NGHIÊN CỨU VỀ METALLOTHIONEIN CỦA TRAI CÁNH XANH - *CRISTARIA BIALATA*

ĐOÀN VIỆT BÌNH, NGUYỄN THỊ KIM DUNG, PHAN VĂN CHI

Viện Công nghệ sinh học

Metallothionein là một loại protein nội bào có khả năng gắn kết và giải phóng kim loại tuỳ theo các điều kiện hác nhau. Vì vậy, chúng giữ vai trò quan trọng trong việc giữ ổn định hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong tế bào, điều chỉnh hoạt tính của chúng, bảo vệ cơ thể trước tác động của các nguyên tố kim loại nặng độc hại.

Nghiên cứu về metallothionein mang lại nhiều khả năng ứng dụng khác nhau. Ở người và động vật, metallothionein có thể dùng là chất chỉ thị sinh học để phát hiện những cá thể bị nhiễm độc kim loại. Metallothionein cũng là chất chỉ thị cho môi trường sống của sinh vật bị ô nhiễm kim loại, đặc biệt là những kim loại nặng [2].

Các loài nhuyễn thể hai mảnh vỏ thường xuyên sống ở tầng đáy của các thuỷ vực và sống bằng cách lọc thức ăn qua nước và lớp bùn ở dưới đáy, vì vậy chúng được chọn sử dụng để nghiên cứu về ô nhiễm môi trường nước, đặc biệt là nghiên cứu về ô nhiễm kim loại nặng [5].

Đã có nhiều công trình trên thế giới nghiên cứu tách chiết, tinh chế và một số đặc điểm sinh hoá của metallothionein của các loài hai mảnh vỏ sống trong nước biển như vẹm [1, 9], điệp [10], ngao [11]... Tuy nhiên, gần như chưa có công trình nào nghiên cứu về protein này ở các loài hai mảnh vỏ sống trong nước ngọt.

Ở nước ta, trong thời gian gần đây do sự phát triển ồ ạt của nhiều ngành công nghiệp và sự thiếu ý thức của các doanh nghiệp trong việc xử lý nước thải, bảo vệ môi trường nên nhiều vùng biển và nhiều thủy vực nước ngọt có biểu hiện bị ô nhiễm, đặc biệt là ô nhiễm các kim loại nặng, gây tác động xấu đến sức khỏe của con người [4, 8].

Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày những kết quả bước đầu nghiên cứu về metallothionein của trai cánh xanh (*Cristaria bialata*), một loài động vật hai mảnh vỏ có phân bố rộng rãi trong các ao, hồ, sông ngòi của nước ta.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Trai cánh xanh: dài 7,5 cm, rộng 6,1 cm, trọng lượng 24,5 g.

2. Phương pháp

a. Phương pháp nuôi để kích thích sinh tổng hợp metallothionein

Để kích thích sự sinh tổng hợp metallothionein ở trai cánh xanh, chúng tôi đã nuôi trai trong điều kiện phơi nhiễm với một kim loại nặng là Cd. Trai được nuôi trong bể kính có dung tích 80 lít nước, kích thước 55 cm × 55 cm × 28 cm, có máy sục khí liên tục 24/24 giờ. Mỗi bể nuôi 4 con trai. Trai được cho ăn bằng tảo silic và tảo spirulina. Bể kính nuôi trai được chiếu sáng bằng đèn nê-ông thông thường trong phòng thí nghiệm và ánh sáng qua cửa sổ. Nước trong bể nuôi luôn được bổ sung $CdCl_2$ để đạt được nồng độ 15 µg/l. Nước được thay liên tục, 2-3 ngày/lần. Trong quá trình thí nghiệm, nước trong bể nuôi được thường xuyên kiểm tra và duy trì ổn định như sau: nồng độ Cd^{2+} (15 µg/l), pH (7 - 7,5), nồng độ ôxy hòa tan (3 - 5 mg/l), độ kiềm (80 mg/l); nồng độ NH_4^+ (< 0,5 mg/l), NO_2^- (< 0,1 mg/l) và NH_3 (< 0,1 mg/l). Sau mỗi tuần nuôi trong điều kiện thí nghiệm, trai lại được chuyển sang bể nuôi không có bổ sung Cd^{2+} để nuôi trong một tuần.

