

MỘT SỐ TÍNH CHẤT HÓA SINH CỦA LECTIN MÍT NA (*ARTOCARPUS MELINOXYLUS*)

TRƯỜNG VĂN CHÂU

Trường ĐHSP Hà Nội 2

I. MỞ ĐẦU

Nghiên cứu Lectin trong các giống trồng (Cultivar) của một loài và lectin của các loài cùng chi là một hướng nghiên cứu mang ý nghĩa khoa học. Kết quả nghiên cứu theo hướng này sẽ cung cấp thêm các dẫn liệu nhằm sử dụng lectin như một trong các tiêu chuẩn phân loại thực vật, đồng thời mở rộng thêm việc sử dụng lectin của các loài gần nhau trong nghiên cứu y học. Trên thế giới, Chi *Artocarpus* có gần 50 loài và dưới loài. Ở Việt Nam có ít nhất từ 10 đến 12 loài thuộc chi *Artocarpus* [2,3]. Jacalin (lectin của 1 số loài mít) tương tác đặc hiệu với IgA₁ trong huyết thanh người và có khả năng kìm hãm sự phát triển của virút HIV nhờ sự tương tác với tế bào limphô CD₄ của người [5,6].

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu lectin mít na của Việt Nam (tách, tinh chế lectin và nghiên cứu một số tính chất hóa sinh cơ bản), rồi đem so sánh với các dẫn liệu về lectin mít rừng đã được các nhà khoa học Việt Nam và Cộng hòa Pháp phối hợp nghiên cứu để cung cấp thêm các dẫn liệu về những đặc điểm chung, cơ bản của lectin một số loài mít chi *Artocarpus*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Hạt từ quả chín của mít na được thu hái ở tỉnh Phú Thọ. Hạt được bóc vỏ lụa, thái thành lát mỏng và sấy ở nhiệt độ 35⁰C, sau đó nghiền thành bột mịn. Bột nguyên liệu này sử dụng để tinh chế và nghiên cứu tính chất sinh hóa của lectin.

2. Phương pháp nghiên cứu

- a) Xác định hoạt độ lectin bằng phương pháp xét nghiệm tế bào của Alexander A.Kott.
- b) Định lượng protêin tổng số và protêin lectin theo phương pháp Lowry.
- c) Tinh chế lectin theo 2 giai đoạn sắc ký: Sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE - Cellulose bằng đệm PBS pH 7,4 theo gradient nồng độ NaCl 0 - 1 M.
- d) Xác định đặc tính hóa sinh của lectin bằng phương pháp nghiên cứu hóa sinh thông dụng.
- đ) Xác định khối lượng phân tử của lectin mít na bằng phương pháp điện di trên gel polyacrilamit có SDS theo Lammeli.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1) Tinh chế lectin mít na

Với 5 gam bột nguyên liệu khô, lectin được chiết rút bằng đệm PBS pH 7,4. Lectin thô được kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa. Sau đó thẩm tích kết tủa trong 48 giờ ở nhiệt độ 4°C . Tiến hành tinh chế lectin thô theo 2 giai đoạn sắc ký: Sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE - Cellulose theo gradient nồng độ NaCl 0 - 1M. Kết quả tinh chế lectin được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Tóm tắt quá trình tinh chế lectin mít na

Các bước tinh chế	Pr tổng số (mg)	HĐTS (đv HAA.10 ³)	HĐR HAA.10 ³ mg pr	Độ sạch (lần)	Thu hồi lectin (%)
Dịch chiết thô	630	512	0,814	1	100
Dịch tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	350	512	1,462	4,79	100
Sắc ký Sephadex G-75	120	420	3,5	4,2	82,4
Sắc ký DEAE Cell	35	276	11,4	14,0	53,9

