

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT VÀ ĐỊNH NHÓM CHỨC TRÊN TÂM HOẠT ĐỘNG CỦA PROTEASE SÂU TƠ (*PLUTELLA MACULIPENNIS* (Curt)) VÀ SÂU XANH (*PIERIS RAPAE*)

Phạm Thị Ánh Hồng

Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 6 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 26 tháng 7 năm 2002)

TÓM TẮT: Các loại sâu đều có hệ enzym protease giúp tiêu thụ protein lá cây. Việc tổng hợp những chất có khả năng ức chế hệ protease này làm sâu không thể tiêu thụ protein từ đó ức chế sự phát triển của sâu và dẫn đến sự chết của chúng. Đề tài này nghiên cứu xác định điều kiện tách chiết và định nhóm chức trên tâm hoạt động của protease sâu tơ (*Plutella Maculipennis* (Curt)) và sâu xanh (*Pieris rapae*), để làm cơ sở cho việc chuyển nạp những gen có khả năng ức chế hoạt động enzym protease của sâu.

1. Giới thiệu:

Nền kinh tế nước ta chủ yếu là nông nghiệp, trong đó rau xanh là khẩu phần ăn cần thiết cho con người. Tuy nhiên, ngành trồng rau hiện nay đang phải thường xuyên đối phó với các nạn sâu rầy đã gây tổn thất đến năng suất, giảm chất lượng nông sản và tăng cao chi phí sản xuất nông nghiệp. Biện pháp phòng trừ sâu hại hiện nay vẫn chủ yếu là sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Song biện pháp này chỉ có hiệu quả tức thời, nó đã đem lại nhiều hậu quả khó lường cho nông nghiệp. Việc sử dụng lâu dài thuốc trừ sâu đã làm nảy sinh nhiều loại sâu có tính kháng thuốc, từ đó làm gia tăng chi phí phòng trừ mà hiệu quả sản xuất giảm. Bên cạnh đó, việc phun thuốc trừ sâu quá nhiều đã phá vỡ cân bằng sinh thái trong tự nhiên giết chết nhiều thiên địch, từ đó nguy cơ bộc phát dịch hại càng dễ xảy ra, đồng thời thuốc cũng gây ảnh hưởng đến môi sinh và sức khỏe con người. Vì vậy, hiện nay việc lập một vành đai rau xanh sạch là một trong những mối quan tâm của con người. Từ những lý do trên cộng với sự phát triển của ngành công nghệ sinh học đã mở ra một hướng thử nghiệm mới đó là sự chuyển nạp vào trong cây những gen có khả năng ức chế hoạt động thủy giải protein của enzym protease có trong côn trùng làm chúng không tiêu hóa được protein trong cây, từ đó ngăn chặn được sự tàn phá của sâu. [1,2,3]

Như chúng ta đã biết, trong cơ thể của sâu có hệ enzym protease giúp sâu tiêu thụ protein lá cây. Việc tổng hợp những chất có khả năng ức chế hệ protease này làm sâu không thể tiêu thụ protein từ đó ức chế sự phát triển của sâu và dẫn đến sự chết của chúng[4]. Những chất ức chế Protease là một trong những hợp chất bảo vệ trong mô thực vật nhằm chống lại sự tấn công của côn trùng và các yếu tố gây bệnh. Người ta tìm thấy ở thực vật những chất ức chế của 3 trong 4 lớp chính của protease là Serin protease, Cystein protease và Metallo protease.[5]

- Serin protease: được phát hiện trong những dịch chiết từ đường tiêu hóa của côn trùng và đây là loại enzym protease mà tâm hoạt động có nhóm OH. Đa số chất ức chế serin trong thực vật là yếu tố ức chế cạnh tranh. Khi côn trùng phá hoại lá thì cây có thể gây ra sự gia tăng chất ức chế trong lá nhằm ức chế sự phát triển của côn trùng.

- Cystein protease: không được tiết ra như các enzym tiêu hóa trong ruột non của các động vật bậc cao hơn, nhưng tìm thấy trong ruột non của một số họ bộ Hemiptera và Coleoptera. Các loại côn trùng sử dụng protease cystein như enzym tiêu hóa chính.
- Metallo protease: chất ức chế nhóm này được tìm thấy chủ yếu trong thực vật, nhưng sự hiểu biết về nó còn ít.

