

TINH SẠCH VÀ KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC SERINE PROTEASE TỪ TRÙN QUẾ (*PERIONYX EXCAVATUS*)

Phan Thị Bích Trâm¹, Dương Thị Hương Giang¹, Hà Thanh Toàn¹, Phạm Thị Ánh Hồng²

¹Đại học Cần Thơ

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sáu phân đoạn protease (FI, FII, FIII-1, FIII-2, FIII-3, FIV) có hoạt tính thủy phân fibrin đã được tinh sạch từ trùn quế (*Perionyx excavatus*) bằng phương pháp kết tủa acetone, kết hợp với sắc ký trên cột trao đổi ion Unosphere Q, cột tương tác kỵ nước Phenyl-Sepharose và cột lọc gel Sepharose 12. Quá trình tự phân giải trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ phòng có thể làm tăng hoạt tính protease của dịch trích ly lên gấp 2 lần so với hoạt tính ban đầu. Các phân đoạn protease nhận được có tính đặc hiệu cơ chất khác nhau, trên cơ chất fibrin hoạt tính rất mạnh trong khoảng từ 44,1 đến 830,7 đơn vị plasmin/mg protein với mức độ hoạt tính FIII-3>FIII-2>FI>FIII-1>FIV>FII, trên cơ chất casein hoạt tính protease yếu hơn trong khoảng từ 0,87 đến 1,81 tyrosine unit/mg protein theo mức độ hoạt tính FI>FIII-3>FII>FIII-1>FIII-2>FIV. Điện di SDS-PAGE và sắc ký lọc gel cho thấy khối lượng phân tử của các protease này nằm trong khoảng từ 28 đến 35 kDa. Các phân đoạn FI, FII, FIII-2, FIII-3, có nhiệt độ tối ưu là 65°C, riêng hai phân đoạn FIII-1, FIV có nhiệt độ tối ưu thấp hơn (60°C). pH 11 là pH tối ưu cho hoạt động của tất cả các phân đoạn. Tuy nhiên, trừ FIII-1, 5 phân đoạn còn lại có khả năng hoạt động cũng khá mạnh ở pH 7. Các protease nhận được bền ở nhiệt độ ≤ 50°C, tương đối thấp hơn nhiệt độ tối ưu, độ bền pH của chúng nằm trong khoảng pH khá rộng từ 4 - 12. Do hoạt tính của các protease này bị ức chế bởi phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) nên có khả năng đây là các serine protease.

Từ khóa: đĩa fibrin, *Perionyx excavatus*, Phenyl Sepharose, Sepharose 12, serine protease, trùn quế, Unosphere Q

MỞ ĐẦU

Một số bệnh liên quan đến tim mạch đang là vấn đề được quan tâm nhiều ở Việt Nam và thế giới. Trong đó, chứng nghẽn mạch do fibrin bị đóng cục, gây cản trở sự lưu thông máu là bệnh rất phổ biến ở người lớn tuổi. Hiện nay, một số nước Châu Á như Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc đã chiết xuất và tinh sạch được enzyme lumbrokinase từ một số loại trùn đất *Lumbricus rubellus* (Cho *et al.*, 2004a; Mihara *et al.*, 1993) và *Eisenia fetida* (Yang *et al.*, 1997) có khả năng thủy phân được fibrin, làm tan các cục máu đông. Các enzyme này là các isozyme thuộc nhóm serine protease có đặc điểm chung là rất bền nhiệt, và chịu được pH kiềm. Trình tự nucleotide của gen mã hóa lumbrokinase có hoạt tính thủy phân fibrin cao cũng được nghiên cứu nhằm tiến tới việc chủ động sinh tổng hợp enzyme này bằng con đường tái tổ hợp (Cho *et al.*, 2004b; Sugimoto *et al.*, 2001).

Với các ưu điểm của lumbrokinase, các nhà nghiên cứu Việt Nam đã hướng tới việc khai thác và

sử dụng enzyme này từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Bước đầu các tác giả đã tiến hành nghiên cứu xác định hoạt tính thủy phân fibrin tách từ một số loài trùn đất ở phía Bắc Việt Nam, hoạt tính này cao nhất ở loài trùn quế (*Perionyx excavatus*). Tiếp theo là nghiên cứu tinh sạch và khảo sát một số tính chất của enzyme thủy phân fibrin của dịch chiết từ loài trùn này (Lý Thị Bích Thủy *et al.*, 2004; 2006).

Tại các tỉnh phía nam và Đồng bằng sông Cửu Long nguồn trùn quế này rất dồi dào, do chúng sinh sản nhanh, dễ thu hoạch, nên được đưa vào nuôi công nghiệp với các quy mô vừa và nhỏ, chủ yếu nhằm bổ sung nguồn đạm cho gia cầm và thủy hải sản. Các khảo sát ban đầu cho thấy hệ protease trong loài trùn này có khả năng chịu nhiệt và bền với pH kiềm cao. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về tách chiết, tinh sạch và khảo sát một số đặc điểm của hệ protease từ trùn quế, với mục đích ứng dụng khả năng thủy phân fibrin của nhóm enzyme này trong y dược học, đồng thời góp phần mở rộng việc sử dụng một cách hiệu quả nguồn nguyên liệu trùn quế, phát triển mô hình

nuôi trùn nhằm cải thiện cuộc sống của người nông dân vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Trùn quế

Trùn quế còn sống trọng lượng trung bình 500 con/kg, được mua từ hộ nông dân thị xã Long Xuyên, tỉnh An Giang. Trùn mua về được rửa sạch, loại các tạp chất và trữ ở -20°C .

Trùn được nghiền nhuyễn trong nước cất, bổ sung 0,02% natri azide để ngăn sự phát triển của vi khuẩn. Hỗn hợp được ủ trong 10 ngày ở nhiệt độ phòng. Dịch trích ly protein được ly tâm với 10000 g ở 4°C , 30 phút. Dung dịch trong bên trên được rửa với acetone theo tỷ lệ 1:2 (v/v). Tủa protein được thu hồi và trữ ở -20°C cho các thí nghiệm sau này.

Hóa chất

Casein, Fibrinogen, PMSF, thuốc thử Folin, Tris được mua từ Merck; human plasmin và thrombin (Sigma); gel trao đổi ion Unosphere Q, hóa chất cho SDS-PAGE (Bio-Rad); protein chuẩn (Fermentas).

Phương pháp

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry và đồng tác giả (1951).

