

SỰ BIẾN ĐỔI CÁC CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN (TI) Ở HẠT GẮC TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN CỦA HẠT

NGUYỄN QUỲNH UYÊN, LÊ TRỌNG QUANG,
TRỊNH HỒNG THÁI, PHAN THỊ HÀ, PHẠM THỊ TRẦN CHÂU

Đại học Quốc gia Hà Nội

LÊ NGUYỄN DŨNG, JEAN FRANCOIS, LAURENT CHICHE

Đại học Montpellier I

Các protein ức chế tripxin (TI) của hạt bí có nhiều tính chất đặc biệt như: khối lượng phân tử thấp (vào khoảng 3 kDa), rất bền với nhiệt, bền với axit, ở dạng tự nhiên khó bị phân giải dưới tác dụng của các proteinaz khác nhau (trừ pepxin), vì vậy các TI này đã được nhiều người quan tâm nghiên cứu. Đến nay, đã có gần 50 TI của hạt bí đã được xác định cấu trúc bậc I. Do có nhiều tính chất mới mẻ nên các TI của hạt bí được xếp thành một họ mới, họ thứ 10 của các protein ức chế proteinaz - xerin. Một số các TI này đã được nghiên cứu cấu trúc không gian, tổng hợp bằng phương pháp hoá học hoặc bằng các biện pháp công nghệ sinh học (CNSH), cải biến phân tử để tạo ra các phân tử có hoạt tính sinh học mới với hiệu quả ứng dụng cao hơn.

Tuy nhiên hầu hết các nghiên cứu TI ở họ bầu bí cũng như các họ khác đều tập trung vào các TI ở hạt chín sinh lý, vì vậy, cho đến nay, còn ít biết về quá trình sinh tổng hợp, quá trình tích lũy TI ở hạt và còn ít dẫn liệu thực nghiệm về vai trò của chúng ở thực vật. Hiểu biết vấn đề này không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn để nâng cao hiệu quả sử dụng và khai thác các TI của họ bầu bí.

Các nghiên cứu của chúng tôi trước đây ở *Cucurbita pepo var. patisonnina* (CPP) [9] là công trình đầu tiên nghiên cứu có hệ thống các TI ở các phần khác nhau của quả, ở các giai đoạn phát triển khác nhau của hạt từ lúc hình thành đến khi nảy mầm [8, 9] cũng như ở hạt aloron của nội nhũ hạt [7]. Các kết quả thu được đã đóng góp dẫn liệu cho các vấn đề đã nêu. Hướng nghiên cứu trên cũng đã được tiếp tục một phần với các hạt của các loài khác thuộc họ

bầu bí khác của Việt Nam như mướp đắng [12], mướp hương, mướp Ấn Độ [14, 15].

Hạt gác trồng thuộc loại giàu TI nhất trong số các hạt của các loài họ bầu bí đã nghiên cứu, vì vậy, bên cạnh các nghiên cứu khai thác sử dụng các PPI của hạt gác [10, 11], công trình này giới thiệu kết quả nghiên cứu TI trong quá trình phát triển của hạt gác nhằm góp thêm dẫn liệu để tìm hiểu quá trình sinh tổng hợp TI ở hạt, một vấn đề còn ít được chú ý nghiên cứu.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