Việc nghiên cứu các gen có khả năng ức chế protease đã cung cấp những hệ thống mới cho việc tìm hiểu quá trình cơ bản làm nền tảng cho sự điều hòa môi trường và phát triển hệ thống bảo vệ tự nhiên trong thực vật, tạo giống kinh điển để lựa chọn các dòng thể hiện tính lai cao, kìm hãm sự phá hoại của côn trùng và các yếu tố gây bệnh.

Để xác định những chất có khả năng ức chế hệ protease của sâu, chúng tôi xác định điều kiện tách chiết tối ưu và định nhóm chức trên tâm hoạt động của Protease trên hai đối tượng sâu tơ và sâu xanh.

2. Đối tượng nghiên cứu:

Sâu tơ - Tên khoa học: *Plutella Maculipennis* (Curt)

Sâu xanh - Tên khoa học: *Pieris rapae*

3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu:

3.1 Lấy mẫu và xử lý mẫu:

Sâu tơ được lấy tại các ruộng rau ở huyện Hóc Môn, xã Xuân Thới Thượng, Bà Điểm.

Sâu xanh được lấy ở xã Tân Thuận, Bà Điểm, huyện Hóc Môn.

3.2 Phương pháp nghiên cứu:

3.2.1 Xác định hàm lượng protein trong mẫu theo phương pháp Lowry.

3.2.2 *Xác định hoạt tính protease của sâu theo phương pháp Anson*: xác định điều kiện tối ưu tách chiết protease bằng cách xác định hoạt tính protease ở các pH khác nhau để chọn ra một pH mà hoạt tính protease là cao nhất, từ pH này chúng tôi thử hoạt tính protease ở những lân cận nó để chọn ra pH tối thích.

3.2.3 *Xác định nhóm chức trên tâm hoạt động của protease bằng phương pháp điện di*:

+ Điện di trên gel polyacrylamid có SDS: so sánh thành phần protein dịch sâu được tách chiết ở các pH khác nhau.

+ Điện di trên gel polyacrylamid chứa gelatin và những chất ức chế protease đặc hiệu: nhằm xác định các nhóm chức trên tâm hoạt động của protease; bản gel polyacrylamid có chứa gelatin là chất nền protein để protease phân giải. [7]

3.2.4 *Phương pháp khuếch tán trên bản thạch*: để xác định một cách chính xác nhóm chức trên tâm hoạt động của protease từ dịch chiết sâu.

Sử dụng cơ chất là casein:

+ Nếu có vòng trắng quanh lỗ: protease trong dịch trích đã phân giải protein làm cho phần chất nền này không ăn màu với phẩm nhuộm.

+ Nếu không có vòng trắng: protease trong dịch trích đã bị kìm hãm bởi chất ức chế nên không tham gia hoạt động thủy giải protein, từ đó giúp xác định nhóm chức trên tâm hoạt động của protease:

- Nếu chất ức chế là E.64 thì protease này có tâm hoạt động là cystein.

- Nếu chất ức chế là PMSF thì protease này có tâm hoạt động là serin.[6]

4. Kết quả:

4.1 Sâu tơ:

4.1.1 Hàm lượng Protein có trong dịch chiết sâu:

Dựa vào đồ thị đường chuẩn albumin, ta xác định được hàm lượng protein (tủa trong aceton) có trong mẫu sâu tơ là: 3,63%.

4.1.2 Hoạt tính Protease trong các điều kiện tách chiết:

4.1.2.1 Dịch chiết tách là nước cất

Bảng 1: Hoạt tính chung Protease (đơn vị hoạt tính/g trọng lượng tươi) của sâu tơ trong môi trường cơ chất của dịch chiết tách là nước cất.

PH môi trường cơ chất	6,3	6,5	6,8	7,0	7,5	8,0
Hoạt tính protease trong môi trường có pH khác nhau	4,02	4,73	4,96	6,71	6,81	7,27

Nhận xét: Trong môi trường cơ chất có pH kiềm thì hoạt tính chung Protease sâu tơ cao hơn trong môi trường cơ chất có pH trung tính và pH acid.