Xác định hoạt tính protease

Hoạt tính protease thủy phân casein được xác định theo phương pháp Anson cải tiến (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 1997) với cơ chất 2% casein. Đơn vị hoạt tính enzyme biểu hiện qua tyrosine unit (U)/mg protein. Một đơn vị enzyme là lượng enzyme cần thiết xúc tác thủy phân casein, tương đương 1 μmol tyrosine sinh ra trong một phút ở 30°C ; pH 7,5.

Hoạt tính protease thủy phân fibrin được xác định theo phương pháp Astrup và Mullertz cải tiến (Choi, Kim, 2001). 10 ml hỗn hợp agarose (2% w/v) và fibrinogen (0,6% w/v) trong đệm 50 mM phosphate pH 7,4, đun trong lò vi sóng trong 2 phút, để nguội đến 50°C , thêm 100 μl dung dịch thrombin (10 NIH unit/ml), khuấy đều, đổ dung dịch agarose vào đĩa petri, ổn định 1 h ở nhiệt độ phòng. Tạo các lỗ đường kính 4 mm trên lớp agarose, 10 μl enzyme

(0,2 μg) được bơm vào mỗi lỗ, ủ trong 8 h ở 37°C . Xác định hoạt tính fibrin theo diện tích vòng tròn thủy phân so sánh với đường chuẩn.

Đường chuẩn human plasmin: Dung dịch chuẩn human plasmin 1 unit/ml. Dựng đường chuẩn từ 0,1 - 0,7 unit/ml. Chuẩn bị đĩa fibrin và bơm vào mỗi lỗ 10 μl , ủ trong 8 h ở 37°C .

SDS-PAGE

Điện di SDS-PAGE theo Hames (1998) với gel polyacrylamide 12%. Xác định khối lượng phân tử của protein dựa trên thang protein chuẩn của Fermentas (14,4 - 116,0 kDa).

Sắc ký trao đổi ion trên cột Unosphere Q

10 g protein thô hòa tan trong 100 ml đệm 20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 1 mM PMSF. Cột sắc ký 1,5 $\times$ 40 cm được nhồi gel Unosphere Q, cân bằng với đệm 20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 1 mM PMSF. Dung dịch protein được cho qua cột với tốc độ dòng 0,8 ml/phút. Protein hấp thụ được rửa bằng gradient nồng độ muối 0 - 0,45 M NaCl, tốc độ dòng 1 ml/phút. Các phân đoạn protein được thu lại, xác định hàm lượng protein, điện di SDS-PAGE, xác định hoạt tính protease trên casein và trên đĩa fibrin.

Sắc ký tương tác kỵ nước trên cột phenyl sepharose

Các phân đoạn protease nhận được sau khi qua cột sắc ký trao đổi ion được tiếp tục cho qua cột sắc ký tương tác kỵ nước. Cột (1,5 $\times$ 30 cm) được nhồi gel Phenyl Sepharose. Cân bằng cột với đệm 20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 1 mM PMSF + 30% ammonium sulphate (AS) tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Các phân đoạn được tuần tự cho qua cột. Protein hấp thụ được rửa với gradient nồng độ muối 30 - 0% AS, tốc độ dòng 1 ml/phút. Các phân đoạn protein được thu lại, xác định hàm lượng protein, điện di SDS-PAGE và xác định hoạt tính protease theo Anson cải tiến.

Sắc ký lọc gel trên cột Sepharose 12

Các phân đoạn có hoạt tính protease thu được từ sắc ký tương tác kỵ nước được thẩm tích loại muối trong đệm 20 mM Tris-HCl pH 7,5 + 0,15 M NaCl + 1 mM PMSF. Từng phân đoạn được cho tuần tự qua cột lọc gel Sepharose 12 (Amersham), sử dụng hệ thống sắc ký tự động Biologic HR (Bio-Rad) với cùng dung dịch đệm, tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút. Các phân đoạn protein được thu lại, xác định hàm lượng protein, xác định hoạt tính và điện di SDS-PAGE.

Các phân đoạn enzyme tinh sạch được đông khô bằng thiết bị VirTis (USA).

Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của các protease

Xác định nhiệt độ tối ưu

Các phân đoạn enzyme tinh sạch được hòa tan trong đệm 50 mM phosphate pH 7,5 (1 mg/ml) và ủ ở các nhiệt độ khác nhau 30, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 và 80°C trong 10 phút. Xác định hoạt tính protease tại các nhiệt độ trên theo Anson cải tiến.

Xác định độ bền nhiệt của các protease

Các phân đoạn enzyme tinh sạch với nồng độ 1 mg/ml, được ủ ở các nhiệt độ 37, 50, 55, 60, 65, 70°C trong 3 h. Sau đó ổn định ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, đo hoạt tính bằng phương pháp Anson cải tiến. Hoạt tính tương quan % trong thí nghiệm được so sánh với hoạt tính enzyme hoạt động ở 37°C (100%).

Xác định pH tối ưu và độ bền pH của các protease

Xác định pH tối ưu

pH tối thích của các phân đoạn protease sau khi tinh sạch được khảo sát ở các giá trị pH khác nhau với các dung dịch đệm glycine-HCl (pH 2, 3, 4); phosphate (pH 6, 7, 8); Tris-HCl (pH 9, 10); glycine-NaOH (pH 10, 11); KCl-NaOH (pH 12, 13). Enzyme được ủ ở các pH nói trên trong 30 phút và đo hoạt tính protease theo Anson cải tiến.

Xác định độ bền pH

Các phân đoạn enzyme được ủ ở pH từ 2 - 13 trong 16 h ở 4°C. Sau đó, dung dịch enzyme được đưa về pH 7, xác định hoạt tính bằng phương pháp Anson cải tiến. Hoạt tính tương quan % trong thí nghiệm được so sánh với hoạt tính enzyme hoạt động ở pH 7 (100%).

