



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003306

(51) **C12Q 1/68**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00082

(22) 02/03/2021

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/05/2021 398

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Hồng Loan (VN); Quách Hồng Thái (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN TÍCH PROTEAZA VÀ QUY TRÌNH PHÂN NHÓM PROTEAZA CÓ TRONG TÔM (PENAEUS)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích proteaza và quy trình phân nhóm proteaza để đánh giá proteaza có trong tôm (*Penaeus*) ứng dụng trong nghiên cứu, đánh giá chất lượng tôm nuôi. Quy trình phân tích proteaza bao gồm bước: a) chuẩn bị bản gel điện di; b) chuẩn bị mẫu protein; c) điện di mẫu; d) ổn định bản gel; e) nhuộm và tẩy màu bản gel. Bằng cách thay đổi các thành phần gel polyacrylamit và điều kiện ủ với đệm hoạt tính, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép phân tích proteaza có trong tôm, đồng thời cho phép phân nhóm các proteaza này mà không cần sử dụng các thành phần gây biến tính protein độc hại như SDS, DTT hoặc β -ME. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép rút ngắn thời gian phân tích nhưng vẫn cho kết quả rõ ràng, chính xác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ enzym và protein, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích proteaza và quy trình phân nhóm proteaza có trong tôm phục vụ nghiên cứu vai trò của các proteaza ở tôm và có thể mở rộng ra các đối tượng khác.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ở tôm (*Penaeus*) nói riêng cũng như trong các sinh vật sống nói chung, các enzym proteolytic hay còn gọi là các proteaza có mặt và đóng vai trò sinh lý quan trọng khác nhau. Một số proteaza đã được biết đến thực hiện các chức năng phân giải protein liên quan đến quá trình chết theo chương trình và melanin hoá có vai trò trong đáp ứng miễn dịch ở tôm. Tùy thuộc vào giai đoạn phát triển, tình trạng sức khỏe và khả năng nhiễm bệnh mà mức độ hoạt động và thành phần của các proteaza ở tôm có thể khác nhau. Các proteaza có nhiều trong tuyến tiêu hoá của tôm sẽ giúp phân giải các protein, thành phần chính trong thức ăn của tôm, quyết định sự sinh trưởng và phát triển của tôm. Ngoài ra, trong quá trình bảo quản và lưu giữ tôm, các protein từ cơ tôm có thể bị phân giải bởi các enzym có hoạt tính proteolytic dẫn đến làm thịt tôm mềm và nhũn, ảnh hưởng đến chất lượng của thịt tôm, làm rút ngắn thời gian sử dụng. Vì vậy, các nghiên cứu về proteaza sẽ giúp hiểu rõ hơn về hệ miễn dịch của tôm giúp hỗ trợ đánh giá khả năng sinh trưởng, trao đổi thức ăn, tăng năng suất nuôi trồng cũng như bảo quản tôm, có hiệu quả không chỉ trong chế biến thủy sản mà còn hữu ích trong việc nghiên cứu, nuôi trồng và sản xuất thức ăn cho tôm.

Phương pháp thường dùng để xác định hoạt độ và phân tích protein dựa trên phổ băng thu được từ kỹ thuật điện di gel polyacrylamit với cơ chất casein (Lemos và cộng sự, 2000; Buarque và cộng sự, 2009, Sriket và cộng sự 2010; Senphan et al., 2015). Cụ thể, mẫu nghiên cứu sẽ được điện di trên gel polyacrylamit có chứa natri dodecyl sulfat (SDS) 0,1% (SDS-PAGE) trong thời gian khoảng 2 giờ. Kết thúc điện di, bản gel sẽ được ủ với Triton X-100 2,5% 30 phút để loại bỏ SDS. Bản gel không có SDS sau đó được tiếp tục ủ với cơ chất casein 3% ở 4°C trong thời gian 30 phút và tiếp theo là đệm hoạt tính ở 25°C trong 90 phút để cho phép enzym hoạt động phân giải cơ chất.

Giữa các bước chuyển đệm, bản gel sẽ được rửa 3 lần để loại bỏ đệm cũ, trước khi tiến hành ủ trong đệm mới. Cuối cùng là các bước nhuộm và tẩy bản gel, kết quả các băng protein có hoạt độ proteaza sẽ hiện lên dưới dạng băng trắng trên nền màu xanh của bản gel. Tổng thời gian thực hiện của phương pháp là khá dài, khoảng 7 giờ. Để phân loại và phân tích phổ băng, kích thước của các proteaza, trước khi tiến hành điện di trên gel SDS-PAGE, mẫu nghiên cứu được ủ với các cơ chất đặc hiệu như PMSF (phenyl-methyl-sulphonyl-florua) cho proteaza serin, TPCK (tosyl-phenylalanin clometyl keton) cho chymotrypsin, TLCK (tosyl-lysin clometyl keton) và benzamidin.

Một phương pháp khác, trong đó cơ chất casein khoảng 0,65% được chuẩn bị trong thành phần của bản gel SDS-PAGE, đệm mẫu có thêm thành phần 0,1% của SDS giúp ức chế tạm thời hoạt động của proteaza trong quá trình di chuyển của protein (Raser và cộng sự, 1995; Gaur và cộng sự, 2010). Sau khi điện di, bản gel cũng được ủ với Triton X-100 để loại bỏ SDS, hồi tính hoạt động của proteaza để phân giải cơ chất, các bước tiến hành tương tự với phương pháp trên. Trong phương pháp này, casein đã có sẵn trong thành phần của bản gel nên chỉ cần sử dụng nồng độ thấp và kết quả cho băng hoạt tính của proteaza trắng, sáng, rất dễ quan sát. Tuy nhiên, nếu bước ức chế tạm thời hoạt tính bởi SDS 0,1% không hiệu quả và nồng độ enzym cao, sẽ dẫn đến vệt băng trắng dài, băng hoạt tính không phân tách, đặc biệt trên các mẫu thô nhiều loại protein khác nhau.

