

BƯỚC ĐẦU SỬ DỤNG LECTIN ĐẬU ĐAO BIỂN (*CANAVALIA MARITIMA*, AUBLET) TRONG ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ IGG TỪ HUYẾT THANH NGƯỜI

TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, TRƯƠNG VĂN CHÂU

Trường đại học Sư phạm Hà Nội 2

ĐỖ VĂN PHÚC, 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 [2, 4]. 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 [2], các loài này đều chứa một loại protein được gọi chung là lectin có hoạt tính ngưng kết hồng cầu là ConA (từ *C. ensiformis*), conG (từ *C. gladiata*) và ConM (từ *C. maritima*) [5, 6]. Tính chất điển hình của lectin là có khả năng liên kết với các gốc đường đơn và các gốc đường nằm trên bề mặt tế bào [7]. Ứng dụng tính chất này, những năm cuối 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 sử dụng lectin ConM từ hạt đậu dao biển (*Canavalia maritima*, Aublet) để định lượng kháng thể trong huyết thanh người là điều cần thiết có ý nghĩa khoa học và thực tiễn y 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 Nguyễn Đăng Khôi định loại.

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 muối sinh lý (NaCl 0,9%).

Các mẫu huyết thanh người khỏe bình thường đã được chuẩn đoán lâm sàng được Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương cung cấp.

2. Phương pháp

Tinh chế kháng thể IgG từ huyết thanh bằng cột sắc kí ái lực Protein A - Sepharose 4B và cột ConM - Sepharose 4B tự tạo [3].

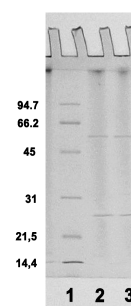
Đánh giá mức độ tinh sạch của IgG đã tinh chế bằng kỹ thuật điện di trên gel SDS-PAGE theo Laemmli, với nồng độ 12% [3].

Sử dụng lectin ConM có độ tinh sạch cao từ hạt đậu dao biển đã được tinh chế bằng phương pháp sắc kí ái lực theo Goldstein và cộng sự (1986) để bước đầu định lượng kháng thể IgA trong huyết thanh bằng kỹ thuật LECTIN-ELISA [3].

Các hoá chất sử dụng của hãng Sigma (Mỹ), Merk (Đức), LKB (Thụy Điển): Protein chuẩn; Sepharose-ProteinA; SephadexG-G75; cộng hợp kháng IgG; cơ chất OPD, các hoá chất này đạt mức độ tinh khiết cao.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tinh chế IgG từ huyết thanh người khỏe



Hình 1. Điện di SDS-PAGE chế phẩm IgG tinh sạch

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

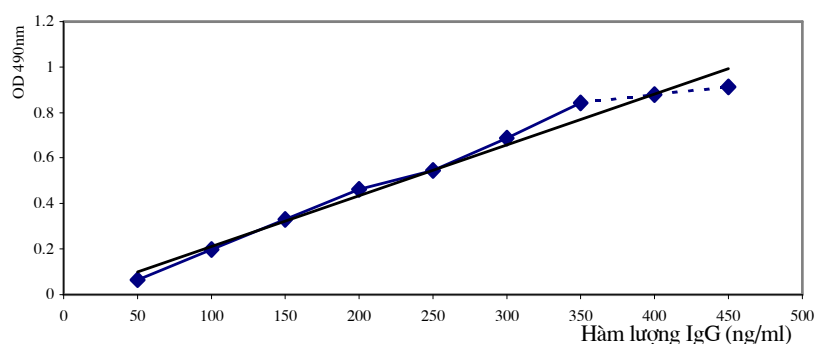
IgG được tinh chế bằng cột ConM-Sepharose 4B tự tạo và cột Protein A - Sepharose 4B. Chế phẩm IgG tinh sạch được dùng để xây dựng đồ thị tiêu chuẩn cho kỹ thuật xét nghiệm LECTIN-ELISA khi dùng lectin ConM gắn bản.

Kết quả 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 1).

Kết quả này đã chứng tỏ rằng lectin ConM liên kết đặc hiệu với kháng thể IgG mà không hề liên kết với các thành phần nào khác trong huyết thanh người.

2. Xây dựng đồ thị chuẩn IgG

Kháng thể IgG tinh sạch sau khi tinh chế được sử dụng để xây dựng đồ thị chuẩn cho kỹ thuật xét nghiệm ELISA. Kết quả thu được ở hình 2.



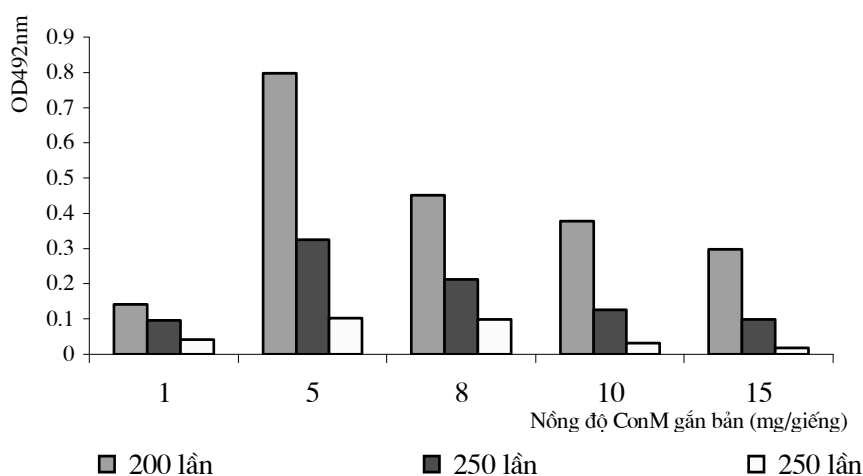
Hình 2. Đồ thị chuẩn IgG

Qua đồ thị chuẩn (hình 2) cho thấy khi mật độ quang nằm trong khoảng từ 0,196 đến 0,698 thì kết quả thực nghiệm thu được tương đương với kết quả lí thuyết. Vì vậy, trong quá trình làm thực nghiệm cần lưu ý độ pha loãng huyết thanh sao cho kết quả đo mật độ quang nằm trong khoảng từ 0,196 đến 0,698.

