



Chương I: **PROTEIN**

Bài 1: PHẢN ỨNG BIURET XÁC ĐỊNH LIÊN KẾT PEPTID

Trong môi trường kiềm, các liên kết peptide trong protein có thể phản ứng với Cu^{2+} tạo thành phức chất màu xanh tím, tím, tím đỏ hay đỏ ở dưới dạng anion. Cường độ màu thay đổi tùy thuộc vào độ dài mạch peptide. Một số hợp chất có hai nhóm amid như Biuret, oxamid cũng cho phản ứng Biuret dương tính.

Phản ứng biure thường được ứng dụng để định lượng protein do có màu bền vững và ổn định.

❖ Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch protein trứng khoảng 1% (*Pha loãng 1 lòng trắng trứng với 15 thể tích nước cất, lọc qua vài lần vải gạc, bảo quản ở 4°C. Khi dùng pha loãng 0,1%*).
- Dung dịch gelatin 0,1% trong nước.
- Dung dịch glycin 0,1% trong nước.
- Dung dịch CuSO_4 1% trong nước.
- Dung dịch NaOH 10% trong nước.

❖ Dụng cụ:

- Ống nghiệm, giá ống nghiệm, cặp ống nghiệm
- Pipet Pasteur

❖ Cách tiến hành:

Cho vào 3 ống nghiệm đánh số:

	1	2	3
Dung dịch protein trứng 0,1% (giọt)	5		
Dung dịch gelatin 0,1% trong nước (giọt)		5	
Dung dịch glycin 0,1% trong nước (giọt)			5
Dung dịch NaOH 10% trong nước (giọt)	3	3	3
Dung dịch CuSO_4 1% trong nước (giọt)	1	1	1

Nhận xét màu sắc, giải thích các thí nghiệm.



Bài 2: BIẾN TÍNH PROTEIN

Sự biến tính của protein được ứng dụng trong các xét nghiệm lâm sàng, trong kiểm nghiệm thuốc và thực nghiệm hóa sinh như:

- Kết tủa protein trong các nguyên liệu sinh vật để tiếp tục nghiên cứu cấu trúc và tính chất sinh học của chúng.
- Định tính và định lượng protein trong các dịch chiết và dịch sinh vật (đặc biệt là phản ứng xác định protein niệu để thăm dò chức năng thận).
- Giải độc muối kim loại nặng (Hg, Cu, Pb) bằng protein (trứng, sữa) trong trường hợp cơ thể chưa kịp hấp thu hoặc có thể sử dụng trong phòng bệnh cho những người phải tiếp xúc với các hóa chất này.

Thông thường sự biến tính của protein là không thuận nghịch, nhưng trong một số trường hợp nếu loại bỏ được tác nhân gây biến tính thì protein vẫn giữ được cấu dạng và tính chất ban đầu của nó.

❖ Thuốc thử và vật liệu thí nghiệm:

- Dung dịch protein trứng không có NaCl (*Lọc lòng trắng trứng gà qua vải thưa. Trộn lẫn một thể tích lòng trắng với 15 thể tích nước cất. Trộn kỹ rồi lọc lại sẽ thu được dung dịch protein trứng khoảng 1%. Bảo quản ở 4°C*).

- Dung dịch acid acetic 1% và 10%.
- Dung dịch NaOH 10%.
- Dung dịch NaCl bão hòa
- Acid nitric đặc
- Dung dịch acid trichloroacetic 10%
- Dung dịch acid sulfosalicylic 20%
- Dung dịch CuSO_4 5% trong nước
- Dung dịch $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5% trong nước
- Ethanol 96°
- Aceton

❖ Dụng cụ:

- Ống nghiệm nhỏ
- Pipet 5 hoặc 10mL



- Pipet Pasteur
- Quả bóp cao su 1 – 2 mL
- Phễu nhỏ
- Giấy lọc

2.1. Biến tính protein bằng nhiệt độ

Protein bị kết tủa khi đun sôi trong môi trường trung tính hay acid yếu vì bị mất lớp áo nước và vì phần lớn protein có $pI \approx 5$ (trừ protamin và histon có chứa nhiều acid amin kiềm nên có $pI \approx 8$), nếu cho thêm chất điện giải cũng làm trung hòa điện tích gây tủa protein dễ dàng hơn.

