

THU NHẬN PROTEIN Lz-8 TỪ DỊCH HUYỀN PHỤ TẾ BÀO NẤM LINH CHI BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ CỘT GPC VÀ SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Bá Tư⁽¹⁾, Nguyễn Thanh Thuận⁽¹⁾,

Nguyễn Anh Dũng⁽¹⁾, Tăng Công Trường⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (2) Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Dương

TÓM TẮT

Trong bài báo này chúng tôi công bố các kết quả từ việc sử dụng hệ thống sắc ký GPC và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC nhằm làm tăng hiệu quả thu nhận Lz-8 tự nhiên (Lz-8 là một protein trong họ protein điều chỉnh miễn dịch (fungal immunomodulatory protein -FIP)). Kết quả chỉ ra rằng, qua phân tích Deconvolution từ HPLC cho thấy có một mass với giá trị: 12420 ± 0.005 Da. Lz-8 khá giàu Asparagine (chiếm 18.37%), tiếp theo là Valin (9.79%) và Threonine (8.24%). Đồng thời, kết quả cũng chỉ ra Lz-8 tinh sạch từ phân đoạn IGPC thiếu vắng sự có mặt của một số amino acid như Half-Cystein, Methionine. Lz-8 thu nhận được có phản ứng gây tan cục máu đông của cả bốn nhóm máu người, nhưng không làm tan đối với máu cừu, điều này chứng tỏ hoạt tính của loại protein này. Sử dụng phương pháp HPLC chúng tôi thấy hiệu quả ly trích Lz-8 đạt được là 30%, cao hơn phương pháp trước đây của Kino và cộng sự (cs) (1989) sử dụng hệ thống sắc ký lọc gel Sephadex G75 với hiệu quả thu được rất thấp, chỉ khoảng 5-10 mg Lz-8 từ 340 gram thể qua.

Từ khóa: linh chi, thu nhận, sắc ký GPC, sắc ký HPLC, amino acid

*

1. Giới thiệu

Họ nấm Linh chi (Ganodermataceae) hiện biết có hơn 200 loài với nhiều loài quý hiếm như Linh chi chuẩn (Ganoderma lucidum (Fr.) Karst) đã được sử dụng trong lĩnh vực y dược ở Phương Đông hơn 2000 năm nay (Stamets, 1993) nhằm điều trị nhiều loại bệnh khác nhau ở người như bệnh viêm gan mãn tính, cao huyết áp, cholesterol hoá mạch máu, tiểu đường, tắc nghẽn động mạch vành, hen suyễn, viêm loét dạ dày.... (Hobbs, 1995).

Hiện nay, việc nuôi trồng nấm linh chi để thu nhận sinh khối và chiết xuất các sản phẩm thứ cấp đang là một hướng nghiên

cứu mũi nhọn trong lĩnh vực y - sinh học, tập trung tác động vào hệ miễn dịch cơ thể chống lại các bệnh nội sinh cũng như các kháng nguyên ngoại lai bất lợi [1],[2],[3].

Về thành phần hoá học và các hoạt chất, hiện nay đã xác định được trong nấm Linh chi có khoảng 119 loại triterpens và nhiều loại polysaccharide có giá trị như 1,3 - D glucan đang được xem là yếu tố mới có tác dụng chống ung thư. Các nghiên cứu của Kremer và cs (1999), Zhang và cs (2001), Tang và cs (2006), Qin và cs (2008)... cho thấy các hoạt chất triterpens, polysacchrides, và protein có nguồn gốc từ thể quả nấm Linh chi đều có mối tương

quan dương tính với các đáp ứng miễn dịch cơ thể. Chẳng hạn, Tang và cs (2006) đã chứng minh acid ganoderic T (AG-T) (một loại lanostane triterpenoid) ở loài Linh chi chuẩn với hàm lượng 50 µg/ ml đã có thể gây ức chế dòng tế bào ung thư phổi 95 D thông qua cơ chế apoptosis và gây nên sự nghỉ hoá chu kỳ tế bào chỉ sau 4-8 h, trong nghiên cứu này tác giả còn công bố AG-T có khả năng điều chỉnh mức biểu hiện của p53 và Bax (hai protein quan trọng tham gia kiểm soát các điểm giới hạn trong chu kỳ tế bào); hay Habijanac và cs (2001) đã chứng minh hiệu quả điều chỉnh miễn dịch của polysaccharide cũng từ Linh chi đỏ lên khả năng tăng sinh một số dòng cytokine (TNF- và INF-γ).

