

TINH SẠCH VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CÁC CHẤT KÌM HÃM TRIPXIN VÀ KIMOTRIPXIN Ở HẠT HÈE-*SOPHORA JAPONICA* L. f.

LÊ TRỌNG QUANG, NGUYỄN PHƯƠNG NAM,
PHAN THỊ HÀ, PHẠM TRẦN CHÂU

Trung tâm Công nghệ sinh học, ĐHQGHN

Các proteinaza tham gia vào nhiều quá trình sống quan trọng, quá trình gây bệnh, ... Protein ức chế proteinaza (PPI) có tác dụng ức chế đặc hiệu cao đối với proteinaza, vì vậy PPI là một trong những yếu tố điều hòa có hiệu quả quá trình proteolysis trong hệ thống sống. Một số PPI đã được sử dụng để điều trị một số bệnh do hoạt động của proteinaza tăng quá mức bình thường. Đến nay, cũng đã có nhiều dẫn liệu cho thấy có thể sử dụng PPI để điều trị một số bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS, ...

Một số nghiên cứu [1] cho thấy có thể sử dụng PPI trừ sâu hại. PPI phổ biến ở động vật, thực vật và vi sinh vật, vì vậy việc nghiên cứu điều tra PPI ở sinh vật, đặc biệt là thực vật để phát hiện các PPI có những đặc tính quý, có thể ứng dụng vào thực tế là vấn đề đang được nhiều nhà khoa học quan tâm.

Chúng tôi đã tiến hành điều tra nghiên cứu PPI ở nhiều họ thực vật khác nhau [1, 8] và mới đây nhất là các kết quả nghiên cứu ở một số cây thuộc họ Cà phê và họ Đậu, đã phát hiện được hạt hèo có hàm lượng chất kìm hãm tripxin (TI) và chất kìm hãm anpha-kimotripxin (KI) cao nhất trong số các mẫu đã nghiên cứu vì vậy chúng tôi đã tiến hành tinh sạch và nghiên cứu PPI ở hạt hèo - *Sophora japonica* L. f.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Hạt hèo - *Sophora japonica* được thu hái ở Gia Lâm. Tách bỏ vỏ hạt, nghiền nhỏ mịn, loại chất béo và chiết rút trong đệm Tris-HCl

0,05 M, pH = 7,4.

Hóa chất: Cazein, BApNA (benzoyl-L-acginin - p-nitroamit) của hãng Sigma (St Louis, Mo, USA). Kít protein chuẩn để xác định khối lượng phân tử, Kít protein chuẩn để xác định pI bằng phương pháp điện di hội tụ (IEF) của hãng Biorad (Mỹ). Ampholyt pH 4 - 6,5, Gelbold film, imidazol, kít nhuộm bạc, superdex 75, superdex 25, MonoQ của hãng Pharmacia Fine Chemicals (Thụy Điển). Các hóa chất khác đạt độ sạch phân tích.

2. Phương pháp

Xác định hoạt độ kìm hãm tripxin (TIA) và anpha-kimotripxin (KIA) ở 35,5°C trong 20 phút theo phương pháp Anson cải tiến. Một đơn vị hoạt độ ức chế tripxin (IU) là lượng chất ức chế làm giảm 50% hoạt độ của 2 mg tripxin. Hoạt độ ức chế kimotripxin được xác định tương tự như hoạt độ ức chế tripxin.

Xác định protein theo phương pháp Bradford [3] sử dụng albumin huyết thanh bò làm protein chuẩn hoặc đo trực tiếp mật độ quang học ở bước sóng 280 nm.

Điện di phát hiện protein theo phương pháp Leammli [7] với nồng độ gel 12,5% có sodium dodecyl sulfat (SDS). Mẫu được xử lý nhiệt ở 100°C trong đệm mẫu có SDS và 2-mecaptoetanol. Nhuộm gel sau điện di bằng dung dịch coomassie brilliant blue 0,1% trong hỗn hợp metanol: axetic: nước (4:1:5). Tẩy màu bằng dung dịch hỗn hợp trên.

