

NGHIÊN CỨU TÁCH VÀ TINH SẠCH ABRIN TỪ HẠT CAM THẢO DÂY TẠI VIỆT NAM

Đến tòa soạn: 15-01-2025

Ngô Ngọc Trung^{1*}, Đào Duy Hưng¹

1. Viện Hóa học Môi trường quân sự, Binh chủng Hóa học

*Email: trungbio@gmail.com

SUMMARY

RESEARCH ON SEPARATION AND PURIFICATION OF ABRIN FROM THE SEEDS OF *ABRUS PRECATORIUS* IN VIETNAM

Abrin is a natural lectin found in the seeds of Abrus precatorius. The structure of abrin consists of two chains (Chain A and chain B) with a molecular weight about 65 kDa. Abrin is highly toxic to humans and animals, so it is considered as a dangerous biological agent that can be used in terrorism or biological warfare. This article introduces the process of isolating abrin from the seeds of Abrus precatorius and purifying abrin by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. Purified abrin is used in determining toxicity in animals, testing the sensitivity of rapid detection tests and immunological studies.

Keywords: purify abrin, *Abrus precatorius*.

1. MỞ ĐẦU

Cây Cam thảo dây có tên khoa học là *Abrus Precatorius* thuộc chi *Abrus*, họ Đậu (Fabaceae), bộ Đậu (Fabales), giới thực vật. Hạt có hình trứng, vỏ rất cứng, màu đỏ, sáng bóng với một điểm đen lớn ở gốc hạt. Hạt cam thảo dây có thành phần chủ yếu là cacbonhydrat, chất xơ và protein, ngoài ra còn có lipase, N-dimetyl tryptophan methyl este, hypaphorin, hemagglutinin gây ngưng kết hồng cầu, một số enzym thủy phân trong đó có urease và độc tố abrin (chiếm tỷ lệ tương đối nhỏ từ 3 – 5%). Abrin trong hạt cam thảo dây là một glycoprotein thuộc nhóm lectin có khả năng gây độc cho người, khối lượng phân tử khoảng 65 kDa. Cấu trúc phân tử gồm hai chuỗi polypeptid là chuỗi A và chuỗi B liên kết với nhau qua cầu nối disulfua (-S-S-). Trong cấu trúc không gian chúng cuộn xoắn tạo thành hình cầu. Chuỗi A cấu tạo từ 251 axit amin có khối lượng phân tử khoảng 30

kDa, là thành phần chính gây độc cho tế bào. Chuỗi B do 267 axit amin tạo nên có khối lượng phân tử khoảng 35 kDa, chịu trách nhiệm liên kết và vận chuyển abrin qua màng tế bào [1]. Với liều gây độc cho người thấp, LD₅₀ đối với người và động vật khoảng từ 0,1 – 3 µg/ kg cân nặng, abrin là một trong những chất độc tiềm năng có thể được sử dụng làm vũ khí sinh học trong quân sự [2]. Đã có một số nghiên cứu về tách và tinh sạch abrin nhưng sử dụng Cam thảo dây tại khu vực Châu Âu và Châu Mỹ [3,4]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về tách và tinh sạch abrin từ cây Cam thảo dây tại Việt Nam. Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu tách chiết abrin từ hạt cây Cam thảo dây tại Việt Nam bằng phương pháp kết tủa phân đoạn và tinh sạch bằng các phương pháp sắc ký.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

2.1.1 Nguyên liệu và hóa chất

+ Hạt cam thảo dây được cung cấp bởi Viện dược liệu.

+ Màng thấm tích xelophan (ICN Biomedical); Sephadex G-100, DEAE Sepharose fast flow, Polyvinylidene fluoride (PVDF), Tris-HCl, glycerin, Sodium dodecyl sulphate -polyacrylamide gel (SDS - polyacrylamide gel).

+ Muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CH_3COOH , đệm Tris-buffered saline (TBS), đệm TTBS (đệm TBS có bổ sung Tween 20 ml/1000 ml), đệm Phosphate Buffered Saline (PBS), NaCl và một số hóa chất khác có độ tinh khiết phân tích.