Đo hàm lượng Cd theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trên hệ máy AAS-3300 của hãng Perkin-Elmer (USA).

Đo nồng độ ôxy hòa tan trong nước bằng máy DOT-0204 do Viện Khoa học Vật liệu

(Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) sản xuất.

Đo pH của bể nước bằng giấy đo pH neutralit của hãng Merck.

Kiểm tra độ kiềm; nồng độ NH_4^+, NO_2^-, NH_3 bằng EVT - Kit của Trung tâm Môi trường thuộc Viện Địa chất.

b. Phân tích hàm lượng metallothionein

Theo phương pháp của D. L. Eaton và cs. [6].

c. Phân tích hàm lượng Cd

Theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trên hệ máy AAS - 3300 của hãng Perkin-Elmer (USA).

d. Phương pháp tách chiết metallothionein

Thu dịch tế bào có chứa Metallothionein: mô của tuyến tiêu hóa của trai được xử lý theo phương pháp của D.C Simes và cs. [11] để thu được dịch tế bào có chứa metallothionein.

Sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G75: dịch tế bào có metallothionein được đưa lên cột Sephadex G-75 (Pharmacia - Thuỵ Điển) kích thước 95 × 1,8 cm, tốc độ chạy 1 ml/phút, thôi protein bằng dung dịch Tris-HCl 0,02 M, pH 8,6 và thu các phân đoạn 5 ml. Đo độ hấp thụ tia tử ngoại trên máy Shimadzu UV-1601 (Nhật Bản) trên các bước sóng 254 và 280 nm. Xác định hàm lượng Cd có trong mỗi phân đoạn bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

Sắc ký trao đổi ion trên DEAE-cellulose: các phân đoạn thu được sau khi chạy cột sephadex đã được xác định là có chứa hàm lượng Cd cao được gom lại, đông khô rồi đưa lên cột DEAE-cellulose (TCI - Nhật Bản), kích thước 8 × 2,8 cm, thôi protein bằng Tris-HCl 0,02M và 0,4M, pH 8,6, thu các phân đoạn 4 ml. Đo độ hấp thụ tia tử ngoại trên máy Shimadzu UV-1601 (Nhật Bản) trên các bước sóng 254 và 280 nm. Xác định hàm lượng Cd có trong mỗi phân đoạn bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

e. Xác định khối lượng phân tử của metallothionein

Khối lượng phân tử của metallothionein được xác định bằng phương pháp điện di gel SDS-PAGE theo Laemmli [3].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự sinh tổng hợp metallothionein trong điều kiện môi trường ô nhiễm Cd

Kết quả theo dõi sự phát triển của trai cánh xanh sống trong môi trường có hàm lượng cao Cd trong thời gian hơn một tháng cho thấy trai vẫn phát triển kích thước và tăng trọng lượng (bảng 1).

Tuy nhiên, càng về cuối thời gian thí nghiệm thì trai có biểu hiện vận động ít hơn và lọc thức ăn cũng kém hơn. Điều đó cho thấy, hàm lượng Cd cao trong thời gian dài rõ ràng có ảnh hưởng đến sức khỏe của trai.

Bảng 1

Sự phát triển của trai cánh xanh sống trong điều kiện ô nhiễm Cd

STT	Thời gian	Ngày 1	Sau 21 ngày	Sau 35 ngày
1	Trọng lượng (g)	24,5	27,75	33
2	Chiều dài (cm)	7,5	7,7	7,75
3	Chiều rộng (cm)	6,1	6,25	6,3

Kết quả phân tích hàm lượng metallothionein trong mô tuyến tiêu hóa của trai (bảng 2) cho thấy càng sống lâu trong điều kiện nước bị ô nhiễm Cd thì càng có nhiều metallothionein được tổng hợp. Như vậy, với đặc tính này, metallothionein của trai cánh xanh cũng có thể nghiên cứu sử dụng dùng làm chỉ thị cho môi trường ô nhiễm kim loại nặng.

