

MỘT VÀI TÍNH CHẤT VÀ KHẢ NĂNG KHAI THÁC LECTIN TỪ HẠT ĐẬU RỒNG

(*Psophocarpus tetragonolobus*).

PTS. Nguyễn Quốc Khang, GSI. Nguyễn thị Thịnh

Trong bộ đậu, cây đậu rồng có tầm quan trọng về lý luận và tính chất thực tiễn [1], nên đã được quan tâm nghiên cứu nhiều về thành phần nitơ, glucit và tính chế lectin, v.v.. [2, 5]. Ở nước ta, cây đậu rồng còn ít được nghiên cứu, nhất là về tính chất và khả năng khai thác lectin.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt đậu rồng phơi khô, nghiền nhỏ thành bột mịn, loại lipit bằng *ethyl*ic, dùng làm đối tượng nghiên cứu.

Hồng cầu người thuộc các nhóm máu A, B, O do phòng lưu trữ máu, bệnh viện Bạch Mai Hà nội cung cấp.

Các hóa chất khác được sử dụng dưới dạng tinh khiết phân tích.

Chiết rút lectin từ bột hạt đậu rồng bằng dung dịch đệm phối phát M/15 có chứa 0,1M NaCl và thử hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu theo nguyên tắc của Jean M. [3], xác định protein theo phương pháp Lowry [4].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1 — Một vài tính chất của lectin đậu rồng:

1. 1. Tính đặc hiệu:

a) Đặc hiệu với nhóm máu:

Tính đặc hiệu với các nhóm máu được thí nghiệm bằng cách dùng dịch chiết rút lectin từ đậu rồng đem kết tủa ammoniumsulfat 50% bão hòa, rồi thẩm tích để loại ammoniumsulfat và làm phản ứng gây ngưng kết. Kết quả cho thấy rằng lectin từ hạt đậu rồng không thể hiện tính đặc hiệu đối với các nhóm máu A, B và O mà có khả năng gây ngưng kết mạnh với các nhóm máu này.

b) Đặc hiệu với các loại đường:

Chế phẩm lectin đậu rồng thu được theo phương pháp trên đem ủ với các loại đường khác nhau ở 37°C trong 30 phút, sau đó làm phản ứng gây ngưng kết với các nhóm máu và cho kết quả ở bảng 1.

Kết quả (bảng 1) cho thấy tất cả các loại đường đã thí nghiệm đều không có khả năng liên kết đặc hiệu đối với lectin đậu rồng, có nghĩa là chúng không có tác dụng ức chế khả năng gây ngưng kết hồng cầu của lectin đậu rồng. Điều này khác với kết quả nghiên cứu của Stevens (1977) cho rằng lectin từ hạt đậu rồng có tính đặc hiệu với đường lactose. Sự khác nhau này có thể do đậu rồng có nhiều thứ khác nhau hoặc điều kiện thí nghiệm khác nhau.

Bảng 1: Tính đặc hiệu của lectin đậu rồng đối với các loại đường:

Loại đường	Ngưng kết hồng cầu	Loại đường	Ngưng kết hồng cầu
Galactose	xxxx	Arabinose	xxxx
Mannose	xxxx	Xilose	xxxx
Glucose	xxxx	Mannit	xxxx
Lactose	xxxx	Salicin	xxxx
Maltose	xxxx	Raffinose	xxxx
Sacchrose	xxxx	Đối chứng	xxxx

GHI CHÚ:

- = không ngưng kết, x = ngưng kết yếu, xx = ngưng kết trung bình, xxx = ngưng kết mạnh, xxxx = ngưng kết rất mạnh (các ký hiệu này dùng cho cả các thí nghiệm tiếp sau)

1. 2. Ảnh hưởng của một vài nhân tố môi trường phản ứng

Để chiết rút những hợp chất protein có hoạt tính sinh học nói chung hay lectin nói riêng, người ta thường tiến hành trong điều kiện lạnh. Mặt khác, các điều kiện như pH, nồng độ muối ăn, nồng độ ammoniumsulfat thời gian thí nghiệm và bảo quản... ít nhiều có ảnh hưởng đến khả năng chiết rút và thu nhận chế phẩm lectin từ nguyên liệu, cũng như hoạt tính sinh học của chúng. Để kiểm tra vấn đề này, chúng tôi đã thí nghiệm như sau:

a) Ảnh hưởng của nồng độ muối ăn (NaCl)

Dùng muối ăn đưa vào dung dịch đệm để chiết rút lectin từ đậu rồng với các nồng độ khác nhau. Các chế phẩm lectin trong dịch chiết rút có khả năng gây ngưng kết hồng cầu ghi ở bảng 2.

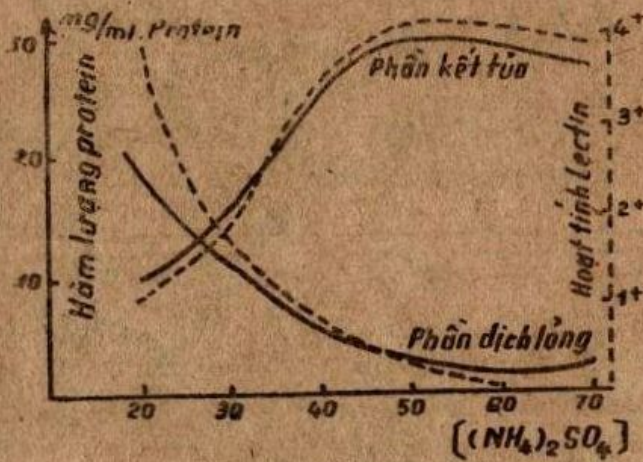
Bảng 2. Ảnh hưởng nồng độ NaCl đến khả năng chiết rút và hoạt tính lectin từ đậu rồng.

Nồng độ NaCl trong đệm	Mức ngưng kết hồng cầu ở các nồng độ protein khác nhau (mg/ml)								Protein : rút được (mg/ml)
	38	19	9	5	2,5	1,3	0,6	0,3	
Đối chứng	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	38
3 gam/lít	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	38
6 gam/lít	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	37,8
9 gam/lít	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	37,6
12 gam/lít	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	37,4
15 gam/lít	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	x	37,0

Từ kết quả ở bảng 2 nhận thấy, dịch chiết rút có nồng độ protein khác nhau thể hiện hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu hầu như không phụ thuộc vào nồng độ muối ăn từ 0 đến 15gam/lít.

b) Ảnh hưởng của nồng độ ammoniumsulfat

Sau khi thu được dịch chiết rút lectin từ đậu rồng, dùng ammoniumsulfat tinh thể thêm vào để đạt các nồng độ mong muốn. Ly tâm phân chia thành hai phần: dịch lỏng và kết tủa. Kết tủa được hòa tan trở lại bằng dung dịch đệm photphat và cả hai phần dẫn đến một thể tích bằng nhau nhất định đem xác định nồng độ protein và thử phản ứng gây ngưng kết hồng cầu. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1

Ảnh hưởng của nồng độ ammoniumsulfat đến sự phân chia và hoạt tính lectin ở dịch chiết rút từ đậu rồng.

Hình 1 cho thấy khi nồng độ ammoniumsulfat tăng lên thì hàm lượng protein trong dịch chiết giảm xuống và hoạt tính lectin cũng giảm theo. Khi nồng độ ammoniumsulfat đạt khoảng 50% bão hòa thì nồng độ protein trong dịch chiết là tối thiểu và hoạt tính lectin cũng thấp nhất. Ngược lại, khi nồng độ ammoniumsulfat tăng lên thì kết tủa protein tăng lên và hoạt tính lectin trong kết tủa cũng tăng theo. Điều đáng chú ý là khi nồng độ ammoniumsulfat đạt khoảng 50% bão hòa thì hàm lượng protein hầu hết nằm trong phần kết tủa và lúc đó hoạt

tính Lectin cũng tập trung hầu hết trong phần kết tủa.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến hoạt tính lectin của đậu rồng.

Số giờ	Nhiệt độ (°C)	Khả năng gây ngưng kết hồng cầu (nồng độ protein mg/ml)							
		38	19	9	5	25	1.3	0.6	0.3
0	4	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX
	37	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	X
24	4	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X
	37	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	X	X	X
48	4	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
	37	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
72	4	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
	37	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
96	4	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
	37	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
120	4	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
	37	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
144	4	XXX	XXX	XXX	XX	XX	X	X	X
	37	XXX	XXX	XX	XX	XX	X	X	X

c) Độ bền nhiệt

Bằng phương pháp định tính để đánh giá mức độ ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến khả năng gây ngưng kết hồng cầu của lectin chiết rút từ hạt đậu rồng.

Bảng 3 cho thấy, ở tất cả các nồng độ protein đã nghiên cứu theo thời gian bảo quản và cả hai điều kiện nhiệt độ nói chung hoạt tính lectin chỉ giảm chút ít sau ngày thứ hai và sau đó ổn định mãi đến 6 ngày sau. Đồng thời trong cả hai điều kiện nhiệt độ, lectin đậu rồng cũng không có ảnh hưởng gì đến khả năng gây ngưng kết hồng cầu. Nó nghĩa là lectin đậu rồng nói chung tương đối bền với nhiệt độ trong điều kiện in vitro.

Để minh họa thêm, chúng tôi đã tiến hành chiết rút lectin từ đậu rồng trong các điều kiện 4°C, 20—25°C và 37°C (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ khác nhau đến khả năng chiết rút và hoạt tính lectin từ đậu rồng;

Nhiệt độ (°C)	Khả năng gây ngưng kết theo nồng độ protein (mg/ml)							
	38	19	9	5	2.5	1.3	0.6	0.3
4	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XX
20 - 25	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XXX	XX	XX
37	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XXX	XX	XX

Như vậy, chúng ta thấy lectin đậu rồng được chiết rút trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau, nhưng hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu gần như giống nhau.

d) Ảnh hưởng của pH

Để tìm hiểu ảnh hưởng của pH đến khả năng chiết rút và hoạt tính lectin từ đậu rồng, chúng tôi đã chiết rút lectin từ đậu rồng bằng các dung dịch đệm photphat có pH khác nhau và sau đó tiếp tục thử hoạt tính lectin trong các pH đã chiết rút lectin ở trên. Kết quả tóm tắt ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng chiết rút và hoạt tính lectin từ đậu rồng

pH	mg/ml protein chiết rút	Khả năng gây ngưng kết hồng cầu theo nồng độ protein (mg/ml)							
		38	19	9	5	2.5	1.3	6.0	0.3
5	37.8	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX	X
6	38.5	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX	X
7	38.5	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX	X
8	39.0	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XX	XX	X

Điều kiện pH ảnh hưởng không rõ rệt đối với khả năng chiết rút protein và hoạt tính lectin từ đậu rồng. Tuy nhiên ở pH = 8 thì việc chiết rút lectin từ đậu rồng có hiệu quả hơn không chỉ về hàm lượng protein mà thực tế khi ly tâm cũng thu được dịch trong hơn.

2.2. Khả năng khai thác lectin từ đậu rồng

Qua các kết quả nghiên cứu các tính chất của lectin đậu rồng, chúng tôi nhận thấy việc khai thác lectin từ đậu rồng có thể thực hiện dễ dàng trong các phòng thí nghiệm hiện có ở Việt Nam. Quy trình khai thác lectin có thể tóm tắt như sau: 500 gam bột hạt đậu rồng đã loại lipid bằng erte - etyllic, hòa vào 2500ml dung dịch đệm photphat pH = 8, có chứa 0,1M NaCl, 10mm MnCl₂ và 10mM CaCl₂ (đệm A), lắc đều 15 giờ ở 4°C, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 30 phút thu lấy dịch trong, rồi kết tủa protein bằng ammoniumsulfat ở 50% bão hòa. Ly tâm thu kết tủa và hòa kết tủa vào đệm A. Sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G.75 bằng đệm A. Các phân đoạn có hoạt tính lectin thu lại đem kết tủa bằng ammoniumsulfat ở 80% bão hòa và ly tâm thu kết tủa. Kết tủa hòa tan vào dung dịch đệm photphat 0,02M và pH 8 (đệm B). Thâm tích đối với đệm B và đưa lên cột sắc ký trao đổi ion DEAE - Cellulose. Tách rút lectin khỏi cột bằng gradient nồng độ NaCl từ 0 - 0,5M trong đệm B. Các phân đoạn có hoạt tính lectin được tách ra ở nồng độ NaCl từ 0,15 - 0,25M. Tiếp tục tái sắc ký qua DEAE cellulose hay - Sephadex A.50. Bằng phương pháp này, chế phẩm lectin thu được còn hai vết protein gần nhau trên điện di SDS-polyacrylamit và có hoạt tính cao (bảng 6).

Bảng 6. Các bước tinh chế lectin đậu rồng

Các bước	mg prot tein chung	hoạt tính chung	hoạt tính riêng	số lần sạch	% kh thác
Dịch khô	9800	18.000	2	1	100
ammoniumsulfat 50%	1860	14.506	18	4	80
Sephadex G.75	980	13.720	15	7	76
DEAE - Cellulose	360	9.500	26	13	38
DEAE - Sephadex A.50	78	5.148	66	33	26
DEAE - Cellulose	17	2.000	811	59	11

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. NGUYỄN ĐẶN KHÔI. 1972. Khả năng phát triển các loại đậu vụ đông ở miền Bắc nước ta. - Tạp chí tin tức hoạt động khoa học, tháng 9.
2. NATHAN SHARON, NALIS H. 1973. Lectin: Cell-agglutinin and sugarspecific protein. - Annu. Rev. Biochem. 42: 541-574.
3. JEAN M F. 1975. Nhóm máu và cảm nang thực hành (bản dịch tiếng Việt). NXB Y-học Hà nội.
4. LOWRY O.H. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - J. biol. Chem. 193, 265.
5. NGUYỄN THỊ THỊNH và NNK. 1983. Bước đầu điều tra lectin ở tập đoàn đậu đỗ Việt Nam. - Tạp chí Sinh học, T 5, 4: 5-11.

(Xem tiếp trang 57)