

NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ PROTEINAZ CỦA MỘT ĐẬU XANH (*CALLOSBRUCHUS CHINENSIS* L)

Nguyễn Hồng Nga, Nguyễn Quỳnh Uyên,
Trịnh Hồng Thái và Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Một đậu xanh *Callosobruchus chinensis* là côn trùng gây hại thuộc bộ Coleoptera phát triển mạnh và phá hại đậu đỗ rất nhanh. Hàng năm, theo báo cáo tại Hội nghị Côn trùng học Quốc tế 13, tổn thất do sâu mọt đã làm giảm mất 1/5 sản lượng đậu đỗ trên thế giới. Ở nước ta, sự phá hại đậu đỗ của côn trùng này cũng đã gây ra những tổn thất đáng lưu tâm [2,3]. Vì lẽ đó, những nghiên cứu về mọt hại kho đậu đỗ không chỉ có nghĩa khoa học mà còn cần thiết cho định hướng ứng dụng trong công tác bảo quản đậu đỗ sau thu hoạch¹.

Việc nghiên cứu về proteinaz của sâu mọt hại kho đậu đỗ nói chung, của một đậu xanh *Callosobruchus chinensis* L. nói riêng còn khá mới mẻ và lý thú. Nhằm đóng góp cơ sở cho việc tìm những biện pháp thích hợp phòng chống côn trùng gây hại, chúng tôi đã tập trung nghiên cứu proteinaz ở các giai đoạn biến thái của chúng. Công trình này giới thiệu các kết quả bước đầu nghiên cứu về proteinaz của dịch chiết từ *Callosobruchus chinensis* L. ở giai đoạn : ấu trùng, nhộng và trưởng thành.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Hoá chất

- Cazem của hãng Sigma Co.,Ltd.
- Sephadex G-75 của hãng Pharmacia Fine Chemical (Thụy Điển) cung cấp.
- Các hóa chất khác đều có độ sạch phân tích.

2. Nguyên liệu

Một đậu xanh *Callosobruchus chinensis* (do Trung tâm Kiểm dịch Thực vật xuất nhập khẩu định tên) nuôi bằng hạt đậu xanh đã diệt trùng không có trứng sâu. Ấu trùng và nhộng được lấy từ các hạt đậu xanh bị mọt.

1) Các chữ viết tắt: AT: ấu trùng, N: nhộng, TT: Con trưởng thành, SDS: Sodium dodecylsulfate, PA: hoạt độ phân giải protein, DMSO: dimethyl sulfoxide, PCMB: parachloromercuribenzoate; PMS: phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; DTT: dithiothreiton; PAGE: Điện di trên gel polyacrilamit; TTHĐ: Trung tâm hoạt động.

Chuẩn bị dịch chiết từ con trùng : Nghiền cả con bằng máy nghiền đồng thể, 10.000 v/ph trong 10 phút, thu lấy dịch trong dùng cho nghiên cứu. Toàn bộ quy trình nghiền và ly tâm thực hiện ở điều kiện nhiệt độ 0 - 4°C.

3. Phương pháp

- Xác định hàm lượng protein của dịch nghiền cứu theo phương pháp Lowry [1] bằng đo trực tiếp mật độ quang học ở bước sóng 280nm.

- Xác định hoạt độ phân giải protein bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch: nồng độ cơ chất 0,1% (cazein dùng ở pH \geq 5,5; gelatin dùng ở pH 4,5), thời gian ủ 20h.

- Điện di phát hiện protein của các dịch chiết theo phương pháp Laemmli [11] thực hiện trên bản gel dày 1mm, nồng độ poliacrilamit (PAG) 12,5 %, mẫu điện di xử lý 100°C trong 3 phút trong đệm mẫu có SDS và mecaphoetanol. Lượng mẫu cho vào mỗi giếng được tính sao cho hàm lượng protein \approx 40 μ g. Nhuộm bản gel sau điện di bằng dung dịch Coomassie brilliant blue R250 0,05% -0,1% trong dịch tẩy metanol: axetic: nước (tỷ lệ 4 : 1:5), tẩy màu bằng dịch pha thuốc nhuộm.

