

Ứng dụng phương pháp SDS-PAGE trong nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng SDS đến khả năng chiết protein trong gạo

Nguyễn Thị Đông^{1*}, Trần Trung¹, Vũ Thị Thu Hà², Trần Đình Phong³, Nguyễn Thị Quỳnh Hoa¹

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Hưng Yên

²Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Trường Đại học KH&CN Hà Nội

Ngày nhận bài 8/9/2017; ngày chuyển phản biện 12/9/2017; ngày nhận phản biện 10/10/2017; ngày chấp nhận đăng 1/11/2017

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng natri dodecyl sunfat (SDS) đến khả năng chiết protein trong gạo. Dữ liệu phân tích phổ điện di gel polyacrylamid có mặt natri dodecyl sunfat (SDS-PAGE), phổ UV-Vis và phổ Raman cho thấy, khi thay đổi nồng độ SDS có trong dung môi chiết protein gạo (0,05 M tris, pH8, 5 M urê, 5% 2-ME) thì lượng protein chiết ra từ gạo thay đổi. Khả năng chiết protein ra từ gạo cao nhất trong dung dịch có nồng độ SDS 3%.

Từ khóa: Chiết tách protein, protein gạo, SDS, SDS-PAGE.

Chỉ số phân loại: 1.4

Application of the SDS-PAGE method to study the effect of SDS content on protein extraction in rice

Thi Dong Nguyen^{1*}, Trung Tran¹, Thi Thu Ha Vu²,

Dinh Phong Tran³, Thi Quynh Hoa Nguyen¹

¹Hung Yen University of Technical Education

²Institute of Chemistry, Academy of Science and Technology of Vietnam

³Hanoi University of Science and Technology

Received 8 September 2017; accepted 1 November 2017

Abstract:

This article presents how sodium dodecyl sulfate (SDS) affects the ability to extract proteins in rice. Analysis data of polyacrylamide gel electrophoresis spectrum available sodium sulfate dodecyl (SDS-PAGE), UV-Vis spectrum, and Raman spectrum showed the SDS concentration in the rice protein extraction solution (0.05 M tris, pH8, 5 M urea, 5% 2-ME) affected the ability of rice protein extraction. The ability to extract the highest rice protein content was reached at the SDS concentration of 3%.

Keywords: Protein extraction, rice protein, SDS, SDS-PAGE.

Classification number: 1.4

Đặt vấn đề

Gạo là loại lương thực cung cấp protein chủ yếu cho con người, đặc biệt là ở châu Á [1, 2]. Nhu cầu protein từ gạo được dự báo tăng dần theo sự tăng dân số thế giới [3]. Vì vậy, việc chiết tách nhằm xác định hàm lượng protein trong gạo, giúp tuyển chọn loại gạo có hàm lượng protein cao là quan trọng và cần thiết.

Protein trong gạo được chia làm bốn nhóm dựa trên tính hòa tan của chúng trong các loại dung môi, gồm: Albumin (tan trong nước), globulin (tan trong muối), prolamin (tan trong rượu) và glutelin (tan trong axit loãng hoặc kiềm loãng) [4]. Trong đó glutelin chiếm 80% tổng lượng protein của gạo. Vì vậy, hàm lượng glutelin thay đổi sẽ làm thay đổi lượng protein trong gạo và từ đó gây ảnh hưởng đến chất lượng dinh dưỡng của gạo [5]. Glutelin trong gạo tồn tại ở các dạng: Proglutelin, α -glutelin, β -glutelin, trong đó dạng α -glutelin quyết định chính đến hàm lượng glutelin [6]. Như vậy, xác định được hàm lượng α -glutelin trong gạo sẽ tìm được loại gạo có hàm lượng

*Tác giả liên hệ: Email: nguyendonghy@gmail.com

protein lớn và chất lượng dinh dưỡng cao.

