

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH TÍNH METALLOTHIONEIN TRONG TIỂU CẦU MÁU NGƯỜI

Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Natalie Chiaverini² và Marc De Ley²

ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) are metal binding proteins with low molecular weight, rich of cystein. They present in animal kingdom, higher plant, eukaryotic microorganisms and some prokaryotes. MT in human platelets was isolated by cells lysis, proteins in the lysate were separated by gel permeation chromatography on the basic of their molecular size. The presence of MT in the peaks was tested by SDS- PAGE (Sodium-dodecyl Sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis) and immunological techniques (immunoblotting). Protein solution containing MT was purified by “negative” affinity chromatography technique to remove FABP (fatty acids binding proteins), a group of low molecular weight proteins together with MT after gel permeation chromatography. MT iso-form was determined by ion exchange chromatography, the results showed that MT in human platelets is MT-0 iso-form.

Keywords: Metallothionein (MT), MT iso-form, platelets

Title: Isolation and Characterisation of Metallothionein in Human Platelets (Thrombocytes)

TÓM TẮT

Metallothionein (MT) là một nhóm protein mang kim loại, có trọng lượng phân tử thấp, giàu cystein. Chúng hiện diện trong động vật, thực vật bậc cao, vi sinh vật chân hạch và một số vi sinh vật sơ hạch. MT từ tiểu cầu máu được trích bằng cách phá vỡ tế bào, sau đó MT được tách dựa trên sự khác biệt kích thước phân tử bằng phương pháp sắc ký thấm (gel permeation chromatography), sự hiện diện của MT được xác định thông qua phương pháp điện di và phương pháp thấm miễn dịch (immunoblotting- Western blotting). Dung dịch protein chứa MT được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực “ngược” (negative affinity chromatography) để loại bỏ protein liên kết acid béo (Fatty acids binding proteins – FABP), một nhóm protein có trọng lượng phân tử thấp hiện diện cùng với MT sau khi qua sắc ký thấm. Dạng đồng đẳng (iso-form) MT được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion (ion exchange chromatography), kết quả cho thấy MT hiện diện trong tiểu cầu máu người là đồng đẳng MT-0.

Từ khóa: Metallothionein (MT), dạng đồng đẳng MT, tiểu cầu máu

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Metallothionein (MT) là một nhóm protein kim loại phân tử nhỏ (khối lượng phân tử 6000- 7000 Dalton), có khả năng liên kết với 7 nguyên tử kim loại hóa trị II. Đặc điểm của nhóm protein này là chứa cystein với hàm lượng cao (20 phân tử cystein/1 phân tử MT), không chứa acid amin mang nhân thơm. Do có khả năng liên kết với kim loại nên chúng có vai trò quan trọng trong cơ thể sống: i. Cố định khoáng vi lượng Cu, Zn và duy trì nồng độ ổn định của các ion này trong tế bào;

¹ Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Khoa Học, Katholic University Leuven, Vương quốc Bỉ

ii. Giải độc các kim loại nặng như Cd và Hg (Kägi và Schäffer, 1988); iii. Chiếm giữ và vô hiệu hóa các gốc tự do (Kumari *et al.*, 1998). Theo Hamer (1986), MT hiện diện trong động vật, thực vật bậc cao, vi sinh vật chân hạch và một số vi sinh vật sơ hạch. Ở người, MT chứa tối đa 7 nguyên tử Zn, chúng có mặt trong tế bào máu, trong não và một số nội quan. Dựa vào sự khác biệt về thành phần acid amin, MT trong cơ thể người được chia thành các dạng đồng đẳng, ký hiệu từ MT-0 đến MT-4 (Bühler và Kägi, 1974; Soumillion *et al.*, 1992); Palmeter *et al.*, 1993; Quaifer *et al.*, 1994). Sự hiện diện của MT trong tiểu cầu máu đã được báo cáo bởi Sugiura và Nakamura năm 1994. Tuy nhiên, dạng đồng đẳng chưa được xác định. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và định tính loại đồng đẳng MT trong tiểu cầu máu (người).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu nhận và phá vỡ tiểu cầu máu