Ảnh hưởng chất ức chế lên hoạt tính protease

Các phân đoạn enzyme tinh sạch được pha trong đệm 20 mM Tris-HCl pH 7,5 với nồng độ 1 mg/ml, cho chất ức chế phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) vào với nồng độ 1 mM, xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson cải tiến, đối chứng là enzyme không có chất ức chế.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

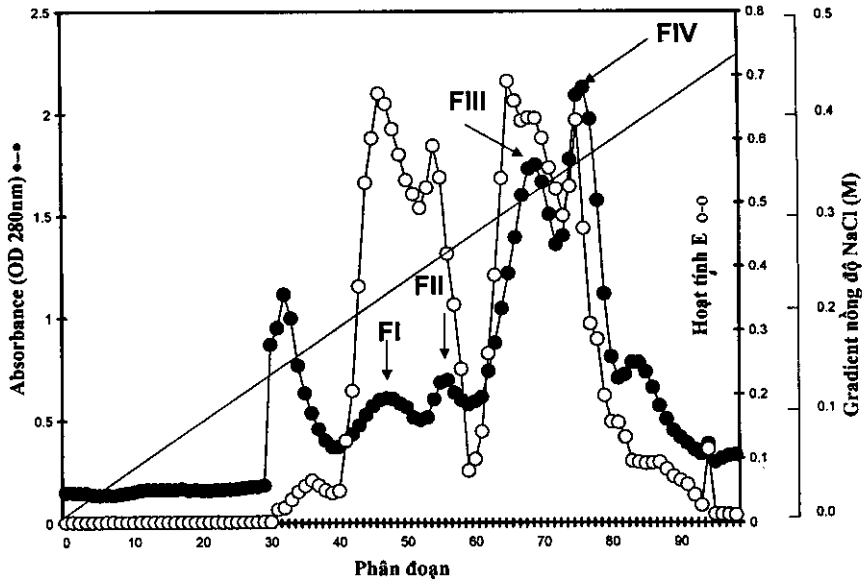
Tinh sạch sơ bộ protease thô

Kết quả phân tích cho thấy dịch chiết protein từ 1 kg trùn trùn tươi sau quá trình tự phân giải 10 ngày có hoạt tính đặc hiệu protease đạt cao nhất với cơ chất casein là 0,045 U/mg protein, tăng gấp 2 lần so với hoạt tính ban đầu. Có khả năng quá trình tự phân giải giúp hoạt hóa các tiền chất của protease tương tự như sự hoạt hóa các enzyme trypsin hay chymotrypsin trong hệ tiêu hóa của động vật. Dịch thủy phân tủa với acetone theo tỷ lệ 1:2 (v/v) thu được khoảng 96 g bột protein thô với hiệu suất thu hồi 9,6%, hoạt tính riêng với cơ chất casein là 0,138 U/mg protein. Có thể thấy hoạt tính riêng của protease thô nhận được sau khi tủa acetone tăng hơn gấp 3 lần so với dịch thủy phân ban đầu. Việc tinh sạch sơ bộ protease thô trùn quế bằng acetone cũng phù hợp với nghiên cứu tinh sạch protease trong trường hợp mẫu có hàm lượng protein cao (Wang *et al.*, 1999) và enzyme trùn đất rất bền không bị mất hoạt tính bởi acetone (Nakajima *et al.*, 2000). Điều này giúp việc tinh sạch ở các bước tiếp theo ít lẫn các protein tạp và có thể thu được enzyme với lượng khá lớn.

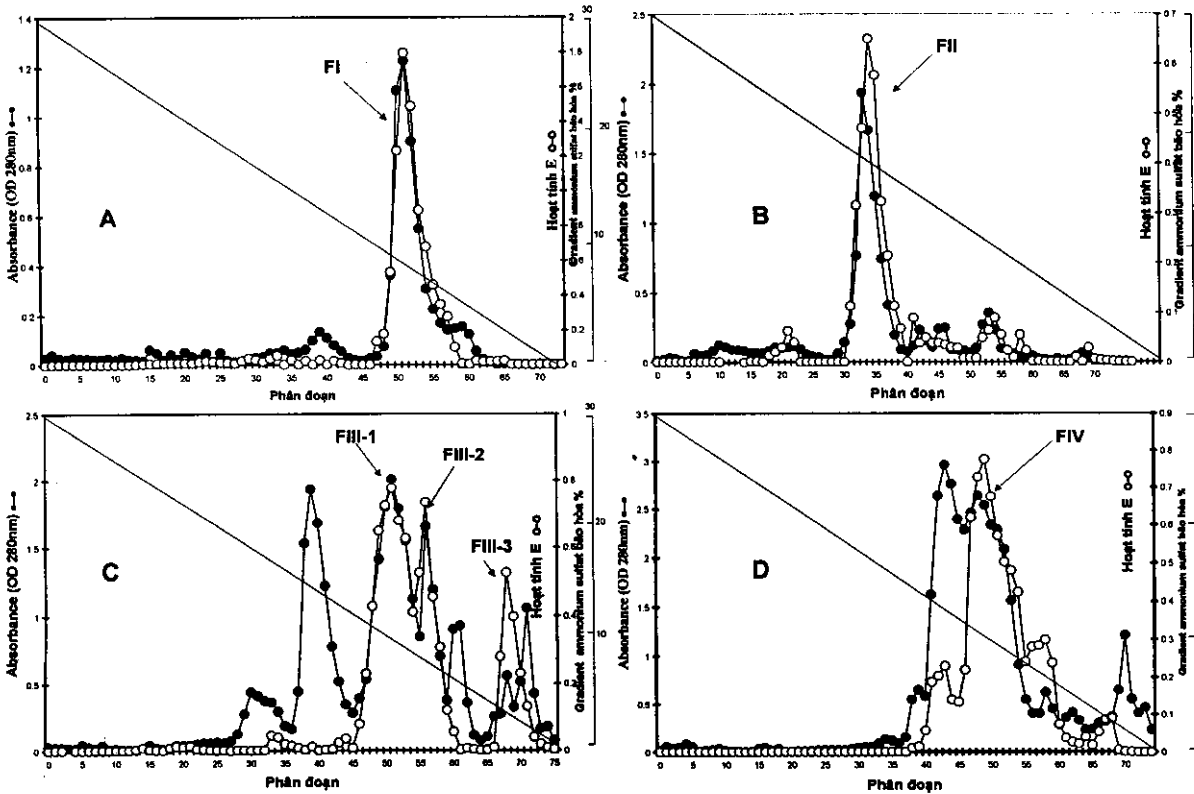
Sắc ký trao đổi ion

Phổ sắc ký (Hình 1) cho thấy enzyme thô của trùn quế sau khi qua cột trao đổi ion Unosphere Q được tách thành 6 phân đoạn, trong đó chỉ có 4 phân đoạn FI, FII, FIII và FIV được rửa tuần tự ở các gradient nồng độ NaCl là 0,21 M; 0,25 M; 0,31 M và 0,35 M có hoạt tính protease trên casein với hoạt tính riêng tăng dần theo thứ tự F1 > F2 > F3 > FIV, tương ứng với 0,87; 0,41; 0,31 và 0,11 U/mg protein. Có thể thấy thành phần protease trong trùn quế rất khác biệt, phân đoạn FI có hàm lượng protein không cao so với các phân đoạn khác (9,25% protein tổng số) nhưng có hoạt tính riêng khá mạnh, gấp hai lần FII, gần 3 lần FIII và gấp 8 lần FIV, trong khi đó phân đoạn FIII và FIV có hàm lượng protein khá cao (39 - 40% protein tổng số) nhưng hoạt tính riêng lại thấp.

