

TINH SẠCH VÀ MỘT VÀI ĐẶC TRUNG CỦA LECTIN TỪ HẠT CHAY (*ARTOCARPUS TONKINENSIS*)

Trần Thị Long, Nguyễn Quốc Khang
Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQGHN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lectin từ các loài *Artocarpus* đã được quan tâm nghiên cứu, nhất là *Artocarpus integrifolia* ưa lectin phản ứng mạnh mẽ với IgA của người [1] và HCG [2]. Nhiều lectin của các loài *Artocarpus* đã được tinh sạch và nghiên cứu đặc trưng cấu trúc phân tử và tính đặc hiệu với carbohydrate [3-6]. Đặc trưng phân tử của các lectin *Artocarpus* đã nghiên cứu đều có cấu trúc đơn từ 2 đến 4 dưới đơn vị đồng hình hay dị hình [3, 7, 8] và chúng có phản ứng đặc trưng với các mono- hay disaccharide kiểu Galactoside [9]. Nhưng *Artocarpus tonkinensis* (cây Chay) có ở Việt Nam thì chưa có công trình nào đề cập tới lectin của đối tượng này. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài "Tinh sạch và nghiên cứu một vài tính chất đặc trưng của lectin từ hạt Chay (*Artocarpus tonkinensis*)".

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt Chay (*Artocarpus tonkinensis*) thu mua ở các chợ vùng Hà Nội mùa hè 1994. Hạt mang vỏ cứng, thái nhỏ và sấy khô ở 40-50°C. Hạt khô đem nghiền nhỏ thành bột mịn, dùng để nghiên cứu.

Hồng cầu các nhóm máu A, B, O của người do khoa Huyết học và truyền máu, bệnh viện Mai Hà Nội cung cấp.

Các hóa chất khác dùng dưới dạng tinh khiết phân tích từ các hãng Sigma (Mỹ) và Merck. Các protein khác, là các chế phẩm của phòng thí nghiệm lectin, Đại học Tổng hợp Hà Nội cấp.

Xác định mức độ ngưng kết hồng cầu theo nguyên tắc của Gebauer [10] mô tả.

Tinh sạch lectin từ hạt Chay theo phương pháp của Nguyễn Quốc Khang [11].

Xác định hàm lượng protein hòa tan theo Lowry [12], có albumine huyết thanh bò làm chất

Điện di trên gel - polyacrylamide có và không có SDS theo nguyên tắc của Weber và Osborn trong hệ đệm của Laemmli [14].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh sạch lectin

tiến hành tinh sạch lectin từ hạt Chay, chúng tôi thử nghiệm việc chiết rút lectin bằng

các dung dịch có bản chất và pH khác nhau (trong hệ thống đệm phosphate). Các kết quả được ghi tóm tắt ở bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Ảnh hưởng bản chất dung dịch đến khả năng chiết rút và hoạt tính lectin từ hạt Chay (*Artocarpus tonkinensis*)

TT	Dung dịch	Protein (mg/g)	Hoạt động gây ngưng kết		
			Nhóm máu	ĐV.10 ³ /g	ĐV/ng Pr.
1	H ₂ O	149,57	A	40960	273851,70
			B	5120	34231,46
			O	5120	34231,46
2	NaCl 0,9%	152,83	A	10240	67002,55
			B	5120	33501,28
			O	5120	33501,28
3	Phosphate pH 5,0	132,67	A	40960	308735,96
			B	40960	308735,96
			O	10240	77183,99
4	PBS - pH 7,2	155,33	A	10240	65924,16
			B	5120	32962,08
			O	5120	32962,08
5	Phosphate pH 8,0	148,03	A	5120	34587,58
			B	2560	17293,79
			O	2560	17293,79
6	Phosphate pH 9,0	144,20	A	10240	71017,41
			B	5120	35508,70
			O	5120	35508,70

Nhìn vào bảng 1 chúng ta nhận thấy:

- Các dung dịch khác nhau, protein hạt Chay được chiết rút ra với lượng khác nhau: nhất là đệm phosphate pH 5,0 (132,67 mg/g hạt) và cao nhất là đệm PBS có pH 7,2. Đáng chú ý là các dung dịch có chứa muối thì hàm lượng protein được rút ra tương tự nhau (như ở NaCl và PBS).

- Tương tự protein, hoạt tính lectin chiết rút bằng các dung dịch cũng khác nhau. Hoạt tính lectin cao nhất là ở dung dịch phosphate có pH 5,0, còn thấp nhất là đệm có pH 7,2.

Sau khi thăm dò bản chất dung dịch ảnh hưởng đến khả năng chiết rút và tính chất của lectin từ hạt Chay, chúng tôi lựa chọn dung dịch chiết rút lectin hạt Chay là đệm phosphate có pH 5,0. Dịch chiết rút, ly tâm 10.000 vòng / 1 phút, trong 10 phút. Dịch ly tâm đem sắc ký trao đổi qua cột CM-cellulose. Rửa sạch cột bằng đệm phosphate pH 5,0. Tách chiết lectin khỏi cột bằng đệm phosphate pH 8,0. Dịch lectin tiếp tục đem sắc ký trao đổi ion qua cột DEAE-cellulose. Kết quả tinh sạch lectin từ hạt Chay (*Artocarpus tonkinensis*) được tóm tắt ở bảng 2.

Bằng phương pháp tinh sạch lectin từ hạt Chay như đã mô tả ở trên, chế phẩm lectin được có độ sạch khoảng gần 5 lần so với dịch thô ban đầu và điện di SDS-Polyacrylamide cho thấy vết protein với trọng lượng tương ứng là 14 và 17 ± 1 kDa. Hiệu suất khai thác là 55% tính

vị hoạt độ và 11,42% tính theo hàm lượng protein, hoạt động riêng tới 864135,02 đơn vị trên 1 mg protein.

Bảng 2. Các bước tinh sạch lectin từ hạt Chay (*Artocarpus tonkinensis*)

Các bước	Protein		Hoạt động chung		Hoạt động riêng	
	mg/g	%	ĐV.10 ³ /g	%	ĐV/mgP	Độ sạch
Dịch thô	145,33	100,00	26214,4	100,00	180378	1,00
CM-cellulose	109,18	75,13	19860,8	75,76	181908	1,01
DEAE-cellulose	40,16	27,63	16384,0	62,50	407968	2,26
DEAE-cellulose	16,59	11,42	14336,0	54,69	864135	4,79

Một vài tính chất đặc trưng

Lectin hạt Chay, cũng giống như lectin từ các *Artocarpus* khác là không đặc hiệu tuyệt đối hồng cầu các nhóm máu A, B và O. Tuy nhiên ít nhiều có ưu thế phản ứng mạnh với nhóm A, tùy bản chất dung dịch chiết rút, như bảng 1 cho thấy ở dịch chiết rút bằng nước và có pH 5,0. Từ kết quả đặc hiệu nhóm máu cũng được thể hiện qua tính đặc hiệu đường (ratcarbon) như sau:

Bảng 3. Nồng độ đường (mM) kìm hãm hoạt tính lectin Chay

TT	Các loại đường	mM	TT	Các loại đường	mM
1	D-Galactose	-	11	α -L(-) Fucose	100
2	NAc-D-Galactosamine	12,50	12	D-Sorbose	-
3	D-Galactosamine	-	13	D-Arabinose	-
4	Me- α -D-Galactoside	1,56	14	D-Ribose	-
5	D-Glucose	-	15	Lactose	200
6	D(+)-Glucosamine	-	16	Saccharose	-
7	NAc-D-Glucosamine	100	17	Maltose	-
8	D-Mannose	-	18	Melibiose	25,00
9	Me- α -D-Mannoside	100	19	NAc-axit-Neuraminic	0,78
10	D-Fructose	-	20	-	-

Từ kết quả bảng 3 cho thấy lectin từ hạt Chay bị kìm hãm mạnh bằng các đường Galactoside trong tự nhiên Galactoside như Methyl- α -D-Galactoside (1,56 mM) và N-Acetyl axit Neuraminic (8 mM). Kết quả này phù hợp với các lectin có ưu thế đặc hiệu nhóm máu A.

Như đã nói ở trên, *Artocarpus integrifolia* [1] đặc hiệu với Globulin miễn dịch IgA, và theo quả thăm dò của phòng hóa miễn dịch Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội cho biết: Lectin Chay (*Artocarpus tonkinensis*) - do chúng tôi tinh sạch cũng phản ứng với IgA tương đối mạnh. Dựa đó, chúng tôi đã thử nghiệm phản ứng của lectin Chay với các protien khác được trình bày tất ở bảng 4.

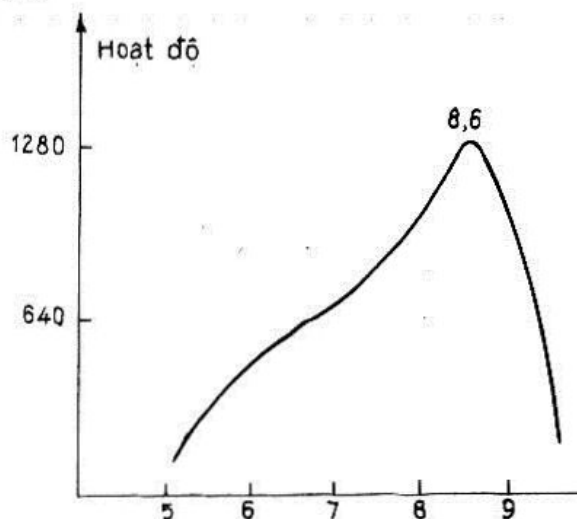
Bảng 4. Nồng độ (mg/ml) protein khác kìm hãm hoạt động lectin Chay

TT	Protein	mg/ml
1	HCG - nước tiểu	0,022
2	Trypsin - Inhibitor đậu tương	-
3	Huyết thanh ngựa chữa	0,060
4	Lectin Sam (<i>Tachypleus tridentatus</i>)	-
5	α -Phetoprotein người	-
6	Lectin nhị Sen (<i>Nelumbo nucifera</i>)	-
7	Lectin chai Tai tượng (<i>Tridacna elongata</i>)	-
8	Lectin Mướp đắng (<i>Momordica charantia</i>)	-
9	Huyết thanh nhóm máu A của người	0070
10	Huyết thanh nhóm máu B của người	0,084
11	Huyết thanh nhóm máu O của người	0,056
12	Mucine cừu	0,039

Như vậy lectin hạt Chay phản ứng khá mạnh với nhiều loại protein có kiểu Glycoprotein như HCG, kích dục tố từ huyết thanh ngựa chữa, Mucine và protein trong huyết thanh của các nhóm máu A, B, O. Nhưng lại không phản ứng với tất cả các lectin khác đã thí nghiệm (bảng 4). Riêng lectin Chay không phản ứng với α -phetoprotein.

Để tìm hiểu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lectin hạt Chay, chúng tôi đã sử dụng hệ đệm PBS (Phosphate-Buffer-Salz) có các pH từ 4,5 đến 9,5. Kết quả thí nghiệm được mô tả tóm tắt bằng hình 1 dưới đây.

Đường cong biểu diễn tốc độ hoạt động của lectin hạt Chay phụ thuộc pH cho thấy: ở vùng pH axit yếu thì có độ dốc thấp, đến pH 6,5 - 7,0 xuất hiện một "vai", sau đó tăng nhanh đến điểm tối thích là pH 8,6; sau đó giảm đột ngột và mất hẳn hoạt động ở pH trên 9,5. Như vậy lectin Chay mẫn cảm với pH cao và có thể có đồng phân. Đó là điều cần được kiểm tra và nghiên cứu tiếp tục để có thể giải thích thỏa đáng hơn.



Hình 1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lectin hạt Chay (*A. tonkinensis*)

4. KẾT LUẬN

- Lectin hạt Chay có thể tinh sạch theo quy trình đơn giản: từ chiết rút bằng đệm có pH 5,0, sắc ký trao đổi ion qua CM-cellulose, DEAE-cellulose và tái sắc ký DEAE-cellulose. Sản phẩm thu được có độ sạch gần 5 lần so với dịch thô ban đầu và có hoạt động riêng 864135,02 đơn vị trên mg protein.

- Lectin hạt Chay đặc hiệu với các đường kiểu Galactoside.

Lectin hạt Chay bị kìm hãm mạnh bằng các protein như HCG, huyết thanh ngựa chửa, thanh các nhóm máu của người và Mucine.

Lectin hạt Chay hoạt động mạnh nhất ở vùng pH 8,6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- oque-Barreira M. C., Campos-Neto A. - J. Immunol., **134** (1985), 1740-1743.
- Nguyễn Quốc Khang và Trần Thị Long. Tạp chí Khoa học, ĐHQG Hà Nội, Tập XII, số 1 (1996).
- de Azevedo-Moreira R., De Lima-Airouz I. - Biol. Plant., **23** (1981), 186-192.
- de Azevedo-Moreira R., De Oliveira J. T. A. - Biol. Plant., **25** (1983), 343-348.
- . Namjuntra, P. Muanwongyathi, M. Chulavatuatal. Biochem. Biophys. Res. Comm., **128** (1983), 833-348.
- . B. Hunter, M. K. Suresh, E. Keshavarz, W. M. Wenman, K. G. Micetich. Biochem. Arch., (1986), 319-328.
- . Aucouturier, E. Mihaesco, C. Mihaesco, J. L. Preud'homme. Mol. Immunol., **24** (1987), 33-511.
- . S. Appukutan and D. Basu. FEBS - Letters, **180** (1985), 331-334.
- I. V. K. Sastry, P. Banarjee, S. R. Patanjali, M. J. Swamy. J. Biol. Chem., **261** (1986), 1726-11733.
- I. Fleish and J. Maider. Biochem. Hoppe-Seyler, **336** (1985), 1029-1032.
- . Q. Khang, et al. Lectins: Sigma Chem. Company, **6** (1988), 341-348.
- . H. Lowry, N. J. Rosebrough, and J. Rondall. J. Biol. Chem., **193** (1951), 256.
- . Weber and M. Osborn. J. Biol. Chem., **244** (1969), 4406.
- . K. Laemmli and M. Farve. J. Mol. Biol., **80** (1977), 455-465.

JOURNAL OF SCIENCE, Nat. Sci., t.XII, n^o2, 1996

PURIFICATION AND SOME CHARACTERIZATIONS OF LECTIN FROM SEEDS OF *ARTOCARPUS TONKINENSIS*

Tran Thi Long, Nguyen Quoc Khang
College of Natural Sciences - VNU

The Lectin from *Artocarpus tonkinensis* was extracted by phosphate - buffer 0.02 M at pH 5.0 purified by ion-exchange on CM-cellulose, DEAE-cellulose and Re-chromatography on the DE-cellulose. The products of lectin have high purity (846135 IU/mg protein).

It was noted that lectin from *Artocarpus tonkinensis* have not specificity for blood groups, have specificity for sugars and glycoproteins very different.

The optimum of the lectin from *Artocarpus tonkinensis* is pH 8.6.