- Điện di phát hiện enzym theo phương pháp Haussen và Dowdle [10] tiến hành trên bản gel dày 0,75 mm , nồng độ poliacrilamit 12,5%, nồng độ cơ chất cazein trở lại 0,1%. Mẫu điện di được trộn trong đệm mẫu có SDS nhưng không có mecaphoetanol và không xử lý với t^o cao. Tẩy SDS và bromophenol blue ở bản gel bằng Triton 2,5% trong 45 phút, rửa nước trong 30 phút, ủ gel ở 35,5°C trong 12 h.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. So sánh hàm lượng protein của 3 dịch chiết ấu trùng, nhộng, con trưởng thành của *Callosobruchus chinensis*

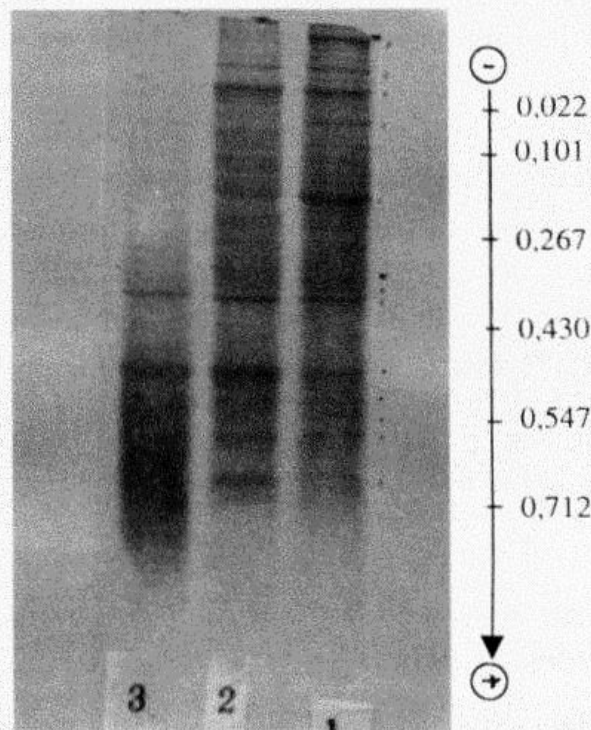
Hàm lượng protein hoà tan của 3 dịch chiết (ấu trùng, nhộng và con trưởng thành) được xác định theo phương pháp Lowry. Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy hàm lượng protein hoà tan (mgP /con) của dịch chiết nhộng cao nhất (0,121 mgP/con) của dịch chiết trưởng thành thấp nhất (0,085 mgP/con). Hàm lượng protein tính trên một cá thể của ấu trùng chỉ bằng 82%, của con trưởng thành chỉ bằng 70% của nhộng. Chúng ta biết rằng khi chuyển qua các giai đoạn biến thái khác nhau có những biến đổi quan trọng [17] ở giai đoạn nhộng vừa có sự phân hủy cấu trúc cũ đồng thời có sự tổng hợp các protein mới [18], các protein dự trữ của nhộng bị phân hủy cung cấp các axit amin để tổng hợp các protein cấu trúc của con trưởng thành [12]. Có lẽ vì thế mà hàm lượng protein hoà tan của dịch chiết nhộng cao hơn so với dịch chiết ấu trùng và con trưởng thành chăng?

Để hiểu thêm về kết quả thu được này, chúng tôi đã nghiên cứu phổ điện di protein của 3 dịch chiết trên. Kết quả sẽ được nói tới ở phần 2.

Dịch chiết	Số con	Số gram	mgP/ml	mgP/g	mgP/con
Ấu trùng	114	0,302	6,64	37,35	0,099
Nhộng	122	0,300	8,98	49,40	0,121
Con trưởng thành	156	0,300	8,06	44,37	0,085

Bảng 1. Hàm lượng protein của các dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành của *Callosobruchus chinensis* L.