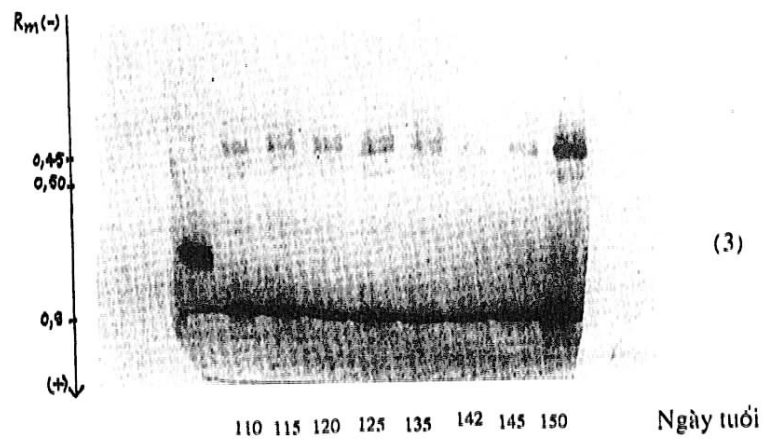
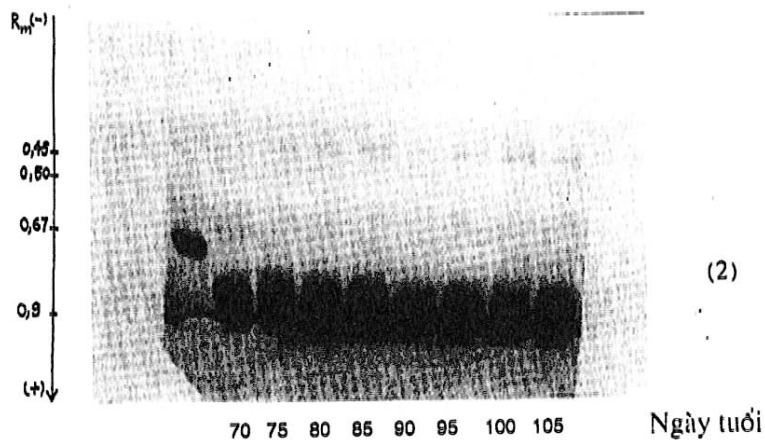
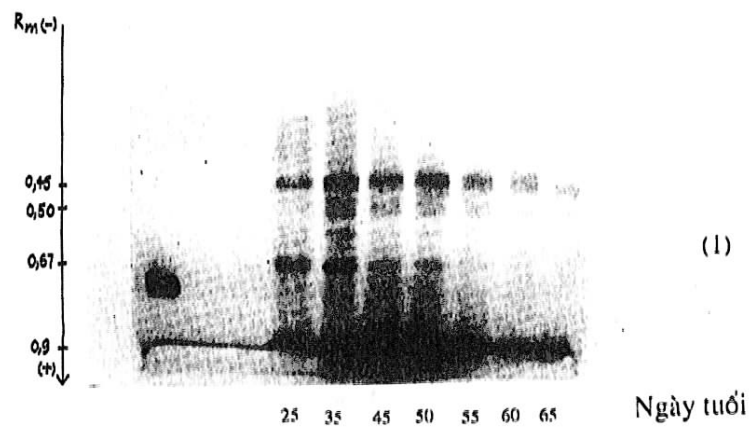
- Hạt gác non: tuổi hạt được tính từ lúc hoa nở, sau khi thu về giữ ở -20°C.

- Dịch chiết (DC) hạt: hạt nghiền mịn chiết bằng axit perchloric 0,15 M, do thể tích đồng thể, ly tâm 10000 vòng/phút, lấy dịch trong, điều chỉnh dung dịch đến pH = 7,0 bằng dung dịch KOH 0,1 M, ly tâm thu dịch trong để phân tích. Quá trình nghiền hạt và chuẩn bị DC, ly tâm đều thực hiện ở điều kiện lạnh.

- Các hoá chất có độ sạch tinh khiết.

2. Phương pháp

Xác định protein theo phương pháp Lowry [6], dùng albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn. Hoạt độ ức chế tripxin (TIA) được xác định bằng hiệu số hoạt độ enzym trước và sau khi xử lý enzym với dung dịch có chứa chất ức chế trong 10 phút. Hoạt độ proteolitic được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [13], dùng cơ chất casein. Hàm lượng chất ức chế



Ảnh 1. Phổ điện di TI của hạt gấc ở các ngày tuổi khác nhau
Điện di trên PAG có cơ chất casein 0,2%, có SDS, ở điều kiện không khử (không có mercaptoetanol)
(1) hạt gấc từ 25-65 ngày tuổi; (2) hạt gấc từ 70-105 ngày tuổi; (3): hạt gấc từ 110-150 ngày tuổi

DC hạt vào khoảng 65 ngày tuổi cho đến khi chín khá giống nhau; ở hạt non hơn, phổ diện di phức tạp hơn, bao gồm nhiều băng trong đó đáng lưu ý là băng TI với $R_m = 0,67$ có cường độ bất mầu gần tương đương với TI có $R_m = 0,45$. Việc không phát hiện được băng TI 0,67 ở những hạt già, ít nhất cũng chứng tỏ tỷ lệ của TI này bị giảm so với các TI khác. Nhìn chung, có thể thấy sự thay đổi tỷ lệ giữa các TI trong quá trình phát triển của hạt gạo xảy ra rõ rệt vào khoảng 65-75 ngày tuổi, nghĩa là vào khoảng giữa thời kỳ phát triển của hạt, giống như đã xác định được ở các loài họ bầu bí khác [12, 14, 15]. Tuy nhiên chưa phát hiện được sự chuyển hoá tương hỗ giữa các TI như ở hạt CPP [9].