Điện di SDS-PAGE có chất khử β -mercaptoethanol cho thấy thành phần protein của các phân đoạn protease nhận được còn khá phức tạp (kết quả không đưa ra ở đây), vì vậy các phân đoạn này được phân tách tiếp tục trên cột sắc ký tương tác kỵ nước Phenyl Sepharose.



Hình 1. Phổ sắc ký trao đổi ion trên cột Unosphere Q dung dịch enzyme thô.



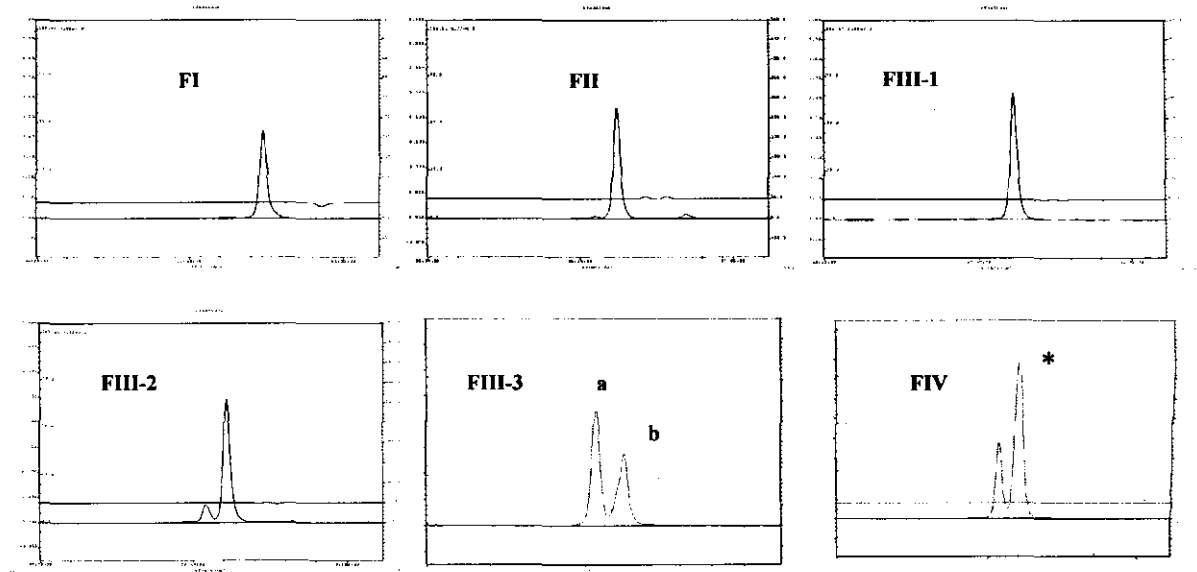
Hình 2. Phổ sắc ký tương tác kỵ nước trên cột Phenyl Sepharose (A), (B), (C), (D): phân đoạn FI, FII, FIII, FIV.

Sắc ký tương tác kỵ nước

Phổ sắc ký tương tác kỵ nước (Hình 2) của từng phân đoạn protease cho thấy ở FI và FII chủ yếu chỉ có một đỉnh protein có hoạt tính (Hình 2A và 2B) và được rửa giải ở gradient nồng độ muối 9% và 16,6% AS bão hòa tương ứng. Riêng FIII được tách thành nhiều tiểu phân đoạn nhưng chỉ có 3 tiểu phân đoạn FIII-1, FIII-2 và FIII-3 có hoạt tính protease (Hình 2C) và được rửa khỏi cột với các nồng độ muối AS bão hòa lần lượt là 9,3; 7,3 và

5,7%. Trong phân đoạn FIV có 2 tiểu phân đoạn nhỏ nhưng chỉ có một tiểu phân đoạn có hoạt tính protease được rửa khỏi cột với nồng độ muối AS bão hòa 10,5% (Hình 2D).

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy các tiểu phân đoạn protease sau khi qua cột tương tác kỵ nước vẫn còn lẫn một số protein tạp có khối lượng phân tử thấp (kết quả không đưa ra ở đây). Vì vậy sắc ký lọc gel có thể là biện pháp hiệu quả hơn để loại các thành phần tạp còn lại này.



Hình 3. Phổ sắc ký lọc gel trên cột Sepharose 12 các tiểu phân đoạn.

Sắc ký lọc gel trên cột Sepharose 12

Các phân đoạn FI, FII, FIII-1, FIII-2 sau khi qua cột lọc gel khá sạch chủ yếu có một đỉnh protein có hoạt tính cao (Hình 3). FIV có 2 đỉnh protein nhưng chỉ có FIV* có hoạt tính. SDS-PAGE với sự hiện diện của β -mercaptoethanol (Hình 4) cho thấy trong tất cả các phân đoạn protease tinh sạch, các băng protein khá rõ nét với khối lượng phân tử tương ứng với kết quả nhận được qua sắc ký lọc gel.

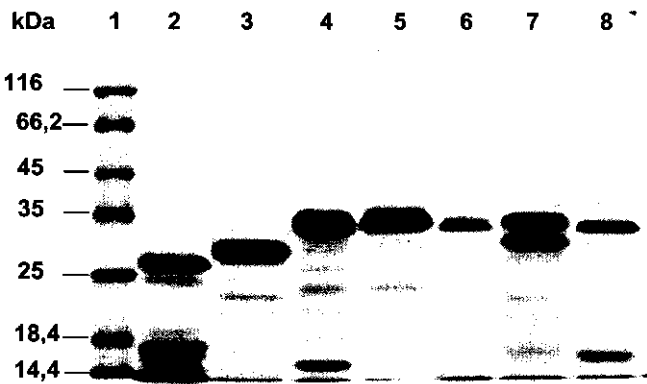
Khác biệt có phân đoạn FIII-3, sau khi phân tích qua cột lọc gel phân đoạn này có hai đỉnh protein trong đó chỉ có FIII-3b có hoạt tính, nhưng kết quả điện di cho thấy cả 2 đỉnh FIII-3a (giếng 6) và FIII-3b (giếng 7) đều có băng protein với khối lượng phân tử gần như nhau khoảng 33 kDa, riêng FIII-b có thêm 1 băng protein với khối lượng phân tử thấp

hơn (31 kDa). Có khả năng băng protein 33 kDa là tiền chất của FIII-3, mặc dù quá trình tự phân giải có kéo dài (10 ngày) nhưng sự phân cắt tiền chất này để cho enzyme có hoạt tính diễn ra chưa triệt để. Theo nghiên cứu của Cho và đồng tác giả (2004a), trong trùn *Lumbricus rubellus* có phân đoạn protease F6 cũng là dạng tiền enzyme gồm 283 amino acid trong đó đoạn peptide gồm 44 amino acid là không có hoạt tính, phân protein có hoạt tính protease chỉ có 239 amino acid. Do vậy, nếu phân tích được trình tự amino acid của cả hai băng protein 33 kDa và 31 kDa sẽ cho kết quả cụ thể hơn.

