

THÀNH PHẦN PROTEINAZ NGOẠI BÀO CỦA VI KHUẨN CỘNG SINH VỚI TUYẾN TRÙNG (*XENORHABDUS SP. CA*)

Trịnh Hồng Thái, Trịnh Thị Thanh Hương,
Lương Thuỳ Dương, Phan Thị Hà

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

1. Mở đầu

Vi khuẩn *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* cộng sinh với hai chủng tuyến trùng *Steinernema* và *Heterorhabditis* tương ứng [1]. Trong phức hệ cộng sinh này, vi khuẩn nằm trong ống tiêu hoá của tuyến trùng. Khi tuyến trùng xâm nhập vào côn trùng, vi khuẩn đi vào xoang máu của côn trùng. Tại đây, chúng nhân lên về số lượng và tạo ra các yếu tố gây bệnh côn trùng như lipopolysaccharit, proteinaz, lipaz, các chất kháng sinh và các protein độc [6].

Trên thế giới, tuyến trùng đã được sử dụng trong phòng trừ sinh học có hiệu quả. Các proteinaz cũng đã được nghiên cứu nhiều ở các vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng [7,8,10]. Các proteinaz này có vai trò quan trọng tham gia vào quá trình diệt côn trùng.

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, tuyến trùng cũng đã được nghiên cứu và sử dụng trong phòng trừ sinh học [4,5]. Trong các công trình nghiên cứu trước, chúng tôi đã tiến hành phân tích proteinaz ngoại bào của các vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng được phân lập ở Việt Nam. Các proteinaz này thuộc loại proteinaz kiềm, khá đa dạng và phong phú [9].

Nhằm tiếp tục tìm hiểu proteinaz của vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng, trong bài viết này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về thành phần proteinaz của vi khuẩn *Xenorhabdus sp. CA* làm cơ sở cho việc sử dụng có hiệu quả phức hợp tuyến trùng-vi khuẩn trong phòng trừ sinh học ở nước ta hiện nay.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Vi khuẩn *Xenorhabdus sp. CA* được phân lập từ tuyến trùng *Steinernema carpocapsae* do Phòng Tuyến trùng, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Nghĩa Đô-Từ Liêm, Hà Nội cung cấp.

Chữ viết tắt: DMSO: Dimethyl Sulfoxide, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, pCMB: p-chloromercuribenzoate, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, o-phe: 1,10 – o-phenanthroline; SDS: sodium dodecyl sulfate.

Vi khuẩn được phân lập trên môi trường NBTA- môi trường dinh dưỡng agar (3g cao thịt, 5g pepton, 15g thạch, dẫn nước đến 1lít, tiệt trùng trong 30 phút ở 0,8 atm) có chứa 25mg Bromothymol Blue và 40mg Triphenyltetrazolium Chloride. Tách một khuẩn lạc, cấy vào môi trường dinh dưỡng không có agar. Nuôi cấy được thực hiện trên máy lắc ổn nhiệt 220 vòng/phút ở 30⁰C, lắc qua đêm. Sau đó, 2ml dịch nuôi cấy được chuyển vào 100ml môi trường dinh dưỡng như trên và lắc ở 30⁰C trong 48 giờ.

Dịch nuôi cấy sau 48 giờ được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4⁰C, thu lấy dịch trong, sau đó lọc qua màng 0,22 μ m và sử dụng cho nghiên cứu.

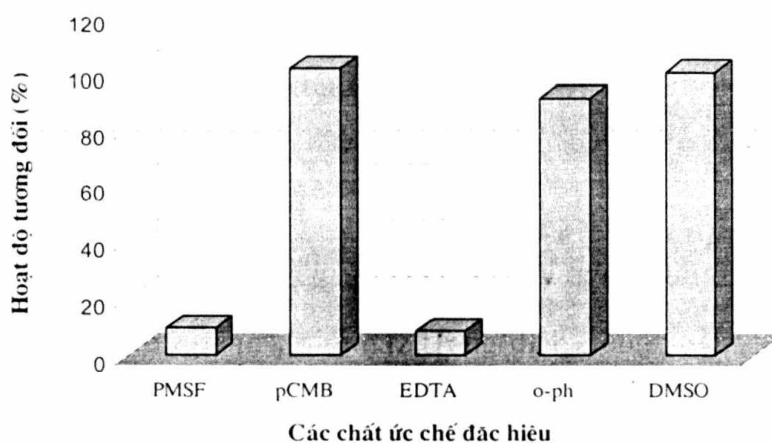
Hoạt độ proteinaz đã được xác định theo phương pháp Kunitz có cải tiến như đã mô tả trước đây [10].