Dung môi chứa sodium dedocyl sunfat (SDS) được sử dụng để chiết các protein trong gạo, dịch chiết thu được được phân tách bằng điện di trên gel polyacrylamide với sodium dedocyl sunfat (SDS-PAGE). Các thành phần của protein được phát hiện bằng cách nhuộm gel sử dụng thuốc nhuộm coomassie blue R-250 thu được các dải: Khoảng 57 kDa là proglutelin, khoảng 40 kDa là α -glutelin, khoảng 20 kDa là β -glutelin, khoảng 13 kDa là prolamin...[5-8]. Nếu diện tích ăn màu của dải α -glutelin lớn thì hàm lượng α -glutelin trong mẫu cao.

Trong chọn tạo giống lúa, kỹ thuật điện di SDS-PAGE đã được các nhà khoa học sử dụng để chọn lọc các dòng, giống có lượng protein cao dựa trên diện tích ăn màu dải α -glutelin trên phổ SDS-PAGE. Tuy nhiên, để so sánh chính xác được lượng α -glutelin trong protein của gạo thì quá trình chiết α -glutelin phải có hiệu quả cao, do đó nghiên cứu này tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng SDS đến khả năng chiết protein trong gạo.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

Nguyên liệu: Gạo giống Q2 (nguồn giống do GS.TSKH Trần Duy Quý chọn tạo) trồng tại Dân Tiến - Khoái Châu - Hưng Yên vụ xuân năm 2015. Đặc điểm: Cứng cây, chịu sâu bệnh tốt, năng suất 6,6 tấn/ha.

Hóa chất: Tris base, acid clohydric, urea, SDS, 2-ME, glycine, CBB-R250, TEMED, acid acetic, methanol, bromphenol blue (Merck); acrylamid, bis acrylamide, BSA (Sigma); protein chuẩn P7703S (M).

Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm:

- Micropipet các loại; pipet 10 ml; ống facol 1,5 ml và ống facol 50 ml.

- Máy lắc, máy ly tâm, máy khuấy từ, nguồn điện di cosort EV2002, bình

điện di gel đứng loại mini do hãng Cole Pamer cung cấp.

- Thiết bị đọc ảnh gel và phần mềm phân tích ảnh gel Multidoc.it 3Dr (hãng UVP - Mỹ).

- Máy đo UV-Vis Jasco V630 (Nhật Bản).

- Máy phân tích phổ Raman (LabRam HR).

Chiết protein trong gạo

Protein trong gạo được chiết bằng cách: Cân chính xác 60 mg mẫu đã nghiền vào ống facol 1,5 ml, thêm 120 μ l dung dịch chiết tách có thành phần tris 0,05 M, pH=8, urê 5 M, 2-ME 5% (thể tích/thể tích) và khảo sát hàm lượng SDS bằng cách thay đổi hàm lượng từ 1,8 đến 4,2% [9]. Để yên mẫu qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó mẫu được khuấy trộn rồi ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ phòng. Lấy dịch chiết đem phân tích bằng SDS-PAGE, UV-Vis và Raman.

Phương pháp SDS-PAGE

Phương pháp SDS-PAGE được tiến hành ở nhiệt độ phòng, sử dụng 12%T acrylamid gel tách và 5%T acrylamid gel cô. Điện di ở điện thế 20 V trong 1 h, rồi tăng thế lên 40 V trong 2 h, sau đó tăng thế đến 60 V cho đến khi prolamin chạm tận cùng gel.

Bình điện di đứng, tấm kính kích thước 11,3x10 cm, chạy cùng một lúc 10 giếng, trong đó: Giếng 1 nhỏ 5 μ l dung dịch BSA hàm lượng 0,28 mg/ml; giếng 10 nhỏ 5 μ l dung dịch protein chuẩn P7703s; giếng 2 đến 9 tương ứng nhỏ 10 μ l mẫu dịch protein chiết được ở trên với hàm lượng SDS thay đổi từ 1,8 đến 4,2% (m/v) theo bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các mẫu trong giếng.