Mặt khác, trong cả hai phương pháp đã đề cập, nếu bước loại bỏ SDS trong thành phần của bản gel chưa hiệu quả, SDS sẽ có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym; cũng như tương tác giữa enzym và các chất nghiên cứu (ức chế/hoạt hoá) và cho kết quả về khả năng ảnh hưởng của các chất đến hoạt độ của proteaza chưa chính xác. Trong các quy trình, điều kiện để proteaza phân giải cơ chất casein thường là 25°C, đây chưa phải nhiệt độ tối thích cho proteaza của tôm nên cần nhiều thời gian để enzym phản ứng, dẫn đến kéo dài thời gian của cả quy trình.

Bên cạnh đó, cho đến hiện nay, chưa có quy trình xác định và phân loại proteaza riêng cho tôm với các điều kiện thích hợp cho proteaza phân lập từ tôm một cách tối ưu. Do đó, cần có một quy trình chuẩn hoá cho phép phân tích proteaza cũng như quy trình phân nhóm proteaza có trong các mẫu tôm phân tích theo hướng đơn giản, tiết kiệm thời gian, tối ưu hóa quy trình nhằm phục vụ cho các nghiên cứu về proteaza trên tôm ứng dụng trong ngành nuôi trồng thủy sản.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên, các tác giả đã cải tiến quy trình phân tích và phân nhóm các proteaza có trong tôm để ứng dụng trong phân tích hóa sinh trên cơ sở điện di protein trong điều kiện không biến tính và có cơ chất, trên cơ sở đó rút ngắn thời gian phân tích, tăng độ nhạy để có thể xác định được nhanh, chính xác các loại proteaza và phân nhóm proteaza có trong tôm.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích proteaza có trong tôm (*Penaeus*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit hai lớp bao gồm: lớp gel tách chứa (% theo thể tích) 44% polyacrylamit 30%, 27,5% Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 27,5% nước, 0,8% amoni persulfat, 0,2% tetrametyletyldiamin và lớp gel cô chứa (% theo thể tích) 12,5% polyacrylamit 30%, 25% Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 60,5% nước, 1,5% amoni persulfat, 0,5% tetrametyletyldiamin;

b) chuẩn bị mẫu protein bằng cách thu nhận, nghiền mẫu tôm trong nitơ lỏng và đồng nhất trong dung dịch đệm chiết (đệm A) bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM theo tỷ lệ mẫu protein: đệm A là 1:3 (trọng lượng/thể tích), sau đó, ly tâm ở 4°C trong 30 phút thu dịch nổi, phần dịch nổi này được chuẩn độ protein đến khoảng từ 1 đến 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, thu được mẫu protein;

c) điện di mẫu bằng cách phối trộn mẫu protein với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glyxerol và 0,01% xanh bromophenol theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích), sau đó nạp từ 5 đến 20 μL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit và tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ;

d) ổn định bản gel với cơ chất bằng cách tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM, tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ để proteaza phân cắt casein, sau đó rửa và ủ lại bằng đệm A ở 37°C trong 30 phút trong điều kiện lắc nhẹ để ổn định bản gel; và

c) nhuộm và tẩy màu bản gel bằng cách ngâm bản gel trong dung dịch đậm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 (theo thể tích) bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie trong 30 phút, sau đó chuyển sang dung dịch đậm tẩy trong khoảng từ 30 đến 60 phút để rửa thuốc nhuộm, thu bản gel có vị trí proteaza không bắt màu nhuộm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân nhóm proteaza có trong tôm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit hai lớp bao gồm lớp gel tách chứa (% theo thể tích) 44% polyacrylamit 30%, 27,5% Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 27,5% nước, 0,8% amoni persulfat, 0,2% tetrametyletylenđiamin và lớp gel cô chứa (% theo thể tích) 12,5% polyacrylamit 30%, 25% Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 60,5% nước, 1,5% APS, 0,5% tetrametyletylenđiamin;

b) chuẩn bị mẫu protein bằng cách thu nhận, nghiền mẫu tôm trong nitor lỏng và đồng nhất trong dung dịch đậm chiết (đậm A) bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM theo tỷ lệ 1:3 (trọng lượng/thể tích), sau đó ly tâm ở 4°C trong 30 phút thu dịch nổi, phần dịch nổi này được chuẩn độ đến khoảng từ 1 đến 1,5µg/µL, thu được mẫu protein;

c) chuẩn bị mẫu phân tích bằng cách ủ lần lượt từng phần mẫu protein với từng nhóm chất ức chế proteaza được chọn từ nhóm bao gồm PMSF, TPCK, TLCK, leupeptin, E64, pepstatin và EDTA với nồng độ từ 2 đến 25mM trong 30 phút ở 4°C thu được nhóm mẫu phân tích;

d) điện di mẫu bằng cách phối trộn mẫu protein, mẫu phân tích lần lượt với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glyxerol và 0,01% xanh bromophenol theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích), sau đó nạp từ 5 đến 20µL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit và tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ;

e) ổn định bản gel với cơ chất bằng cách tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM, tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ

để proteaza phân cắt casein, sau đó rửa và ủ lại bằng đệm A ở 37°C trong 30 phút kết hợp lắc nhẹ để ổn định bản gel;

f) nhuộm và tẩy màu bản gel bằng cách ngâm bản gel trong dung dịch đệm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 (theo thể tích) bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie trong 30 phút, sau đó chuyển sang dung dịch đệm tẩy trong khoảng từ 30 đến 60 phút để rửa thuốc nhuộm thu bản gel có vị trí proteaza không bắt màu nhuộm; và

g) xác định các nhóm proteaza trong tôm bằng cách so sánh các băng từ nhóm mẫu phân tích với mẫu protein để xác định sự có mặt của các nhóm proteaza thuộc serin, chymotrypsin, trypsin, cystein, aspartyl và metallo proteaza tương ứng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh bản gel điện di phân tích nhóm proteaza từ mẫu tôm sú, trong đó (1) thang chuẩn protein; (2) dịch chiết protein từ cơ thân; (3) dịch chiết protein từ cơ đầu; (4) dịch chiết protein từ huyết tương; (5) dịch chiết protein từ gan tụy; (6) dịch chiết protein đầu tôm sú.

Hình 2 là hình ảnh bản gel điện di phân tích nhóm proteaza từ dịch chiết gan tụy tôm sú, trong đó:

A: (1) dịch chiết gan tụy tôm sú; (2) dịch chiết gan tụy tôm sú trong DMSO 20%; (3-4) dịch chiết ủ với 1 và 10mM PMSF; (5-6) ủ với 10 và 20mM TPCK, (7-8) ủ với 10 và 20mM TLCK,

B: (1-2) ủ với leupeptin 1 và 5mM, (3-4) ủ với E64 1 và 5mM; (5-6) ủ với pepstatin A 1 và 5mM, (7-8) ủ với EDTA 10 và 25mM, (9) dịch chiết gan tụy tôm sú

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Trong các kỹ thuật điện di protein gel polyacrylamit thường có 0,1% natri dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate: SDS), DTT hoặc β -ME là những hợp chất có tác dụng phá vỡ cấu trúc bậc ba của protein, làm cho phân tử protein cuộn gập thành dạng duỗi thẳng. Đây cũng là các chất có thể tác động đến cấu trúc gen gây đột biến

cho người sử dụng. SDS còn có tác dụng bao phủ các mạch bên của các axit amin giúp bề mặt phân tử protein tích điện âm. Dưới tác dụng của các hợp chất trên, khi điện di phân tử protein sẽ ở dạng mạch thẳng, tích điện âm và di chuyển về cực dương trong điện trường.

Đối với phần lớn các proteaza trong các mẫu tôm thường có giá trị $pI < 8,0$. Do đó, khi điện di với đệm $pH = 8,3$ thì các proteaza có giá trị $pI < pH$ nên sẽ tích điện âm và di chuyển về cực dương trong điện trường. Chính vì vậy, có thể phát triển kỹ thuật điện di bằng cách thay đổi thành phần và điều kiện điện di sao cho proteaza không bị biến tính, vẫn cho phép điện di được mà không cần sử dụng SDS.

Tôm sinh trưởng và phát triển trong khoảng nhiệt độ $25-28^{\circ}C$, tuy nhiên các nghiên cứu về tính chất của các proteaza phân lập từ tôm cho thấy nhiệt độ tối thích cho enzym hoạt động thường khoảng từ 37 đến $50^{\circ}C$. Vì vậy, các tác giả đề xuất nhiệt độ phản ứng cho proteaza phân giải cơ chất casein tại $37^{\circ}C$ để rút ngắn thời gian phản ứng và tiết kiệm thời gian cho cả quy trình.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích proteaza và quy trình xác định phân nhóm proteaza có trong tôm. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép phân tích proteaza có trong các mẫu tôm phân tích, đồng thời có thể phân nhóm proteaza có trong tôm làm cơ sở đánh giá chất lượng tôm nuôi.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích proteaza có trong tôm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit; b) chuẩn bị mẫu protein; c) điện di mẫu; d) ổn định bản gel với cơ chất; và e) nhuộm và tẩy màu bản gel.

Trong bước chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit, các bản gel điện di được chuẩn bị theo phương pháp đúc gel chuẩn. Các thành phần được sử dụng để đúc gel 2 lớp bao gồm gel tách và gel cô. Lớp gel tách được sử dụng nền polyacrylamit, trong đó bao gồm (% theo thể tích) 44% polyacrylamit 30%, 27,5% Tris-HCl 1,5M $pH=8,8$, 27,5% nước, 0,8% amoni persulfat, 0,2% tetrametyletylenđiamin. Lớp gel cô chứa (% theo thể tích) 12,5% polyacrylamit 30%, 25% Tris-HCl 0,5M, $pH=6,8$, 60,5% nước, 1,5% APS, 0,5% tetrametyletylenđiamin. Hai lớp gel này được đúc và được sử dụng là tấm điện di theo kỹ thuật điện di phân tách khối lượng.

Như đã nêu ở trên, các kỹ thuật điện di polyacrylamit thường sử dụng SDS, kỹ thuật theo giải pháp hữu ích không sử dụng tác nhân biến tính này, do đó an toàn cho người thao tác, đồng thời không cần bước rửa để loại bỏ tác nhân này ra khỏi tấm điện di.

Trong bước chuẩn bị mẫu protein, mẫu được sử dụng là mẫu tôm sống. Mẫu được thu nhận từ tôm sống và tiếp đó được nghiền trong nitơ lỏng nhằm tăng hiệu quả đồng nhất mẫu trong thời gian ngắn, hoạt độ proteaza không bị phân cắt giới hạn hay bị mất hoạt tính. Tiếp đó đồng nhất trong dung dịch đệm chiết (đệm A). Dung dịch đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM. Lượng mẫu bổ sung với dung dịch đệm A là 1:3 (trọng lượng/thể tích). Sau khi đồng nhất, tiến hành ly tâm ở 4°C trong 30 phút thu dịch nổi. Phần dịch nổi được định lượng protein theo phương pháp Bradford và nồng độ protein trong mẫu được pha loãng về khoảng từ 1 đến 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Quá trình này nhằm thu được protein đủ để phân tích và cho kết quả các băng protein rõ ràng, tách biệt nhau.

