

TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA ENZIM THỦY PHÂN FIBRIN ĐƯỢC TÁCH CHIẾT TỪ LOÀI GIUN QUẾ (*PERIONYX EXCAVATUS*)

LÝ THỊ BÍCH THỦY, ĐỖ THỊ TUYỀN, NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

Viện Công nghệ sinh học

Trên thế giới, số người chết vì bệnh tim mạch ngày càng tăng do những thay đổi về môi trường cũng như lối sống, nhất là ở các nước đang phát triển. Bệnh tim mạch có nhiều thể khác nhau như: chứng tràn máu não, tăng huyết áp, xơ cứng động mạch. Nguyên nhân chủ yếu là do fibrin bị đóng cục, gây tắc mạch và cản trở lưu thông máu. Vì vậy, việc làm tan cục máu đông đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh tim mạch.

Trước đây, để điều trị bệnh nghẽn mạch, người ta dựa vào việc sử dụng các chất kháng đông như heparin và coumarin. Ngày nay, người ta phát hiện ra rằng cách tốt nhất để điều trị bệnh nghẽn mạch là sử dụng enzym thủy phân fibrin. Urokinaza và chất hoạt hóa plasminogen được sử dụng rộng rãi trong việc xử lý tắc mạch. Tuy nhiên, chúng rất đắt và không hiệu quả khi uống qua đường miệng.

Từ những phát hiện của các nhà khoa học Nhật Bản và Trung Quốc về enzym thủy phân fibrin mạnh có trong các loài giun đất *Lumbricus rubellus* và *Eisenia foetida* [6, 7, 10], chúng tôi cũng đặt vấn đề tìm kiếm ở Việt Nam loài giun đất có enzym thủy phân fibrin mạnh. Vì thế, chúng tôi đã khảo sát hoạt tính ở một số loài giun đất Việt Nam và chọn được loài giun có hoạt tính cao nhất là loài giun quế, *Perionyx excavatus* [5]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quá trình tinh sạch và một số tính chất của enzym thủy phân fibrin được tách chiết từ loài giun quế này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Loài giun quế *Perionyx excavatus* được lấy từ Trung tâm chăn nuôi Dê Thỏ ở Ba Vì, tỉnh Hà Tây. Giun được lấy vào mùa hè, là mùa giun

sinh trưởng và phát triển mạnh.

2. Hóa chất

Các hóa chất dùng cho thí nghiệm đều ở mức độ sạch phân tích, bao gồm những hóa chất chính sau: plasmin, thrombin, fibrinogen của hãng Sigma (Mỹ), Na_2HPO_4 và NaH_2PO_4 của hãng Fluka, maker protein của Fermentas và các hóa chất cần thiết khác.

3. Phương pháp tinh sạch enzym

Giun đất được rửa sạch và ngâm trong nước cất để thải loại hết chất cận bã trong đường tiêu hóa. Chỉ những con giun còn sống mới được sử dụng để nghiền trong NaCl 0,9% bằng máy nghiền đồng thể; mẫu được đặt trong đá. Dịch nghiền đồng thể được ly tâm 20.000 v/phút trong 60 phút ở 4°C và thu dịch trên. Dịch được đông khô và bảo quản trong tủ lạnh ở -84°C để dùng trong quá trình thí nghiệm. Khi tách chiết, bột giun đông khô được hòa trong đệm phốt-phát natri 50 mM, pH 7,5.

Muối sun-phát amôn được cho vào dịch enzym (trong đệm phốt-phát 50 mM, pH 7,5) để đạt nồng độ 35% bão hòa, để yên trong 1-2 giờ (thỉnh thoảng khuấy), sau đó ly tâm 10.000 v/phút trong 10 phút; loại tủa, tiếp tục bổ sung muối sun-phát amôn vào dịch trên để đạt nồng độ 60% bão hòa; ly tâm 10.000 v/phút trong 10 phút để thu tủa. Tủa được hòa tan lại trong đệm trên và cho qua cột lọc gel sephacryl S200, cột cân bằng trong đệm phốt-phát natri 50 mM, pH 7,5. Tốc độ dòng chảy 1 ml/phút, chia thành 120 phân đoạn, mỗi phân đoạn 2 ml. Các phân đoạn được xác định hoạt tính thủy phân fibrin và hàm lượng protein; phân đoạn có hoạt tính riêng cao nhất sẽ tiếp tục được tinh sạch bằng cột DEAE xen-lu-lô. Dịch enzym được đưa lên cột DEAE xen-lu-lô và rửa protein không hấp phụ bằng 2 lần thể tích cột chính đệm trên. Phân hấp phụ