Bảng 2

Hàm lượng metallothionein của trai cánh xanh sống trong điều kiện ô nhiễm Cd

Thời gian	Ngày 1	Sau 21 ngày	Sau 35 ngày
Metallothionein (μg/g mô tươi)	42,25	128,87	202,68

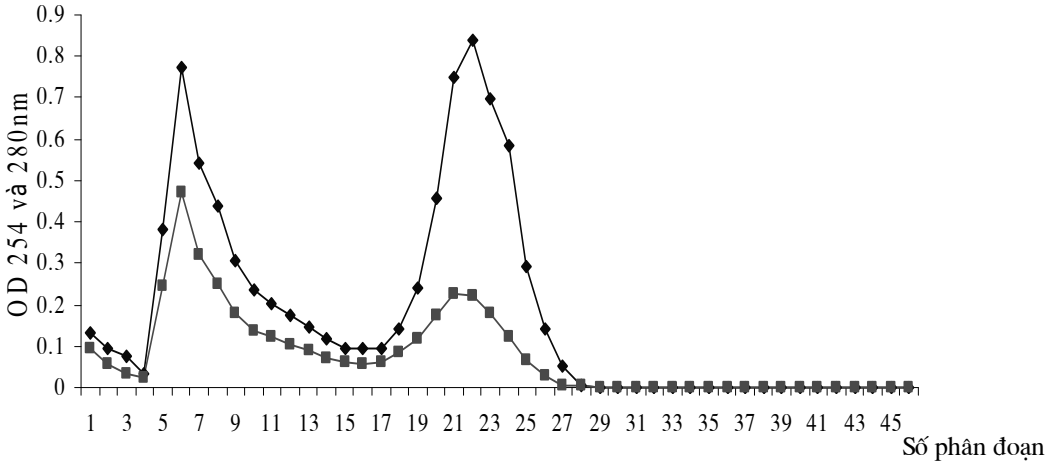
2. Sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G-75

Protein của dịch tế bào mô tuyến tiêu hoá của trai cánh xanh phân đoạn trên cột Sephadex G-75, tổng số thu được 46 phân đoạn (hình 1). Kết quả tách được 2 đỉnh. Đỉnh thứ nhất ở phân đoạn số 7 và đỉnh thứ hai ở phân đoạn số 23. Đồng thời kết quả cũng cho thấy đo ở bước sóng 254 nm thu được kết quả tốt hơn ở bước sóng 280 nm.

Khi đo kiểm tra hàm lượng Cd các phân đoạn từ 1-46 (hình 2) thì phân đoạn số 11 có hàm lượng Cd cao nhất (23,81 µg/l). Các phân đoạn đối xứng hai bên của phân đoạn này là các phân đoạn số 9, 10 và 12, 13 có hàm lượng Cd lần lượt theo thứ tự là 5,82, 16,4 và 14,82, 9,38 µg/l. Phân đoạn số 23 chỉ có hàm lượng 0,33 µgCd/l. Như vậy, chỉ trong các phân đoạn từ số 9 -13 là có khả năng có metallothionein vì protein này có khả năng gắn kết rất tốt với kim loại, đặc biệt là với Cd.

Nghiên cứu về metallothionein của các loài vẹm biển *Mytilus galloprovincialis* và *Mytilus edulis*, của điệp *Adamussium colbecki*, các tác giả E. Carpene và cs. [1], J. M. Frazier và cs. [7], E. Ponzano và cs. [10] cũng thu được hai phân đoạn khi cho dịch tế bào chạy trên cột sắc ký lọc gel và sau đó đo kiểm tra nồng độ Cd trong các phân đoạn thu được. Hai phân đoạn này được đặt tên là MT1 và MT2. MT1 là metallothionein có khối lượng phân tử khoảng 25 000 Dalton, lớn hơn MT2 có trọng lượng phân tử chỉ vào khoảng 6000-7000 Dalton. Cũng theo các tác giả trên thì do phân tử metallothionein có chứa nhiều lưu huỳnh (tới 30%) nên đo ở bước sóng 254 nm hấp thụ tốt hơn.

Như vậy theo phỏng đoán của chúng tôi thì cả MT1 và MT2 của trai cánh xanh đều nằm trong đỉnh thứ nhất của sắc ký đồ lọc gel trên cột Sephadex G75 (hình 1).