2. Phổ điện di protein của dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành



Ảnh 1. Phổ điện di protein hoà tan của dịch chiết ấu trùng, nhộng, con trưởng thành của *Callosobruchus chinensis*

*Giếng 3. Dịch chiết con trưởng thành : 40,30 μgP

*Giếng 2. Dịch chiết nhộng : 40,41 μgP

* Giếng 1. Dịch chiết ấu trùng : 39,84 μgP

Kết quả điện di trên PAG được trình bày ở ảnh 1 và bảng 2 cho thấy có sự sai khác rõ rệt giữa ấu trùng và nhộng với con trưởng thành: sai khác nổi bật nhất là các băng protein có độ di động chậm (có $R_f < 0,43$) hầu như chỉ còn dạng vệt ở con trưởng thành. Có lẽ các protein hoà tan có độ di động chậm ($R_f < 0,43$) đã phát hiện được ở ấu trùng và nhộng đã chuyển thành các protein cấu trúc không hoà tan? Tỷ lệ % protein của một số băng so với tổng số các băng protein phát hiện được của 3 mẫu cũng có những sai khác, rõ rệt nhất là ở các băng $R_f = 0,022$; 0,267 và 0,547 (bảng 2).

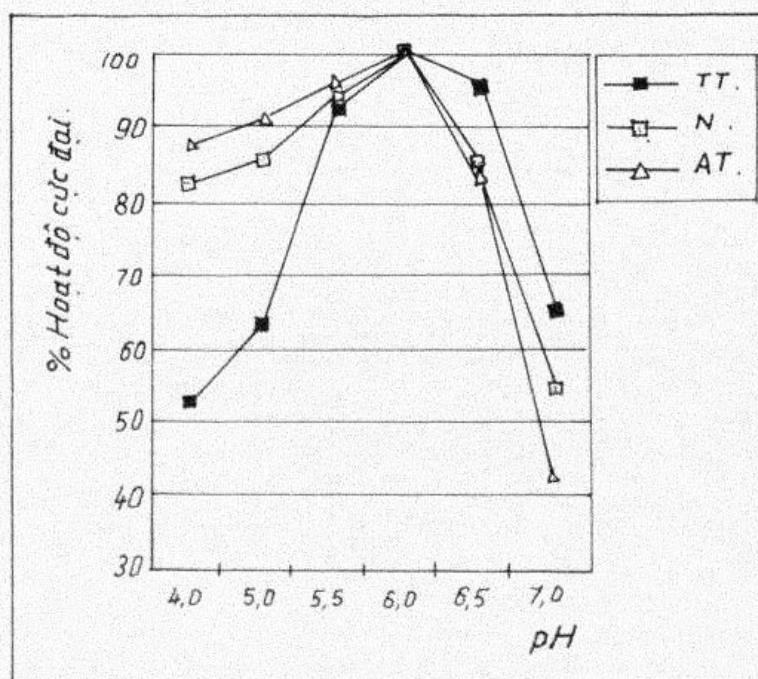
Bang protein (Rf)	% tổng số các băng protein đã phát hiện được		
	Ấu trùng	Nhộng	Con trưởng thành
0.022	5.88	0	1.44
0.101	7.52	8.92	1.29
0.267	8.80	6.67	0.65
0.547	3.72	10.25	24.98
0.712	3.44	4.34	23.87

Bảng 2. So sánh phổ điện di protein trong dịch chiết của các mẫu ấu trùng, nhộng, trưởng thành

3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ proteinaz của các dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành

Do khó phát hiện được hoạt động của proteinaz trong các dịch chiết nghiên cứu bằng phương pháp Anson, chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch là một phương pháp có độ nhạy cao.

Kết quả xác định hoạt độ enzym ở các pH từ 4 - 9 cho thấy hoạt độ enzym của cả 3 mẫu dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành mạnh nhất ở pH 5.5 - 6.5 (hình 1). ở các pH > 6.5 hoạt độ giảm mạnh, ở các pH < 5.5 hoạt độ enzym của con trưởng thành giảm mạnh hơn các mẫu khác.