lần lượt được đẩy khỏi cột bằng gradien nồng độ muối NaCl biến thiên từ 0-1 M pha trong đệm phốt-phát natri 50 mM, pH 7,5 với tốc độ 0,5 ml/phút, thu 50 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml. Các phân đoạn được xác định hoạt tính thủy phân fibrin, phân đoạn có hoạt tính cao sẽ được tiếp tục tinh sạch bằng cột superdex G75. Cột được cân bằng trong đệm phốt-phát natri 50 mM, pH 7,5, tốc độ dòng chảy 0,3 ml/phút, thu 50 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn là 0,5 ml. Các phân đoạn có hoạt tính cao nhất được thu lại và bảo quản ở -20°C. Quá trình tách chiết được thực hiện ở 4°C.

- **Xác định hoạt tính thủy phân fibrin:** Hoạt tính được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của ASTRUP và MULLERTZ (1952) sử dụng plasmin làm chuẩn [1].

- **Xác định hàm lượng protein:** Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Bradford (1976) [2].

- **Xác định trọng lượng phân tử tương đối:** Trọng lượng phân tử tương đối của enzym được xác định theo phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamit 12,5% của Laemmli (1970) [4] và so sánh với thang protein chuẩn.

- **Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym:** nhiệt độ, pH, ion kim loại, EDTA bằng cách so sánh hoạt tính thủy phân fibrin của các mẫu enzym ở các điều kiện khác nhau (nhiệt độ, pH, nồng độ ion kim loại, nồng độ EDTA).

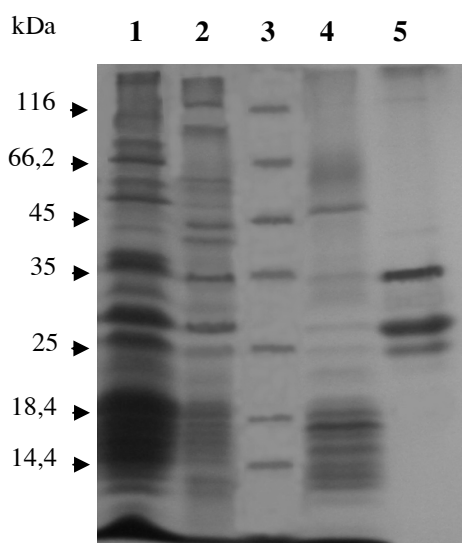
- **Xác định thành phần axit amin:** Thành phần axit amin của enzym tinh sạch được xác định bằng máy phân tích axit amin tự động HP Amino Quant Series II (Hewlett Packard).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tinh sạch enzym thủy phân fibrin

Dịch nghiền đồng thể của giun quế, sau khi ly tâm, được tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với nồng độ 35 - 60%, thu được dịch enzym có hoạt tính riêng tăng 2,6 lần (bảng 1). Dịch enzym này được cho qua cột sephacryl S200 với tốc độ dòng chảy 1 ml/phút, thu 120 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn là 2 ml. Việc xác định hoạt tính của các phân đoạn cho thấy hoạt tính của

