

XÁC ĐỊNH PHÂN TỬ LƯỢNG VÀ CÁC THÔNG SỐ ĐỘNG HỌC CỦA UREASE TỪ ĐẬU NÀNH HẠT VÀNG VIỆT NAM

Lê Thị Phú, Nguyễn Thị Cẩm Vi

Trường Đại học Bán công Tôn Đức Thắng

(Bài nhận ngày 17 tháng 07 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 10 tháng 05 năm 2007)

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã tìm ra được quy trình tinh sạch hiệu quả urease từ đậu nành hạt vàng Việt Nam. Bột Urease đậu nành tinh khiết có hoạt lực 8.44UI/mg thu từ quá trình tinh sạch trên được sử dụng để xác định một số đặc tính. Kết quả điện di trên gel polyacrylamid 7,5%, không có SDS và β -mercaptoethanol, so với dãy protein chuẩn phân tử lượng 35 000Da – 400 000Da đã chỉ ra urease đậu nành Việt Nam có phân tử lượng khoảng 440 000Da. Urease được xử lý nhiệt với SDS và β -mercaptoethanol, sau đó được điện di trên SDS-acrylamide gel 10% so với dãy protein chuẩn phân tử lượng 10 000–200 000 Da cho thấy urease đậu nành Việt Nam có một loại chuỗi tiểu đơn vị trọng lượng khoảng 17000 Da. Các thông số động học của urease đậu nành Việt Nam xác định theo phương trình Lineweaver – Burk là $K_m = 5.3 \text{ mM}$ và $V_{max} = 6.77 \cdot 10^{-3} \text{ mM/phút}$.

1. MỞ ĐẦU

Urease là một loại enzym thủy phân ure hình thành NH_3 và CO_2 , được ứng dụng rất nhiều trong Y học và Công nghiệp thực phẩm để định lượng ure trong các mẫu bệnh phẩm và nước chấm. Trên thế giới, có rất nhiều nhà khoa học nghiên cứu về enzym urease và các đặc tính của chúng, tuy nhiên các bài nghiên cứu về urease từ các nguồn nguyên liệu đậu khác nhau cho các kết quả khác nhau về đặc tính urease. Điều này chứng tỏ urease từ các nguyên liệu đậu khác nhau có thể có một số khác biệt về tính chất. Còn ở Việt Nam chỉ mới có các nghiên cứu để tinh sạch urease, hoàn toàn chưa có tác giả nào nghiên cứu nào về các đặc tính urease từ nguyên liệu đậu nành Việt Nam.

Để có thể ứng dụng urease trong Y học và Thực Phẩm hiệu quả rất cần thiết phải nắm được các đặc tính urease. ở nước ta hiện nay vẫn phải nhập chế phẩm urease và kit urease từ nước ngoài với giá thành rất cao. Do đó chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm tìm ra một số đặc tính urease đậu nành hạt vàng Việt Nam: phân tử lượng của urease và chuỗi tiểu đơn vị, các thông số động học của urease.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Urease đậu nành hạt vàng Việt Nam: được tinh sạch qua các công đoạn: trích ly với đệm phosphate pH 7, 1/15M chứa 0,05M EDTA và 0,05M L-cystein; tủa phân đoạn sunfat amon 65% và 55% bão hòa; trao đổi ion trên DEAE – cellulose; đông khô bảo quản dưới dạng bột trắng, mịn.

Hoá chất: dãy protein chuẩn 10 000 – 250 000 Da và 35 000 – 400 000 Da, Nessler (Merck), Glycine, Tris(base), EDTA, L-Cystein.HCl, Acrylamide và bisacrylamide, SDS, TEMED, Amonium persulfate, DEAE – Cellulose (Merck).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp Nessler: xác định hoạt tính urease [4]

Phương pháp điện di: điện di trên gel 7,5% và 10% polyacrylamid với tốc độ dòng 20mA, gel được nhuộm với Coomassie Blue R-250. [1]

