

ỨNG DỤNG ĐIỆN DI ZYMOGRAM VÀ SUBSTRATE-GEL TRONG XÁC ĐỊNH PHÂN TỬ LƯỢNG CỦA PROTEASE TÔM SÚ *PENAEUS MONODON*

● NGUYỄN LỆ HÀ

TÓM TẮT:

Nghiên cứu đã xác định phân tử lượng của protease nội tạng và đầu tôm sú *Penaeus monodon* bằng phương pháp điện di Zymogram và Substrate-Gel Electrophoresis. Hệ protease nội tạng và đầu tôm lần lượt có 5 và 7 loại khác nhau, trong đó có 3 loại chính quyết định hoạt tính của chúng với phân tử lượng từ 20.200 - 25.000 Da. Zymogram tỏ ra hiệu quả hơn trong nhận diện các protease có mặt, nhưng Substrate-Gel lại cho đánh giá về hoạt tính tương đối của từng protease rõ ràng hơn.

Từ khóa: tôm sú, khối lượng phân tử, protease, zymogram, substrate-gel electrophoresis.

1. Đặt vấn đề

Trong sản xuất và đời sống, enzyme nói chung, protease nói riêng được sử dụng ngày càng phổ biến như một phương tiện trợ giúp hiệu quả ở rất nhiều lĩnh vực sản xuất thực phẩm và ngày càng đóng vai trò quan trọng hơn trong công nghệ thực phẩm. Thế mạnh của ngành Thủy sản Việt Nam trên thương trường quốc tế là các sản phẩm từ tôm, đặc biệt là tôm sú. Trong năm 2020, xuất khẩu tôm đạt 3,7 tỷ USD, tăng 11% so với năm trước [1].

Cùng với sự phát triển của ngành chế biến, lượng phế liệu thải ra cũng ngày càng nhiều. Trong khi đó, protease thu nhận từ phế liệu đầu tôm có hoạt tính mạnh, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng enzyme nhóm này vào các lĩnh vực khác nhau và đạt hiệu quả khả quan [2]. Nghiên cứu mong muốn kiểm tìm những hiểu biết đầy đủ về

protease trong tôm nhằm đáp ứng các nhu cầu thông tin về mặt hàng nuôi trồng và chế biến chủ lực của ngành Thủy sản, giúp hiểu và lý giải được các biến đổi của tôm sau khi thu hoạch, trong quá trình chế biến cũng như bảo quản.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Tôm sú sống (cỡ 40-50 con/kg) nuôi tại Cần Giờ, được vận chuyển từ ao nuôi về phòng thí nghiệm trong bình sục khí, làm tôm chết bằng cách trộn với đá lạnh sau đó tách nội tạng để riêng trong túi PE, bảo quản ở -20°C và lấy ra khi cần nghiên cứu, thời gian bảo quản không quá 4 tuần.

Tinh sạch protease: Toàn bộ quá trình tách chiết và tinh sạch enzyme được thực hiện ở nhiệt độ 0 - 4°C. Nội tạng tôm được nghiền nhỏ và chiết rút bằng Tris-HCl 0,05M pH7,5 theo tỉ lệ nguyên liệu:

dung môi 1: 3(w/v) trong 60 phút, sau đó ly tâm (6.000 vòng/ph, 15 phút) thu dịch chiết, kết tủa dịch chiết với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% trong 70 phút rồi ly tâm (tương tự trên), sau đó loại muối qua đêm bằng màng thẩm tích. Cặn thu được hòa tan trong đệm photphat pH7 rồi đem tách trên sắc ký lọc gel Bio - Gel P-100, sử dụng cột 50 x 1,5cm của Bio - Rad. Tốc độ dòng 0,14 ml/ phút, thu phân đoạn (2ml/phân đoạn).

Phân tử lượng của protease tôm sú được xác định bằng phương pháp sử dụng điện di Substrate-Gel Electrophoresis và Zymogram.