Tiểu cầu máu được thu nhận từ trung tâm truyền máu Leuven (Vương quốc Bỉ) một ngày sau khi hết hạn dùng cho mục đích y học. Sau đó tiến hành đếm tế bào sống, mẫu sử dụng cần có số lượng tiểu cầu trong huyền phù vào khoảng $1,5 \times 10^9$ tế bào/ml. Tiểu cầu được rửa với đệm phosphate pH 7,4 bằng cách ly tâm (2.000 vòng/phút, 10 phút), tiến trình lặp lại 3 lần.

Tiểu cầu thu nhận sau ly tâm bị phá vỡ bằng cách ngâm trong dung dịch nhược trương, sau đó huyền phù tế bào được làm lạnh đông (-72°C , 5 phút- sử dụng hỗn hợp đá carbonic/ethanol), tiếp theo rã đông (37°C , 5 phút); quá trình lặp lại 3 lần.

Hỗn hợp thu được sau khi phá vỡ tiểu cầu được đun cách thủy 4 phút ở nhiệt độ sôi, tiến hành ly tâm loại bỏ kết tủa, thu dung dịch protein thô (lần 1: tốc độ 2.000 vòng/phút, 10 phút, nhiệt độ phòng; lần 2: 13.000 vòng/phút, 15 phút, 20°C).

2.2 Phương pháp thu nhận protein và xác định loại đồng đẳng

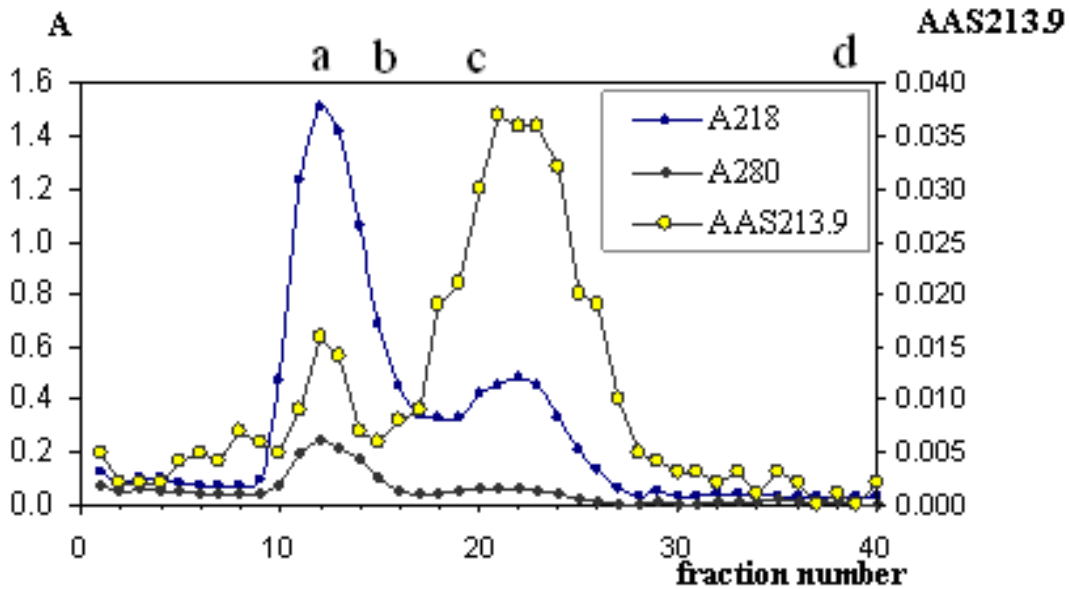
- Nồng độ dung dịch protein được xác định dựa trên phương pháp Bradford (Bradford, 1976).
- Dịch trích protein thu được phân tách và xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp sắc ký thẩm sử dụng cột Sephacryl S100. Các phân đoạn (fractions) thu được sau sắc ký được xác định độ hấp thụ ở bước sóng 218nm và 280nm.
- Hàm lượng kẽm trong dung dịch được phân tích bằng phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử (Atomic Absorption Spectrophotometry- AAS) ở bước sóng 213,9nm.
- Sự hiện diện của MT trong từng đỉnh thu nhận sau sắc ký được kiểm tra dựa trên phương pháp điện di SDS-PAGE và phương pháp thẩm miễn dịch (Van Houdt K *et al.*, 1992).
- Protein cần nghiên cứu sau khi tách bằng sắc ký thẩm còn chứa FABP. Để loại bỏ FABP ra khỏi dung dịch chứa MT, dùng sắc ký ái lực với kháng thể đơn dòng FABP. Kháng thể FABP được hoạt hóa bởi cyanogen bromide cố định trên cột Sepharose 4B. Khi hỗn hợp protein đi qua cột, FABP bị giữ lại trên cột, do đó thu được dung dịch chứa MT.