Điện di proteinaz theo phương pháp của Heussen và Dowdle (1980) được thực hiện như đã mô tả từ trước [10].

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của các chất ức chế đặc hiệu nhóm đến hoạt độ enzym

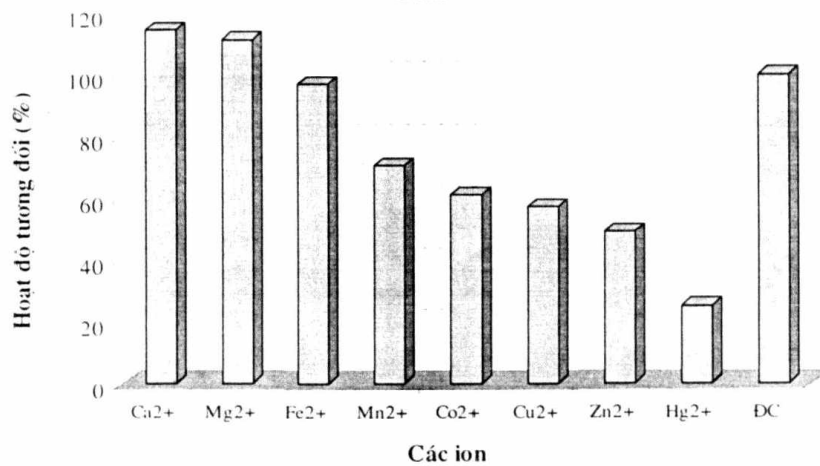
Để sơ bộ xác định thành phần proteinaz trong dịch nuôi cấy vi khuẩn, chúng tôi đã tiến hành thử tác dụng của bốn chất ức chế đặc hiệu nhóm (PMSF, pCMB, EDTA và o-phenanthroline). Kết quả cho thấy: enzym bị ức chế mạnh nhất bởi EDTA và PMSF (hình 1). PMSF là chất ức chế đặc hiệu với nhóm proteinaz xêrin, còn EDTA là chất ức chế đặc hiệu với nhóm proteinaz kim loại. Như vậy, trong dịch nuôi cấy vi khuẩn có thể chứa hai loại proteinaz: proteinaz kim loại và proteinaz xêrin.



Hình 1: Ảnh hưởng của các chất ức chế đặc hiệu nhóm đến hoạt độ proteinaz của vi khuẩn *Xenorhabdus sp. CA*

3.2. Ảnh hưởng của các ion kim loại hoá trị hai đến hoạt độ enzym

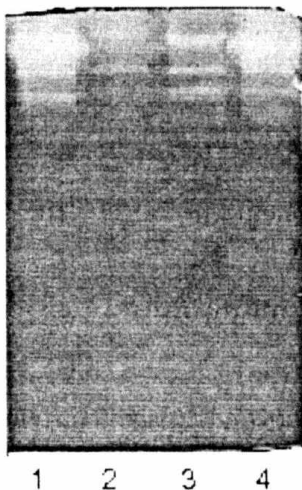
Các ion kim loại được sử dụng gồm 8 ion: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} với nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp phản ứng bằng 10^{-3} M. Kết quả cho thấy enzym bị giảm hoạt tính mạnh nhất bởi Hg^{2+} , sau đó đến Zn^{2+} , Co^{2+} và Cu^{2+} ; ngược lại, ion Ca^{2+} và Mg^{2+} đã làm tăng hoạt độ enzym 10-15% (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của ion kim loại hoá trị hai đến hoạt độ proteinaz của vi khuẩn *Xenorhabdus sp. CA*