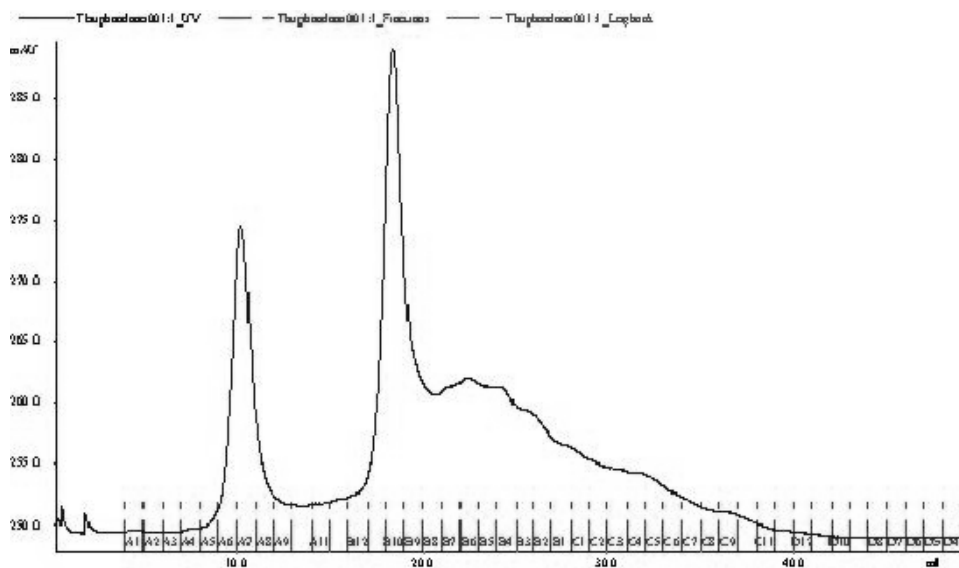
enzim tập trung ở đỉnh 2 của sắc ký đồ (từ phân đoạn 25 đến 30).



Hình 1. Điện di đồ các dịch protein trên gel polyacrylamit 12,5%

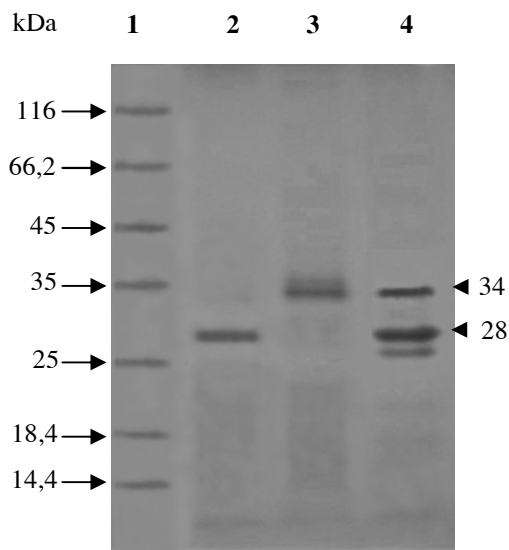
(1). dịch thô; (2). đỉnh 2 trên cột sephacryl S200; (3). chỉ thị phân tử protein; (4). đỉnh 2 trên cột DEAE xen-lu-lô; (5). đỉnh 3 trên cột DEAE xen-lu-lô.

Điện di đồ ở hình 1 cho thấy đỉnh này (cột 2 của hình 1) có rất nhiều băng protein. Vì vậy, các phân đoạn của đỉnh 2 được tiếp tục cho qua cột DEAE xen-lu-lô. Cột được cân bằng trong đệm phốt-phát natri 20 mM, pH 7,5, tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút. Sau khi đưa mẫu lên cột và rửa các protein không bám, chúng tôi tiến hành thu mẫu. Gradient nồng độ muối từ 0% dung dịch B (đệm phốt-phát natri 50 mM, pH 7,5, NaCl 1M) đến 100% dung dịch đệm B; thu 50 phân đoạn, thể tích của mỗi phân đoạn là 1 ml. Việc kiểm tra hoạt tính thủy phân fibrin của các phân đoạn thu được cho thấy hoạt tính tập trung chủ yếu ở đỉnh 3, tương ứng khoảng 80% dung dịch B. Đỉnh này (cột 5 của hình 1) có 3 băng protein có trọng lượng phân tử trong khoảng 25-35 kDa. Hoạt tính riêng của đỉnh là 207,3 UI. Đỉnh này được tiếp tục phân tách theo trọng lượng phân tử bằng cột lọc gel superdex G75. Mẫu được đưa lên cột với đệm phốt-phát natri 20 mM, pH 7,5, tốc độ dòng chảy 0,3 ml/phút; thu 50 phân đoạn, thể tích của mỗi phân đoạn là 0,5 ml.



Hình 2. Sắc ký đồ trên cột superdex G75

Sắc ký đồ thể hiện trên hình 2 cho thấy protein được phân tách thành 2 đỉnh phân biệt rõ ràng. Qua kiểm tra hoạt tính thủy phân fibrin của 2 đỉnh, chúng tôi thấy đỉnh 1 có hoạt tính riêng rất cao (271,3 UI/mg), đỉnh 2 cũng có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhưng thấp hơn đỉnh 1 (126 UI/mg).



