

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.182

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY VÀ TINH SẠCH LECTIN TỪ ĐẬU MA (*Pueraria phaseoloides*) BẰNG SẮC KÝ ÁI LỰC

Võ Văn Song Toàn^{1*}, Trần Khoa Nguyên¹, Kim Thị Thu Xương¹, Nguyễn Thị Bảo Trân¹, Nhan Hoàng Thịnh¹ và Tào Việt Hà²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Đại học Tây Đô

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Võ Văn Song Toàn (email: vvstoan@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 07/07/2021

Ngày nhận bài sửa: 31/07/2021

Ngày duyệt đăng: 25/12/2021

Title:

Investigation of the conditions for lectin extraction and purification from wild bean (*Pueraria phaseoloides*) by using affinity chromatography

Từ khóa:

Lectin, *Pueraria phaseoloides*, SDS-PAGE, Sepharose D-galactose, trích ly

Keywords:

Extraction, lectin, *Pueraria phaseoloides*, Sepharose D-galactose, SDS-PAGE

ABSTRACT

The study was conducted to determine the conditions for lectin extraction and purification from wild pea (*Pueraria phaseoloides*). Lectin in wild bean was first extracted in 0.9% NaCl solution with different ratios (w/v) as well as time and temperature conditions. The crude extract was then purified with ammonium sulfate at various salt precipitation concentrations, followed by affinity chromatography on Sepharose D-galactose gel to improve the purity level. The results showed that the optimal efficiency of lectin extraction was achieved in specific activity of 1.579 HAA/mg at the ratio of 1 bean:4 NaCl (w/v), at 50°C for 10 minutes. The fractional precipitation with ammonium sulfate concentration of 40% - 50% gave the highest recovery efficiency which was 35.4% with a purity increasing of 6.38 times compared to the crude sample. F₁ fraction obtained from affinity chromatography had a recovery efficiency of 9.85%, and there was a rise in purity level, 16.2 times higher than crude sample. The results of SDS-PAGE electrophoresis on polyacrylamide gel 12% showed two protein bands with molecular weights of 66.0 kDa and 56.0 kDa.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định điều kiện trích ly và tinh sạch lectin từ đậu ma *Pueraria phaseoloides*. Lectin đậu ma được trích ly cùng với dung dịch NaCl 0,9% ở các tỷ lệ (w/v), thời gian và nhiệt độ ù khác nhau. Dịch chiết thô được tinh sạch bằng phương pháp tủa phân đoạn với muối ammonium sulfate, tiếp theo là sắc ký ái lực trên gel Sepharose D-galactose để cải thiện độ tinh sạch. Kết quả cho thấy lectin đậu ma đạt hiệu quả trích ly tối ưu với hoạt tính đặc hiệu đạt là 1.579 HAA (Hemagglutination assay)/mg ở tỉ lệ với dung môi trích ly là 1:4 (w/v), tại 50°C, trong 10 phút. Dịch trích lectin đậu ma sau khi tủa phân đoạn ở nồng độ muối 40% - 50% cho hiệu suất thu hồi 35,4% với độ tinh sạch tăng 6,38 lần so với dịch trích thô; trong khi phân đoạn F₁ từ sắc ký ái lực cho hiệu suất thu hồi 9,85% với độ tinh sạch tăng 16,2 lần. Kết quả điện di SDS-PAGE xuất hiện hai băng protein có khối lượng phân tử 66,0 kDa và 56,0 kDa.

1. GIỚI THIỆU

Đậu ma có tên khoa học là *Pueraria phaseoloides* là cây thuộc họ đậu, mọc hoang ở các khu rừng thưa hay chỗ trống, bờ suối, ven đường đi, trên đất cát sét với đặc điểm sinh trưởng nhanh, ít sâu bệnh và có khả năng chịu được hạn ngắn. Ở nước ta, do đặc tính hạt nhỏ, ít tinh bột, cảm quan không cao nên đậu ma chỉ được sử dụng như một nguồn thức ăn chăn nuôi, dùng cải tạo đất (Cook et al., 2005), dùng ủ phân vi sinh hoặc sử dụng lá trị một số bệnh ngoài da. Trong khi đó, theo nhiều nghiên cứu, trong thành phần ở cây đậu ma, đặc biệt là hạt chứa một lượng lớn lectin với hoạt tính sinh học cao nhưng chưa được khai thác.

Lectin là protein chứa ít nhất một trung tâm hoạt động, có khả năng tương tác đặc hiệu với mono, oligo-saccharide nằm trên bề mặt tế bào mà không làm thay đổi cấu trúc carbohydrate được liên kết (Lê Thị Ngọc Quỳnh và ctv., 2015). Lectin khá phổ biến trong thực vật, đặc biệt, 90% loại đậu của Việt Nam có chứa lectin (Nguyễn Thị Thịnh, 1983). Khả năng ngưng kết tế bào là nổi bật nhất cho đặc tính của lectin. Với đặc tính này, một số loại lectin được sử dụng như một phương tiện nhận diện một số loài vi khuẩn gây bệnh (Mai Thị Đàm Linh, 2014), phát hiện đặc hiệu nhóm máu người (Boyd & Rankonen, 1940) và phát hiện thai sớm ở người (Đỗ Ngọc Liên, 1998). Ngoài ra, lectin còn được sử dụng nhiều trong phát hiện ung thư (Hu & David, 2008), các khối u ác tính và tăng miễn dịch tự nhiên. Lectin còn được ứng dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu nhờ khả năng gây độc hiệu quả đối với côn trùng (Lê Thị Ngọc Quỳnh và ctv., 2015). Mặc dù lectin nhận được sự quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu trong những năm vừa qua, nhưng quá trình tinh sạch lectin chủ yếu đến từ các loại thực vật phổ biến và sử dụng các phương pháp cổ điển. Do đó, việc đưa ra một quy trình tinh sạch lectin từ nguồn nguyên liệu rẻ tiền và dễ tìm như đậu ma cần được quan tâm nghiên cứu. Vì thế, việc khảo sát điều kiện trích ly và tinh sạch lectin từ đậu ma bằng sắc ký ái lực đã được nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Đậu ma được thu ở xã An Thạnh 3, huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng. Hạt được thu khi đã già và cho khô tự nhiên để dùng thực hiện thí nghiệm.