- Dạng đồng đẳng (iso-form) MT được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion sử dụng cột DEAE-Sephacel với gradient nồng độ đệm Tris-HCl pH 8 từ 10mM - 300mM.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tinh sạch và xác định sự hiện diện của MT trong tiểu cầu

Dịch trích protein từ tiểu cầu được xác định nồng độ bằng phương pháp Bradford với protein chuẩn BSA (Bovine serum albumin) có giá trị là 0,558mg/ml. Hỗn hợp protein được tách bằng sắc ký thẩm trên cột Sephacryl, kết quả thể hiện ở hình 1.



Hình 1: Sắc ký đồ phân tách hỗn hợp protein bằng phương pháp sắc ký thẩm

(Thể tích mỗi phân đoạn 2ml; độ hấp thụ protein được đo ở 218nm và 280nm; Zn hiện diện được xác định ở 213,9nm bằng phổ hấp thụ nguyên tử; vị trí protein chuẩn phân tách cùng điều kiện được thể hiện bằng các chữ cái bên trên sắc ký đồ: a. BSA (68.000 Da), b. OA (43.000 Da), c. MY (17.200 Da), d. K₂Cr₂O₇ (294 Da))

Kết quả từ sắc ký đồ cho thấy có 2 đỉnh (peak) xuất hiện sau khi tách và đo ở bước sóng 218nm (đặc trưng cho liên kết peptide) và bước sóng 280nm (phản ánh sự hiện diện của acid amin mang nhân thơm).

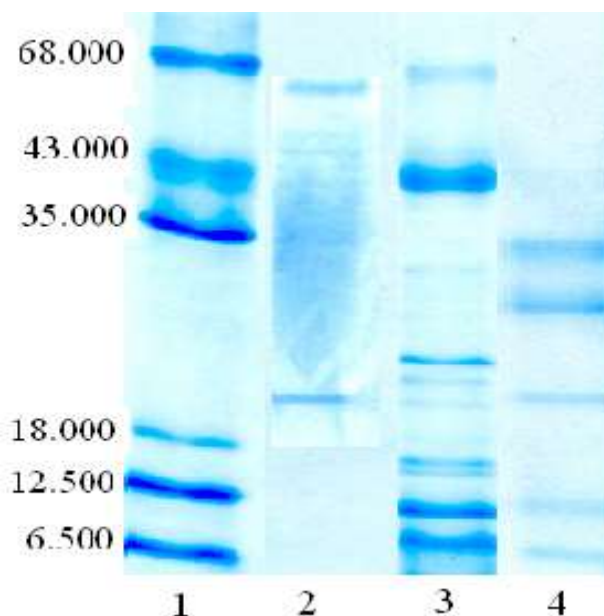
- Đỉnh 1: Cho thấy phân đoạn này chứa hàm lượng protein cao, đồng thời có sự hiện diện của acid amin mang nhân thơm. Tuy nhiên hàm lượng kẽm thấp.