SDS-PAGE có chất khử β -mercaptoethanol, kết hợp với sắc ký lọc gel cho thấy khối lượng phân tử của FI, FII, FIII-1, FIII-2, FIII-3b và FIV* là 28; 29; 35; 35; 31 và 34 kDa tương ứng. Như vậy, trong 6 phân đoạn được tìm thấy có 2 phân

đoạn có khối lượng phân tử tương tự như kết quả tinh sạch trước đây của Lý Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2006) là 28 và 34 kDa. So sánh về thành phần protease trùn quế tương tự với protease trùn đất (từ 23,5 - 34,2 kDa) theo các công trình nghiên cứu của Mihara và đồng tác giả (1991). Phổ điện di (Hình 4) cho thấy vẫn còn sự hiện diện của một

số băng protein với khối lượng phân tử thấp, mặc dù trên sắc ký lọc gel các đỉnh protein nhận được khá sạch, có khả năng đó là sản phẩm sinh ra do sự tự phân giải của các protease. Tuy rằng trong quá trình tinh sạch đã có sử dụng chất ức chế PMSF để hạn chế khả năng này nhưng cũng không thể ức chế hoàn toàn được.



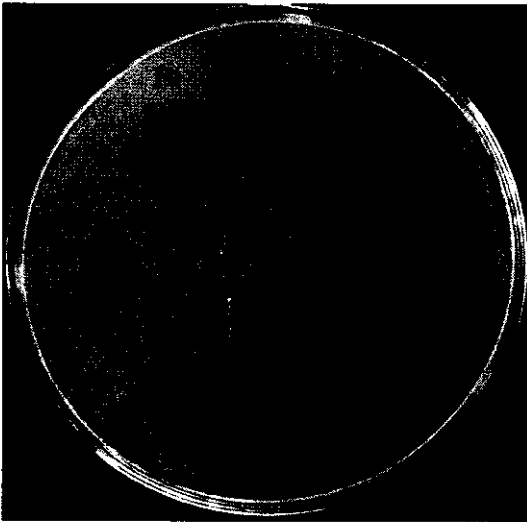
Hình 4. Điện di SDS-PAGE các phân đoạn sau lọc gel có β -mercaptoethanol. 1: protein chuẩn, 2: F1, 3: F2, 4 : FIII-1, 5: FIII-2, 6: FIII-3a, 7: FIII-3b, 8: FIV.

Hoạt tính thủy phân trên casein và đĩa fibrin của các phân đoạn protease

Hoạt tính thủy phân trên casein của các phân đoạn enzyme trùn quế được trình bày ở bảng 1. Hoạt tính protease được thực hiện ở nhiệt độ 30°C nằm trong dãy 0,87 - 1,81 U/mg protein theo thứ tự F1> FIII-3> FII> FIII-1> FIII-2> FIV.

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme trên đĩa fibrin (Hình 5) cho thấy, sau 8 h ủ ở 37°C, cả 6 phân đoạn đều tạo thành những vòng tròn trong suốt do fibrin bị thủy phân. Dựa vào diện tích vòng tròn thủy phân, có thể thấy khả năng thủy phân fibrin của phân đoạn FII là thấp nhất, không đặc hiệu đối với cơ chất này. Hoạt tính mạnh thể hiện ở phân đoạn FIII-3. Hoạt tính fibrin các phân đoạn trong khoảng 44,1 - 830,7 đơn vị plasmin/mg được tính dựa vào đường chuẩn plasmin, mức độ hoạt tính được xếp theo thứ tự sau: FIII-3> FIII-2> FI> FIII-1> FIV> FII. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Cho và đồng tác giả (2004a) trên trùn *Lumbricus rubellus*, mức độ thủy phân cơ chất casein không khác biệt nhiều giữa sáu phân đoạn protease được tìm thấy, riêng về khả

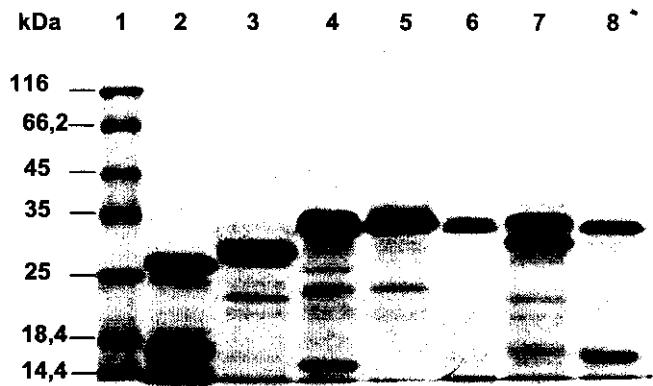
năng thủy phân fibrin trên đĩa chỉ có phân đoạn F6 có hoạt tính cao nhất (207,2 đơn vị plasmin/mg).



Hình 5. Hoạt tính thủy phân trên đĩa fibrin của các phân đoạn enzyme.

đoạn có khối lượng phân tử tương tự như kết quả tinh sạch trước đây của Lý Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2006) là 28 và 34 kDa. So sánh về thành phần protease trùn quế tương tự với protease trùn đất (từ 23,5 - 34,2 kDa) theo các công trình nghiên cứu của Mihara và đồng tác giả (1991). Phổ điện di (Hình 4) cho thấy vẫn còn sự hiện diện của một

số băng protein với khối lượng phân tử thấp, mặc dù trên sắc ký lọc gel các đỉnh protein nhận được khá sạch, có khả năng đó là sản phẩm sinh ra do sự tự phân giải của các protease. Tuy rằng trong quá trình tinh sạch đã có sử dụng chất ức chế PMSF để hạn chế khả năng này nhưng cũng không thể ức chế hoàn toàn được.