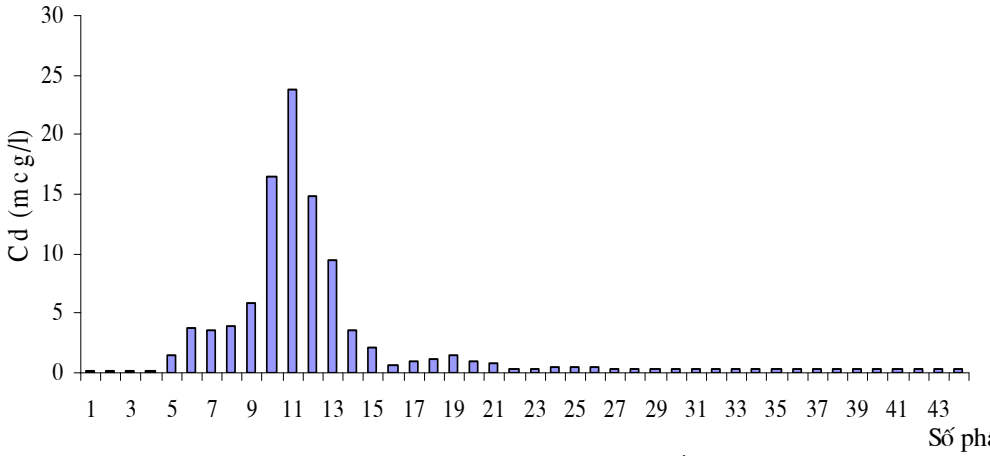
Hình 1. Sắc ký dịch tế bào tuyến tiêu hoá của trai cánh xanh trên gel Sephadex G-75 (-▲-: OD 254 nm; -■-: OD 280 nm).

3. Sắc ký trao đổi ion trên DEAE-cellulose

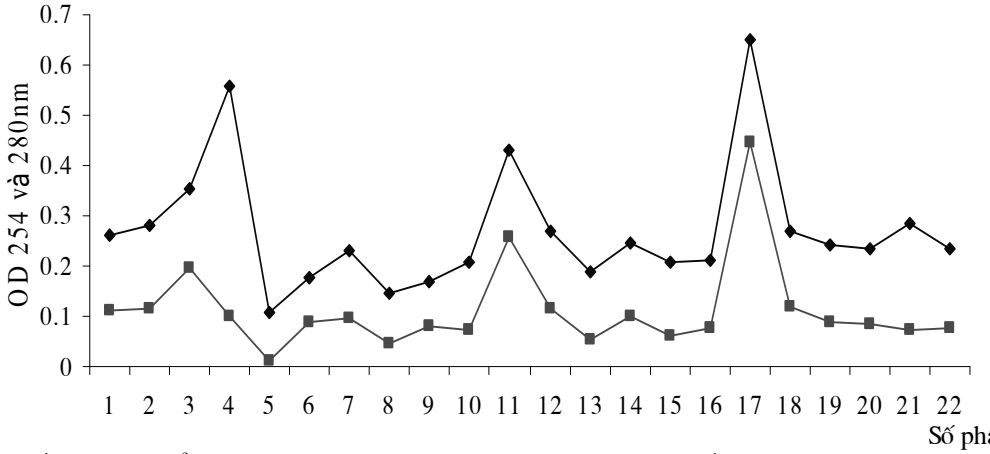
Để tiếp tục làm sạch phân tử protein đã thu được qua sắc ký lọc gel Sephadex chúng tôi đã lấy phân đoạn số 11 cho chạy tiếp trên cột sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose, tổng số thu được 22 phân đoạn (hình 3). Kết quả thu được 4 đỉnh ở các phân đoạn số 4, 7, 11 và 17. Tuy nhiên, khi đo kiểm tra nồng độ Cd trong các phân đoạn thu được thì chỉ có phân đoạn số 11 và số 17 là có hàm lượng Cd cao (1,76 và 1,17 µg/l) (hình 4). Phân đoạn số 4 và phân đoạn số 7 có hàm lượng Cd rất nhỏ (0,12 và 0,24 µg/l), còn ít hơn cả các phân đoạn khác. Như vậy, chỉ ở 2 phân đoạn số 11 và 17 có protein gắn kết với Cd. Trong phân đoạn số 4 và số 7 có protein nhưng đó không phải là protein gắn kim loại; và như vậy, trong các phân đoạn đó không có metallothionein.