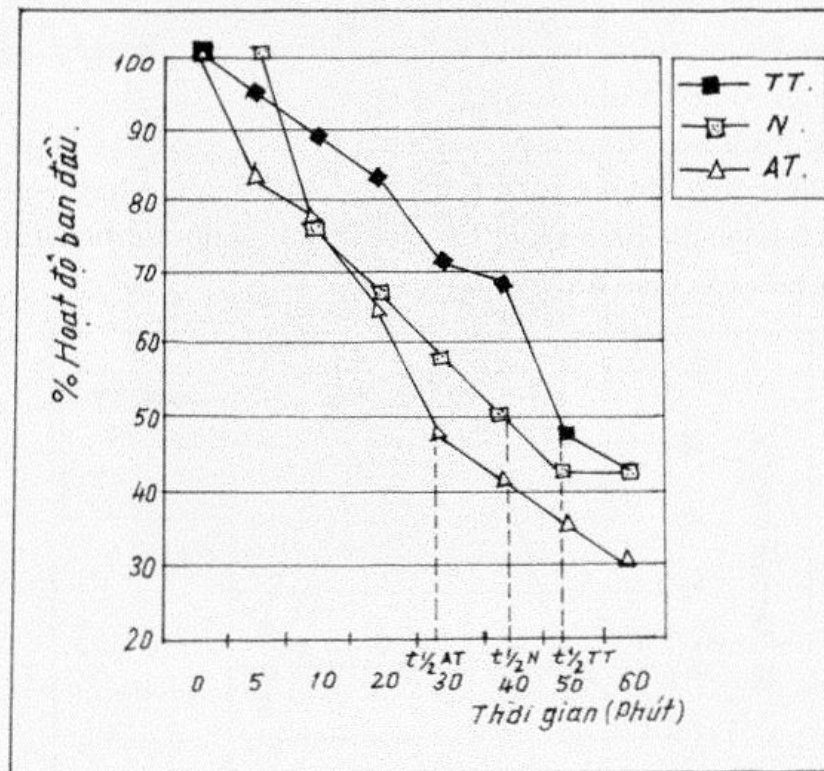
Hình 1. Hoạt độ proteolytic của các dịch chiết ở các pH khác nhau.

Chúng ta cũng biết rằng proteinaz - xistein và phần lớn proteinaz-kim loại thường hoạt động mạnh ở vùng pH trung tính. Kết quả trên cho phép giả thiết có thể 2 nhóm proteinaz này chiếm ưu thế trong các dịch chiết của *Callosobruchus chinensis*.

Nhiều nghiên cứu về proteinaz của dịch chiết các sâu rau thuộc bộ Lepidoptera đã cho thấy: nhìn chung, chúng đều hoạt động cao nhất ở vùng kiềm [1, 5, 4, 6, 8, 9]. Phải chăng đây cũng là một trong những điểm khác căn bản giữa proteinaz của dịch chiết sâu rau (Lepidoptera) và sâu mọt hại kho đậu đỗ (Coleoptera)?

4. Xác định độ bền nhiệt của proteinaz có trong các dịch chiết nghiên cứu theo thời gian

Đối với enzym, một trong những tính chất quan trọng trong nghiên cứu và ứng dụng là độ bền. Với bản chất là protein, phần lớn enzym nói chung, cũng như proteinaz nói riêng rất không bền ở nhiệt độ trên 60°C , đặc biệt là khi kéo dài thời gian xử lý. Người ta thường dùng giá trị $t_{1/2}$ (thời gian xử lý ở 60°C làm giảm 50 % hoạt độ ban đầu) để biểu diễn độ bền nhiệt của enzym. Tiến hành nghiên cứu độ bền với nhiệt ở 60°C theo thời gian của các dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành đã xác định được các giá trị $t_{1/2}$ của 3 mẫu là khoảng 30 phút, 40 phút và 50 phút theo thứ tự tương ứng. Điều đó cho thấy proteinaz trong dịch chiết của ấu trùng kém bền vững nhất.