- Đỉnh 2: Hàm lượng protein không cao, sự hiện diện của acid amin mang nhân thơm hầu như không đáng kể, hàm lượng kẽm cao ($A_{213,9} = 0,037$, nồng độ 0,23 µg/ml ứng với phân đoạn 21).

Do đặc điểm MT ở người là loại protein phân tử lượng thấp, không chứa acid amin mang nhân thơm và có khả năng liên kết với 7 nguyên tử kẽm, cho phép dự đoán các phân đoạn thu được ở đỉnh 2 có khả năng chứa MT.

Để có cơ sở khẳng định đỉnh thứ 2 chứa protein cần nghiên cứu, dung dịch protein thu được từ các phân đoạn ứng với 2 đỉnh trên được tiến hành cô đặc, phân tích

bằng phương pháp điện di SDS- PAGE, kết quả thể hiện ở hình 2. Hỗn hợp protein chuẩn sử dụng cho điện di và ký hiệu sử dụng được thể hiện trong bảng 1.



Hình 2: Điện di đồ (SDS-PAGE) hỗn hợp protein sau sắc ký thẩm

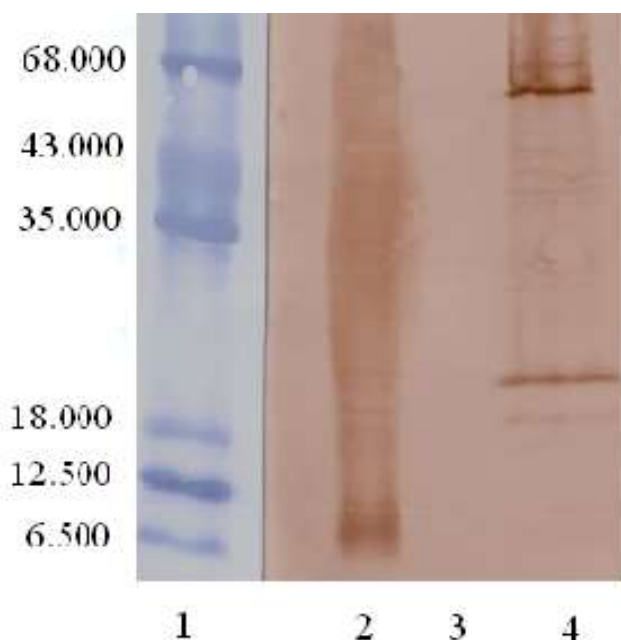
(Cột 1: Hỗn hợp protein chuẩn: BSA, OA, LDH, β L, cyt.c, Ap; cột 2: MT chuẩn; cột 3: protein thu nhận từ đỉnh 1; cột 4: protein thu nhận từ đỉnh 2)

Ở cột 2 ứng với MT chuẩn, có sự xuất hiện của nhiều vạch (band) protein có khối lượng phân tử cao hơn của MT (~6.000-7.000 Dalton) do hiện tượng trùng hợp (polymerisation) của chúng trên gel (Soumillion, 1992). Ở cột 3 và 4 xuất hiện nhiều vạch tương ứng với nhiều protein có phân tử lượng khác nhau, điều này có thể giải thích là do hiệu quả phân tách trên gel hoặc do hiện tượng trùng hợp của MT.

Bảng 1: Hỗn hợp protein chuẩn sử dụng cho SDS-PAGE

Protein	Chữ viết tắt	Trọng lượng phân tử (Dalton)
Bovine serum albumin	BSA	68.000
Ovalbumin	OA	43.000
Lactate dehydrogenase	LDH	35.000
β -Lactoglobulin	β L	18.000
Cytochrome c	Cyt.c	12.500
Aprotinin	Ap	6.500

Để khẳng định sự hiện diện của MT trong các phân đoạn thu được ở đỉnh 2 sau sắc ký thẩm, dùng phương pháp thẩm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng E9 (kháng thể đặc trưng của MT) liên kết với enzyme peroxidase, làm hiện màu bằng phản ứng oxi hóa cơ chất 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) (Cherian và Banerjee, 1981), kết quả thể hiện ở (Hình 3).



