

DÙNG CÁC KỸ THUẬT MIỄN DỊCH PHÓNG XẠ VÀ HPLC ĐỂ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG CỦA ACID ABCISIC (AAB) VÀ CITOKININ TRONG SỰ RỤNG TRÁI NON XOÀI (*Mangifera indica* L.) GIỐNG CÁT HÒA LỘC

Lê Thị Trung¹, Malko Rech, Gérard Tremblin², Ginette Garello,
Marie-Thérèse Le Page-Degivry³

¹ Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa-Vi sinh, Trường ĐH Sư Phạm Tp. HCM, ² Phòng thí nghiệm Sinh học Thực vật - ĐH Maine - Cộng hòa Pháp, ³ Phòng thí nghiệm Sinh học thực vật -

ĐH Nice-Sophia Antipolis - Cộng hòa Pháp

(Bài nhận ngày 12 tháng 9 năm 2003)

TÓM TẮT: Acid abscisic có vai trò khởi phát lão suy trong khi cytokinin quan trọng trong giai đoạn tăng trưởng chậm của trái. Có sự tăng cao acid abscisic cùng với sự giảm hàm lượng cytokinin trong các trái ở giai đoạn dễ rụng, dù đo bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ, HPLC hay phương pháp sinh trắc nghiệm.

Từ khóa: acid abscisic, trắc nghiệm miễn dịch phóng xạ, cytokinin, HPLC, sắc kí bản mỏng, *Mangifera indica* L. giống Cát Hòa Lộc.

I. Mở đầu

Acid abscisic và cytokinin có ảnh hưởng quan trọng trên sự rụng qua vai trò của chúng đối với quá trình lão suy. Acid abscisic kích thích, trong khi cytokinin cản quá trình này (Leopold, 1972). Khảo sát sự rụng ngoài thiên nhiên cho thấy trái non xoài cát Hòa Lộc có tỉ lệ rụng cao khi trái đạt 7 ngày tuổi (Lê Thị Trung, Bùi Trang Việt, Mai Trần Ngọc Tiếng, 2000). Khi dùng phương pháp sắc kí bản mỏng để cô lập các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở vị trí xác định và đo hoạt tính của chúng bằng các sinh trắc nghiệm, chúng tôi thấy acid abscisic tăng mạnh ở ngày 3 và 7, trong khi cytokinin giảm mạnh ở các ngày này (tài liệu tham khảo chưa công bố). Trong công trình này, chúng tôi phân tích hàm lượng acid abscisic bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ và hàm lượng cytokinin theo phương pháp HPLC nhằm mục đích phát triển hai kỹ thuật mới này để nghiên cứu về các chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

II. Vật liệu – phương pháp

II.1. Vật liệu

Trái non xoài Cát Hòa Lộc (*Mangifera indica* L.) ở các ngày tuổi khác nhau.

II.2. Phương pháp

Đo hàm lượng acid abscisic bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ

Trắc nghiệm miễn dịch phóng xạ (Radio immunoassay, RIA) dùng AAB-Gly-Tyr-I₁₂₅ làm chất đánh dấu. Sự đổi nhóm carboxyl của AAB thành amid làm tăng mạnh tính chuyên biệt của trắc nghiệm, cho phép việc đo AAB được tiến hành không cần qua sắc kí lớp mỏng.

Li trích mẫu

Nghiền 2 g trái trong metanol 80% chứa 100 mg/l BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) để tránh sự oxid-hóa. Khuấy trong 2 giờ ở 4⁰C, trong tối. Li tâm ở 2000 rpm trong 10 phút và lấy các phần nổi (lặp lại 3 lần). Hút chân không ở 35⁰ C. Thêm 1ml nước cất

và chỉnh dịch trích về pH 3. Tiếp tục trích mẫu 4 lần với dietyl ete (1:1, v/v) để thu AAB dạng tự do (Garello and Le Page-Degivry 1995).