Hình 2. Độ bền của proteinaz các dịch chiết nghiên cứu theo thời gian ở 60°C

5. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất ức chế đặc hiệu lên PA các dịch chiết

Kết quả trên bảng 3 cho thấy PA của các dịch chiết bị giảm mạnh dưới tác dụng của PCMB (là chất kìm hãm đặc hiệu các proteinaz - xistein), ít bị thay đổi dưới tác dụng của PMSF (là chất ức chế đặc hiệu các proteinaz - xerin) và hầu như không bị giảm dưới tác dụng của EDTA (là chất kìm hãm đặc hiệu các proteinaz - kim loại). Điều đó chứng tỏ proteinaz - xistein chiếm ưu thế trong các dịch chiết nghiên cứu. Kết quả này cũng tương tự với các kết quả nghiên cứu proteinaz của *Leptinotarsa decemlineata*

hololeuca undecimpunctata [16] nhưng lại khác với proteinaz của *Costelytra zealandica*, *Encyrtus molitor* [6, 7, 8, 13], mặc dù tất cả các loài kể trên cùng thuộc bộ Coleoptera. Điều này cho thấy tính đa dạng của các proteinaz thuộc các loài côn trùng khác nhau trong bộ Coleoptera. Trong khi các kết quả nghiên cứu đã công bố [1, 5, 15, 16] về proteinaz của các loài thuộc bộ Lepidoptera đều cho thấy proteinaz-xerin chiếm ưu thế

Chất ức chế	% hoạt độ ban đầu		
	Ấu trùng	Nhộng	Con trưởng thành
Đối chứng với H ₂ O	100%	100%	100%
Đối chứng với DMSO	72%	83%	73%
PMSF	78%	83%	80%
PCMB	33%	39%	33%
EDTA	95%	89%	93%
Xistein	100%	100%	100%

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất ức chế đặc hiệu lên PA các dịch chiết.

Khả năng phục hồi hoạt tính PA của các dịch chiết nghiên cứu bởi xistein

Chúng ta đã biết rằng enzym proteinaz - xistein có gốc SH của axit amin xistein của TTHĐ. Các proteinaz này hoạt động mạnh ở vùng trung tính và có tính đặc hiệu mạnh. Loại proteinaz - xistein chỉ hoạt động khi nhóm - SH trong TTHĐ không bị bao vệ. Do đó, những chất như xistein, DTT, mecaphoetanol, glutation khử, axit ascobic... ở nồng độ xác định có tác dụng làm bền, hoạt hoá enzym này. Để góp phần xác định tính chất của proteinaz ở dịch chiết nghiên cứu, chúng tôi đã thử ảnh hưởng của xistein ở nồng độ khác nhau tới khả năng phục hồi PA các dịch chiết nghiên cứu sau khi xử lý với chất ức chế đặc hiệu PCMB 1 mM. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Các dịch chiết sau khi xử lý với PCMB 1mM đều bị giảm mạnh, PA còn < 50 % hoạt độ ban đầu. Nhưng sau khi ủ lại với xistein ở các nồng độ 5 mM, 10mM thì PA của 3 dịch chiết đều phục hồi khá rõ rệt (bảng 4.)

Mẫu	Đối chứng (%)	PCMB (%)	Xistein 5 mM (%)	Phục hồi bằng xistein 5mM (%)	xistein 1mM (%)	Phục hồi bằng xistein 1mM (%)
Ấu trùng	100%	39%	100%	72%	100%	66%
Nhộng	100%	44%	100%	83%	100%	77%
Con trưởng thành	100%	40%	100%	73%	100%	73%

