng.

2.4. Sản xuất các chất miễn dịch và vaccine

Vi sinh vật từ lâu được xem là công cụ đắc lực để phòng ngừa và điều trị bệnh tật. Ngoài việc sử dụng vi sinh vật để phục hồi lại khu hệ đường ruột đã bị huỷ hoại bởi điều trị kháng sinh lâu ngày, từ lâu con người cũng đã biết sử dụng các vi sinh vật còn sống hoặc đã bị giết chết, đặc biệt là các vi khuẩn, làm kháng nguyên để tạo kháng thể hay làm độc tố để tạo kháng độc tố trong miễn dịch. Trong sản xuất vaccine các vi khuẩn gây bệnh thường được nuôi đại trà .

2.4.1. Sản xuất chất độc tố miễn dịch (Immunotoxin-ITs).

Chất độc tố miễn dịch là các độc tố gây độc cho tế bào, ITs có cấu trúc gồm hai phần: chất gây độc (toxin) có bản chất protein và tác nhân hướng đích. Độc tố miễn dịch hiện đang được phát triển mạnh mẽ ở nhiều nước trên thế giới để điều trị các bệnh về ung thư và bệnh tự miễn.

Trong điều trị HIV, trở ngại lớn nhất là khả năng thâm nhập của virus vào một loại tế bào lympho T có vai trò như bộ nhớ của hệ thống

miễn dịch. Khả năng nguy trang của virus HIV tinh xảo đến mức chưa có loại thuốc chống tái phát nào có khả năng tìm diệt được. Để giải quyết vấn đề này, nhóm nghiên cứu trường Đại học Texas đã thành công trong việc tạo ra một loại độc tố miễn dịch, bao gồm một kháng thể chuyên nhận dạng tế bào T cất giấu virus và một phân tử có nguồn gốc từ chất độc ricin thần kinh. Họ đã tiến hành thử nghiệm 24 bệnh nhân HIV và nhận thấy loại độc tố trên đã làm giảm một lượng lớn các tế bào T đã nhiễm virus trong một thời gian ngắn. Tuy nhiên, theo giáo sư Frances Gotch thuộc trường Imperial London (Anh), nếu loại độc tố trên nếu không được “lập trình” cẩn thận, nó có thể huỷ diệt bất kỳ tế bào miễn dịch nào trong máu và khiến hệ miễn dịch sẽ yếu hơn do các tế bào “bộ nhớ” đã bị tiêu diệt.

Một liệu pháp đang điều trị dạng ung thư máu hiếm gặp cho nhiều kết quả hứa hẹn trong thử nghiệm ban đầu và cũng giúp bệnh nhân điều trị các bệnh bạch cầu khác. Trong bệnh bạch cầu tế bào có lông là ung thư tế bào lymphocyte B, họ đã dùng độc tố miễn dịch gồm một phần kháng thể và một phần độc tố. Độc tố này có tên là BL22, có phần kháng thể nhận dạng gắn với tế bào ung thư và phần độc tố để tiêu diệt tế bào. Ngoài ra, BL22 cũng có hiệu quả trong điều trị bệnh bạch cầu lymphocyte mãn tính (CLL), một dạng bệnh bạch cầu phổ biến hơn bệnh bạch cầu có lông. Các nhà khoa học có dự định dùng BL22 để điều trị bệnh bạch cầu nguyên bào lymphocyte cấp tính (ALL) ở trẻ em

Để chống lại độc tố người ta có thể tạo ra các kháng độc tố, thường là trong cơ thể thể động vật. Để sản xuất các chất này người ta thường dùng phương pháp nuôi chìm các vi khuẩn, chẳng hạn *Clostridium tetani* hay *C. butulinum*. Sau đó tiêm vào các động vật thích hợp như ngựa chẳng hạn. Từ huyết thanh ngựa người ta tách kháng độc tố, tinh sạch ở mức độ cao rồi đem đi điều trị.

Các độc tố hay được dùng để sản xuất ITs là các protein từ vi khuẩn như: *Pseudomonas* exotoxin (PE) hay diphtheria toxin (DT), hoặc từ thực vật ở nhóm protein bất hoạt ribosome (RIPs) như ricin, pokweed anti-viral protein (PAP), saporin (SAP)...

Ngay nay người ta có thể tạo độc tố miễn dịch bằng công nghệ DNA tái tổ hợp trên cơ sở gene mã hoá cho protein vô hoạt ribosome (RIPs).

2.4.2. Sản xuất vaccine vô hoạt (inactivated).

Vaccin vô hoạt hay còn gọi là vaccine chết, đó chính là tác nhân gây bệnh nhưng đã bị giết chết. Khi một thực thể vi sinh bị vô hoạt thì protein bề mặt vẫn được giữ nguyên cấu trúc. Về góc độ vaccine mà nói, nó vẫn giữ được tính kháng nguyên, nghĩa là chúng vẫn có khả năng kích thích miễn dịch, tuy không hoàn toàn và bền lâu.

Để sản xuất loại vaccine này, các vi khuẩn gây bệnh thường được nuôi đại trà. Trước kia thường dùng phương pháp bề mặt, ngày nay hay dùng phương pháp chìm. Sau đó giết chết bằng nhiệt, acid, formalin, phenol hoặc các cách khác sao cho kháng nguyên bề mặt của chúng vẫn được giữ lại, rồi được chế thành thuốc tiêm. Loại vaccine này từ vi khuẩn đã được sản xuất với một số lượng lớn, tuy nhiên ngày nay ý nghĩa của chúng phần nào bị giảm sút, một phần vì sự khác biệt về tính kháng nguyên của nhiều vi khuẩn, một phần vì khả năng điều trị về kháng sinh hiện nay rất lớn. Ngay cả trong việc nuôi cấy vi khuẩn để sản xuất vaccine cũng phải thay đổi phương pháp nuôi liên tục đã được sử dụng.

2.4.3. Sản xuất vaccine nhược độc (attenuated vaccine).

Là loại vaccine chứa tác nhân gây bệnh còn sống, nhưng đã bị làm giảm độc lực, không còn đủ sức gây bệnh. Để sản xuất loại vaccine nhược độc người ta dùng phương pháp tiếp truyền nuôi cấy trong điều kiện bất lợi để giảm bớt độc lực. Trong các vật chủ không thích hợp qua nhiều thế hệ (có thể hàng trăm thế hệ), làm cho vi sinh vật có những biến đổi về gen để thích nghi điều kiện mới. Những biến đổi đó dẫn đến việc mất đi hoàn toàn hay giảm đến mức không còn khả năng gây bệnh, nhưng vẫn còn khả năng kích thích miễn dịch vì chúng vẫn còn sống.

Một trong các loại vaccine nhược độc thì loại vaccine BCG (Bacillus-Calmette- Guérin) có ý nghĩa rất lớn. vaccine này được sản xuất từ một chủng vi sinh vật là *Mycrobacterium tuberculosis v. bovis* đã được Calmette, một học trò của Paster và Guérin nuôi qua 230 lần cấy chuyển trên môi trường mật bò để làm mất hoạt tính. Để sản xuất loại vaccine này người ta dùng cả phương pháp bề mặt lẫn phương pháp chìm. Trong hầu hết các trường hợp nuôi cấy chìm hiện nay người ta dùng glycerin (2-10%) làm nguồn carbon, Tween 80 (0,1-2%), L-asparagine và dung dịch albumin (5%) làm nguồn nitrogen và các muối dinh dưỡng thông thường khác. Sau đó điều chỉnh để đạt nồng độ tế bào 5×10^7 /ml và làm đông khô với một dung dịch chứa 2% Natri glutamate; 8% dextran; 7,5 saccharose và 0,1% hydroxylamine. Khi tiêm phòng sản phẩm sẽ được pha loãng ra.