Với một số trường hợp gel được nhuộm âm bản theo phương pháp Fernandez Patron [6]: lắc gel nhẹ nhàng trong dung dịch imidazol 0,2 M trong 10 phút, sau đó chuyển gel sang ủ trong dung dịch ZnCl₂ 0,2 M trong một phút.

Phức hợp imidazol-Zn sẽ tạo nên gel có màu trắng đục. Protein sẽ hiện dưới dạng các băng trong suốt không màu trên nền gel trắng đục, các băng này được thổi ra từ gel và sử dụng trong nhiều nghiên cứu tiếp theo.

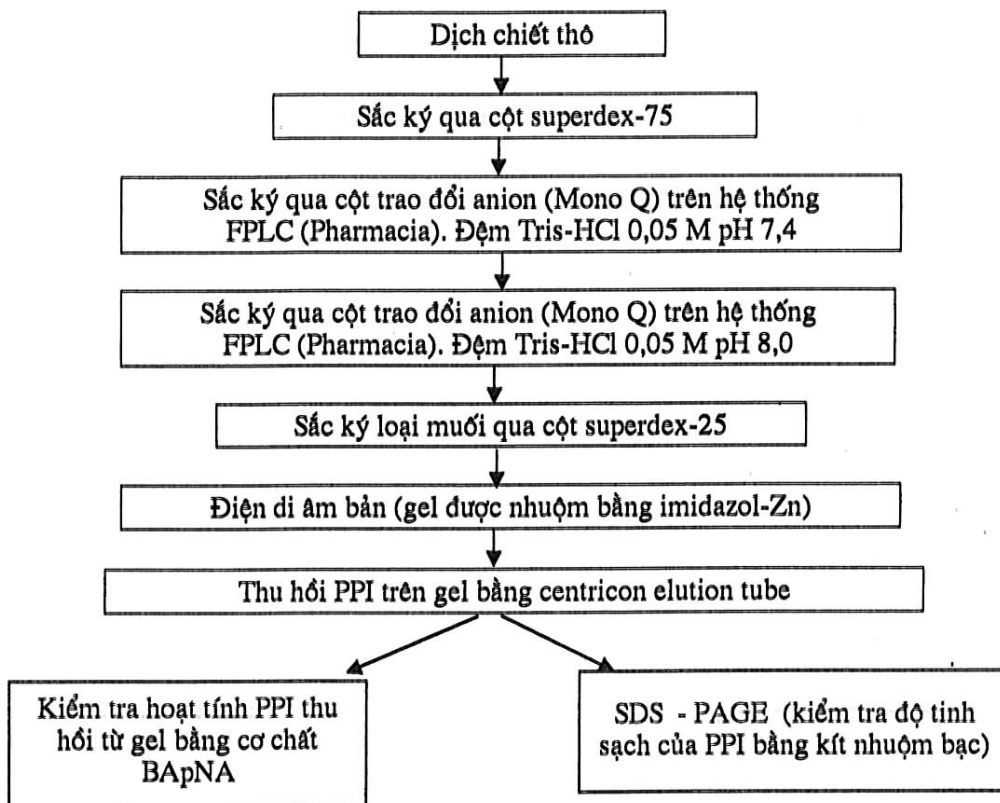
Điện di phát hiện các chất kim hãm tripxin (TI) và anpha- kimotripxin (KI) theo phương pháp Hanspal [5] với gel 12,5% có SDS, nồng độ cơ chất gelatin trộn trong gel đạt 0,1%. Mẫu protein được trộn bằng đệm mẫu có SDS nhưng không có 2-mecap-

thoetanol và không xử lý nhiệt. Tẩy SDS khỏi gel bằng dung dịch triton X-100 2,5% trong 30 phút, ủ gel trong đệm Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 có 250 μ g tripxin/100 ml ở 37°C trong 8 giờ.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tinh sạch PPI của hạt hờ

Quá trình tinh sạch PPI của hạt hờ qua các bước được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tinh sạch PPI từ hạt hờ

