

TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ CỦA LECTIN TỪ HẠT ĐẬU VÁN ĐEN (*LABLAB PURPUREUS*)

Trương Văn Châu

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

I. Mở đầu

Đậu ván đen là một trong hai giống trồng trong loài đậu ván (*Lablab purpureus*) đang được trồng rất phổ biến ở miền Bắc nước ta [2]. Hạt và quả của nó là thực phẩm giàu protein và vitamin cho người, lá và thân được sử dụng làm thức ăn cho gia súc. Trong hạt đậu ván đen chúng tôi đã phát hiện thấy có chứa lectin với hoạt độ khá cao, tương đương với đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) [1]. Hiện nay chưa có một công trình nào nghiên cứu quá trình tinh chế lectin từ đậu ván đen và xác định khối lượng phân tử của nó. Bởi vậy chúng tôi đã tiến hành công trình này nhằm cung cấp các dẫn liệu khoa học về lectin đậu ván, bổ xung thêm các dạng lectin từ các loài thuộc họ đậu (*Fabaceae*).

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên liệu: Hạt đậu ván đen đã già được thu nhận từ một số vùng thuộc huyện Mê Linh – Vĩnh Phúc. Hạt được bóc vỏ ngoài, thái mỏng, sấy khô ở 30°C và nghiền thành bột mịn. Lấy 5 gam bột khô để chiết rút và tinh chế lectin.

2. Phương pháp nghiên cứu

a) Chiết rút lectin bằng đệm PBS pH 7,4. Quá trình chiết rút được thực hiện bằng khuấy từ với 5 gam bột khô.

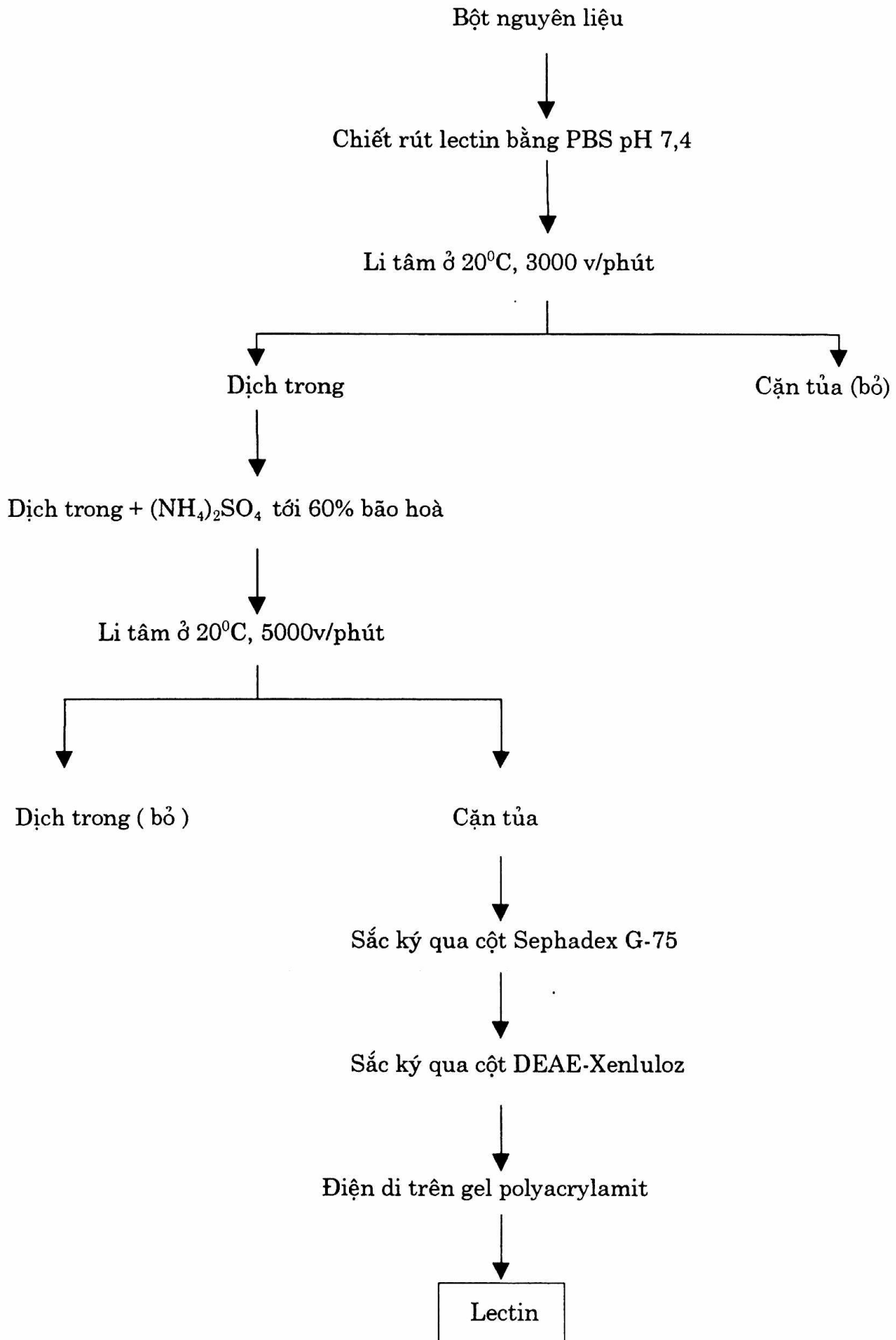
b) Xác định hàm lượng lectin và protein trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp Lowry.

