

# TINH SẠCH CHẤT ỨC CHẾ TRYPSIN (TI) TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG (GLYCINE MAX L.)

Phan Tuấn Nghĩa, Đặng Quang Hưng

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

## 1. Đặt vấn đề

Hạt đậu tương (*Glycine max* L.) có chứa hai ức chế trypsin điển hình với khối lượng phân tử 8 kDa và 20 kDa và được gọi tương ứng là chất ức chế Bowman-Birk và chất ức chế Kunitz theo cách gọi của các tác giả lần đầu tiên phát hiện và tinh sạch chúng [2, 4,]. Cho đến nay các tính chất của cả hai chất ức chế này đã được nghiên cứu rất kỹ [1, 6]. Cả hai chất đều đã được một số hãng hoá chất tinh sạch và sản xuất làm các protein chuẩn cho việc xác định khối lượng phân tử bằng sắc ký lọc gel và bằng điện di. Tuy nhiên, ở Việt Nam cho đến nay chưa có công trình nào báo cáo về việc tinh sạch các chất ức chế này. Nghiên cứu này nhằm mục đích thiết lập một qui trình tương đối đơn giản, dễ áp dụng để tinh sạch chất ức chế Kunitz (KI), với khối lượng 20 kDa vốn khá bền với nhiệt, có hàm lượng tương đối cao trong nguồn nguyên liệu bột đậu tương dễ kiếm, giá rẻ để có thể sử dụng như một protein chuẩn cho việc đánh giá khối lượng của các protein thay cho việc nhập ngoại giá cao.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Hạt đậu tương (*Glycine max* L.) được mua từ hàng hạt giống Hà Nội và được định tên khoa học bởi chuyên gia phân loại thực vật.

Trypsin của hãng Sigma (Mỹ), các protein chuẩn của hãng Pharmacia (Thụy điển). Trypsin-Sepharose được chúng tôi tự tổng hợp bằng cách gắn trypsin tinh khiết của hãng Sigma vào Sepharose 4B đã được hoạt hoá bằng BrCN của Hãng Pharmacia. Các hoá chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dành cho phân tích.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hoạt độ ức chế trypsin (TIA) được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và phương pháp được mô tả trong [7]. Một đơn vị chất ức chế trypsin là lượng chất ức chế có khả năng làm giảm 50% hoạt độ của 2 mg trypsin tinh khiết trong các điều kiện phân tích.

Protein được xác định bằng hai phương pháp: đo độ hấp thụ ánh sáng ở vùng bước sóng 280 nm ( $A_{280}$ ) đối với các phân đoạn thu qua các cột sắc ký cột và phương pháp Lowry [5] sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn.

Điện di trên gel polyacrylamid có SDS ( SDS-PAGE) được thực hiện theo phương pháp của Laemmli [3]. Trong toàn bộ nghiên cứu này chúng tôi dùng nồng độ gel tách là 12,5% và nồng độ gel cô là 4%.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Chuẩn bị dịch chiết hạt đậu tương

Hạt đậu tương được nghiền mịn. 20 g bột nghiền mịn được loại mỡ bằng ete etylic (theo tỷ lệ 1 g bột 5 ml ete). Pha nổi ở trên chứa mỡ trong ete được gạn bỏ, phần bột đã loại mỡ được cho làm bay hơi ete ở nhiệt độ phòng.

Bột đậu tương loại mỡ được chiết bằng đệm Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5 có chứa 50 mM KCl (đệm A) theo tỷ lệ 1:5 (khối lượng:thể tích) trong 1 giờ. Dịch đồng thể được ly tâm ở 14.000 v/ph trong 20 phút ở 4°C. Dịch trên tủa được thu lại. Kết tủa được chiết lại với cùng đệm A nhưng theo tỷ lệ 1:3 (w:v) và thu dịch trên tủa bằng ly tâm.

#### 3.2. Sắc ký trao đổi ion qua cột DE-52 cellulose

Dịch chiết hạt đậu tương của hai lần được trộn lại và cho lên cột DE-52 cellulose (có kích thước 1,6x 8 cm) đã được cân bằng với đệm A ở trên. Tốc độ lên cột là 20 ml/giờ.