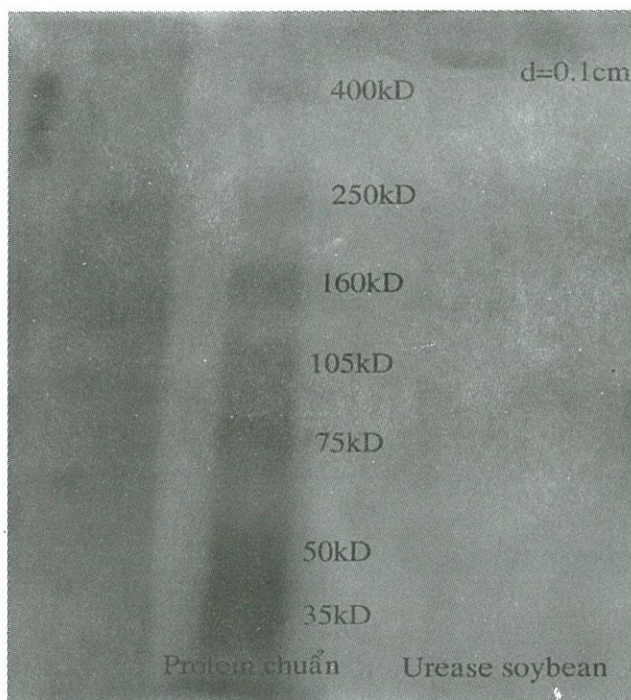
Xác định phân tử lượng của urease: lập đồ thị đường chuẩn biểu hiện sự tương quan giữa phân tử lượng protein chuẩn và khoảng di chuyển của chúng khi điện di trên gel polyacrylamid. Từ khoảng di chuyển của urease, bằng phương trình đường chuẩn trên chúng tôi sẽ xác định được phân tử lượng của urease. [19]

Xác định vận tốc phản ứng thủy phân ure của enzym urease: dựa vào lượng NH₃ hình thành xác định bằng phương pháp Nessler, từ đó tính được lượng ure phân huỷ theo thời gian.

3. KẾT QUẢ

3.1 Xác định phân tử lượng của urease đậu nành:

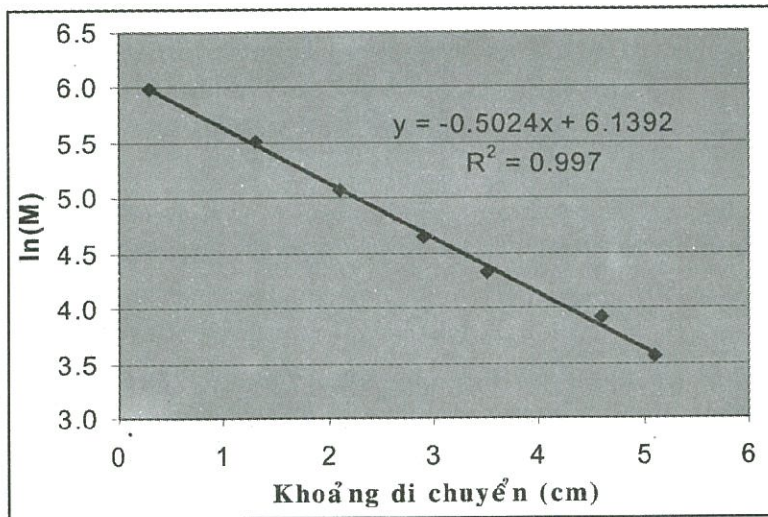
Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng phương pháp điện di trên gel poliarylamid 7,5% để xác định phân tử lượng các mẫu urease đậu nành hạt vàng Việt Nam đã tinh sạch. Trong đệm mẫu chúng tôi không sử dụng SDS và β -mercaptoethanol nhằm giữ nguyên phân tử lượng urease chạy trong điện trường điện di. Để so sánh chúng tôi dùng các chất chuẩn có phân tử lượng từ 35 000 – 400 000 Da. Mẫu enzym urease hoà tan trong đệm mẫu, xử lý nhiệt, sau đó qua điện di trên gel polyacrylamid 7,5% với đệm điện di cũng không bổ sung SDS. Theo [19] muốn xác định phân tử lượng của một chất thông qua các chất chuẩn trên gel polyacrylamide trước hết phải lập phương trình đường chuẩn với các thông số tương quan tuyến tính là phân tử lượng của dãy chất chuẩn và khoảng cách di chuyển của chúng trên điện di đồ. Trong thí nghiệm chúng tôi xác lập phương trình đường chuẩn với dãy protein chuẩn có phân tử lượng từ 35 000 – 400 000 Da. Kết quả ở hình 1 và bảng 1.



