

BƯỚC ĐẦU THĂM DÒ SỰ BIẾN ĐỔI PHỔ PROTEIN Ở CÁC DÒNG RONG CÂU ĐƯỢC CHIẾU XẠ (PHẦN II)

Nguyễn Đức Bách, Phạm Ngọc Sơn, Đặng Diễm Hồng
Viện Công Nghệ Sinh Học

TÓM TẮT Báo cáo này trình bày những kết quả bước đầu nghiên cứu sự biến đổi về phổ protein ở các dòng rong Câu chỉ vàng *Gracilaria asiatica* (thu tại trại Quý Kim, Hải Phòng) sau khi chiếu xạ với các liều khác nhau (20, 60 và 100 krade) và nuôi trên môi trường chọn lọc (ESS-1 không có NaCl và 23 ppt NaCl).

Kết quả thu được cho thấy các dòng *G. asiatica* được chiếu xạ có tỉ lệ sống sót và hàm lượng protein cao hơn so với đối chứng, đặc biệt ở liều chiếu 60 krade. Dựa trên kết quả này, đã chọn được dòng rong Câu có khả năng thích nghi cao với biến động rộng của độ mặn.

Theo kết quả điện di trên gel polyacrylamid 9,5%, nhìn chung không có sự khác biệt đáng kể về thành phần protein giữa mẫu thí nghiệm so với đối chứng. Tuy nhiên có 1 băng protein với trọng lượng phân tử khoảng 67 kDa đã xuất hiện rõ hơn so với mẫu đối chứng được nuôi trên môi trường tối ưu với nồng độ NaCl 23 ppt. So sánh thành phần protein của các mẫu đối chứng nuôi trên môi trường chọn lọc ESS-1 không chứa NaCl, có thể kết luận sơ bộ rằng băng protein 67 kDa có thể đóng vai trò quan trọng trong việc thích nghi của *G. asiatica* đối với những biến động rộng về độ mặn. Tuy nhiên, để tìm hiểu rõ hơn về bản chất và vai trò của băng protein này, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn nữa với các kỹ thuật như điện di 2 chiều, Western blot...

INITIAL INVESTIGATION ON CHANGES OF PROTEIN COMPONENTS IN RADIATED GRACILARIA ASIATICA (PART II)

Nguyen Duc Bach, Pham Ngoc Son, Dang Diem Hong
Institute of Bio-technology

ABSTRACT This paper presents some initial studied results in variety of protein components of *Gracilacia asiatica* (collected in Quy Kim station, Haiphong province) after irradiation. *G. asiatica* was radiated with different doses (20, 60 and 100 krade) and grown on selected media (ESS-1 without NaCl and with 23 ppt of NaCl).

The result showed that with all of radiated doses, *G. asiatica* had not only higher survival rates but also higher protein contents comparing with the control in both of selected media, especially with the dose of 60 krade. Based on this result, *G. asiatica* strain, which adapt well to wide change of salinity can be selected.

There was no remarkable difference in protein components among radiated

and control samples (in polyacrylamid 9.5% electrophoresis). But there was a 67 kDa protein band appeared more clearly than control (grown on ESS-1 23ppt of NaCl). Therefore, it can be concluded initially that this 67 kDa protein plays an important role to *G. asiatica* in adaptation to wide changes of salinity. However, more clearly understanding needs to study on more details by other methods such as two dimensional SDS-PAGE, Western blot analysis...

I. MỞ ĐẦU

Việc chọn tạo được các giống Rong Câu *Gracilaria asiatica* - nguồn nguyên liệu quan trọng trong công nghiệp sản xuất agar ở các tỉnh phía Bắc - có khả năng thích ứng cao với sự biến động rộng của nồng độ muối là một việc rất quan trọng và đáp ứng được yêu cầu của thực tế nuôi trồng rong này đặt ra.

Tiếp theo thông báo trước đây về "Bước đầu thăm dò sự biến đổi phổ protein ở các dòng Rong Câu chiếu xạ" (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001), trong phạm vi bài báo này xin trình bày tiếp những kết quả nghiên cứu về sự biến đổi về phổ protein và bước đầu tìm hiểu bản chất của việc xuất hiện băng protein có trọng lượng phân tử 67 Kda ở các dòng Rong Câu thu được sau khi chiếu xạ có tính thích nghi cao với biến động rộng của độ mặn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