Sau khi cho toàn bộ dịch chiết chảy qua cột, cột được rửa bằng đệm A cho đến khi  $A_{280}$  của dịch rửa chiết nhỏ hơn 0,005 (khoảng 120 ml) và sau đó được phản hấp thụ bằng gradient NaCl từ 0,05-1,0M pha trong cùng đệm A. Tốc độ rửa chiết là 25 ml/giờ với mỗi phân đoạn thu là 2ml.

Kết quả cho thấy protein và TIA được phát hiện ở cả phần dịch không hấp thụ (phân đoạn I). Tuy nhiên, qua thử nghiệm chúng tôi thấy chất ức chế Kunitz (KI) không thuộc phân đoạn I nên chúng tôi không tiếp tục tinh sạch KI từ phân đoạn này. Sắc ký đồ của phần protein hấp thụ trên cột (hình 1) cho thấy có hai đỉnh protein chính, trong đó chỉ đỉnh thứ nhất được đẩy ra ở nồng độ NaCl từ 0,3 đến 0,5M là có TIA (và được ký hiệu là phân đoạn II). Còn đỉnh protein thứ hai được đẩy ra ở nồng độ NaCl cao hơn thì không có TIA. Nhờ loại bỏ được phần protein không gắn với cột và phần protein có ái lực cao do đó chế phẩm KI thu được đã có độ sạch tăng lên 10,2 lần so với ban đầu (bảng 1). Kết quả SDS-PAGE của phân đoạn II còn chứa rất nhiều băng protein, trong đó có băng với khối lượng phân tử 20 kDa (hình 3).

#### 3.3. Sắc ký qua cột lọc gel Sephadex G-100

Các phân đoạn II có TIA của bước sắc ký qua cột DE-52 cellulose được dồn lại, loại muối bằng thẩm tích, cô đặc đến 2 ml và cho sắc ký qua cột qua cột lọc gel Sephadex G-100 (có kích thước 1x70 cm) đã được cân bằng cùng đệm A. Cột được rửa chiết bằng cùng đệm A với tốc độ dòng chảy 20 ml/giờ, thu mỗi ống 2,5 ml.

Sắc ký độ phân đoạn II sau khi qua cột lọc gel có 1 đỉnh protein lớn và một vùng đỉnh kéo dài đến ống thứ 40, tuy vậy chỉ có một đỉnh TIA, ứng với các ống từ 10-22 là có TIA. Như vậy bước sắc ký lọc gel đã cho phép loại bỏ nhiều protein không mong muốn, nhờ đó độ sạch của chế phẩm KI đã được tăng lên 12,6 lần so với ban đầu (bảng 1). Tuy vậy, kết quả chạy SDS-PAGE cho thấy chế phẩm vẫn còn một số băng protein khác nhau, chúng tỏ cần phải được tiếp tục tinh sạch.