Ngoài ra, họ protein điều chỉnh miễn dịch FIPs (fungal immunomodulatory protein) đang được giới khoa học hết sức chú ý trong việc nghiên cứu sử dụng điều trị các bệnh hiểm nghèo. FIP được phát hiện lần đầu tiên năm 1989 ở loài Linh chi chuẩn (Kino và cs, 1989) với tên gọi Lz-8 (FIP-glu) và cũng là FIP được nghiên cứu kỹ nhất với vai trò như một loại protein chống dị ứng phổ rộng và điều hoà miễn dịch, Qin và cs (2008) đã chứng minh với hàm lượng 5 µg/ ml protein Lz-8 đã có thể làm tế bào lách chuột tăng sinh tới 149% còn với hàm lượng 10 µg/ ml thì protein này đã chống được phản ứng ngưng kết máu ở người. Cho tới nay, FIP đã được tìm thấy ở nhiều loài nấm khác nhau từ nấm dược liệu như linh chi đến nấm ăn như kim châm, nấm rơm với cùng một phương pháp cô điển như đã phát hiện ra Lz-8.

Sau khi các protein FIP được phát hiện tồn tại tự nhiên trong các loài nấm, cho tới nay, các gen mã hoá đã được xác định và chuyển vào các thể mang bao gồm cả prokaryote và eukaryote theo hướng DNA tái tổ hợp (reDNA) nhằm nâng cao hiệu

suất tổng hợp các protein FIP tái tổ hợp (reFIP). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy không những hiệu suất thu nhận còn khá thấp mà hoạt tính các reFIP cũng kém xa các FIP tự nhiên (Ko và cs, 1997; Lin và cs, 1997; Jinn và cs, 2006; Li và cs, 2010). Chính vì vậy, trong bối cảnh chưa tìm được một hệ thống hoàn hảo các sinh vật chuyển gen thì việc tìm môi trường thích hợp cho nuôi cấy huyền phù thu nhận các FIP tự nhiên vẫn là một hướng quan trọng trong nghiên cứu được học.

Sắc ký cột GPC kết hợp với hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC đã trở thành một quy trình tối ưu cho việc tách chiết nhiều hợp chất thiên nhiên như polysaccharide hay protein. Lz-8 với bản chất là một lectin (dạng glyco-protein) được xem là khá phù hợp với hệ thống sắc ký này. Sau khi thu nhận hệ sợi từ kết quả nuôi cấy huyền phù, chúng tôi tiến hành ly trích protein đích. Sau đây là một số kết quả đạt được.

2. Vật liệu và phương pháp

– Chủng Linh chi đỏ (*G. Lucidum*) được cung cấp bởi công ty TNHH nấm dược liệu Phú Trường An (huyện Long Thành, tỉnh Đồng Nai).

– Hệ sợi được thu nhận từ dịch lỏng, nghiền nhỏ và rửa nhiều lần với PBS 10mM sau đó đem ly tâm 10.000 v/phút trong khoảng 10 phút.

– Thu dung dịch và đông cô trong điều kiện lạnh thẳng hoa làm giàu protein

– Thu phân đoạn có khối lượng 11-15KD bằng sắc ký cột GPC.

• Cột Ultrahydrogel 500, kích thước 7.8 X 300mm (đường kính 7.8mm, dài 300mm), kích thước hạt 10 µm.

• Pha động: dung dịch Tris-HCl 10 mM pH 8

• Tốc độ dòng 1mL/phút.

- Đầu dò RID (Refractive Index Detector).
- Quy trình: mẫu sau khi đông cô được thêm dung dịch Tris-HCl 10mM pH 8 và lắc, ly tâm và hút lấy phần nước tiêm vào hệ GPC.