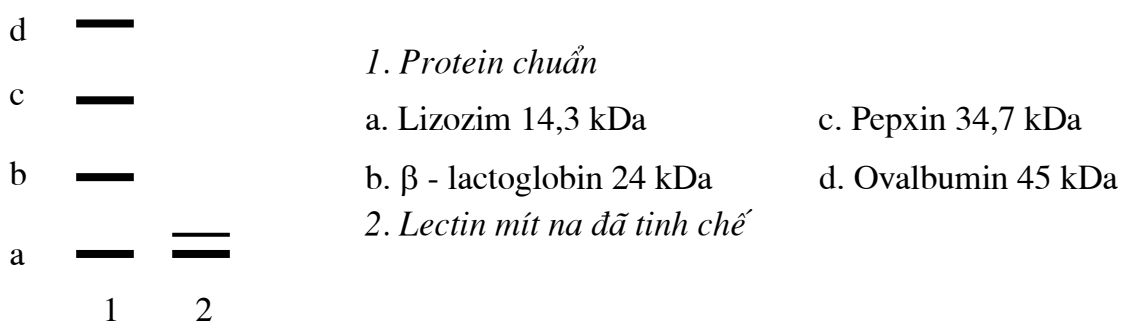
HDTS: Hoạt độ tổng số

Pr - Protein

HDR: Hoạt độ riêng

đv HAA: đơn vị hoạt độ lectin

Như vậy, qua 2 giai đoạn sắc ký độ tinh sạch của lectin tăng 14 lần so với dịch chiết thô ban đầu. Kết quả này chứng tỏ rằng lectin mít na tinh chế bằng 2 giai đoạn sắc ký là phù hợp cho chế phẩm có độ tinh sạch cao, thu hồi lectin trên 50%. Để kiểm tra độ tinh sạch của lectin qua 2 giai đoạn sắc ký chúng tôi đã điện di chế phẩm lectin trên gel polyacrilamit có SDS theo phương pháp Lammeli. Kết quả điện di cho thấy chế phẩm lectin tinh chế gồm 2 băng protein khá đồng nhất trên gel với khối lượng phân tử khoảng 14 kDa và 17 kDa trên điện di đồ (Hình 1).



Hình 1. Phổ điện di chế phẩm lectin mít na trên gel polyacrilamit có SDS

2) Nghiên cứu một số tính chất hóa sinh của lectin mít na

a) Tương tác với đường

Với một số loại đường hexoz và dẫn xuất của chúng, bằng phương pháp xác định khả năng làm ngưng kết hồng cầu nhóm máu A của người chúng tôi đã xác định được hoạt độ lectin mít na bị kim hãm bởi α - D - galactoz và dẫn xuất của α - D - galactoz.

b Ảnh hưởng của độ pH lên hoạt độ lectin mít na

Lectin tinh sạch từ mít na được sử dụng nghiên cứu ảnh hưởng độ pH đến khả năng làm ngưng kết hồng cầu của nó. Theo kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3, chúng tôi nhận thấy: độ pH thích hợp của lectin mít na là từ 6,5 - 8,0. Giá trị pH từ 6,0 - 4,0 và từ 9,0 - 10,0 khả năng ngưng kết hồng cầu của lectin giảm mạnh và mất hoạt tính hoàn toàn.

c). Các yếu tố kích thích và kìm hãm hoạt độ lectin mít na

Với các loại muối chứa ion kim loại hóa trị I và hóa trị II, chúng tôi tiến hành thí nghiệm tác dụng của các ion kim loại lên hoạt độ lectin. Thí nghiệm được lập lại nhiều lần đã cho thấy: Mg²⁺ làm tăng hoạt độ lectin, trong khi đó Zn²⁺ lại làm giảm hoạt độ lectin (Bảng 4)

d) Tác dụng của nhiệt độ đến hoạt độ lectin mít na

Lectin đã tinh sạch được đặt trong môi trường có nhiệt độ khác nhau để kiểm tra mức độ bền với nhiệt của lectin. Thời gian tác dụng của nhiệt độ lên lectin là 15 phút. Thí nghiệm được lập lại nhiều lần, kết quả nghiên cứu trong bảng 5 đã cho thấy: từ 0°C - 40°C hoạt độ lectin không thay đổi. Từ 50°C trở lên đã làm giảm mạnh hoạt độ lectin. Có thể nói lectin mít na cũng như một số dạng lectin từ các loài đậu, các loài mít là không bền với nhiệt

Bảng 2: Sự kìm hãm hoạt độ lectin mít na bởi các loại đường

(Nồng độ các loại đường thí nghiệm 0,125 M. Hoạt độ lectin đối chứng 64 đv..HAA)

Các loại đường	Hoạt độ lectin				
α - D - glucoz	+	+	+	+	+
α - D - glucozamin	+	+	+	+	+
N - axetyl - D - glucozamin	+	+	+	+	+
α - D - galactoz	-	-	-	-	-
α - D - galactozamin	-	-	-	-	-
Metyl - α - D - galactozamin	-	-	-	-	-
α - D - Manoz	+	+	+	+	+
L - Fucoz	+	+	+	+	+