4.1.2.2 Dịch chiết tách là đệm phosphat ở các pH khác nhau:

Bảng 2: Hoạt tính chung của Protease (đơn vị hoạt tính/g trọng lượng tươi) của sâu tơ trong môi trường cơ chất có pH kiềm (A) môi trường cơ chất có pH tương ứng pH dùng để ly trích mẫu (B).

pH	6,2	6,5	7,2	8,0
Hoạt tính Protease trong môi trường (A)	15,74	17,16	13,12	9,49
Hoạt tính Protease trong môi trường (B)	7,19	7,55	5,35	—

Nhận xét:

Dịch chiết Protease sâu tơ có hoạt tính cao nhất ở pH = 6,5. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiếp tục xác định hoạt tính Protease của dịch sâu trong vùng lân cận của pH = 6,5.

So với hoạt tính chung Protease dịch chiết được xác định trong môi trường (A) có giá trị cao hơn trong môi trường (B). Vì vậy, môi trường cơ chất dùng xác định Protease nên ở pH kiềm.

Bảng 3: Hoạt tính Protease (đơn vị hoạt tính/g trọng lượng tươi) của sâu tơ được trích từ đệm Phosphat với các pH = 6,3 ; 6,5 và 6,8.

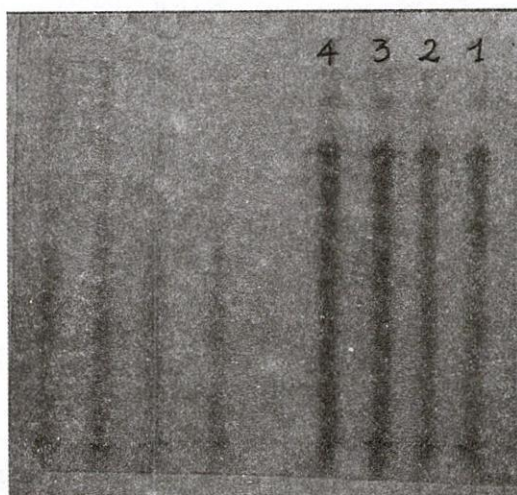
PH đệm Phosphat dùng ly trích mẫu	6,3	6,5	6,8
Hoạt tính Protease	18,94	17,16	15,95

Nhận xét: Protease sâu tơ được trích trong đệm phosphat với pH=6,3 - 6,5 thì có hoạt tính cao.

4.1.3 Xác định nhóm chức trên tâm hoạt động Protease:

4.1.3.1 Xác định thành phần Protein trong dịch chiết sâu tơ bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid:

Ảnh 1: Điện di polyacrylamid có SDS của dịch sâu tơ.



Vạch 1: Dịch sâu chiết rút bằng đệm Phosphat tại pH =6,2

Vạch 2: Dịch sâu chiết rút bằng đệm Phosphat tại pH =6,3

Vạch 3: Dịch sâu chiết rút bằng đệm Phosphat tại pH =6,5

Vạch 4: Dịch sâu chiết rút bằng đệm Phosphat tại pH =6,8

Nhận xét:

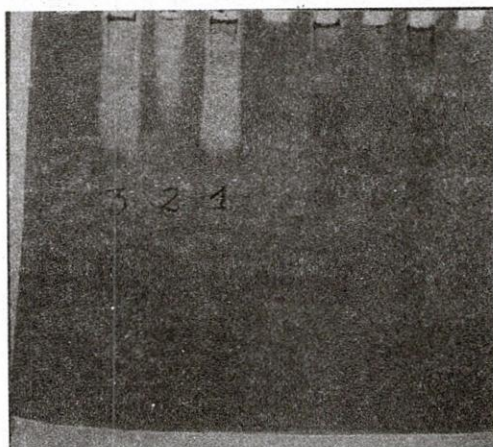
Về thành phần Protein dịch chiết từ sâu hầu như không thay đổi ở cả 4 giá trị pH dùng để tách chiết.

4.1.3.2 Xác định nhóm chức Protein của sâu tơ:

- Điện di trên gel polyacrylamid chứa gelatin và những chất ức chế protease đặc hiệu E.64 và PMSF.