Điện di Substrate-Gel Electrophoresis được thực hiện theo phương pháp của García-Carreno và cộng sự (1993) [4] trên gel polyacrylamide với gel gom 4% và gel phân tán 12%. Protease sau sắc ký lọc gel (hàm lượng protein 500 $\mu\text{g/ml}$) được pha loãng với tỉ lệ từ 1:5 đến 1:500 (v/v) bằng dung dịch đệm xử lý mẫu (Tris-HCl 1M pH6,8; SDS 10%; glycerol 20%, không tác nhân khử β -mercaptoethanol), không gia nhiệt. Mỗi mẫu protease gan tụy hoặc đầu đều được điện di song song 5 mẫu trên cùng bản gel với độ pha loãng khác nhau 5, 25, 50, 100 và 500 lần, lượng mẫu đưa lên giếng là 15 μl . Thang protein chuẩn được điện di trên bản gel có cùng thành phần với điện di Zymogram hoặc Substrate-Gel để có thể so sánh và tính toán phân tử lượng của các protease.

Quá trình điện di thực hiện ở hiệu điện thế 110V, 30A, thời gian điện di là 2 giờ trên thiết bị điện di đứng của Bio-Rad. Bản gel sau điện di được ngâm và lắc đều trong 100 ml dung dịch casein 2% (w/v) pha trong đệm Tris-HCl, pH 7,5, nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút để casein thấm vào bản gel và enzyme hoạt động làm xuất hiện các vùng hoạt tính. Sau khi rửa bằng nước, gel được nhuộm trong thuốc nhuộm Coomassie Brilliant blue 0,1% pha trong dung dịch methanol 40%, acid acetic 10% trong 2 giờ, việc giải nhuộm màu sau đó được thực hiện trong dung dịch I chứa 40% methanol và 10% acid acetic với thời gian 30 phút, tiếp tục rửa kết thúc bằng dung dịch II gồm 0,5% methanol và acid acetic 10% trong 2 giờ.

Phân tử lượng của protease được thực hiện bằng cách so sánh với thang chuẩn 161-0371 của

Sigma, bao gồm myosin (200.000 Da), β -galactosidase (116.250 Da), phosphorylase b (97.400 Da), serum albumin (66.200 Da), ovalbumin (45.000 Da), cacbonic anhydrase (31.000 Da), trypsin inhibitor (21.500 Da), lysozym (14.400 Da) và aprotinin (6.500 Da). Thang chuẩn được chạy trên cùng gel với protease, sau điện di được cắt ra và nhuộm riêng ngay mà không cần xử lý với casein. Cách thức nhuộm thang chuẩn tương tự như đã trình bày ở trên.

Điện di Zymogram thực hiện tương tự như Substrate-gel nhưng gel phân tán được bổ sung thêm casein với nồng độ 0,1%. Sau điện di, bản gel được ngâm trong dung dịch Triton X100 2,5% 2 lần, mỗi lần 30 phút, tiếp tục ngâm trong dung dịch gồm glycine 0,1M và CaCl_2 2mM pH8, thời gian 30 phút, sau đó thay mới bằng chính nó để ngâm qua đêm. Công đoạn nhuộm bằng Coomassie Brilliant blue và giải nhuộm thực hiện tương tự như đã trình bày ở phương pháp điện di Substrate- Gel.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc loại hóa chất tinh khiết dùng cho phân tích.

3. Kết quả và thảo luận

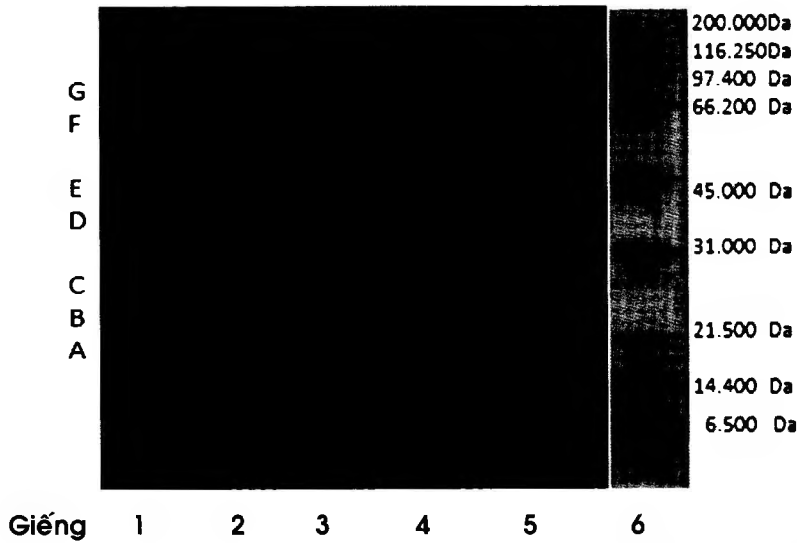
3.1. Phân tử lượng của protease gan tụy và đầu tôm xác định bằng Zymogram

Trong Hình 1 và Hình 2 lần lượt là điện di đồ Zymogram của protease gan tụy và đầu tôm sú. Thành phần gel phân tán của Zymogram được bổ sung thêm casein với nồng độ 0,1%. Các protease được xử lý SDS nhưng không bị biến tính, vì không dùng tác nhân khử β -mecaptoethanol và không gia nhiệt chạy trong điện trường về cực dương, tạo thành các vạch protease màu sáng trên bản gel xanh sau khi nhuộm màu và giải nhuộm. Phân tử lượng của các protease trong gan tụy và đầu tôm được xác định dựa vào khoảng di chuyển tương đối R_f của vạch protease và đồ thị tương quan giữa phân tử lượng protein chuẩn và khoảng di chuyển R_f của chúng khi điện di trên gel polyacrylamide 12%.

Đường chuẩn xác định phân tử lượng các protease được xây dựng trên đồ thị với trục hoành là khoảng di chuyển tương đối R_f của các protein chuẩn và trục tung biểu diễn giá trị logarit tự nhiên

Hình 1. Điện di đồ Zymogram của protease gan tụy tôm sú

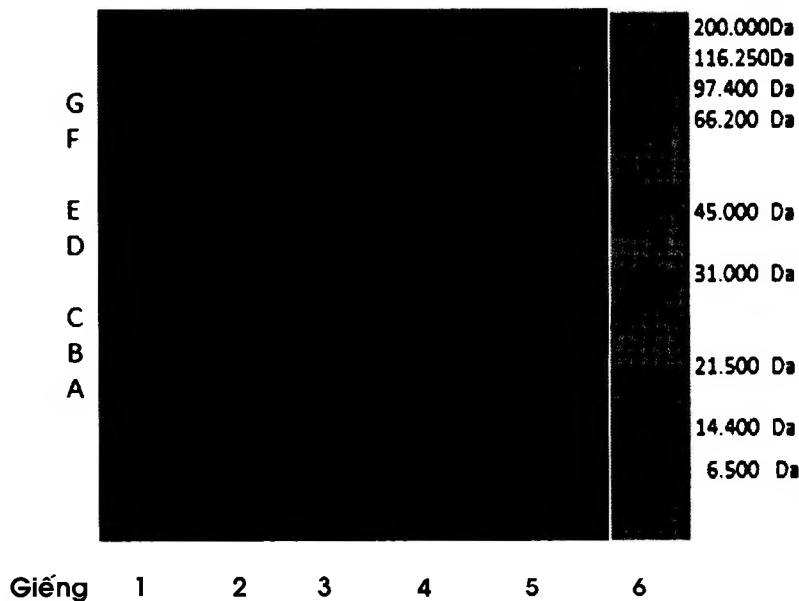
(Độ pha loãng protease sau tinh sạch đưa vào giếng 1: 5 lần, giếng 2: 25 lần, giếng 3: 50 lần, giếng 4: 100 lần, giếng 5: 500 lần, giếng 6: thang protein chuẩn)



Nguồn: Tác giả thực hiện

Hình 2: Điện di đồ Zymogram của protease đầu tôm sú

(Độ pha loãng protease sau tinh sạch đưa vào giếng 1: 5 lần, giếng 2: 25 lần, giếng 3: 50 lần, giếng 4: 100 lần, giếng 5: 500 lần, giếng 6: thang protein chuẩn)



Nguồn: Tác giả thực hiện

của phân tử lượng protein tương ứng (Hình 3). Phương trình đường chuẩn như sau:

$$Y = -3,3661x + 12,036,$$

với hệ số $R^2 = 0,973$

Trong đó:

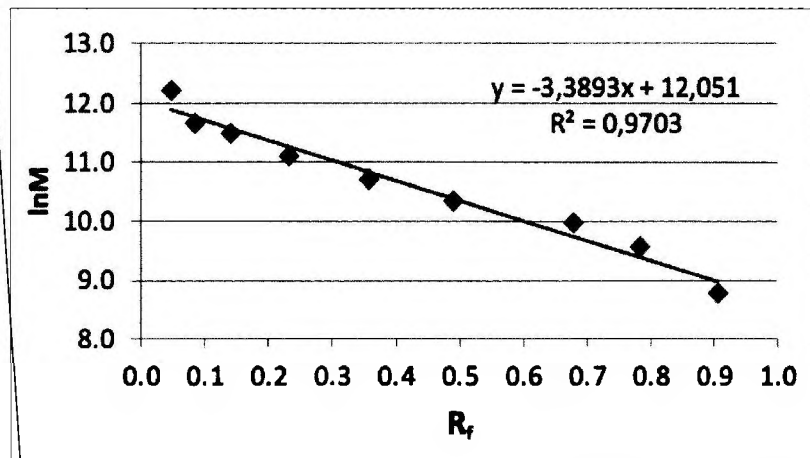
Y là giá trị logarit tự nhiên trọng lượng phân tử của protease (Dalton)

x là khoảng di chuyển tương đối của vạch protein (R_f)

Dựa vào đường chuẩn này và hệ số R_f - khoảng di chuyển tương đối của các vạch protein trên điện di đồ Zymogram, ta suy ra được phân tử lượng của các protease trong gan tụy và đầu tôm sú như trong Bảng 1.

Như vậy, trong gan tụy tôm sú có ít nhất 5 protease khác nhau là A, B, C, D, E, trong đó, 3 enzyme chủ yếu là A, B, C với phân tử lượng không khác nhau nhiều, dao động trong khoảng từ 20.200 đến 25.000 Da. Trong 3 protease này, loại B tỏ ra chiếm ưu thế hơn cả, sau đó là C và cuối cùng là A. Điều này có thể dễ dàng nhận ra từ điện di đồ (Hình 1), vì vạch B trên điện di đồ bao giờ cũng hiện ra rõ ràng hơn so với A và C ở cùng nồng độ pha loãng. Riêng protease A hiện khá rõ khi độ pha loãng từ 5 đến 50 lần, mờ dần khi con số này tăng lên thành 100 lần và hầu như không còn nhìn được nữa khi mẫu đưa vào giếng được pha loãng 500 lần. 2 protease D và E với trọng lượng phân tử 35.300 và 40.200 Da có tồn tại trong hệ enzyme protease đầu tôm nhưng hoạt tính thật sự không

Hình 3. Đồ thị tương quan giữa phân tử lượng protein chuẩn và khoảng cách di chuyển của chúng khi điện di trên gel polyacrylamide 12%



Nguồn: Tác giả thực hiện

Bảng 1. Phân tử lượng của protease gan tụy và đầu tôm *Penaeus monodon*

Tên protease	Trọng lượng phân tử (Dalton)	
	Protease gan tụy tôm	Protease đầu tôm
A	20.200	20.200
B	22.000	22.000
C	25.000	25.000
D	35.300	35.300
E	40.200	40.200
F	-	49.200
G	-	76.000

Nguồn: Tác giả thực hiện

lớn. Chúng chỉ thể hiện những vệt rất mờ trên Zymogram khi lượng mẫu protease đưa vào giếng lớn (độ pha loãng 5 lần), càng mờ hơn khi độ pha loãng này tăng lên thành 25 lần và hoàn toàn không nhìn thấy khi lượng mẫu đưa lên giếng được pha loãng thêm nữa.

Từ điện di đồ protease đầu tôm (Hình 2) có thể nhận thấy trong đầu tôm có ít nhất 7 loại protease A, B, C, D, E, F và G với phân tử lượng được liệt kê trong Bảng 1. Từ Hình 2 và Hình 3 cũng dễ dàng so sánh hệ protease gan tụy và đầu tôm: cả 2 cùng có 3 protease chủ yếu là A, B, C trong đó B có hoạt

tính nổi trội hơn cả, chúng cũng cùng có 2 protease D và E với hoạt tính kém hơn nhiều so với 3 loại A, B, C. Sự khác nhau ở hệ protease đầu tôm so với gan tụy là đầu tôm có thêm 2 protease F và G, mặc dù hoạt tính của chúng thật sự rất thấp (thể hiện qua hình ảnh mờ nhạt của vạch trên điện di đồ), thấp hơn cả D và E. Sự khác nhau giữa hệ protease gan tụy và đầu tôm có lẽ do đầu tôm không chỉ có gan tụy chứa enzyme này, mà phần thịt trong đó cũng có protease mang hoạt tính. Tuy nhiên, ở cả hai nguồn, loại protease thật sự đóng vai trò chủ chốt và đại diện là 3 loại A, B và C.

3.2. Phân tử lượng của protease gan tụy và đầu tôm xác định bằng điện di đồ Substrate-Gel

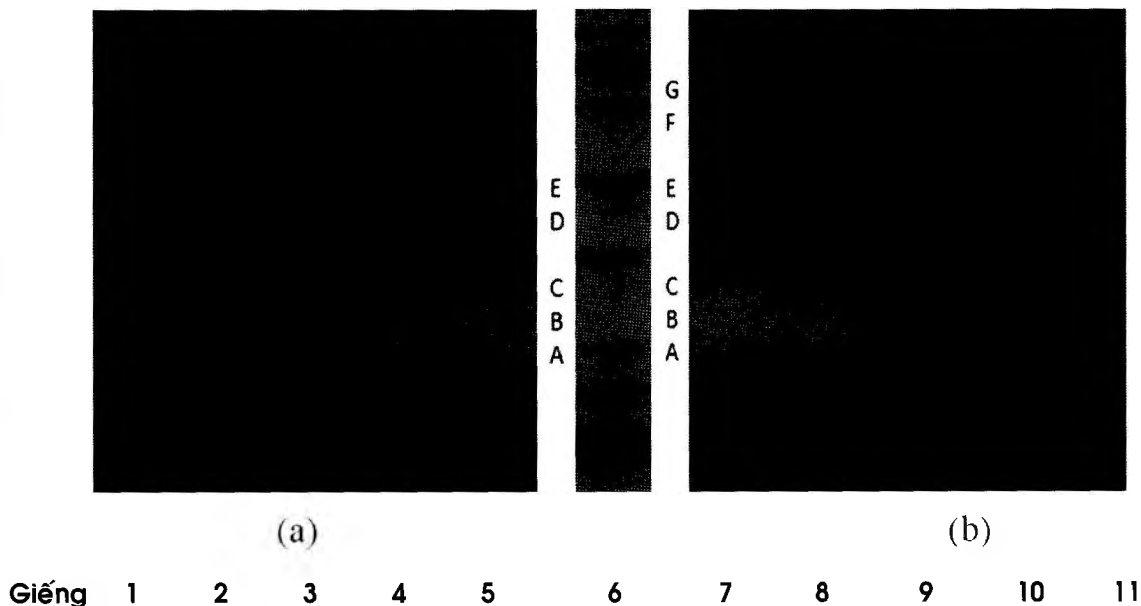
Nghiên cứu phân tích protease gan tụy và đầu tôm bằng cách sử dụng điện di Substrate-Gel theo phương pháp của García-Carreno và cộng sự (1993). Điện di đồ Substrate-Gel thể hiện trên Hình 4 cho thấy, lúc thoát nhìn, có cảm giác điện di đồ

Substrate-Gel khá giống Zymogram, tuy nhiên, khi nhìn kỹ sẽ nhận ra sự khác biệt: các vạch protease thể hiện kém rõ ràng trong trường hợp mẫu đưa lên giếng ít pha loãng (từ 5 lần đến 50 lần), cũng rất khó để phân biệt được số lượng vạch protein, và khi pha loãng thêm (100 hay 500 lần) thì sẽ chỉ thấy 2 vạch protease B và C rõ (căn cứ vào trọng lượng phân tử được xác định theo cách tương tự đã làm đối với Zymogram ở trên).

Vạch protease A rất mờ nhạt trên bản điện di, có thể do 1 trong 2 nguyên nhân: hoạt tính (hoặc nồng độ) của A quá thấp so với B, hoặc B có hoạt tính

Hình 4. Điện di đồ Substrate-Gel so sánh hệ protease gan tụy (a) và đầu tôm sú (b)

(Độ pha loãng protease sau tinh sạch đưa vào giếng 1, 11:5 lần, giếng 2, 10:25 lần, giếng 3, 9:50 lần, giếng 4, 8:100 lần, giếng 5, 7:500 lần, giếng 6: thang protein chuẩn)



Nguồn: Tác giả thực hiện

quá mạnh (hay nồng độ cao hơn hẳn A), do đó B phân giải hoàn toàn lượng casein thấm vào gel ở vùng lân cận, vạch sáng do B tạo ra quá lớn, đến mức A bị lấn vào và không thể hiện đơn lẻ. Ta cũng thấy, ở độ pha loãng mẫu đưa vào giếng thấp (5 đến 25 lần), 2 vạch D và E (ở cả protease gan tụy và đầu) hiện ra trên Substrate-Gel rõ, nhưng chúng dường như bị “đính” vào nhau, khi tăng độ pha loãng lên, chúng dường như “biến mất”. 2 vạch F và G (ở protease đầu tôm) thì thật sự mờ đến mức khó nhìn ra, kể cả ở độ pha loãng mẫu đưa lên giếng điện di thấp, chứng tỏ tỉ lệ lượng protease F và G có lẽ rất ít và hoạt tính của chúng hoàn toàn không đáng kể so với A, B và C.

Như vậy, cả 2 phương pháp điện di Zymogram và Substrate-Gel đều có thể áp dụng để xác định phân tử lượng và phức tạp những nét cơ bản về thành phần và hoạt tính tương đối của các protease trong gan tụy và đầu tôm. Tuy nhiên, hình ảnh vạch protease trên bản gel Zymogram rõ ràng hơn nhiều so với Substrate-Gel. Có lẽ việc “nhốt” casein trực tiếp vào gel polyacrylamid của

điện di Zymogram đã thể hiện tác dụng cố định mạng casein cung cấp cho mỗi vạch protease, vì vậy mật độ casein bị phân giải ở vùng lân cận trên bản gel tương đối đồng đều, do vậy, vạch sáng hiện lên rõ ràng.

Đối với trường hợp Substrate-Gel, casein được cung cấp đồng đều và liên tục cho mọi điểm trên bản gel sau khi các vạch protease đã cố định trên đó, protease ở vạch nào có hoạt tính lớn sẽ phân giải nhiều casein hơn, do đó, vạch sau khi nhuộm và giải nhuộm trắng hơn, dễ loang lãn vào nhau hơn. Với giải thích như vậy, Zymogram tỏ ra hiệu quả hơn trong nhận diện các protease có mặt, nhưng Substrate-Gel lại cho đánh giá về hoạt tính tương đối của từng protease rõ ràng hơn. Điều này cũng gợi mở một khía cạnh khác cần lưu ý khi nghiên cứu enzyme bằng điện di có cơ chất: Để khai thác được tối đa hiệu quả của phương pháp này và thu nhận bức tranh đầy đủ nhất, chúng ta không những chỉ cần thực nghiệm với nhiều nồng độ enzyme đưa vào giếng khác nhau, mà nồng độ cơ chất sử dụng và phương cách cho phản ứng phân

giải cơ chất tiến hành cũng cần thử nghiệm một cách có cân nhắc.

Nếu so sánh hệ protease trong gan tụy tôm sú Việt Nam với hệ protease trong bộ phận tiêu hóa ở tôm sú Đài Loan (Jiang, 1991) [5] ta sẽ thấy một số khác biệt: Protease trong gan tụy tôm Việt Nam có 5 loại so với 4 ở tôm Đài loan. Tuy nhiên, điểm đáng chú ý là ở cả 2 loại tôm đều có 3 protease chủ yếu với trọng lượng phân tử tương đối thấp và gần nhau, mặc dù protease trong tôm Việt Nam đang được nghiên cứu có phân tử lượng hơi cao hơn một chút (20.200, 22.000, 25.000 Da) so với 18.500, 20.900 và 23.300 Da (bao gồm hai trypsin và một chymotrypsin).