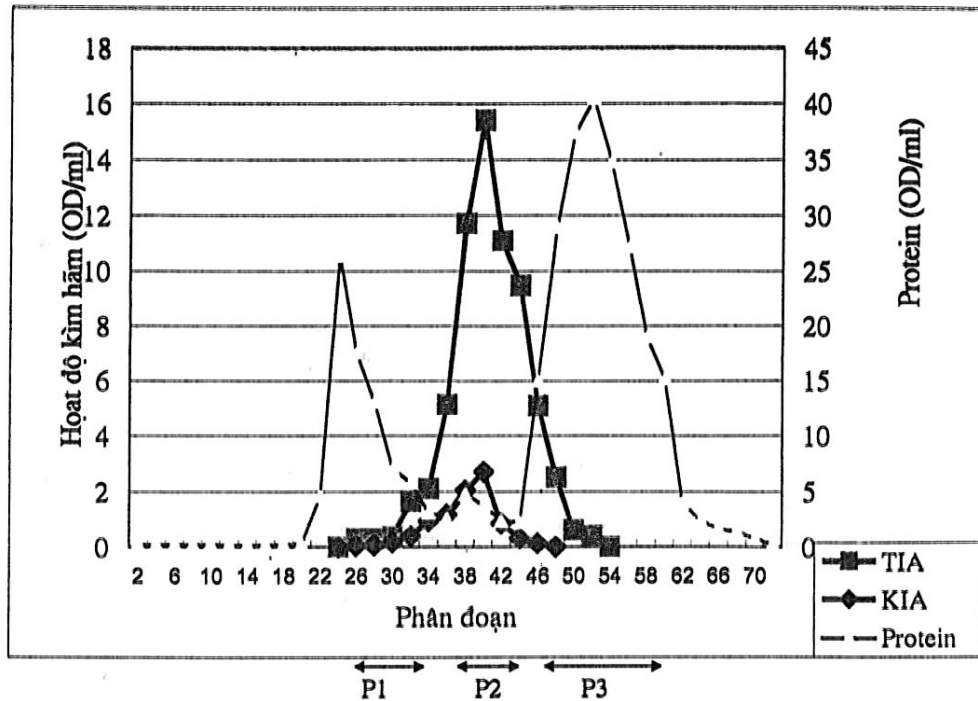
Ghi chú: SDS: Điện di trên gel poliacrilamit có SDS, Rf: độ di động điện di, pI: điểm đẳng điện

a) Sắc ký qua cột lọc gel superdex-75

Kết quả sắc ký trên hình 2 và bảng 1 cho thấy có ba vùng protein với ký hiệu là P1, P2, P3 được rút xuống theo tỷ lệ 26% : 5,5% : 68%. Trong đó, đáng chú ý đỉnh P2 (vùng có hàm lượng protein thấp nhất) là vùng có cả hoạt tính kim hãm tripxin và anpha-kimotripxin, do đó chế phẩm sau khi qua cột superdex có độ sạch

tăng gấp nhiều lần so với mẫu thô ban đầu (hình 3).

Kết quả điện di protein theo phương pháp Leammli (hình 3) cho thấy P2 đã được tinh sạch đáng kể so với mẫu dịch chiết thô ban đầu. Các băng protein có khối lượng phân tử 55, 35 và 16 kDa (so với protein chuẩn chạy cùng điều kiện) là các protein chính ở đỉnh P2 (hình 3).



Hình 2. Sắc ký mẫu hạt hèo qua cột superdex-75. Đệm Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Tốc độ chảy 24 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn 2 ml. Kích thước cột 1,2x90 cm

Bảng 1

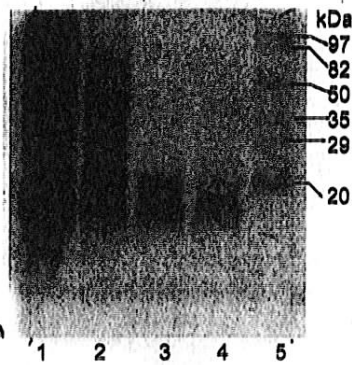
Tỷ lệ protein ở các đỉnh sau các giai đoạn tách rút và so với mẫu thô ban đầu

| Giai đoạn | Mẫu | % so với tổng lượng protein lên cột | % so với tổng lượng protein ban đầu |
|------------------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Superdex-75 | P1 | 26,00 | 26,00 |
| | P2 | 5,50 | 5,50 |
| | P3 | 68,00 | 68,00 |
| MonoQ Đệm Tris HCl pH 7,4 | D ₁ | 9,40 | 0,52 |
| | D ₂ | 17,40 | 9,96 |
| MonoQ Đệm Tris HCl pH 8,0 | SJ-I | 6,00 | 0,03 |
| | SJ-II | 26,20 | 0,25 |