3.3. Xác định thành phần proteinaz bằng điện di

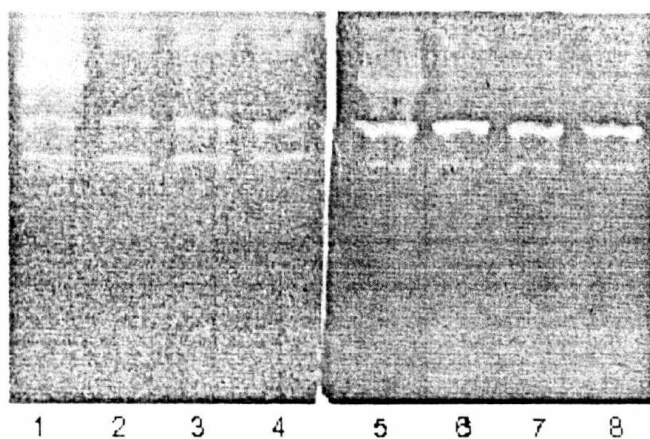
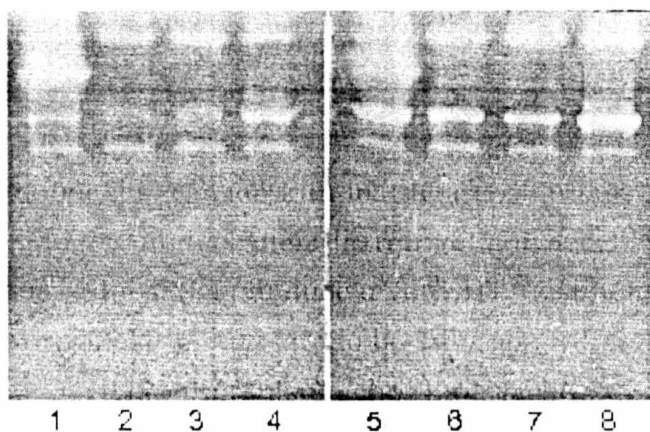
Để đi sâu phân tích thành phần proteinaz có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn, chúng tôi đã tiến hành điện di trên gel polyacrylamit có SDS và có cơ chất gelatin 0,1% (hình 3). Các băng enzym được nhận thấy trên bản gel nằm trong 3 vùng (I, II và III) với độ di động điện di tương ứng bằng: (0-0,08), (0,09-0,20) và (0,25-0,31). Trong đó các băng trong vùng II thể hiện hoạt độ mạnh nhất, chúng bị ức chế mạnh bởi cả EDTA và PMSF. Ngược lại, hai loại chất ức chế này đều không ức chế các băng trong vùng I. Tuy nhiên, các băng trong vùng III bị ức chế mạnh khi ủ với PMSF nhưng cũng bị ức chế một phần bởi EDTA.

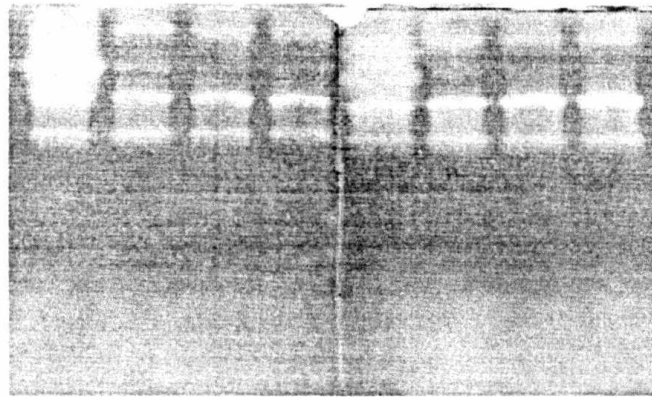


Hình 3. Điện di proteinaz trên gel polyacrylamit có SDS và có cơ chất gelatin 0,1%: ảnh hưởng của EDTA và PMSF lên hoạt độ của proteinaz trong dịch nuôi cấy vi khuẩn *Xenorhabdus sp. CA*.