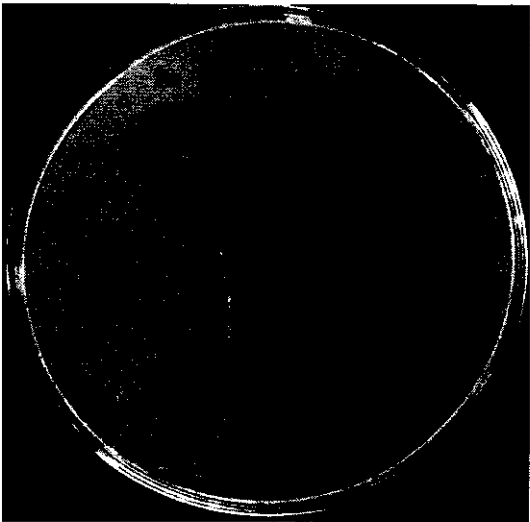
Hình 4. Điện di SDS-PAGE các phân đoạn sau lọc gel có β -mercaptoethanol. 1: protein chuẩn, 2: F1, 3: F2, 4: FIII-1, 5: FIII-2, 6: FIII-3a, 7: FIII-3b, 8: FIV.

Hoạt tính thủy phân trên casein và đĩa fibrin của các phân đoạn protease

Hoạt tính thủy phân trên casein của các phân đoạn enzyme trùn quế được trình bày ở bảng 1. Hoạt tính protease được thực hiện ở nhiệt độ 30°C nằm trong dãy 0,87 - 1,81 U/mg protein theo thứ tự F1> FIII-3> FII> FIII-1> FIII-2> FIV.

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme trên đĩa fibrin (Hình 5) cho thấy, sau 8 h ủ ở 37°C, cả 6 phân đoạn đều tạo thành những vòng tròn trong suốt do fibrin bị thủy phân. Dựa vào diện tích vòng tròn thủy phân, có thể thấy khả năng thủy phân fibrin của phân đoạn FII là thấp nhất, không đặc hiệu đối với cơ chất này. Hoạt tính mạnh thể hiện ở phân đoạn FIII-3. Hoạt tính fibrin các phân đoạn trong khoảng 44,1 - 830,7 đơn vị plasmin/mg được tính dựa vào đường chuẩn plasmin, mức độ hoạt tính được xếp theo thứ tự sau: FIII-3> FIII-2> FI> FIII-1> FIV> FII. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Cho và đồng tác giả (2004a) trên trùn *Lumbricus rubellus*, mức độ thủy phân cơ chất casein không khác biệt nhiều giữa sáu phân đoạn protease được tìm thấy, riêng về khả

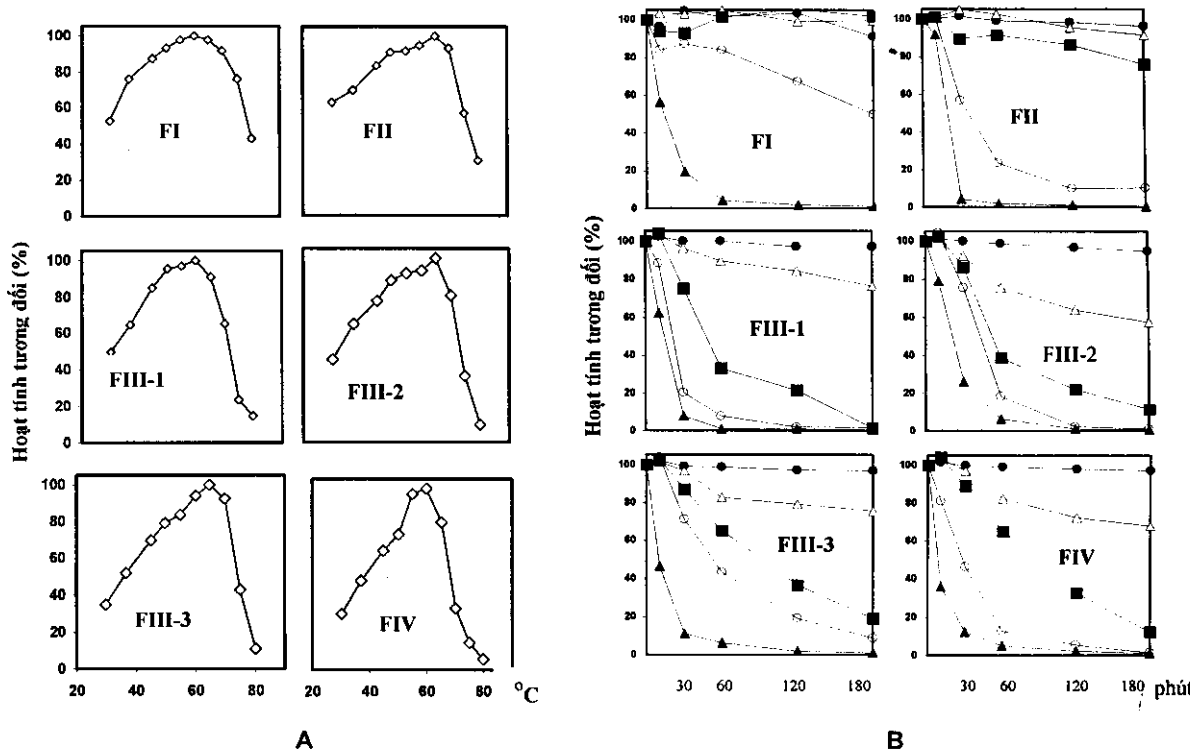
năng thủy phân fibrin trên đĩa chỉ có phân đoạn F6 có hoạt tính cao nhất (207,2 đơn vị plasmin/mg).



Hình 5. Hoạt tính thủy phân trên đĩa fibrin của các phân đoạn enzyme.

Bảng 1. Hoạt tính thủy phân casein và fibrin các phân đoạn enzyme trùn quế sau tinh sạch.

Cơ chất	FI	FII	FIII-1	FIII-2	FIII-3	FIV
Fibrin (plasmin unit/mg)	602,1	44,1	393,4	783,4	830,7	296,4
Casein (U/mg)	1,81	1,05	1,04	0,98	1,23	0,87



Hình 6. Nhiệt độ tối ưu các phân đoạn enzyme sau khi tinh sạch (A), Độ bền nhiệt các phân đoạn sau khi tinh sạch. Ký hiệu (●): 50°C; (Δ): 55°C; (■): 60°C; (○): 65°C (▲): 70°C (B).