Hình 3: Kết quả thâm miễn dịch dung dịch protein thu được sau sắc ký thấm

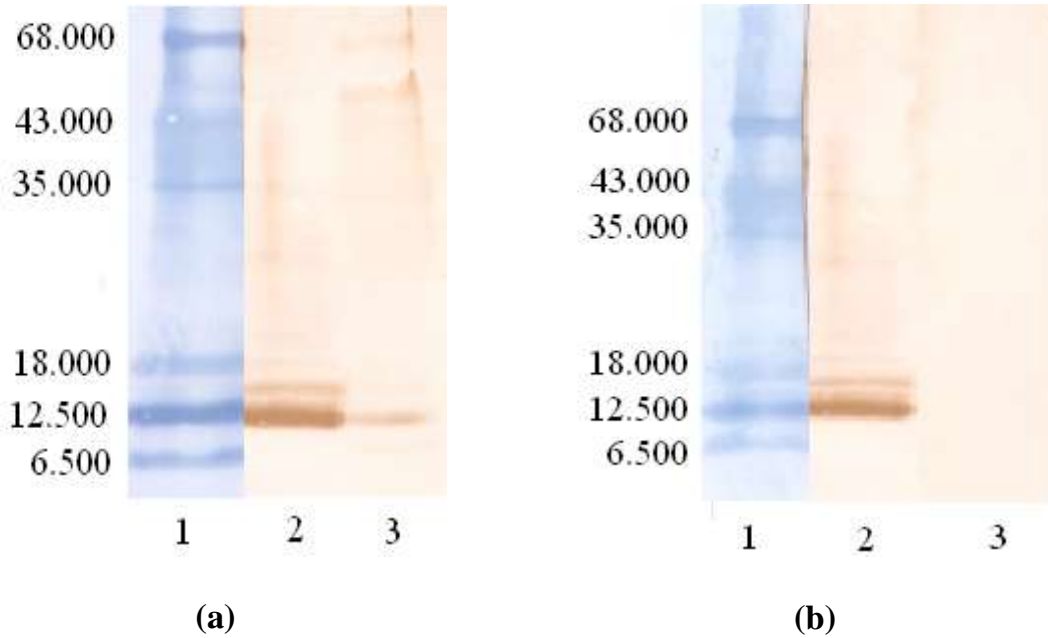
(Cột 1: Hỗn hợp protein chuẩn: BSA, OA, LDH, β L, cyt.c, Ap; cột 2: MT chuẩn; cột 3: protein từ các phân đoạn ở đỉnh 1; cột 4: protein từ các phân đoạn ở đỉnh 2)

Kết quả thâm miễn dịch ở hình 3 cho thấy: protein thu được từ các phân đoạn ở đỉnh 2 sau sắc ký thấm cho phản ứng miễn dịch với kháng thể E9, khẳng định sự hiện diện của MT. Ngược lại, protein thu được từ các phân đoạn ở đỉnh 1 không có phản ứng miễn dịch với kháng thể của MT.

Theo báo cáo của Hellemans (1997), các dạng đồng đẳng MT thu được sau sắc ký thường chứa FABP do chúng cùng là protein tan trong tế bào chất, có trọng lượng phân tử tương đương. Do đó, sự hiện diện của FABP trong đỉnh 2 được kiểm tra bằng phương pháp thâm miễn dịch ứng với kháng thể đơn dòng L2B10. Kết quả thể hiện ở hình 4a cho thấy có sự hiện diện của FABP cùng với MT trong các phân đoạn thu được sau sắc ký thấm. Để loại chúng khỏi dung dịch chứa MT, phương pháp sắc ký ái lực “ngược”, sử dụng kháng thể cho FABP đã được sử dụng để cố định FABP trên cột, protein MT không bị liên kết sẽ qua cột.