Tóm lại, kết quả trên cho thấy TI (hoặc các TI) phân tử thấp nhất với $R_m = 0,9$ là TI chủ yếu của hạt gạo chín đã xuất hiện ngay ở hạt 25 ngày tuổi. Điện di protein (ảnh 2) cũng nhận được kết quả tương tự, phát hiện được các băng protein chủ yếu với các giá trị R_m tương ứng với các băng TI, nhưng ở vùng băng protein có R_m khoảng 0,9, đã phát hiện được 2-3 băng protein sát nhau. Ở hạt non hơn 75 ngày tuổi, phổ diện di phức tạp hơn, nhiều băng protein ở vùng M_r lớn, kể cả hạt 15 ngày tuổi. Tuy nhiên, ở hạt 15 ngày tuổi đã không phát hiện được băng protein ứng với R_m khoảng 0,9. Từ đó, có thể nghĩ rằng các TI phân tử thấp (là những TI chủ yếu ở hạt gạo chín) xuất hiện ở hạt sau 15 ngày tuổi.

2. Tách TI của DC hạt 25 ngày tuổi và hạt chín

a) Sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-75

Sắc ký qua cột Sephadex G-75 DC hạt gạo

25 ngày tuổi, nhận được 1 đỉnh TIA ứng với $V_e = 190$ ml (hình 2); đối với DC hạt gạo chín, thu được 2 đỉnh TIA tách nhau không rõ: đỉnh I có $V_e = 190$ ml, đỉnh II có $V_e = 202$ ml. Từ đó, có thể nghĩ rằng ở hạt chín tỷ lệ các TI phân tử thấp đã tăng lên. Sắc ký DC hạt 60 ngày tuổi cũng nhận được sắc ký đồ giống với hạt 25 ngày tuổi (hình không trình bày ở đây) (bảng 1).

b) Thu đỉnh TIA

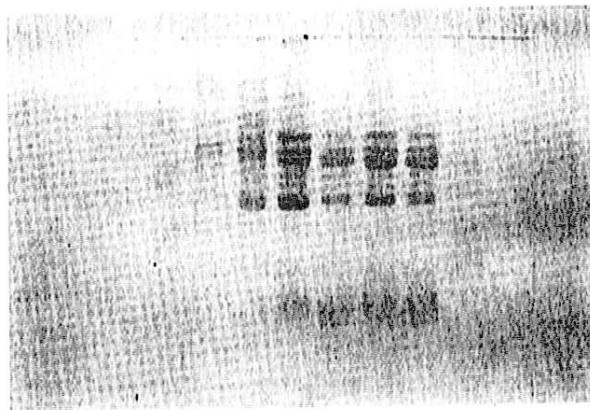
Tiến hành sắc ký qua cột Mono S hệ thống FPLC. Kết quả trên hình 3a, 3b cho thấy phổ protein của 2 mẫu này có những sai khác nhất định: ở hạt 25 ngày tuổi phần protein được rút xuống ở nồng độ muối 0,1 M có 1 cụm đỉnh protein được rút xuống sớm hơn các đỉnh A và B của hạt chín. Dựa vào thời gian lưu (retention time: viết tắt là rt), ở hạt 25 ngày tuổi không có các đỉnh tương ứng với đỉnh A và đỉnh B của hạt chín.