Giống vi khuẩn *Staphylococcus* sp. được lưu trữ tại phòng thí nghiệm công nghệ enzyme, Viện

Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp chuẩn bị nguyên liệu

Đậu ma sau khi thu hoạch, chọn ra hạt tốt và đồng đều, sau đó được nghiền mịn và trữ lạnh ở -20°C.

Vi khuẩn *Staphylococcus* sp. được nuôi tăng sinh trong môi trường thạch TYEG trong 24 giờ.

2.2.2. Phương pháp thí nghiệm

a. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ bột đậu và dung dịch NaCl 0,9% đến quá trình trích ly lectin

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố (tỉ lệ bột đậu: dung dịch NaCl 0,9%), với 8 mức độ lần lượt là 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14 và 1:16. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Đậu sau khi nghiền mịn thành bột, được hòa tan trong dung môi NaCl 0,9% theo tỉ lệ cần khảo sát để trích ly lectin bằng sóng siêu âm ở 22,5 kHz trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Dịch trích sau đó được ly tâm lạnh ở 4°C với tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 15 phút. Sau ly tâm, loại bỏ phần cặn và thu lấy phần dịch trong để tiến hành xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976) và xác định hoạt tính lectin dựa trên khả năng gây ngưng kết tế bào theo phương pháp của Gebauer (Gebauer et al., 1979).

b. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình trích ly lectin

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số hai nhân tố (nhiệt độ và thời gian), với 3 giá trị nhiệt độ (30, 40 và 50°C) và 4 mức thời gian (10, 20, 30 và 40 phút). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau khi chọn được tỉ lệ đậu và dung môi thích hợp ở thí nghiệm trước, tiến hành trích ly lectin bằng sóng siêu âm ở 22,5 kHz theo các mức nhiệt độ và theo thời gian cần khảo sát. Dịch trích sau đó cũng được ly tâm và đánh giá hàm lượng và hoạt tính tương tự như thí nghiệm trước.

c. Tinh sạch lectin bằng phương pháp tủa phân đoạn muối ammonium sulfate (AS)

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố (nồng độ muối AS) với các mức độ là 0% (mẫu đối chứng), 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Đầu tiên cho 10% muối AS vào dịch trích đậu, khuấy nhẹ và trữ ở 4°C trong 1 giờ, sau đó ly tâm lạnh 5.400 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút để thu lấy phần kết tủa. Phần dịch còn lại sau ly tâm tiếp tục được bổ sung thêm muối AS để đạt nồng độ 20%. Quy trình này tiếp tục thực hiện đến khi nồng độ AS đạt 80%. Mỗi phân đoạn protein kết tủa sẽ được hòa tan trong dung dịch NaCl 0,9%, sau đó tiến hành thẩm tích để loại muối. Phân đoạn sau tinh sạch được dùng để xác định hàm lượng, hoạt tính, hiệu suất thu hồi, độ tinh sạch và khối lượng phân tử của lectin (Laemmli, 1970).

d. Tinh sạch lectin bằng phương pháp sắc ký ái lực

Cột Sepharose D-galactose được rửa sạch và ổn định bằng dung dịch NaCl 0,9%. Dung dịch protein trích ly được bơm qua cột gel Sepharose D-galactose với tốc độ 0,75 mL/phút.

Sau đó các protein mục tiêu được rửa giải bằng 22 mL dung dịch D-galactose 1 M với tốc độ chảy 1 mL/phút, ghi nhận sắc ký đồ ở bước sóng 280 nm và tiến hành thu các phân đoạn protein. Phân đoạn rửa giải được thẩm tích để loại đường và tiến hành trữ mẫu ở -20°C.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được nhập liệu, lưu trữ, xử lý và vẽ hình bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, sai số chuẩn được tính toán bằng phần mềm Minitab 16. Trung bình các số liệu giữa các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh thông qua phép thử Tukey, phân tích phương sai một nhân tố (One Way ANOVA) và hai nhân tố (General Linear ANOVA) bằng phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả ảnh hưởng của tỉ lệ bột đậu:dung dịch NaCl 0,9% đến quá trình trích ly lectin

Theo Bảng 1, lectin đậu ma có hoạt tính tổng cao nhất ở các tỉ lệ 1:2, 1:4 và 1:6 và hoạt tính đặc hiệu tương ứng cũng đạt khá cao ở các nghiệm thức này. Trong đó, ở tỉ lệ 1:4 hoạt tính tổng đạt đến 163.840 HAA và 950 HAA/mg đối với hoạt tính đặc hiệu, trong khi ở các nghiệm thức còn lại hoạt tính đặc hiệu chỉ đạt từ 262 - 582 HAA/mg. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Suseelan et al. (1997) khi cho rằng tỉ lệ thích hợp để trích ly lectin từ bột hạt đậu là 1:4.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ bột đậu:dung dịch NaCl 0,9% đến trích ly lectin đậu ma