Chú thích trên hình điện di: giếng
1: đối chứng nước; 2: EDTA; 3:
PMSF; 4: DMSO

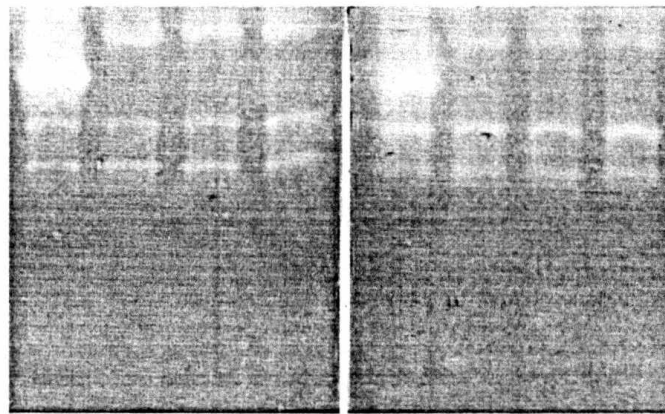
Để đánh giá ảnh hưởng của các ion kim loại hoá trị hai đối với các băng proteinaz bị ức chế bởi EDTA, mẫu nghiên cứu được điện di trên gel polyacrylamit có SDS và có cơ chất gelatin 0,1%. Chuẩn bị mẫu như sau: mẫu được ủ với EDTA với nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp phản ứng bằng $10^{-3}M$ trong 10 phút, sau đó bổ sung ion kim loại với nồng độ cuối cùng bằng $10^{-3}M$; $2,5 \cdot 10^{-3}M$ và $5 \cdot 10^{-3}M$. Kết quả đã cho thấy: các ion Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} đã làm tăng rõ rệt hoạt độ enzym thuộc vùng III; các ion Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} thể hiện ảnh hưởng không rõ ràng. Điều đáng lưu ý là: các ion Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} chỉ ảnh hưởng đến hoạt độ của băng proteinaz 0,25, còn Pb^{2+} chỉ có tác dụng đối với băng 0,31. Tuy nhiên, chúng tôi chưa tìm thấy ion kim loại nào có tác dụng khôi phục hoạt tính của các băng enzym vùng II (hình 4).





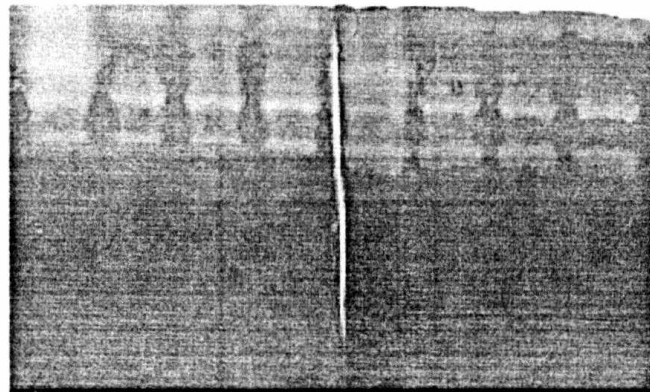
1 2 3 4 5 6 7 8

(c)



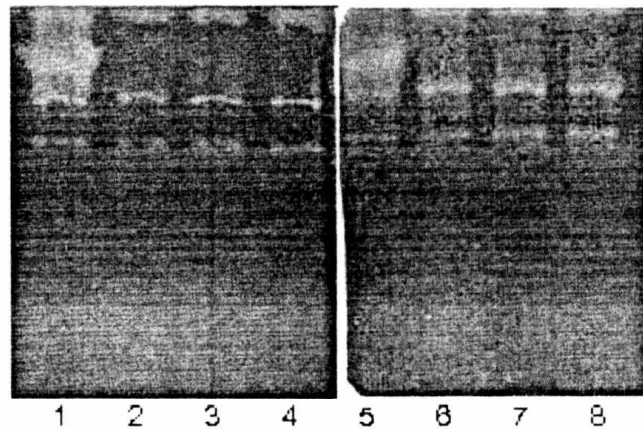
1 2 3 4 5 6 7 8

(d)