2.1.2 *Thiết bị*: Máy quang phổ tử ngoại - khả kiến (Jasco -V530, Nhật), máy ly tâm lạnh (Hettich- Đức), máy đông khô (Thermo Savant- Mỹ), máy đo pH (Hanna), máy điện di protein....

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định hàm lượng protein tổng số

Hàm lượng protein tổng số trong hạt cam thảo dây và trong các bước của quá trình tách và tinh sạch abrin được xác định bằng phương pháp của Lowry [5] với tinh thể albumin huyết thanh bò làm đường chuẩn.

2.2.2 Tách abrin từ hạt cam thảo dây

200 gram hạt cam thảo dây sau khi được xay và nghiền nhỏ được ngâm trong dung dịch axit acetic 5% (tỉ lệ hạt cam thảo dây: acid acetic = 1:10 theo khối lượng), điều chỉnh môi trường đến pH = 3,7 ÷ 3,9. Lắc với tốc độ 480 lần/phút trong vòng 10 ÷ 12h (để qua đêm). Loại bỏ cặn bằng giấy lọc, thu dịch lọc abrin thô (S_1). Kết tủa phân đoạn dịch S_1 bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở các nồng độ khác nhau để xác định nồng độ thu nhận protein tối ưu.

2.2.3 Tinh sạch abrin từ hạt cam thảo dây

Tinh sạch abrin bằng phương pháp sắc ký lọc gel với Sephadex G100 và sắc ký trao đổi ion với nhựa DEAE Sepharose fast flow [6]. DEAE được cân bằng ở pH = 8,0 bằng dung dịch đệm Tris - HCl 0,05 M. Lấy 20 ml dung dịch protein thu được cho vào 50 ml gel, khuấy 15 phút để protein bám hoàn toàn vào gel. Đưa toàn bộ gel lên cột thủy tinh kích thước 1,5×40 cm, rửa cột bằng 100 ml đệm Tris - HCl 0,05 M để ổn định gel. Rửa cột bằng đệm Tris - HCl 0,05 M pH = 8,0 có bổ xung NaCl 0,05 M với tốc độ 0,2 ml/phút, tiến hành thu mẫu theo phân đoạn (2 ml/phân đoạn).

Sephadex G -100 được hoạt hoá trong nước cất ở nhiệt độ phòng theo tỉ lệ 1g/10ml H_2O trong 4 ÷ 6h (để gel hoạt hoá hoàn toàn). Gel được nạp lên cột thủy tinh đường kính 2,5cm, chiều cao cột 50cm và được ngâm trong dung dịch đệm photphat nồng độ 0,002 M (pH = 7,2). Chạy sắc ký trên cột theo tỉ lệ mẫu:gel = 1: 6 (tính theo thể tích) tốc độ 0,3 ml/phút và thu 20 phân đoạn (2ml/mỗi phân đoạn).

2.2.3 Xác định độ tinh sạch của abrin bằng phương pháp điện di

Độ tinh sạch của abrin được xác định bằng cách điện di trên gel polyacrylamide theo phương pháp của Main và cộng sự [6] trên thiết bị của hãng Hoefer (Mỹ). Bản gel được nhuộm màu bằng Coomassie Blue và đọc kết quả trên hệ thống phân tích ảnh của Biorad.

2.2.4 Xác định abrin bằng phương pháp Western blot

Sau khi điện di SDS-PAGE, protein từ gel được chuyển sang màng PVDF nhờ hệ thống chuyển màng trong 20 phút với hiệu điện thế 15V, màng được phủ bằng sữa 5% trong đệm TBS qua đêm, rửa 3 lần bằng

đệm TTBS và TBS, ủ màng với kháng thể kháng abrin của thỏ pha loãng 5.000 lần với sữa 5% trong TBS trong 2 giờ. Rửa màng và phủ với kháng thể 2 kháng kháng thể IgG thỏ cộng hợp enzym pha loãng 10.000 lần trong 2 giờ. Cuối cùng rửa bằng màng TTBS, dung dịch TBS và hiện màu bằng dung dịch TMB [4].

