

TINH SẠCH CHẤT KIM HÂM TRIPXIN CHỦ YẾU CỦA HẠT MƯỚP ĐẮNG (*MOMORDICA CHARANTIA* L.) MC TI-IV, VÀ MỘT VÀI TÍNH CHẤT CỦA NÓ

PHAN TUẤN NGHĨA, PHẠM TRẦN CHÂU

Trong các công trình công bố ở Việt Nam gần đây [10, 11] chúng tôi đã giới thiệu tóm tắt vai trò và triển vọng ứng dụng của các chất kim hãm tripxin (TI) tách từ hạt bầu bí. Kết quả nghiên cứu điều tra hàm lượng TI ở hạt các cây thuộc họ bầu bí (*Cucurbitaceae*) trồng phổ biến ở nước ta [11], cho thấy hạt mướp đắng (*Momordica charantia*) thuộc loại giàu các chất này. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu kỹ hơn thành phần, tính chất TI của chúng.

Bài này sẽ trình bày các kết quả nghiên cứu phương pháp tinh sạch một TI chủ yếu của hạt mướp đắng (MC TI-IV):

Nguyên liệu và phương pháp:

Nguyên liệu:

Hạt mướp đắng lấy từ vườn giống mướp đắng ở Đông dư, Gia Lâm, Hà nội Tripxin tùy tạng bò, tripxin-sepharozo -4B do Viện Sinh hóa Đại học Tổng hợp Wrocław, Ba lan tặng. Sephadex G-75 dextran xanh, SP-Sepha lex C-25 của hãng Pharmacia Fine chemicals, Uppsala, Thụy Điển. Các protein chuẩn: albumin huyết thanh bò, (kimotripxinogen A) (Boehringer), xitocrom C (Merck), chất kim hãm kunitz và Bowman-Birk từ đậu tương (PCh). Proteinaza ngoại bào của *Bacillus pumilus* Trung tâm Vi sinh vật ứng dụng Đại học Tổng hợp Hà nội cung cấp.

Phương pháp:

Protein được xác định theo phương pháp Lowry [5]. Hoạt độ của tripxin được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [11] dùng casein làm cơ chất nồng độ cuối cùng của casein trong hỗn hợp phản ứng với enzym là 0,6%, đệm phốtphat 0,1M, pH 7,6, nhiệt độ 35,5°C, thời gian tác dụng là 20 phút. Để xác định hoạt độ kim hãm tripxin (TIA), ủ tripxin với chất kim hãm trong 10 phút, sau đó xác định hoạt độ tripxin. Hoạt độ kim hãm tripxin là hiệu số hoạt độ enzym khi có và không có chất kim hãm. Một đơn vị TIA (IU) là lượng chất kim hãm làm giảm 50% hoạt độ của 2 mg tripxin.

Điện di trên gel poliacylamid 7,5%, pH 8,3 theo phương pháp của Bavis [1], để phát hiện các băng protein, nhuộm gel với amido đen 10B 1% trong axit axetic 7%, tẩy màu bằng axit axetic 7%. Để xác định các vùng có hoạt tính kim hãm tripxin trên cột gel, sau khi chạy điện di, cột gel không nhuộm mà cắt thành các đoạn dài 0,4 cm, đánh nát gel với 100µl dung dịch đệm phốtphat

(0.1M pH 7.6, lấy một lượng nhỏ dịch trong, phát hiện TIA bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa 0,1% casein, pH 8,1 [4].

Xác định trong lượng phân tử bằng phương pháp sắc ký cột gel Sephadex (G-75 (1,35 x 135 cm) cân bằng với dung dịch đệm phốt phát 0,06M, pH 7,0 có chứa NaCl 0,1M. Các protein chuẩn đã dùng: albumin huyết thanh bò (trọng lượng phân tử 67.000), kimotripxinogen A (25.000), xitocrom C (12.300), chất kim hãm Kunitz của đậu tương (20.000), chất kim hãm Bowman - Birk của đậu tương (8.000).