Tổng hợp AAB-HAS (human serum albumin)

Hòa tan 45 μmol AAB tinh khiết trong 1 ml DMF (N,N-dimethylformamide), 70 μl trietylamin (TEA, Fluka: 1/11 trong DMF) và 35 μl etyl cloroformat (ECF, Prolabo: 1/16 trong DMF, pha ngay khi sử dụng). Để ở 4°C trong 10 phút. Đây là hỗn hợp hoạt hóa AAB.

Hòa tan 50 mg albumin huyết thanh người (HAS) trong 5 ml dung dịch đệm borat (0,005M, pH 9).

Tạo phản ứng kết nối AAB-HAS bằng cách cho 300 μl hỗn hợp hoạt hóa AAB vào 2 ml dung dịch albumin huyết thanh người.

Sử dụng thỏ từ 12 đến 16 tuần tuổi để thực hiện phản ứng miễn dịch với AAB-HAS. Máu từ tĩnh mạch ở rìa tai thỏ được trích ra sau 1 đến 2 tuần chích AAB-HAS (sự chích huyết thanh được thực hiện mỗi tháng) và được giữ ở -18°C . Phân đoạn này (antiserum) chứa các kháng thể kháng-AAB (anti-ABA antibodies).

Tổng hợp AAB-Gly-Tyr

Hòa tan 11 μmol AAB trong 200 μl DMF, 40 μl TEA (1/11 trong DMF) và 20 μl ECF (1/16 trong DMF). Phản ứng được thực hiện ở 4°C trong 10 phút.

Chuẩn bị dung dịch Gly-Tyr 0,075 M trong 200 μl DMF. Thêm vào dung dịch này 50 μl TEA và 30 μl nước.

Phản ứng liên kết AAB với Gly-Tyr xảy ra khi cho 200 μl dung dịch Gly-Tyr vào cùng thể tích AAB nêu trên. 15 phút sau đặt hỗn hợp phản ứng vào -18°C (để ngừng phản ứng).

Để loại các hợp chất không liên kết, cho hỗn hợp phản ứng qua cột QAE Sephadex 270 mm x 100 mm, và rửa cột với dung dịch NaCl (tăng dần từ 0,02 M đến 0,4 M).

Phức hợp AAB - Gly-Tyr tinh khiết được định lượng bằng phổ UV, giữ dưới dạng bột khô (nhờ kỹ thuật dễ hòa tan (lyophilisation)).

Quá trình gắn AAB - Gly-Tyr với I_{125}

Hòa tan AAB - Gly Tyr trong nước ở nồng độ 2 nmol/7 μl . Cho vào dung dịch này 37 MBq (1 mCi) NaI_{125} trong 10 μl NaOH (Amersham), 10 μl dung dịch Cloramin-T (1mg trong 1 ml đệm phosphat 0,05 M, pH 7,2). Sau 2 phút, cho thêm vào 20 μl dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1,2 mg trong 1 ml nước), và 1 phút sau nữa thêm 500 μl acid ascorbic (3m M) - đệm sodium azid (10 mM, pH 6,2).

Để loại phức hợp AAB - Gly- Tyr không gắn với I_{125} , hỗn hợp phản ứng được cho qua cột Sephadex G25 500 mm x 10 mm và rửa với acid ascorbic-đệm sodium azid.

Phức hợp AAB - Gly-Tyr- I_{125} được cô lập và giữ dưới dạng dung dịch loãng ở -18°C (trong vòng 3 tháng).

Sự đổi AAB li trích thành AAB-glycinamid

150 μl dịch trích AAB và 15 μl dung dịch carbodiimid 0,75 M cho vào ống nghiệm có chứa 150 μl glycinamid 1M trong dung dịch đệm acid morpholinoethan sulfonic pH 5,2.

Hiệu suất của phản ứng được ước lượng bằng cách dùng C^{14} -AAB. Sản phẩm của phản ứng được tinh sạch qua cột QAE Sephadex 10 mm x 270 mm và được tách rửa bằng NaCl (tăng dần từ 0,02 M đến 0,4 M). Phần lớn, khoảng 90%, AAB chuyển thành AAB-glycinamid.