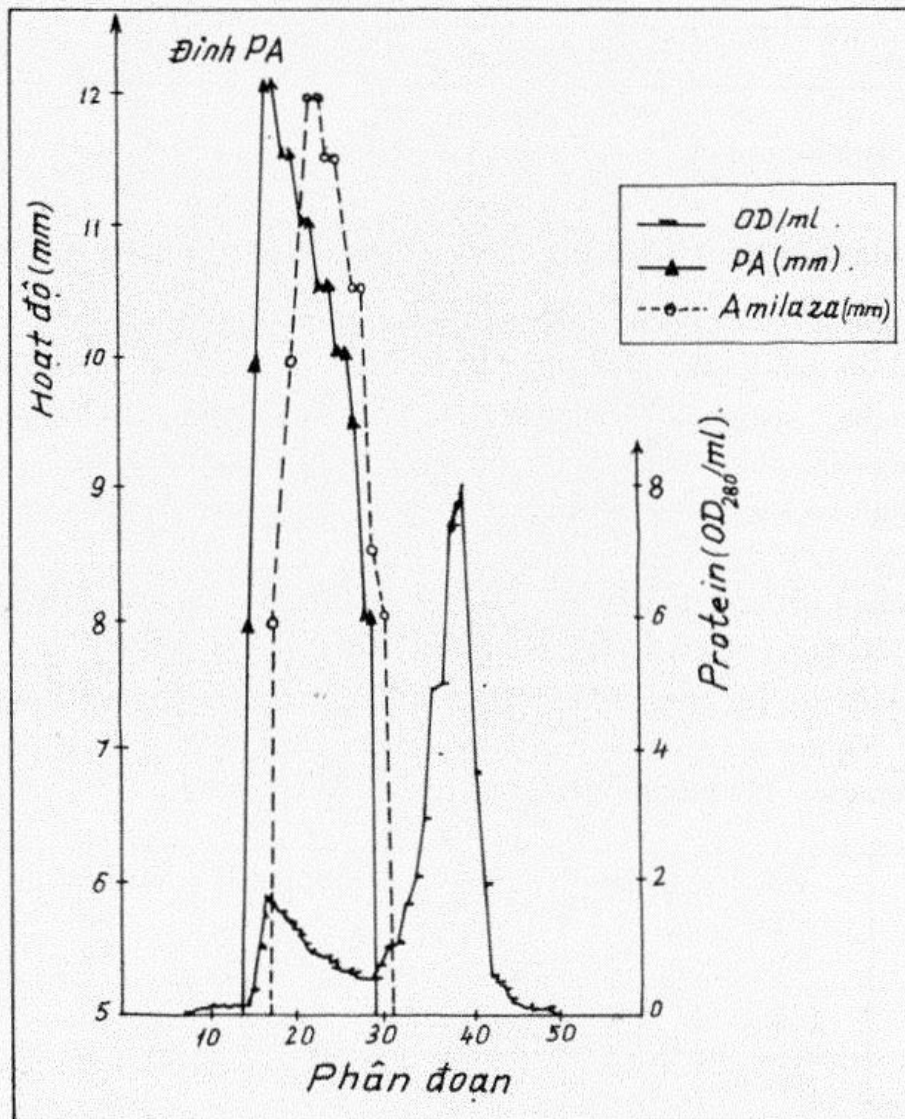
Bảng 4. Phục hồi hoạt tính PA của dịch chiết ấu trùng bằng xistein.

Kết quả này một lần nữa khẳng định thêm rằng proteinaz của các dịch chiết nghiên cứu thuộc nhóm proteinaz - xistein là chủ yếu.

7. Kết quả sắc ký lọc gel qua sephadex G - 75 của dịch chiết ấu trùng

Để tìm hiểu sâu hơn về nhóm enzym proteinaz - xistein trong dịch chiết ấu trùng chúng tôi đã tiến hành sắc ký dịch chiết ấu trùng qua cột gel sephadex G - 75. Kết quả sắc ký được trình bày trên hình 3 cho thấy có một đỉnh có PA tương ứng với đỉnh protein I ở phân đoạn 18 - 22. Còn đỉnh protein II ở phân đoạn 39 - 41 không có PA.

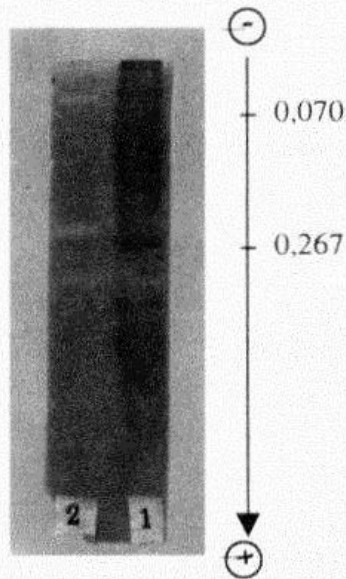
Để phát hiện và so sánh PA của đỉnh xuống cột với dịch chiết thô, chúng tôi tiến hành điện di trên PAG có cơ chất các mẫu này theo phương pháp Haussen và Dowdle. Kết quả trên ảnh 2 cho thấy trong khi ở dịch chiết thô có nhiều băng PA mờ nhỏ thì đỉnh PA sau qua cột chỉ có 2 băng PA sáng rõ hơn ($R_m = 0,070; 0,267$). Điều đó chứng tỏ dịch chiết qua cột đã loại được phần lớn các protein tạp nhưng chưa tách được riêng biệt các băng PA. Vấn đề này sẽ được nghiên cứu sâu hơn.