Loại vaccine này thường có khả năng kích thích cho miễn dịch lâu bền (1-2 năm), hình thành đầy đủ các loại hình miễn dịch và tiện lợi khi sử dụng. Tuy nhiên, vì là còn sống, nên chúng có khả năng lại độc (pathogenicity inversion), đặc biệt thường gây phản ứng vaccine với cơ thể yếu.

2.4.4. Sản xuất vaccine tái tổ hợp (Recombinant Vaccines).

Vaccine tái tổ hợp gene hay còn gọi là vaccine dưới đơn vị, đây là loại vaccine thế hệ mới được tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền. Vaccine tái tổ

hợp gene được sản xuất dựa trên nguyên tắc chuyển gene kháng nguyên của đối tượng gây bệnh vào một vi sinh vật nào đó. Vi sinh vật này sinh sôi nảy nở nhanh chóng và sản xuất ra các phân tử kháng nguyên. Tách chiết, tinh sạch các kháng nguyên làm vaccine dưới đơn vị.

Quy trình sản xuất vaccine tái tổ hợp gene nhìn chung phức tạp, nhưng nguyên tắc chung đều trải qua các bước sau đây:

- Tuyển chọn nguồn gene có biểu hiện kháng nguyên chính của virus (kháng nguyên bề mặt hoặc kháng nguyên lõi), thao tác cắt gene.

- Chọn vector thích hợp (plasmide), cắt plasmide và gắn gene kháng nguyên vào để tạo vector tái tổ hợp.

- Chọn vật chủ thích hợp để đưa vector vào. Vật chủ có nhiều loại như vi khuẩn, nấm men, virus (chẳng hạn *E. coli*, *S. cerevisiae*, *adenovirus*, virus đậu, *baculovirus v.v...*).

- Nuôi cấy, lên men.

- + Nếu vi khuẩn, nấm men thì nuôi cấy trong môi trường để nhân lên lượng lớn kháng nguyên.

- + Nếu là virus thì phải nhân lên trong tế bào động vật hay thực vật thích hợp.

- Tách chiết và làm sạch các protein kháng nguyên bằng phương pháp hoá sinh thông thường.

- Tạo vaccine phân tử dạng chùng, dạng tiêm.

- Tiến hành thử hiệu lực trên động vật và trên lâm sàng.

Hiệu lực của vaccine phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Bên cạnh bản chất kháng nguyên mạnh, yếu thì con đường đưa vaccine vào cơ thể cũng rất quan trọng: da hay niêm mạc, tiêm hay chùng, thời gian sử dụng vaccine, lần số tiêm chùng và khoảng cách giữa các lần, liều lượng dùng, tuổi dùng và theo dõi độ dài miễn dịch. Nếu là miễn dịch dịch thể thử vaccine bằng phản ứng trung hoà kháng nguyên kháng thể, ELISA, miễn dịch huỳnh quang, miễn dịch phóng xạ. Nếu là miễn dịch tế bào thì phát hiện đo lường các tế bào T, B và phát hiện các yếu tố T và B.

2.4.5. Một số mô hình tái tổ hợp gene trong sản xuất vaccine ứng dụng trong nông nghiệp.

Hiện nay đã có một số mô hình tái tổ hợp gene trong sản xuất vaccine cho cây trồng, chẳng hạn: người ta biết vi khuẩn *Bacillus thuringensis* (Bt) sản xuất ra protein chống côn trùng, ngày nay người ta đã tách riêng ra được các gene đó để gắn vào *Agrobacterium tumefaciens* rồi dùng súng bắn gene chuyển vào khoai tây, bông... để phòng bệnh cho

cây; Hay Roundup là một trong những thuốc diệt cỏ đại tốt. Roundup diệt được cỏ dại chính là nhờ nó khả năng ức chế hoạt động của một enzyme tham gia tạo amino acid thơm cần cho sự tăng trưởng của cỏ dại đó. Người ta nghiên cứu cấu trúc gene này và lắp vào vi khuẩn nào đó rồi tìm cách đưa vào cây đồng nội để chúng tự sản xuất ra Roundup để trừ cỏ dại. Hơn nữa Roundup lại thoái hoá nhanh chóng trong môi trường để trở thành thành phần tự nhiên vô hại.

Đối với động vật, hiện nay nhiều loại bệnh do nguyên nhân từ virus cũng đã có nhiều vaccine được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp gene như: bệnh Newcastle đã có vaccine virus đậu tái tổ hợp, bệnh Influenza đã có vaccine virus pox tái tổ hợp, bệnh virus bạch cầu bò đã có virus đậu tái tổ hợp v.v...

III. Sản xuất protein nguồn thực vật

3.1. Cơ sở hoá sinh và ý nghĩa của nuôi cấy mô và tế bào

3.1.1. Cơ sở hoá sinh và di truyền

Đầu thế kỷ XIX các nhà khoa học đã chính thức xây dựng học thuyết tế bào, họ cho rằng trong cơ thể đa bào các tế bào có thể tồn tại độc lập và riêng biệt. Đến năm 1962, Haberlandt là người đầu tiên đề xướng ra phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật để chứng minh cho tính toàn thể của tế bào. Theo ông mỗi một tế bào bất kỳ của cơ thể sinh vật đa bào đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh, nghĩa là: Mỗi tế bào riêng rẽ của một cơ thể đa bào đều chứa đầy đủ toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết của cả sinh vật đó và gặp điều kiện thích hợp thì mỗi tế bào có thể phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh.

Điều kiện thích hợp đó chính là các yếu tố trong môi trường gồm:

- Các loại muối khoáng.

Có nhiều loại muối khoáng khác nhau cần thiết cho đời sống thực vật được cung cấp dưới dạng đa lượng như P, Ca, K, Mg, N, S và dạng vi lượng như Fe, Cu, Zn, Mn, Mo v.v... Chúng đều là những tác nhân quan trọng tham gia và các phản ứng hoá học trong quá trình trao đổi chất

- Nguồn carbon và nguồn năng lượng.

Mô và tế thực vật chủ yếu sống theo phương thức dị dưỡng (mặc dù trong một số trường hợp chúng có thể sống bán dị dưỡng nhờ điều kiện ánh sáng nhân tạo để lục lạp quang hợp tạo ra nguồn carbon), vì vậy việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn carbon là điều kiện bắt buộc. Ngoài việc cung cấp năng lượng, nguồn carbon là khung chính cho sự tổng hợp các chất cần thiết trong quá hoạt động sống.

- Các phụ gia hữu cơ.

Đây là các loại như vitamin được sử dụng để xúc tác cho các phản ứng hoá học, chúng có thể được tổng hợp trong tế bào nuôi cấy nhưng lượng thường không đủ do đó phải bổ sung từ ngoài vào. Các amino acid có thể được tổng hợp trong tế bào thực vật, nhưng việc bổ sung thêm các amino acid còn có tác dụng kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy protoblast và để hình thành các dòng tế bào. Ngoài ra còn có một số phụ gia hữu cơ khác đều quan trọng cho quá trình trao đổi chất.

- Các chất điều khiển sinh trưởng.

Trong nuôi cấy mô bà tế bào thực vật thành phần quan trọng nhất là các chất điều khiển sinh trưởng. Người ta thấy rằng có tất cả 4 nhóm chất điều khiển sinh trưởng chung đó là auxin, cytokinin, gibberellin và acid abscisic. Sự sinh trưởng và phát triển của mô nuôi cấy khi chỉ bổ sung một hoặc một số chất thuộc 4 nhóm trên vào môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ của các loại hormon cần cho sự tạo một cơ quan nào đó rất khác nhau. Đó chính là cơ sở có ý nghĩa rất quan trọng cho mục đích thu nhận chế phẩm mong muốn trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật bằng việc thay đổi hợp lý các điều kiện môi trường.