3. Thăm dò nồng độ gắn bản của ConM và độ pha loãng của huyết thanh

Huyết thanh người bình thường được pha loãng 150, 200, 250 lần trong đệm blocking pH 7,6-7,8; ConM được gắn bản với các nồng độ 1, 3, 5, 8, 10, 15 $\mu\text{g/l}$ giếng để bắt giữ IgG trong kỹ thuật Lectin-Elisa (hình 3).

Kết quả hình 3 cho thấy, để thích hợp cho việc định lượng IgG thì huyết thanh được pha loãng 200 lần và nồng độ gắn bản của ConM là 5 $\mu\text{g/giếng}$.



Hình 3. Kết quả thăm dò độ pha loãng của huyết thanh và nồng độ gắn bản của ConM

4. Bước đầu sử dụng lectin ConM định lượng kháng thể IgG trong huyết thanh người bình thường

Kết quả xác định hàm lượng kháng thể IgG trung bình trong huyết thanh người bình thường khi sử dụng phương pháp LECTIN-ELISA là 12,7 mg/ml. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những thông số của người Việt Nam khỏe bình thường và phù hợp với những kết quả xét nghiệm của Văn Đình Hoa [1] khi họ sử dụng bộ xét nghiệm sinh phẩm của nước ngoài. Điều đó đã chứng minh rằng chế phẩm lectin từ hạt đậu dao biển hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu cho điều chế bộ sinh phẩm xét nghiệm kháng thể IgG bằng kỹ thuật LECTIN-ELISA.

III. KẾT LUẬN

1. Lectin ConM được tinh sạch từ hạt đậu dao biển (*C. maritima* Aublet) đã được chứng minh là có tính đặc hiệu liên kết với IgG của người.

2. Hàm lượng lectin ConM được lựa chọn tối ưu cho gắn bản nhựa microtiter plate trong kỹ thuật ConM-ELISA để xác định hàm lượng IgG từ huyết thanh là 5 µg/giếng.

3. Huyết thanh gốc được pha loãng 200 lần là điều kiện thích hợp cho xét nghiệm xác định hàm lượng IgG từ huyết thanh bằng kỹ thuật ConM-ELISA.

4. Hàm lượng kháng thể IgG trung bình trong huyết thanh người khỏe bình thường khi định lượng bằng phương pháp ELISA-ConM là 12,7 mg/ml. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những thông số của người Việt Nam và phù hợp

với những kết quả xét nghiệm của Văn Đình Hoa [1] khi họ sử dụng bộ xét nghiệm sinh phẩm của nước ngoài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Văn Đình Hoa, Trần Thị Chính, 1996: Hàm lượng globulin miễn dịch IgG, IgA, IgM, IgE trong huyết thanh của người Việt Nam có sức khỏe bình thường, Kỷ yếu chương trình Hội nghị về các chỉ tiêu Sinh học người Việt Nam, Nxb. Y học Hà Nội.
2. Nguyễn Đăng Khôi, 1979: Nghiên cứu về cây thức ăn cho gia súc ở Việt Nam, tập 1, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, 2004: Thực hành Hoá sinh miễn dịch, Nxb. Đại học Quốc gia, Hà Nội.
4. Van der Macsen J. G. & Somantmadja S. (Dương Đức Huyền dịch), 1996: Tài nguyên thực vật Đông Nam Á, Các cây đậu ăn hạt, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Decastle B. R. and Homer B. B., 1973: Acta., 322:141-144.
6. Goldstein I. J. and Poretz R. D., 1986: Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins: 185-188. Academic Press, Inc.
7. Strosberg A. D., Dominique B., Mark L. and Andrew F., 1986: Legume lectins: A large family of homologous protein: 251-262. The lectin: properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, INC.

PRELIMINARY USING THE LECTIN FROM MARITIMA JACKBEAN SEEDS (*CANAVALIA MARITIMA* AUBLET) FOR ANALYSIS OF IGG FROM HUMAN SERUM BY LECTIN-ELISA TECHNIQUE

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

SUMMARY

In recent investigation, we proved specific interaction between lectin ConM from *Canavalia maritima* of Vietnam and IgG from human serum. In order to using the lectin for analysis IgG from human serum, we carried out the purification of IgG from healthy human serum by Protein A - Sepharose 4B and ConM-

Sepharose 4B column chromatography followed to prepare the ConM-ELISA biokit for analyzing IgG from human serum.

Results obtained showed that average concentration of IgG from healthy human serum was determined to be 12.7 mg/ml. Using suitable concentration of ConM to be 5 µg/well by ConM-ELISA technique with human serum diluted 200 times.

Ngày nhận bài: 30-11-2007