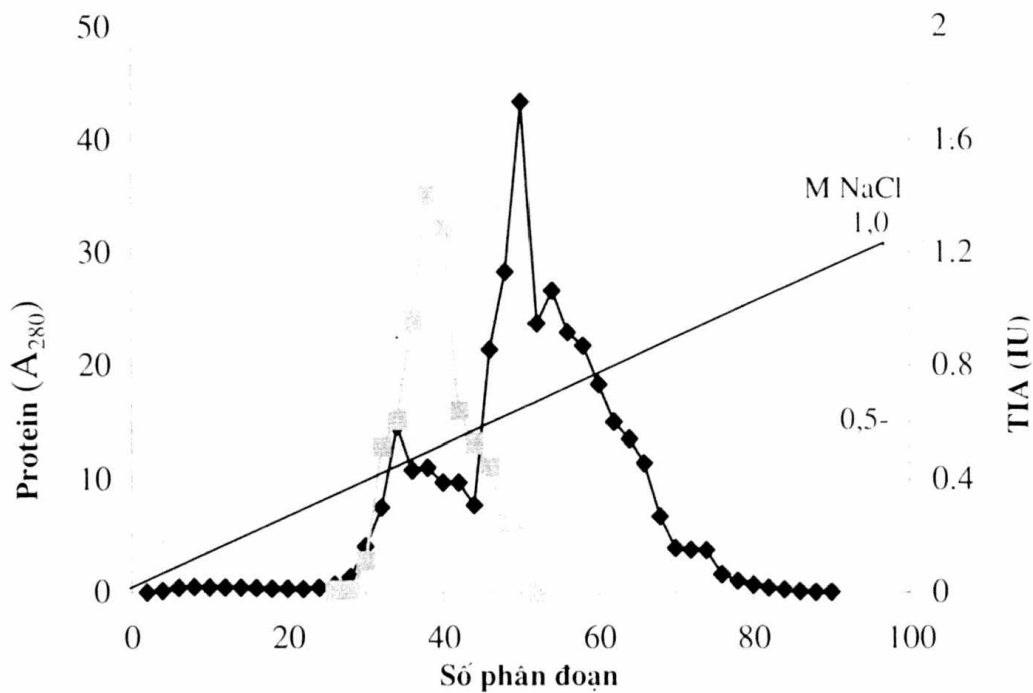
### **3.4. Sắc ký ái lực qua cột Trypsin-Sepharose 4B.**

Đỉnh TIA từ bước sắc ký lọc gel được thu lại, thẩm tích đối đệm A và cho sắc ký qua cột trypsin-sepharose 4B đã được cân bằng với đệm A có chứa 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Protein không hấp thụ và gắn không đặc hiệu được đẩy bằng dung dịch NaCl 1M pha trong cùng đệm A. Phần protein gắn đặc hiệu trên cột được đẩy bằng dung dịch HCl 0,001M có chứa 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Kết quả phân tích cho phần dịch đẩy bằng NaCl có protein nhưng không có TIA. Dịch phần hấp thụ có chứa cả protein và TIA. Độ sạch của chế phẩm qua bước này tăng lên 37,2 lần.

Kết quả phân tích SDS-PAGE (hình 3) cho thấy, chế phẩm KI thu được (cột 6 và 8) có duy nhất một băng protein với kích thước bằng 20 kDa, nằm đúng vị trí của băng chất ức chế Kunitz từ đậu tương trên đường chạy của các protein chuẩn. Kết quả này chứng tỏ chế phẩm TI thu được là đã tinh sạch. Quy trình tinh sạch TI từ đậu tương được tóm tắt ở bảng 1 bao gồm các bước: loại mỡ bằng etylic và chiết bằng đệm Tris-HCl, sắc ký qua cột trao đổi ion DE-52 cellulose, sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-100 và sắc ký ái lực qua cột Trypsin-Sepharose 4B.