Tỷ lệ đậu: dd NaCl 0,9%	Thể tích (mL)	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (HAA)	Hoạt tính đặc hiệu (HAA/mg)
1:2	5,53 ± 0,416	140 ^e ± 10,30	113.323 ^c ± 8.527	809 ^b ± 3,88
1:4	15,8 ± 0,289	174 ^c ± 2,47	163.840 ^a ± 2.956	950 ^a ± 8,25
1:6	25,8 ± 0,289	180 ^{bc} ± 1,53	132.267 ^b ± 1.478	735 ^c ± 5,13
1:8	36,2 ± 0,764	159 ^d ± 3,65	92.587 ^d ± 1.955	582 ^d ± 1,40
1:10	47,2 ± 0,608	174 ^c ± 2,48	60.416 ^f ± 779	348 ^e ± 0,545
1:12	57,7 ± 0,289	186 ^{bc} ± 2,15	73.813 ^e ± 370	397 ^f ± 2,58
1:14	68,2 ± 0,289	202 ^a ± 1,43	87.253 ^d ± 370	43 ^e ± 1,33
1:16	77,3 ± 0,764	189 ^b ± 4,85	49.493 ^e ± 489	262 ^h ± 4,48
CV%	1,21	2,58	3,45	0,745

*Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại trong cùng một cột với các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.

Theo Bùi Phương Thuận và ctv. (2009), tỷ lệ bột đậu:NaCl 0,9% là 1:2 thích hợp cho việc trích ly lectin, tuy nhiên ở tỉ lệ này thì dung môi chưa đủ để lectin khuếch tán ra môi trường do diện tích tiếp xúc giữa dung môi và bề mặt nguyên liệu không đủ để các protein hòa tan khuếch tán hết ra môi trường, do đó hoạt tính tổng và hoạt tính đặc hiệu lectin chưa đạt tối ưu. Ở tỷ lệ 1:4, khi nguyên liệu ngập hoàn toàn trong dung dịch NaCl 0,9%, quá trình khuếch tán của lectin ra ngoài tăng lên, đồng thời dung môi

này cũng tạo điều kiện cho các protein không có hoạt tính ngưng kết cũng khuếch tán ra ngoài.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hàm lượng protein tổng

Theo kết quả từ Bảng 2, khi trích ly ở nhiệt độ 40°C trong 10 phút, thu được hàm lượng lectin là 188 mg, hàm lượng tiếp tục tăng và đạt cao nhất đến 206 mg khi tăng thời gian trích ly lên 20 phút. Tuy

nhiên, hàm lượng protein tổng bắt đầu giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ và kéo dài thời gian trích ly. Trong đó, hàm lượng protein tổng đạt thấp nhất là 143 mg khi trích ly ở 60°C trong 40 phút. Theo lý thuyết, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng nhiệt độ học

của các phân tử, do đó việc trích ly sẽ dễ dàng hơn, tuy nhiên khi tiếp tục tăng nhiệt độ hoặc kéo dài khoảng thời gian gia nhiệt sẽ làm biến tính nhiều loại protein (bị tủa lại và loại bỏ ở bước ly tâm) không chịu được nhiệt độ thấp.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tương tác nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng protein tổng

Đơn vị: mg

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)			
	10	20	30	40
40	188 ^{ab} ± 5,39	206 ^a ± 7,24	183 ^{bc} ± 5,31	178 ^{bcd} ± 5,43
50	189 ^{ab} ± 13,60	172 ^{bcd} ± 2,02	156 ^{de} ± 7,05	174 ^{bcd} ± 9,60
60	163 ^{cde} ± 2,74	161 ^{de} ± 5,71	143 ^e ± 4,17	149 ^e ± 10,20

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng 2 là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại với các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%, CV (%) = 4,25

Như vậy, khi tiến hành trích ly trong khoảng thời gian 10 phút và 20 phút ở điều kiện nhiệt độ 40°C và 10 phút trong điều kiện nhiệt độ 50°C để thu được hàm lượng protein tối ưu nhất, nhưng đây chưa hẳn là điều kiện tối ưu để thu được protein mục tiêu (lectin đậu ma) nên cần xem xét các chỉ về hoạt tính ngưng kết tế bào *Staphylococcus* sp. và hoạt tính đặc hiệu trên tế bào vi khuẩn này.

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hoạt tính ngưng kết tế bào *Staphylococcus* sp.

Số liệu từ Bảng 3 cho thấy hoạt tính ngưng kết (đơn vị là HAA) của lectin chịu ảnh hưởng lớn bởi nhiệt độ và thời gian trích ly. Có thể thấy rõ hoạt

tính lectin ổn định ở nhiệt độ trích ly 40°C, nhưng khi tăng nhiệt độ lên 50°C thì hoạt tính tăng mạnh ở 296.960 HAA, tuy nhiên hoạt tính lại giảm mạnh sau khi kéo dài thời gian và tăng nhiệt độ trích ly lên 60°C. Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng trích ly và duy trì hoạt tính lectin. Nhiệt cao làm tăng khả năng trích ly, nhưng khi tiếp tục tăng nhiệt độ ở cùng mức thời gian thì lectin bị giảm hoạt tính (Kilpatrick, 2000). Lectin cũng như các protein khác, tồn tại ở dạng cấu trúc không gian ba chiều và được giữ ổn định nhờ các liên kết yếu. Tùy theo loại protein đang khảo sát hoạt tính, nhiệt độ quá cao trong quá trình trích ly sẽ làm gãy một số liên kết yếu, kém bền trong phân tử protein, thay đổi cấu trúc phân tử, dẫn đến trung tâm hoạt động mất dần hoạt tính (Ynalvez và Shrum, 2011).