Tên giếng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tên mẫu	BSA	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M
% SDS		1,8	2	2,4	2,8	3	3,4	3,8	4,2	

Nhuộm màu gel và rửa nhuộm:

Gel được nhuộm màu trong dung dịch: acid acetic (10%), methanol (50%), coomassie brilliant blue R-250 (0,3%) trong 1 h. Sau đó, rửa gel đã nhuộm bằng dung dịch chứa methanol (10%) và acid acetic (5,5%) trong 1 h hoặc cho đến khi mất màu nền gel và các dải protein điện di hiện rõ [9].

Phân tích ảnh gel:

Sau khi rửa nhuộm, bản gel điện di SDS-PAGE được tiến hành phân tích ảnh gel, sử dụng phần mềm phân tích ảnh Doc-It LS (P/N 97-0185-02). Căn cứ theo dải protein chuẩn P7703s và hàm lượng BSA chuẩn có thể xác định trọng lượng phân tử và hàm lượng từng dải protein.

Phương pháp UV-Vis và Raman

Dịch chiết protein được pha loãng rồi đem đi phân tích phổ UV-Vis bằng máy Jasco V-630 trong khoảng 350÷700 nm.

Các dịch chiết cũng được pha loãng 3 lần rồi đem phân tích phổ Raman tại bước sóng kích thích 632,81 nm; thời gian đo mẫu 5 s, trong khoảng bước sóng từ 400 đến 2.200 cm^{-1} trên thiết bị LabRam HR.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Kết quả phân tích dịch chiết protein bằng phương pháp SDS-PAGE

Protein của gạo chiết bằng dung môi với hàm lượng SDS khác nhau được phân ly bằng SDS-PAGE sử dụng thuốc nhuộm CBB-R250. Kết

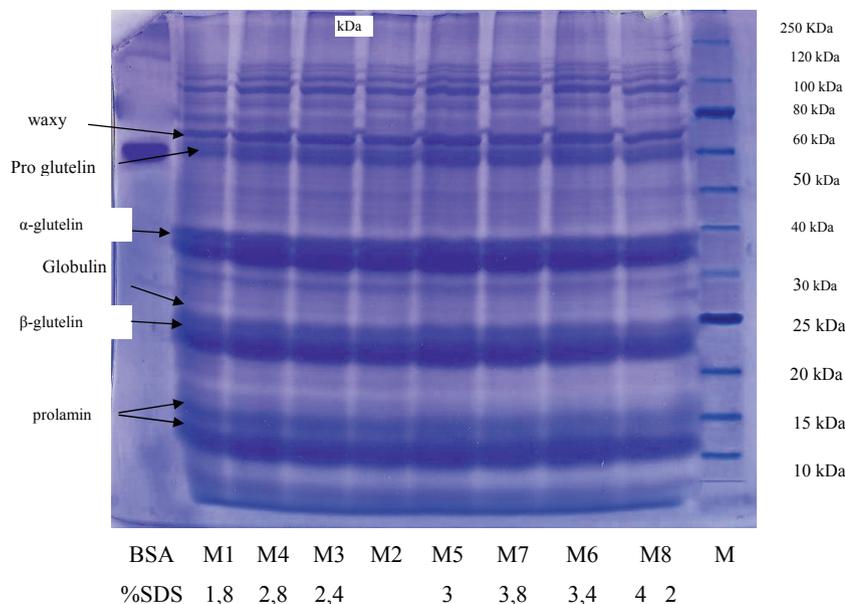
quả thực nghiệm được thể hiện trên hình 1.

Kết quả cho thấy, ở tất cả các mẫu đều thu được cùng số dải protein đặc trưng cho protein gạo nhưng mức độ ăn màu thuốc nhuộm CBB-R250 khác nhau. Điều này có thể được giải thích do SDS là một tác nhân làm biến tính protein và tích điện âm cho các phần tử protein. Anion của SDS kết hợp với phân tử protein bằng dây hữu cơ kỵ nước phá vỡ cấu trúc ba chiều của phân tử protein làm chúng duỗi ra, đồng thời làm cho các phần tử protein tích điện âm bằng vô số điện tích âm của SDS. Vì vậy, khi thay đổi hàm lượng SDS thì khả năng chiết tách protein sẽ khác nhau.

