

TÁCH, TINH CHẾ VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA LECTIN TỪ HẠT ĐẬU COVE VÀNG (PHASEOLUS VULGARIS DB1)

Trương Văn Châu - Nguyễn Đức Tiến, Đỗ Ngọc Liên
Khoa Sinh, ĐHTH Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Đậu Cove vàng thuộc nhóm cove lùn của loài *Phaseolus vulgaris* L. là một giống trồng khá phổ biến ở một số tỉnh miền núi và đồng bằng Bắc bộ [1]. Những nghiên cứu cơ bản gần đây cho thấy hàm lượng protein dinh dưỡng trong hạt đậu cove DB1 khá cao. Mặt khác, nó còn chứa lectin, một loại protein đó hoạt tính sinh học đặc biệt. Khoa huyết học và truyền máu của bệnh viện Bạch Mai (Hà Nội) trong những năm 80 đã sử dụng dịch chiết từ hạt đậu cove xanh (*Phaseolus vulgaris*) có chứa lectin để kích thích sự chuyển dạng tế bào lim phô [2]. Để có chế phẩm lectin tinh sạch từ hạt các giống trồng thuộc loài *Phaseolus-vulgaris* ứng dụng trong nghiên cứu miễn dịch và y học chúng tôi đã tiến hành công trình này.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hạt đậu cove vàng DB1 thu nhận từ một số vùng của tỉnh Lai Châu, được sấy khô ở nhiệt độ 35°C trong 120 giờ và nghiền thành bột mịn. Quá trình chiết rút lectin được tiến hành bằng đệm PBS pH 7,4 ở nhiệt độ 25°C. Hàm lượng protein hòa tan được xác định theo phương pháp Lowry với albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn. Hoạt độ lectin được xác định theo phương pháp đã mô tả trước đây. Trọng lượng phân tử của lectin DB1 được xác định bằng điện di trên gel poliacrylamit có SDS theo phương pháp Laemmli.

Các hóa chất dùng để sắc ký, điện di... là của hãng BIORAD và SICMA (Mỹ).

III. KẾT QUẢ VÀ ĐÁNH GIÁ

1 - Tách và tinh chế lectin DB1

a) Chiết rút và sơ chế:

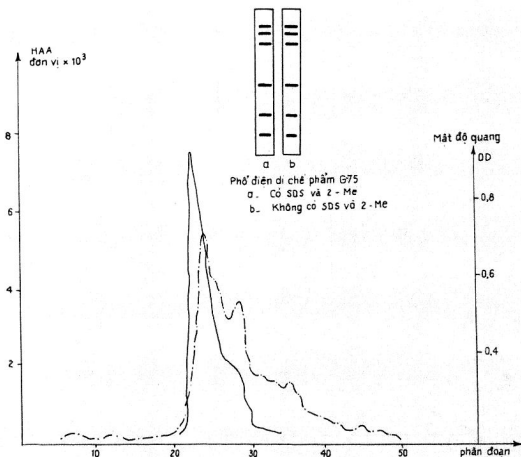
Protein hòa tan (trong đó có lectin) của hạt đậu được chiết rút bằng đệm PBS pH 7,4. Dịch chiết được tủa bằng amon sunfat 60% bão hòa, tiến hành ly tâm lấy tủa.

Ở bước sơ chế này độ tinh sạch lectin này tăng 1,4 lần so với dịch chiết.

b) Sắc ký lọc gel Sephadex G-75:

Chế phẩm lectin thô được đưa lên cột sephadex G-75 sau khi đã cân bằng với đệm PBS pH 7,4. Rửa chiết lectin theo từng phân đoạn, mỗi phân đoạn 3 ml với lưu lượng 30 ml/giờ. Các thử nghiệm xác định hoạt độ lectin bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu người nhóm A, cho thấy

lectin thu lại ở một đỉnh. Thu hồi lectin đạt gần 65,6%. Độ sạch lectin tăng xấp xỉ 6,4 lần so với dịch chiết. Kết quả điện di chế phẩm lectin qua G-75 cho thấy lectin chưa được tinh sạch (Hình 1).



Hình 1. Sắc ký lọc gel Sephadex G-75 bằng đệm PBS pH 7,4

+ Đường liền ——— hoạt độ lectin (HAA).

+ Đường gián đoạn OD - Mật độ quang biểu hiện hàm lượng Protein ở các phân đoạn.

c) Sắc ký trao đổi ion trên cột DEAE - Trisacryl.