Khi tiếp tục làm sạch các phân tử protein chứa kim loại thu được sau khi sắc ký lọc gel

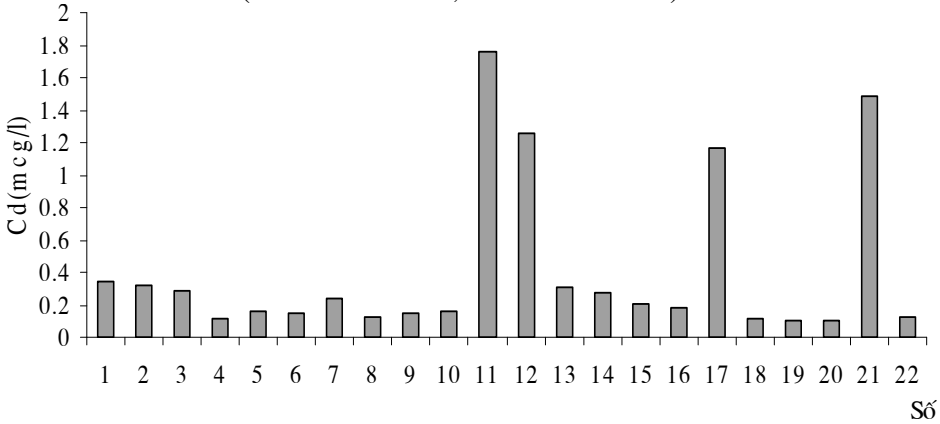
bằng sắc ký trao đổi ion, nhiều công trình nghiên cứu của các tác giả khác [1, 7, 11] cũng đã thu được từ 2-4 đỉnh có hàm lượng Cd cao. Theo các nhà nghiên cứu này thì đó chính là các đồng dạng (isoform) khác nhau của phân tử metallothionein. Các đồng dạng này có cùng trọng lượng phân tử nhưng khác nhau về hoá trị và chính do có sự khác nhau này mà metallothionein có khả năng gắn kết với nhiều loại kim loại khác nhau.



Hình 2. Hàm lượng Cd trong các phân đoạn sau khi sắc ký lọc gel Sephadex G-75



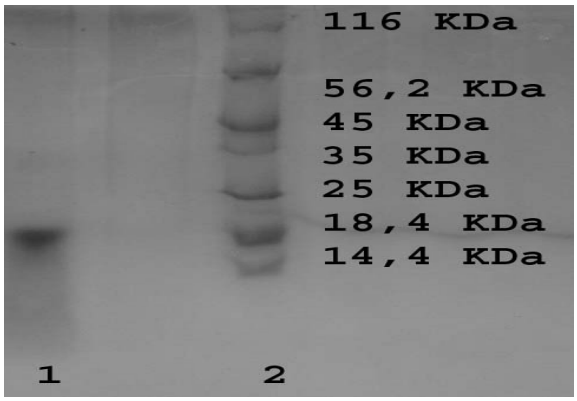
Hình 3. Sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose phân đoạn số 11 của sắc ký lọc gel Sephadex G-75 (-▲-: OD 254 nm; -■-: OD 280 nm).



Hình 4. Hàm lượng Cd trong các phân đoạn của sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose

4. Khối lượng phân tử của metallothionein của trai cánh xanh

Kết quả điện di cho thấy metallothionein của trai cánh xanh có khối lượng phân tử khoảng 18,5 kDa (hình 5). Như vậy metallothionein của trai cánh xanh có khối lượng phân tử gần bằng metallothionein của loài vẹm *Mutilus edulis* do Mackay và cộng sự đã xác định được [9].



Hình 5. Điện di SDS-PAGE của các phân đoạn sắc ký trên cột Sephadex G-75 của dịch tuyến tiêu hóa của trai cánh xanh.
1. phân đoạn số 11; 2. Marker.

III. KẾT LUẬN

1. Trong điều kiện nuôi thí nghiệm với nồng độ Cd trong nước là 15 µg/l, hàm lượng metallothionein đo được trong dịch tế bào tuyến tiêu hoá của trai cánh xanh tăng dần từ 42,25 (ngày bắt đầu thí nghiệm) lên 128,87 (sau 21 ngày) và 202,68 µg/g mô tươi (sau 35 ngày). Metallothionein của trai cánh xanh có thể tiếp tục nghiên cứu để sử dụng làm chỉ thị cho môi trường ô nhiễm kim loại nặng (Cd).

2. Đã tách chiết và thu được các phân đoạn có chứa metallothionein của trai cánh xanh bằng sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose.