Để tách chiết protein từ thực vật cần chú ý rằng: tế bào thực vật, có thành tế bào được cấu tạo bởi hydratcarbon, lignin bao quanh màng sinh chất. Các sợi nhỏ cellulose bao quanh màng nguyên sinh chất theo dạng lưới làm cho tế bào có độ dai bền nhưng có kích thước lớn (đối với tế bào nuôi cấy mô có kích thước khoảng 100 μm). Vì vậy việc nghiền tế bào trong nitrogen lỏng sẽ dễ dàng thu được các phân tử peptide chứa trong không bào. Sau khi thu nhận bằng ly tâm 10.000 vòng /phút, ở 4°C trong 10 phút, dịch chiết thô được chiết với thể tích tương đương dung dịch đệm Tris-HCl 0,1M; pH= 7,2- 7,5. Sau đó peptide được tinh chế theo các phương pháp tinh chế protein hiện đang sử dụng trong các phòng thí nghiệm (chương 5).

3.1.2. Ý nghĩa của nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Việc tách chiết nguồn protein trong tự nhiên bằng phương pháp hoá, lý (dựa trên sự phát triển nhanh chóng của kỹ thuật hoá học hiện đại) để phục vụ cho nhu cầu đời sống con người ngày càng phát triển. Thực vật bậc cao vẫn là nguồn cung cấp có các hợp chất có giá trị cho nhiều mục đích khác nhau, đặc biệt trong lĩnh vực dược phẩm. Tuy nhiên trong những năm gần đây nguồn thực vật tự nhiên ngày càng bị cạn kiệt do sự khai thác ồ ạt của con người. Sản lượng khai thác không ổn định do hậu quả của một số yếu tố như: điều kiện tự nhiên không thuận lợi, chi phí lao động ngày càng cao, khó khăn về kỹ thuật và kinh tế trong trồng trọt v.v...

Phương pháp nuôi cấy mô và tế bào sẽ giúp để giải quyết những vấn đề đó.

Mặt khác sự chọn dòng tế bào có thể tạo ra dòng có khả năng tích lũy cao hợp chất mong muốn. Chẳng hạn như công trình của Zenk và cộng sự (1978) nghiên cứu hàm lượng anthraquinon (một loại sắc tố) trong tế bào của cây nhàu (*Morinda citrifolia*) cho biết rằng đã nâng được hàm lượng của chất này lên gấp 20 lần so với rễ là cơ quan tích trữ chính của hợp chất nói trên. Cũng như vậy, thông báo của tập đoàn công nghiệp hoá dầu Mitsui (Nhật bản) năm 1983 về việc sản xuất được chất shikonin là vị thuốc dân tộc có khả năng chống viêm. Bằng phương pháp nuôi cấy tế bào trong thùng lên men loại nhỏ 750 lít, họ đã chọn được dòng tế bào có khả năng tích lũy shikonin nhiều hơn gấp 10 lần với nguồn nguyên liệu tự nhiên ở cây shikokon (*Lithospermum erythozhion*). Người ta đã khẳng định rằng khi so sánh hàm lượng các chất trong những tế bào chuyên sản sinh ra chất đó, thì hàm lượng các chất đó trong tế bào nuôi cấy vẫn lớn hơn từ 2-4 lần. (Zenk, 1978)

Kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật còn cho phép điều khiển tế bào tạo ra chất quan tâm. Chẳng hạn có thể điều chỉnh chất kích thích sinh trưởng hoặc nhờ kỹ thuật tái tổ hợp DNA, để chuyển gene mã hoá chất mong muốn vào thực vật tạo ra cây biến đổi gen. Gần đây có rất nhiều công trình công bố kết quả sự điều khiển tế bào thực vật sản xuất protein mong muốn, trong đó chủ yếu hầu hết các công trình đều tập trung vào việc sản xuất vaccine và những protein ứng dụng trong lĩnh vực y học.

Ngoài ra nuôi cấy mô và tế bào thực vật còn loại bỏ được sự nhiễm virus gây bệnh, ngăn chặn sự ảnh hưởng chất lượng của protein quan tâm sau khi được tách chiết.

3.2. Các thành tựu sản xuất protein từ thực vật trên thế giới

Từ lâu, trên thế giới thường thu nhận protein thực vật bằng con đường chiết xuất từ các nguồn tự nhiên. Xác định được hướng đi đó sẽ không tồn tại lâu dài, các nhà khoa học đã tìm ra nguồn nguyên liệu mới dựa trên cơ sở nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Ngày nay kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào đã được triển khai ngày càng tiến bộ ở các nước công nghiệp tiên tiến. Một loạt các công ty trên thế giới như: công ty Escagenetics (California, Mỹ); hãng Phytton Catalitic (New York, Mỹ) và rất nhiều công ty khác đã công bố thành tựu sản xuất các dược chất dựa trên kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào.

Theo một công bố gần đây nhất loại thuốc chống HIV và những bệnh khác như bệnh dại có thể được bào chế từ hoa màu biến đổi gene, hay nói cách khác người ta đang biến đổi một loại cây để nó có thể trở

thành một loại thuốc trị bệnh. Các công ty dược phẩm lớn đang nghiên cứu khả năng đó, và đã chi hàng triệu đô la để nghiên cứu những tân dược này.

Theo thông báo của phòng thí nghiệm ở Arizona (là nơi đang đi đầu về nghiên cứu nông dược), giám đốc phòng thí nghiệm cho biết điều đơn giản trong sử dụng thực vật biến đổi gene là khi chuyển cho cây một gene, cây đó trở thành một hệ thống sản xuất và chúng ta sẽ có được một hệ thống sản xuất chi phí thấp. Tại đây người ta đang sấy lạnh những miếng cà chua - một loại cây được trồng thử nghiệm, mạng một loại gen chống loại ung thư cổ tử cung - một phần trong công nghệ chế biến thực phẩm tương đối đơn giản để chuyển từ thực vật sang dược phẩm. Khi ra khỏi máy sấy lạnh, chúng nhẹ như polystyrene, nhưng vẫn mang đầy mùi cà chua và vẫn giữ được thành phần hoạt chất. Sau đó, chúng được nghiền thành bột và đóng viên.

Mỗi loại thuốc viên có nguồn gốc thực vật khác nhau có thể trị những bệnh khác nhau. Những trái cà chua đỏ thậm chí mang vaccine trị tiêu chảy, cây thuốc lá có thể chống lại virus AIDS. Tất cả sẽ có giá thành rẻ hơn các loại dược phẩm hiện đại hiện nay.

IV. Sản xuất protein từ nguồn động vật

4.1. Nguyên tắc và điều kiện để sản xuất protein

Việc tách chiết để sản xuất protein từ nguồn động vật tùy theo mục đích để lựa chọn phần mô có sự tích lũy hợp chất đó lớn nhất, chẳng hạn sản xuất insulin thường tách chiết từ tuyến tụy, các enzyme tiêu hoá như pepsin, tripsin, được từ niêm mạc dạ dày v.v... việc tách chiết các hợp chất này tốt nhất toàn bộ quá trình tiến hành trong phòng lạnh và đều thường dựa trên nguyên tắc và các bước chung sau đây:

- Nghiền và chiết rút bằng đệm có pH thích hợp.
- Ly tâm thu dịch lỏng và loại bỏ phần bã.
- Kết tủa dịch lỏng (có thể dùng muối hay dung môi hữu cơ).
- Ly tâm thu phần dịch nổi (phần tủa), ta được chế phẩm thô.
- Tinh sạch bằng sắc ký, để thu chế phẩm có độ tinh khiết cao.