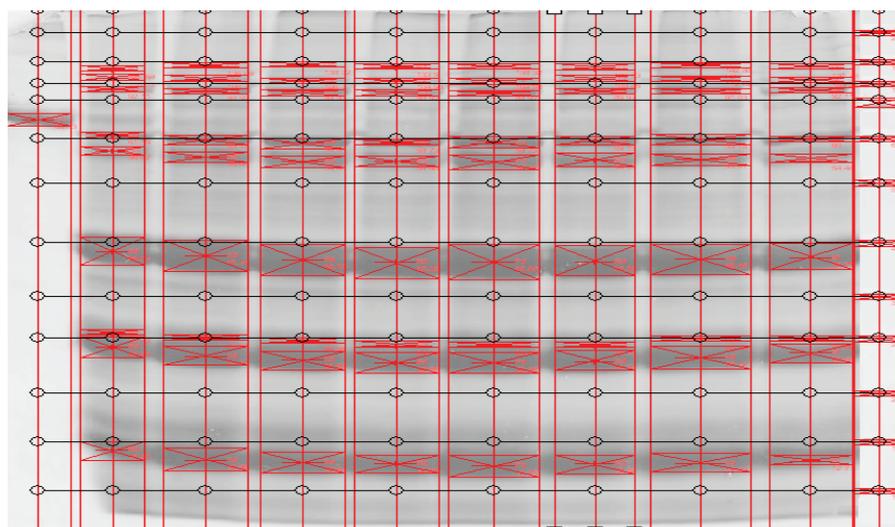
Mẫu cho phổ điện di có dải α -glutelin đậm hơn và diện tích lớn hơn thì hàm lượng protein thu được cao hơn, chứng tỏ khả năng chiết protein của dung dịch chiết cao hơn. Mức độ tách protein quan sát bằng mắt thường cao nhất ở mẫu chiết bằng dịch SDS 3% (dịch chiết M5). Điều này có thể giải thích do tại nồng độ SDS = 3% vừa đủ biến tính protein. Khi hàm lượng SDS > 3%, lượng SDS dư sẽ chiếm một phần thể tích của protein đã biến tính, vì vậy làm giảm hàm lượng protein được hút vào giếng và làm giảm độ ăn màu với thuốc nhuộm.

Để định lượng từng loại protein chính xác hơn, chúng tôi tiến hành phân tích ảnh SDS-PAGE bằng phần mềm phân tích ảnh Doc-It LS. Kết quả được thể hiện trong hình 2.

Kết quả phân tích từ hình 2 cho biết khối lượng phân tử các dải protein và hàm lượng tương ứng được trình bày ở bảng 2 và bảng 3. Kết quả ở bảng 2 cho thấy xuất hiện các dải α -glutelin từ 36,65 kDa đến 38,01 kDa và dải protein waxy 58,73 kDa đến 61,19 kDa [6, 10, 11]. Kết quả bảng 3 thể hiện hàm lượng từng loại protein nội suy từ trọng lượng giếng số 1 với hàm lượng BSA đã biết.



Hình 1. Phổ SDS-PAGE của protein chiết trong các dung môi với hàm lượng SDS khác nhau.



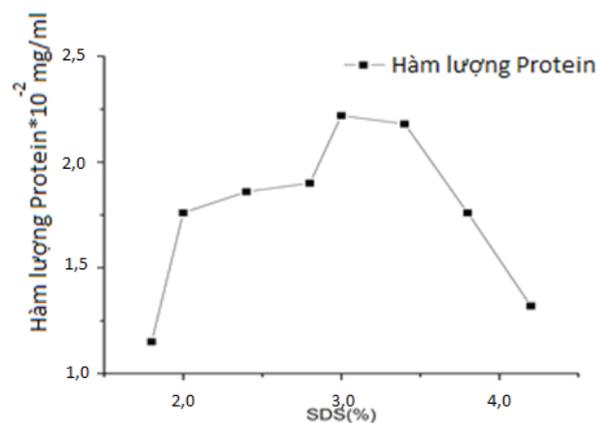
Hình 2. Phân tích phổ SDS-PAGE bằng phần mềm phân tích ảnh Doc-It LS.