Tách chất kim hãm tripxin (TI) từ hạt mướp đắng: hạt nghiền mịn, chiết bằng dung dịch đệm theo tỷ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích), khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, li tâm thu lấy dịch trong, sắc ký qua cột SP - Sephadex C-25, thu đỉnh hoạt động chính (MC TI - IV), sắc ký qua cột Sephadex G-75, thu đỉnh hoạt động, sắc ký ái lực qua cột tripxin - Sepharosa 4B (1,5 x 7cm) theo phương pháp đã ghi trong [3].

Kết quả và thảo luận

Thăm dò điều kiện chiết rút TI từ hạt mướp đắng

Để chiết rút TI từ hạt bầu bí, các công trình nghiên cứu trước đây [3, 6, 8, 10, 12] đều dùng dung dịch đệm axetat natri. Tuy nhiên khi sử dụng một lượng lớn dung dịch đệm này gặp khó khăn, vì vậy chúng tôi đã chọn các dung dịch dễ tìm hơn. Bảng 1 cho thấy khi dùng dung dịch HCl để chiết rút TI, tổng hoạt độ trong dịch chiết tuy có ít hơn khi dùng dung dịch đệm axetat nhưng hoạt độ riêng (HDR) của nó lại lớn hơn HDR của dịch chiết bằng đệm axetat gần 1,5 lần

Kết quả sắc ký qua cột Sephadex G - 75 (hình 1a, b, c) cho thấy, sắc ký đồ của cả 3 dịch chiết tuy có dạng chung giống nhau: 4 đỉnh protein chính được rút xuống ở các thể tích rút giống nhau; ở cả 3 dịch chiết đều chỉ có đỉnh hoạt động tập trung ở vùng thể tích rút từ 165--200ml. Tuy nhiên trên hình 1c các đỉnh protein không có hoạt tính (đỉnh I, II, IV) đã bị giảm rõ rệt, do đó tỉ lệ TIA/mg protein (HDR) của dung dịch chiết HCl là lớn hơn cả. Hơn nữa, đỉnh hoạt động thu được sau khi sắc ký qua cột sephadex G-75 ở hình 1c cũng có HDR cao nhất (bảng 1). Kết quả trên chứng tỏ có thể sử dụng HCl để chiết rút TI, điều này có ý nghĩa thực tiễn rõ rệt.

Để sơ bộ tìm hiểu trọng lượng phân tử của các TI hạt mướp đắng (MC TI) đã cho các protein chuẩn có trọng lượng phân tử đã biết qua cột Sephadex G-75 ở những điều kiện giống như trên, xác định thể tích rút (V_e) của mỗi protein. Kết quả cho thấy, tất cả protein chuẩn, kể cả chất kim hãm Bowman - Birk từ đậu tương là protein chuẩn có trọng lượng phân tử thấp nhất (8.000) cũng được rút xuống trước đỉnh TIA của hạt mướp đắng. Do đó, có thể kết luận rằng các MC TI có trọng lượng phân tử bé hơn 8000 Da. Nếu tính theo đồ thị chuẩn (hình 2) thì trọng lượng phân tử của các MC TI nằm trong giới hạn từ 22500-6500 Da, nghĩa là thuộc nhóm TI phân tử thấp như nhiều TI của các hạt bầu bí khác đã được công bố [2, 3, 6, 8, 9, 12], vì vậy đã tiến hành tinh sạch MC TI dựa theo các phương pháp đã được dùng trước đây.

Điện di trên gel polyacrilamit 7,5% ở pH 8,6 theo chiều từ âm đến dương, tất cả các đỉnh từ MCTI - II đến MCTI - IV đều cho 1 băng protein (bình 4a). Tuy

Hình 4

Điện di trên gel poliacrilamit ở pH 8,3 các chế phẩm TI của hạt mướp đắng.