Nhiệt độ tối thích và độ bền nhiệt

Nhiệt độ tối thích của sáu phân đoạn protease trên cơ chất casein được khảo sát trong khoảng từ 30-80°C. Kết quả cho thấy cả 6 phân đoạn đều hoạt động mạnh trong khoảng nhiệt độ 60 - 65°C, trong đó FII, FIII-1, FIII-2, FIII-3 hoạt động mạnh nhất ở nhiệt độ 65°C, riêng FI và FIV hoạt động mạnh nhất ở 60°C (Hình 6A).

Tuy nhiên, khi khảo sát độ bền nhiệt của sáu phân đoạn trong khoảng nhiệt độ 50 - 70°C trong thời gian 3 h, nhận thấy enzyme chỉ bền ở nhiệt độ ≤ 50°C, hoạt tính bắt đầu giảm từ 10 - 30% ở nhiệt độ 55°C. Trong khoảng nhiệt độ 60 - 65°C hoạt tính enzyme giảm đến 98% và ở 70°C hoạt tính gần như bị mất hoàn toàn. Theo kết quả hình 6B cho thấy FI

và FII có khả năng bền nhiệt hơn các phân đoạn khác, ở nhiệt độ từ 50 - 60°C hoạt tính mất từ 10-20%. Điều này cũng thể hiện được trong suốt tiến trình tinh sạch, cả 2 phân đoạn này có hoạt tính tương đối ổn định. Kết quả này cũng có khác biệt một ít so với các khảo sát của Lý Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2006), theo tác giả thì enzyme trùn quế có nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt thấp hơn trong khoảng từ 35 - 45°C và có thể sự khác biệt là do điều kiện khảo sát.

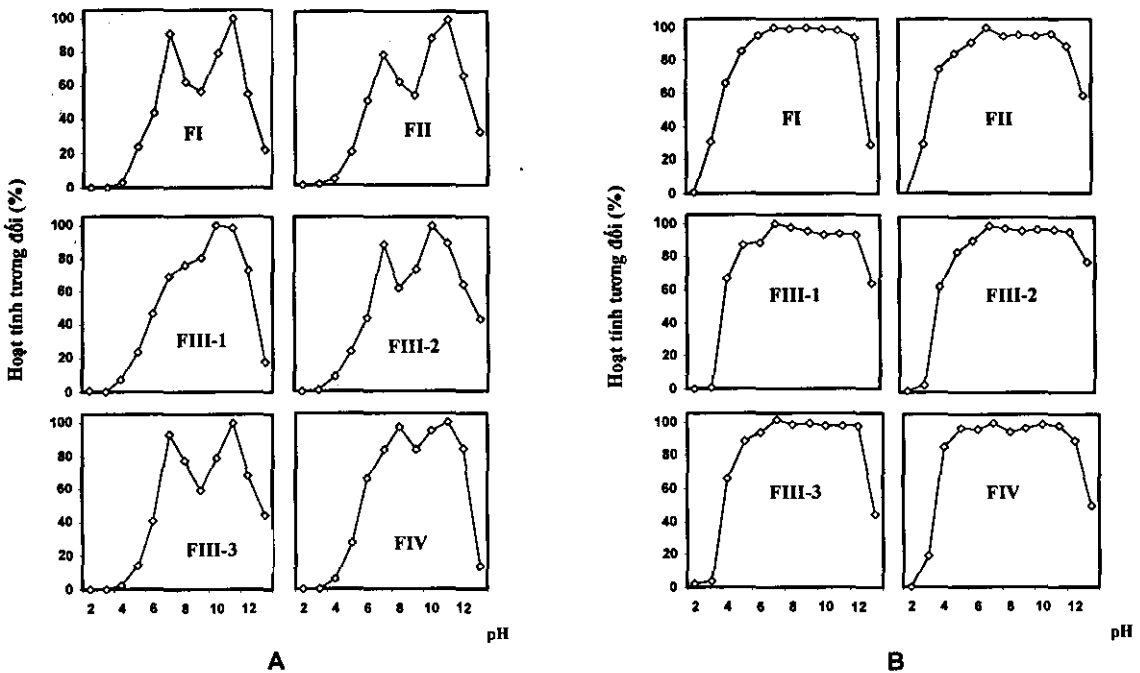
pH tối ưu và độ bền pH

pH tối ưu của hầu hết 6 phân đoạn ở là pH 11. Ngoài ra, các phân đoạn FI, FII, FIII-2, FIII-3 và FIV còn hoạt động khá mạnh ở pH trung tính 7

(Hình 7A), đặc điểm này được tìm thấy ở serine protease trong khoang ruột ấu trùng của loài bọ cánh cứng *Tribolium castaneum*. pH tối ưu trên cơ chất tổng hợp N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) là 4,0 và 8,5 (Oppert *et al.*, 2003). Hoạt tính mạnh ở pH trung tính rất thuận lợi cho việc sử dụng các protease trùn quế trong lĩnh vực y dược học, để hòa tan các cục máu đông trong môi trường pH sinh lý của cơ thể.

Độ bền pH của các phân đoạn enzyme tinh sạch được khảo sát bằng việc ủ enzyme ở pH từ 2 - 13

trong 16 h (Hình 7B). Nhận thấy ở pH 2, hầu hết các phân đoạn enzyme bị mất hoạt tính hoàn toàn; hoạt tính rất thấp ở pH 3 và 13; bền và ổn định ở pH trong khoảng 4-12, các protease này có ưu điểm là cũng bền trong khoảng pH tối ưu của chúng. Với đặc tính về độ bền pH này thì các protease trùn quế khảo sát tương tự với loài trùn *Lumbricus rubellus* của Nhật Bản và Hàn Quốc (Mihara *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 2004a) và cũng có sự khác biệt với protease trùn quế mà Lý Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2006) nghiên cứu, chúng hoạt động và bền trong vùng pH trung tính.

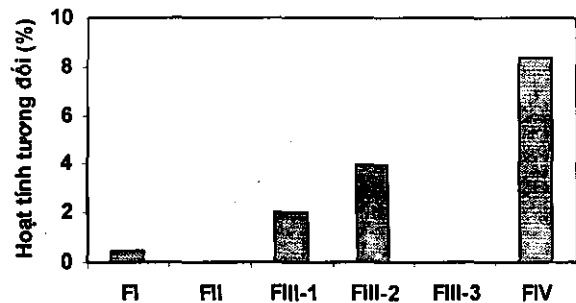


Hình 7. pH tối ưu các phân đoạn enzyme sau khi tinh sạch (A), Độ bền pH các phân đoạn enzyme sau khi tinh sạch (B).