Kỹ thuật RIA (Radio immunoassay)

Kỹ thuật RIA được thực hiện qua sự thẩm tách (Cailla *et al.* 1973, Le Page Degivry *et al.* 1984). Một bên màng chứa 150 μ l kháng huyết thanh (antiserum) loãng (1:40.000). Bên kia màng là hỗn hợp 75 μ l dung dịch AAB – Gly-Tyr- I_{125} và 75 μ l AAB-glycinamid trong đệm citrat pH 6,25. Sự thẩm tách được thực hiện ở 4⁰C trên máy lắc khoảng 22 giờ. Tính phóng xạ của 100 μ l trong mỗi ngăn sau đó được đếm. Lượng AAB tự do trong mô thực vật được tính dựa vào sự cạnh tranh giữa AAB không được đánh dấu và AAB được đánh dấu bởi I_{125} trên kháng thể.

Đo hàm lượng cytokinin bằng HPLC

Cytokinin được li trích và phân đoạn theo Bùi Trang Việt (1992), Meidner (1984) và Yokota *et al.* (1980). Dịch trích từ pha trung tính được lọc qua milipore Φ 0,45 μ m. Dịch lọc được bơm vào cột sắc kí Gecko 2000. Cột được rửa ở tốc độ dòng 0,8 ml/phút với dung môi metanol: nước (47: 53 % thể tích), đầu dò UV 254 nm, đầu ghi Waters 746 của máy HPLC (hiệu Spectra series P 100). Lượng mẫu nạp mỗi lần 5 μ l. Nhận biết thời gian xuất hiện Cytokinin bằng cách hứng phân đoạn dung dịch BA 1mg/l, thử bằng phản ứng màu với xanh bromophenol và AgNO₃ 1% (1:1,v/v) (Yokota *et al.* 1980).

III. Kết quả

Hàm lượng của acid abscisic trong trái non xoài (*Mangifera indica* L.) đo bằng trắc nghiệm miễn dịch phóng xạ

Lượng AAB thấp ở trái 0 ngày tuổi, tăng cao ở trái 3-7 ngày tuổi và giảm nhẹ ở các trái 10 ngày tuổi. Sự thay đổi hàm lượng của chất này không khác sau khi dịch trích được sắc kí trên bản silica gel và đo bằng phương pháp sinh trắc nghiệm (bảng 1).

Bảng 1: Sự thay đổi hàm lượng acid abscisic trong trái non xoài Cát Hòa Lộc (*Mangifera indica* L.) ở các ngày tuổi khác nhau.

Tuổi trái (ngày)	0	3	7	10
Hàm lượng AAB (ng/g) được đo nhờ RIA	804 ± 80	1.574 ± 157	2.170 ± 217	2.024 ± 202
Hoạt tính AAB (mg/l) được đo nhờ STN (*)	0 ± 0	1,24 ± 0,05	1,30 ± 0,04	0,42 ± 0,11

STN (*) (Sinh trắc nghiệm): Tài liệu chưa công bố

Hàm lượng của cytokinin trong trái non xoài (*Mangifera indica* L.) đo bằng phương pháp HPLC

Các đỉnh trong sắc kí đồ, được ghi nhận qua đầu dò UV ở thời gian 16,12 ± 0,33 phút (hình 1), cho thấy hàm lượng cytokinin cao trong trái 0 ngày tuổi. Hàm lượng này giảm ở trái 3 ngày tuổi và giảm mạnh trong trái 7 ngày tuổi. Cytokinin gia tăng trở lại ở các trái 10 ngày tuổi. So sánh với hàm lượng của chất này trong trái khi đo bằng phương pháp sinh trắc nghiệm cho thấy sự thay đổi xảy ra tương tự (bảng 2).

Bảng 2: Sự thay đổi hàm lượng cytokinin (phân đoạn BA) trong trái non xoài Cát Hòa Lộc (*Mangifera indica* L.) ở các ngày tuổi khác nhau.