2.2.5 Xác định abrin bằng test phát hiện nhanh của tetracore

Abrin sau quá trình tinh sạch được xác định bằng test phát hiện nhanh mua từ hãng tetracore (Mỹ) với độ pha loãng 1.000 lần [7].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tách abrin từ hạt cam thảo dây

Tiến hành kết tủa phân đoạn dịch S_1 bằng dung dịch $(NH_4)_2SO_4$ có nồng độ khác nhau (dung dịch 30%; 40% 50%, 60% và

70%). Kết tủa thu được bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Hòa tan kết tủa bằng đệm PBS 0,01M (pH = 7,2), thẩm tích loại muối $(NH_4)_2SO_4$ thu được dung dịch S_2 . Điện di các dung dịch thu được bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12,6% và chạy western blot ở điều kiện không khử (trong đệm xử lý mẫu không bổ sung β -mercaptoetanol) để giữ nguyên cầu nối disulfide liên kết chuỗi A và chuỗi B. Kiểm tra các dung dịch thu được bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12,6% và western blot ở điều kiện không khử (trong đệm xử lý mẫu không bổ sung β -mercaptoetanol) để giữ nguyên cầu nối disulfide liên kết chuỗi A và chuỗi B (kết quả chạy không trình bày trong báo cáo). Kết quả xác định hàm lượng protein và hiệu suất thu hồi khi tủa ở nồng độ muối khác nhau được đưa ra trên bảng 1.

Bảng 1: Kết quả xác định protein và hiệu suất thu hồi khi kết tủa bằng các nồng độ muối khác nhau

Dịch thẩm tích thu được	Σ_V (ml)	C_{Pr} (mg/ml)	Σ_{Pr} (mg)	η (%)
Dịch trích ly thô (C_0)	300	2,64	792	-
Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 30%	42	3,41	143,2	18,08
Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 40%	45	4,65	209,2	26,41
Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 50%	49	5,82	285,1	35,99
Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 60%	52	6,09	316,6	39,97
Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 70%	53	6,10	323,3	40,82

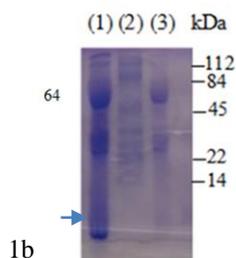
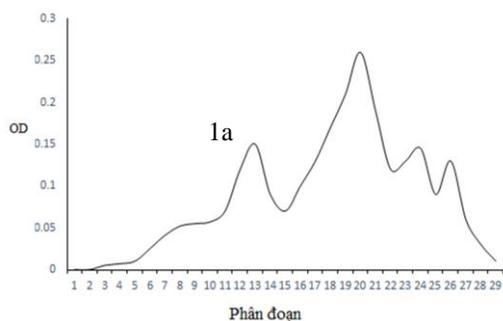
Từ các kết quả có thể nhận thấy, dung dịch muối $(NH_4)_2SO_4$ có nồng độ 60% cho khả năng kết tủa protein tốt nhất tương ứng với hiệu suất thu hồi protein là cao nhất. Khi pha đến nồng độ 70% tuy lượng protein tổng có tăng lên một chút nhưng hình ảnh western blot cho thấy lượng abrin tại khu vực 65 kDa lại giảm đi. Do vậy, dung dịch $(NH_4)_2SO_4$ nồng độ 60% được chọn dùng để tách chiết abrin từ bã hạt cam thảo dây. Kết quả trên tương tự với các kết quả nghiên cứu của Ramesh và cộng sự về tách và tinh sạch abrin sử dụng muối $(NH_4)_2SO_4$ và gel ái

lực Lactamyl – Sepharose [3], nghiên cứu của Sjur Olnes và cộng sự đã tách abrin bằng kết tủa với muối $(NH_4)_2SO_4$ và tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion [6].

