

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG BẮT GIỮ KHÁNG THỂ IGG TỪ HUYẾT THANH NGƯỜI CỦA LECTIN ĐẬU ĐAO BIỂN (*CANAVALIA MARITIMA*, AUBLET) BẰNG KỸ THUẬT LECTIN - ELISA

TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, TRƯƠNG VĂN CHÂU

Trường đại học Sư phạm Hà Nội 2

ĐỖ NGỌC LIÊN

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

Đậu dao biển (*Canavalia maritima* Aublet) có nguồn gốc từ Brazil, thường sống ở các vùng nhiệt đới ven biển và cũng được liệt kê vào các loài cây đậu ăn hạt ở các vùng Đông Nam Á [3]. Cùng với loài đậu rựa thường mọc ở rừng núi (*Canavalia ensiformis* D. C.) và đậu gươm (*Canavalia gladiata* (Jacq) D. C.) đã được tìm thấy ở Việt Nam (Nguyễn Đăng Khôi, 1976), các loài này đều chứa một loại protein có hoạt tính ngưng kết hồng cầu là ConA (từ *C. ensiformis*), ConG (từ *C. gladiata*) và ConM (từ *C. maritima*) [4-8]. Tuy nhiên, ở Việt Nam có thể có một số biến dạng về loài *Canavalia maritima*, nên có tên khác là *Canavalia obtusifolia* (Lam) D. C. và *Canavalia rosea* (Swartz) D. C.

Lectin là một dạng glycoprotein có khả năng tương tác rất đặc hiệu và rất tinh vi với các gốc đường. Ứng dụng đặc tính này, những năm cuối cùng của thế kỷ XX, các nhà khoa học đã sử dụng lectin để nghiên cứu sự biểu hiện kháng thể và kháng nguyên.

Vì vậy, việc tìm hiểu đặc tính ái lực hoá học của lectin ConM từ hạt đậu dao biển (*Canavalia maritima*) đối với các kháng thể trong huyết thanh người là điều cần thiết, tạo cơ sở khoa học cho việc ứng dụng nó một cách an toàn và khoa học.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Hạt đậu dao biển được thu hái tại khu vực chân núi Ngũ Hành, Quảng Nam, Đà Nẵng, do TS. Nguyễn Đăng Khôi định loại [1].

Hồng cầu được Viện Huyết học và truyền máu Trung ương cung cấp gồm các nhóm máu A, B, O được rửa 3 lần với dung dịch muối sinh lý (NaCl 0,9%).

Các mẫu huyết thanh người khoẻ bình thường đã được chuẩn đoán lâm sàng được viện Huyết học và Truyền máu TW cung cấp.

2. Phương pháp

Tinh sạch lectin được thực hiện theo kỹ thuật của Golstein và cs. (1986) [5] có cải biến.

Tinh chế kháng thể IgG từ huyết thanh bằng cột chuẩn sắc kí ái lực Sepharo - ProteinA của hãng SIGMA và cột ConM - Sepharose 4B tự tạo [2].

Xác định thành phần các protein từ dịch chiết, từ các phân đoạn lectin đã tinh chế và từ các phân đoạn IgG đã tinh chế bằng kỹ thuật điện di trên gel SDS - PAGE theo Laemmli, với nồng độ 12% [2].

Xác định khả năng bắt giữ các kháng thể trong huyết thanh được thực hiện theo phương pháp ELISA - LECTIN.

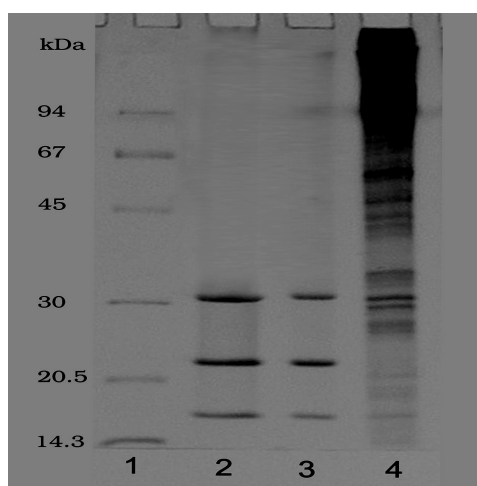
Các hoá chất đã sử dụng có độ tinh sạch cao của hãng Sigma (Mỹ), Merk (Đức), LKB (Thụy Điển): Protein chuẩn, Sepharose-ProteinA, Sephadex G - G75, cộng hợp kháng IgG, cơ chất OPD.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tinh chế lectin từ hạt đậu dao biển

Không giống như một số loại lectin khác đã được tinh chế, lectin từ hạt đậu dao biển (ConM) hoàn toàn không biểu hiện hoạt tính trong đệm

PBS, đệm carbonat và dung dịch muối sinh lý, mà chỉ biểu hiện trong đệm TBS có chứa Ca^{2+} , và Mn^{2+} . Đặc biệt nếu kết tủa dịch chiết thô bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aceton lạnh, hay cồn lạnh thì ConM cũng hoàn toàn bị mất hoạt tính. Do đó ConM đã được tinh chế bằng cách bỏ qua giai đoạn kết tủa, dịch chiết thô được đưa trực tiếp qua cột sắc kí lọc gel G75. Kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12% có SDS và 2- β -mercaptoethanol cho thấy chế phẩm lectin conM đều cho 3 băng, một băng chính lớn nhất có khối lượng vào khoảng 33 kDa, một băng có khối lượng vào khoảng 23 kDa, một băng nhỏ nhất có khối lượng khoảng 18 kDa (hình 1). Kết quả này phù hợp với kết quả của các tác giả Ramos M. V. và cs. [6], Moreira R. A. và cs. [7].