Chế phẩm lectin đã qua G-75 được dồn lại, tủa bằng sunfat - amôn 80% bão hòa, thẩm tích 48 giờ và đưa lên cột sắc ký DEAE - Trisacryl. Sự chiết rút lectin theo gradien nồng độ NaCl 0 ÷ 1M. Thu mỗi phân đoạn 2 ml với lưu lượng chiết rút 27 ml/giờ. Kết quả cho thấy thu được một đỉnh lectin. Độ tinh sạch lectin tăng 2,3 lần so với chế phẩm lectin qua G-75 và tăng 14,61 lần so với dịch chiết ban đầu. Thu hồi lectin gần 26,4%. Phổ điện di chế phẩm qua DEAE - Trisacryl cho thấy có 1 băng protein (hình 2)

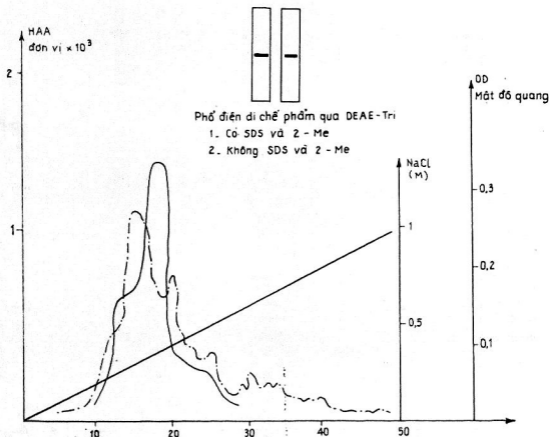
Như vậy sau 2 giai đoạn tinh chế, lectin trong hạt đậu cove vàng DB1 đã được tinh sạch. Độ sạch của lectin tăng 14,61 lần so với dịch thô ban đầu (bảng 1).

2 - Một số tính chất của Lectin DB1

a) Độ bền nhiệt:

Lectin dùng để thí nghiệm độ bền nhiệt có hoạt độ 32.10^3 đơn vị/mg. Kết quả thu được như

sau: ở 0°C hoạt độ lectin hầu như không đổi. Nhiệt độ 45°C hoạt độ lectin tăng lên trong khoảng thời gian sau 15 phút đến 60 phút. Nhiệt độ 70°C sau 120 phút hoạt độ lectin giảm 4 lần. Như vậy lectin ĐB1 tương đối bền với nhiệt (bảng 2).



Hình 2. Sắc kí trao đổi ion qua cột DEAE - Trisacryl theo gradien nồng độ NaCl 0 ÷ 1 M
 + Đường liền ——— hoạt độ lectin (HAA).
 + Đường gián đoạn OD - Mật độ quang biểu hiện hàm lượng Protein ở các phân đoạn.

Bảng 1. Kết quả các giai đoạn tinh chế lectin ĐB1
 + HAA - Hoạt độ lectin, + HDR - Hoạt độ riêng lectin

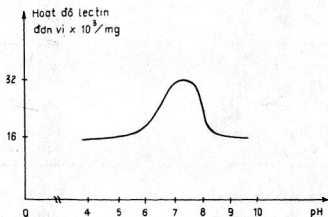
Các giai đoạn tinh chế	Protein tổng số (mg)	HAA tổng số (đơn vị $\times 10^3$)	HDR (đơn vị $\times 10^3$ / mg)	Độ sạch tăng (lần)	Thu hồi (%)
Dịch chiết PBS pH 7,4	1088	512	0,4706	1	100
Dịch rửa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	769	512	0,666	1,4	70,68
Sắc ký Sephadex G75	8,79	26,88	3,058	6,4	65,6
Sắc ký ion DEAE-Tri.	1,35	9,28	6,814	14,61	26,4

Bảng 2. Độ bền nhiệt của lectin ĐB1

Nhiệt độ	Hoạt độ lectin (đơn vị $\times 10^3$ /mg)				
	15 phút	30 phút	60 phút	120 phút	240 phút
0°C	32	32	32	32	32
25°C	32	32	32	32	32
35°C	32	32	32	32	32
45°C	64	64	64	Không xác định	Không xác định
70°C	32	32	32	8	Không xác định
80°C	8	8	0	0	
100°C	0	0	Không xác định	Không xác định	

b) Ảnh hưởng của độ pH đến hoạt độ lectin ĐB1.

Thực nghiệm được lập lại nhiều lần cho thấy lectin ĐB1 hoạt động thích hợp ở độ pH 6 ÷ 7, 5. Ở độ pH axit yếu (4 ÷ 4, 5) và ở độ pH kiềm 8 ÷ 9) hoạt độ lectin đều giảm 2 lần (hình 3).



Hình 3. Đường biểu diễn ảnh hưởng của độ pH đối với hoạt động lectin ĐB1

c) Sự tương tác giữa lectin ĐB1 và một số loại đường:

Qua thí nghiệm chúng tôi nhận thấy hoạt độ lectin ĐB1 bị kìm hãm khá rõ rệt bởi D-galactosa và sau đó là D-glucosa. Các dẫn xuất của 2 loại mônôza này như N-axetyl glucosamin, N-axetylgalatozamin gây ức chế yếu hơn.