3.2 Tinh sạch abrin sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel

3.2.1 Tinh sạch abrin bằng sắc ký trao đổi ion

Kết quả thu phân đoạn khi chạy sắc ký trao đổi ion bằng DEAE Sepharose fast flow và điện di sản phẩm sau sắc ký được trình bày trong hình dưới đây:



Hình 1:

1a: Sắc đồ rửa giải bằng DEAE thu các phân đoạn 1-29

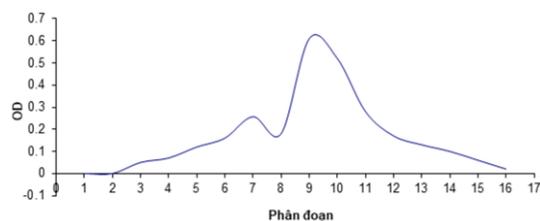
1b: Kết quả điện di protein tại phân đoạn 19,20,21 sau khi chạy sắc ký trên cột DEAE.

(1): Dịch abrin sau quá trình kết tủa, trước khi chạy cột; (2): Marker; (3): Phân đoạn 19, 20, 21 thu được sau khi qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE

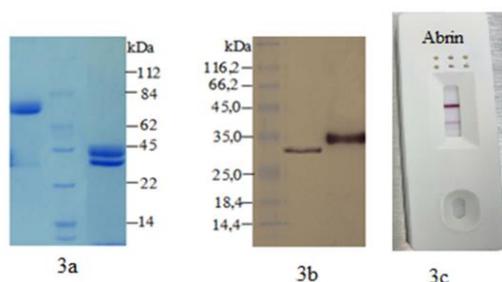
Phân tích ảnh điện di kết hợp sắc đồ rửa giải protein trên hình 1 cho thấy protein ra khỏi cột theo các phân đoạn chia thành 4 đỉnh. Đỉnh thứ 2 tập chung tại các phân đoạn 19,20,21 có 02 băng riêng biệt với khoảng khối lượng từ 60-80 kDa và từ 35-45 kDa. Đỉnh protein thứ 2 được kiểm tra bằng test phát hiện nhanh abrin của hãng tetracore (Mỹ) cho kết quả dương tính chứng tỏ protein trên là abrin. Tuy nhiên, abrin vẫn lẫn trong một số loại protein khác có cùng điện tích, để thu được abrin tinh sạch, sản phẩm trên tiếp tục xử lý bằng sắc ký lọc gel.

3.2.2 Tinh sạch abrin bằng sắc ký lọc gel

Kết quả thu phân đoạn khi chạy sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G -100 và điện di sản phẩm sau sắc ký được trình bày trong hình dưới đây:



Hình 2: Sắc ký đồ rửa giải bằng Sephadex G100 thu các phân đoạn 1-16



Hình 3:

3a: Kết quả điện di protein tại phân đoạn 9, 10 sau khi chạy sắc ký lọc gel; 1: không có β -mercaptoethanol, M: Marker; 2: có β -mercaptoethanol;

3b: Kết quả chạy sản phẩm điện di bằng Western blot; M: Marker; 1: chuỗi A; 2: chuỗi B

3c: Kết quả xác định abrin bằng test phát hiện nhanh abrin của tetracore (Mỹ).

Sắc ký đồ quá trình tinh sạch abrin bằng sắc ký lọc gel cho thấy protein thoát ra ở 2 đỉnh, đỉnh protein thứ 2 (phân đoạn 9,10) được dùng để xác định abrin bằng test phát hiện nhanh với độ pha loãng 1.000 lần cho kết quả dương tính với abrin. Kết quả cho thấy test lên 02 vạch tương đương dương tính với abrin (hình 3c).

Kết quả điện di không biến tính protein với phân đoạn 9 và 10 cho thấy xuất hiện một băng protein đậm kích thước khoảng 65 kDa tương đương với khối lượng phân tử của abrin và lẫn một lượng nhỏ protein không đặc hiệu khác. Kết quả điện di biến tính cho thấy xuất hiện 2 băng protein có kích thước khoảng 30 kDa và 35 kDa, đây chính là chuỗi A và chuỗi B tương ứng của abrin sau khi bị cắt cầu nối disulfide (hình 3a). Kết quả chạy western blot 2 chuỗi A và B riêng biệt với kháng thể đặc

hiệu abrin chứng tỏ abrin có độ tinh sạch cao (hình 3b), có thể sử dụng cho kiểm tra test phát hiện nhanh độc tố abrin, nghiên cứu liều gây chết (LD₅₀) và thử nghiệm đáp ứng miễn dịch trên động vật.