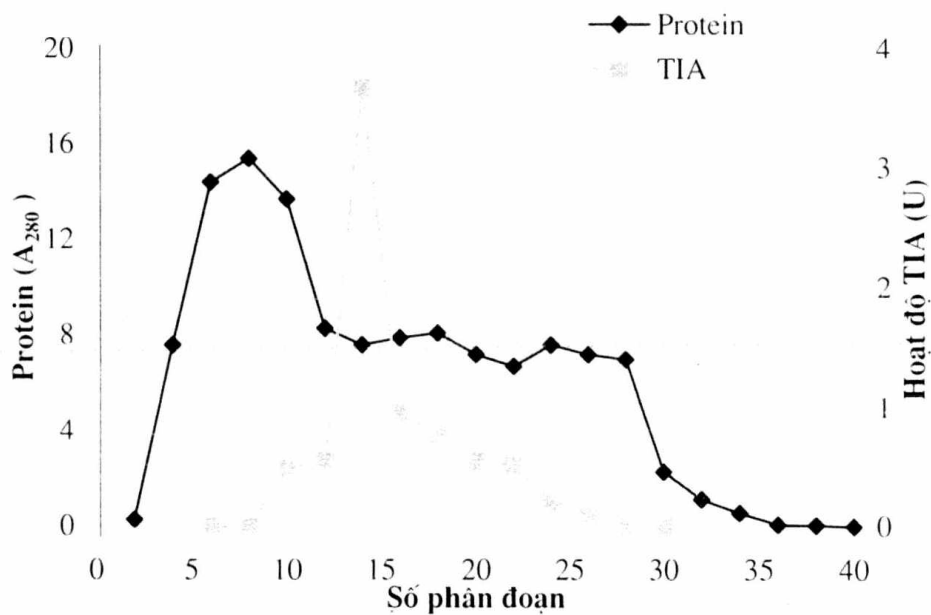
## **4. Thảo luận**

Chất ức chế Kunitz (KI) với hoạt tính ức chế trypsin lần đầu tiên đã được Kunitz tách ra từ hạt đậu tương một qui trình nhiều bước khác nhau [2]. Sau này Fedurkina và Mosolov [1] đã phát triển một phương pháp tinh sạch KI từ hạt đậu tương rất đơn giản bằng sắc ký hấp thụ miễn dịch, trong đó các tác giả đã sử dụng KI thương mại gây kháng thể kháng KI ở thỏ và gắn kháng thể thu được lên Sepharose 4B để tạo cột ái lực. Tuy nhiên, bước phức tạp của phương pháp này là phải gây được kháng thể kháng KI. Quy trình của chúng tôi với 3 bước sắc ký phối hợp ở trên là dễ dàng áp dụng với các phòng thí nghiệm hoá sinh thông thường hiện nay. Quy trình cho phép thu được khoảng 6 mg KI từ 20 gam nguyên liệu ban đầu. Chế phẩm có độ tinh khiết cao, hoàn toàn phù hợp với mục đích sử dụng như một protein chuẩn cho việc đánh giá khối lượng phân tử bằng sắc ký hay điện di. Hơn thế nữa, với hoạt độ riêng 1,17 IU/mg protein (bảng 1) và dựa trên tỷ lệ ức chế 1mol KI: 1mol trypsin cho thấy, KI thu được vẫn giữ nguyên hoạt độ ức chế enzym đích.



Hình 1: Sắc ký qua cột DE-52 cellulose dịch chiết hạt đậu tương có chứa chất ức chế trypsin.

Cột có kích thước 1,6x8cm được cân bằng với đệm A. Tốc độ rửa chiết 25 ml/giờ, thu mỗi phân đoạn 2,0 ml

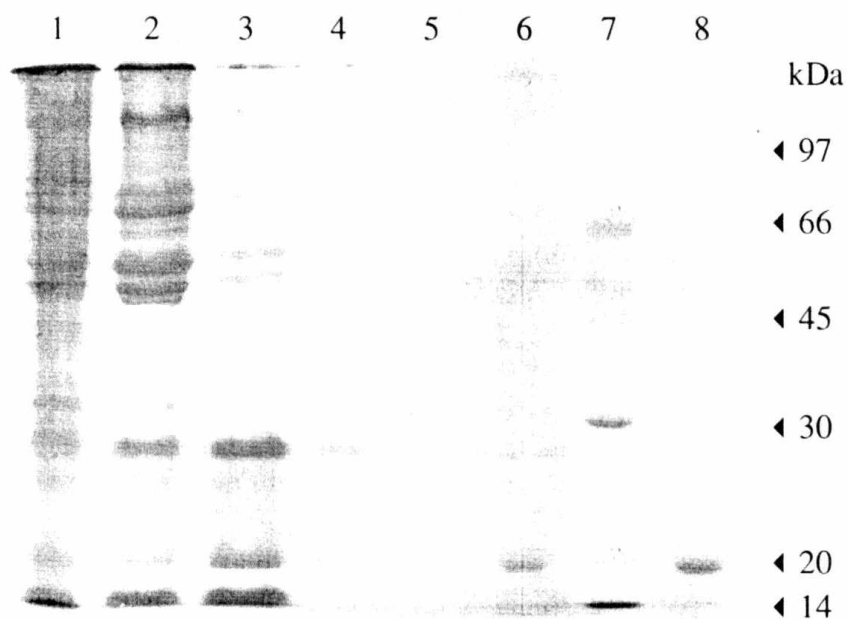


Hình 2: Sắc ký qua cột Sephadex G100 phân đoạn TI của hạt đậu tương.