Tuy nhiên tùy theo từng loại hợp chất mong muốn để có những thay đổi điều kiện thích hợp khi sản xuất. Ví dụ: những peptide tách từ tế bào bạch cầu trong sản xuất kháng thể đơn dòng, thường dùng các dung dịch có tính acid và gồm các bước như sau:

- Các tế bào bạch cầu được thu nhận bằng ly tâm trong điều kiện lạnh cùng với chất chống đông máu.

- Chiết bằng đệm pH=7,5-8,0 (thường là đệm Tris-HCl, nồng độ 20-50 mM, chứa 50 nM NaCl).

- Ly tâm thu phần lắng.

- Nghiền với dung dịch có tính acid (thường 15- 20mm HCl).

- Ly tâm thu dịch nổi ta được dung dịch chứa peptide.

4.2. Sản xuất kháng thể đơn dòng

4.2.1. Khái niệm về kháng thể đơn dòng.

Khi kết hợp dòng tế bào bạch cầu lymphocyte sản sinh kháng thể với một dòng tế bào ung thư sẽ tạo thành một dòng tế bào lai có tên gọi là hybridoma. Tính chất đặc biệt nhất của loại tế bào lai này là có khả năng tăng sinh vĩnh viễn, chúng đã được bất tử hoá. trong môi trường nuôi cấy và sản sinh ra một loại kháng thể được gọi là kháng thể đơn dòng. Các phân tử kháng thể này có cấu trúc hoàn toàn giống nhau, chúng được sử dụng rất đa dạng trong phân tích sinh học và chữa bệnh. Ngày nay các kháng thể đơn dòng đã được áp dụng nhiều trong chẩn đoán và điều trị y học và đã mang về những lợi nhuận lớn cho các công ty dược trên thế giới.

4.2.2. Một số lưu ý khi sản xuất kháng thể đơn dòng.

- Các kháng thể đơn dòng của chuột (lai tế bào ung thư với tế bào lymphocyte của chuột), tuy đã được dùng nhiều trong điều trị nhưng có một số nhược điểm. Đó là trong nhiều trường hợp kháng thể chống lại Ig của chuột biểu hiện trong tuần hoàn máu bệnh nhân, như vậy ngăn cản sự điều trị lâu dài.

- Kháng thể chuột có thể làm yếu hoạt hoá hệ thống bỏ thể người *in vivo* dẫn tới hậu quả gây độc trực tiếp tế bào.

Để khắc phục những nhược điểm trên ngày nay người ta phát triển sản xuất kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ người. Bởi vì các kháng thể đơn dòng người được dung nạp tốt trong các bệnh nhân. Tuy nhiên, sản xuất kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ người cũng có một số bất cập như: để sản xuất kháng thể đơn dòng của người (lai tế bào ung thư với tế bào lymphocyte của người), phải tìm được nguồn tế bào lymphocyte miễn dịch phù hợp nhằm tăng tỷ lệ bài tiết kháng thể. Kháng thể đơn dòng của loài gặm nhấm được sinh ra bởi sự lai tạo với tế bào lymphocyte của lách hay hạch lympho từ những động vật được miễn dịch nhắc lại. Nhưng những nguồn lymphocyte đó không có thể lấy được một cách bình thường ở người. Vì thế những cách đơn giản nhất là dòng tế bào lymphocyte được tách ra từ máu của những người tình nguyện đã được gây miễn dịch với chất độc uốn ván, hay từ những người đã phát triển kháng thể tuần hoàn sau bệnh nhiễm trùng, bệnh tự miễn hoặc của ung thư. Những kháng thể

đặc hiệu có thể được tách ra từ máu như những kháng thể có mặt trong tuần hoàn.

Mặc dù lymphocyte có thể kiếm được chủ yếu là từ máu, nhưng cũng có thể thu được những tế bào miễn dịch đó từ các cơ quan khác như hạch lymphocyte, amidan, ung thư tủy xương và lách. Có một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng, lymphocyte được lấy từ những cơ quan rắn như hạch lymphocyte, amidan có thể dễ hợp nhất lại hơn so với lymphocyte từ máu. Ngoài ra họ còn cho biết thêm các lymphocyte từ máu chuột thì không hợp nhất với tế bào lách như là với tế bào u tủy xương (myeloma) chuột.

4.2.3. Làm giàu đối với các lymphocyte đặc hiệu

Hiệu quả của quá trình bắt tử của tế bào phụ thuộc vào tỷ lệ bài tiết kháng thể đặc hiệu, vì vậy trước hết cần phải làm giàu các tế bào lymphocyte đặc hiệu kháng nguyên. Có ba phương pháp làm giàu lymphocyte đặc hiệu kháng nguyên sau đây:

a) Hồng cầu phủ kháng nguyên phản ứng với kháng thể đặc hiệu để tạo thành thể hoa hồng và thể này được tách ra bằng ly tâm theo gradien nồng độ.

b) Các kháng nguyên được đánh dấu bằng chất huỳnh quang phản ứng với kháng thể trên tế bào B. Rồi các tế bào liên kết kháng nguyên có thể tách ra bằng máy FACS (fluorescence Activated Cell Sorter).

c) Các tế bào B sản xuất kháng thể dính vào những đĩa plastic phủ kháng nguyên và rồi được tách ra dễ dàng.

4.2.4. Các phương pháp làm bất tử tế bào.

Có ba phương pháp để làm cho các tế bào lymphocyte đặc hiệu kháng nguyên trở thành bất tử:

a) Tải nạp (transfection) với tế bào ung thư để thành dòng tế bào biến hình.

b) Lai (hybridization) lymphocyte với tế bào ung thư thích hợp (myeloma) để thành dạng lai (hybridoma).

c) Sự biến hình kéo dài theo nhiễm virus Epstein Barr (EBV) để thành dòng tế bào nguyên bào lympho (lymphoblastoid). Rồi các tế bào đó được lai để trở thành hybridoma.

Sự lai tạo là hợp nhất các tế bào lymphocyte miễn dịch với các tế bào ung thư lympho để tạo ra các tế bào này tiếp tục bài tiết các kháng thể, đồng thời lại bất tử vì là tế bào chứa gene ung thư. Tỷ lệ hợp nhất tế bào người thì thấp, ở mức từ $0,08 \times 10^{-7}$ tới 60×10^{-7} . Trong khi đó tỷ lệ lai tạo

của lymphocyte chuột là từ 30×10^{-7} tới 60×10^{-7} . Tỷ lệ lai tạo thấp do tính không bền của các tế bào lai, mà các tế bào lai đó chứa một lượng lớn nhiễm sắc thể gấp 2 hoặc 3 lần bình thường. Thông tin di truyền cho tính đặc hiệu kháng thể nằm ít nhất ở hai nhiễm sắc thể tương đồng, cả hai của chúng đều cần có mặt trong nhân và được biểu hiện bởi tế bào sản xuất kháng thể và bài tiết liên tục. Sự mất nhiễm sắc thể tương ứng hay mất sự biểu hiện của chúng có thể dẫn đến tế bào bài tiết sẽ trở thành không bài tiết.

Một trong những giai đoạn đầu tiên và là chủ yếu là chọn lọc thuần hoá tế bào ở giai đoạn rất sớm. Sự thuần hoá được tiến hành từ những tế bào đơn giản, nhưng nhiều tế bào bài tiết kháng thể thì không lớn lên từ tế bào đơn giản, do đó những tế bào nuôi khác nhau và những yếu tố tăng trưởng thường được đưa thêm vào nuôi cấy để thuần hoá trong giai đoạn sớm của sự lớn lên của tế bào. Sự thuần hoá thường được nhắc lại cho đến khi chúng lớn lên và bài tiết được kháng thể đặc hiệu. Vì ở giai đoạn này nó thường được coi là đã tạo được dòng tế bào bền. Song sự thuần hoá vẫn cần được nhắc lại.