Để kiểm tra tính hiệu quả của việc loại FABP sau sắc ký ái lực, dung dịch chứa protein thu được được phân tách trên gel polyacrylamide và kiểm tra bằng phương pháp thâm miễn dịch, kết quả thể hiện ở (Hình 4b).

Kết quả hình 4 cho thấy, sau khi qua cột sắc ký, dung dịch protein không có phản ứng miễn dịch với kháng thể của FABP do toàn bộ FABP đã bị giữ lại trên cột. Đồng thời để khẳng định sự hiện diện của MT trong dung dịch qua cột, xác định bằng phương pháp thâm miễn dịch với kháng thể đặc trưng.

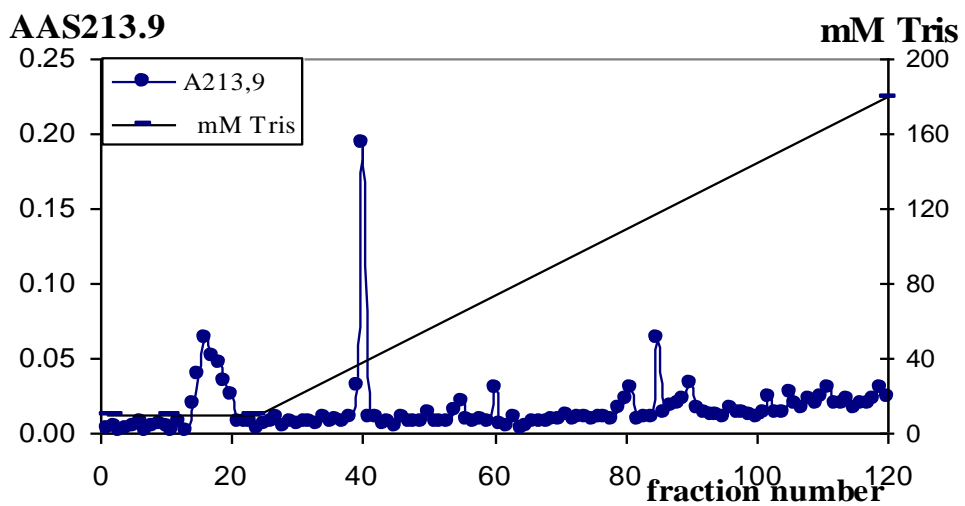


Hình 4: Kết quả thẩm miễn dịch xác định sự hiện diện của FABP trong dung dịch protein: (a) trước và (b) sau khi qua cột sắc ký ái lực tách loại FABP

(Cột 1: Hỗn hợp protein chuẩn: BSA, OA, LDH, βL, cyt.c, Ap; cột 2: protein chuẩn FABP; cột 3: dung dịch chứa protein nghiên cứu)

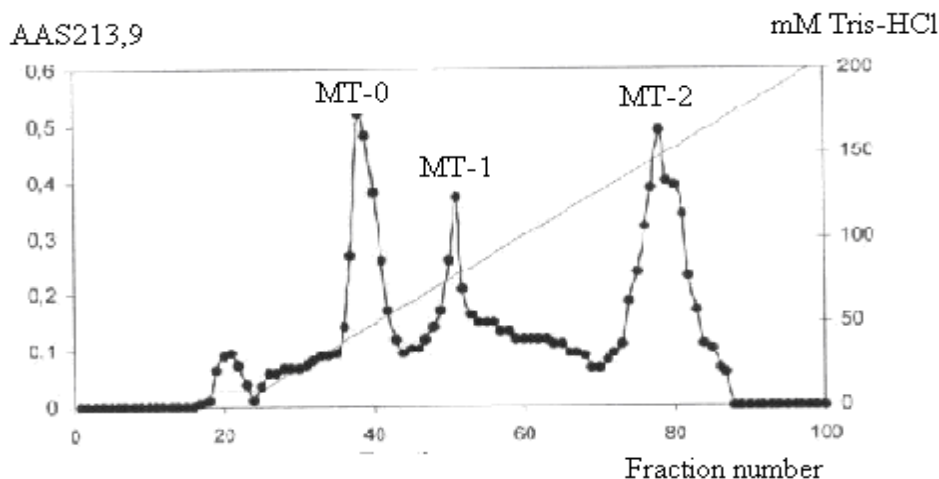
3.2 Phân tách MT thành các dạng đồng đẳng (iso-form)