Tính chất này của ĐB1 tương tự ĐB7 (3) (bảng 3).

d) Ảnh hưởng của một số ion kim loại của muối trung tính:

Các thí nghiệm đều cho kết quả $ZnSO_4$ và $BaSO_4$ ở nồng độ 0,5 M gây tan huyết. Ở nồng độ 0,2 M thì chúng kìm hãm hoạt độ lectin. Mg^{++} và K^+ ít gây ảnh hưởng hoạt độ lectin. Trong khi đó Mn^{++} lại tăng hoạt tính lectin ĐB1 (bảng 4)

Bảng 3. Sự kìm hãm hoạt độ lectin ĐB1 bởi một số loại đường
+ có gây ngưng kết hồng cầu, - không gây ngưng kết hồng cầu

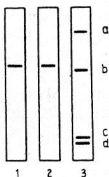
Các loại đường	Nồng độ đường (M)					
	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625
D-Glucosa	-	-	-	+	+	+
N-axetylglucosamin	-	-	+	+	+	+
D-galactosa	-	-	-	-	+	+
N-axetylgalactosamin	-	-	+	+	+	+
Mannosa	-	-	+	+	+	+

Bảng 4. Ảnh hưởng của một số ion kim loại đến
hoạt độ lectin ĐB1 ở nhiệt độ 25°C
+ Có gây ngưng kết hồng cầu, - Không gây ngưng kết hồng cầu

Các loại muối	Nồng độ muối (M)											
	$0,2 \times 2^0$	$0,2 \times 2^{-1}$	$0,2 \times 2^{-2}$	$0,2 \times 2^{-3}$	$0,2 \times 2^{-4}$	$0,2 \times 2^{-5}$	$0,2 \times 2^{-6}$	$0,2 \times 2^{-7}$	$0,2 \times 2^{-8}$	$0,2 \times 2^{-9}$	$0,2 \times 2^{-10}$	$0,2 \times 2^{-11}$
Đối chứng	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
KCl	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BaSO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZnSO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MnSO ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

e) Trọng lượng phân tử lectin ĐB1

Bằng phương pháp điện di trên gel poliacylamit có chứa SDS và chất khử 2 - mecaptoetanol chúng tôi phát hiện ra lectin ĐB1 có một băng protein với trọng lượng phân tử khoảng 70 KDa.



Sơ đồ phổ điện di trên gel poliacylamit chế phẩm lectin ĐB1 qua DEAE - Trisacryl

- 1 - Lectin ĐB1 không chứa SDS và 2-mecaptoetanol,
- 2 - Lectin ĐB1 chứa SDS và 2-mecaptoetanol
- 3 - Protein chuẩn:

a) Photphorilazab	92 KDa
b) BSA	66 KDa
c) Inhibitotripxin	20 KDa
d) Lizozim	14 KDa

f) Sự tích lũy lectin trong hạt cove ĐB1

Với 2 giai đoạn tinh chế ở trên đã cho chế phẩm lectin có độ tinh khiết khá cao, tăng 14,61 lần so với dịch chiết ban đầu. Hàm lượng lectin sau khi tinh chế theo phương pháp trên chiếm gần 25,4% so với tổng số proteinn hòa tan trong đệm PBS pH 7,4.

III. KẾT LUẬN

- 1 - Lectin đậu cove ĐB1 đã được tinh chế một bằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 70 KDa. và độ sạch tăng 14,61 lần so với dịch chiết.
- 2 - D-Glucosa và D-galactosa là 2 loại đường ức chế đối với hoạt độ lectin ĐB1.
- 3 - Lectin ĐB1 khá bền với nhiệt. Ở nhiệt độ 0°C hoạt độ lectin hầu như không đổi.
- 4 - Độ pH thích hợp với hoạt độ lectin ĐB1 là 6 ÷ 7, 5.
- 5 - Ion Zn^{++} và Ba^{++} ức chế hoạt độ lectin, trong khi đó Mn^{++} lại tăng hoạt tính của nó.

Lời cảm ơn. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ nhiều mặt của bộ môn sinh hóa - khoa sinh trường đại học Tổng hợp Hà Nội, trong quá trình thực hiện công trình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đăng Khôi, 1979: Nghiên cứu về cây thức ăn gia súc Việt Nam, tập 1 - NXB KHKT Hà Nội.
2. Nguyễn Thị Thịnh, Lê Doãn Diên, Nguyễn Quốc Khang và Phan Huy Bảo, 1987: Thử nghiệm phương pháp tinh chế lectin cove xanh (*Phaseolus vulgaris*) Tạp chí Sinh học 3- 1987, tr. 21 - 29.
3. Ahidjo Ayouba, Christian Chatelain and pierre Rouge, 1991: Legume Lectins interact with muramic acid and N-acetyl muramic acid. Federation of European Biochemical Societes. Volum 289, number 1, 102 - 104.

VNU,H Journal of science, Nat. sci. t.XI, n°1, 1995

ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF THE LECTIN FROM PHASEOLUS VULGARIS DB1 SEEDS

Truong Van Chau, Nguyen Duc Tien, Do Ngoc Lien
Faculty of Biology, Hanoi U.iversity

Lectin from *Phaseolus vulgaris* DB1 seeds was isolated by PBS buffer pH 7,4 and was purified by two steps: Sephadex G-75 gelfiltration and DEAE - Trisacryl chromatography. Purity of lectin was checked by SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The lectin activity was determined by method of Alexande A. Kott.

The results of this study showed that: The molecular weight of DB1 Lectin was 70 KDa. Lectin activity of *phaseolus vulgaris* DB1 was inhybites by α -D-glucos and α -D-galactoz. The effect of the temperature, pH on the lectin activity was determined.