4a. Điện di từ $\ominus \rightarrow \oplus$

A - Dịch chiết HCl của hạt mướp đắng;

B - MC TI - II; C - MC TI - III.

D - MCTI - IV.

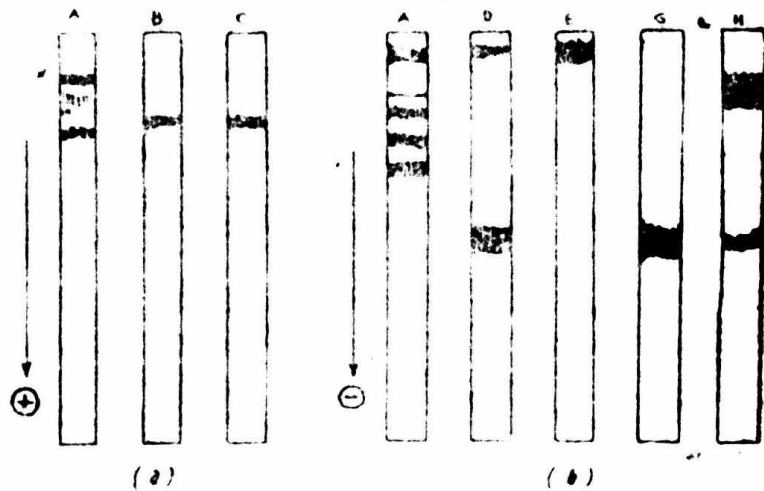
4b. Điện di từ $\oplus \rightarrow \ominus$:

A) Dịch chiết HCl của hạt mướp đắng;

D) MC TI - IV; E - Đỉnh protein I của MC TI - IV sau khi qua cột sephadex G - 75.

G) Đỉnh protein II (II G) của MC TI - IV sau khi qua cột Sephadex (G - 75)

H) MC TI - IV sau khi qua cột triptxin - Sepharosa 4B.



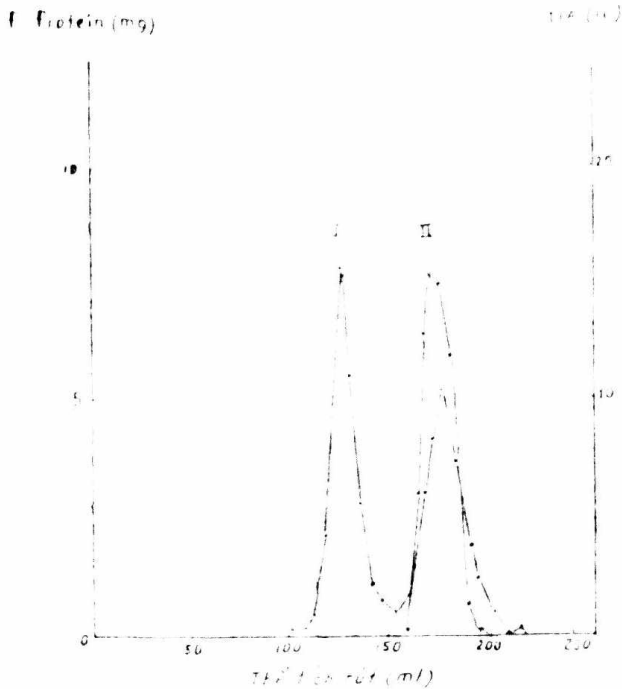
nhiên khi xác định TI_A, chỉ có băng protein của - II và - III có hoạt tính kim hãm triptxin. Các băng này có độ di động giống nhau và cũng ứng với 1 băng protein có hoạt độ kim hãm triptxin của dịch trước khi lên cột (cột A, bình 4a). MCTI - IV tuy có 1 băng protein nhưng băng này cũng như các đoạn cắt khác trên cột gel đều không có hoạt tính kim hãm triptxin. Khi điện di với các điều kiện như trên nhưng theo chiều ngược lại từ dương đến âm, MCTI - II cũng như MCTI - III không cho băng protein nào và cũng không có hoạt tính. Ngược lại, MCTI - IV có 2 băng protein, trong đó băng di động nhanh hơn có hoạt tính kim hãm triptxin (cột D, hình 4b). Như vậy dung dịch MCTI - IV chưa đồng nhất còn lẫn các protein khác không có hoạt tính. Ngoài ra, kết quả điện di cũng chứng tỏ MCTI - IV có tính kiềm mạnh, ở pH 8,3 nó vẫn tích điện dương.