❖ **Tiến hành:**

Dùng 5 ống nghiệm ghi số:

Thuốc thử	1	2	3	4	5
Protein trứng không có NaCl (mL)	1	1	1	1	1
CH ₃ COOH 1% (giọt)		2			
CH ₃ COOH 10 % (giọt)			5	5	
Dung dịch NaCl bão hòa (giọt)				4	
Dung dịch NaOH 10% (giọt)					4

Đun sôi ống nghiệm và nhận xét sự kết tủa.

2.2. Biến tính protein bằng acid vô cơ mạnh

Dưới tác dụng của acid vô cơ đậm đặc, protein bị kết tủa. Tủa sẽ hòa tan trở lại khi cho thừa acid, trừ acid nitric. Vì vậy HNO₃ được sử dụng để định tính protein trong nước tiểu.

❖ **Tiến hành:**

Tủa protein bằng HNO₃ và H₂SO₄.



Dùng 2 ống nghiệm:

Thuốc thử	1	2
Dung dịch protein 0,1% (giọt)	5	5
HNO ₃ đặc (giọt) nhỏ từ từ vào thành ống để nghiêng	5	
H ₂ SO ₄ đặc (giọt) nhỏ từ từ vào thành ống để nghiêng		5

Xuất hiện tủa trắng của protein ở mặt ngăn cách giữa hai lớp chất lỏng. Sau đó lắc nhẹ ống nghiệm. Thêm 5 giọt acid mỗi loại vào 2 ống tương ứng.

Nhận xét kết quả ở 2 ống nghiệm.

2.3. Biến tính protein bằng acid hữu cơ:

Phản ứng kết tủa protein bằng acid hữu cơ xảy ra không thuận nghịch. Trong labo hóa sinh thường dùng:

- Acid trichloroacetic (CCl₃COOH) để kết tủa protein nhưng không kết tủa peptid và acid amin nên được dùng để khử tạp protein ra khỏi huyết thanh trong các xét nghiệm định lượng các chất phi protid như ure, acid amin, acid uric, ... sau đó muốn loại bỏ nó ra khỏi dịch lọc chỉ cần đun sôi vì acid này sẽ bị hủy thành CHCl₃ và CO₂.

- Acid sulfosalicylic [C₆H₃(OH)(COOH)SO₃H] được dùng để phát hiện protein trong nước tiểu và các dung dịch sinh học khác.

❖ Tiến hành:

Cho vào 1 ống nghiệm:

- Dung dịch protein 0,1 %: 5 giọt
- Dung dịch acid trichloroacetic:2 giọt

Nhận xét kết quả.



2.4. Biến tính protein bằng muối kim loại nặng

Ion kim loại nặng có khả năng gắn vào các nhóm chức ở mạch nhánh của acid amin trong phân tử protein làm phá vỡ cấu trúc không gian và gây tủa. Nếu cho thừa muối kim loại nặng (trừ AgNO_3 và HgCl_2), tủa sẽ tan vỡ lại do hấp thụ các ion kim loại tạo điện tích dương trên phân tử protein.

❖ Tiến hành

Cho vào hai ống nghiệm:

Thuốc thử	1	2
Dung dịch protein trứng 0,1% (giọt)	10	10
CuSO_4 5% (giọt)	2	
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5% (giọt)		2

Nhận xét sự tạo thành tủa trong 2 ống. Cho thừa 2 muối vào 2 ống tương ứng.

Quan sát sự hòa tan trở lại của tủa.