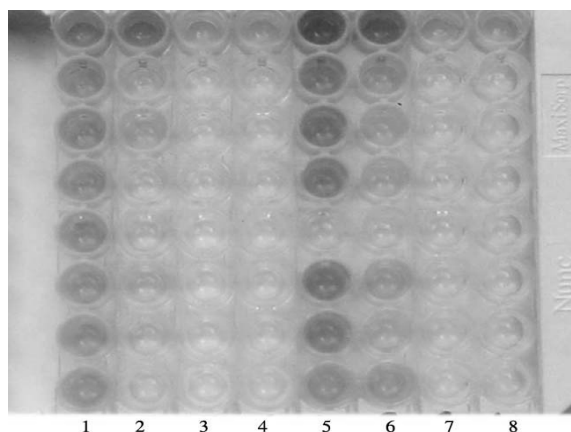


Hình 1. Điện di SDS - PAGE chế phẩm ConM

Ghi chú: 1. Protein chuẩn (Phosphorylaza 94,7 kDa; BSA 67 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Carbonic - anhydrase 30 kDa; Soybean trypsin inhibitor 24 kDa; Lysozyme 14,4 kDa); 2, 3. Chế phẩm lectin ConM tinh sạch; 4. Dịch chiết thô từ hạt đậu dao biển.

2. Nghiên cứu khả năng bắt giữ kháng thể của ConM

Khả năng nhận biết các gốc carbohydrat của các hợp chất đường là một trong những đặc tính quan trọng của lectin. Vì IgG là một glycoprotein nên căn cứ vào đặc tính này chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng bắt giữ IgG của lectin đậu dao biển. Kết quả cho thấy, ConM có khả năng liên kết với kháng thể IgG (được thể hiện ở hình 2).



Hình 2. Kết quả bắt giữ IgG của lectin đậu dao biển ConM

Ghi chú: 1, 2, 5, 6. Kết quả bắt giữ IgG của lectin ConM; 3. Lectin đậu dao biển ConM không tương tác với IgA; 4. Lectin đậu dao biển ConM không tương tác với IgM; 7. Lectin đậu dao biển ConM không tương tác với IgE; 8. Lectin đậu dao biển ConM không tương tác với IgD.

Việc sử dụng lectin liên kết với một dòng kháng thể nào đó có ý nghĩa rất quan trọng khi theo dõi sự biến động hàm lượng một kháng thể của dịch cơ thể trong nghiên cứu biểu hiện bệnh lí ở người và động vật. Chính vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng bắt giữ kháng thể IgG của lectin tinh chế từ hạt đậu dao biển.

Để chứng minh được khả năng bắt giữ đặc hiệu IgG của ConM chúng tôi đã tiến hành một quy trình thực nghiệm như sau:

1. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgG từ huyết thanh người và dùng anti IgG cộng hợp với PO để nhận biết.

2. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgA từ huyết thanh người và dùng anti IgA cộng hợp với PO để nhận biết.

3. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgM từ huyết thanh người và dùng anti IgM cộng hợp với PO để nhận biết.

4. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgE từ huyết thanh người và dùng anti IgE cộng hợp với PO để nhận biết.

5. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM

cho xét nghiệm ELISA đối với IgD từ huyết thanh người và dùng anti IgD cộng hợp với PO để nhận biết.

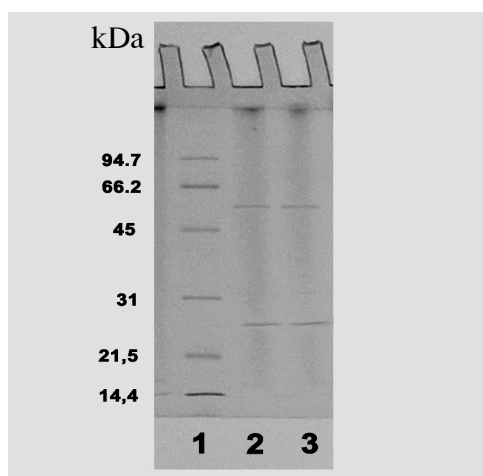
Kết quả như sau (hình 2): thực hiện theo bước 1 thì thu được kết quả dương tính, còn thực hiện theo các bước 2, 3, 4, 5 thì kết quả thể hiện âm tính. Điều này đã chứng tỏ rằng lectin ConM không liên kết với kháng thể khác của người mà chỉ liên kết với kháng thể IgG.