c) Quá trình tinh chế lectin được thực hiện qua 2 giai đoạn sắc ký: Sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion qua cột DEAE-Xenluloz. Độ tinh sạch của lectin được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamit theo Laemmli [5].

d) Khối lượng phân tử của lectin được xác định bằng điện di trên gel polyacrylamit có sử dụng protein chuẩn đã biết trước khối lượng phân tử.

Các hoá chất dùng để tinh chế và xác định khối lượng phân tử lectin là của hãng SIGMA (Mỹ).

Quá trình tinh chế lectin được biểu diễn theo sơ đồ sau:



III. Kết quả và đánh giá

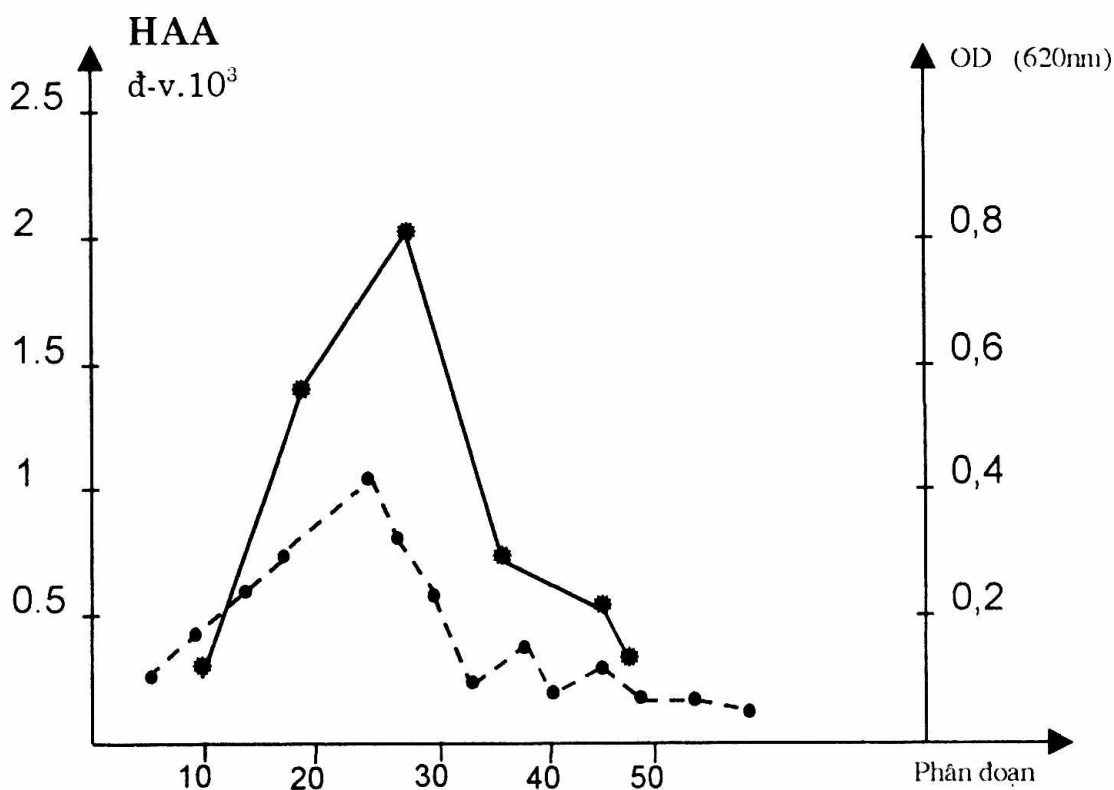
1. Tinh chế lectin từ hạt đậu ván đen