Tinh sạch MCTI - II C qua cột Sephadex G - 75:

Dung dịch MCTI - IV nhận được từ cột SP - Sephadex C - 25 đem cô đặc, điều chỉnh pH đến 7,0 và cho qua cột S - Sephadex G - 75. Hình 4 cho thấy có 2 đỉnh protein nhưng hoạt độ kim hãm triptxin chỉ có ở đỉnh protein thứ II (II G) (hình 5) với $V_e = 177$ ml. Tính theo đồ thị chuẩn (hình 2) nó có trọng lượng phân tử khoảng 5.000 Đa. Điện di trên gel poliacrilamit (từ dương đến âm), mỗi đỉnh chỉ cho 1 băng protein đỉnh protein II ứng với băng di động nhanh, đỉnh protein I ứng với băng di động chậm của dung dịch MCTI - IV trước khi cho qua cột Sephadex G - 75 (hình 4b).

Sắc ký ái lực qua cột triptxin Sepharosa 4B:

Đồn các phân đoạn của đỉnh II G (hình 5), cho qua cột triptxin - Sepharosa 4B, hoạt động riêng của dung dịch TI nhận được sau khi sắc ký ái lực vẫn không tăng. Điều đó chứng tỏ II G có thể đã được tinh sạch. Điện di trên gel poliacrilamid dung dịch chất kim hãm nhận được sau sắc ký ái lực, thấy xuất hiện thêm 1 băng protein di động chậm hơn (hình 4b, cột H, băng m) và cũng có hoạt tính TI. Đó có thể là dạng biến chỉnh của MCTI - IV, ký hiệu là MCTI - IV*. Dạng



Hình 5

Sắc ký MC TI - IV qua cột Sephadex G - 75
Cột (1,35 x 135cm) cân bằng với dung
dịch đệm photphat 0,06M pH = 7,0. Tốc độ
chảy 30ml/giờ, thu mỗi phần đoạn 3 ml.

..... proten; x—x hoạt độ

biểu chính thường được tạo thành khi tiến hành sắc ký ái lực TI, tripxin có
t thể cắt đứt liên kết peptit - P₁ - P'₁ - ở trung tâm phản ứng của chất kim bầm
r như vẫn thường thấy ở các trường hợp khác [3, 6, 8, 9, 10, 12]

Bảng 2: Tóm tắt quá trình tinh sạch MCTI-IV của hạt mướp đắng
(45g hạt đã nghiền mịn, ứng với 200 hạt).

Số TT	Các bước tinh sạch	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ kim hàm tripxin (TIA)			
			TIA tổng số (IU)	Hoạt độ riêng IU/mg protein	Số lần tinh sạch	Hiệu suất
1	Dịch chiết thô bằng HCl có xử lý bổ sung.	1118,0	425,8	0,38	1,8	100
2	Sắc ký qua cột SP - Sepha- dex C - 25.					
	MCTI - I	48,8	12,9	0,26	0,7	3,0
	MCTI - II	42,7	57,8	1,35	3,6	13,6
	MCTI - III	45,8	98,5	2,15	5,7	23,1
	MCTI - IV	87,7	156,2	1,25	3,3	37,7
	MCTI - V	16,2	2,8	0,17	0,1	0,7
	Tổng số:	241,2	328,2			77,1
3	Sephadex G - 75 MCTI - IV.	35,7	112,6	3,15	8,3	26,1
4	Tripxin - Sepharosa 4B MCTI - IV	23,6	74,5	3,17	* 8,3	17,5