Hình 3. Điện di đồ dịch enzyme tinh sạch (1). chỉ thị phân tử protein; (2). dịch enzyme đỉnh 2; (3). dịch enzyme đỉnh 1; (4). dịch enzyme trước khi chạy qua cột superdex G75.

Chúng tôi đã đánh giá mức độ tinh sạch và xác định trọng lượng phân tử tương đối bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit 12,5%, sử dụng chỉ thị phân tử protein của hãng Fermentas làm chuẩn. Điện di đồ ở hình 3 cho thấy enzyme thu được khá sạch. Đỉnh 1 có một băng protein khoảng 34 kDa; đỉnh 2 có một băng protein khoảng 28 kDa. So với enzyme lumbrokinaza mà các nhà khoa học Nhật Bản đã tách chiết từ loài giun *Lumbricus rubellus* [6, 7] thì các enzyme mà chúng tôi tách chiết được có trọng lượng phân tử và hoạt tính xấp xỉ (lumbrokinaza có trọng lượng phân tử là 29,66 và 24,66 tương ứng với hoạt tính là 204 và 223 UI).

Như vậy, từ dịch protein ban đầu có hoạt tính riêng 20,5 UI, chúng tôi đã tinh sạch được 2 enzyme có trọng lượng phân tử khoảng 34 kDa và 28 kDa, với hoạt tính riêng tương ứng là 271,3 UI và 126 UI.

Mẫu enzyme tinh sạch (đỉnh 1) được xác định thành phần axit amin bằng máy phân tích axit amin tự động HP Amino Quant Series II (Hewlett Packard). Kết quả cho thấy enzyme tinh sạch có loại axit amin nhiều nhất là axit aspartic (17%). Theo Mihara và cs., thành phần axit amin của các lumbrokinaza cũng chứa rất nhiều axit aspartic [3].

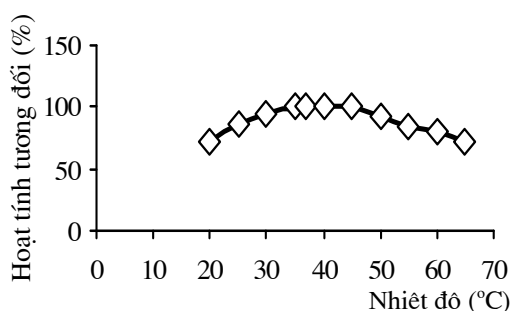
Các bước tinh sạch enzym thủy phân fibrin

Các bước tinh sạch	Thể tích (ml)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (UI)	Hoạt tính riêng (UI/mg)	Độ tinh sạch	Hiệu suất (%)	
Dịch thô	50	500	10250	20,5	1	100	
Tủa sun-phát amôn	6	153	8048	52,6	2,6	78	
Sephacryl S200 (đỉnh 2)	14	45,2	4457	98,6	4,8	43	
DEAE xen-lu-lô (đỉnh 3)	10	19	3939	207,3	10,1	38	
Superdex G75	Đỉnh 1	2	5,5	1492	271,3	13,2	26
	Đỉnh 2	2	9,3	1172	126	6,1	

Ghi chú: hiệu suất tính theo hoạt tính.

2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym

a. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính của enzym



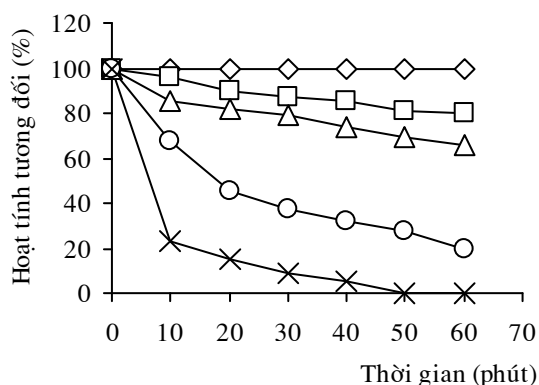
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính của enzym

Dịch enzym trong đệm phot-phát natri 50 mM, pH 7,5 được ủ trên đĩa fibrin ở các nhiệt độ khác nhau 20°C-60°C và đo diện tích của vòng phản ứng sau 3 giờ ủ để xác định hoạt tính tương đối.