(+ Còn hoạt độ lectin _ Không còn hoạt độ lectin)

Bảng 3: Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ lectin mít na
Hoạt độ lectin đối chứng là 64 đv.HAA được xác định ở nhiệt độ 30°C với nhóm máu A của người

pH	Hoạt độ lectin				
4,0	-	-	-	-	-
4,5	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-	-
5,5	-	-	-	-	-
6,0	+	+	+	+	-
6,5	+	+	+	+	+
7,0	+	+	+	+	+
7,5	+	+	+	+	+
8,0	+	+	+	+	+
8,5	+	+	+	+	-
9,0	-	-	-	-	-
9,5	-	-	-	-	-
10,0	-	-	-	-	-

(+ Còn hoạt độ lectin _ Không còn hoạt độ lectin)

3) So sánh lectin mít na và lectin mít rừng

Sử dụng kết quả nghiên cứu lectin mít na ở trên, chúng tôi so sánh với lectin mít rừng (*Arotocarpus masticata*) về hai đặc tính của lectin là khối lượng phân tử và sự tương tác đặc hiệu với đường của các nhà khoa học Việt Nam và Cộng hòa Pháp phối hợp nghiên cứu [4,5].

a) Khối lượng phân tử của lectin

Bằng phương pháp điện di trên gel polyacrilamit có SDS, cả 2 loài mít này đều chứa lectin gồm 2 băng prôtein với khối lượng phân tử khoảng 14 kDa và 17 kDa. Đây là một dẫn liệu khoa học khá thú vị. Khi nghiên cứu lectin từ các cultivar của một loài chúng tôi thấy đặc tính lectin của chúng rất giống nhau, mang tính đặc thù của loài [1]. Với 2 loài mít cùng chi *Artocarpus* chúng tôi thấy khối lượng phân tử lectin của chúng cũng có dấu hiệu giống nhau. Như vậy, mặc dù 2 loài mít sống ở môi trường địa lý khác nhau nhưng khối lượng phân tử của lectin lại giống nhau, có tính bảo thủ cao trong tiến hóa.

b) Sự tương tác đặc hiệu với đường

So sánh đặc tính tương tác đặc hiệu với đường của lectin mít na và lectin mít rừng, chúng tôi nhận thấy cả 2 dạng lectin này đều bị kìm hãm bởi α - D - galactoz và dẫn xuất của α - D - galactoz. Tính chất này chứng tỏ rằng lectin mít na và lectin mít rừng không những có khối lượng phân tử tương đương mà còn giống nhau về đặc tính tương tác đặc hiệu với đường α - D - galactoz. Sự giống nhau về khối lượng phân tử và tương tác đặc hiệu với α - D - galactoz cho thấy sự giống nhau về đặc tính phân tử của chúng và cũng cho thấy có thể tinh chế lectin mít na bằng phương pháp sắc ký ái lực.

Để có dẫn liệu khoa học đầy đủ hơn về tính bảo thủ của lectin các loài mít trong quá trình tiến hóa cần có các nghiên cứu tiếp theo với nhiều loài mít chi *Artocarpus* ở Việt Nam và một số quốc gia khác trên thế giới.

Bảng 4 : Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt độ lectin mít na

Hoạt độ lectin đối chứng 64 đv.HAA , pH 7,4 ở nhiệt độ 30°C Nồng độ muối thí nghiệm 0,2M.

Muối thí nghiệm 0,2M	Hoạt độ lectin					
NaCl	+	+	+	+	+	+
KCl	+	+	+	+	+	+
MgSO ₄	+	+	+	+	+	+
BaSO ₄	+	+	+	+	+	+
MnSO ₄	+	+	+	+	+	+
ZnSO ₄	+	+	+	-	-	-

(+ Còn hoạt độ lectin Không còn hoạt độ lectin)

Bảng 5 : Tác dụng của nhiệt độ lên hoạt độ lectin mít na

Hoạt độ lectin đối chứng 64 đv.HAA với nhóm máu A của người

Nhiệt độ thí nghiệm	Hoạt độ lectin					
0 °C	+	+	+	+	+	+
10 °C	+	+	+	+	+	+
20 °C	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+
40 °C	+	+	+	+	+	+
50 °C	+	+	+	+	-	-
60 °C	+	+	-	-	-	-
70 °C	-	-	-	-	-	-