Xác định hoạt tính LZ-8 bằng phương pháp gây đông máu trên máu người và máu cừu 5 ml máu mỗi loại đem rửa với PBS 5 lần ly tâm 5000 v/phút trong 10 phút loại bỏ huyết tương, đem thử hoạt tính với 25 μ l protein (phân đoạn I GPC) trong 25 μ l gelatin 0,2%. Ủ qua đêm (12 giờ) và xem kết quả.

– Xác định khối lượng protein bằng phương pháp HPLC-MS

– Cột KommerciL C4, kích thước hạt 5 μ m, kích thước 2.1X150mm. Pha động: Pha A: Tris HCl 0.01%; Pha B: acetonitrin

– Thành phần amino acid.

Quy trình phân tích:

Thông số kỹ thuật

• Cột ZORBAX Extend C18, kích thước hạt 5 μ m, kích thước 4.6 X 250mm

• Pha động: pha A: 90% dung dịch đệm pH 2.8 + 5% Acetonitril + 5% Isopropanol, pha B: 20% dung dịch đệm pH 1.8+ 40% Acetonitril +40% Isopropanol.

• Đầu dò UV bước sóng 250 nm.

• Tốc độ dòng 1mL/phút.

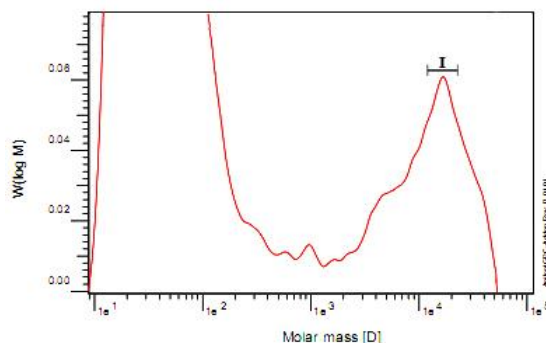
– Tiến trình: mẫu sau khi thủy phân protein thành các amino acid và tạo dẫn xuất được hòa tan lại bằng pha A và tiêm vào hệ thống. Xác định thành phần amino acid dựa trên phương pháp đường chuẩn (kit amino acid)

3. Kết quả và bàn luận

Sau khi thu được hệ sợi với sinh khối cao nhất tại pH 5.0 và 30⁰C (Nguyễn Bá Tư và cs, 2013) từ quá trình nuôi cấy huyền phù, chúng tôi tiến hành xác định sự có mặt

của protein Lz-8 bằng các phương pháp sắc ký GPC và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng đầu dò UV và MS.

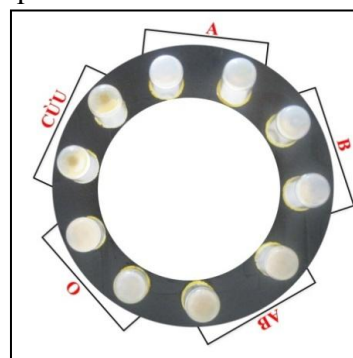
3.1. Tinh sạch Lz-8



Hình 1: Sắc ký cột GPC thu nhận protein Lz8

Kết quả cho chạy GPC phát hiện một peak có khối lượng trong khoảng 11.000 Da -15.000 Da phù hợp với khối lượng chung của các protein FIP đã biết. Phân đoạn sau khi thu nhận được đem thử hoạt tính hemagglutination trên máu người (A, B, AB, O) và máu cừu để khẳng định protein đích đã thu được. Kết quả được trình bày trong hình 1 & 2.

Quy trình: 5 ml máu mỗi loại đem rửa với PBS 5 lần ly tâm 5000v/phút trong 10 phút loại bỏ huyết thanh, đem thử hoạt tính với 25 μ l protein (phân đoạn I GPC) trong 25 μ l gelatin 0,2%. Ủ qua đêm (12 giờ) và xem kết quả.