Bảng 3. Ảnh hưởng của tương tác nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính ngưng kết tế bào *Staphylococcus* sp.

Đơn vị: HAA

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)			
	10	20	30	40
40	166.400 ^b ± 4.434	169.813 ^b ± 5.329	168.860 ^b ± 5.120	167.595 ^b ± 3.292
50	296.960 ^a ± 10.420	151.893 ^e ± 2.956	76.800 ^d ± 2.560	39.893 ^e ± 1.332
60	75.093 ^d ± 1.478	74.240 ^d ± 2.560	74.240 ^d ± 2.560	36.693 ^e ± 1.955

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng 3 là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại với các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%, CV (%) = 3,48.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hoạt tính đặc hiệu

Từ kết quả Bảng 4 cho thấy nhiệt độ và thời gian đồng thời tác động lên hoạt tính đặc hiệu (HAA/mg) của lectin đậu ma (p-value < 0,05). Tương tự kết quả hoạt tính ngưng kết tế bào vi khuẩn *Staphylococcus* sp., hoạt tính đặc hiệu của lectin ổn định và tăng dần

từ 885 HAA/mg đến 943 HAA/mg khi tăng thời gian trích ly đến 40°C và tiếp tục tăng đến 1.579 HAA/mg ở 50°C trong 10 phút, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Hoạt tính đặc hiệu này cũng có xu hướng giảm khi tiếp tục tăng thời gian trích ly ở cả nhiệt độ 50°C và 60°C và đạt thấp nhất khi trích ly trong 40 phút (230 HAA/mg ở 50°C và 246 HAA/mg ở 60°C).

Bảng 4. Ảnh hưởng của tương tác nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính đặc hiệu của lectin đậu ma (*P. phaseoloides*)

Đơn vị: HAA/mg

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)			
	10	20	30	40
40	885 ^{bc} ± 3,24	824 ^c ± 3,71	921 ^b ± 4,63	943 ^b ± 29,80
50	1.579 ^a ± 71,70	885 ^{bc} ± 12,0	491 ^d ± 14,60	230 ^e ± 5,30
60	461 ^d ± 2,43	460 ^d ± 1,57	519 ^d ± 13,50	246 ^e ± 4,16

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng 4 là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại với các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%, CV (%) = 3,35.

Kết quả thấy lectin đậu ma ổn định hoạt tính ở 40°C, tuy nhiên nhiệt độ này không đủ năng lượng đưa toàn bộ lượng lectin vào dung môi. Dù thời gian trích ly dài hơn làm tăng khả năng trích lectin vào dung môi, nhưng điều này cũng làm mất đi hoạt tính đặc hiệu của lectin. Tương tự, khi trích ly ở 60°C, hoạt tính đặc hiệu của lectin giảm dần theo thời gian do mức nhiệt này quá cao cho sự giữ ổn định cấu trúc lectin, đồng thời kéo theo sự phóng thích các protein có khả năng chịu nhiệt cao khác làm giảm hoạt tính đặc hiệu của lectin.

Đối chiếu với số liệu ở Bảng 2, tuy việc trích ly lectin đậu ma ở 50°C trong 10 phút không thu được hàm lượng protein cao nhất nhưng không làm mất hoạt tính lectin vì đã loại bỏ được các loại protein tạp trong hạt đậu ma. Ở điều kiện trích ly này, lectin đậu ma còn thể hiện hoạt tính ngưng kết tế bào vi khuẩn *Staphylococcus* sp. và hoạt tính đặc hiệu tối ưu nhất. Vì vậy điều kiện trích ly ở 50°C trong 10 phút có là điều kiện được lựa chọn để trích ly lectin thực hiện cho các thí nghiệm tinh sạch tiếp theo.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, các phân đoạn đầu từ 10% - 30% cho hoạt tính đặc hiệu của lectin tăng dần từ 100 HAA/mg đến 326 HAA/mg, tương ứng độ tinh sạch cũng tăng từ 0,06 tới 0,2 lần. Điều này chứng tỏ ở các phân đoạn đầu lượng ammonium sulfate đã làm tủa được một lượng nhỏ lectin và loại được các protein tạp tuy nhiên hoạt tính đặc hiệu còn rất thấp (chỉ đạt 326 HAA/mg ở phân đoạn 30% với độ tinh sạch 0,2 lần).

Có thể thấy hàm lượng, hoạt tính tổng, hoạt tính đặc hiệu và độ tinh sạch của lectin đều cao hơn hẳn ở phân đoạn 40% - 50%. Hoạt tính đặc hiệu ở phân đoạn 40% đạt 2.813 HAA/mg tương ứng với độ tinh sạch đạt 1,71 lần và đạt cực đại ở phân đoạn 50% với hoạt tính đặc hiệu đạt 11.226 HAA/mg cùng độ tinh sạch là 6,28 lần. Tuy nhiên khi tăng nồng độ ammonium sulfate, kết quả cho thấy dung dịch sau khi tủa 50% chỉ còn một lượng nhỏ lectin, và lượng lectin này cũng giảm dần ở các phân đoạn từ 60 - 80% (với hoạt tính đặc hiệu giảm từ 80 HAA/mg

xuống 10 HAA/mg). Độ tinh sạch ở các phân đoạn sau này cũng rất thấp, chỉ đạt từ 0,01 - 0,05 lần so với mẫu thô.