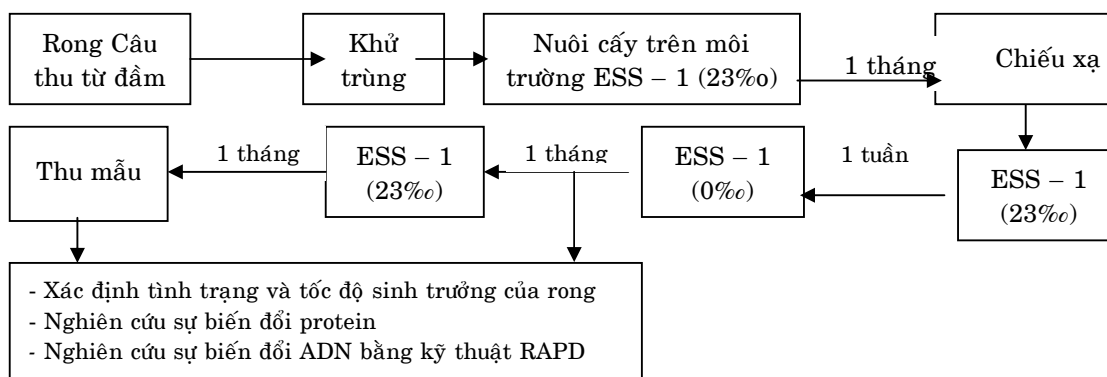
1. Vật liệu

Rong Câu Chỉ Vàng *Gracilaria asiatica* thu từ trạm nghiên cứu thủy sản Quý Kim – Hải Phòng được sử dụng làm nguyên liệu để chiếu xạ.

Nguồn phóng xạ ^{60}Co của Trung tâm Chiếu xạ, Viện Khoa học và Kỹ thuật Hạt nhân Hà Nội với các liều chiếu khác nhau 20, 60, 100 krade được sử dụng để chiếu xạ Rong Câu như đã mô tả trước đây (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001).

2. Phương pháp nghiên cứu

Sau 1 tháng nuôi chọn lọc ở các điều kiện khác nhau chúng tôi xác định tỉ lệ sống sót và phân tích sự biến đổi về thành phần phổ protein của các mẫu Rong Câu được chiếu xạ như đã mô tả trước đây (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001).



Sơ đồ 1: Các bước tiến hành trong thí nghiệm chiếu xạ

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Rong Câu thu từ đầm nuôi được đem chiếu xạ với các liều 0 (đối chứng), 20, 60 và 100 krad và nuôi chọn lọc trên môi trường ESS-1 0‰ NaCl. Đã tiến hành xác định tỉ lệ sống sót và hàm lượng protein của các mẫu Rong Câu với các liều chiếu xạ khác nhau. Theo công bố trước đây (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001) kết quả thu được đã cho chúng ta thấy:

- Lô Đ/C nuôi trên môi trường 23‰ NaCl có tỉ lệ sống sót và hàm lượng protein cao nhất so với tất cả các lô thí nghiệm khác. Lô Đ/C nuôi trên môi trường 0‰ NaCl sau 2 tuần, tỉ lệ sống sót thấp nhất (17,50%) và sau 4 tuần, rong bị chết hoàn toàn. Hiện tượng này cũng phù hợp với điều kiện thực tế ở các đầm nuôi khi nồng độ NaCl giảm xuống rất thấp (có thể xuống tới 0‰).

- Còn các mẫu Rong Câu được chiếu xạ với liều 20 và 60 krad có thể tồn tại trên môi trường 0‰ NaCl, tỉ lệ sống sót khá cao (đạt 46,65% sau 4 tuần ở liều chiếu 60 krad đồng thời hàm lượng protein giảm không đáng kể so với đối chứng nuôi trên môi trường 23‰ NaCl). Đây có thể là cơ sở ban đầu để cho phép tiến tới chọn tạo dòng rong Câu thích nghi với nồng độ muối thấp.

- Liều chiếu 100 krad thực sự là liều chiếu quá ngưỡng đã gây chết rong (tỉ lệ sống sót sau 4 tuần chỉ còn 0,83%). Như vậy liều chiếu 100 krad không thể sử dụng để chọn tạo dòng.

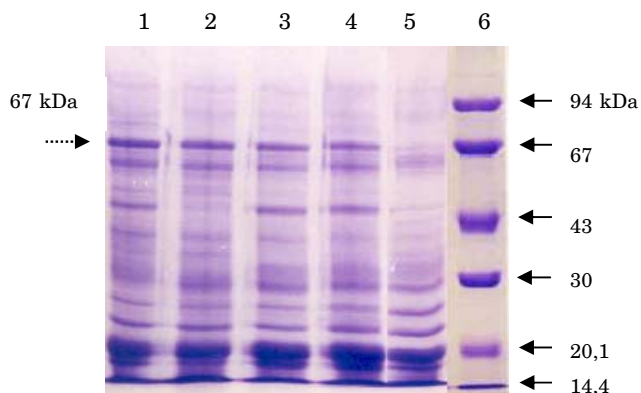
Việc có thể tạo ra được những dòng Rong Câu có thể thích nghi trong một phạm vi rộng của độ mặn từ 0‰

đến 23‰ NaCl, song lại có chất lượng agar cao có một ý nghĩa thực tế to lớn trong việc nâng cao năng suất nuôi trồng Rong Câu Chỉ Vàng ở các tỉnh phía Bắc của nước ta.