Các nghiên cứu trước về các TI ở hạt bầu bí [3, 6, 7, 9, 12] cũng cho thấy dạng hiệu chỉnh giống với dạng ban đầu về nhiều tính chất như hoạt độ, trọng lượng phân tử v.v.. Nhưng có thêm 1 nhóm $-NH_3^+$ và 1 nhóm $-COO^-$ tự do. Vì vậy, tùy pH của môi trường, nó sẽ tích điện âm hoặc dương lớn hơn dạng ban đầu. Nếu chất kim hãm có trọng lượng phân tử thấp, sự sai khác này thể hiện rõ rệt khi điện đi. Mặt khác, vì dạng hiệu chỉnh có liên kết trong phân tử bicat đút nên chúng có thể bền hơn dạng ban đầu. Vì vậy, dung dịch có chứa dạng hiệu chỉnh sẽ có độ bền với nhiệt thấp hơn dung dịch không có nó.

Bảng 3: Độ bền với nhiệt của dung dịch MCTI-IV trước (a) và sau (b) khi qua cột tripxin - sepharoza 4B (xử lý ở 100°C)

Thời gian xử lý (phút)	TIA còn lại (%)	
	a	b
0	100	100
30	93	71
60	91	36
90	91	35
120	75	35
150	75	27
180	54	27
240	54	27
300	46	16

Độ bền với nhiệt của MCTI-IV trước và sau khi qua cột tripxin - Sepharoza 4B:

Các nghiên cứu sơ bộ cho thấy MCTI-IV khá bền với nhiệt, do đó đã tiến hành nghiên cứu độ bền bằng cách xử lý dung dịch chất kim hãm ở 100°C, sau các khoảng thời gian xác định lấy mẫu làm lạnh nhanh chóng và xác định hoạt độ kim hãm của nó. Bảng 3 cho thấy dung dịch MCTI-IV nhận được sau khi qua cột tripxin - Sepharoza 4B ở tất cả các thời điểm lấy phân tích đều có hoạt độ thấp hơn dung dịch trước khi qua cột sắc ký ái lực. Đó cũng là một bằng chứng về sự có mặt của dạng MCTI-IV*.

Trọng lượng phân tử của MCTI-IV:

Dùng phương pháp sắc ký qua cột Sephadex G-75, đo thể tích rút, dựa vào đồ thị chuẩn ở hình 2 đã tính được trọng lượng phân tử của MCTI-IV vào khoảng 4.800 - 5.500. Trọng lượng phân tử của MCTI-IV sau khi đi qua cột tripxin - Sepharoza cũng không thay đổi.

Tính đặc hiệu của MCTI-IV:

Dùng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có độ nhạy cao [4] để nghiên cứu ảnh hưởng của MCTI-IV đến hoạt độ phân giải protein của các proteinaza khác nhau cho thấy nó không kim hãm α - kimotripxin, cũng không kim hãm proteinaza ngoại bào của *Bacillus pumilus* và bromelain. Tuy nhiên, theo thông báo miệng của Trần Liên Hương MCTI-IV lại kim hãm hoạt độ phân giải gelatin của proteinaza có trong môi trường nuôi cấy *Trichophyton rubrum*.

Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy MCTI-IV, chất kim hãm chủ yếu của hạt mướp đắng có trọng lượng phân tử thấp hơn CPPTI-II ($M_r = 7500$) [8] nhưng lớn hơn tất cả các TI chủ yếu của hạt bầu bí đã biết ($M_r = 3200$) [2, 3, 6, 8, 9, 12]. Tuy nhiên khác với các TI kể trên, MCTI-IV có tính kiềm cao, khi điện đi ở pH 8,3 nó vẫn di chuyển về catốt. Tính chất này cũng đã quan sát được ở CPPTI-III của hạt *Cucurbita pepo* var. *patissonina* [9], CPPTI-II của hạt *Cucurbita pepo* var. *Girromontia* [3], TI của hạt *Brassica oleracea* var. *Sabellica* [13], nhưng các TI này đều có trọng lượng phân tử