3.3. Kết quả tinh sạch lectin bằng phương pháp tủa phân đoạn muối ammonium sulfate

Theo kết quả Bảng 5 cho thấy các phân đoạn đều xuất hiện protein tủa và có hoạt tính lectin. Trong đó, ở các phân đoạn đầu từ 10 - 30% khi tăng nồng độ ammonium sulfate thì hàm lượng protein tổng, hoạt tính tổng, hoạt tính đặc hiệu, hiệu suất thu hồi và cả độ tinh sạch cũng tăng dần. Lectin tủa nhiều nhất ở phân đoạn 40% và 50% giảm dần ở các phân đoạn sau đó.

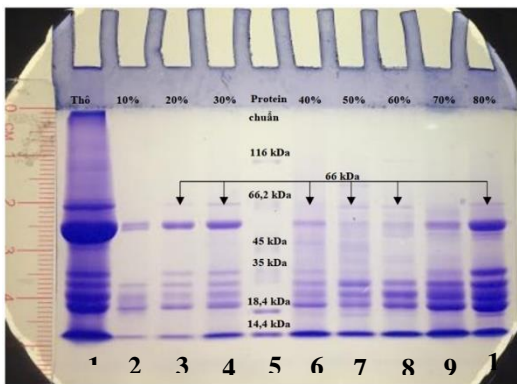
Kết quả này có thể giải thích rằng, protein tồn tại trong dung dịch do sự cân bằng của lực tĩnh điện và tương tác kỵ nước, do trên bề mặt phân tử protein có chứa những nhóm phân cực; bổ sung ammonium sulfate ở nồng độ thấp vừa giúp các phân tử protein trung hòa điện tích, vừa giúp loại bỏ lớp hydrate, do đó các protein có khối lượng phân tử lớn dễ dàng tương tác với nhau và lắng tụ (Green & Hughes, 1955). Nói cách khác, nồng độ ammonium sulfate ảnh hưởng đến độ hòa tan của protein do đó các protein khác nhau sẽ bị kết tủa ở các nồng độ ammonium sulfate khác nhau. Chính vì vậy phân đoạn tủa bằng ammonium sulfate 40% - 50% thu được protein có hoạt tính lectin cao. Phân đoạn tủa 10% - 30% và 60% - 80% thu được protein với hàm lượng thấp cùng hoạt tính ngưng kết tương đối yếu, do protein thu được ở phân đoạn này chủ yếu là những protein không mang bản chất lectin và có kích thước phân tử nhỏ hoặc lớn hơn lectin.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Munoz et al. (2005) khi cho rằng lectin từ đậu ma tủa chủ yếu bởi ammonium sulfate ở phân đoạn 45%. So với phương pháp tinh sạch sơ bộ lectin đậu ma bằng cách điều chỉnh pH của dịch lectin lần lượt ở môi trường acid và bazơ, nghiên cứu của Mai Thị Đàm Linh (2014) cho độ tinh sạch so với mẫu thô chỉ đạt 1,2 lần.

Bảng 5. Đánh giá hiệu quả tinh sạch lectin đậu ma bằng phương pháp tủa phân đoạn ammonium sulfate

Phân đoạn	Thể tích (mL)	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (HAA)	Hoạt tính đặc hiệu (HAA/mg)	Hiệu suất thu hồi hoạt tính (%)	Độ tinh sạch (lần)
Thô	65,0 ± 4,36	810 ^a ± 66,00	1.331.200 ^a ± 89,27	1.645 ^c ± 25,40	100 ^a ± 0,00	1 ^c ± 0,00
10%	6,3 ± 0,38	5 ^c ± 0,18	509 ^d ± 30,30	100 ^{ef} ± 2,31	0,04 ^d ± 0,00	0,06 ^{ef} ± 0,00
20%	4,8 ± 1,10	4 ^c ± 0,94	773 ^d ± 176,00	177 ^f ± 3,54	0,06 ^d ± 0,01	0,11 ^f ± 0,00
30%	13,2 ± 0,87	13 ^c ± 0,77	4.224 ^d ± 279,00	326 ^d ± 2,20	0,32 ^d ± 0,02	0,2 ^d ± 0,00
40%	20,6 ± 0,47	38 ^{bc} ± 0,39	105.643 ^c ± 2420,00	2.813 ^b ± 78,00	7,94 ^c ± 0,18	1,71 ^b ± 0,05
50%	23,0 ± 0,64	42 ^{bc} ± 1,07	471.723 ^b ± 13167,00	11.226 ^a ± 48,90	35,4 ^b ± 0,99	6,83 ^a ± 0,03
60%	14,5 ± 0,57	29 ^c ± 0,71	2.325 ^d ± 91,00	80 ^f ± 1,64	0,17 ^d ± 0,00	0,05 ^{fg} ± 0,00
70%	13,8 ± 0,17	43 ^{bc} ± 0,43	1.104 ^d ± 14,90	26 ^f ± 0,26	0,08 ^d ± 0,00	0,02 ^{fg} ± 0,00
80%	22,9 ± 0,46	93 ^b ± 1,27	916 ^d ± 18,30	10 ^f ± 0,18	0,07 ^d ± 0,00	0,01 ^g ± 0,00
CV%	7,69	18,40	14,10	1,75	2,09	1,69