Hình 3.1 Điện di phân tích phân tử lượng urease đậu nành

Bảng 3.1: Kết quả phân tích tương quan giữa phân tử lượng dãy protein chuẩn và khoảng cách di chuyển của chúng trên điện di đồ gel 7.5%

Phân tử lượng M (kDa)	Khoảng cách di chuyển d (cm)	ln(M)
400	0,3	5,99146
250	1,3	5,52146
160	2,1	5,07517
105	2,9	4,65396
75	3,5	4,31749
50	4,6	3,91202
5	5,1	3,55535

**Hình 3.2:** Đồ thị tương quan giữa phân tử lượng protein chuẩn và khoảng cách di chuyển của chúng khi điện di trên gel polyacrylamide 7,5%

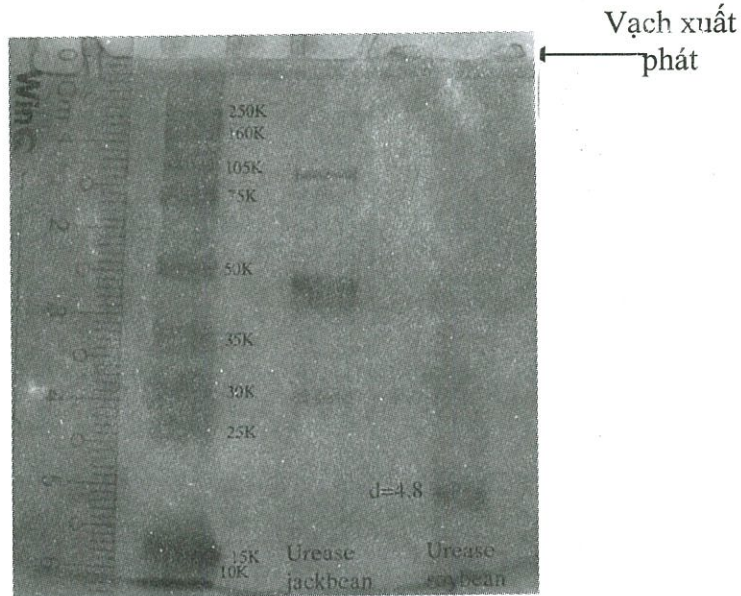
Dựa vào kết quả phân tích bảng 1, chúng tôi đã xây dựng được đường chuẩn xác định phân tử lượng với trục hoành là khoảng di chuyển protein chuẩn và trục tung là Ln(phân tử lượng protein chuẩn). Đường chuẩn do chúng tôi xây dựng có độ chính xác cao với phương trình $y = -0,5024x + 6,1392$. Điều này chứng tỏ chúng tôi hoàn toàn có thể dựa vào đường chuẩn trên để xác định phân tử lượng của urease đậu nành Việt Nam.

Trên điện di đồ thấy rõ khoảng di chuyển của urease đậu nành là $d = 0,1$ cm. Từ phương trình đường chuẩn vừa tìm xác định được phân tử lượng của urease đậu nành vào khoảng 440 000 Da.

3.2 Xác định trọng lượng của các chuỗi tiểu đơn vị

Trong thí nghiệm này, với mục đích xác định trọng lượng các tiểu đơn vị trong phân tử urease, chúng tôi đồng thời sử dụng các tác nhân SDS, β - mercaptoethanol để cắt cấu trúc bậc 4 urease đậu nành thành các tiểu đơn vị mang điện tích âm, và quá trình điện di được tiến hành

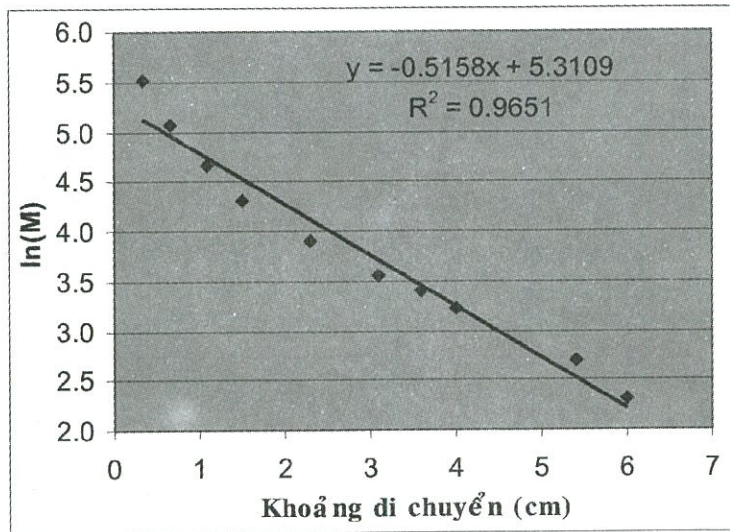
trên gel polyacrylamide nồng độ 10% với cường độ dòng 20 mA. Các chất chuẩn là những protein có phân tử lượng 10 000 – 250 000 Da. Kết quả thu được như sau