Khi nhiệt độ của phản ứng tăng từ 20°C lên 35°C thì hoạt tính thủy phân fibrin cũng tăng dần lên (hình 4). Hoạt tính của enzym đạt cao nhất ở nhiệt độ 35°C đến 45°C (100%). Khi nhiệt độ tăng lên trên 45°C thì hoạt tính của enzym giảm dần xuống cho tới 65°C. So với hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu, hoạt tính ở 65°C vẫn giữ được 72%. Như vậy, nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzym thủy phân fibrin này là 35°C-45°C.

b. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền của enzym

Để nghiên cứu tính bền nhiệt của enzym, dịch enzym trong đệm phot-phát natri 50 mM, pH 7,5 được ủ ở các nhiệt độ 40°, 50°, 60°, 70° và 80°C, trong các khoảng thời gian 10, 20, 30, 40, 50 và 60 phút. Hoạt tính còn lại được xác định bằng phương pháp đĩa fibrin sau 3 giờ ủ.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền của enzym

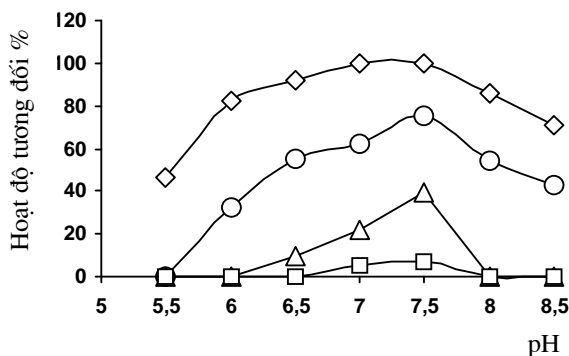
◇. 40°C; □. 50°C; Δ. 60°C; ○. 70°C; *. 80°C.

Ở nhiệt độ 40°C, diện tích của vòng phản ứng là cao nhất (100%) và không thay đổi với các khoảng thời gian trên (hình 5). Ở các nhiệt độ 50°C và 60°C, hoạt tính của enzym có giảm dần và giảm nhanh hơn theo thời gian đối với nhiệt độ 60°C (còn 65% hoạt tính sau thời gian ủ 60 phút). Ở nhiệt độ 70°C, hoạt tính của enzym vẫn còn 20% sau 60 phút ủ nhưng ở 80°C thì hoạt tính của enzym mất nhiều sau 30 phút (còn 9%) và mất hoàn toàn sau 50 phút.

Như vậy, so với các enzym khác đã biết thì enzym thủy phân fibrin tách từ loài giun quế tương đối bền với nhiệt độ.

c. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzym

Dịch enzym được nhỏ lên đĩa fibrin ở các đệm phốt-phát natri khác nhau có pH trong khoảng 5,5-8,5; ủ ở các nhiệt độ 50°, 60°, 70° và 80°C trong 3 giờ. Hoạt tính của enzym được thể hiện bằng diện tích của vòng phản ứng.



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzym

◇. 50°C; ○. 60°C; △. 70°C; □. 80°C.

Ở nhiệt độ 50°C, hoạt tính của enzym mạnh nhất ở khoảng pH 7-7,5 và giảm dần ở ngoài khoảng pH này (hình 6). Khi ủ ở 60°C thì hoạt tính của enzym chỉ còn lại ở các khoảng pH từ 6 đến 8,5; ủ ở 70°C thì hoạt tính của enzym vẫn còn với pH 6,5-7,5; ủ ở 80°C thì hoạt tính của enzym còn lại rất ít (7%) với pH trung tính và bị mất hoàn toàn với các khoảng pH kiềm và axit. Điều này chứng tỏ enzym bền ở khoảng pH trung tính.

d. Ảnh hưởng của ion kim loại và EDTA đến hoạt tính của enzym

Để đánh giá ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính thủy phân fibrin, dịch enzym được thêm vào các ion kim loại khác nhau với nồng độ 2-10 mM, ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, rồi xác định hoạt tính. Kết quả nhận được như sau: Ion Ca^{2+} với nồng độ 2,5 mM không làm thay đổi hoạt tính của enzym; ở nồng độ 10 mM, hoạt tính của enzym tăng nhẹ (10%). Các ion kim loại Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} và Ni^{2+} không ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym. Các ion kim loại Pb^{2+} , Cu^{2+} và Zn^{2+} ức chế mạnh (hoạt tính còn 60-40%) ở các nồng độ 2-10 mM. Hg^{2+} ức chế hoạt tính của enzym mạnh nhất, hoạt tính còn 30-40% ở nồng độ 2,5 mM và ức chế hoàn toàn ở nồng độ 10 mM.