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại với các chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%, p-value = 0,000



Hình 1. Kết quả điện di các phân đoạn protein, lectin đậu ma được tủa với ammonium sulfate

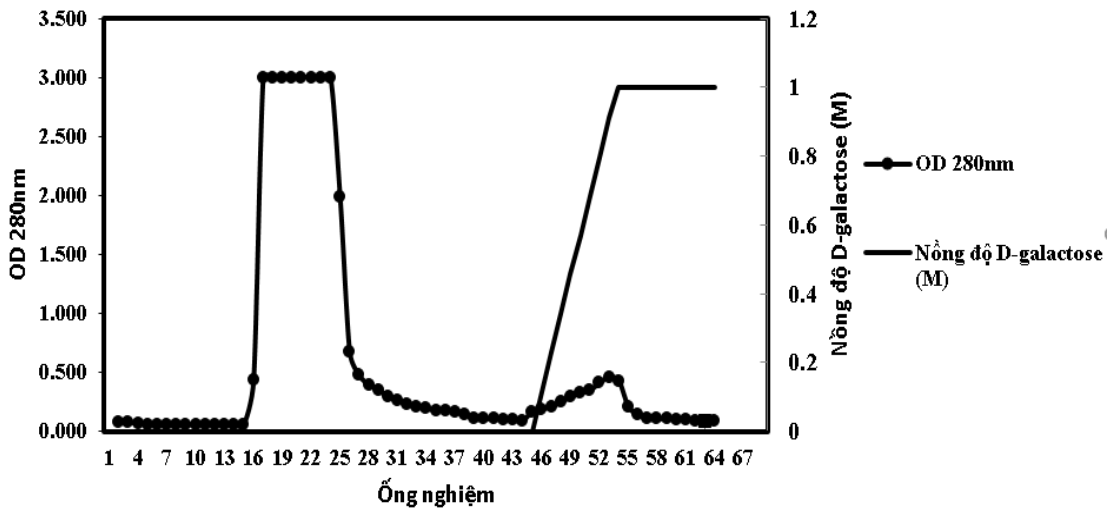
*Chú thích: Giếng 1: Thô, Giếng 2: 10% AS, Giếng 3: 20% AS, Giếng 4: 30% AS, Giếng 5: Protein chuẩn, Giếng 6: 40% AS, Giếng 7: 50% AS, Giếng 8: 60% AS, Giếng 9: 70% AS, Giếng 10: 80% AS.

Munoz et al. (2005) cho rằng lectin đậu ma là một loại protein tồn tại ở dạng dimeric có khối lượng của mỗi phân tử là 33 kDa. Kết quả điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide (Hình 1) cho thấy ở các phân đoạn từ 10% - 80% đều chứa băng protein 66 kDa. Trong đó, kết quả ngưng kết cho thấy hoạt tính và hoạt tính đặc hiệu ở phân đoạn 40% - 50%

cao hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các phân đoạn còn lại. Điều này cho thấy lượng protein bị tủa bằng ammonium sulfate từ 40% đến 50% chủ yếu là protein mục tiêu (lectin đậu ma). Vì vậy, phân đoạn tủa 40% và 50% được chọn để thực hiện cho bước tinh sạch tiếp theo.

3.4. Tinh sạch lectin bằng phương pháp sắc ký ái lực

Dịch thô sau khi được tủa ammonium sulfate 40% - 50% được xác định ở thí nghiệm trước tiếp tục sắc ký ái lực với gel Sepharose D-galactose và rửa giải bằng galactose nồng độ tăng dần từ 0 - 1 M và tiến hành đo OD ở bước sóng 280 nm. Kết quả được thể hiện trong sắc ký đồ ở Hình 2. Việc rửa giải bằng đường galactose dựa vào khả năng tương tác đặc hiệu của lectin đậu ma với galactose. Ở giai đoạn rửa giải, việc sử dụng đường ở nồng độ cao làm tăng khả năng cạnh tranh với lectin dẫn đến làm giảm khả năng bám của lectin vào hạt gel và lectin sẽ liên kết với đường ra khỏi cột gel (Urh và Zhao, 2009). Dịch lectin sau đó được thẩm tích nhằm loại galactose để thu lại lectin tinh sạch. Ở nghiên cứu này cho thấy lectin đậu ma được thu lại ở phân đoạn F1 (phân đoạn bám trên gel Sepharose D-galactose), rửa giải bằng D-galactose ở nồng độ 0,91 M cho hàm lượng và hoạt tính đặc hiệu cao nhất dựa trên độ hấp thụ ở bước sóng 280nm.



Hình 2. Sắc ký đồ tinh sạch lectin đậu ma trên gel ái lực Sepharose D-galactose

Kết quả sắc ký ở Bảng 6 cho thấy có sự khác nhau giữa hàm lượng protein, hoạt tính tổng, hoạt tính đặc hiệu ở các phân đoạn. Trong đó hoạt tính đặc hiệu ở phân đoạn F₁ cao hơn hẳn so với các nghiệm thức còn lại, cụ thể hoạt tính đặc hiệu của F₁ đạt 24.281 HAA/mg cao hơn 2 lần so với mẫu thô (1.500 HAA/mg). Bên cạnh đó, có thể thấy hàm

lượng protein của F₁ chỉ đạt 5,5 mg, trong khi phân đoạn AS đạt 227 mg, điều này chứng tỏ lectin đã được tinh sạch, loại bỏ được phần lớn protein tạp. Các protein tạp có trong mẫu dịch lectin được loại bỏ trong quá trình rửa cột do không có đặc tính liên kết đặc hiệu với phối tử (galactose) trên Sepharose D-galactose như lectin.