- Phần protein được rút xuống ở nồng độ muối 0,2 M của 2 mẫu có các đỉnh tương ứng về thời gian lưu như nhau (bảng 2): các đỉnh C₃, C₄, E, F của hạt chín (hình 3a) đều có hoạt tính ức chế tripxin, có thể tương ứng theo thứ tự với các đỉnh TIA c₃, c₄, e, f (hình 3b) của hạt 25 ngày tuổi; đỉnh D tương ứng với đỉnh TIA d. Sự sai khác chủ yếu là tỷ lệ giữa các đỉnh: ở hạt non đỉnh f chiếm tỷ lệ lớn hơn cả chiếm 57% tổng protein của các đỉnh trong khi ở hạt chín đỉnh protein này chiếm hơn 15%. Ngược lại, ở hạt chín đỉnh D và E chiếm đến hơn 68% tổng lượng protein của các đỉnh, trong khi ở hạt 25 ngày tuổi cả 2 đỉnh này chỉ chiếm gần 22% (bảng 2).

Bảng 1

Tóm tắt kết quả sắc ký qua cột Sephadex G-75

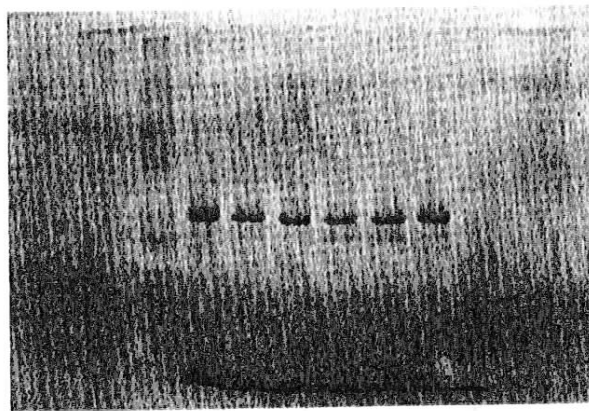
Hạt	Mẫu	Protein		TIA		HĐR IU/mg protein	Độ sạch
		mg	%	IU	%		
25 ngày tuổi	DC	66,0	100	86,0	100	1,30	1,00
	Sephadex G-75 (đỉnh TIA)	29,9	34,6	64,5	75	2,15	1,65
Hạt chín	LC	241,7	100	174,9	100	0,80	1,00
	Sephadex G-75 (đỉnh TIA)	120,0	49,6	158,8	90	1,32	1,65



(i)

15 25 35 45 50 55

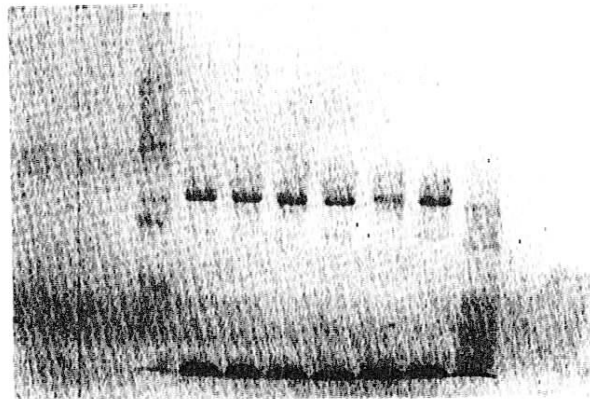
Ngày tuổi



(2)

60 65 70 75 80 85

Ngày tuổi

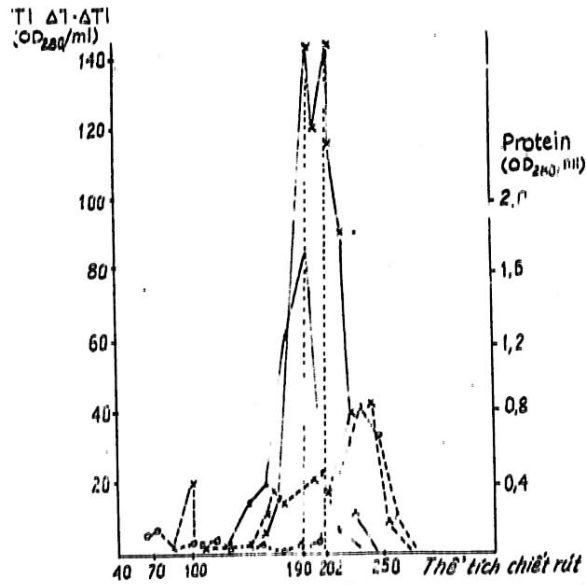


(3)