Tuổi trái (ngày)	0	3	7	10
Hàm lượng cytokinin (picrogram/g) được đo nhờ HPLC	223,787 ± 0,04	43,744 ± 0,02	8,167 ± 0,02	36,794 ± 0,02
Hoạt tính cytokinin (mg/l) được đo nhờ STN (*)	0,15 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0 ± 0	0,28 ± 0,01

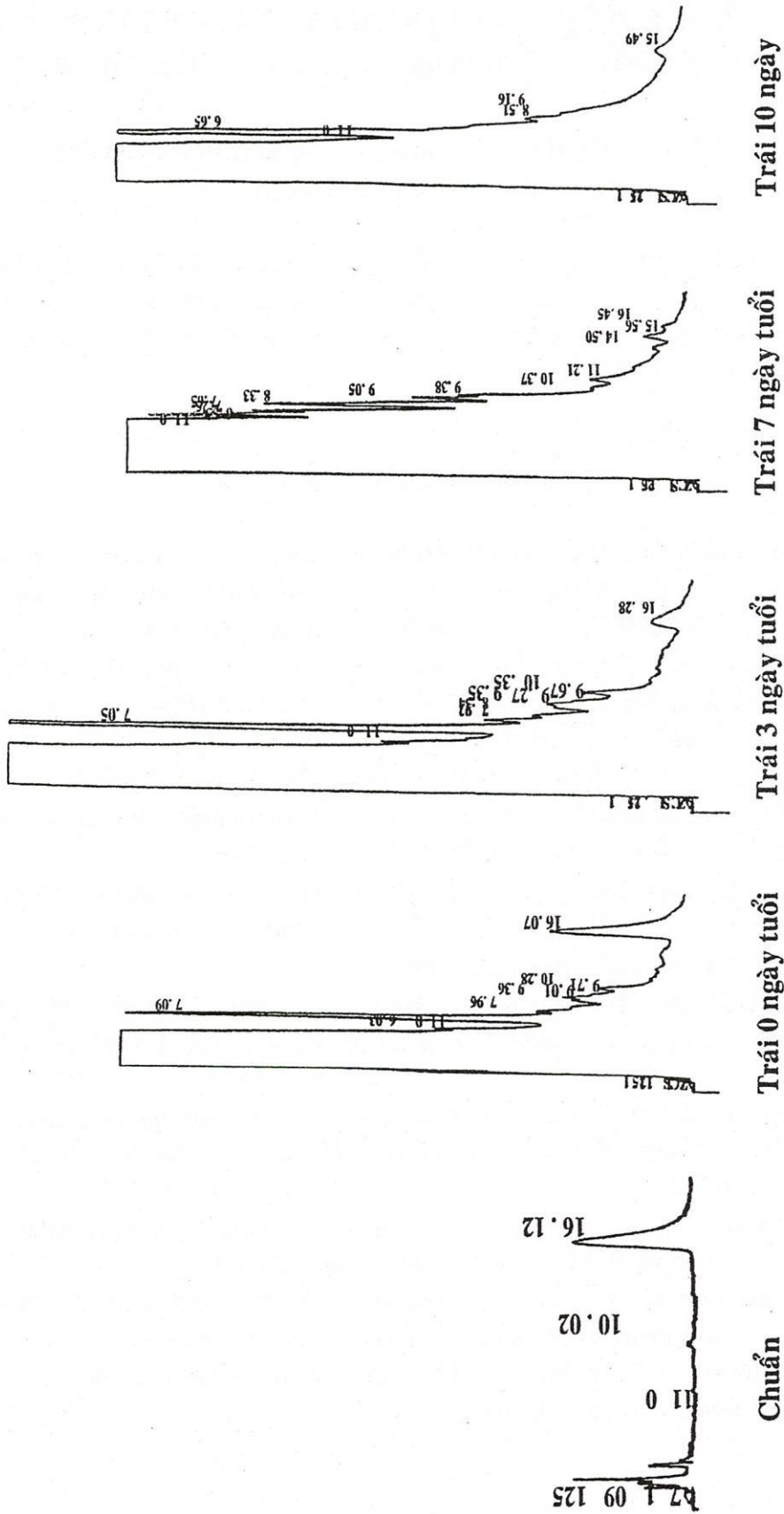
STN (*) (Sinh trắc nghiệm): Tài liệu chưa công bố

IV. Kết luận

Sự phù hợp giữa các kết quả về hàm lượng acid abscisic được đo bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ và hàm lượng cytokinin được đo bằng kỹ thuật HPLC so với phương pháp sắc kí lớp mỏng và sinh trắc nghiệm cho thấy rằng các phương pháp sinh trắc nghiệm (được thực hiện sau các phương pháp sắc kí) là phương tiện tương đối đơn giản, dễ thực hiện nhưng chính xác và đáng tin cậy.