Một trong những chất kìm hãm đặc hiệu đối với enzym có nhóm ngoại mang ion kim loại là EDTA. Chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của EDTA (với các nồng độ khác nhau từ 1-10 mM) đến hoạt tính của enzym. Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt tính thủy phân fibrin của enzym không thay đổi so với ban đầu (dịch enzym không được bổ sung EDTA) ở tất cả các nồng độ EDTA trong khoảng trên. Như vậy, EDTA không có tác dụng kìm hãm enzym và enzym thủy phân fibrin tách chiết được không thuộc nhóm enzym có kim loại. Kết quả này cũng gợi ý rằng, chúng ta có thể bổ sung EDTA vào dịch enzym trong quá trình tách chiết để ức chế các proteaza kim loại.

III. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được quy trình thích hợp để tách chiết enzym có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun quế *Perionyx escavatus*. Quy trình gồm các bước chính: kết tủa phân đoạn bằng muối sun-phát amôn, qua cột lọc gel sephacryl S200, cột trao đổi anion DEAE xen-lu-lô và cột lọc gel superdex G75. Thực hiện quy trình tách chiết này, chúng tôi thu được 2 enzym có trọng lượng phân tử khoảng 34 và 28 kDa, tương ứng với các hoạt tính là 271 và 126 UI. Kết quả xác định thành phần axit amin cho thấy enzym rất giàu axit aspartic (17%). Đây là enzym khá bền với nhiệt, với nhiệt độ tối ưu là 35°C-45°C; enzym hoạt động trong khoảng pH rộng và rất bền ở pH trung tính; enzym không bị kìm hãm bởi EDTA, được kích thích nhẹ bởi Ca^{2+} , bị kìm hãm bởi các ion Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} và bị kìm hãm mạnh bởi ion Hg^{2+} .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Astrup T., Mullertz S., 1951: Arch. Biosci. Biochem. Biophys., 40: 346-351.
2. Bradford M. M., 1976: Anal. Biochem., 72: 248-254.
3. Mihara H. et al., 1991: Jpn. J. Physiol., 41: 461-472.
4. Laemmli U. K., 1970: Nature, 227: 680-685.
5. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 531-534. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

6. Nakajima N., Mihara H., Sumi H., 1993: Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 1726-1730.
7. Sumi H., Nakajima N., Mihara H. A., 1993: Comp. Biochem. Physiol., 106: 763-766.
8. Thái Trần Bái, Nguyễn Văn Cảnh, 2004: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 31-34. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
9. Trần Thị Hồng Thúy, Nguyễn Trần Giáng Hương, 2003: Tạp chí Dược học, 325: 17-19.
10. Zhou Y. C., Zhu H., Chen Y. C., 1988: Acta Biochim. Biophys. Sin., 20: 35-42.

**PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF SOME
CHARACTERS OF THE FIBRINOLYTIC ENZYME ISOLATED
FROM THE EARTHWORM *PERIONYX EXCAVATUS***

LY THI BICH THUY, DO THI TUYEN, NGUYEN THI NGOC DAO

SUMMARY

A strong fibrinolytic enzyme was isolated and purified from an earthworm of Vietnam: *Perionyx excavatus*. The purification procedure was described as follows: the earthworms were washed to remove the attached mud and then were left to evacuate the casts from their alimentary tract in distilled water. The living earthworms were homogenized in 0.9% NaCl. The homogenate was centrifuged at 20.000 rpm/min for one hour. The obtained supernatant was precipitated with a 35% and then 60% saturation of ammonium sulfate. The resultant precipitate was dissolved in the 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6 and subjected on the sephacryl S200 gel filtration column. The strongest fibrinolytic fraction was further fractionated by the column chromatography on DEAE cellulose and then on the superdex G75 gel filtration column. The particular activities of two obtained enzymes were 271 and 126 IU/mg and theirs molecular weights were 34 and 28 kDa, respectively. The obtained enzymes were heat-stable and had broad pH range; the optimum temperature was at range 35°C — 45°C and the optimum pH was at range 7-7.5.

Ngày nhận bài: 27-6-2005