Trong bước điện di mẫu, phối trộn mẫu protein với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glyxerol và 0,01% xanh bromophenol theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích). Tiếp đó, sau đó nạp từ 5 đến 20 μL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit. Tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ. Cần lưu ý, với pH=8,3, các protein của tôm sẽ mang điện tích âm, và do đó trong điện trường, nhóm các protein sẽ dịch chuyển về cực dương mà không cần sử dụng SDS như các phương pháp điện di gel polyacrylamit thông thường. Quá trình điện di kết thúc được xác định khi vệt xanh chạm đáy băng tấm gel điện di.

Trong bước ổn định bản gel với cơ chất, trước tiên, tiến hành tráng rửa bản gel trong đệm A. Đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM. Tiếp đó, ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ. Sau khi ủ, thay thế bằng đệm A không bổ sung casein rồi ủ tiếp ở 37°C trong 30 phút. Quá trình này nhằm các proteaza có trong mẫu phân cắt casein. Trong quá trình ủ, tiến hành lắc nhẹ để thu được bản gel ổn định trước tiến hành nhuộm và tẩy màu gel.

Sau khi thu được bản gel đã được ủ với cơ chất, tiến hành nhuộm và tẩy màu bản gel bằng cách ngâm bản gel vào dung dịch đậm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 (theo thể tích) bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie (khối lượng/thể tích). Quá trình nhuộm xanh Comassie thực hiện trong 30 phút, sau đó chuyển sang dung dịch đậm tẩy trong khoảng từ 30 đến 60 phút. Bằng cách này, cả bản gel đã được ủ với casein sẽ có màu xanh, ngoại trừ những vị trí có hoạt tính của proteaza đã phân cắt casein, không bắt màu bởi thuốc nhuộm xanh Comassie nên bị rửa trôi do đó có màu trắng. Như vậy, có thể xác định được phổ băng, mức độ hoạt động và dự đoán được khối lượng phân tử của các proteaza trong mẫu protein trên cơ sở các băng điện di này. Cụ thể, băng điện di càng lớn, độ trắng sáng càng rõ thì hoạt độ proteaza càng mạnh và ngược lại. Căn cứ vào vị trí băng điện di có thể xác định sơ bộ kích thước của các proteaza trên cơ sở so sánh với thang chuẩn protein.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân nhóm proteaza có trong tôm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit; b) chuẩn bị mẫu protein; c) chuẩn bị mẫu phân tích; d) điện di mẫu; e) ổn định bản gel với cơ chất; f) nhuộm và tẩy màu bản gel; và g) xác định các nhóm proteaza.

Quy trình phân nhóm proteaza theo giải pháp hữu ích có bước chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit, chuẩn bị mẫu protein được thực hiện như trong quy trình xác định proteaza theo giải pháp hữu ích được mô tả ở trên. Ngoài ra, các điều kiện điện di mẫu, ổn định bản gel với cơ chất, nhuộm và tẩy màu bản gel được cũng được thực hiện trong cùng điều kiện như mô tả trong quy trình xác định proteaza đã nêu. Theo đó các điều kiện này không được mô tả lại, nhưng người có hiểu biết cơ bản trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể dựa vào phần mô tả ở trên để áp dụng cho quy trình phân nhóm proteaza theo giải pháp hữu ích.

Trong bước chuẩn bị mẫu phân tích, các mẫu phân tích được sử dụng là mẫu protein được ủ với các nhóm chất ức chế khác nhau đại diện cho các nhóm proteaza cần phân tích. Cụ thể trong bước này, mẫu protein thu được sau bước chuẩn bị mẫu protein ở trên được lấy từng phần và ủ lần lượt với từng nhóm chất ức chế proteaza quan tâm. Cụ thể, nhóm chất ức chế proteaza được sử dụng theo giải pháp hữu ích bao gồm PMSF ức chế proteaza serin nói chung, TPCK ức chế nhóm chymotrypsin, TLCK ức chế nhóm trypsin, leupeptin ức chế serin và cystein proteaza, E64 ức chế proteaza

thiol, pepstatin ức chế proteaza aspartyl và EDTA ức chế nhóm proteaza có chứa ion kim loại (metalloprotease). Nồng độ của mỗi chất ức chế tùy theo mức độ ức chế proteaza, nhưng được sử dụng với nồng độ từ 2 đến 25mM. Thời gian ủ của proteaza với chất ức chế được thực hiện trong 30 phút ở 4°C, thu được nhóm mẫu phân tích.

Nếu proteaza bị ức chế sẽ không có khả năng phân giải casein, do đó không xuất hiện vạch băng protein màu trắng tại các vị trí tương ứng so với mẫu protein không bổ sung chất ức chế, từ đó xác định được nhóm proteaza quan tâm. Về lý thuyết, đối với những mẫu có chứa proteaza, casein bị phân giải, không bắt màu bởi thuốc nhuộm xanh Comassie nên cho băng protein màu trắng trên nền xanh. Khi bổ sung các chất ức chế proteaza, nếu proteaza bị ức chế đặc hiệu và bị giảm hoặc mất hoạt tính, làm giảm hoặc không có khả năng phân giải casein, casein sẽ bắt màu với thuốc nhuộm xanh Comassie. Trên cơ sở so sánh với mẫu đối chứng không bổ sung chất ức chế, có thể xác định được nhóm các proteaza tương ứng.