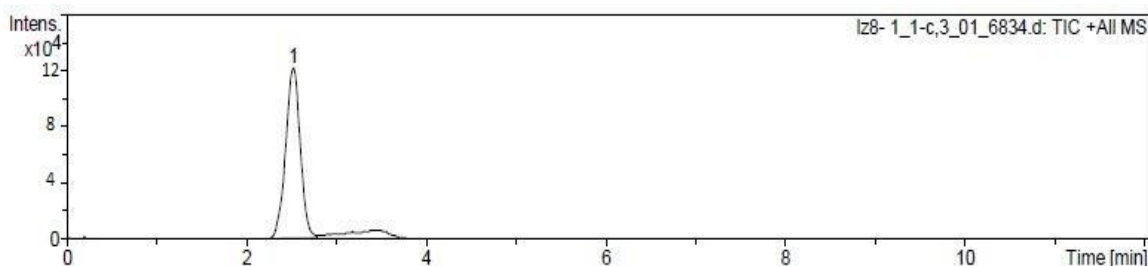


Hình 2: Kết quả thử hoạt tính Hemagglutination phân đoạn I GPC

Kết quả thử phản ứng gây tan cục máu đông cho thấy phân đoạn I GPC đã có phản ứng dương tính làm tan tất cả các cục máu đông với cả bốn nhóm máu người (A, B, AB, O) trong khi âm tính với máu cừu. Kết quả này chỉ ra đây chính là protein đích cần thu nhận Lz-8.

3.2. Khối lượng protein

Sau khi xác định chính xác phân đoạn I GPC nhạy cảm với phản ứng hemagglutination, chúng tôi tiến hành xác định trọng lượng phân tử protein đích bằng HPLC-MS. Kết quả được chỉ ra trong hình 3.



Hình 3. Kết quả phổ đồ MS của Lz-8 trong giai đoạn tách GPC phân đoạn 1

Ghi chú: Đường TIC

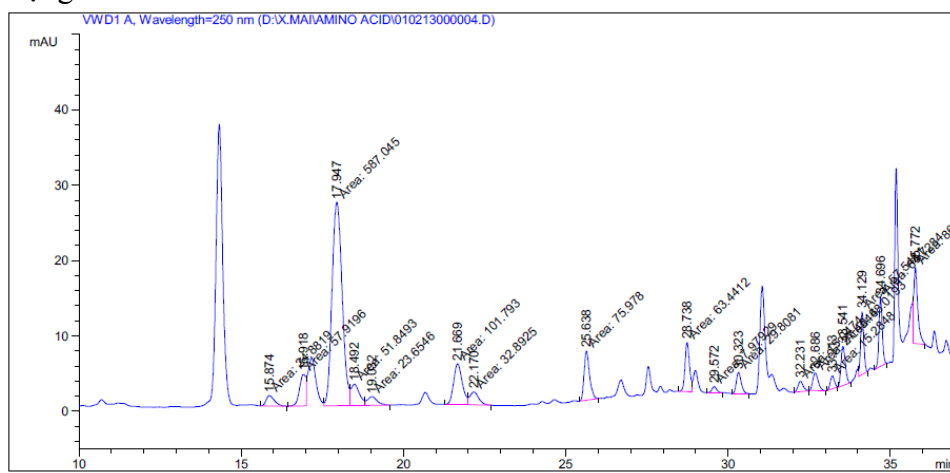
Kết quả Deconvolution cho thấy có một mass với giá trị: 12420 ± 0.005 Da. Kết quả cũng cho thấy mass của phân đoạn thu được từ HPLC MS phù hợp với khoảng mass thu được từ GPC (khoảng 11.000 Da -15.000 Da) và cũng phù hợp về khối lượng chính xác của protein Lz-8 theo các nghiên cứu của Kino và cs (1989); Ko và cs (1997) nhưng hơi khác so với khối lượng của reLz-8 của Liang và cs (2009) với khối lượng 14.000 Da bằng SDS-PAGE và 12.722 bằng kỹ thuật MALDI-TOF-MS, hay trong nghiên cứu của Xue và cs (2008) lại cho thấy reLz8 có khối lượng 17.000 Da...