Bảng 2. Khối lượng phân tử (kDa) các dải protein.

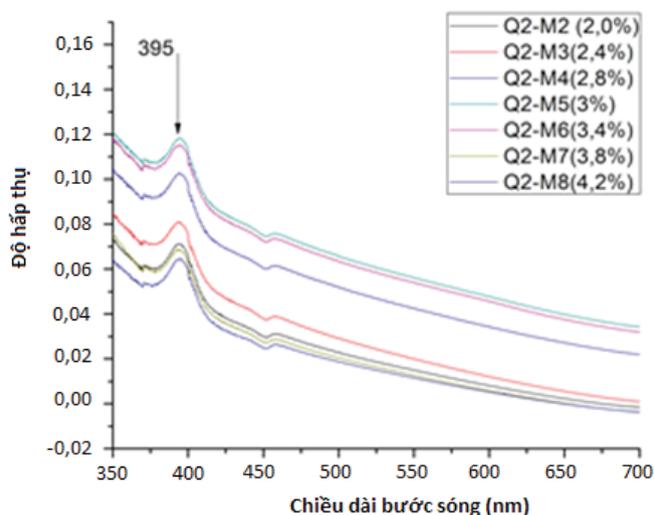
Dải	BSA	M1	M4	M3	M2	M5	M7	M6	M8	M
1	68,83	127,54	136,09	138,32	133,9	138,32	129,63	142,88	131,75	250 kDa
2		110,22	106,7	106,7	104,99	104,99	108,45	112,02	108,45	150 kDa
3		92,11	88,92	89,97	88,92	88,92	89,97	91,03	92,11	100 kDa
4		61,19	59,79	58,94	58,73	58,73	59,15	59,79	60	80 kDa
5		56,87	55,46	54,48	54,48	54,48	54,87	55,07	54,48	60 kDa
6		38,01	37,14	36,79	36,65	36,65	36,65	36,86	37,19	50 kDa
7		25,48	24,91	24,56	24,13	24,13	24,13	24,74	24,82	40 kDa
8		24,04	23,21	22,88	22,56	22,56	22,72	23,13	23,54	30 kDa
9		13,95	12,88	12,61	12,52	12,25	12,52	12,52	12,7	25 kDa
10										20 kDa
11										15 kDa
12										10 kDa

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ SDS đến hàm lượng các dải protein.

Dải	BSA x10 ⁻² (mg/ ml)	M1 x10 ⁻² (mg/ ml)	M4 x10 ⁻² (mg/ ml)	M3 x10 ⁻² (mg/ ml)	M2 x10 ⁻² (mg/ ml)	M5 x10 ⁻² (mg/ ml)	M7 x10 ⁻² (mg/ ml)	M6 x10 ⁻² (mg/ ml)	M8 x10 ⁻² (mg/ ml)	Marker x10 ⁻² (mg/ml)
SDS (m/v)		1,8	2	2,4	2,8	3	3,4	3,8	4,2	
1	0,14	0,03	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05	0,02
2		0,04	0,07	0,06	0,06	0,08	0,07	0,08	0,05	0,02
3		0,05	0,08	0,09	0,08	0,09	0,07	0,09	0,07	0,03
4		0,07	0,15	0,17	0,1	0,2	0,14	0,19	0,08	0,04
5		0,08	0,17	0,17	0,17	0,25	0,19	0,2	0,11	0,02
6		0,35	0,55	0,54	0,54	0,64	0,5	0,61	0,43	0,03
7		0,06	0,09	0,08	0,09	0,1	0,08	0,09	0,07	0,03
8		0,26	0,35	0,34	0,35	0,4	0,34	0,47	0,31	0,02
9		0,21	0,39	0,36	0,32	0,39	0,31	0,39	0,15	0,03
10										0,02
11										0,02
12										0,03
Tổng	0,14	1,15	1,9	1,86	1,76	2,22	1,76	2,18	1,32	0,28



Hình 3. Sự phụ thuộc của hàm lượng protein chiết được vào nồng độ SDS trong dung môi.