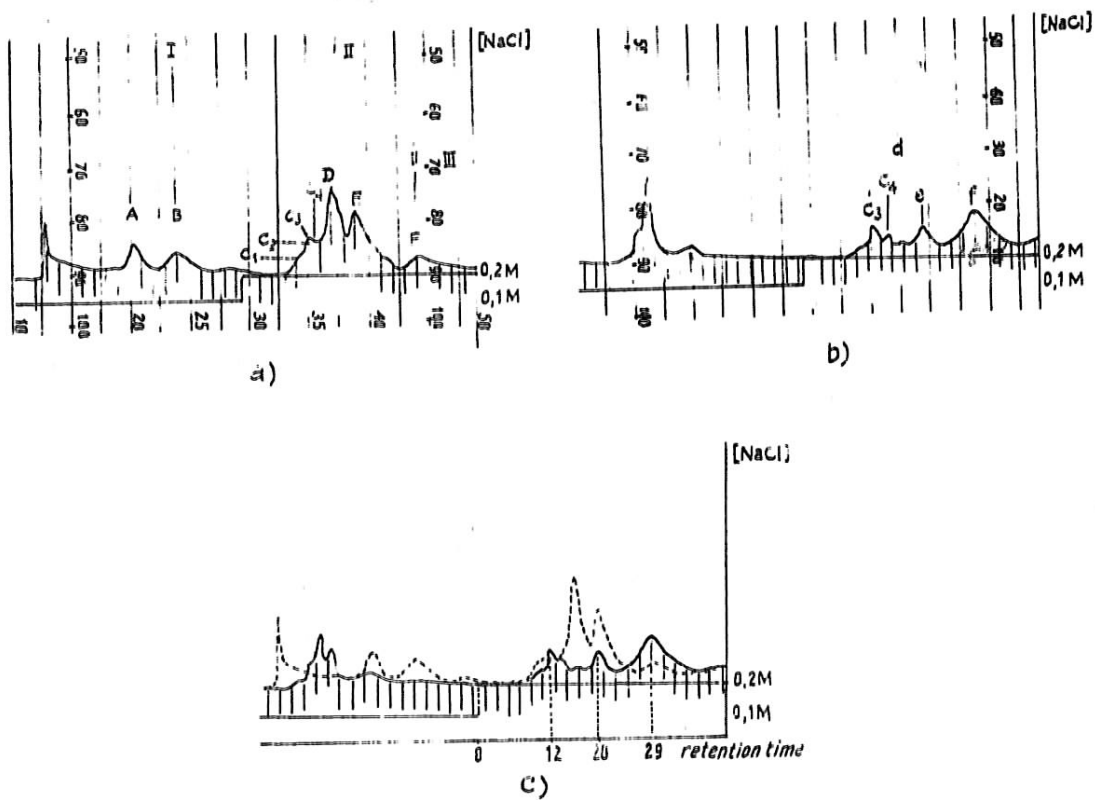
90 95 100 105 110 115

Ngày tuổi

Ảnh 2. Phổ điện di protein của hạt gạo ở các ngày tuổi khác nhau
Điện di trên PAG có DSC ở điều kiện không khử (không có mercaptoetanol)
(1) hạt gạo từ 15-55 ngày tuổi; (2) hạt gạo từ 60-85 ngày tuổi; (3): hạt gạo từ 90-115 ngày tuổi

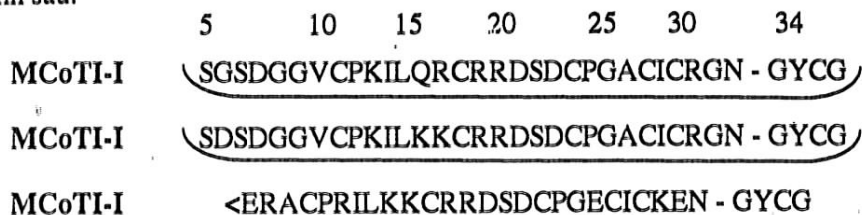


Hình 2. Sắc ký qua cột Sephadex G-75, kích thước cột: 2x94 cm, vận tốc 32 ml/h, phân đoạn 3 ml; thể tích mẫu = 5 ml, đệm axetat natri: 0,02 M pH = 5
 — x — TIA của hạt gấc chín - - - x - - Protein của hạt gấc chín
 — • — TIA của hạt 25 ngày tuổi - - - • - - Protein của hạt 25 ngày tuổi