Ảnh hưởng của chất ức chế PMSF

Khả năng ức chế của PMSF lên hoạt tính của sáu phân đoạn protease sau khi tinh sạch đã được xác định. Kết quả (Hình 8) cho thấy hầu hết cả sáu đều bị mất hoạt tính với các mức độ khác nhau. FI, FII, FIII-3 gần như bị mất hoạt tính hoàn toàn, FIII-1, FIII-2 và FIV bị mất hoạt tính từ 92 - 98%.

Điều này cho phép dự đoán cả sáu phân đoạn protease tinh sạch được từ trùn quế thuộc nhóm serine protease.



Hình 8. Ảnh hưởng của PMSF lên hoạt tính các phân đoạn protease tinh sạch.

KẾT LUẬN

Sự hoạt hóa protease bằng quá trình tự thủy phân trong giai đoạn trích ly ban đầu là cần thiết để gia tăng hoạt tính protease của dịch enzyme. Kết quả nghiên cứu cho thấy protease trùn quế (*Perionyx excavatus*) là các serine protease kiềm tính, có nhiệt độ tối ưu trong khoảng 60 - 65°C và pH tối ưu là 11. Bền ở nhiệt độ 50°C và trong khoảng pH 4 - 12. Khối lượng phân tử của các protease tinh sạch nằm trong khoảng từ 28 - 35 kDa. Protease trùn quế có khả năng thủy phân fibrin tốt hơn casein và hoạt tính này được thể hiện mạnh nhất ở phân đoạn FIII-3. Trong các nghiên cứu tiếp theo cần phân tích trình tự amino acid của các protease tinh sạch này, để có thể so sánh sự tương đồng hay khác biệt của chúng với các protease trong các loài trùn đất đã được nghiên cứu. Ngoài ra, việc khảo sát các điều kiện tối ưu để có thể nâng cấp quy trình tinh sạch cho sản phẩm ở phạm vi ứng dụng trong y dược học cũng là điều cần thiết.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài nghiên cứu cấp Bộ B2007-16-56.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cho IH, Choi ES, Lim HG, Lee HH (2004a) Purification and characterization of six fibrinolytic serine-protease from earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol* 37(2): 199-205.
- Cho IH, Choi ES, Lee HH (2004b) Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol* 37(5): 574-581.
- Choi NS, Kim SH (2001) The effect of sodium chloride on the serine-type fibrinolytic enzymes and the thermostability of extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4. *J Biochem Mol Biol* 34(2): 134-138.
- Hames PD (1998) *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. 3th edition. Oxford.
- Lowry OH, Rosenberg WJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Quantitation of protein using Folin-Ciocalteu reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004) Tách chiết enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin từ loài giun quế (*Perionyx excavatus*). *Báo cáo Khoa học Hội nghị Toàn quốc 2004, Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Sự sống định hướng Y Dược học, Hà Nội*: 173-176.
- Lý Thị Bích Thủy, Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2006) Tinh sạch và xác định một số tính chất của enzyme thủy phân fibrin được tách chiết từ loài giun quế (*Perionyx excavatus*). *Tạp chí Sinh học* 28(3): 77-82.
- Miraha H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M, Maruyama M (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol* 41: 461-472.
- Mihara H, Nakajima N, Sumi H (1993) Characterization of protein fibrinolytic enzyme in earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1726-1730.
- Nakajima N, Sugimoto M, Ishihara K (2000) Stable earthworm serine protease: Application of the protease function and usefulness of the earthworm autolysate. *J Biosci Bioeng* 90(2): 174-179.
- Oppert B, Morgan TD, Hartzer K, Lenarcic B, Galesa, Brzin J, Turk V, Yoza K, Ohtsubo K, Kramer KJ (2003) Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinase and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol, Part C* 134: 481-490.
- Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường (1997) *Thực hành Sinh hóa*. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Sugimoto M, Nakajima N (2001) Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine-protease with fibrinolytic activity from earthworm. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(7): 1575-1580.
- Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Fujii T, Kowashi Y, Ohura K (1999) Purification and characterization of a trypsin-like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *Eur J Oral Sci* 107: 147-153.
- Yang JS, Ru BG (1997) Purification and characterization of an SDS-activated fibrinolytic enzyme from *Eisenia fetida*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118(3): 623-631.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SERINE PROTEASE FROM EARTHWORM (*PERIONYX EXCAVATUS*)

Phan Thi Bich Tram^{1,*}, Duong Thi Huong Giang¹, Ha Thanh Toan¹, Pham Thi Anh Hong²

¹Cantho University

²University of Natural Sciences, Vietnam National University-Hochiminh City

SUMMARY

Six protease fractions FI, FII, FIII-1, FIII-2, FIII-3, FIV were purified from the earthworm *Perionyx excavatus* lysate by acetone precipitation in combination with chromatography on ion exchange column Unosphere Q, hydrophobic column Phenyl-Sepharose and gel filtration Sepharose 12 column. The protease activity of the protein extract increased two times by the autolysis within 10 days at room temperature. The substrate specificity of these six fractions exposed differently on different substrates, on the fibrin plate the protease activity ranged from 44.1 to 830.7 plasmin unit/mg protein in the following order: FIII-3> FIII-2> FI> FIII-1> FIV> FII, while on the casein substrate it ranged from 0.87 to 1.81 tyrosine unit/mg protein in the order of FI> FIII-3> FII> FIII-1> FIII-2> FIV. The molecular mass of these protease fractions estimated by SDS-PAGE in combination with gel filtration were from 28 kDa to 35 kDa. The optimum temperature for FI, FII, FIII-2, FIII-3 was 65°C and for FIII-1, FIV was 60°C. All obtained protease fractions exposed optimum activity at pH 11, besides that FI, FII, FIII-2, FIII-3, FIV also have relatively high activity at pH 7. These enzymes were stable at temperature ≤ 50°C, and in a wide pH range from pH 4 - 12. The inhibition effect of phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) on protease activity suggested that these proteases belonged to group of serine proteases.

Keywords: Fibrin plate, *Perionyx excavatus*, Phenyl Sepharose, Sepharose 12, serine protease, UnosphereQ.

* Author for correspondence: Tel: 84-710-831530/8326; E-mail: ptbtram@ctu.edu.vn