Ngược lại với hiệu quả thấp của sự hợp nhất tế bào người, sự nhiễm và biến dạng của các lymphocyte bởi virus Epstein Barr (EBV) để tạo thành tế bào lymphoblast xảy ra ở tần số cao 1×10^{-1} . EBV là một virus herpes làm nhiễm trùng các tế bào lymphocyte B gây nên bệnh viêm sốt hạch (mononucleosis). Hầu hết những người trưởng thành ở thế giới phương Tây đã biểu hiện EBV và chúng có một quần thể lymphocyte tuần hoàn có thể ngăn cản sự nhiễm EBV tiếp tục.

Kỹ thuật hybridoma-EBV được kết cấu bởi một dòng nguyên bào lymphoblast (KB4) đã được phát triển với sự nhạy cảm HAT (môi trường lựa chọn có chứa Hypoxanthin, Aminopterin và Thymidin) và kháng ouabain lai với dòng sản xuất kháng thể.

Một hướng khác là dùng những đoạn DNA hoặc là của tế bào ung thư hoặc là của virus để gây ra sự hình thành những dòng tế bào bị biến hình từ những tế bào lympho bài tiết kháng thể. Tuy nhiên kỹ thuật này được coi như là một sự truyền nhiễm nên không chắc chắn và tế bào được truyền nhiễm thì lớn lên chậm hơn.

4.2.5. Sử dụng hợp các thành viên lai với nhau và phương pháp lựa chọn tế bào lai.

Sự lai giữa tế bào của người với nhau gặp trở ngại lớn do thiếu một dòng tế bào thành viên phù hợp. Trong hệ thống gặm nhấm, sự nuôi cấy các tế bào myeloma tức là những tế bào ung thư được dẫn ra từ các

lymphocyte bài tiết kháng thể (tế bào plasma) thì có thể hoạt động như là một thành viên trong quá trình hợp nhất này.

Ngược lại, myeloma của người khó được xác định trong nuôi cấy và những dòng tế bào có những dấu hiệu kháng thuốc thì thích hợp cho lựa chọn để sàng lọc các tế bào lai. Các nguyên bào lympho (lymphoblast) cũng được dùng như là thành viên trong quá trình hợp nhất.

Đã có những công bố nghiên cứu so sánh về tần suất lai tạo giữa lymphocyte của người với các dòng tế bào khác và theo dõi tính bền của chúng cho biết rằng: myeloma của chuột (NS-1) đã hợp nhất với tần suất cao nhất và hướng kém bền hơn là các tế bào lai giữa người với người. Họ cũng đã tạo ra các tế bào lai giữa người và chuột thành công và đã thu được các kháng thể đặc hiệu.

Vấn đề là tìm kiếm tế bào thành viên thích hợp để hợp nhất với lymphocyte người là một hướng mới. Các tế bào lai được gọi là heteromyeloma đã được xây dựng giữa myeloma của chuột và người. Các tế bào đó không bài tiết Ig của chuột hoặc người và chúng sẵn sàng hợp nhất với tế bào lymphocyte của người để hình thành tế bào lai sản xuất kháng thể bền. Song cho đến nay, heteromyeloma vẫn chưa được đưa đến các phòng thí nghiệm khác để thử nghiệm.

Phương pháp lựa chọn tế bào lai sau khi hợp nhất như sau: Sau các bước kỹ thuật lai tạo, môi trường nuôi cấy chứa hỗn hợp các tế bào lympho chưa hợp nhất và các tế bào lai. Các tế bào lai giữa myeloma và lymphocyte cần phải được chọn ra để nuôi cấy trên môi trường HAT. Nói chung sự nuôi cấy dựa trên nguyên tắc thiếu enzyme dẫn đến làm cho tế bào nhạy cảm với chất đối kháng của aminopterin và acid folic. Chỉ có những tế bào lai giữa myeloma và lymphocyte có khả năng sử dụng hypoxanthin cung cấp trong môi trường HAT.

Tóm lại mặc dù còn nhiều hạn chế nhưng hiện tại đã có nhiều loại kháng thể đơn dòng hiện đang được sử dụng để chẩn đoán và điều trị nhiều loại bệnh tật (bảng 6.1). Trong một tương lai không xa nữa với nhiều nghiên cứu cải tiến trong lĩnh vực công nghệ sinh học, chúng ta hy vọng rằng: sản xuất kháng thể đơn dòng người hay gặm nhấm có giá thành rẻ để cung cấp cho điều trị các bệnh hiểm nghèo như ung thư và không chế được sự trả lời miễn dịch không mong muốn thường xảy ra trong việc ghép cơ quan hay trong bệnh tự miễn thấp khớp.

4.3. Sản xuất các hormon, enzyme và protein khác

4.3.1. Sản xuất bằng tách chiết trong tự nhiên.

Các hormone, enzyme và những protein có hoạt tính sinh học khác trong tự nhiên được bài tiết và tích lũy trong các mô, tế bào rất khác nhau

Bảng: 6.1 Một số kháng thể đơn dòng đang được sử dụng trong y học

Nguồn xuất xứ	Loại kháng thể
Lai giữa tế bào người và chuột	- Độc tố uốn ván. - Virus sởi - Ung thư phổi - Ung thư vú
Lai giữa tế bào người và người	- Virus sởi - Dinitrochloronbenzene - Độc tố uốn ván - Glioma
Các biến dạng EBV (EBV-transfections)	- Rhesus D - Độc tố uốn ván - Kháng nguyên bề mặt vi khuẩn B - Cytomegalovirus - Chlamydia trachomatis - Virus cúm - Melanom
Lai tại EBV(EBV hybrids)	- Độc tố uốn ván

phụ thuộc vào chức năng riêng biệt của nó. Vì vậy, để thu nhận các loại hormone, enzyme hay protein khác nhau, người ta sử dụng các mô khác nhau để tách chiết và tinh sạch chúng. Ví dụ: để sản xuất hormone tăng trưởng người (HGH- Human Growth Hormone) hay hormone kích thích vỏ thượng thận (ACTH- Adrenocorticotropic Hormone) và kích thích tố (FSH- Follicle Stimulating Hormone), người ta tách chiết từ tuyến yên của người chết; insulin, glucagon và somatostatin, được trích ra từ tuyến tụy của bò, heo; hormone erythropoietin, angiotensin-25-hydrogenxy-cholecalciferon, được trích ra từ thận, các enzyme tiêu hoá như protease, lipase, amilase và ribonuclease, được trích ra từ tuyến tụy, màng nhầy dạ dày v.v...

Việc tách chiết và tinh sạch hormone, enzyme và các loại protein có hoạt tính sinh học gồm các bước và phương pháp tách chiết và tinh

sạch các chất trong tế bào động vật bình thường đã được trình bày ở trên. Tuy nhiên, các hormon và các protein có hoạt tính sinh học khác việc tách chiết trong tự nhiên thường chỉ thu nhận được một lượng nhỏ, không đáp ứng được nhu cầu đòi hỏi trong chữa bệnh. Mặt khác các hormon và các protein đó tách chiết ở người và động vật thường gây dị ứng hoặc nhiễm các bệnh của virus v.v... Để khắc phục một số nhược điểm đó ngày nay người ta phát triển mạnh theo hướng sản xuất hormon và các protein tái tổ hợp DNA.