lớn hơn MCTI-IV. Do đó MCTI-IV có thể là một TI mới của họ bầu bí, khác với các TI đã biết. Mặt khác, tác dụng kìm hãm proteinaza *Trichophyton rubrum* của MCTI-IV đáng được lưu ý tiếp tục nghiên cứu vì nó có thể có ý nghĩa trong thực tế y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Davis B.J., 1964: Ann N.Y. Acad. Sci., 121: 404 - 427.
2. Hojima Y., J.V. Pierce, J.J.Pisano, 1982: Biochemistry 21: 3741 - 3746.
3. Leluk J. J., Ollewski, M.Wieczorek, A.Polanowski T.Wilusz, 1983: Acta Biochim. Polon.30: 127 - 138.
4. Leluk J., Phạm Trần Châu, J.Kieleczawa 1985: XXI Zjazd PT Bioch Krakow streszezenie, tr.139.
5. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.C. Farr, R.J.Randall 1951: J. Biol. Chem., 193: 265 - 275.
6. Ollewski J., A.Polanowski, J.Leluk, T.Wilusz, 1981: Acta Biochim. Polon 331: 267 - 278.
7. Ollewski J., T.Wilusz, 1985: Acta Biochim. Polon., 32: 285 - 293.
8. Phạm Trần Châu, J.Leluk, T.Wilusz, A.Polanowski, 1985: Acta Biochim. Polon, 32: 319-328.
9. Phạm Trần Châu, 1986: Acta Universitatis Wratislaviensis N°912.
10. Phạm Trần Châu, J.Leluk, 1987: Tạp chí sinh học, 9 (1): 1-7.
11. Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Trần Châu, 1987: Tạp chí sinh học, 9 (3) đang in.
12. Polanowski A., T.Wilusz, B.Nienartowicz, E.Leslar, A.Slomin'ska, K.Nowak 1980: Acta Biochim. Polon. 27: 371-382.
13. Wilimowska - Pele A., 1985: Acta Biochim. Polon. 32: 351 - 353.
14. Петрова Н.С. М.М. Виндюайте, 1966: Приклад. Биохим. и микробиол. 21: 232-238

Phan Tuan Nghia, Fам Chan Chau

SOCHISTKA I CHASTICHNAYA KHARAKTERISTIKA GLAVNOGO INHIBITORA TRIPSIINA IZ SEMYAM MOMORDICA CHARANTIA L.

Otchizden odin glavnoy inhibitor tripsina, MCTI-IV iz HCl ekstrakta semeyan *Momordica charantia* ponozobmennoy khromatografii na SP-sephadexe C₂₅ i gelfil'tratsii na sefadeksee G₇₅. Inhibitor yavlyetsya termostabil'nyim, shchelochnym polipeptidom s nizkomolekulyarnym, vesom. MeCTI-IV ne inhibiruet kakx-khimotripsina, vneshnokletochnykh protsenkaz *Bacillus pumilus*, tak ni bromelaina.

Phan Tuan Nghia, Pham Tran Chau

PURIFICATION OF A MAJOR TRYPSIN INHIBITOR FROM MOMORNICA CHARANTIA RESTING SEEDS AND ITS SOME PROPERTIES

A major trypsin inhibitor, MCTI-IV, was isolated from the HCl extract of *Momordica charantia* resting seeds by using column chromatography on Sp-Sephadex C-25 and gel filtration on Sephadex G-75, it appears to be a heat stable alkaline low molecular mass polypeptide. The inhibitor does not act on chymotripsin, extracellular proteinases of *Bacillus pumilus* or bromelain.

Bộ môn Sinh hóa - Khoa Sinh học

Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội

Nhận bài ngày 23-6-87.