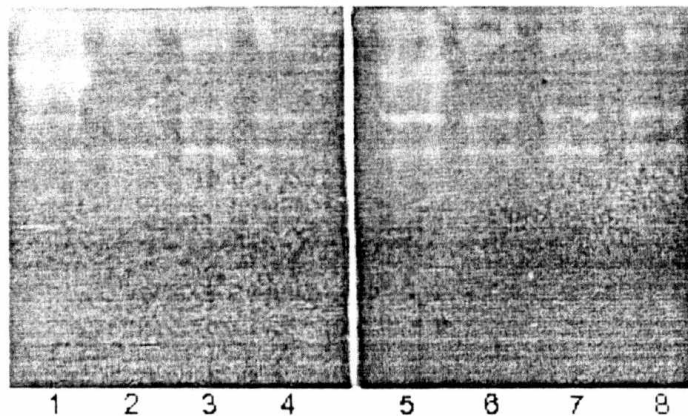


1 2 3 4 5 6 7 8

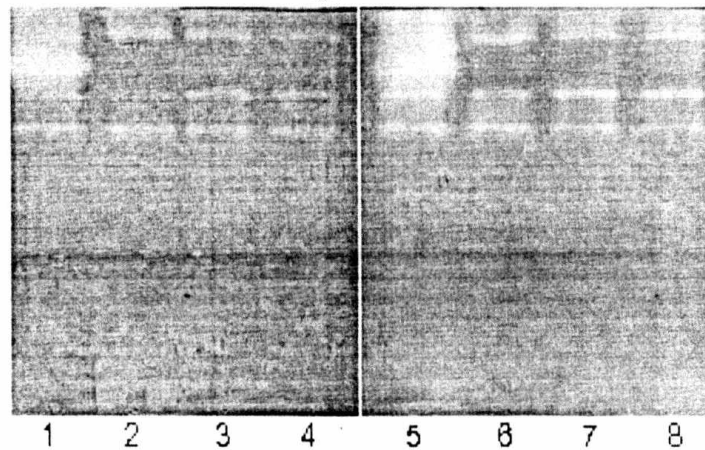
(e)



(f)



(g)



(h)

Hình 4. Điện di proteinaz trên gel polyacrylamit có SDS và có cơ chất gelatin 0.1%: ảnh hưởng của các ion kim loại đối với hoạt độ proteinaz của vi khuẩn *Xenorhabdus sp.* CA sau khi bị ức chế bởi EDTA.

Chú thích trên hình điện di: giếng 1, 5: đối chứng nước; 2, 6: đối chứng EDTA; 3, 7 và 4, 8: proteinaz sau khi bị ức chế bởi EDTA được ủ với ion kim loại nồng độ $2,5 \cdot 10^{-3}M$ và $5 \cdot 10^{-3}M$, tương ứng. Sau khi điện di: nửa bản gel (có các giếng 1-4) được ủ với đệm glycin-NaOH 0.1M pH 8.0 không có ion kim loại; nửa bản gel (có các giếng 5-8) được ủ với đệm trên, có ion kim loại nồng độ $2,5 \cdot 10^{-3}M$. (a): Ca^{2+} , (b): Ba^{2+} , (c): Mg^{2+} , (d): Mn^{2+} , (e): Pb^{2+} , (f): Ni^{2+} , (g): Cd^{2+} , (h): Fe^{2+}

Các nghiên cứu từ trước đều cho biết vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng tiết ra một lượng lớn proteinaz trong môi trường nuôi cấy [2,7,8,9,10]. Các proteinaz này được phân loại thuộc proteinaz kiềm với pH thích hợp bằng 8 và thuộc nhóm proteinaz kim loại do chúng bị ức chế mạnh bởi EDTA, chúng không bị ức chế bởi PMSF[8,10]. Tuy nhiên, rất ít công trình nghiên cứu đi sâu phân tích thành phần proteinaz ngoại bào của vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy proteinaz ngoại bào của *Xenorhabdus sp.* CA. không những bị ức chế mạnh bởi EDTA mà còn bị ức chế mạnh bởi PMSF. Bằng kỹ thuật điện di proteinaz, chúng tôi đã xác định được thành phần của proteinaz, trong đó băng proteinaz có hoạt độ mạnh nhất thuộc vùng II bị ức chế mạnh bởi cả EDTA và PMSF, còn các băng proteinaz trong vùng III bị ức chế mạnh bởi PMSF nhưng cũng bị ức chế một phần bởi EDTA. Nghiên cứu ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ proteinaz đã cho thấy các ion Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} có tác dụng khôi phục hoạt tính của băng 0,25 sau khi bị ức chế bởi EDTA, còn Pb^{2+} chỉ có tác dụng với băng 0,31. Vì vậy, có thể cho rằng hai băng này thuộc loại proteinaz kim loại-xêrin như đã được tìm thấy ở vi khuẩn *Bacillus pumilus* [3]. Bước tiếp theo cần phải tinh sạch, nghiên cứu tính chất và cấu trúc của phân tử proteinaz.