Đây là một đặc tính quý của lectin tinh chế từ hạt đậu dao biển, cần ứng dụng đặc tính quý này trong nghiên cứu Hoá sinh và Y học.

3. Tinh chế IgG từ huyết thanh người khỏe

Lectin ConM sau khi tinh chế được gắn với Sepharose 4B đã được hoạt hoá bằng CNBr để tạo cột ConM-Sepharose 4B. Cột này được dùng để tinh chế kháng thể IgG từ huyết thanh người khỏe.

Ngoài ra IgG còn được tinh chế bằng cách sử dụng cột chuẩn ProteinA - Sepharose (hãng SIGMA - USA) để so sánh với cột tự tạo ConM-Sepharose 4B.



Hình 3. Ảnh điện di SDS - PAGE chế phẩm IgG tinh sạch

Ghi chú: 1. Các protein chuẩn của hãng SIGMA; 2. IgG tinh sạch bằng cột ConM - Sepharose 4B; 3. IgG tinh sạch bằng cột Protein A - Sepharose 4B; 4. Dịch IgG thô.

Kết quả thu được thể hiện ở hình 3 chứng tỏ chế phẩm IgG thu được hoàn toàn tinh sạch, chỉ biểu hiện 2 băng duy nhất là chuỗi nặng (53 kDa) và chuỗi nhẹ (25 kDa) khi kiểm tra bằng

kỹ thuật SDS-PAGE (hình 3). Chứng tỏ rằng hoàn toàn có thể sử dụng cột ConM -Sepharose 4B để tinh chế kháng thể IgG từ huyết thanh người.

Kết quả này một lần nữa chứng minh rằng lectin ConM chỉ liên kết đặc hiệu với kháng thể IgG mà không liên kết với các lớp kháng thể khác trong huyết thanh người.

Kháng thể IgG sau khi tinh chế được dùng để xây dựng đồ thị tiêu chuẩn cho kỹ thuật xét nghiệm ELISA - LECTIN khi dùng lectin ConM gắn bản.

III. KẾT LUẬN

1. ConM đã được tinh chế từ hạt đậu dao biển trên cột sắc kí Sephadex G - 75 trong đệm TBS có chứa Ca^{2+} và Mn^{2+} ở nồng độ 3 mM, bỏ qua giai đoạn kết tủa. Độ tinh sạch của lectin ConM được đánh giá bằng điện di trên gel polyacrylamid 12% có mặt SDS và 2-mecaptoethanol.

2. Lectin tinh chế từ hạt đậu dao biển liên kết đặc hiệu với kháng thể IgG, không liên kết với các lớp kháng thể khác trong huyết thanh người.

3. Hoàn toàn có thể sử dụng cột Sepharose - ConM tự tạo để tinh chế kháng thể IgG từ huyết thanh người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Đăng Khôi**, 1979: Nghiên cứu về cây thức ăn cho gia súc ở Việt Nam: 93-94, tập 1. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. **Đỗ Ngọc Liên**, 2004: Thực hành Hoá sinh miễn dịch: 92-100. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. **Van der Macsen J. G. & Somantmadja S.**, 1996: Tài nguyên thực vật Đông Nam Á, các cây đậu ăn hạt (tiếng Việt, người dịch: Dương Đức Huyền). Nxb. Khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
4. **Decastle B. R. and Homer B. B.**, 1973: Properties of ConcanavalinA. Biochem, Biophys. Acta., 322: 141-144.
5. **Goldstein I. J. and Poretz R. D.**, 1986: Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-Binding Specificity of

- Lectins, Academic Press, Inc: 185-188.
6. **Moreira R. A., Cordeiro E. F.**, 1993: Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*, Department de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, CP 6020, Fortaleza, CE, 60451-970, Brazil.
7. **Strosberg A. D., Dominique B., Mark L. and Andrew F.**, 1986: Legume lectins: A large family of homologous protein. The lectin: properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, INC: 251-262.

STUDY ON CAPTURE CAPACITY OF IGG FROM HUMAN SERUM OF LECTIN FROM *CANAVALIA MARITIMA* BY LECTIN - ELISA TECHNIQUE

TRAN THI PHUONG LIEN,
TRUONG VAN CHAU, DO NGOC LIEN

SUMMARY

The lectin from *Canavalia maritima* Aublet seeds (ConM) was purified by Sephadex G - 75 column chromatography. Its purity was assessed by SDS - PAGE in presence of 2 - mercaptoethanol. The SDS - PAGE result show that the purified lectin from *Canavalia maritima* Aublet comprise three bands of protein which are approximately 33, 23 and 18 kDa.

With the aim to seek and use a lectin which is specific antibody from human serum, we investigate the capacity capturing specifically IgG purified from human serum in comparison with the other immunoglobulins as IgA, IgM, IgD, IgE from human serum. The results obtained by using LECTIN - ELISA technique show that the lectin from *Canavalia maritima* Aublet seeds has a capacity capturing specifically IgG from human serum. We prepared the *ConM* - Sepharose 4B to purify the IgG from human serum. Again, the result obtained demonstrated the specificity of the *Canavalia maritima* lectin - IgG interaction.

Ngày nhận bài: 30-11-2007