3. Metallothionein của trai cánh xanh có khối lượng phân tử 18,5 kDa và có 2 đồng dạng được phát hiện.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gien, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Carpene E.**, **O. Cattani**, **G. Hakim**, **G. P. Serrazanetti**, 1983: Comp. Biochem. Physiol., 74C(2): 331-336.
2. **Dallinger R.**, **Berger B.**, **Gruber C.**, **Hunziker P.**, **Stürzenbaum S.**, 2000: Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand), 46(2): 331-46.
3. **Laemmli U. F**, 1970: Nature, 227: 680-685.
4. **Lưu Văn Diệu** và **cs.**, 1999: Điều tra đánh giá hàm lượng các kim loại nặng Cu, Pb, Zn, Cd, As và Hg trong môi trường và sinh vật hai mảnh vỏ vùng vịnh Hạ Long: 5-28. Trung tâm Khoa học và Công nghệ quốc gia, Phân Viện hải dương học.
5. **Diniz M. S.**, **Santos H. M.**, **Costa P. M.**, **Peres I.**, **Costa M. H.**, **Capelo J. L.**, 2007: Biomarkers, 12(6): 589-98.
6. **Eaton D. L.**, **B. F. Toal,** 1982: Toxicology and Applied Pharmacology, 66: 134-142.
7. **J. M. Frazier**, **S. S. George**, **J. Overnell**, **T. L. Coombs**, **J. Kagi**, 1985: Comp. Biochem. Physiol., 80C(2): 257-262.
8. **Phan Thị Thu Hằng**, **Nguyễn Thế Đặng**, 2007: Hàm lượng kim loại nặng (Pb, Cd, As) trong nước tưới khu vực chuyên canh rau của thành phố Thái Nguyên, Khoa học đất, 28: 49-53.
9. **Mackay E. A.**, **Overnell J.**, **Dunbar B.**, **Davidson J.**, **Hunziker P. E.**, **Kaegi J. H. R.**, **Fothergill J. E.** 1993: Eur. J. Biochem., 218: 183-194.
10. **E. Ponzano**, **F. Dondero**, **J. M. Buoquegneau**, **R. Sack**, **P. Hunziker, A. Viarengo,** 2001: Polar Biol., 24: 147-153.
11. **Simes D.C.**, **M. J. Bebianno**, **J. J. G. Moura**, 2003: Aquatic Toxicology, 63: 307-318.

RESEARCH ON METALLOTHIONEIN OF THE FRESHWATER MUSSEL *CRISTARIA BIALATA*

DOAN VIET BINH, NGUYEN THI KIM DUNG, PHAN VAN CHI

SUMMARY

Metallothionein is a cytoplasmic protein witch may serve a detoxication function or as a storage/transport protein for essential trace metals in animals. Metallothionein of bivalve molluscs are often used for evaluation of heavy metal environmental pollution.

In this article we report about our fist results on research of metallothionein of the freshwater mussel (*Cristaria bialata*)**.** The induction of metallothionein was carried out in experiment with exposure to $CdCl_2$. The mussel were kept in a 80L aquaria with aerated freshwater contaminated with 15 μgCd^{2+}/l. The water in aquaria was changed two times a week. The mussel were fed every two days with a small amount of fresh diatoms or spirulina. They were transferred into fresh medium every second week. Contents of metallothionein were analyzed by the Cd/Hemoglobin affinity assay. The determinated values of metallothionein are 128.87 (after 21 days) and 202.68 µg/g wet weight (after 35 days). Metallothionein was isolated from the digestive gland of the mussel by gel filtration chromatography with Sephadex G-75. Fractions were monitored for absorbance at 254 and 280 nm by UV spectrophotometer and showed higher absorbance at 254 then at 280 nm. Cadmium content of the fractions was analyzed by atomic absorption spectrometry. The Cd^{2+}-containing peak fractions were pooled, lyophilized and further purified by ion exchange chromatography with DEAE-cellulose. The elution profiles of the fractions showed 2 isoforms of metallothionein. The determinate value of the molecular weight of metallothionein of the freshwater mussel is 18,5 kDa. Metallothionein of the freshwater mussel (*Cristaria bialata*) could be propose to use as biomarker for water pollution heavy metal (Cadmium).

Ngày nhận bài: 15-4-2009