Hình 4. Phổ UV-Vis của các dịch chiết protein từ gạo.

Kết quả thu được cho thấy, hàm lượng protein được chiết ra từ các dung dịch giảm dần theo thứ tự M5 > M6 > M4 > M3 > M2 > M7 > M8 > M1 (với dải số 6 tương ứng hàm lượng α -glutelin).

Mối quan hệ hàm lượng protein và nồng độ SDS trong các chiết được thể hiện trên hình 3.

Kết quả cho thấy, khi hàm lượng SDS tăng từ 1-3% thì nồng độ protein tách được cũng tăng và đạt $2,22 \cdot 10^{-2}$ mg/ml tại 3% (m/v - SDS 0,1 M). Khi hàm lượng SDS lớn hơn 3% thì hàm lượng protein tách ra giảm xuống. Như vậy, tại nồng độ SDS 3%, lượng protein được chiết ra đạt cực đại, phù hợp với kết quả được quan sát bằng mắt ở trên. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của Andrew Lee [12], khoảng nồng độ SDS từ 10-100 mM thì tốc độ duỗi gấp nếp với S6 của protein tăng từ 10^2 đến 10^4 s⁻¹.

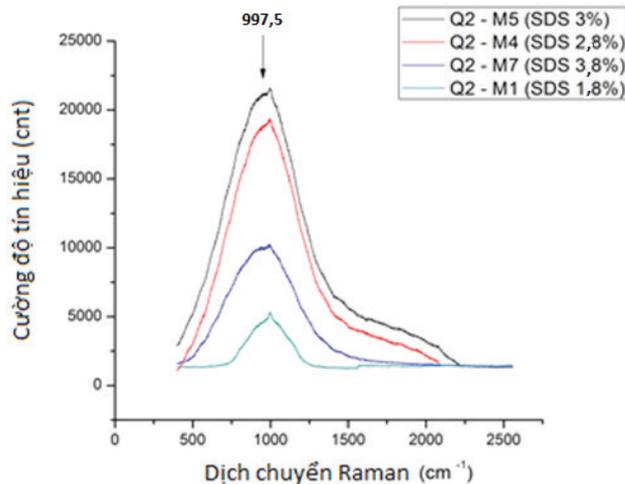
Kết quả phân tích dịch chiết protein bằng phương pháp UV-Vis

Dịch chiết protein được pha loãng 500 lần rồi đem phân tích UV-Vis bằng máy Jasco V-630 trong khoảng 350-700 nm, tốc độ quét 400 nm/phút. Kết quả được thể hiện trên hình 4.

Hình 4 cho thấy, độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 395 nm tăng dần theo thứ tự: M1 < M8 < M7 < M2 < M3 < M4 < M6 < M5, như vậy khi thay đổi hàm lượng SDS thì khả năng biến tính protein cũng thay đổi [13]. Khi hàm lượng SDS tăng từ 1,8 đến 3% thì độ hấp thụ tăng, tức là hàm lượng protein tách được tăng lên và đạt cực đại tại 3%. Khi hàm lượng SDS lớn hơn 3% thì độ hấp thụ giảm xuống, lượng protein tách ra giảm xuống. Như vậy, kết quả này phù hợp với kết quả phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE.

Kết quả phân tích dịch chiết protein bằng phương pháp phổ Raman

Để kiểm chứng chính xác các kết quả phân tích protein trong gạo,



Hình 5. Sự phụ thuộc của hàm lượng protein chiết được vào nồng độ SDS trong dung môi.

các dịch chiết M1, M4, M5 và M7 được pha loãng 3 lần và tiến hành phân tích bằng phương pháp phổ Raman tại 632,8 nm, trong khoảng 400-2.200 cm⁻¹ thời gian chờ mẫu 5 s, kết quả thu được thể hiện trên hình 5.