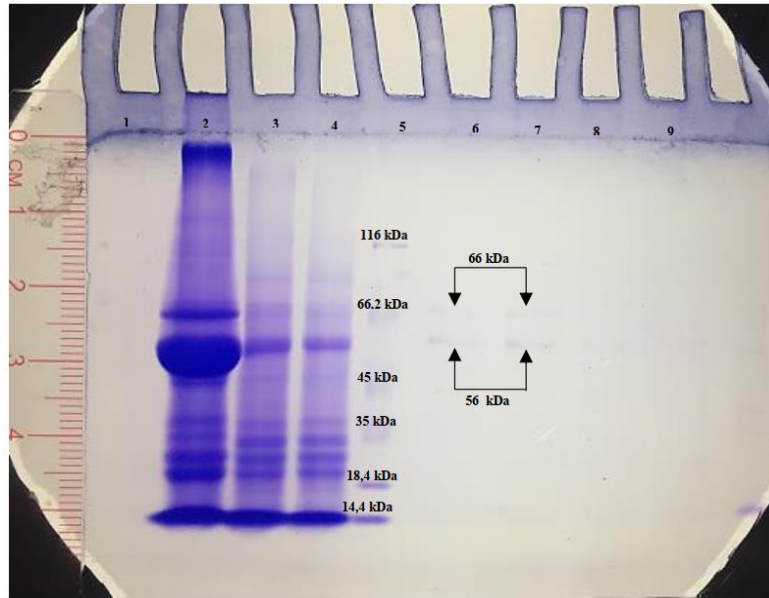
Bảng 6. Đánh giá quá trình tinh sạch lectin đậu ma

Mẫu	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (HAA)	Hoạt tính đặc hiệu (HAA/mg)	Hiệu suất thu hồi hoạt tính (%)	Độ tinh sạch (lần)
Thô	929,00 ± 1,44	1.392.640 ± 0,00	1.500 ± 2,32	100,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AS	227,00 ± 7,29	593.920 ± 0,00	2.618 ± 83,30	42,60 ± 0,00	1,75 ± 0,06
F ₁	5,50 ± 0,15	133.478 ± 0,00	24.281 ± 667,00	9,58 ± 0,00	16,20 ± 0,45

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Kết quả độ tinh sạch cho thấy phương pháp sắc ký ái lực này phù hợp để tinh sạch lectin trong đậu ma, làm tăng độ tinh sạch lectin lên 16,2 lần so với mẫu thô. So sánh với kết quả nghiên cứu của Mai Thị Đàm Linh (2014), tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion âm trên gel CM-Sephadex chỉ cho độ tinh sạch gấp 10,4 lần so với dịch chiết thô. Điều này có thể do phương pháp tinh sạch của Mai Thị Đàm Linh (2014) dựa trên tương tác trao đổi ion âm, do đó

protein thu được ở phân đoạn F₁ ngoài lectin ra, còn một phần protein cũng mang điện tích dương trong điều kiện pH 6,0. Lectin đậu ma trong khi nghiên cứu này dựa trên tương tác đặc hiệu giữa trung tâm hoạt động của lectin với gốc đường đặc hiệu (cụ thể là galactose), vì thế toàn bộ protein được giữ lại trên gel Sepharose D-galactose ở giai đoạn rửa giải đều được cho là có khả năng tương tác với galactose (hoạt tính đặc trưng của lectin đậu ma).



Hình 3. Kết quả điện di các phân đoạn protein, lectin đậu ma (*P. phaseoloides*) sau sắc ký ái lực

*Chú thích: Giếng 2: Thô, Giếng 3: 40% - 50% AS, Giếng 4: Phân đoạn UB, Giếng 5: Protein chuẩn, Giếng 6: Phân đoạn protein F₁ được xử lý bằng β-mercaptoethanol, Giếng 7: Phân đoạn protein F₁.

Kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12% (Hình 3) cho thấy, sau khi tiến hành sắc ký trên gel ái lực Sepharose D-galactose, phân đoạn F₁ đã thể hiện băng protein có khối lượng phân tử 66 kDa. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Munoz et al. (2005) khi cho rằng khối lượng phân tử lectin đậu ma là khoảng 66 kDa. Tuy nhiên, kết quả điện di trên F₁ còn xuất hiện thêm băng protein có khối lượng phân tử khoảng 56 kDa. Nguyên nhân của sự khác nhau này có thể do đặc điểm tương tác của với từng gốc đường khác nhau. Trong nghiên cứu của Munoz et al. (2005), việc tinh sạch lectin bằng tương tác đường N-galactosamine chỉ thu được loại lectin có khối lượng phân tử 66 kDa, còn tinh sạch lectin bằng sắc ký trao đổi ion âm của Mai Thị Đàm Linh (2014) thu được tiêu đơn vị của lectin với khối lượng 33 kDa.

Từ đó có thể suy luận rằng trong lectin đậu ma có 2 loại lectin có khả năng tương tác với gốc đường D-galactose có khối lượng phân tử khoảng 66 kDa và 56 kDa và chỉ có loại lectin khối lượng phân tử 66 kDa mới có khả năng tương tác với N-acetylgalactosamine trong khi lectin có khối lượng phân tử khoảng 56 kDa thì không có khả năng tương tác với loại đường này. Điều đặc biệt hơn nữa, ở 2 loại tiêu đơn vị của lectin đậu ma có khả năng tích điện khác nhau, đó cũng là nguyên nhân vì sao khi Mai Thị Đàm Linh (2014) tinh sạch lectin đậu ma bằng sắc ký trao đổi ion âm trên gel CM-Sephadex

cho kết quả băng protein của phân đoạn F₁ có hoạt tính lectin với khối lượng phân tử vào khoảng 33 kDa.