Hiệu quả tách chiết và tinh sạch abrin qua các giai đoạn công nghệ được trình bày trong bảng 2 cho thấy hiệu suất bước tinh sạch abrin bằng sắc ký lọc gel là tương đối thấp (21,5%), điều này do quá trình thu nhận abrin tinh sạch chỉ thu 02 phân

đoạn để đảm bảo abrin thu được có độ sạch cao, sử dụng được cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hiệu suất của phương pháp sắc ký lọc gel cũng không cao bằng các phương pháp khác bởi tính chọn lọc theo khối lượng, do đó nếu muốn tăng hiệu suất thu hồi cần có những nghiên cứu với các loại gel đặc hiệu hơn. Hiệu suất và các giai đoạn tách chiết và tinh sạch abrin được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Hiệu quả tách chiết và các quá trình tinh sạch abrin từ hạt cam thảo dây

Các giai đoạn tinh sạch	Σ _V (ml)	C _{Pr} (mg/ml)	Σ _{Pr} (mg)	η(%)
Dung dịch chiết từ hạt cam thảo dây	500	2,64	1320	-
Kết tủa phân đoạn bằng (NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	86,7	6,09	528	40
Sắc ký qua cột DEAE Sepharose	26,01	4,72	122,7	23,2
Sắc ký qua cột Gel Sephadex G100	8,35	3,18	26,5	21,5

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp kết tủa phân đoạn khi sử dụng muối (NH₄)₂SO₄ kết hợp với các kỹ thuật sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel đã tiến hành tách chiết và tinh sạch được chế phẩm abrin từ hạt Cam thảo dây. Sản phẩm của quá trình tách chiết và tinh sạch abrin được kiểm tra bằng các phương pháp điện di, phương pháp Western blot và test thử phát hiện nhanh abrin. Kết quả kiểm tra cho thấy sản phẩm có độ sạch cao, có thể sử dụng cho mục đích đánh giá độc tính trên động vật, kiểm tra độ nhạy của test thử abrin và tiến hành các nghiên cứu miễn dịch học.

Lời cảm ơn: Cảm ơn các đồng nghiệp tại Viện Hóa học Môi trường quân sự, Viện Công nghệ mới/ Viện Khoa học và Công nghệ quân sự đã giúp đỡ tác giả trong quá trình thực hiện công trình này.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của Ngô Ngọc Trung, Đào Duy Hưng công trình chưa gửi đăng tại bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anamika Das, Vernika Jain and Amarnath Mishra (2016), A brief review on a

traditional herb: *Abrus precatorius*, *International Journal of Forensic Medical and Toxicological Science*, **1(1)**, 1-10.

2. Ramesh C. Gupta (2015), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press, Massachusetts, USA.

3. Ramesh Hegde, T. K. Maiti, and S. K. Podder (1991), Purification and Characterization of three toxins and two agglutinins from *Abrus precatorius* seeds by using lactamul-sepharose affinity chromatography. *Analytical biochemistry*, **194**, 101-109.

4. Sjur Olnes and Alexander Pil (1973), Isolation and properties of Abrin: a Toxic protein Inhibiting protein synthesis evidence for different biological functions of its two constituent – peptid chains. *European Journal of Biochemistry*, **35**,179-185.

5. Nguyễn Văn Mùi (2007), Thực hành Hóa sinh học, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

6. Marcio V. Ramos, Daniel M. Mota, Clarissa R. Teixeira, Benildo S. Cavada and Renato A. Moreira (1998), Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds, *Toxicon*, **3(36)**, 477-484.

7. <https://tetracore.com/product/abrin-biothreat-alert-kit/> (truy cập ngày 12/12/2024)