4.3.2. Sản xuất hormon, enzyme và protein động vật bằng công nghệ gene.

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều loại hormon, enzyme và các loại protein quan trọng khác, đặc biệt các loại protein ứng dụng trong y học để chẩn đoán và điều trị đã tung ra thị trường (bảng 6.2), nhiều nhà sản xuất đã thu được hàng chục triệu đô la mỗi năm nhờ con đường sản xuất hormon bằng DNA tái tổ hợp. Ngoài kháng thể đơn dòng, các vaccine, các tế bào động vật còn được ứng dụng rộng rãi trong việc sản xuất các hormon trong điều trị cho người và động vật.

Bảng: 6.2 Các hormon và protein điều trị được sản xuất từ tế bào động vật

Số	Các hormon và protein
1	Hormon sinh trưởng của người
2	Hormon sinh sản
3	Yếu tố VIII
4	Erythropoetin
5	Các yếu tố đông máu
6	Chất hoạt hoá plasminogen-mô (tPA)
7	Kháng thể đơn dòng
8	Vaccine viêm gan B
9	Alpha-interferon

a) Các bước sản xuất hormon tái tổ hợp DNA trong tế bào động vật.

Nhìn chung các bước để sản xuất hormon tái tổ hợp trong tế bào động vật đều gồm những bước chính tương tự như sản xuất các loại protein tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn. Sự khác biệt lớn nhất trong sản xuất protein ở tế bào động vật so với ở tế bào vi khuẩn là: thay vì tế bào vi

khuẩn là nơi sản xuất protein thì ở đây là protein được sản xuất trong tế bào động vật, và chi tiết hơn gồm những bước chính như sau.

- Tuyển chọn hệ biểu hiện thích hợp để biểu hiện gene.
- Dựa vào trình tự gene mã hoá protein để thiết kế các đoạn môi để nhân gene. Tổng hợp môi.
- Chuẩn bị DNA khuôn để nhân gene.
- Nhân gene bằng PCR từ DNA hệ gene của vi khuẩn hoặc từ ngân hàng cDNA, nhưng tốt nhất là nhân gene trực tiếp từ chính plasmid mang gene đã từng dùng dùng để đọc trình tự gene đó.
- Đưa gene vào vector tách dòng và biến nạp vào *E. coli* để khuếch đại dòng gene.
- Tách plasmid từ các thể biến nạp *E. coli* kiểm tra gene trong vector tách dòng bằng enzyme hạn chế.
- Đưa gene vào vector biểu hiện và biến nạp vào *E. coli*.
- Tách plasmid từ các thể biến nạp trong *E. coli* và kiểm tra gene, đặc biệt là chiều dài của gene trong vector biểu hiện. Gen cần phải nằm đúng chiều promotor.
- Biến nạp vector biểu hiện có mang gene biểu hiện vào tế bào động vật.

- Kiểm tra sự biểu hiện.
- Tách, tinh sạch protein.

b) Một số đặc điểm cần chú ý khi sản xuất hormon và các loại protein bằng DNA tái tổ hợp trên tế bào động vật.

Việc sản xuất protein nói chung và hormon nói riêng trong tế bào động vật có một số ưu điểm hơn so với hệ thống tế bào vi khuẩn hay nấm men. Các tế bào động vật có hệ thống cải biến sau dịch mã như: glycosyl hoá, phosphoryl hoá, amin hoá và sự cắt bỏ từ các preprotein, tập hợp các tiểu đơn vị v.v... Hơn nữa, môi trường khử của vi khuẩn *E. coli* không dẫn đến hình thành cầu disulfua mà chỉ tìm thấy ở tế bào động vật. Sự thiếu những biến đổi thích hợp là ảnh hưởng sâu sắc đến cấu hình và tính hoà tan của protein. Trong nhiều biến đổi ở một số trường hợp biểu hiện ở *E. coli* tích tụ những dạng không hoà tan và mất hoạt tính sinh học (cũng có một số trường hợp sự biến đổi chỉ xảy ra ở hoạt tính sinh học), chúng có thể làm ảnh hưởng ít nhiều đến bản chất kháng nguyên và lý tính của protein. Trong khi đó một số protein, những biến đổi thứ cấp chính xác thì đòi hỏi một cách tuyệt đối cho chức phận của phân tử. Tóm lại, sự gấp khúc protein, sự tập hợp các tiểu đơn vị và sự bài tiết chúng là những lý do

cộng thêm để chúng ta hiểu tại sao phải bắt buộc dùng những tế bào động vật trong sản xuất các hormon và những protein có hoạt tính sinh học.

Một vector tế bào động vật điển hình gồm có ba thành phần chính:

- Thành phần 1: Sự giải mã trình tự DNA của vi khuẩn cho phép truyền bá và sản xuất DNA vector trong vi khuẩn trước khi gây nhiễm vào tế bào động vật.

- Thành phần 2: Vùng vector tế bào động vật chứa những đoạn trình tự, mà những đoạn đó cho phép lựa chọn những tế bào được gây nhiễm dậy lên thường xuyên từ 10^3 - 10^6 . Thêm vào đó, vùng này có thể chứa những đoạn trình tự được đòi hỏi để duy trì và phóng đại một lượng lớn số bản copy của vector.

- Thành phần 3: Vùng thứ ba gồm những đoạn trình tự mã hoá hormon hay protein cần sản xuất cùng với những đoạn điều hoà (promotor), tín hiệu thêm như poly A, introns v.v...

Nhiều vector dùng trong tế bào động vật đòi hỏi để duy trì và phóng đại được mang đến từ các nguồn virus động vật loại DNA như SV 40, polyoma, papiloma bovin (PBV) và Epstein-Barr. Tất cả chúng đều có bản chất làm biến tính di truyền. Thường những đoạn trình tự làm điều hoà gene mong muốn cũng được dẫn ra từ các virus. Song vấn đề đó cũng có thể tập hợp các vector không có yếu tố virus, bởi vì bao gồm những yếu tố kiểm tra tế bào như hệ thống phóng đại được dựa trên enzyme reductase dihydrofolate và các hệ thống khác. Tất cả các vector tế bào động vật được thiết kế đến nay đều dùng những dòng tế bào xác định làm vật chủ.

c) Những phương pháp chuyển gene.

DNA có thể đưa vào tế bào hoặc cùng lắng tủa với calci phosphate hay liên kết với DEAE-dextran. Vào nhân, DNA được gài vào một cách ngẫu nhiên trong một hay nhiều chromosome của tế bào chủ. Dòng tế bào bền chứa DNA được sát nhập thì biểu hiện những tín hiệu chứng tỏ có sự sát nhập. Quan trọng hơn cả là sự chuyển gene dòng vector retrovirus.

Những virus RNA đó sát nhập vào vào trong nhiễm sắc thể của tế bào với những bản sao DNA của chúng. Tất cả những đoạn mã hoá protein của bộ gene virus có thể bị mất và gene được chuyển tới được đặt giữa đôi của những đoạn trình tự nhắc lại ở những đầu cuối của virus (LTRs-long terminal repeat). Nếu như DNA virus tái tổ hợp được bao gói bởi "herpes virus" (virus này cung cấp đoạn mã hoá protein cần thiết để dịch mã), thì đoạn tái tổ hợp này có thể gây nhiễm 100% các tế bào nhân. Hơn nữa vì cơ chế sát nhập bao gồm sự tái tổ hợp đặc hiệu ở LTRs nên DNA chiếm chỗ giữa chúng luôn luôn sát nhập nguyên vẹn vào bộ gene.

d) Những kỹ thuật làm tăng cường biểu hiện của gene.

Muốn tối ưu hoá sự biểu hiện của gene chuyển người ta cho rằng nên ghép thêm một đoạn biểu hiện promotor mạnh và thường cài đặt một hay nhiều chỗ trong gene của virus.