Hình 3. Sắc ký đồ qua cột Mono S, hệ thống FPLC. Đệm natri axetat: 0,005 M, pH = 3,6
 a: hạt gấc chín, b: hạt gấc 25 ngày tuổi, c: vẽ chồng 2 đồ thị a và b để tiện so sánh
 --- hạt gấc chín, hạt gấc 25 ngày tuổi

Các TI của các đỉnh B, D, E, F của hạt chín đã được xác định cấu trúc bậc I [4] được mô tả theo hình sau:



Bảng 2

So sánh các đỉnh TIA của hạt gấc chín và hạt gấc 25 ngày tuổi nhận được sau khi sắc ký qua cột Mono S

Nồng độ NaCl của dung dịch	Hạt chín			Hạt 25 ngày tuổi		
	Đỉnh	Thời gian lưu (phút)	% tổng số đỉnh được rút xuống ở cùng nồng độ muối	Đỉnh ứng với các đỉnh của hạt chín	Thời gian lưu (phút)	% tổng số đỉnh được rút xuống ở cùng nồng độ muối
0,1 M	A					
	B	33,5				
0,2 M	C ₁	9,5	3,19			
	C ₂	10,5	4,15	c ₂	10,00	4,11
	C ₃	11,5	2,87	c ₃	12,00	9,36
	C ₄	13,5	5,75	c ₄	14,00	6,36
	D	16,5	34,18	d	16,50	6,36
	E	20,5	34,18	e	20,00	15,35
	F	29,5	15,72	f	29,00	57,30

và ký hiệu là MCoTI-I (B), -II (E) và -III (F). Các nghiên cứu cũng đã xác định đỉnh D là isofom của MCoTI-II, đỉnh F ngoài MCoTI-III còn có dạng succimide của MCoTI-II [4]. Đối chiếu các đỉnh TIA của hạt non với các đỉnh TIA của hạt chín, có thể nghĩ rằng ở hạt 25 ngày tuổi không có MCoTI-I hoặc chỉ có với lượng rất ít, lượng MCoTI-II cũng ít hơn MCoTI-III. Để khẳng định điều này, cần tiếp tục nghiên cứu xác định cấu trúc bậc I của các TI ở các đỉnh c, d, e, f của hạt non. MCoTI-I, -II, -III có khối lượng phân tử tương ứng là 3480,7 ; 3453,0 và 3379,6. MCoTI-I và -II có cấu trúc vòng kiểu nối đầu đuôi, bao gồm 34 axit amin trong đó có 6 gốc Cys tạo thành 3 cầu -S-S-, tuy nhiên chúng vẫn có những đặc tính chung của

các TI họ bầu bí. Cấu trúc vòng của MCoTI-I và -II là lần đầu tiên được phát hiện ở các TI thuộc họ bầu bí. Hơn nữa, theo cách định vị của các cấu trúc dioxunfua trong phân tử, 2 TI này được đề nghị là các thành viên đầu tiên của một họ mới thuộc Knottin vòng [1].

III. KẾT LUẬN

Sử dụng các phương pháp điện di, sắc ký lọc gel, sắc ký trao đổi ion để nghiên cứu các TI của hạt gấc trong quá trình hình thành và phát triển của hạt, đã đi đến một số kết luận sau:

1. Sự biến đổi hàm lượng chất khô, protein tan trong môi trường axit của hạt tăng lên từ 15

ngày tuổi đến khoảng 60-65 ngày tuổi, sau đó thay đổi không nhiều. TIA (tính trên g chất khô) cũng tăng nhanh từ hạt 25 ngày tuổi cho đến ngày thứ 70 (52 IU/g CK), sau đó có xu hướng giảm, đến ngày thứ 140 lại tăng lên (49,2 IU/g CK)

2. Phổ điện di TI cũng như phổ điện di protein của hạt non hơn 65 ngày tuổi có nhiều băng TI hơn các hạt già; ở hạt từ 70 ngày tuổi trở đi, số băng TI được phát hiện ít hơn nhiều so với các hạt non. Các TI phân tử thấp nhất và là TI chủ yếu của hạt chín đã có ở hạt 25 ngày tuổi.