Tác giả chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Đốc trại Giống Cây Trồng Đồng Tiến – Hốc Môn đã tạo mọi điều kiện để dâng về vật liệu thí nghiệm để chúng tôi thực hiện thí nghiệm này.
- Phòng Thí nghiệm Sinh học Thực vật trường Đại học Maine, Cộng hòa Pháp, đã tạo điều kiện và giúp đỡ chúng tôi kỹ thuật đo HPLC.
- Phòng Thí nghiệm Sinh học Thực vật trường Đại học Nice-Sophia Antipolis, Cộng hòa Pháp, đã giúp đỡ chúng tôi kỹ thuật đo acid abscisic bằng phương pháp miễn dịch.



Hình 1: Sắc kí đồ của cytokinin trong trái xoài Cát Hòa Lộc (*Mangifera indica* L.) ở các ngày tuổi khác nhau được đo bằng HPLC, qua đầu dò UV ở 16,12 ± 0,33 phút.

USING THE RADIO IMMUNOASSAY AND THE HPLC TO ANALYSE
QUANTITATIVELY ABSCISIC ACID AND CYTOKININ IN THE YOUNG
FRUITS'S ABSCISSION OF *Mangifera indica* L. cv. CAT HOA LOC

Le Thi Trung, Malko Rech, Gérard Tremblin, Ginette Garello,
Marie-Thérèse Le Page-Degivry

ABSTRACT: Abscisic acid plays a raising role of the aging while cytokinin is important in primary developing of fruit. There is an increase of abscisic acid and a decrease amount of cytokinin in fruit in easy fallen period, even the measuring method is radio immunoassay, HPLC or bioassay were used.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Thị Trung, Bùi Trang Việt, Mai Trần Ngọc Tiếng (2000), *Bước đầu tìm hiểu hiện tượng rụng trái non xoài (Mangifera indica L.) ngoài thiên nhiên và trong phòng thí nghiệm*, Hội nghị KH lần II, Trường ĐHKHTN Tp. HCM, tháng 5, tr. 1-6.
- [2] Bùi Trang Việt (1992), *Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng "bông" và "trái non" Tiêu (Piper nigrum L.)*, *Tạp san khoa học ĐHTH Tp. HCM* 1, tr.155-165.
- [3] Cailla H. L., Cross G.S., Jolu E. J. P., Delaage M. A. and Depieds R. C. (1973), "Comparison between rat and rabbit anticyclic AMP antibodies. Specificity toward acyl derivatives of cyclic AMP", *Anal. Biochem.*, 56, pp. 383-393.
- [4] Garello G. and Le Page-Degivry M. Th. (1995), "Desiccation-sensitive *Hopea odorata* seeds: Sensitivity to abscisic acid, water potential and inhibitors of gibberllin biosynthesis", *Physiologia Plantarum*, 95, pp. 45-50.
- [5] Le Page-Degivry M. T., Duval D., Bulard C. and Delaage M. (1984), "A radioimmunoassay for abscisic acid", *Journal of Immunological Methods*, 67, pp. 119-128.
- [6] Leopold A. C. (1972), "Ethylene as a plant hormone", In *Hormonal regulation in plant growth and development*, Edited by Kaldeway H. and Wardar Y., Verlag Chemie, Weheim, pp. 245-262.
- [7] Meiner H. (1984), *Class experiments in plant physiology*, George Allen & Unwin (Publishers) Ltd. London, Boston, Sydney, 51-52, pp. 124-130.
- [8] Yokota T., Murofushi N. and Takahashi N. (1980), *Extraction, Purification and Identificatio. In hormonal regulation of development I- Molecular aspects of plant hormones*, Edited by J. Mac Millan - Encyclopedia of plant physiology, New series, vol.9, Springer New York, pp.113-201.