Cột có kích thước 1 x 70cm được cân bằng với đệm A. Tốc độ rửa chiết 20 ml/giờ, thu mỗi phân đoạn 2,5 ml.

**Bảng 1:** Tóm tắt qui trình tinh sạch chất ức chế trypsin 20 kDa từ hạt đậu tương

STT	Bước tinh sạch	Kết quả tinh sạch			
		Protein (mg)	TIA (đơn vị)	Hoạt độ riêng (đơn vị/ mg protein)	Hệ số tinh sạch (lần)
1	Loại mỡ bằng ete etylic và chiết bằng đệm A	1.125	33,28	0,0314	1,00
2	Sắc ký qua cột DE-52 Đỉnh thứ nhất	38,4	12,23	0,318	10,2
3	Sắc ký qua cột Sephadex G-100 đỉnh TIA của cột DE-52	23,1	9,13	0,395	12,6
4	Sắc ký qua cột Trypsin-Sepharose 4B	6,4	7,50	1,170	37,2



**Hình 3:** Điện di gel polyacrylamid 12,5% có SDS chế phẩm chất TI từ đậu tương

1: Dịch chiết hạt đậu tương, 2: Đỉnh TIA thu từ cột DE-52, 3 và 4: đỉnh TIA thu từ cột Sephadex G-100, 6 và 8: Chế phẩm TI thu từ cột sắc ký ái lực Trypsin-Sepharose 4B, 7: Các protein chuẩn bao gồm: Phosphorylase B, albumin huyết thanh bò, ovalbumin, cacbonic anhydrase, chất ức chế trypsin (KI) đậu tương và lactalbumin.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fedurkina. N. V. and Mosolov.V.V., Purification of soy bean trypsin inhibitor by immunoabsorption, *Applied Biochem. and Microbiol.*, **20**(1984), 452-457
2. Kunitz. M, Crystalline soy bean trypsin inhibitor II. General properties, *J Gen Physiol.*, **30**(1947), 291-310

3. Laemmli. U.K, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(1970), 680-685
4. Laskowski. M. Jr. and Kato. I., Proteinase inhibitors of proteinases, *Annu. Rev. Biochem.*, **49**(1980), 593-676
5. Lowry. O.H., Rousenbrough. N.J., Farr. A.L., Randall. R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**(1951), 265-275
6. Park. D.S., Gramham. M.Y., Graham. T.L., Identification of soybean elicitation competency factor, CF-1, as the soybean Kunitz trypsin inhibitor. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **59**(2001), 265-273.
7. Phan. T.N. and Pham. T.C., Trypsin inhibitors in developing seeds of *Momordica charantia* L., *Proc. Natl Center Sci. Res. Vietnam.*, **2**(1990), 129-137.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N<sub>o</sub>4, 2004

## PURIFICATION OF TRYPSIN INHIBITOR (TI) FROM SOYBEANS (GLYCINE MAX L.)

**Phan Tuan Nghia and Dang Quang Hung**

*Department of Biology, College of Science, VNU*

A protocol for purification of the soybean trypsin inhibitor (SBTI) or Kunitz inhibitor (KI) has been reported. The ground powder was extracted with ethylic ether to remove fat, then resuspended and magnetically stirred in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 50 mM KCl, followed by centrifugation to collect the clear supernatant fluid. The extract then underwent 3 steps of purification: i) anion exchange column chromatography on DE-52 cellulose, ii) gel filtration on Sephadex G100 and iii) affinity chromatography on Trypsin-Sepharose 4B. The obtained TI preparation contained only a single protein of a molecular weight of 20 kDa as shown at the same position of the standard KI present in the molecular weight markers on SDS-PAGE. The protocol allows to obtain 6.4 mg KI from 20 g of soybean ground powder and the purification factor of the KI after the 4 steps increased 37 fold.