Lectin từ hạt đậu ván đen được tinh chế qua 2 giai đoạn sắc ký : Sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE – Xenluloz.

a. Sắc ký lọc gel Sephadex G-75

Trước hết, kết tủa dịch chiết lectin thô bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hoà, sau đó cân bằng cột G-75 bằng đệm PBS pH 7,4, đưa dung dịch kết tủa lên cột. Quá trình sắc ký theo từng phân đoạn mỗi phân đoạn thu 3 ml với tốc độ dòng chảy 30 ml/giờ. Trong quá trình này đã thu được một đỉnh lectin.

Sơ đồ sắc ký được biểu diễn ở hình 1:



Hình 1: Sắc ký đồ dịch chiết thô qua cột Sephadex G-75.

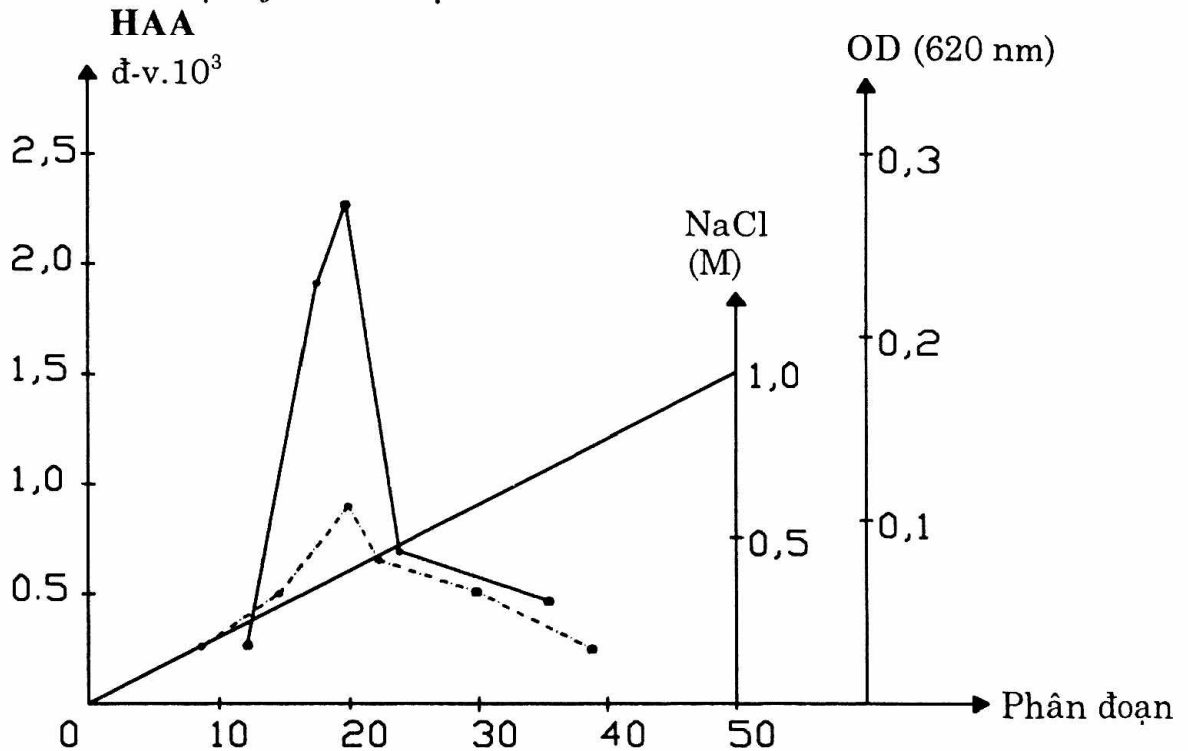
Thu 50 phân đoạn, mỗi phân đoạn 3ml. Tốc độ dòng chảy 30 mm/giờ.