Trong bước điện di mẫu, quá trình này được thực hiện với mẫu protein đối chứng (protein không ủ với chất ức chế) và các mẫu phân tích (protein được ủ với từng chất ức chế đặc hiệu với từng loại proteaza). Cụ thể mẫu protein đối chứng, mẫu phân tích sau khi phối trộn với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glycerol và 0,01% xanh bromophenol theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích). Tiếp đó, nạp từ 5 đến 20μL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit. Tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ. Cần lưu ý, với pH=8,3, các protein của tôm sẽ mang điện tích âm, trong điện trường dưới tác dụng của dòng điện một chiều, nhóm các protein sẽ dịch chuyển từ cực âm sang cực dương mà không cần sử dụng SDS như các phương pháp điện di gel polyacrylamit thông thường. Quá trình điện di kết thúc được xác định khi vệt xanh chạm đáy của tấm gel điện di.

Trong bước ủ bản gel với cơ chất, bản gel sau điện di sẽ được chuyển khay chứa (dung tích 50 – 100mL), tráng rửa bản gel một vài lần trong đệm A (Tris-HCl 50mM, pH 8 có NaCl 50mM, CaCl₂ 5mM), tiếp theo ủ bản gel trong đệm A có 5% casein (khối lượng/thể tích) tại 4°C trong thời gian 1 giờ. Theo một phương án ưu tiên, bản gel cần được ủ với casein tại 4°C, có lắc nhẹ để đảm bảo casein được thấm tốt vào trong bản gel, tạo điều kiện cho bước phân giải cơ chất của enzym sau này.

Trong bước ủ bản gel với đệm hoạt tính để proteaza phân giải cơ chất, bản gel được ủ trong đệm hoạt tính (Đệm A) tại 37°C trong thời gian 30 phút; có lắc nhẹ.

Trong bước nhuộm, bản gel được nhuộm bằng xanh Comassie 0,5% (khối lượng/thể tích) pha trong đệm có metanol:axit axetic:H₂O theo tỷ lệ 3:1:6 (đệm tẩy) trong thời gian 30 phút.

Trong bước tẩy, hiện màu, bản gel được tẩy trong đệm tẩy đến khi quan sát rõ các băng trắng hoạt tính của proteaza, thường khoảng 30 phút – 1 giờ.

Để phân nhóm proteaza của tôm sú, mẫu nghiên cứu tách chiết từ tôm sẽ được ủ với các chất ức chế đặc hiệu PMSF (chất ức chế serin proteaza), TPCK (chất ức chế chymotrypsin), TLCK (chất ức chế trypsin), pepstatin A (chất ức chế proteaza aspartyl), E64 (chất ức chế proteaza thiol) và EDTA (chất ức chế proteaza kim loại) trong thời gian 30 phút tại 4°C. Sau đó, hỗn hợp mẫu và các chất ức chế sẽ được ủ với đệm mẫu SB và tiến hành các bước tương tự như quy trình xác định hoạt độ của proteaza. Trên cơ sở phân tích với mẫu đối chứng, được ủ trước với DMSO (đệm pha các chất ức chế), băng protein nào không xuất hiện trong các mẫu ủ với chất ức chế đặc hiệu so với mẫu đối chứng là cơ sở để phân nhóm protein.

Quy trình theo giải pháp hữu ích có thể định tính và phân loại được nhóm proteaza trong mẫu tôm, từ đó cho phép phát hiện, phân tích, phân loại nhóm proteaza ứng dụng trong công tác phòng bệnh trên cơ sở nghiên cứu miễn dịch và nuôi tôm, tạo tiền đề cho các nghiên cứu, ứng dụng proteaza trong nuôi trồng thủy sản.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Xác định các proteaza chính ở tôm sú (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798)

Để xác định vị trí tập trung các proteaza ở tôm sú, tôm sú sống được giải phẫu để thu các bộ phận khác nhau. Cụ thể 1g mẫu bao gồm mẫu cơ thân, cơ đầu, gan tụy và đầu được thu nhận bằng giải phẫu và chuyển vào cối sứ và nghiền trong 3mL đệm chiết bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl₂ 5mM. Với mẫu dịch lỏng (hemolymph) được hút trực tiếp bằng xi lanh chứa đệm chiết. Quá trình này được thực hiện khi tôm còn sống để đảm bảo lượng proteaza có trong mẫu lớn nhất.

Tiếp đó ly tâm mẫu ở 4°C trong 30 phút ở tốc độ 12.000 vòng/phút, thu dịch nổi rồi đưa nồng độ protein đến khoảng 2µg/µL. Tiến hành phối trộn 40µL dịch nổi với

10 μ L đệm mẫu SB bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glyxerol và 0,01% xanh bromophenol thu 50 μ L mẫu protein.

Bản gel điện di polyacrylamit hai lớp được chuẩn bị theo quy trình nêu trên. Lớp gel tách bao gồm chứa 1500 μ L polyacrylamit 30%, 937,5 μ L Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 937,5 μ L nước, 30 μ L amoni persulfat, 7 μ L tetrametyetylendiamin. Lớp gel cô chứa 162,4 μ L polyacrylamit 30%, 312,4 μ L Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 762,5 μ L nước, 20 μ L APS, 5 μ L tetrametyetylendiamin.

Hút 20 μ L mẫu nạp vào giếng điện di trên gel polyacrylamit hai lớp được chuẩn bị ở trên, và tiến hành điện di ở 4°C trong đệm Tris-HCl 25mM, pH=8,3 chứa glyxin 192mM trong 1 giờ đến khi băng xanh chạm đáy bản điện di.

Tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl₂ 5mM. Tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trên máy lắc tốc độ 5 vòng/phút, sau khi rửa sạch đệm, bổ sung vào đệm A và tiếp tục ủ ở 37°C trong 30 phút trong cùng điều kiện lắc.

Bản gel sau khi ủ được ngâm trong 20mL dung dịch đệm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie (khối lượng/thể tích) trong 30 phút. Cuối cùng chuyển sang dung dịch đệm tẩy trong 40 phút để hiện các băng trắng.

Kết quả phân tích proteaza có trong các thành phần của tôm được thể hiện trên Hình 1, trong đó cho thấy proteaza của tôm sú tập trung chủ yếu ở phần đầu và gan tụy của tôm, trong đó (1) thang chuẩn protein; (2) dịch chiết protein từ cơ thân; (3) dịch chiết protein từ cơ đầu; (4) dịch chiết protein từ hemolymph; (5) dịch chiết protein từ gan tụy; (6) dịch chiết protein đầu tôm sú.

Phổ băng proteaza ở các bộ phận trong phần đầu tôm gần tương tự như nhau, gồm có 12 phổ băng của các proteaza với khối lượng phân tử (KLPT) tương ứng 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 23, 25, 30, 35 và 48kDa. Trong đó, các proteaza có KLPT từ 11 đến 15 và từ 20 đến 25kDa có hoạt độ cao hơn cho băng trắng phân giải casein đậm hơn. Tất cả các proteaza này đều xuất hiện chủ yếu trong gan tụy, đặc biệt các proteaza có khối lượng phân tử từ 11 đến 25kDa có hoạt độ và hàm lượng cao vượt trội. KLPT của các băng protein được xác định dựa vào độ di động của các băng trên zymogram

có thang protein chuẩn và công bố của một số tác giả về khối lượng protein của các proteaza từ tôm.

Ví dụ 2. Phân nhóm proteaza từ mẫu gan tụy của tôm sú

Để phân nhóm các proteaza trong tôm sú, lựa chọn gan tụy tôm để làm mẫu đánh giá nhóm các proteaza có trong tôm.

Lấy 1g mẫu gan tụy tôm bằng giải phẫu và chuyển vào cối sứ và nghiền trong 3 mL đệm chiết bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM. Tiếp đó ly tâm mẫu ở 4°C trong 30 phút ở tốc độ 12.000 vòng/phút, thu dịch nổi, đo nồng độ protein rồi đưa nồng độ protein trong khoảng 1-1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Hút lần lượt 30 μL mẫu protein tổng số và ủ độc lập với 10 μL mỗi chất sau: DMSO 100% làm đối chứng dương, 10 và 50mM PMSF, 50 và 100mM TPCK, 50mM và 100mM TLCK, 5 và 25mM leupeptin, 5 và 25mM E64, 5 và 25mM pepstatin và 50 và 125mM EDTA, mẫu protein tổng số được sử dụng làm mẫu đối chứng âm. Mỗi mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C thu được nhóm mẫu phân tích.

Tiến hành phối trộn 40 μL hỗn hợp mẫu trên với 10 μL đệm mẫu SB bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glycerol và 0,01% xanh bromophenol thu 50 μL mẫu protein tổng số.

Mỗi bản gel điện di polyacrylamit hai lớp được chuẩn bị theo quy trình chuẩn. Lớp gel tách bao gồm chứa 1500 μL polyacrylamit 30%, 937,5 μL Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 937,5 μL nước, 30 μL amoni persulfat, 7 μL tetrametyletyldiamin. Lớp gel cô chứa 162,4 μL polyacrylamit 30%, 312,4 μL Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 762,5 μL nước, 20 μL APS, 5 μL tetrametyletyldiamin.

Hút 20 μL từng mẫu phân tích bổ sung vào mỗi giếng điện di và tiến hành điện di ở 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong 1 giờ đến khi băng xanh chạm đáy bản điện di.

Tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM. Tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trên máy lắc tốc độ 5 vòng/phút, sau khi rửa sạch đệm, bổ sung vào đệm A và tiếp tục ủ ở 37°C trong 30 phút trong cùng điều kiện lắc.

Bản gel sau khi ủ được nhúng 20mL vào dung dịch đậm tầy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie (khối lượng/thể tích) trong 30 phút. Cuối cùng chuyển sang dung dịch đậm tầy trong 40 phút để hiện các băng trắng.

Kết quả điện di mẫu phân tích được thể hiện trên Hình 2, trong đó:

A: (1) dịch chiết gan tụy tôm sú; (2) dịch chiết gan tụy tôm sú trong DMSO 20%; (3) dịch chiết ủ với PMSE 1mM, (4) dịch chiết ủ với PMSF 10mM; (5) dịch chiết ủ với TPCK 10mM, (6) dịch chiết ủ với TPCK 20mM, (7) dịch chiết ủ với TLCK 10mM và (8) dịch chiết ủ với TLCK 20mM.

B: (1) dịch chiết ủ với leupeptin 1mM, (2) dịch chiết ủ với leupeptin 5mM, (3) dịch chiết ủ với E64 1mM, (4) dịch chiết ủ với E64 5mM; (5) dịch chiết ủ với pepstatin A 1mM, (6) dịch chiết ủ với pepstatin A 5mM, (7) dịch chiết ủ với EDTA 10mM, (8) dịch chiết ủ với EDTA 25mM, và (9) dịch chiết gan tụy tôm sú.