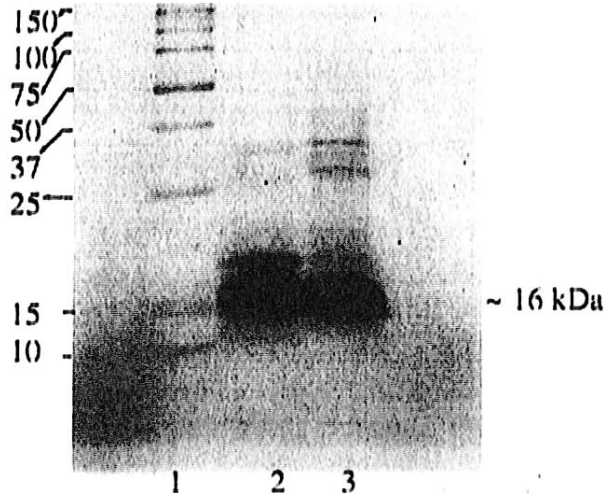
b) Sắc ký đỉnh P2 qua cột Mono Q trên hệ thống sắc ký tự động FPLC

Sắc ký đỉnh P2 qua cột Mono Q (trao đổi anion mạnh) trên hệ thống sắc ký tự động FPLC trong đệm Tris - HCl pH 7,4 với gradient nồng độ NaCl 0-1 M thu được hai cụm đỉnh protein có chứa cả hoạt độ kim hãm triptxin lẫn

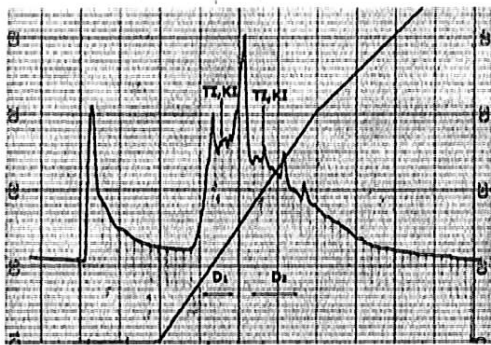
kimotriptxin (ký hiệu D₁ và D₂) (hình 5) tách nhau khá rõ ở nồng độ muối tương ứng là 0,13 - 0,16M và 0,22-0,26 M với tỷ lệ 9,4% (D₁) và 17,4 % (D₂) tổng lượng protein lên cột (bảng 2). Độ sạch của D₁ và D₂ tăng lên nhiều lần so với mẫu qua cột superdex-75 khi phân tích D₁ và D₂ trên gel poliacrilamit (hình 3).



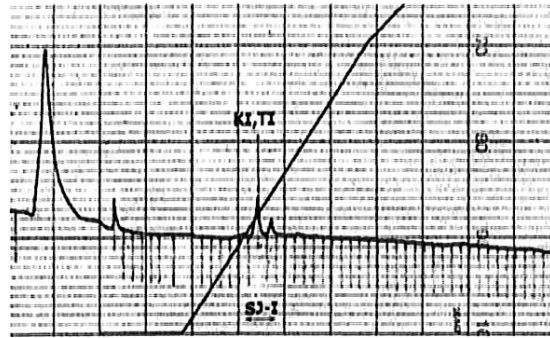
Hình 3. Phổ protein qua SDS -PAGE 12,5%
1: mẫu thô, 2: P2, 3: D₁, 4: D₂, 5: protein chuẩn