Dựa vào phương pháp này, vector của adenovirus đã được dùng để biểu hiện nhiều gene có hiệu quả trong đó có gene thymidine kinase của virus herpes và gene này cấu thành tới 10% của sản phẩm được tổng hợp mới. Retrovirus được dùng một cách tương tự để sản xuất một lượng lớn hormon và protein hữu dụng có thể dùng trong thương mại, bởi dựa vào những tín hiệu biểu hiện tốt chứa trong LTRs của chúng (bảng 6.3).

Dạng thay đổi của cấu trúc vector bao gồm phối hợp những yếu tố có chức phận từ những nguồn khác nhau. Như trong sự phối hợp với gene khởi động tăng cường (enhancer-promotor) cần cho sự phiên mã có hiệu quả hay trong sự phối hợp những đoạn thích hợp có đầu 5' tận cùng và 3' của vùng mã hoá protein để làm tăng sự dịch mã cũng như tăng tính bền truyền tin sau khi sao chép xong. Trong trường hợp này, những đơn vị sao chép hoàn toàn được hình thành bởi cung cấp những đoạn mã hoá.

Ngoài ra còn có hai yếu tố nữa có thể làm tăng cường biểu hiện của gene sát nhập vào trong bộ gene đó là:

- Vị trí sát nhập của gene.

Gene được gài vào chromosome một cách ngẫu nhiên, hoặc ở vùng trơ hoặc ở vùng hoạt động. Chẳng hạn các đoạn của β -globin đưa vào dòng tế bào erythroleukemia, chỉ được xác định được một trong số 1000 tế bào bị nhiễm là có chứa đoạn vector sát nhập locus β -globin. Do đó phải có sự sàng lọc và tách dòng có sự tái tổ hợp ở vị trí đặc biệt. Muốn làm được điều này phải có biện pháp để lựa chọn những vị trí sát nhập cho phép biểu hiện ở mức độ cao. Tuy nhiên hiện nay vấn đề này đang còn được nghiên cứu.

- Số lượng bản sao (copy)

Lượng sản phẩm thu nhận được từ những gene được chuyển thường tỷ lệ thuận với số lượng bản copy của gene có mặt, do đó làm tăng số lượng copy của những gene đã được sát nhập là rất cần thiết. Người ta thấy rằng, sự khuếch đại gene trong các tế bào nuôi cấy chịu sự tăng lượng thuốc độc thì dòng biến đổi của nó được chọn lọc để kháng thuốc hơn so với dòng tế bào hoang dại. Trong phần lớn trường hợp là do sự sản xuất quá nhiều những enzyme có khả năng ức chế tác dụng của thuốc. Sự sản xuất quá nhiều enzyme lại thường do tăng nhiều số lượng

Bảng 6.3 Một số sản phẩm tái tổ hợp biểu hiện trong tế bào động vật

Vector	Promotor	Số copy	Vật chủ	lượng	Số phân tử ($\times 10^6$)
<i>Hormon Sinh trưởng</i>					
BPV	MMT-1	10-100	C127(chuột)	6-18	200-600
Retrovirus	RSV-LTR	≈ 100	Fibroblast	15	250
<i>Chất Plasmin mô</i>					
DNA genomic	TPA	Không xác định	L. chuột	0,07	0,6
Amplifiable (DHFR)	SV 10E	Không xác định	CHO (chuột cống)	50	440
Amplifiable (DHFR)	10E Adenovirus	≈ 100	CHO (chuột cống)	60	520
<i>Kháng nguyên bề mặt viêm gan B</i>					
SV 40	SV40L/ HBV	Không xác định	CV-1 (khi)	0,125	25
SV 40	SV 40L	Không xác định	CV-1 (khi)	3,8	90
SV 40	SV 40L	Không xác định	CV-1 (khi)	0,03	0,7
SVORI	HBV ^b	5×10^5	COS	4,5	100
SVORI	HBV	Không xác định	COS	1,6-2,0	34-42
BPV	HBV ^b	50-100	C127(chuột)	0,18	3,5
BPV	HBV	20-200	C127(chuột)	0,6	13
BPV	HBV	10-100	NIH3T3 (chuột)	0,6	13
BPV	MMT-1	150-160	C127(chuột)	1-2	22-24
Retrovirus (MSV)	MSV-LTR	5-10	NIH3T3 (chuột)	0,45	10

Ghi chú: lượng = pg / tế bào / ngày

bản copy, nghĩa là có sự khuếch đại gene cấu trúc mã hoá cho enzyme. Trên thực tế người ta thấy có trên 10 trường hợp khuếch đại gene nội bào đã được biết trên tế bào động vật có vú, chẳng hạn gene mã hoá enzyme dihydrofolate reductase, asparagine synthetase v.v...chúng biểu hiện chỉ là mã hoá cho những protein ức chế thuốc. Như vậy có thể gợi ý rằng những gen chọn lọc mong muốn đưa vào sẽ sát nhập một cách ngẫu nhiên vào bộ gene sẽ có thể khuếch đại. Hơn nữa vùng DNA khuếch đại rất lớn so với vùng gene cấu trúc lựa chọn (thường là hơn 1000Kb được khuếch đại nguyên vẹn). Hiện nay để sản xuất các protein điều trị mang tính chất thương mại, người ta cũng khuếch đại với gene DHFR (xem bảng 6.3).

Các vector có số lượng cao nhất là các vector dựa trên virus SV 40 của khỉ. Một hệ thống thuận lợi bắt nguồn từ dòng tế bào thận khỉ CV-1, mà dòng này bị biến tính bởi virus SV 40 làm khiếm khuyết phần gốc sao chép. Thiếu chức phận này, DNA hợp nhất vào nhiễm sắc thể chủ ở đó nó chỉ biểu hiện chức phận gene được mã hoá của các virus là kháng nguyên T mà thôi. Các tế bào “COS” (CV-1 khuếch đại khuyết phần gốc SV 40) sẽ cho phép sao chép các plasmid vi khuẩn, chúng chứa ít nhất 228 bp của DNA SV 40 bao gồm cả phần gốc sao chép. Vector SVORI có thể sao chép với 4×10^5 copy /tế bào/ 2 ngày và biểu hiện ở mức độ cao, nhưng phần lớn vector của virus này dễ chết và tế bào bị nhiễm chỉ sống sót được 2 tuần trong nuôi cấy.

Virus động vật dùng để cấu trúc vector biểu hiện là virus papiloma của bò (BPV), sao chép theo cách thể bổ sung (episome) trong các tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) của loài gặm nhấm. Số lượng copy của nó thấp hơn SV 40, nhưng ưu điểm nhất của nó là không giết chết tế bào chủ nên các dòng tế bào bền và có thể dùng để sản xuất. Trong một số trường hợp vector BPV đã được chỉ ra là duy trì episome giống con đường của virus nguyên vẹn. Trong nhiều trường hợp khác vector BPV hợp nhất vào tế bào chủ thường như sắp đặt hàng đôi từ đầu đến cuối. Sự phối hợp giữa promotor và enhancer mạnh (như promotor I của metallothionein chuột và enhancer của BPV) đồng thời với số lượng copy cao tương đối sẽ cho sự biểu hiện cao trong các tế bào fibroblast chuột của nhiều các gene.

V. Sản xuất protein từ nguồn phế thải

Sản xuất protein từ nguồn phế thải hiện đang là vấn đề thời sự, bởi vì sử dụng nguồn phế thải ngoài ý nghĩa tạo ra các sản phẩm mong muốn dùng trong các lĩnh vực như dược phẩm, chăn nuôi, mỹ phẩm v.v...sử dụng nguồn phế thải còn có ý nghĩa to lớn trong việc xử lý ô nhiễm môi trường. Ở nước ta cũng như trên thế giới hàng ngày có hàng trăm tấn rác

thải cần được xử lý. Với ý nghĩa đó chúng tôi xin giới thiệu công nghệ sản xuất một số protein và amino acid từ nguồn phế thải.