Từ các kết quả trên cho thấy khối lượng thực tế của protein Lz-8 có sự dao động tùy theo phương pháp tinh sạch và loại tự nhiên hay hoang dại. Tuy nhiên, yếu tố quyết định khẳng định chính xác có phải protein này hay không chính là thành phần, trình tự các amino acid và hoạt tính sinh học.

3.3. Thành phần amino acid

Xác định thành phần amino acid dựa trên phương pháp đường chuẩn (kit amino acid)

Kết quả thu được ở hình 4 và bảng 1.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu protein được tách từ phân đoạn 1 của GPC

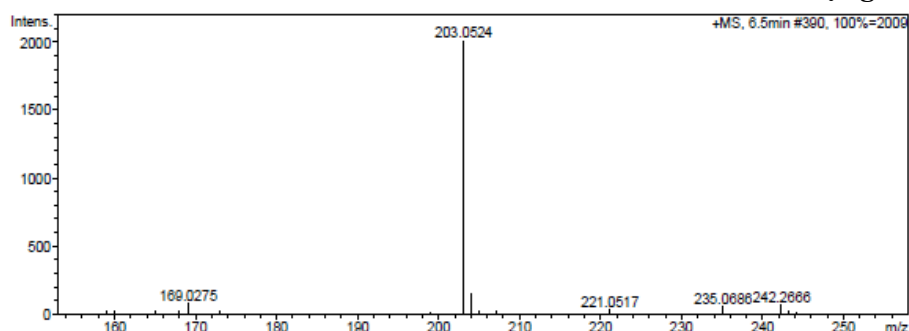
Bảng 1. Thành phần amino acid từ phân đoạn I GPC bằng phương pháp HPLC-UV

Amino acid	% (W/W)	Amino acid	% (W/W)
Asparagine	18,37± 0.15	Valine	9.79 ±0.01
Threonine	8.24 ± 0.15	Methionine	0.00 ±0.00
Glycine	7.61 ± 0.10	Arginine	3.40 ±0.01
Serine	5.78 ± 0.18	Trptophan	2.64 ±0.07
Glutamic	5.43 ± 0.32	Tyrosine	5.23 ±1.01
Alanine	6.77 ±0.15	Phenylalanine	6.00 ±0.08
Half-Cystein	0.00 ±0.00	Lysine	5.24 ±0.03
Isoleucine	5.31 ± 0.01	Histidine	0.00 ±0.00
Leucine	5.56 ±0.01	Proline	4.58±0.33

Từ các kết quả phân tích cho thấy Lz-8 khá giàu Asparagine (chiếm 18,37%), tiếp theo là Valin (9.79%) và Threonine (8,24%). Đồng thời, kết quả cũng chỉ ra Lz-8 tinh sạch từ phân đoạn I GPC thiếu vắng sự có mặt của một số amino acid như Half-Cystein; Methionine (trên thực tế thì amino acid này vẫn tồn tại ở cấu trúc sơ cấp, nhưng khi hình

thành cấu trúc cấp hai thì amino acid đầu tiên là Serine sẽ bị acetyl hoá nên không thể liên kết với Methionine làm tách amino acid này ra); và thậm chí còn vắng mặt cả Histidine. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố của Kino và cs (1989), Tanaka và cs (1989), Ko và cs (1995).

3.4. Hàm lượng đường tổng số



Hình 5. Kết quả phổ MS xác định hàm lượng đường của phân đoạn I từ GPC

Kết quả từ phân tích HPLC-MS thu được hàm lượng đường tổng số chiếm 12.46%. Từ kết quả này cho thấy hàm lượng đường khá cao trong nấm linh chi, mặt khác bản chất Lz-8 là một lectin (glyco protein), điều này góp phần giải thích tại sao việc xác định chính xác khối lượng Lz-8 gặp nhiều khó khăn. Trên thực tế đã có nhiều công bố không thống nhất về sinh khối Lz-8 (Kino và cs, 1989; Xue và cs, 2008; Li và cs, 2011).