Đường liền ————— : Hoạt độ lectin – HAA.

Đường gián đoạn - - - - - : Mật độ quang OD-hàm lượng protein
các phân đoạn.

b. Sắc ký trao đổi ion DEAE - Xenluloz:

Toàn bộ dịch sơ chế qua cột Sephadex G-75 có chứa lectin được dồn lại, rửa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hoà, thẩm tích 24 giờ, sau đó đưa lên cột trao đổi ion DEAE - Xenluloz. Quá trình sắc ký được thực hiện theo gradien nồng độ NaCl 0 - 1 M trong đệm phốt phát 0,2 M ở pH 8,0. Tốc độ sắc ký 20 ml/giờ, thu 50 phân đoạn, mỗi phân đoạn 2ml. Trong quá trình sắc ký cũng đã thu được 1 đỉnh lectin. Ở nồng độ 0,5 M NaCl lectin bị đẩy ra khỏi cột nhiều nhất.



Hình 2: Sắc ký đồ tinh chế lectin qua cột DEAE-Xenluloz.

Đệm phốt phát 0,2 M pH 8,0. Tốc độ dòng chảy 20ml/giờ.

Thu 50 phân đoạn, mỗi phân đoạn 2ml. Quá trình sắc ký theo gradien nồng độ NaCl 0 - 1 M.

Đường liền: ————— : Hoạt độ lectin-HAA.

Đường gián đoạn - - - - - : Mật độ quang OD-hàm lượng protein
các phân đoạn.

Như vậy sau 2 giai đoạn sắc ký độ tinh sạch của lectin tăng 8,3 lần so với dịch chiết thô ban đầu, thu hồi lectin đạt 33,2%. Toàn bộ quá trình tinh chế lectin từ hạt đậu ván đen được tóm tắt ở bảng dưới đây.

Bảng tóm tắt quá trình tinh chế lectin từ hạt đậu ván đen.

HĐTS : Hoạt độ tổng số.

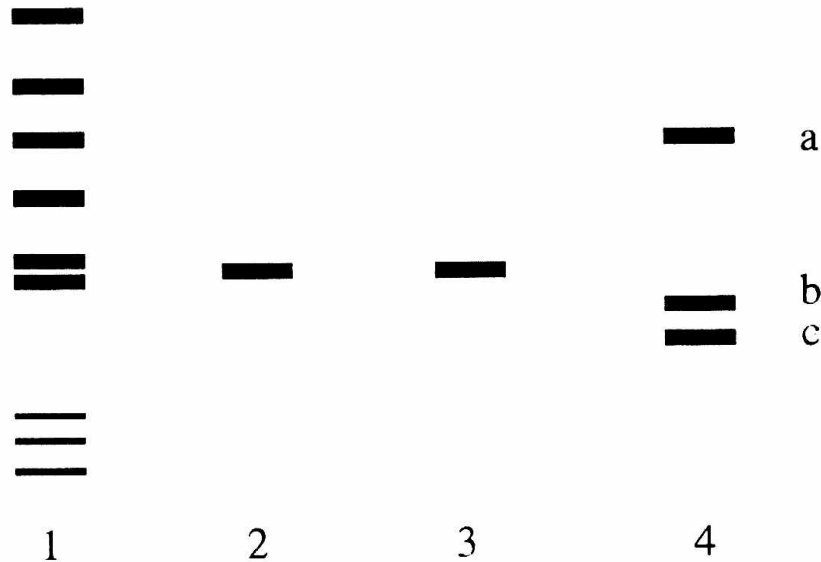
Pr : Protein.