(+ Còn hoạt độ lectin Không còn hoạt độ lectin)

Bảng 6: So sánh sự tương tác đặc hiệu với đường của lectin mít na và lectin mít rừng

Đường ức chế	Hoạt độ lectin mít na (Trương Văn Châu, 2004)	Hoạt độ lectin mít rừng (Theo một số tác giả Pháp - Việt, 1993 -1995)
α - D - galactoz		-
α - D - galactozamin	-	-
Metyl - α - D - galactozamin	-	-

+ Còn hoạt độ lectin - Không còn hoạt độ lectin

IV. KẾT LUẬN

1. Lectin mít na tinh chế qua 2 giai đoạn sắc ký: Sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE - Cellulose có độ tinh sạch cao, tăng 14 lần so với dịch chiết thô. Lectin tinh chế gồm 2 băng protein với khối lượng phân tử 14 kDa và 17 kDa.

2. Ở nhiệt độ môi trường từ 0 °C tới 40 °C hoạt độ lectin ổn định; giá trị pH từ 6,5 - 8,0 là thích hợp với hoạt độ lectin mít na. Mg^{2+} làm tăng hoạt độ lectin, Zn^{2+} lại làm giảm hoạt độ lectin. Lectin mít na bị ức chế khá đặc hiệu bởi α - D - galactoz và dẫn xuất của α - D - galactoz.

3. Lectin của 2 loài mít chi *Artocarpus* là mít na và mít rừng đều gồm 2 băng protein trên gel có khối lượng phân tử 14 kDa và 17 kDa. Hoạt độ của hai dạng lectin này đều bị kìm hãm bởi α - D - galactoz và dẫn xuất của α - D - galactoz.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Văn Châu. Một số đặc tính sinh học của lectin trong các giống trồng loài đậu cove (*Phaseolus vulgaris*). Tạp chí khoa học số 4 năm 2002, Trường ĐHSP Hà Nội, trang 108 - 112.
2. Võ Văn Chi, Vũ Văn Chuyên. Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1971.
3. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1986.
4. Đỗ Ngọc Liên, Brillard M, Hoebeke J. Một số đặc điểm phân tử của lectin chay (*Artocarpus tonkinensis*). Tạp chí Khoa học số 4, ĐHTT Tổng hợp Hà Nội, 1993, tr 55 - 61.
5. Lien Do Ngoc, M.Brillard, J.Hoebeke and P.Aucouturier. The α - and β - subunits of the Jacalins are cleavage products from a 17- kDa precursor. Biochemistry Acad. Paris, 1993., p.219 - 222
6. Lien Do Ngoc, M. Brillard, J. Hoebeke and P.Aucouturier. A new α chain of Jacalin from jack - fruit seeds of two wild species. Biochemistry. Acad Paris, 1995. P. 167 - 172
7. M. Haran, H. Binz, C. Devaux. Jacalin, a lectin with anti - HIV₁ properties and HIV₁ gp 120 envelope protein interact with distinct regions of the CD₄ molecule. Molecular immunology, 1994. Vol 31, No 2, P. 509 - 515.
8. N. Pineau, P. Aucouturies, J.C. Brugier and L. Preudhome. Jacalin: a lectin mitogenic for human CD₄T lymphocytes. Immunol No. 80. Paris, 1990. P. 420 - 425.
9. N.Pineau, J.Pouseset and P.Aucouturier. Structural and functional similarities of breadfruit seed lectin and jacalin. Molecular immunology, Vol.27, No.3, Paris, 1990, p. 237 - 240.

SUMMARY

STUDIES ON SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LECTIN FROM ARTOCARPUS MELINOCYLUS SEEDS

TRUONG VAN CHAU

The lectin of *Artocarpus melinocylus* in Viet Nam was purified in two steps: Sephadex G-75 gel filtration and ion - exchange on DEAE - Cellulose chromatography. The purity of lectin was checked by SDS - polyacrylamid gel electrophoresis (SDS - PAGE). Some biochemical characteristics of lectin from *Artocarpus melinocylus* were compared

with lectin from *Artocarpus masticata* (Lien Do Ngoc, J. Hoebeke, M. Brillard and P. Aucouturier, 1995).