Hình 3.3: Điện di đồ xác định trọng lượng chuỗi tiểu đơn vị của urease đậu nành (Mẫu xử lý bằng SDS, β - mercaptoethanol; gel 10% , dòng điện 20mA)

Bảng 3.2: Kết quả phân tích tương quan giữa phân tử lượng protein chuẩn và khoảng di chuyển của chúng khi điện di trên gel acrylamide 10%

Phân tử lượng M (kDa)	Khoảng di chuyển d(cm)	ln(M)
250	0,35	5,52146
160	0,65	5,07517
105	1,1	4,65396
75	1,5	4,31749
50	2,3	3,91202
35	3,1	3,55535
30	3,6	3,40120
25	4	3,21888
15	5,4	2,70805
10	6	2,30259



Hình 3.4: Đồ thị tương quan giữa phân tử lượng protein và khoảng cách di chuyển của chúng khi điện di trên gel acrylamide 10%

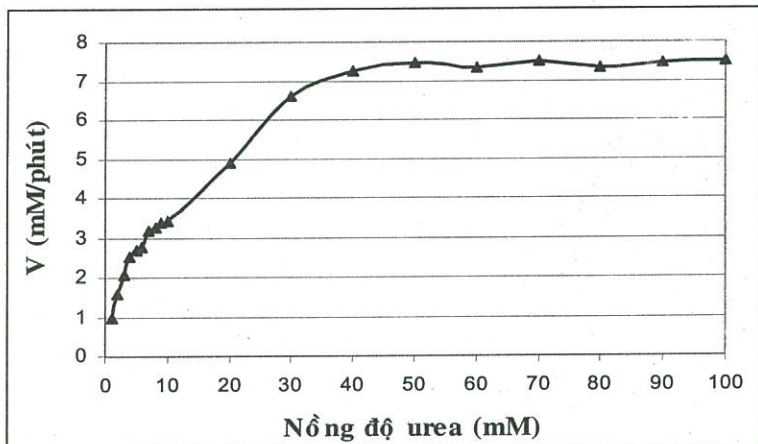
Trên điện di đồ hình 4 cho thấy urease đậu nành sau khi xử lý bằng SDS, β -mercaptoethanol; gel polyacrylamide 10% xuất hiện một vạch của các tiểu đơn vị của phân tử urease, khoảng cách từ điểm xuất phát tới vạch $d = 4,8$ cm. Điều này chứng tỏ các tiểu đơn vị của urease đậu nành hạt vàng Việt Nam có cùng trọng lượng, Dựa vào phương trình đường chuẩn $y = -0,5158x + 5,3109$ (đồ thị hình 3.12) tìm khối lượng tương ứng với khoảng cách 4.8cm, đó sẽ là phân tử lượng của tiểu đơn vị urease đậu nành. Trên đường chuẩn trong thí nghiệm của chúng tôi, ứng với khoảng cách 4,8 cm chúng tôi xác định được trọng lượng của tiểu đơn vị urease là 17000Da.

3.3 Xác định các thông số động học của urease đậu rựa và đậu nành:

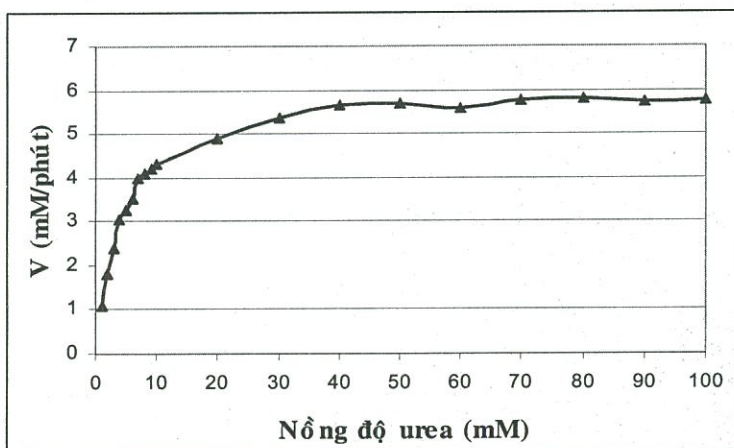
Thông số động học của enzym là tốc độ phản ứng V_{max} và hằng số Michaelis K_m .