4. Kết luận

1) Bằng kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamit có SDS và có gelatin 0,1% đã xác định được proteinaz ngoại bào của vi khuẩn *Xenorhabdus sp.* CA gồm 3 vùng (I, II và III) với độ di động điện di tương ứng bằng: (0-0,08), (0,09-0,20) và (0,25-0,31) .

2) Các băng trong vùng II thể hiện hoạt độ mạnh nhất, chúng bị ức chế mạnh bởi cả EDTA và PMSF. Các băng trong vùng III bị ức chế mạnh khi ủ với PMSF nhưng cũng bị ức chế một phần bởi EDTA. Chúng thuộc loại proteinaz kim loại-xêrin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boemare N., A. Givaudan, Brehelin M. and C. Laumond, Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complex, *Symbiosis*, 22(1997), pp 21-45.
2. Caldas C., A. Cherqui, A. Pereira, N. Simoes, Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3(2002), pp 1297-1304.
3. Phạm Thị Trân Châu and Urbanek H., Serine neutral proteinase from *Bacillus pumilus* as metalloenzyme, *Acta Microbiologica Polonica*, Ser. B, 6, (23), 1(1974), pp 21-25.
4. Nguyễn Ngọc Châu, Nghiên cứu sử dụng tuyến trùng trong phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng ở Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Hà Nội, XXXVI, 3(1998), tr 24-29.
5. Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh, Lại Phú Hoàng, Phan Kế Long, Bước đầu điều tra tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, Hà Nội, 21, 2b(1999), tr 90-95.

6. Forst S., and K. Nealson, Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp, *Microbiological Reviews*, 60(1996), pp 21-43.
7. Ong K.L., F.N. Chang, Analysis of proteins from different phase variants of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus luminescens* by two dimensional zymography, *Electrophoresis*, 18(1997), pp834-839.
8. Schmidt T.M., B. Bleakley, and K.H. Nealson, Charaterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 11(1998), pp 2793-2797.
9. Trịnh Hồng Thái, Nguyễn Hoài Hà, Phạm Thị Trân châu, Bước đầu nghiên cứu proteinaz của vi khuẩn phân lập từ tuyến trùng *Steinernema carpocapsae* TL và *Heterorhabditis* sp. TK3, *Tạp chí Sinh học*, Hà Nội, 21b(1999), tr 173-179.
10. Trinh H Thai, R.A. Boigegrain. M. Brehelin, Purification and characterization of the extracellular protease from the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, *J. Genetics and Applications*. Special Issue, Biotechnology, 2001, pp 10-17.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N_o3, 2004

COMPOSITION OF EXTRACELLULAR PROTEINASE PRODUCED BY ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA (*XENORHABDUS* SP. CA)

**Trinh Hong Thai, Trinh Thi Thanh Hương,
Luong Thuy Duong, Phan Thi Ha**

Department of Biology, College of Science, VNU

Xenorhabdus sp.CA, an entomopathogenic bacterium associated with the *Steinernema carpocapsae* was isolated in Vietnam. Extracellular proteinase of *Xenorhabdus* sp.CA was strongly inhibited by EDTA and PMSF. Proteinase composition was analyzed by using a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis incorporating 0.1% gelatin. Proteinase activity was identified in 3 areas (I, II, II) with relative motility of (0-0,08), (0,09-0,20) và (0,25-0,31), respectively. Proteinase activity of II was the strongest, the proteinases were inhibited by EDTA and PMSF. In contrary, they didn't inhibit the proteinases of I. However, the proteinases of III were strongly inhibited by PMSF and partly inhibited by EDTA.

Ions of Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺ increased the proteinase activity of III, however, the effect of Ni²⁺, Cd²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ was very weak. It is interested that ions of Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ influenced on the band of 0.25, and Pb²⁺ influenced only on the band of 0.31. Unexpectedly, we didn't find any metal ions which effected on the proteinases of II. The proteinases were classified as serine metalloproteinase.