Hình 3. Sắc ký dịch chiết ấu trùng qua cột gel Sephadex G - 75.

Đệm sorenson pH6, 1/15M, tốc độ chảy 14 → 17 ml/h.

Thể tích mỗi phân đoạn 1ml. Kích thước cột 1cm × 48cm



Ảnh 2. Phổ điện di PA dịch chiết thô và đỉnh PA
1. Dịch chiết thô; 2. Đỉnh PA sau qua cột G- 75

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu protein, PA của dịch chiết ấu trùng, nhộng, con trưởng thành của *Callosobruchus chinensis* L. thu được ở trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau :

1. Hàm lượng protein hoà tan (tính theo mg/con) của các dịch chiết được tìm thấy giai đoạn nhộng là cao nhất.
2. Có sự sai khác rõ rệt về phổ điện di protein của dịch chiết con trưởng thành so với dịch chiết nhộng và ấu trùng, đặc biệt các băng protein có độ di động chậm chỉ còn dang vệt ở con trưởng thành.
3. Hoạt độ phân giải protein của 3 dịch chiết đều mạnh nhất ở pH6
4. Proteinaz trong dịch chiết ấu trùng kém bền vững nhất ở 60°, $t_{1/2}$ của dịch chiết ấu trùng, nhộng và con trưởng thành tương ứng là khoảng 30 phút, 40 phút và 50 phút.
5. Hoạt độ proteinaz của 3 dịch chiết đều bị kim hãm mạnh bởi chất kim hãm đặc hiệu proteinaz - xistein (PCMB), ít bị kim hãm bởi chất kim hãm đặc hiệu proteinaz - kerin (PMSF) và hầu như không bị kim hãm bởi chất kim hãm đặc hiệu proteinaz - kim loại (EDTA).
6. Sắc ký qua cột gel sephadex G - 75 dịch chiết ấu trùng thu được 2 đỉnh protein, trong đó chỉ có đỉnh protein I có hoạt tính phân giải protein. Điện di đỉnh PA này thu được 2 băng sáng rõ rệt có $R_f = 0,070$ và $R_f = 0,267$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Trân Châu, Trịnh Hồng Thái. Tinh sạch và nghiên cứu một số tính chất của proteinaz ở sâu xanh, (*Heliothis armigera*), *Tạp chí Khoa học*, KH tự nhiên