5.1. Sản xuất cystine và các amino acid

5.1.1. Vài nét về ứng dụng của cystine.

Cystine được cấu trúc từ hai phân tử cysteine liên kết với nhau qua cầu disulfua. Gần đây người ta phát hiện thấy cystine có nhiều ứng dụng trong đời sống:

Trong dược phẩm như thuốc chống viêm gan, bảo vệ gan trong nhiễm độc kim loại nặng, chống loạn dưỡng da, chống rụng tóc, chống bệnh nghèo đạm và chống nhiễm độc thai nghén. Ngoài ra cystine còn được dùng làm thuốc chống bỏng da và viêm loét giác mạc, thuốc phòng và điều trị ung thư, thuốc bổ miễn dịch, thuốc chống xơ hoá và thấp khớp, thuốc chống phóng xạ, phòng chất độc hoá học và hàn gắn nhanh những vết thương, vết mổ v.v...

Đối với mỹ phẩm, cystine được làm thuốc trẻ hóa, thuốc sấy tóc bền, thuốc làm mượt tóc v.v...

Đối với thực phẩm cystine trở thành loại thực phẩm cao cấp, được dùng vào sữa khô, bánh mì khô và súp cao cấp.

Với ý nghĩa như vậy, cystine hiện nay trở thành thương phẩm có giá trị trên thị trường Quốc tế, đặc biệt là các nước ở Tây Âu và Nhật Bản. Riêng ở Nhật mỗi năm tiêu thụ lên tới 500 tấn cystine.

5.1.2. Công nghệ sản xuất cystine và amino acid từ nguồn phế liệu.

Trong các công nghệ phổ biến sản xuất amino acid bằng con đường vi khuẩn, nấm men, con đường tổng hợp enzyme, con đường tổng hợp hoá học, thì cystine vẫn đang được tách chiết từ nguồn nguyên liệu giàu cystine và trong năm 1980, thế giới đã sản xuất được 700 tấn dạng L-cystine. ở đây chúng tôi chỉ trình bày việc sản xuất cystine và các amino acid từ nguồn phế liệu là lông gà, lông cánh vịt lông lợn và tóc vụn, Quá trình tách chiết phải trải qua 11 công đoạn sau đây:

Công đoạn 1: Thủy phân bằng HCl ở 100°C.

Công đoạn 2: Trung hoà dịch thủy phân bằng Na₂CO₃.

Công đoạn 3: Lắng, lọc và thu tủa.

Công đoạn 4: Hoà tan tủa bằng HCl 5%, thu lấy dịch trong.

Công đoạn 5: Xử lý than hoạt tính.

Công đoạn 6: Trung hoà NaOH, thu cystine thô.

Công đoạn 7: Đến công đoạn 11 lặp lại các bước trên để thu được

cystine sạch và cuối cùng phải xác định sản phẩm bằng một trong những phương pháp khác nhau thường sử dụng trong phòng thí nghiệm.

Bằng công nghệ trên họ đã thu được hàm lượng cystine từ tóc là 6%; từ lông cánh vịt 2,3%; lông gà 3,5% và lông lợn 2,13% (tính theo hàm lượng amino acid tổng số).

5.2. Sản xuất protein đơn bào từ bã mía

Việc giải quyết nguồn thức ăn cân bằng về mặt dinh dưỡng cho người và động vật đang có ý nghĩa thời sự. Một trong những hướng có nhiều triển vọng và được đặc biệt chú ý là làm giàu protein đơn bào từ các phế liệu có nguồn gốc thực vật dùng để làm thức ăn thực vật giàu protein.

Sản xuất protein đơn bào từ bã mía nhằm nâng cao chất lượng của thức ăn gia súc, đồng thời góp phần làm giảm mức độ gây ô nhiễm môi trường và nhờ đó nâng cao hiệu quả kinh tế của ngành công nghiệp sản xuất đường mía.

Nhìn chung quy trình để sản xuất protein đơn bào từ bã mía gồm các bước tương tự như sản xuất protein đơn bào bằng vi sinh vật chỉ khác nguồn carbon ở đây là bã mía. Tuy nhiên cần chú ý một số đặc điểm sau đây:

- Thủy phân nguyên liệu thích hợp ở pH 1,5-3,0 ở nhiệt độ 121°C thời gian 30- 50 phút.

- Lên men chìm với chủng nấm men thích hợp (chủ yếu là *S. tropicalis* SK-4).

- Môi trường lên men cần bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với hàm lượng 1,0 gam/ lít và MgSO_4 hàm lượng 0,7 gam/lít.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày nguyên tắc chung, những vấn đề cần lưu ý và các bước trong quy trình sản xuất protein đơn bào
2. Nêu các bước trong sản xuất insulin và nguyên tắc một số phương pháp để sản xuất yếu tố giải phóng hormon sinh trưởng dựa trên kỹ thuật DNA tái tổ hợp.
3. Nêu một số thành tựu về sản xuất các cytokin, các chất miễn dịch và vaccine. Nguyên tắc và các bước chung trong quy trình sản xuất vaccine tái tổ hợp.
4. Trình bày cơ sở sinh hóa học và một số thành tựu trong sản xuất protein từ thực vật.

5. Trình bày nguyên tắc chung và điều kiện để sản xuất protein từ nguồn động vật.
6. Thế nào là kháng thể đơn dòng? Để sản xuất kháng thể đơn dòng cần phải lưu ý những vấn đề nào? Có những phương pháp nào để làm bất tử tế bào?
7. Có những con đường nào có thể được những protein có hoạt tính sinh học?
8. Trình bày một số thành tựu về việc sản xuất amino acid và protein từ nguồn phế thải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp. Nhà XB KH& KT Hà nội.
2. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân, 1994. Công nghệ gen và công nghệ sinh học ứng dụng trong Y-Dược học hiện đại. Nhà XB Y học.
3. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân, 1994. Chuyên đề Công nghệ gen trong sản xuất vaccine thể hệ mới ứng dụng trong Y học và nông nghiệp hiện đại. TT Tư liệu, TT KHTN& CN QG, Hà nội.
4. Đái Duy Ban, Lê Thanh Hoà, 1999. Công nghệ sinh học đối với vật nuôi và cây trồng. Nhà XB Nông nghiệp
5. Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huân, 2003. Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên sinh vật Việt nam. Nhà XB KH&KT Hà nội.
6. Phạm Anh Cường, Panfilov V.I, 1999, Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất thức ăn gia súc giàu protein đơn bào từ bã mía. Báo cáo Khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà XB KH&KT. Hà nội
7. Nguyễn Quốc Khang. 2002. năng lượng sinh học. NXB KH& KT
8. Nguyễn Hoàng Lộc. 1998. Giáo trình nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Đại học Khoa học Huế
9. Lê Ngọc Tú, 2000. Hoá sinh công nghiệp. Nhà XB KH& KT Hà nội
10. Copeland. Robert A., 2000. Enzymes; A Practical Introduction To Structure; Mechanism & Data Analysis. Willey-VCH. A John Willey & Sons, INC., Pub. 2nd ed.
11. Dennison Clive . 2002. A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, Lodon, Moscow.

12. Fersht Alan, 1998, Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3rd Rev Edit.
13. Hans U. B., 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Second English Edition Academic Press, Inc., New York San Francisco London, Vol., 4.
14. Liebler Daniel C., 2002. Introduction to proteomics. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.
15. Reseacher's Asociates, 1996. Vaccine Handbook. The national Institue of Health. Tokyo, Japan
16. Walker John M., 1996. The Protein Protocols Hand book. 2nd ed. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.
17. <http://www.ivac.com.vn/Default.aspx>