Kết quả trên Hình 2A cho thấy mẫu (1) đối chứng âm và dịch chiết gan tụy tôm sú ủ với DMSO (2) đối chứng dương có phổ băng tương tự nhau gồm 12 băng proteaza với KLPT từ 11 đến 48kDa. Mẫu gan tụy ủ với PMSF 1 và 10mM (3-4) bị mất 5 băng protein có KLPT tương ứng trong khoảng từ 20 đến 35kDa, các băng protein KLPT khoảng từ 11 đến 18kDa bị mờ đi so với mẫu gan tụy đối chứng (1 và 2). Mẫu gan tụy ủ với TPCK 10 và 20mM (5-6) có 2 băng bị giảm kích thước so với mẫu gan tụy trong DMSO 40% đối chứng (2) là 17 và 18kDa. Mẫu gan tụy ủ với TLCK 10 và 20mM (7-8) bị mất băng protein có KLPT tương ứng 11, 13, 15kDa và làm giảm hoạt tính của các protein có KLPT khoảng 14, 17, 18, 20, 23, 25, 30 và 35kDa so với mẫu gan tụy đối chứng (1). Hình 2B: leupeptin (1-2) đã làm mờ đi một phần hoạt tính của các băng có KLPT khoảng 11-14, 20, 23, 35 và 48 kDa; E64, pepstatin A và EDTA (3-8) chưa thể hiện khả năng ức chế hoặc làm giảm hoạt tính của các proteaza, có phổ băng protein tương tự như các mẫu đối chứng. Qua đó có thể kết luận, trong gan tụy của tôm, thành phần serin proteaza là chủ yếu, bao gồm các proteaza với KLPT tương ứng là 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 23, 25, 30 và 35kDa. Trong đó, các proteaza có KLPT khoảng 11, 13 và 15kDa còn bị ức chế bởi TLCK và có thể là các proteaza giống trypsin. Các băng protein có hoạt tính proteaza có KLPT khoảng 17 và 18kDa đã bị ức chế một phần bởi TPCK nên có thể là các proteaza giống

chymotrypsin. Leupeptin ức chế một phần hoạt tính của các giống trypsin 11, 13 và 14kDa; proteaza giống chymotrypsin 48kDa; ngoài ra còn có vẻ ức chế nhẹ hoạt tính của các serin proteaza có KLPT 20, 23 và 35kDa.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình phân tích proteaza và quy trình phân nhóm proteaza có trong tôm theo giải pháp hữu ích cho phép xác định được nhóm các proteaza có trong tôm, cho phép rút ngắn thời gian phân tích xuống còn khoảng 5 giờ. Quy trình không sử dụng các tác nhân gây biến tính protein như SDS, DTT hoặc β -ME độc hại.

Bằng cách điều chỉnh thành phần điện di và điều kiện phản ứng của proteaza, quy trình theo giải pháp không trải qua bước loại bỏ tác nhân gây biến tính bằng triton X-100 đồng thời giữ được hoạt độ enzym, điều này tăng chất lượng kết quả phân tích; mặt khác tiến hành phản ứng trong đệm hoạt tính tại điều kiện 37°C thích hợp cho proteaza của tôm, giúp rút ngắn thời gian của quy trình. Các quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép đánh giá được proteaza tổng cũng như phân loại một cách hiệu quả các nhóm proteaza trong tôm dựa trên phổ băng điện di, nhờ đó cho phép đánh giá chính xác lượng proteaza tổng số cũng như phân loại được các loại proteaza có trong mẫu phân tích, hỗ trợ tốt cho việc nghiên cứu vai trò của các enzym này ở tôm cũng như có thể đánh giá được chất lượng tôm.

Tài liệu tham khảo

1. Buarque D.S., Castro P.F., Santos F.M.S., Lemos D., Carvalho L. B. Bezerra R.S. (2009). "Digestive peptidases and proteinase in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)", *Aquaculture Research*, **40**: 861–870.
2. Gaur S., Agrahari S., & Wadhwa N. (2010), "Purification of protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 isolated from poultry waste site", *The Open Microbiology Journal*, **4**: 67.
3. Lemos D., Ezquerro J. M., & Garcia-Carreño F. L. (2000), "Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility", *Aquaculture*, **186**: 89-105.
4. Raser K.J., Posner A., & Wang K.K.W. (1995) "Casein zymography: a method to study μ -calpain, m-calpain, and their inhibitory agents." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **319**: 211-216.
5. Senphan T., Benjakul S., & Kishimura H. (2015), "Purification and Characterization of Trypsin from Hepatopancreas of Pacific White Shrimp", *Journal of Food Biochemistry*, **39**: 388-397.
6. Sriket, C., Benjakul S. & Visessanguan W. (2010) "Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**: 52–59

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân tích proteaza có trong tôm (*Penaeus*) bao gồm các bước:

a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit hai lớp bao gồm: lớp gel tách chứa (% theo thể tích) 44% polyacrylamit 30%, 27,5% Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 27,5% nước, 0,8% amoni persulfat, 0,2% tetrametyletylendiamin và lớp gel cô chứa (% theo thể tích) 12,5% polyacrylamit 30%, 25% Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 60,5% nước, 1,5% APS, 0,5% tetrametyletylendiamin;

b) chuẩn bị mẫu protein bằng cách thu nhận, nghiền mẫu tôm trong nitơ lỏng và đồng nhất trong dung dịch đệm chiết (đệm A) bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM theo tỷ lệ mẫu tôm:đệm A là 1:3 (trọng lượng/thể tích) rồi ly tâm ở 4°C trong 30 phút thu dịch nổi, phần dịch nổi này được chuẩn độ protein đến khoảng từ 1 đến 1,5µg/µL, thu được mẫu protein;

c) điện di mẫu bằng cách phối trộn mẫu protein với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glyxerol và 0,01% xanh bromophenol theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích), sau đó nạp từ 5 đến 20µL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit và tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ;

d) ổn định bản gel với cơ chất bằng cách tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM, tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ để proteaza phân cắt casein, sau đó rửa và ủ lại bằng đệm A ở 37°C trong 30 phút trong điều kiện lắc nhẹ để ổn định bản gel; và

e) nhuộm và tẩy màu bản gel bằng cách ngâm bản gel trong dung dịch đệm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 (theo thể tích) bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie (khối lượng/thể tích) trong 30 phút, sau đó chuyển sang dung dịch đệm tẩy trong khoảng từ 30 đến 60 phút để rửa thuốc nhuộm thu bản gel có vị trí proteaza không bắt màu nhuộm.