Dung dịch MT thu được sau sắc ký ái lực được tiến hành phân tách thành các dạng đồng đẳng bằng sắc ký trao đổi ion sử dụng cột DEAE- Sephacel, đệm Tris-HCl gradient nồng độ 10mM- 300mM, pH 8 được sử dụng làm dung dịch rửa giải. Sự hiện diện của MT được xác định bằng cách đo AAS_{213,9} (phản ánh sự hiện diện của Zn) được thể hiện ở (Hình 5).



Hình 5: Sắc ký đồ trao đổi ion của dung dịch MT từ tiểu cầu máu

So sánh sự hiện diện của đỉnh ứng với phân đoạn 39-40 trên sắc ký đồ phân tách dung dịch MT từ tiểu cầu (Hình 5) với sắc ký đồ chuẩn của hỗn hợp các đồng đẳng MT từ gan bào thai (Hình 6) cho phép kết luận đồng đẳng đang nghiên cứu là MT-0.



Hình 6: Sắc ký đồ trao đổi ion của các đồng đẳng MT chuẩn (từ gan bào thai)

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu trên, các kết luận được rút ra như sau:

Quá trình tinh sạch MT trong tiểu cầu máu có thể được tiến hành dựa trên phương pháp sắc ký thẩm. Để loại trừ sự hiện diện của FABP trong các phân đoạn thu được, có thể dùng sắc ký ái lực ngược sử dụng kháng thể đơn dòng của FABP. Tiểu cầu máu chứa dạng đồng đẳng MT-0 (MT-0 iso-form).

Tuy nhiên, để có thêm cơ sở khoa học cho việc xác định dạng đồng đẳng MT trong tiểu cầu máu, cần xác định trình tự acid amin của phân tử protein này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bühler RH and Kägi JHR. (1974) Human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.* **39**: 229-234.
- Cherian MG, Yu S, and Redman CM. (1981) Site of synthesis of metallothionein in rat liver. *Can. J. Biochem.* **59**: 301-306.
- Hamer D.H. (1986) Methallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 913-951
- Hellemans G. (1997) Karakterisatie van humane nier-metallothioneines in vergelijking met foetale lever-metallothioneines. Doctoral thesis, KULeuven.
- Kägi JHR and Schäffer A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**: 8509-8515.
- Kumari MV, Hiramatsu M., Ebadi M. (1998) Free radical scavenging actions of MT isoform I and II. *Free Radical Research* **29** (2): 93-101
- Palmiter RD, Sandgren EF, Masters BA, and Brinster RL. (1993) In *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications*. Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds.). Birkhauser Verlag, basel. pp: 417-424.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrovic BP, and Palmiter R.D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**: 7250-7259.
- Soumillion A, Van Damme J, and De Ley M. (1992) Cloning and specific polymerised-chain reaction amplification of a third charge separable human metallothionein isoforms. *Eur. J. Biochem.* **209**: 999-1004.
- Sugiura T and Nakaruma H. (1994) Metallothionein in platelets. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **103**: 341-348.
- Van Houdt K, Nicasi I, Van Mechelen E, Veulemans B, and De Ley M. (1992) Monoclonal antibodies against metallothioneins from the human liver. *Immunol. Lett.* **32**: 21-26.