Tốc độ của phản ứng enzym trong một giới hạn nào đó phụ thuộc vào nồng độ cơ chất có trong môi trường. Chừng nào enzym chưa bị bão hoà bởi cơ chất thì tốc độ phản ứng vẫn tỷ lệ thuận với nồng độ cơ chất. Do đó chúng tôi khảo sát biến thiên vận tốc phản ứng thủy phân ure của urease đậu nành và đậu rựa bằng cách thay đổi nồng độ ure từ 1 – 100 mM để tìm khoảng nồng độ ure mà trong đó enzym chưa bị bão hoà bởi cơ chất.

Quá trình xác định động học enzym urease được tiến hành như sau: hoà tan bột enzym urease đậu rựa (Merck) và urease đậu nành đã tinh sạch bằng đệm phosphate 1/15M, pH7 để có dung dịch enzym hoạt lực 20UI Summer/1ml (đơn vị hoạt lực UI Summer được định nghĩa là lượng enzym có khả năng thủy phân ure tạo thành $1\mu\text{g NH}_3$ trong 1 phút ở điều kiện tiêu chuẩn). Bổ sung 0.5ml dịch urease 20 UI Summer/1ml vào các ống nghiệm đã có sẵn ure với nồng độ tăng dần từ 1 – 100 mM, ủ ở 30°C trong 5 phút. Lượng NH_3 tạo thành được xác định theo phương pháp Nessler, qua tính toán tìm được lượng cơ chất ure bị thủy phân rồi tính được vận tốc phản ứng enzym urease. Kết quả thu được như sau:



Hình 3.5: Đồ thị biểu diễn sự biến đổi vận tốc thủy phân của enzym urease đậu rựa khi thay đổi nồng độ cơ chất ure



Hình 3.6: Đồ thị biểu diễn sự biến đổi vận tốc thủy phân của urease đậu nành khi thay đổi nồng độ cơ chất ure.

Từ đường biến thiên tốc độ phản ứng enzym ở cả 2 đồ thị cho thấy cả urease đậu nành và đậu rựa hoạt tính 10 UI Summer đều bị bão hoà cơ chất khi nồng độ ure ≥ 30 mM (tức tốc độ phản ứng không tăng khi nồng độ cơ chất tăng). Ở nồng độ ure ≤ 30 mM, vận tốc thủy phân ure của enzym urease đậu nành và đậu rựa tăng dần khi tăng nồng độ cơ chất ure. Như vậy, các thông số động học của urease có thể được xác định khi thay đổi khoảng nồng độ cơ chất ≤ 30 mM ứng với 10 UI Summer urease.

Các thông số động học của urease đậu rựa và urease đậu nành thu được từ quá trình tinh sạch trên được xác định dựa trên tương quan vận tốc thủy phân của enzym urease và nồng độ cơ chất. Để lập đường thẳng thể hiện mối tương quan giữa vận tốc phản ứng thủy phân và nồng độ cơ chất chúng tôi xác định vận tốc thủy phân của enzym urease ở nồng độ cơ chất từ 1 – 10 mM với hoạt tính enzym 10 UI Summer. Chúng tôi xây dựng đường thẳng tương quan giữa vận tốc thủy phân của enzym và nồng độ cơ chất theo phương trình Lineweaver – Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + V_{max}$$

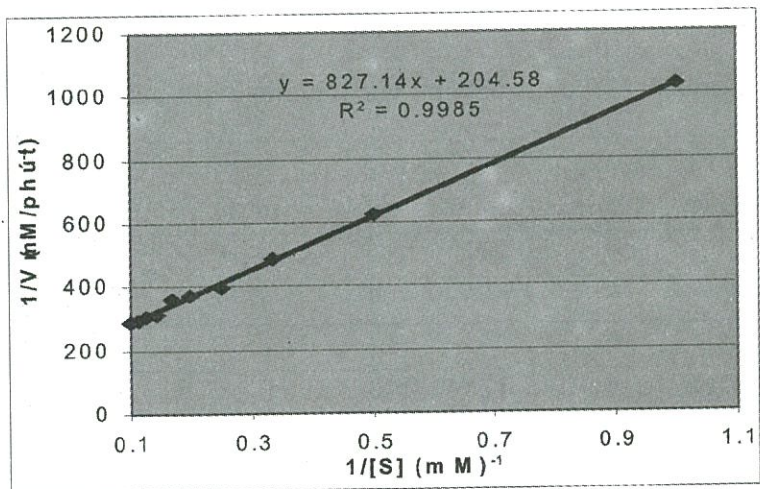
Kết quả phân tích như sau:

Bảng 3.3: Kết quả xác định vận tốc thủy phân của urease đậu rựa

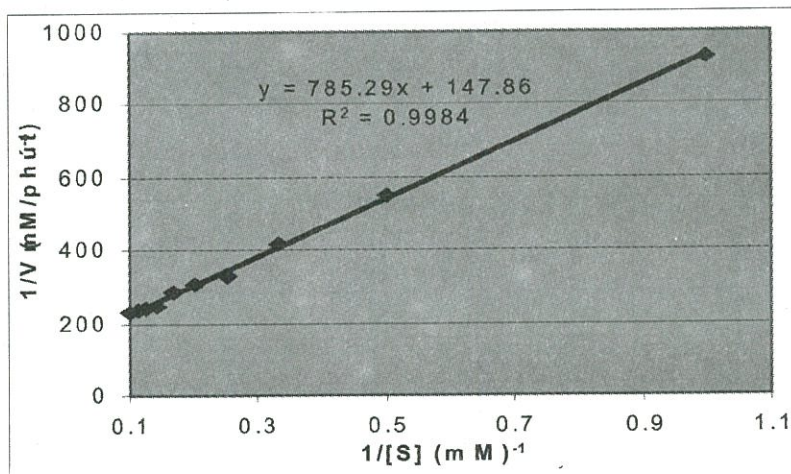
[S] (mM)	[V] ($\mu\text{M}/\text{phút}$)	1/[S] (mM) ⁻¹	1/[V] (mM/phut) ⁻¹
1	0,971	1	1030,30
2	1,606	0,5	622,71
3	2,065	0,333	484,33
4	2,524	0,25	396,27
5	2,700	0,2	370,37
6	2,771	0,167	360,93
7	3,194	0,143	313,08
8	3,265	0,125	306,31
9	3,406	0,111	293,61
10	3,441	0,1	290,60

Bảng 3.4: Kết quả xác định vận tốc thủy phân của urease đậu nành

[S] (mM)	[V] ($\mu\text{M}/\text{phút}$)	1/[S] (mM) ⁻¹	1/[V] (mM/phut) ⁻¹
1	1,076	1	928,962
2	1,818	0,5	550,162
3	2,382	0,333	419,753
4	3,053	0,25	327,553
5	3,265	0,2	306,306
6	3,512	0,167	284,757
7	4,006	0,143	249,633
8	4,112	0,125	243,205
9	4,218	0,111	237,099
10	4,324	0,1	231,293



Hình 3.7: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa 1/V và 1/[S] của urease đậu rựa



Hình 3.8: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa 1/V và 1/[S] của urease đậu nành

Bảng 3.5: Các thông số động học của urease đậu rựa và đậu nành

Đậu	V_{\max} (mM/phút)	K_m (mM)
Đậu rựa	$4,89 \cdot 10^{-3}$	3,84
Đậu nành	$6,77 \cdot 10^{-3}$	5,3

Từ kết quả phân tích cho thấy giá trị K_m của urease đậu rựa thấp hơn đậu nành, điều này có thể giúp chúng ta kết luận urease đậu rựa có ái lực với cơ chất ure lớn hơn urease đậu nành nhưng sự khác biệt này không lớn lắm. Kết quả tính giá trị V_{\max} cho thấy urease đậu nành có giá trị V_{\max} cao hơn urease đậu rựa.

4. KẾT LUẬN

Sau quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được một số đặc tính urease đậu nành và đậu rạ như sau:

Đặc tính	Đậu nành	Đậu rạ
Trọng lượng phân tử (Da)	440 000	-
Trọng lượng chuỗi tiểu đơn vị (Da)	17 000	-
K_m (mM)	5,3	3,84
V_{max} (mM/phút/10UI summer)	6,77	4,89

Đây là một số đặc tính quan trọng hỗ trợ cho những nghiên cứu tiếp theo để đưa urease đậu nành vào ứng dụng trong Y học và Thực Phẩm.