2. Quy trình phân nhóm proteaza có trong tôm (*Penaeus*) bao gồm các bước:

a) chuẩn bị bản gel điện di polyacrylamit hai lớp bao gồm lớp gel tách chứa (% theo thể tích) 44% polyacrylamit 30%, 27,5% Tris-HCl 1,5M pH=8,8, 27,5% nước, 0,8% amoni persulfat, 0,2% tetrametyletylendiamin và lớp gel cô chứa (% theo thể

tích) 12,5% polyacrylamit 30%, 25% Tris-HCl 0,5M, pH=6,8, 60,5% nước, 1,5% APS, 0,5% tetrametyletylenđiamin;

b) chuẩn bị mẫu protein bằng cách thu nhận, nghiền mẫu tôm trong nitor lỏng và đồng nhất trong dung dịch đệm chiết (đệm A) bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM theo tỷ lệ 1:3 (trọng lượng/thể tích) rồi ly tâm ở 4°C trong 30 phút thu dịch nổi, phần dịch nổi này được chuẩn độ đến khoảng từ 1 đến 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. thu được mẫu protein;

c) chuẩn bị mẫu phân tích bằng cách ủ lần lượt từng phần mẫu protein với từng nhóm chất ức chế proteaza được chọn từ nhóm bao gồm phenylmethylsulfonyl florua (PMSF), tosyl phenylalanin clometyl keton (TPCK), tosyl lysin clometyl keton (TLCK), leupeptin, E64, pepstatin và EDTA với nồng độ từ 2 đến 25mM trong 30 phút ở 4°C thu được nhóm mẫu phân tích;

d) điện di mẫu bằng cách phối trộn mẫu protein, mẫu phân tích lần lượt với đệm mẫu (đệm SB) bao gồm Tris-HCl 312,5mM, pH=6,8 chứa 50% glycerol và 0,01% xanh bromophenol (khối lượng/thể tích) theo tỷ lệ mẫu protein:đệm SB là 4:1 (thể tích/thể tích), sau đó nạp từ 5 đến 20 μL mẫu đã trộn đệm SB này vào giếng điện di trên gel điện di polyacrylamit và tiến hành điện di ở điều kiện 4°C trong đệm Tris 25mM, pH=8,3 điều chỉnh bằng glyxin 192mM trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ;

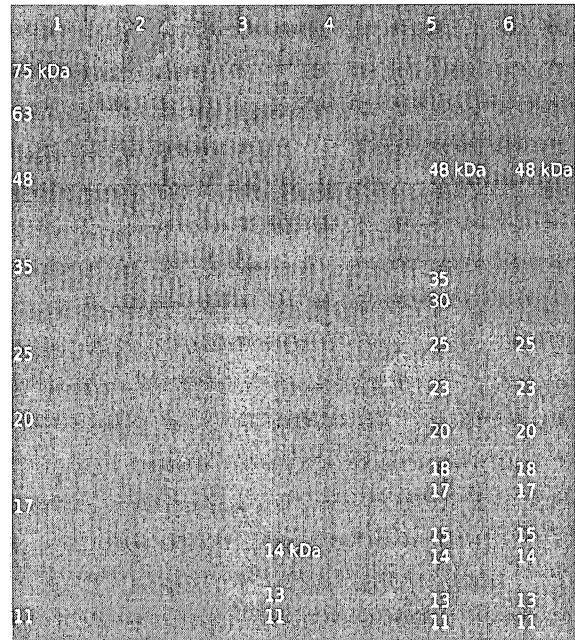
e) ổn định bản gel với cơ chất bằng cách tráng rửa bản gel trong đệm A bao gồm Tris-HCl 50mM, pH=8 bổ sung NaCl 50mM và CaCl_2 5mM, tiếp đó ủ bản gel trong 1 giờ trong đệm A bổ sung 5% casein (khối lượng/thể tích) ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ để proteaza phân cắt casein, sau đó rửa và ủ lại bằng đệm A ở 37°C trong 30 phút trong điều kiện lắc nhẹ để ổn định bản gel;

f) nhuộm và tẩy màu bản gel bằng cách ngâm bản gel trong dung dịch đệm tẩy gồm metanol:axit axetic:nước theo tỷ lệ 3:1:6 (theo thể tích) bổ sung 0,5% thuốc nhuộm xanh Comassie (khối lượng/thể tích) trong 30 phút, sau đó chuyển sang dung dịch đệm tẩy trong khoảng từ 30 đến 60 phút để rửa thuốc nhuộm thu bản gel có vị trí proteaza không bắt màu nhuộm; và

g) xác định các nhóm proteaza trong tôm bằng cách so sánh các băng từ nhóm mẫu phân tích với mẫu protein để xác định sự có mặt của các nhóm proteaza thuộc serin, chymotrypsin, trypsin, cystein, aspartyl và metallo proteaza tương ứng.

1/1

HÌNH 1



HÌNH 2