Gelatin có vai trò làm cơ chất protein cho protease của sâu phân giải, cho nên thông qua sự ăn màu hay không ăn màu của nền cơ chất khi có sự hiện diện của chất ức chế E.64 và PMSF giúp xác định nhóm chức Protease của sâu, từ đó ta thu được kết quả thể hiện ở ảnh 3.

Ảnh 2: Điện di polyacrylamid chứa 1% gelatin, dịch sâu tơ có và không có chất kìm hãm.



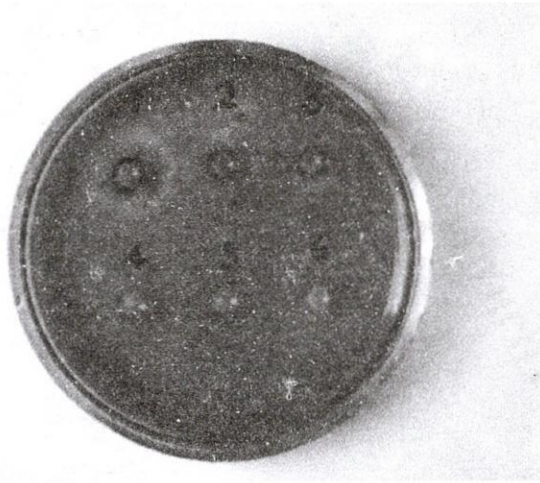
- Vạch 1: Dịch sâu có chất ức chế E-64
 Vạch 2: Dịch sâu có chất ức chế PMSF
 Vạch 3: Dịch sâu không có chất ức chế

Nhận xét:

Qua kết quả điện di, Protease sâu tơ chỉ bị kiềm hãm bằng chất ức chế PMSF và không bị ức chế bằng chất E.64, chứng tỏ Protease sâu tơ thuộc nhóm **Serin Protease**.

- *Khuyếch tán trên lam thạch* cũng cho kết quả như phương pháp trên qua việc quan sát vòng phân giải casein trong lam thạch .

Ảnh 3: Sự thay đổi hoạt tính của protease sâu tơ dưới tác động của nồng độ chất ức chế tăng dần



- (1) 0 μ l PMSF + 10 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (2) 2 μ l PMSF + 8 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (3) 4 μ l PMSF + 6 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (4) 6 μ l PMSF + 4 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (5) 8 μ l PMSF + 2 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (6) 10 μ l PMSF + 0 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein

Nhận xét:

Cùng một lượng protein – enzym ở 6 lỗ thí nghiệm (10 μ l) và lượng cơ chất ức chế PMSF thay đổi từ 0,2,4,6,8,10 μ l theo thứ tự từ lỗ 1 đến lỗ 6 đã làm giảm dần và làm mất hẳn hoạt tính của protease sâu tơ. Điển hình đường kính vòng phân giải ở lỗ 1 lớn nhất và từ từ giảm dần đến các lỗ 4,5,6 không còn thấy vòng phân giải chứng tỏ hoạt tính phân giải của protease sâu tơ đã bị ức chế hoàn toàn.

4.2 Sâu xanh:**4.2.1 Hàm lượng Protein có trong dịch chiết sâu:**

Dựa vào đồ thị đường chuẩn albumin, ta xác định được hàm lượng protein (tủa trong aceton) có trong mẫu sâu xanh là: 11,04%.

4.2.2 Hoạt tính Protease trong các điều kiện tách chiết:**4.2.2.1 Dịch chiết tách là nước cất**

Bảng 4: Hoạt tính chung Protease (đơn vị hoạt tính/g trọng lượng tươi) của sêu xanh trong môi trường cơ chất ở các pH khác nhau của dịch chiết tách là nước cất.

PH môi trường cơ chất	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5	8,0
Hoạt tính Protease	0,96	1,28	1,47	1,60	2,09	4,40

Nhận xét: Trong môi trường cơ chất có pH kiềm (pH = 8) thì hoạt tính Protease của sêu xanh cao nhất.