DETERMINING MOLECULAR MASS AND KINETIC PARAMETERS OF VIETNAM YELLOW SOYBEAN UREASE

Le Thi Phu, Nguyen Thi Cam Vi
University of Ton Duc Thang, HCMc

ABSTRACT: *In previous reports in this series, we found out the effective purification process of urease from Viet Nam yellow soybean. The pure soybean urease powder (8.44UI/mg powder) from the purification process was used to determine some properties. Polyacrylamide gel 7,5% electrophoresis, non SDS and β -mercaptoethanol, compare with standard proteins from 35 000 – 400 000Da, showed Viet Nam soybean urease's molecular mass about 440 000 Da. The soybean urease was heated with SDS and β -mercaptoethanol, then SDS – acrylamide gel 10% electrophoresis, compare with standard proteins 10 000 – 250 000 Da, indicated that there exists a single Viet Nam soybean urease subunit species with a size of about 17 000 Da. Kinetic parameters of Viet Nam yellow soybean urease, determined according to Lineweaver – Burk equation, are $K_m = 5.3$ mM and $V_{max} = 6.77 \cdot 10^{-3}$ mM/min.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Anh Hồng, *Kỹ thuật sinh hóa*, NXB ĐHQG Tp.HCM, (2003)
- [2]. Nguyễn Đức Lượng và các tác giả, *Công nghệ enzyme*, NXB ĐHQG Tp.HCM, (2004)
- [3]. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành sinh hóa*, NXB KH&KT Hà Nội, (2002).
- [4]. Đào Hữu Vinh và các tác giả, *Các phương pháp sắc ký*, NXB KH&KT Hà Nội, (1985).
- [5]. Cristian Follmer và các tác giả, *Jackbean, soybean and bacillus pasteurii urease - biological effects unrelated to ureolytic activity*, Eur. J. Biochem. 271, 1357-1363, Cambridge, (004).
- [6]. E. G. Schmidt, *The inactivation of urease*, The department of biological chemistry of the university of Maryland school of medicine, Baltimore, (1928)
- [7]. Frederick J. Dechow, *Separation and purification technique in biotechnology*, Noyes publications, New Jersey, (1989)

- [8]. Henry Tauber and Israel S. Kleiner, *The toxicity of crystalline urease, medical college and flower hospital*, J. Biol. Chem. 92, 177, New York, (1931)
- [9]. Irwin W. Sier, *The activation energy of urea hydrolysis catalyzed by soybean urease*, Eur. J. Biochem. 132, 209, Cambridge, (1939)
- [10]. J. G. Mateer, E. K. Marshall, *The urease content of certain beans, with special referenace to the jack bean*, John Hopkins University, Baltimore, (1916)
- [11]. Jack Peterson, Kent M. Harmon, and Carl Niemann, *The dependence of the specific activity of urease upon the chemistry*, California Institute of Technology, Pasadena, (1948).
- [12]. James B. Summer, *The isolation and crystallization of the enzym-urease*, J. Biol. Chem. 69, 435 - 441, New York, (1926)
- [13]. K. Takisnima and T. Suga, *The structure of jack bean urease, the complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cystein residues*, Eur. J. Biochem. 175, 151 - 165, Cambridge, (1988).
- [14]. Stacey F. Howell and James B. Sumner, *The specific effects of buffer upon urease activity*, J. Biol. Chem. 104, 619, New York, (1934)
- [15]. Isobel J. Rosenstein, Jeremy M. Hamilton and Miller and William Brufitt, *Role of urease in the formation of infection stones: comparision of urease from different sources*, www.pubmedcentral.com, (1981)
- [16]. Joseph C. Polacco and Evelyn A. Havar, *Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture*, www.biomedcetral.com, (1979)
- [17]. Prem P. Sehgal and Aurbrey W.Naylor, *Purication and properties of urease derived from hydrated seeds of jack bean, Canavalia ensiformis (L)*, Plant Physiology. 4, 567 - 572, Horsham, (1966)
- [18]. William N. Fishbein, *Stoichiometry, Kinetics, and Inhibitory Properties of a third substrate: Dihydroxyurea*, The Journal of Biological Chemistry, New York, (1969).
- [19]. *Quantitation & Electrophoresis of Proteins*, www.cas.vanderbilt.edu