3.5. Hiệu quả thu nhận protein Lz-8

Theo nhiều nghiên cứu (Kino và cs, 1989; Ko và cs, 1995; Hsu và cs, 1997; ...) cho thấy hiệu quả ly trích các protein tự nhiên thuộc họ FIPs phụ thuộc chủ yếu hai

vấn đề: (1) nguồn vật liệu nấm là thể quả hay hệ sợi, do vách tế bào nấm được phủ bởi lớp kitin khá dày nên việc phá tế bào sẽ gặp nhiều khó khăn thậm chí làm biến tính protein đích dẫn đến hiệu quả ly trích không cao; (2) phương pháp ly trích protein FIP. Trên thực tế đã có nhiều phương pháp được áp dụng như sắc ký cột nhồi Sephadex 75, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lỏng cao áp với đầu dò UV hoặc MS...

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp với đầu dò MS và UV từ phân đoạn GPC. So với các tác giả khác thì phương pháp này hiệu quả hơn (kết quả được trình bày trong bảng 2).

Bảng 2. Hiệu quả thu nhận protein FIP từ các phương pháp khác nhau

Loại FIP	Nguồn gốc	Nguồn vật liệu	Khối lượng mẫu (gram)	Lượng protein thu nhận (mg)	Hiệu quả thu nhận (%)	Phương pháp	Tác giả/năm
FIP- glu	<i>Ganoderma lucidum</i>	Hệ sợi	340	10	13	Sephadex G-75 Sắc ký trao đổi ion	Kino và cs 1989
FIP-fve	<i>Flammulina velutipes</i>	Thế quả	400	35	25	Sắc ký trao đổi ion	Ko và cs, 1995
FIP-vvo	<i>Volvariella volvacea</i>	Thế quả	3000	115	32	Sắc ký trao đổi ion	Hsu và cs, 1997
FIP- glu	<i>Ganoderma lucidum</i>	Hệ sợi	500	39	30	Sắc ký lỏng HPLC	2012

Kết quả bảng 2 cho thấy, trên thực tế các phương pháp ly trích protein FIP tự nhiên từ các chủng nấm vẫn chưa hoàn thiện, biểu hiện là hiệu quả ly trích vẫn còn thấp mặc dù chúng ta đều biết rằng, hoạt tính của protein tự nhiên luôn cao hơn nhiều so với protein thu được từ các mô hình tái tổ hợp.

Trong kết quả này, bằng việc sử dụng phương pháp HPLC đã góp phần cải thiện hiệu suất ly trích từ 13% (Kino và cs, 1990) lên 30%, nhưng nhìn chung so với các phương pháp gần đây sử dụng sắc ký trao đổi in trên các loại FIP khác thì vẫn chưa cao hơn (FIP-vvo là 32%; FIP-fve là 25%) một cách đáng kể. Điều này có lẽ còn phụ thuộc nhiều yếu tố, chẳng hạn chủng nấm, cách phá tế bào, hay quy trình thiết lập hệ thống HPLC

với các pha động khác nhau. Như vậy, để nâng cao hiệu quả từ HPLC thì cần thay đổi pha động và thậm chí cả cột sắc ký trong hệ GPC trước khi đưa vào HPLC.

4. Kết luận

Trong kết quả này, lần đầu tiên đối với Lz-8, hai hệ sắc ký GPC và HPLC đã được kết hợp và thu nhận thành công với hiệu quả tăng từ 13% (Kino và cs, 1989) lên 30%. Từ kết quả phân tích trọng lượng, thành phần amino acid của Lz-8 cho thấy protein này có trọng lượng 12420 Da với cho thấy sự giàu Asparagine (chiếm 18,37%), tiếp theo là Valin (9.79%) và Threonine (8,24%). Đồng thời, kết quả cũng chỉ ra Lz-8 tinh sạch từ phân đoạn 1GPC thiếu vắng sự có mặt của một số amino acid như Half-Cystein; Methionine.