4.2.2.2 Dịch chiết tách là đệm phosphat ở các pH khác nhau:

Bảng 5: Hoạt tính chung của Protease sêu xanh trong môi trường cơ chất có pH kiềm (A) và môi trường cơ chất có pH tương ứng pH dùng để ly trích mẫu (B).

pH	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5	8,0
Hoạt tính Protease trong môi trường (A)	3,20	6,91	13,31	10,05	10,95	8,96
Hoạt tính Protease trong môi trường (B)	3,84	6,53	12,80	7,96	7,82	7,68

Nhận xét:

Dịch chiết Protease sêu xanh có hoạt tính cao nhất ở pH = 6,8. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiếp tục xác định hoạt tính Protease của dịch sêu trong vùng lân cận của pH = 6,8.

Bảng 6: Hoạt tính Protease (đơn vị hoạt tính/g trọng lượng tươi) của sêu xanh được trích từ đệm Phosphat với các pH = 6,7 ; 6,8 và 6,9.

PH đệm Phosphat dùng ly trích mẫu	6,7	6,8	6,9
Hoạt tính Protease trong môi trường (A)	8,64	13,44	9,09
Hoạt tính Protease trong môi trường (B)	10,24	12,48	8,64

Nhận xét: Protease sêu xanh được trích trong đệm phosphat với pH=6,8 thì có hoạt tính cao.

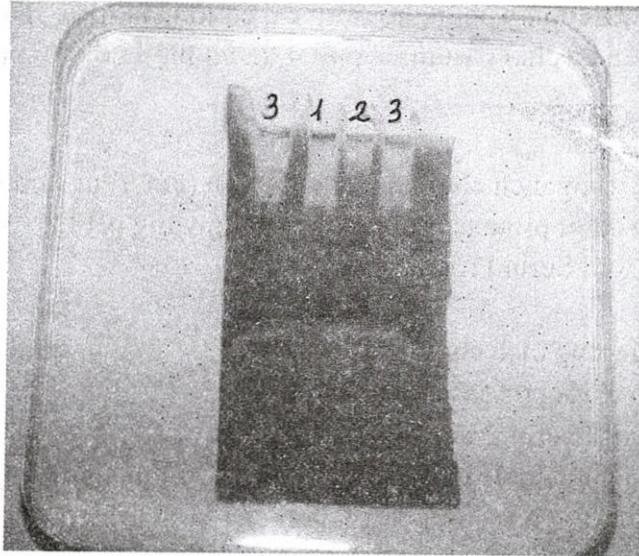
4.2.3. Xác định nhóm chức Protein của sêu xanh:

- Điện di trên gel polyacrylamid chứa gelatin và những chất ức chế protease đặc hiệu E.64 và PMSF.

Gelatin có vai trò làm cơ chất protein cho protease của sêu phân giải, cho nên thông qua sự ăn màu hay không ăn màu của nền cơ chất khi có sự hiện diện của chất ức chế E.64

và PMSF giúp xác định nhóm chức Protease của sâu, từ đó ta thu được kết quả thể hiện ở ảnh 6.

Ảnh 4: Điện di polyacrylamid chứa 1% gelatin, dịch sâu xanh có và không có chất kiềm hãm.



Vạch 1: Dịch sâu không có chất ức chế tại pH=6,8

Vạch 2: Dịch sâu có chất ức chế PMSF

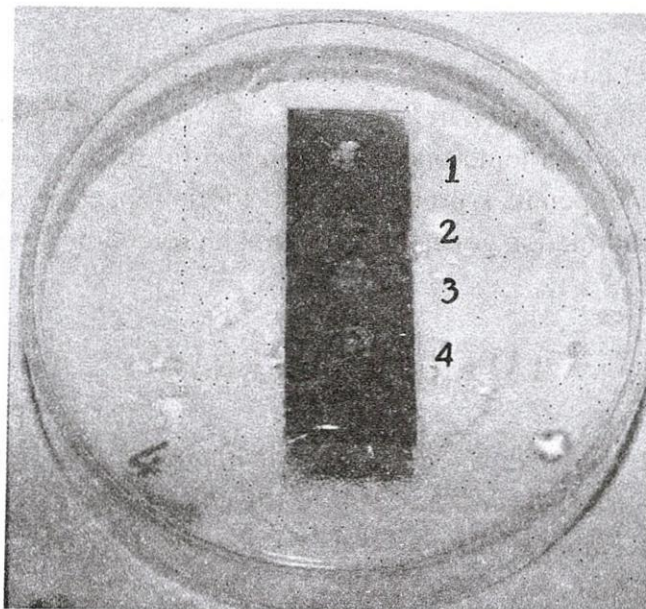
Vạch 3: Dịch sâu có chất ức chế E-64

Nhận xét:

Qua kết quả điện di, Protease sâu xanh chỉ bị kiềm hãm bằng chất ức chế PMSF và không bị ức chế bằng chất E.64, chứng tỏ Protease sâu xanh thuộc nhóm **Serin Protease**.