Hình 4. Phổ protein qua SDS -PAGE 12,5 %
1: protein chuẩn, 2: SJ-I, 3: SJ-II



Hình 5. Sắc ký đỉnh P2 qua cột Mono Q trên FPLC. Đệm Tris-HCl 0,05 M pH = 7,4 với gradient 0-1 M NaCl, tốc độ chảy 30 ml/giờ, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml, kích thước cột 1 ml



Hình 6. Sắc ký D1 qua cột Mono Q trên FPLC. Đệm Tris -HCl 0,05 M pH = 8,0 với gradient 0-1 M NaCl, tốc độ chảy 30 ml/giờ, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml, kích thước cột 1 ml

Bảng 2

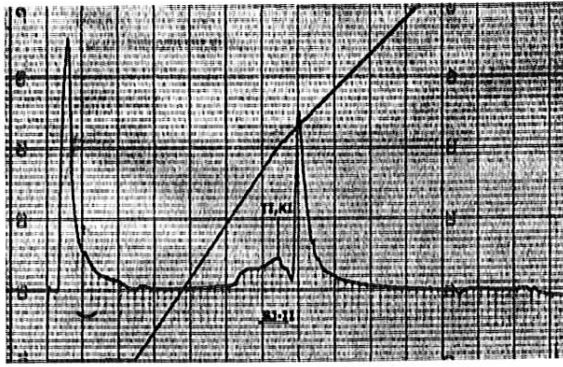
Độ di động điện di và tỷ lệ tương quan một số băng protein chính ở SJ-I và SJ-II

| Rf | Mẫu | |
|------|------------------|-------------------|
| | % protein ở SJ-I | % protein ở SJ-II |
| 0,34 | 2,0 | 3,4 |
| 0,41 | 2,6 | 7,1 |
| 0,44 | 1,6 | 8,2 |
| 0,60 | 12,4 | 7,9 |
| 0,68 | 75,0 | 70,1 |

Để thu nhận được PPI hoàn toàn tinh sạch, D₁ và D₂ được thu lại và tiếp tục tách riêng qua

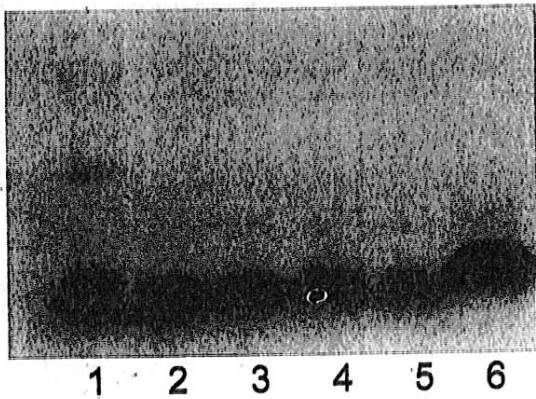
cột Mono Q cân bằng với đệm Tris -HCl pH 8,0 (hình 6 và 7). Tương tự kết quả trên, chúng tôi thu được hai đỉnh PPI (SJ-I và SJ-II) được rút ở nồng độ muối tương ứng với D₁, D₂. Ngoài sự khác biệt về thời gian lưu (retention time), phổ sắc ký ở hình 6 và 7 còn cho thấy với điều kiện tinh sạch trên, đỉnh SJ-I được tách tốt hơn SJ-II. Sự khác này còn được thể hiện khi so sánh phổ protein giữa SJ-I và đỉnh SJ-II trên gel poliacrilamit (hình 4).

Phổ điện di protein (hình 4 và bảng 2) theo Leammli cho thấy SJ-I và SJ-II chỉ còn vài băng so với dịch chiết thô, trong đó băng protein có khối lượng phân tử khoảng 20 kDa tương ứng với R = 0,68 ở SJ-I và SJ-II là protein chính, chiếm tỷ lệ trên 70% so với các protein còn lại.