RECEIVING PROTEIN LZ-8 FROM SUSPENSOID FLUID CELLS OF REISHI MUSHROOM (GANODERMA LUCIDUM) BY THE TWO TECHNIQUES OF GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY GPC AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Ba Tu⁽¹⁾, Nguyen Thanh Thuan⁽¹⁾, Nguyen Anh Dung⁽¹⁾, Tang Cong Truong⁽²⁾

(1) Thu Dau Mot University, (2) The Department of Science and Technology of Binh Duong province

ABSTRACT

In this paper, we are publishing the results from the application of the gel permeation chromatography GPC and high-performance liquid chromatography HPLC to increase receiving efficiency of natural Lz-8 (Lz-8 is a protein in the immune regulatory protein family (fungal immunomodulatory protein FIP-)). Through deconvolution analysis from HPLC, the results indicated a mass with value of 12420 ± 0.005 Da. Lz-8 is quite rich of Asparagine (accounted for 18.37%), followed by Valin (9.79%) and Threonine (8.24%). At the same time,

the results also indicated that Lz-8 purified from 1GPC segments is lack of the presence of certain amino acids such as Half-Cysteine; Methionine. The acquired Lz-8 had reactions which caused blood clot-dissolving in the four types of human blood, but did not dissolve clots on sheep blood. It showed the activity of this type of protein. Using the HPLC method, we found that the achieved efficiency of extracted Lz-8 was 30%, higher than the method of Kino et al (cs) (1989) which used the Sephadex G75 gel filtration chromatography system with very low performance, only about 5-10 mg of Lz-8 from 340 gram of ascomata.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hsu HC, Hsu CI, Lin RH, Kao CL, Lin JY (1997), *Fip-vvo, a New Fungal Immunomodulatory Protein Isolated from Volvariella volvacea*, J. Biol. Chem., 323: 557-565.
- [2] JINN et al, *Functional Expression of FIP-gts, a Fungal Immunomodulatory Protein from Ganoderma Tsugae in Sf21 Insect Cells*, 2006, Biology chemistry.
- [3] Liang, et al. (2009), *Ganoderma lucidum immunomodulatory protein (Lz-8) expressed in Pichia pastoris and the identification of immunocompetence*, Department of Cytobiology, Institute of Frontier Medical Science, Jilin University, Changchun, China.
- [4] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, KerKry O, Shimizu K, Tsunoo H (1989), *Isolated and characterization of a new immunomodulatory protein ling zhi-8 (LZ-8), from Ganoderma lucidum*, J. Biol. Chem., 264: 472-478.
- [5] Ko et al (1995), *A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, Flammulina velutipes and its complete amino acid sequence*, Eur. J. Biochem. 228, 244-249.
- [6] Lin WH, Hung CH, Hsu CI, Lin JY (1997), *Dimerization of the N-terminal Amphipathic α -Helix Domain of the Fungal Immunomodulatory Protein from Ganoderma tsugae (Fip-gts) Defined by a Yeast Two-hybrid System and Site-directed Mutagenesis*, J. Biol. Chem., 272: 20044-20048.
- [7] Li QZ, Zheng SB, Wang XF, Bao TW, Zhou XW (2011), *Preparation of rabbit anti-Ganoderma sinensis immunomodulatory protein polyclonal antibody*, African Journal of Microbiology Research., 5(12):1562-1564.
- [8] Li QZ, Wang XF, Chen YY, Lin J, Zhou XW (2010a), *Cytokines expression induced by Ganoderma sinensis fungal immunomodulatory proteins (FIP-gsi) in mouse spleen cells*, Appl. Biochem. Biotech., 162: 1403-1413
- [9] Li et al. 2011, *Recent status and prospects of the fungal immunomodulatory protein family*. Critical Reviews in Biotechnology, 2011; 31(4): 365–375
- [10] Liang CY, Zhang SQ, Liu ZY, Sun F (2009), *Ganoderma lucidum immunomodulatory protein(Lz-8) expressed in Pichia pastoris and the identification of immunocompetence*, C. J. Biotech. 25(3): 441-7.
- [11] Naszeen Z. et al., 2005, *Study of different growth parameters in Ganoderma lucidum*, Biotechnology and food research Center, PCSIR labs, USA.
- [12] Qin et al., 2008, *Functional expression of LZ-8, a fungal immunomodulatory protein from Ganoderma lucidum in Pichia pastoris*, J. Gen. Appl. Microbiol., (54).