Kết quả từ hình 5 cho thấy, cực đại tán xạ tại bước sóng 997,5 cm⁻¹ nằm trong vùng tần số đặc trưng cho liên kết peptid (890-1.060 cm⁻¹) [14] và tăng dần đối với dịch chiết theo thứ tự M1 < M7 < M4 < M5, chứng tỏ liên kết peptid thu được cao nhất ở dịch chiết M5. Như vậy, phương pháp phổ Raman cho kết quả tương tự phương pháp SDS-PAGE và UV-Vis ở trên.

Kết luận

Nhóm tác giả đã ứng dụng thành công phương pháp SDS-PAGE để nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng SDS đến khả năng chiết protein trong gạo. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tại hàm lượng SDS đạt 3% trong dung môi chiết protein từ gạo chứa tris 0,05 M, pH = 8, urê 5 M, 2-ME 5% thì khả

năng chiết protein trong gạo cao nhất.

Kết quả phân tích hàm lượng protein trong gạo bằng phương pháp SDS-PAGE có sự tương đồng với kết quả phân tích hàm lượng protein trong gạo bằng phương pháp UV-Vis và phương pháp phổ Raman.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của đề tài “Ứng dụng công nghệ sinh học để chọn tạo giống lúa năng suất cao, chất lượng tốt cho Hưng Yên và Đồng bằng Bắc Bộ”, mã số ĐTĐL.2012-G36.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] B. Duff (1991), “Trends and patterns in Asian rice consumption”, *Marketing and Quality Issues*, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp.1-22.
 [2] L. Fresco (2005), “Rice is life”, *J. Food Compos. Anal.*, **18**, pp.249-253.
 [3] C. Mann (1997), “Reseeding the green revolution”, *Science*, **277**, pp.1038-1043.
 [4] Thomas B. Osborne (1924), “The

Vegetable Proteins”, *Monographs on biochemistry*, Longmans, Green and Co., London.

[5] Nadar Khan, et al. (2010), “Diversity of glutelin alpha subunits in rice varieties from Pakistan”, *Pak. J. Bot.*, **42(3)**, pp.2051-2057.

[6] P.A. Aung, T. Kummaru and H. Satoh (2001), “Genetic variation of glutelin seed storage protein in Myanmar local rice cultivars”, *Rice Genet. Newslett.*, **18**, pp.50-52.

[7] L.Q. Qu, X.L. Wei, H. Satoh, T. Kumamaru, M. Ogawa and F. Takaiwa (2003), “Biochemical and molecular characterization of a rice glutelin allele for the GluA-1 gene”, *Theor. Appl. Genet.*, **107**, pp.20-25.

[8] H.D. Tian, T. Kumamaru, Y. Takemoto, M. Ogawa and H. Satoh (2001), “Gene analysis of new 57H mutant gene, *glup6*, in rice”, *Rice Genet. Newslett.*, **18**, pp.48-50.

[9] S. Galani, et al. (2011), “Seed storage protein polymorphism in ten elite rice (*Oryza sativa* L.) genotypes of Sindh”, *African Journal of Biotechnology*, **10(7)**, pp.1106-1111.

[10] Syed Mehar Ali Shah (2011), “Interspecific variation of total seed protein in wild rice germplasm using SDS-PAGE”, *Pak. J. Bot.*, **43(4)**, pp.2147-2152.

[11] Teerarat Likitwattanasade, Parichat Hongsprabhas (2010), “Effect of storage proteins on pasting properties and microstructure of Thai rice”, *Food Research International*, **43**, pp.1402-1409.

[12] Andrew Lee (2011), “Denaturation of proteins by SDS and Tetraalkylammonium Dodecyl sulfates”, *Langmuir*, **27**, pp.11560-11574.

[13] Patrick Cutler (2009), “Experimental monitoring and data analysis tools for protein folding Study of steady-state evolution and modeling of kinetic transients by multitechnique and multiexperiment data fusion”, *Analytical Chimica Acta*, **632**, pp.52-62.

[14] Yubao Guo (2013), “Infrared and Raman Spectroscopic Characterization of Structural Changes in Albumin, Globulin, Glutelin, and Prolamin during Rice aging”, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, pp.185-192.