3. Sắc ký qua cột Mono S, hệ thống FPLC đã tách được từ hạt 25 ngày tuổi các đỉnh TIA tương ứng với MCoTI-III của các hạt chín tuy nhiên khác nhau rõ rệt về tỷ lệ: ở hạt 25 ngày tuổi, đỉnh tương ứng với MCoTI-III (và dạng succinimide của MCoTI-II của hạt chín) chiếm ưu thế. Ngoài ra, ở hạt 25 ngày tuổi, không phát hiện được đỉnh nào tương ứng với MCoTI-I của hạt chín.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Annie Heltz et al., 2001: Biochemistry, 40: 7973-7983.
2. Hanspal J. S., Bushell G. I., Ghosh P., 1983: Anal. Biochem, 132: 288-292.
3. Heussen. C., Dowdle E. B., 1980: Analyt Biochem., 102: 196- 202.
4. Jean- Francois Hernandez et al., 2000: Biochemistry, 39: 5722-5730.
5. Leammil U. K., 1970: Nature, 277: 680-685.
6. Lowry O. H et al., 1951: J. Biol. Chem., 193: 265-270.
7. Phạm Trần Châu, 1986: Biochem. Physiol. Pflanzet, 181: 565-569
8. Phạm Trần Châu, J. Leluk, 1987: Tạp chí Sinh học, 9(1): 1-7.
9. Phạm Thị Trần Châu, 1987: Trypsin inhibitors of white bush (*Cucurbita pepo* var. *Patisonina*) fruits and seeds. Publishing House: Univ. of Wroclaw: 110 pages
10. Phạm Thị Trần Châu và cs., 2000: Tạp chí Khoa học, ĐHQG Hà Nội, XVI(1): 1-11.
11. Phan Thị Hà, Phạm Thị Trần Châu, 2000: Tạp chí Sinh học, 22(3): 31-37.
12. Phạm Tuấn Nghĩa, Phạm Trần Châu, 1990: Proceeding of the National center of Scientific Research of Vietnam, 2: 129-135.
13. Pietrova J. S., Wincjunajte M. M., 1966: Priklad. Biochem. Mikrobiol. 2: 232 (in Russian).
14. Quyen N. H. M. and Phạm Trần Châu, 1994: Proceedings of the 11th FAOBMB Symposium 15-18/11/1994. Biopolymers and Bioproducts: Structure, Functions and Applications: 399-405. Samakkhisan (dokya) Public Company Limited 1995.
15. N. H. M. Quyen và cs., 1997: Tạp chí Khoa học, ĐHQG Hà Nội, XIII: 20-27.

STUDY ON THE CHANGE OF TRYPSIN INHIBITORS (TI) IN THE SEEDS OF MOMORDICA COCHINCHINENSIS DURING THEIR FORMATION AND DEVELOPMENT

NGUYEN QUYNH UYEN et al.

SUMMARY

Using PAGE, column chromatography to study the qualitative and quantitative changes in TIs from developing seeds of *Momordica cochinchinensis* showed that:

1. The change in dry substances and proteins increased from day 15 after the flowering (aff.) to day 65 aff., then slightly decreased.

TIA (per dry substances) of the seeds also quickly increased from day 15 aff., to day 70 aff. (52 IU/g dry substances), then changed to lower level but at day 140 aff., it reached to 49,2 IU/g dry substances.

2. Electrophoretic patterns of TIs from the younger than 65 days aff. seeds showed much more bands than those of the over 70 days aff. seeds. The major TIs of the lowest Mr in the mature seeds were also discovered in the 25th day seeds.

3. Using chromatography method on sephadex G-75 and Mono S column to fractionate TIs from the seeds indicated that: in the 25th day seed extract there exist the TIA peaks named e, f corresponding to the MCoTI_II and MCoTI_III of the mature seeds. However, in the young seeds, peak f was the major one while in mature seeds MCoTI_III was the minor TI as compared with MCoTI_II. Moreover, no TIA peak corresponded to MCoTI_I was found in young seeds.

Ngày nhận bài: 17-8-2001