Điều này khá tương đồng với kết luận được rút ra khi nghiên cứu về protease trên 4 loài tôm *P. vannamei*, *P. monodon*, *P. stylirostris* và *P. californiensis* của Albuquerque-Cavalcanti (2002) [3], các protease chính (được xác định là trypsin) có trọng lượng phân tử trong khoảng 17.000-22.000 Da. Nghiên cứu trên cá chỉ vàng *Pricanthus macracanthus* đánh bắt ở Thái lan (Pham, 2006) cũng xác định loại trypsin trong ruột

cá này có phân tử lượng 23.800 Da [6], Simpson (1984) đã chỉ ra phân tử lượng của trypsin ở cá tuyết Atlantic, cá tuyết Greenland lần lượt là 24.000 và 23.500 Da [7,8].

Trên cơ sở xem xét phân tử lượng của protease đã xác định được từ thực nghiệm, so sánh với các dữ liệu từ các tài liệu tham khảo, và kết luận mang tính thống kê của nhiều tác giả về hệ protease trong động vật giáp xác thường có thành phần chính là trypsin và chymotrypsin, trong đó trypsin chiếm hơn 50% hoạt tính, suy ra rằng, nhiều khả năng là các protease tồn tại trong gan tụy tôm sú Việt Nam cũng thuộc về nhóm trypsin và chymotrypsin.

4. Kết luận

Hệ protease ở gan tụy và đầu tôm sú được nghiên cứu đều bao gồm 3 protease chủ yếu A, B, C với phân tử lượng lần lượt là 20.200, 22.000, 25.000 Da và 2 protease ít hoạt tính hơn là D, E (phân tử lượng theo thứ tự là 35.300, 40.200 Da). Riêng đầu tôm còn có thêm 2 protease nữa với hoạt tính rất bé là F và G (với phân tử lượng là 49.200 và 76.000 Da) ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. VASEP (2021). *Xuất khẩu tôm năm 2020 đạt 3,7 tỷ USD, tăng 11% so với năm trước*. Tin sản phẩm xuất khẩu 27/1/2021.
2. Nguyễn Lệ Hà (2014). Những ứng dụng của enzyme từ động vật thủy sản trong công nghệ thực phẩm. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ thủy sản*, số 3-2014, trang 216-223.
3. Albuquerque-Cavalcanti C., Garcia-Carreno F.L., Navarrete M.A. (2002). Trypsin and trypsin inhibitors from *Penaeus* shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 233-251.
4. Garcia-Carreno F. L., Dimes L.E., Haard N.F. (1993). Substrate-Gel Electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases of proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, p.65-69.
5. Jiang, S.T., Moody, M.W. & Chen, H.C. (1991). Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Science*, 56, 322-326.
6. Pham Van Hau and Benjakul S. (2006). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper *Pricanthus macracanthus*. *J. Journal of Food Biochemistry*, 30, 478-495.
7. Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1984a). Trypsin from Greenland cod as a food-processing aid. *Journal of Applied Biochemistry*, 6, 135-143.
8. Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1984b). Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79B, 613-622.

Ngày nhận bài: 3/5/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/5/2021

Ngày chấp nhận đăng bài: 5/6/2021

Thông tin tác giả:

TS. NGUYỄN LỆ HÀ

Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH

Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH)

**APPLICATION OF ZYMOGRAM AND SUBSTRATE-GEL
ELECTROPHORESIS TO DETERMINE MOLECULAR WEIGHT
OF BLACK-TIGER SHRIMP'S PROTEASE**

● **Ph.D. NGUYEN LE HA**

Institute of Applied Sciences,

Ho Chi Minh City University of Technology

ABSTRACT:

Molecular weight of protease from hepatopancreas and heads of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* were determined in this study by using Zymogram và Substrate-Gel Electrophoresis. Protease fraction in hepatopancreas and heads shrimp consisted of at least 5 and 7 different proteases, respectively; three of them (with molecular weights from 20.200 - 25.00 Da) were mainly responsible for the fraction activity. Zymogram was better in identifying the present of proteases but Substrate-Gel provides a clearer assessment of the relative activity of individual proteases.

Keywords: Black Tiger shrimp, protease molecular weight, zymogram, substrate-gel electrophoresis