Tóm lại, lectin đậu ma (*P. phaseoloides*) sau khi tinh sạch bằng sắc ký ái lực với gel Sepharose D-galactose và rửa giải bằng galactose với nồng độ 0,91 M thể hiện hai băng protein có khối lượng phân tử lần lượt là 66 kDa và 56 kDa với hoạt tính đặc hiệu ngưng kết trên tế bào vi khuẩn *Staphylococcus* sp. đạt 24.281 HAA/mg, độ tinh sạch cao hơn 16,2 lần so với mẫu thô. Kết quả này cho thấy phương pháp sắc ký ái lực trên gel Sepharose D-galactose thích hợp cho việc tinh sạch lectin đậu ma (*P. phaseoloides*).

4. KẾT LUẬN

Lectin đậu ma (*P. phaseoloides*) được trích ly tại nhiệt độ 50°C trong 10 phút, ở tần số sóng siêu âm 22,5 kHz với tỉ lệ bột đậu: dung môi NaCl 0,9% theo tỉ lệ 1:4 (w/v) cho hiệu quả trích ly tối ưu với hoạt tính đặc hiệu khoảng 1.579 HAA/mg. Bên cạnh đó, nồng độ ammonium sulfate thích hợp cho quá trình tinh sạch lectin là 40% - 50%. Lectin sau tinh sạch bằng sắc ký ái lực có hoạt tính đặc hiệu đạt 24.281 HAA/mg với hiệu suất thu hồi đạt 9,58% và độ tinh sạch 16,2 lần so với dịch trích thô. Kết quả điện di SDS-PAGE cũng cho thấy phân đoạn F₁ này cho xuất hiện 2 băng protein có khối lượng phân tử 66 kDa và 56 kDa.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí (T2020-112), Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, 119(3091), 419-419.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 72(1), 248-254.
- Bùi Phương Thuận, Phạm Văn Ty, Ngô Tự Thành, Nguyễn Văn Mùi, Trịnh Hồng Thái, Nguyễn Quang Huy, Lê Quý Thuồng & Nguyễn Thị Thanh Nga. (2009). *Nghiên cứu đặc tính một số lectin có tác dụng phát hiện các vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm* (luận văn Thạc sĩ). Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội, trang 78-104.
- Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M. and Schultze-Kraft, R. (2005). *Tropical Forages: An interactive selection tool*. CSIRO Research Publications Repository.
- Đỗ Ngọc Liên, Nguyễn Văn Lợi, Bùi Phương Thuận, Trần Thị Phương Liên, Phạm Tuấn Anh. (2004). Sử dụng hoạt chất lectin từ nguồn tài nguyên Việt Nam trong nghiên cứu kháng thể bệnh lý. Hội nghị miễn dịch toàn quốc. *Tạp chí Y dược học Quân sự*, 295 - 299.
- Gebauer, G., Schilitz, E., Schimpl, A. & Rdi-Ger, H. (1979). Purification and Characterization of a Mitogenic Lectin and a Lectin-Binding Protein from *Vicia sativa*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, 360(2), 1727-1236.
- Green, A.A. & Hughes, W.L. (1955). Methods in Enzymology, Vol.1 "Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents", Amsterdam-Netherlands: *Eslevier*, 67-90.
- Hu, S. & David, T.W. (2009). Lectin microarray. *Proteomics - Clinical applications*, 3(2), 148-154.
- Kilpatrick, D.C. (2000). Mannan-binding lectin concentration during normal human pregnancy. *Human Reproduction*, 15(4), 9416-2350.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lê Thị Ngọc Quỳnh, Chu Đức Hà, Nguyễn Văn Kết & Lê Tiến Dũng. (2015). Lectin thực vật và tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát côn trùng gây hại. *Tạp chí Sinh học*, 37(2), 170-183.
- Nguyễn Thị Thịnh, Lê Doãn Diên, Nguyễn Quốc Khang & Phan Huy Bảo. (1983). Kết quả điều tra lectin ở một số giống đậu ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 5(4), 11-18.
- Mai Thị Đàm Linh. (2014). *Nghiên cứu phát hiện lectin thực vật có khả năng ngưng kết đặc hiệu với một số vi khuẩn gây nhiễm độc thực phẩm phổ biến* (luận án tiến sĩ Sinh học). Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc Gia Hà Nội. Hà Nội.
- Munoz, C. E., Blanco, E., Martin, D. M., Driessche, L. V. and Beeckmans, S.E. (2005). The lectin from *Pueraria phaseoloides*. In *Abstracts of the 191st Meeting of the Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology (electronic)*. Brussels Belgium.
- Suseelan, K.N., Bhatia, C.R. & Mitra, R. (1997). Characteristics of two major lectins from mung bean (*Vignaradiata*) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(3), 211-222.
- Urh, M.D.S. & Zhao, K. (2009). Method in enzymology. *Affinity chromatography: general methods*, 463, 417-438.
- Ynalvez, M.A. & Shrum, W.M. (2011). Professional networks, scientific collaboration, and publication productivity in resource-constrained research institutions in a developing country. *Research Policy*, 40(2), 204-216.