2.5. Biến tính protein bằng dung môi hữu cơ:

Protein kết tủa bông hay bị vẩn đục trong dung môi hữu cơ như alcol, aceton, ether ... do bị mất lớp áo nước. Tủa càng dễ dàng nếu có thêm các chất điện giải và môi trường trung tính hay hơi acid. Kết tủa protein bằng dung môi hữu cơ có thể thuận nghịch nếu được tiến hành ở nhiệt độ thấp (-15°C đến 0°C), trong thời gian ngắn và được tách nhanh ra khỏi dung môi.

❖ Tiến hành:

Cho vào 1 ống nghiệm:

- Dung dịch protein trứng 0,1%..... 5 giọt
- Ethanol 95°15 – 20 giọt

Sau đó thêm:

- NaCl bão hòa1 giọt

Nhận xét kết quả.



Bài 3: PHƯƠNG PHÁP SORENSEN
(Phương pháp xác định đậm formol)

Các amino acide có thể phản ứng với formol trung tính để tạo thành dẫn suất metylenic. Kết quả là nhóm amin mất tính chất cơ bản của nó, ngược lại nhóm carboxyl trong amino acide tồn tại dạng metylen tự do có thể chuẩn độ với NaOH.

Phương pháp được ứng dụng trong trường hợp số nhóm carboxyl và nhóm amin tự do bằng nhau.

❖ **Nguyên liệu và hóa chất:**

- Dung dịch formol (*pha 10ml formol với 2ml dd phenolphtalein 0,5%, dùng NaOH 0,1N trung hòa cho đến khi có màu hồng nhạt và chỉ chuẩn bị trước khi dùng*)
- Nước mắm, nước cất
- Dung dịch NaOH 0,1N
- Phenolphtalein 0,5%

❖ **Dụng cụ:**

- Ống nghiệm, giá ống nghiệm, cặp ống nghiệm
- Bình nón 100ml, 250ml
- Bình định mức 100ml
- Burret 25ml
- Pipette 5 – 10ml

❖ **Cách tiến hành:**

- Lấy 2 bình nón: bình **1** dùng làm bình kiểm tra, bình **2** dùng làm bình thí nghiệm
- Cho vào bình **1**: 10ml nước cất, thêm vào 5ml dd formol và 5ml dd NaOH 0,1N. Sau đó dùng H₂SO₄ 0,1N để hiệu chỉnh màu trong bình cho đến khi chỉ còn màu hồng nhạt, thêm 2 giọt NaOH 0,1N, màu đỏ tươi xuất hiện, ứng với pH=8,8.
- Cho vào bình **2**: 10ml dịch mẫu, thêm 5ml dd formol và chuẩn độ bằng dd NaOH 0,1N đến khi có màu đỏ tươi (đậm hơn màu ở bình kiểm tra). Dùng H₂SO₄ 0,1N để hiệu chỉnh màu của dịch trong bình đến hồng nhạt, sau đó thêm vài giọt NaOH 0,1N để có màu đỏ tươi, tương đương với màu ở bình kiểm tra (pH=8,8)



- Thêm vào bình **1**: 4 giọt NaOH 0,1N, xuất hiện màu đỏ tươi ứng với pH=9,1
- Thêm vào bình **2**: vài giọt NaOH 0,1N cho đến khi xuất hiện màu đỏ tươi giống như bình **1** (pH=9,1)

Tính kết quả:

$$N \text{ (mg\%)} = [(V_2 - v_2) - (V_1 - v_1)] \cdot 1,4 \cdot 100/a$$

V_1 là tổng lượng kiềm dùng để chuẩn độ bình kiểm tra 1

v_1 là tổng lượng acide dùng để chuẩn độ bình kiểm tra 1

V_2 là tổng lượng kiềm dùng để chuẩn độ bình kiểm tra 2

v_2 là tổng lượng acide dùng để chuẩn độ bình kiểm tra 2

a là lượng mẫu(g) ứng với 10ml dịch mẫu dùng để xác định N

Tính lượng đạm amin N trong mẫu thí nghiệm trên.