HĐR : Hoạt độ riêng.

đv HAA : Đơn vị hoạt độ ngưng kết hồng cầu của lectin.

Các bước tinh chế	Protein tổng số (mg)	HĐTS đvHAA.10 ³	HĐR đvHAA.10 ³ /mgpr	Độ sạch tăng(lần)	Thu hồi HAA (%)
Dịch chiết thô	750	512	0,682	1	100
Dịch rửa (NH ₄) ₂ SO ₄	620	512	0,825	1,2	100
Sắc ký Sephadex G-75	150	350,8	2,33	3,2	68,5
Sắc ký DEAE-Xenluloz	30	170,0	5,66	8,3	33,2

2. Kiểm tra độ tinh sạch và xác định khối lượng phân tử của lectin đậu ván đen



Hình 3 : Phổ điện di chế phẩm lectin đã tinh chế trên gel polyacrylamit có SDS.

1. Chế phẩm lectin thô.

2. Chế phẩm lectin đã tinh chế có SDS và mecraptoetanol.

3. Chế phẩm lectin đã tinh chế có SDS và không mecraptoetanol.

4. Protein chuẩn:

a) Albumin huyết thanh bò 66 kDa.

b) Inhibitortripxin 20 kDa.

c) Lizozim 14 kDa.

Bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit chúng tôi phát hiện thấy dịch chiết thô từ hạt đậu ván đen có khá nhiều băng protein, trong khi đó chế phẩm lectin qua 2 giai đoạn sắc ký chỉ còn 1 băng protein trên gel.

Khi sử dụng một số dạng protein chuẩn đã biết trước khối lượng phân tử, bằng phương pháp này chúng tôi đã xác định được khối lượng phân tử của lectin đậu ván đen khoảng 28 kDa.

IV. Kết luận

1. Lectin từ hạt đậu ván đen (*Lablab purpureus*) tinh chế qua 2 giai đoạn sắc ký nối tiếp: Sắc ký qua cột Sephadex G-75 và sắc ký qua cột trao đổi ion DEAE – Xenluloz có độ tinh sạch cao tăng 8,3 lần so với dịch chiết ban đầu. Chế phẩm lectin tinh chế gồm một băng protein trên gel polyacrylamit.

2. Bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit đã xác định được khối lượng phân tử của đậu ván đen là 28 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Văn Châu, Đỗ Ngọc Liên, Nghiên cứu protein lectin từ hạt của đậu cove xanh và cove chạch thuộc loài đậu cove (*Phaseolus vulgaris*), *Thông báo khoa học số 4*, Trường ĐHSPT Hà Nội I, 1994, trang 59 – 65.
2. Nguyễn Đăng Khôi, *Nghiên cứu cây thức ăn gia súc Việt Nam*, tập 1, Nhà xuất bản Khoa học & Kỹ thuật - Hà Nội, 1979.
3. Đỗ Ngọc Liên, Trần Tuấn Quỳnh, Tách, tinh chế và nghiên cứu một số tính chất của lectin từ hạt chay (*Artocarpus tonkinensis* L), *Tạp chí Sinh học* tháng 6/1991, trang 20 – 27.
4. Ahidjo Ayouba, Christian Chatelain and Pierre Rouge, Leguine lectins interact with muramic acid and N-Axetylmuramic acid, *Federation of Europe and Biochemical Soclated*, Volum 289, No 1(1991), 102-104.
5. Laemmli U.K, Resagent and gel for SDS-PAGE, *Nature*, No.227(1970), pp.579-580.

PURIFICATION AND DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF LECTIN FROM LABLAB PURPUREUS

Truong Van Chau

Ha Noi Pedagogical University No.2

Lectin from Lablab purpureus was extracted in phosphate buffered saline (PBS with pH 7,4) and was purified by the method of chromatography gel filtration on Sephadex G-75 and io-exchange on DEAE-cellulose. The purity of lectin was checked by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The lectin activity was determined by method of Alecxande A Kott. The molecular weight of lectin from Lablab purpureus was 28 kDa when was determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis.