

NGHIÊN CỨU ĐIỀU TRA CÁC LECTIN Ở MỘT SỐ LOÀI RONG BIỂN

Nguyễn Quang Vinh
Khoa Sinh, ĐHTH Hà Nội

Sinh vật biển nói chung, các loài rong biển nói riêng, từ lâu đã được biết là nguồn nguyên liệu quý giá về các chất có hoạt tính sinh học (2, 3, 5, 9, 14, 10) hoặc để sản xuất aga hay axit alginic (6)

Lectin và Protein có hoạt tính sinh học, đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sống, được tìm thấy ở nhiều đối tượng sinh vật. Một trong những tính chất sinh học quan trọng của lectin là khả năng ngưng kết các tế bào, trong đó có các tế bào hồng cầu máu người và động vật và chính lectin được phát hiện dựa trên tính chất này (8). Cho đến nay các nghiên cứu về lectin được tiến hành chủ yếu trên đối tượng thực vật và động vật bậc cao (8). Đối với thực vật bậc thấp nói chung, rong biển nói riêng, mới chỉ có ít thông báo liên quan đến vấn đề này (1, 4, 7, 11, 12).

Lectin ở các loài rong biển đã được nghiên cứu thường có hoạt tính ngưng kết thấp đối với các loại tế bào hồng cầu khác nhau và thường không biểu hiện tính đặc hiệu đường cũng như đặc hiệu nhóm máu (7). Tuy nhiên, đã phát hiện một số loài rong biển chứa lectin đặc hiệu nhóm máu người như lectin của các rong đỏ: *Ptilota plumosa* (11) *Laurencia undulatus* (7) đặc hiệu hồng cầu nhóm B; tảo lục *Ulva lactuca* chứa lectin đặc hiệu nhóm máu O (4). Lectin trong rong biển cũng ngưng kết hồng cầu động vật như: thỏ, ngựa, cừu, gà, vịt... với mức độ khác nhau.

Các công trình nghiên cứu sinh hóa rong biển ở nước ta đã công bố chủ yếu đề cập đến aga, axit alginic; có một số nghiên cứu điều tra về thành phần hóa học (13), nhưng chưa có công trình nào đề cập đến lectin ở chúng.

Bài này giới thiệu kết quả nghiên cứu điều tra lectin ở một số loài rong biển thuộc 3 ngành: Rong đỏ (Rhodophyta), rong nâu (Phaeophyta), rong lục (Chlorophyta), và một loài thuộc ngành thảo silic.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các loài rong biển thu ở ven biển và đảo vùng Hải Phòng, Quảng Ninh được đựng trong túi nilông và chuyển ngay về phòng thí nghiệm, giữ trong tủ lạnh và ngăn đá. Mẫu khô không khí cũng được giữ trong túi nilông và bảo quản trong tủ lạnh. Tên các loại rong do PTS Nguyễn Văn Tiến (Phân viện Hải Dương học, Hải phòng) định loại.

- Dịch chiết rong biển thu được bằng cách nghiền mẫu (đã được làm sạch khỏi cát sỏi và động vật biển) trong cối sứ có thêm cát thủy tinh (đã sử lý bằng HCl và làm sạch, khô) với đệm PBS, pH7,4, tỷ lệ mẫu : dịch đệm là 1:1 (w/v) đối với mẫu tươi và 1:10 (w/v) đối với mẫu khô trong 30 phút. Li tâm 30 phút ở 3000 vòng/phút, thu lấy dịch trong để làm phản ứng ngưng kết hồng cầu.

Một số mẫu rong được chiết bằng vài loại đệm khác nhau để làm phản ứng ngưng kết. Dịch chiết một số mẫu rong giữ ở 4°C và - 15°C với thời gian 2 tháng, sau đó được thử lại hoạt tính ngưng kết hồng cầu.

PHẢN ỨNG NGUNG KẾT HỒNG CẦU

Phản ứng ngưng kết được tiến hành trên bản thử bằng nhựa với các giếng có đáy hình chữ V. 50 μl dịch chiết rong được pha loãng gấp đôi liên tiếp trong các giếng của bản nhựa và 50 μl hồng cầu 2% (V/V) của các nhóm máu người, hoặc động vật (đã rửa 3-6 lần bằng NaCl 0,9%) được thêm vào mỗi giếng. Kết quả phản ứng ngưng kết ghi nhận sau 1-1,5 giờ ở nhiệt độ phòng. Hoạt động ngưng kết (giá trị hiệu chuẩn) là nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất của dịch lectin còn có khả năng ngưng kết hoàn toàn lượng hồng cầu đã thêm vào.

TÍNH ĐẶC HIỆU ĐƯỜNG

Sự ức chế phản ứng ngưng kết bởi đường được tiến hành như sau. 50 μl mỗi loại đường với nồng độ xác định được pha loãng gấp đôi liên tiếp trong các giếng của bản nhựa với độ pha loãng từ 1/2 đến 1/256 bằng đệm tương ứng. Chuẩn bị một dịch chiết pha loãng của rong chứa 4 đơn vị ngưng kết/50 μl và 25 μl của dịch này được thêm vào mỗi giếng có chứa đường đã pha loãng trên bản nhựa. Để yên bản nhựa trên ở nhiệt độ phòng 30-60 phút trước khi thêm vào mỗi giếng 25 μl hồng cầu 4%. Các bản nhựa lại được để yên ở nhiệt độ phòng 1 giờ trước khi kiểm tra độ ức chế. Độ ức chế ngưng kết được ghi nhận là độ pha loãng lớn nhất của dung dịch đường còn có khả năng ức chế hoàn toàn sự ngưng kết hồng cầu. Độ pha loãng lớn nhất của đường ở đây tương ứng với một nồng độ nhất định. Vì vậy cũng có thể biểu diễn độ ức chế bằng nồng độ tối thiểu của dung dịch đường còn có khả năng ức chế hoàn toàn sự ngưng kết.

Các loại đường dùng để thử của hãng Sigma. Các hóa chất khác ở mức độ tinh khiết phân tích.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả điều tra về hoạt tính Lectin (bảng 1) cho thấy hoạt tính ngưng kết hồng cầu phát hiện thấy ở dịch chiết của 28 trong số 38 loài rong đã nghiên cứu và phổ biến trong cả ba ngành rong đã thử. Tuy nhiên, số loài có lectin chiếm tỷ lệ cao hơn ở rong đỏ và rong nâu (70 - 90% số loài đã nghiên cứu) so với các loài rong lục (~ 40%). Hoạt tính ngưng kết hồng cầu trong đa số các trường hợp là thấp và không đặc hiệu. Kết quả này tương tự các công trình đã công bố về lectin ở rong biển (1, 7). Trong số các loài đã điều tra, *Codium arabicum* có biểu hiện hoạt tính cao nhất, mặc dù không đặc hiệu nhóm máu. Kết quả này là tương tự với điều tra của Rogers và các cộng sự (12).

Phản ứng ngưng kết của dịch chiết từ một số loài rong với các nhóm máu người (bảng 1) cho thấy lectin của các loài rong đã ngưng kết các nhóm máu A, B, O cũng ngưng kết hồng cầu nhóm máu AB, nhưng thường với mức độ bằng hoặc thấp hơn.

Bảng 1 : Hoạt động ngưng kết của dịch chiết từ các loài rong biển
đối với hồng cầu máu người và máu động vật/Hoạt độ tính trên 50 μ l dịch chiết

Tên loài rong biển		Nơi thu mẫu	Hoạt độ ngưng kết						
Tên Việt Nam	Tên Khoa học		Nhóm máu người				Máu gà	Máu vịt	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)				(6)	(7)
	<i>Ngành rong đỏ</i>	<i>Rhodophyta</i>							
1	Rong mút tròn *	<i>Porphyra suborbiculata</i> Kjellm	Hòn Dấu (Đồ Sơn)	8	8	16	8	16	16
2	Rong vú bò tán	<i>Galaxaura fastigiata</i> Decne	Cát bà	1	1	1		0	0
3	Rong san hô vảy	<i>Corallina squamata</i> El. et Send	Hòn Dấu	0	0	0		0	0
4	Rong thạch sỏi	<i>Gelidium crinale</i> (Turn) LamX	Hòn Dấu	1	1	1		1	N
5	Rong Thạch chạc	<i>Gelidium divaricatum</i> Mart	Cát bà	0	0	0		0	0
6	Rong câu cong	<i>Gracilaria bangmeiana</i> Zhang et Abbott	Hòn Dấu	0	0	0		0	0
7	Rong câu thắt*	<i>G. blodgettii</i> Harv	Yên Hưng (Quảng Ninh)	8	4	4	4	4	2
8	Rong câu thừng*	<i>G. chorda</i> Holm	Vạn ninh (Quảng Ninh)	16	8	8	8	8	4
9	Rong câu chỉ vàng *	<i>G. asiatica</i> Chang et Xia	Cát bi	4	2	2	2	2	2
10	Rong thạch giả	<i>Gelidiopsis gracilis</i> (Kuets) Vicks	Hòn Dấu	4	4	4		4	2
11	Rong sừng xốp	<i>Ceratodictyon</i> <i>spongiosum</i> Zan	Cát bà	8	8	4		32	2
12	Rong Kỳ lân*	<i>Eucheuma muricata</i> (Gmel)	Quảng Ngãi	16	8	16	8	8	8
13	Rong thun thút	<i>Catenella nipae</i> Zan	Hòn Dấu	2	2	2		0	0
14	Rong đông roi	<i>Hypnea flagelliparmis</i> Grev	Hòn Dấu	4	2	2		1	1
15	Rong cao đẹp	<i>Gigartina intermedia</i> Sur	Hòn Dấu	0	0	0		0	N
16	Rong gọng kìm	<i>Centroceras clavulatum</i> Mont	Hòn Dấu	0	0	0		0	N

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)			(6)	(7)
	<i>Ngành rong nâu</i>	<i>Phaeophyta</i>						
17	Rong bóng trơn	<i>Colpomenia sinuosa</i> Derber Sol	Cát bà	2	4	2	4	2
18	Rong quạt úc	<i>Padina australis</i> Hauck	Cát bà	4	4	2	1	N
19	Rong quạt bốn lớp	<i>P. Te trastromatica</i> Hauck	Cát bà	1	2	1	4	N
20	Rong thùy	<i>Labophora variegata</i> (Lams) Womers	Cát bà	0	0	0	0	0
21	Rong Mơ giên man	<i>Sargassum</i> <i>Kjellmanianum</i> Yendo	Hòn Dấu	4	4	2	0	N
22	Rong mơ mềm	<i>Sargssum</i> <i>tenerrimum</i> J. Ag	Hòn Dấu	4	4	4	0	N
23	Rong Mơ vasen	<i>S. vachellianum</i> Grev	Hòn Dấu	8	8	8	4	8 4
24	Rong mơ mảnh	<i>S. gracillimum</i> Rbd	Hòn Dấu	8	4	8	0	N
25	Rong mơ thối chùm	<i>S. Swatzii</i> (Turn) C.Ag	Hòn Dấu	8	4	8	0	N
26	Rong mơ heclô	<i>S. herklotsii</i> Setch	Hòn Dấu	8	8	8	8	2 2
27	Rong mơ lá phao	<i>S. meclurei</i> Setch	Cát bà	8	8	4	2	2
28	Rong mơ thối tán	<i>S. peniculatum</i> J. Ag	Cát bà	8	8	4	2	2
29	Rong mơ dị nang	<i>S. heterocystum</i> Mont	Cát bà	4	4	2	2	1
30	Rong mơ sừng	<i>S. siliquosium</i> J. Ag	Cát bà	6	6	4	2	1
	<i>Ngành rong lục</i>	<i>Chlorophyta</i>						
31	Rong cải biển hoa	<i>Ulva conglobata</i> Kjellm	Hòn Dấu	8	16	16	4	0 0
32	Rong tóc đốt xoắn	<i>Chae tomorpha spiralis</i> Okam	Hòn Dấu	0	0	0	0	N
33	Rong tóc xanh	<i>Cha. chlorotica</i> (Mont) kiitz	Đồ sơn	1	1	1	0	0
34	Rong túi mảnh	<i>Valonia aegaropila</i> (Roth). J. Ag	Hòn Dấu	0	0	0	0	N
35	Rong túi thô	<i>V. macrophysa</i>	Cát bà	0	0	0	0	N
36	Rong đại Á Rập	<i>Codium arabicum</i> Kuetz	Cát bà	2048	2048	4096	0	0
37	Rong bún	<i>Enteromorpha tubulosa</i> Kiitz	Đồ sơn	2	2	4	2	0 0
38	tảo silic	<i>Skeletonema costatum</i>	Đồ sơn	0	0	0	0	0

Ghi chú : N - Mẫu không thử, * - Mẫu dạng khô không khí

Phản ứng ngưng kết hồng cầu máu gà, vịt biểu hiện khác nhau ở các loài rong khác nhau (bảng 1). Đối với rong đỏ và rong nâu, đa số các dịch chiết đã ngưng kết hồng cầu máu người cũng ngưng kết hồng cầu máu gà, vịt với mức độ tương đương hoặc thấp hơn, trong khi đó không một dịch chiết nào của các loài rong lục cho phản ứng ngưng kết với hồng cầu máu gà, vịt.

Loài tảo silic duy nhất mà chúng tôi thử, không biểu hiện hoạt tính ngưng kết với hồng cầu máu người cũng như máu gà, vịt.

Dịch chiết một số loại rong bằng các dịch đệm khác nhau cho phản ứng ngưng kết khác nhau. Trong số các dịch đệm đã thử, đáng chú ý là dịch đệm Tris-NaCl-CaCl₂; nó làm tăng hoạt độ ngưng kết hồng cầu đối với dịch chiết từ tảo *Ulva* và *Enteromorpha*. Hơn nữa đối với *Ulva*, hoạt độ ngưng kết hồng cầu nhóm máu O tăng lên đáng kể.

Những lectin cần ion Ca²⁺ thường có thể liên quan đến tính đặc hiệu axit sialic. Ngoài ra đối với chi *Ulva* đã có thông báo về lectin đặc hiệu nhóm máu O có trong một loài thuộc chi này là *Ulva lactuca* (4). Vì vậy chúng tôi đã thử tính đặc hiệu đường đối với dịch chiết từ hai loài rong lục trên. Kết quả thể phản ứng ức chế bởi đường (bảng 2) cho thấy, đường ức chế mạnh nhất phản ứng ngưng kết của dịch chiết *Ulva conglobata* và L-Fucose, còn đối với *Enteromorpha tubulosa* là axit N-Axetylneuraminic. Trên cơ sở những dẫn liệu đã biết (4, 8) cùng với những kết quả chúng tôi thu được có thể nói dịch chiết của *Ulva conglobata* cũng chứa lectin đặc hiệu nhóm máu O của người, còn *Enteromorpha tubulosa* có chứa lectin đặc hiệu axit sialic. Điều sau này là đáng chú ý bởi hầu hết các lectin đặc hiệu axit sialic đã biết đều có nguồn gốc động vật không xương sống (8).

Bảng 2: Sự ức chế phản ứng ngưng kết của dịch chiết rong bởi đường

Loại đường	Nồng độ tối thiểu của đường gây ức chế (mM)	
	<i>Ulva</i>	<i>Enteromorpha</i>
Metyl-Mannose	< 100 mM	> 100 mM
Metyl-Glucose	200	> 100
Metyl-Galactose	200	> 100
L-Fucose	12,5-25	> 100
Glucosamine	200	50
Galactosamine	200	50
N-Acetyl-Glucosamine	200	> 100
N-Acetyl-Galactosamine	200	> 100
N-Axetyl-neuraminicacid	> 100	3,1-6,25
Mucine (porcine)	N	0,3 mg/ml

Ghi chú : N - không thử

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian giữ mẫu đến hoạt độ ngưng kết của dịch chiết rong (bảng 3) cho thấy ảnh hưởng này là khác nhau đối với các loại rong khác nhau. Hoạt tính của dịch chiết một số loài rong như các loài rong câu rong mút tròn, rong kỳ lân (các rong đỏ), rong cải biển hoa hầu như không giảm sau 2 tháng giữ ở 4°C hoặc - 15°C, trong khi đó ở một số loài khác hoạt độ ngưng kết bị giảm đáng kể hoặc hầu như mất hoàn toàn như trường hợp rong mơ gienma, rong sừng xốp, trong mơ Vasen, rong mơ Heclô, nhất là rong đại Á Rập (xem bảng 1). Tuy nhiên, đối với rong đại Á Rập, sau 1 tháng giữ ở 4°C hoạt tính giảm không đáng kể; hoạt tính ngưng kết giảm và mất sau đó có liên quan đến sự xuất hiện nấm mốc chưa phân

lập được trong dịch chiết. Sự giảm hoạt tính của một số mẫu khác có lẽ cũng liên quan đến hiện tượng này.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến hoạt độ ngưng kết hồng cầu máy người của dịch chiết một số loài rong biển

Loài rong biển	Điều kiện giữ dịch chiết *					
	Giữ ở 4°C			Giữ ở - 15°C		
	Hoạt độ ngưng kết nhóm máu					
	A	B	O	A	B	O
<i>Rong đỏ</i>						
Rong câu thắt	8	4	4	8	4	4
Rong câu thừng	16	8	8	16	8	8
Rong mút tròn	8	16	16	8	16	16
Rong kỳ lân	16	8	16	16	8	16
Rong sừng xóp	1	1	1	2	2	2
Rong thạch giả	2	2	2	4	4	4
<i>Rong nâu</i>						
Rong mơ giếnman	1	1	1	1	1	1
Rong mơ mềm	1	1	1	1	1	1
Rong mơ vasen	1	1	1	2	2	2
<i>Rong lục</i>						
Rong cải biển hoa	8	16	16	8	16	16
Rong bún	1	1	2	2	2	2
Rong đại Á Rập	0	0	0	1	1	1

Ghi chú : * Mẫu giữ ở các điều kiện trên trong thời gian 2 tháng

Cũng không loại trừ khả năng sự giảm hoạt độ ngưng kết của dịch chiết liên quan đến hoạt động của các enzym proteolytic có trong dịch chiết mà chúng tôi đã phát hiện thấy (15). Đa số các rong biển chứa proteinaza trung tính mà dung dịch đậm chúng tôi dùng để chiết rút có pH khoảng trung tính thì dù ở 4°C hay thấp hơn, enzym ít nhiều vẫn hoạt động. Tuy nhiên, điều đáng ngạc nhiên là đối với một số mẫu rong câu và rong đỏ khác như rong kỳ lân (một trong những đối tượng có hoạt tính proteinolytic cao nhất [15]) là nguyên liệu để sản xuất aga hoặc caragen (6) có chứa lectin, nhưng hình như proteinaza của dịch chiết không ảnh hưởng đến hoạt tính ngưng kết của lectin trong chúng. Mối quan hệ giữa lectin và proteinaza hay protein ức chế proteinaza trong cùng một đối tượng là vấn đề thú vị cần được nghiên cứu tiếp.

Những lectin đặc hiệu hoặc bền với các điều kiện nhiệt độ, pH... cần được tiếp tục nghiên cứu để làm rõ chức năng sinh học và khả năng ứng dụng của chúng trong thực tế.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành với sự giúp đỡ của Chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực khoa học tự nhiên.

This publication was completed with financial support from the National basic Research Program in Natural Sciences.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andersson L., Pisa P., et al., 1986. Studies of Swedish marine organisms. V. A Screening for lectin-like activity. Acta Pharm. Suec. 23, 91-100.
2. Attway D. H., 1974. The Biological activity substances from sea. J. of Ocean Technology, 8, 7.
3. Barascov G. K., 1963. Khimia vodoroslei : Izd. Acad. CCCP. Mockva
4. Gilboa - Garber N. et al., 1988. H Blood group detection by the L - Fucose binding lectin of the green alga *Ulva lactuca*. Devel, Comp. Immunol. V. 12, 695 - 705.
5. Gurin I. S, Ajtikhin I. C., 1981. Biologicheski aktivnie vesestava Ghidrobiontov istochnik novukh lekarstv i preparatov. Izd . "Nauka" Mockva.
6. Mc Hugh D. T. (ed), 1987. Production and Utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. (288) 189 p.
7. Ingram G. A., 1985. Lectins and lectin-like molecules in Lower plants. I. Marine Algae (Review). Devel. Comp. Immunology. V. 9 1-12.
8. I. E. Leinier N. Sharon, I. J. Goldstein (Eds)., 1986. The Lectins : Properties, functions and Applications in Biology and Medecine. New York : Acad. Press, Ind.
9. Mohamed M., El-Sayed. 1983. Fatty acid composition of some algae lipids from the Red sea. J. of the Faculty of Marine Sciences. 3, 1404.
10. Rhomashina N. A., 1983. Marine invertebrates as a source of eicopentanoie and other polyenoic acids. J. Mar. Biol. Vladivostok, No1, 66.
11. Rogers D. J, Blunden G. and Evans P. R., 1977. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. Med. Lab. Sciences. 34, 193 - 200.
12. Rogers D. J, Blunden G, Topliss, J. A and Guiry M. D., 1980. A survey of some marine organisms for haemagglutinins. Bot. Mar. 23, 569.
13. Lâm Ngọc Trâm, Nguyễn Văn Thiện, Đỗ Tuyết Nga, Lưu Thị Hà, Nguyễn Kim Đức, 1991. Thành phần hóa học trong các loài rong biển vùng biển Phú Yên - Khánh Hòa - Minh Hải. Tuyển tập nghiên cứu biển tập III, trang 150.
14. Lâm Ngọc Trâm, 1992. Bước đầu nghiên cứu các photpho lipid, axit béo ở san hô, cầu gai, hải sâm và amebocyte lysate (amoebocyte lysate) ở san tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa. Luận án PTS.
15. Phạm Trân Châu, Phan Thị Hà, Nguyễn Quang Vinh, 1993. Nghiên cứu điều tra các proteinaza và các chất ức chế Proteinaza ở một số loài rong biển, Tạp chí Khoa học. ĐHTH Hà Nội, số 4. 50.

SURVEY OF SOME MARINE ALGAE FOR LECTINS (HAEMAGGLUTININS)

Nguyen Quang Vinh
Faculty of Biology, Hanoi University

Lectins (Haemagglutinins) with rather low titre were detected in 28 of 38 different marine algae species examined. Extracts of red and brown algae agglutinate not only human A, B, O, Red Blood Cells (RBC) but also RBC of chicken and duck, while those of green algae tested agglutinate mostly human RBC.

Among the marine algae tested, *Codium arabicum* possessed the highest agglutinating activity, *Ulva conglobata* was found to be the species containing a L-Fucose binding lectin and Extract of *Enteromorpha tubulosa* contains a sialic acid specific lectin.

Duration and conditions of storage of algae extracts had some influence on the agglutination of human RBC. Relation between the agglutination and the presence of proteinases and other factors in algae extracts was discussed.