Hình 7. Sắc ký D2 qua cột Mono Q trên FPLC. Đệm Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 với gradient 0-1 M NaCl, tốc độ chảy 30ml/giờ, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml. Kích thước cột 1 ml

Điện di có cơ chất phân tích thành phần, khối lượng phân tử PPI theo phương pháp Hanspal [5] (hình 8 và 9) phát hiện SJ-I và SJ-II có một băng



Hình 8. Phổ TI trên SDS -PAGE 12,5% có 0,1% gelatin. 1: Hạt thô, 2: TI qua superdex-75, 3: TI không bám 4: SJ-I, 5: SJ-II, 6: STI chuẩn

Băng protein có $R_f = 0,68$ (16 kDa) từ SJ-I và SJ-II tách ra từ gel sau khi nhuộm âm bản (ký hiệu tương ứng là E_1 và E_2) được kiểm tra lại độ sạch bằng SDS-PAGE, nhuộm bằng kết nhuộm bạc theo phương pháp Schecvchenko [9]. Kết quả cho thấy mỗi mẫu chỉ có một băng protein duy nhất (hình 11).

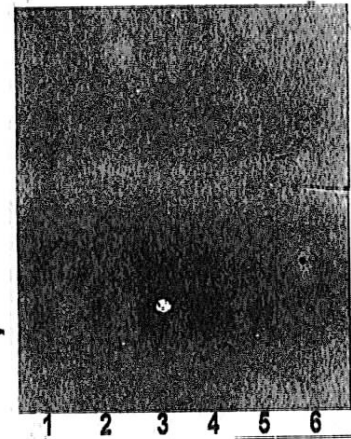
Kiểm tra hoạt tính kìm hãm tripxin của băng

TI và KI duy nhất có khối lượng phân tử nhỏ hơn 20 kDa.

Trên cơ sở phân tích các kết quả nhận được về thành phần và khối lượng phân tử PPI (hình 4, 8 và 9) chúng tôi giả thiết các PPI của hạt hóc kìm hãm tripxin và anpha-kimotripxin theo kiểu họ nhóm chất kìm hãm hai đầu Bowman-Birk ở hạt cây đậu tương (có thể kìm hãm đồng thời cả tripxin lẫn anpha-kimotripxin cùng lúc, độc lập). Tuy nhiên, về khối lượng phân tử lại cao hơn nhiều.

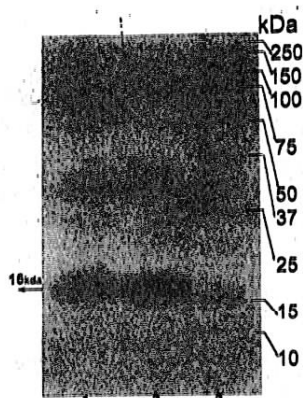
c) Điện di âm bản (Negative staining) tách chế phẩm PPI

SJ-I và SJ-II được cô đặc nhiều lần và lên điện di có SDS theo Leammli. Kết thúc điện di, gel được nhuộm bằng imidazol - Zn [6]. Sau khi các băng hiện hình (hình 10), cắt băng có khối lượng phân tử khoảng 16 kDa và thổi băng này từ gel bằng elution centricon tube.

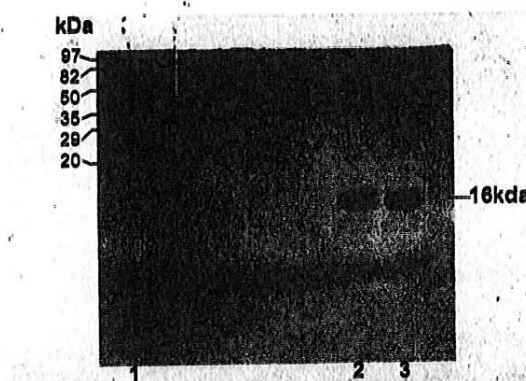


Hình 9. Phổ KI trên SDS -PAGE 12,5% có 0,1% gelatin. 1: SJ-II, 2: SJ-I, 3: KI qua superdex-75, 4: Hạt thô, 5: KI không bám, 6: STI chuẩn

protein này, với cơ chất đặc hiệu BApNA [4] cho thấy ở 25°C trong 10 phút, 12,5 μ l tripxin bị kìm hãm hoàn toàn bởi 50 μ l mẫu E_1 và E_2 . Điều này cho phép chúng tôi khẳng định băng protein 16 kDa được tinh sạch như trên có hoạt tính ức chế tripxin. E_1 và E_2 cũng có hoạt tính ức chế anpha-kimotripxin khi thử bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.



Hình 10. Phổ điện di SJ- I và SJ-II trên gel polyacrilamit 12,5% có SDS sau khi điện di được nhuộm imidazol-Zn
1: SJ-II, 2: SJ-I, 3: protein chuẩn



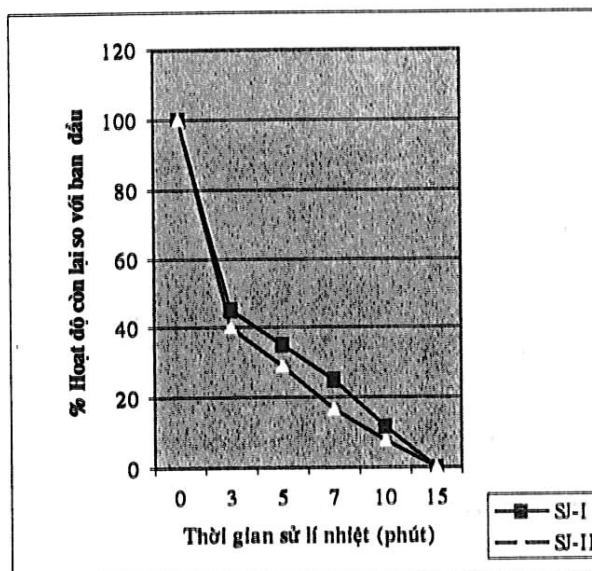
Hình 11. Phổ điện di E₁ và E₂ trên gel polyacrilamit 12,5% có SDS sau khi điện di được nhuộm bằng bạc.
1: protein chuẩn, 2: E₁, 3: E₂

2. Độ bền nhiệt của SJ-I và SJ-II

Nghiên cứu độ bền với nhiệt của PPI đóng vai trò quan trọng trong xác định tính chất của các protein này. Chúng tôi đã tiến hành xử lý SJ-I và SJ-II ở 70°C trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả nhận được cho thấy (hình 12) TIA của SJ-I và SJ-II giảm nhanh khi xử lý nhiệt. Sau 3 phút, TIA của cả SJ-I và SJ-II chỉ còn khoảng trên 40% hoạt độ ban đầu. TIA của SJ-I và SJ-II mất hoàn toàn hoạt động sau 15 phút xử lý nhiệt. Điều đó cho thấy PPI của hạt hede có độ bền với nhiệt kém hơn PPI kiểu Bowman-Birk của hạt đậu tương hay một số cây họ đậu khác [2].

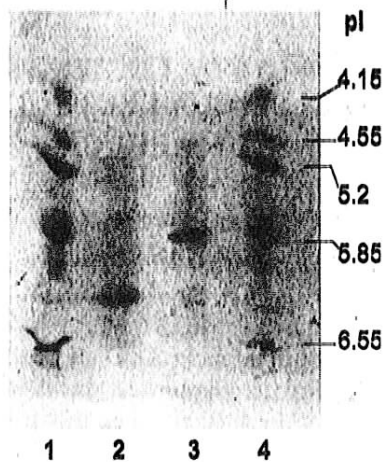
3. Xác định điểm đẳng điện của SJ-I và SJ-II bằng điện di đẳng điện

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy nhóm họ kìm hãm Bowman-Birk thường có pI nằm ở vùng axit, ví dụ như PPI từ đậu tương (4,55), đậu ngự (5,1)... [2]. Mặt khác, qua một số tính chất tương tự giữa PPI hạt hede với nhóm họ kìm hãm đã nêu ở trên, chúng tôi đã tiến hành phân tích điểm đẳng điện PPI của hạt hede từ SJ-I và SJ-II trên gel polyacrilamit 5%T (total cross linker) 4%C (cross linker) có ampholyt pH từ 4,0 đến 6,5 [10].



Hình 12. Độ bền nhiệt TI của SJ-I và SJ-II ở 70°C

Hình 13 cho thấy phổ điện di SJ-I có một băng protein chính có pI vào khoảng 6,2, trong khi đó pI của băng protein tương ứng ở SJ-II là 5,85. Tổng hợp tất cả các kết quả thu nhận được, chúng tôi giả thiết có ít nhất hai PPI trong hạt hede thuộc về nhóm họ kìm hãm proteinaza serin kiểu "Bowman-Birk" tương tự như các PPI của các cây họ đậu khác. Các PPI này giống nhau về mặt khối lượng phân tử song có thể khác nhau về điểm đẳng điện. Phải chăng đây là các dạng isoform của PPI.



Hình 13. Phổ điện di pI của SJ-I và SJ-II trên gel poliacrilamit 5%T, 4%C, 2,2% ampholyt pH từ 4 - 6,5
1, 4: Protein chuẩn, 2: SJ-II, 3: SJ-I

III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng phương pháp sắc ký qua cột superdex-75, cột MonoQ và tiếp tục tinh sạch bằng phương pháp điện di nhuộm âm bản, đã tách được từ hạt hòe 2 PPI có độ sạch cao, ký hiệu là SJ-I và SJ-II. Mỗi PPI này có tác dụng ức chế cả trypsin và kimotripxin.

2. SJ-I và SJ-II có khối lượng phân tử vào khoảng 16 kDa nhưng khác nhau về điểm đẳng điện: pI của SJ-I là 6,2 và pI của SJ-II là 5,85.

3. Độ bền nhiệt của SJ-I và của SJ-II khá giống nhau: sau xử lý nhiệt ở 70°C trong 3 phút, TIA của SJ-I và SJ-II còn khoảng 40% và sau 15 phút mất hoàn toàn.

Từ các kết quả nhận được, đưa đến giả định có thể 2 PPI của hạt hòe thuộc loại chất kìm hãm 2 đầu kiểu "Bowman-Birk".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Trân Châu và cs., 2000: Tạp chí Khoa học-Khoa học tự nhiên. Đại học Quốc gia Hà Nội, 16(1): 1-11.
2. Birk Y., Gerler A., 1971: Biochem. Biophys. Acta, 54: 378-381.
3. Bradford M., 1976: Anal. Biochem., 72: 284-253.
4. Erlanger B., Kokowski N., 1961: Arch. Biochem. Biophys., 95: 271-275.
5. Hanspal J. S., Bushell G. I., Ghosh P., 1983: Anal. Biochem., 132: 288-292.
6. Fernandedez-Patron., 1995: Anal. Biochem., 224: 203-211.
7. Leammli U. K., 1970: Nature, 227: 680-685.
8. Phạm Thị Trần Châu et al., 1999: Tạp chí Khoa học - Khoa học tự nhiên. Đại học quốc gia Hà Nội, 15(3): 1-10.
9. Schecvchenko A., 1996: Anal. Chem., 68: 850-858.
10. Reghetl P., Gianazza E., 1989: Anal. Chem., 61: 1602-1612.

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF TWO PROTEIN PROTEINASE INHIBITORS FROM THE SEEDS OF *SOPHORA JAPONICA* L. f.

LE TRONG QUANG, NGUYEN PHUONG NAM,
PHAN THI HA, PHAM TRAN CHAU

SUMMARY

Using column chromatography on superdex-75, MonoS and PAGE methods allowed to separate two highly purified protein proteinase inhibitors from *Sophora japonica* seeds, named SJ-I and SJ-II. Each of them showed inhibitory activity against both trypsin and chymotripxin.

The molecular mass of both inhibitors were estimated around 16 kDa. However, they were different in pI value: 6.2 for SJ-I and 5.85 for SJ-II.

The heat stability of two inhibitors was also similar: after the treatment of inhibitors at 70°C for 3 min, TIA remained 40% and after 15 min, TIA completely lost.

All obtained data led to a suggestion that SJ-I and SJ-II were isoforms and might be a Bowman - Birk type double headed inhibitors of higher molecular mass.

Ngày nhận bài: 18-10-2002