- *Khuyến tán trên lam thạch* cũng cho kết quả như phương pháp trên qua việc quan sát vòng phân giải casein trong lam thạch, cụ thể qua ảnh 5 nhận thấy rằng chỉ có các thí nghiệm có mặt của PMSF mới có khả năng thủy giải protease trên cơ chất casein.

Ảnh 5:



- (1) 10 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (2) 10 μ l PMSF + 10 μ l dịch protein
- (3) 10 μ l H₂O + 10 μ l dịch protein
- (4) 10 μ l E64 + 10 μ l dịch protein

Nhận xét: các lỗ (1) (3) (4) đều có vòng phân giải màu trắng rõ ràng, lỗ (2) hầu như không có vòng phân giải. Điều này chứng tỏ rằng chỉ có lỗ (2) PMSF mới ức chế khả năng thủy giải của protease trên cơ chất casein, còn E64 thì vô hiệu đối với protein của sâu xanh.

5. Kết luận:

➤ Sâu tơ:

- Hàm lượng Protein có trong dịch chiết sâu tơ là 3,63% (tủa trong acetone).
- pH thích hợp cho tách chiết protease sâu tơ nằm trong vùng pH từ 6,3 - 6,5.
- Protease sâu tơ thuộc loại Serin Protease.

➤ Sâu xanh:

- Hàm lượng Protein có trong dịch chiết sâu xanh là 11,04% (tủa trong acetone).
- pH thích hợp cho tách chiết protease sâu xanh là 6,8.

Protease sâu xanh thuộc loại Serin Protease.

Từ các kết quả thu được bước đầu đã mở ra cơ sở để thực hiện việc chuyển nạp những gen có khả năng ức chế hoạt động thủy giải protein của protease có trong sâu tơ và sâu xanh nói riêng cũng như các loại côn trùng gây hại nói chung.

DEFINE CONDITION TO DEVERT AND DETERMINE CASTE OF ACTIVE SITE PLUTELLA MACULIPENNIS'S AND PIERIS RAPAE'S PROTEINASE

Pham thi Anh Hong

Faculty of Biology, University of Natural Sciences – VNU-HCM

ABSTRACT: All of insect have proteolytic system helping to consume leaves's protein. The collection substances that can inhibit it couldn't be consumed protein by insect so they couldn't develop and die. This topic research condition to divert and determine caste of active site Plutella Maculipennis's proteinase and Pieris rapae' proteinase, from then it becomes to basic for transformation genes that can inhibit proteolytic system of insect.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Mạnh Chinh - *Sâu bệnh hại cây trồng thường thấy ở miền Nam*. NXBNN 1986.
- [2]. Nguyễn Xuân Cung - *Dự tính và dự báo một số sâu chính hại cây trồng*. NXBNN.
- [3]. Nguyễn Xuân Cung - *Phòng trừ sâu hại bằng vi sinh vật*. NXBNN.
- [4]. Clarence A. Ryan; Annu. Rev Phytopathol - *Proteaz inhibitors in plants: genes for improving Defenses Against Insects and Pathogens* - 1990.

- [5]. Vaughan A.Hilder, Anghazaed M.R.Gatehouse and Donald Boulter - *Transgenic plants conferring insect tolerance* - Department of Biological Sciences University of Durham Durham DHI 3LI.United Kingdom.
- [6]. D.Michaud, L.Faye and S.Yelle - *Electrophoretic analysis of plant Cysteine and Serine protease* - 1993.14.94 - 98.
- [7]. Gel filtration theory and practice - *Dextran gels and their application in gel filtration*, Sweden 1962.