- DHQG Hà Nội, tập XI, số 1, 1995, tr. 42 - 49.
- 2 Nguyễn Đình Cơ. Nghiên cứu tình hình hao hụt chất lượng nông sản và các phương pháp bảo quản giản đơn nhằm hạn chế tổn thất dinh dưỡng, *Báo cáo đề tài 1987 - 1990. Cục quản lý chất lượng hàng hóa và đo lường- Bộ Nội thương*, 1990.
 - 3 Bùi Kim Thanh, Lê Tiến Vinh và cộng sự. Nghiên cứu giải pháp bảo quản đậu đỗ quy mô vừa và nhỏ phục vụ hải đảo và hộ nông dân, *Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm*, số 3, 1995, tr. 192 - 194.
 - 4 Trịnh Hồng Thái, Phạm Thị Trân Châu. Hoạt độ proteolytic và hoạt độ antiproteolytic của dịch chiết từ sâu xanh (*Heliothis armigera*), *Tạp chí Sinh học*, tập 15, số 4(1993), tr. 35-40.
 - 5 Mai Ngọc Toàn. So sánh một số tính chất proteinaz của sâu tơ (*Plutella xylostella* L), sâu khoang (*Spodoptera litura* Fabr), sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapal* L), *Luận án Thạc sĩ khoa học sinh học*, 1997.
 - 6 Z. Ahmad et al. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larval of the armyworm (*Spodoptera litura*), *Insect Biochem.*, N^o 10(1988), p. 667 - 673.
 - 7 J.T Christeller and B.D. Shaw B. D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costrellytra zealandica* trypsin, *Insect Biochem.*, N^o 19(1989), p. 233 - 241
 - 8 M. Eguchi and K. Kuriyama. Purification and characterization of membrane -bound alkaline proteases from midgut tissue of the silk worm (*Bombyx mori*), *J. Biochem.*, 97(1985), p. 1437 - 1445.
 - 9 W. Giebel, R. Zwilling and Pfejlderer. The proteolytic enzyme of the honey bee (*Apis mellifica* L), *Comp. Biochem. Physiol.*, B38(1971), p. 197 - 210.
 - 10 C. Haussen, E.B. Dowdle. Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrilamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrates, *Analyt Biochem.*, 102(1980), p. 196 - 202.
 - 11 U. K. Laemmli. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227(1970), p. 680 - 685.
 - 12 L. Levenbook. Storage proteins, in comprehensive. *Insect Biochemistry, Physiology, and Pharmacology*, Vol 10(1985), p. 307 - 346. Pergamon Press, Oxford.
 - 13 H. Levinsky, Y. Birk and S. W. Applebaum. Isolation and Characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* larvae, *Int. J. Peptide protein Res.*, 10(1977), p. 252 - 264.
 - 14 O. H. Lowry, N. J. Rose Bough, A. L. Farr and R. J. Andall. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biochem.*, 193(1951), p. 265 - 270.
 - 15 W. J. Miller, K. J. Kramer and J. Law J. Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from Tobacco Horn worm (*Manduca sexta*), Jahanson (*Lepidoptera: Sphigidae*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 48 B 1974, p. 117 - 129.
 - 16 J. Purcell et al. Examination of midgut liminal proteaza activities in six economically important insect, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22, 1(1992), p. 41 - 47.

- 17 Russo Caia. In the Physiology of Insect, *Academic express*, New York - London Vol. I(1964), p. 91 - 142.
- 18 F. Sehnael. Biochemistry, Physiology, and Pharmacology, *Pergamon press*, Oxford Vol. 3(1985), p. 1 - 86.

VI. JOURNAL OF SCIENCE. Nat. Sci., t.XVI, n^o1 - 2000

PRIMARY STUDY ON PROTEINASE OF *CALLOSOBRUCHUS CHINENSIS L*

Nguyen Hong Nga, Nguyen Quynh Uyen
Trinh Hong Thai and Pham Thi Tran Chau

Center of Biotechnology - VNU

This work deals with the protein content, proteolytic activity of the extracts from larvae, pupae and adults of *Callosobruchus chinensis L*. The obtained results showed that

1. The highest soluble protein content was found from pupal extracts.
2. The protein electrophoresis pattern of larval and pupal extracts were rather similar with an exception of the bands with $R_m = 0.022$; $R_m = 0.267$. However, in the case of the adult extract, the bands with low R_m (relative mobility) were remained only a trace.
3. The proteolytic activities of all three extracts are strongest at pH 6.0.
4. T1/2 values of larval, pupal, adults' extracts after heat treatment at 60°C were 30 minutes, 40 minutes, 50 minutes, respectively.
5. The proteolytic activity of all extracts were strongly declined in the presence of 10^{-3} M PCMB, but slightly decreased by 10^{-3} M PMSF and almost no changed with an addition of 10^{-3} M EDTA. It was suggested that the cystein-proteinase(s) was the major proteinase(s) in the *Callosobruchus chinensis L*. extracts.
6. Using sephadex G-75 column chromatography, proteins of the larval extract were fractionated into two peaks, however, only the first one showing proteolytic activity. Further analysis of PA peak on PAGE containing casein substrate showed two distinct PA patterns.