Cũng theo thông báo trước đây (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001) đã công bố sau 1 tháng chuyển tiếp lên môi trường ESS-1 có 23‰ NaCl (theo sơ đồ thí nghiệm trên), tỉ lệ sống sót của Rong Câu ở các lô chiếu xạ 20 và 60 krad là khá lớn (71,38% và 53,10%, tương ứng). Theo dõi sự sinh trưởng của rong ở giai đoạn này và xác định hàm lượng protein thấy những tản rong còn sống (có khả năng thích nghi) trong điều kiện này thì hàm lượng protein có xu hướng tăng lên (1.333,3 µg/gam rong tươi ở liều chiếu 60 krad). Kết quả đó có thể giải thích do tác động của chiếu xạ đã gây đột biến ở một hoặc một vài gen nào đó dẫn đến sự tổng hợp protein có vai trò bảo vệ giúp cho rong sống được trong các điều kiện sốc muối. Chính vì vậy tiếp theo chúng tôi đã tiến hành phân tích phổ protein của Rong Câu chiếu xạ với các liều chiếu khác nhau được nuôi chọn lọc trên các môi trường 0‰ và 23‰ NaCl.

1. Phân tích phổ protein của Rong Câu chiếu xạ với các liều khác nhau được nuôi chọn lọc trên các môi trường 0‰ và 23‰ NaCl

Protein của Rong Câu đã được tách chiết và điện di trên gel polyacrylamide 9,5% như đã công bố (Nguyễn Đức Bách và ctv, 2001). Kết quả về sự thay đổi protein giữa Rong Câu được chiếu xạ với các liều chiếu khác nhau được chỉ ra trên hình 1.



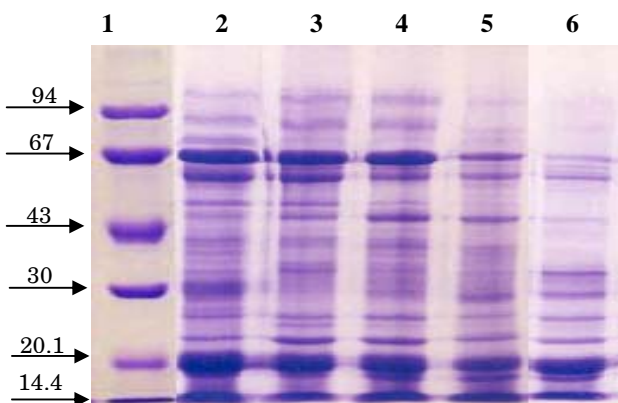
Hình 1: Phổ protein của các mẫu Rong Cầu chiếu xạ với các liều khác nhau và được nuôi chọn lọc trên môi trường ESS - 1 (0‰ NaCl). Cột 1--->3 Rong Cầu được chiếu xạ 20, 60 và 100 krade. Cột 4 - Đ/C nuôi ở 0‰ NaCl; Cột 5 - Đ/C nuôi ở 23‰ NaCl. Cột 6 - Marker

Kết quả điện di cho thấy, thành phần phổ protein giữa các mẫu chiếu xạ và mẫu đối chứng khi nuôi trên môi trường ESS-1 0‰ và 23‰ NaCl không có sự khác biệt lớn. Với liều 100 krade, một số băng protein Rong Cầu trong khoảng 40 - 60 kDa bị mất hoặc rất mờ. Điều này cũng phù hợp với tỉ lệ sống sót và hàm lượng protein đã phân tích ở trên.

Từ kết quả chỉ ra trên hình 1 và 2 nhận thấy băng protein 67 kDa xuất hiện rất rõ ở các mẫu chiếu xạ 20 và 60 krade so với mẫu đối chứng nuôi ở môi trường 0‰ NaCl (Đ/C 0‰) và 23‰ NaCl (Đ/C 23‰). Để xác định rõ điều này chúng tôi đã tách protein tổng số của mẫu Rong Cầu không chiếu

xạ nuôi trên môi trường chọn lọc 0‰ NaCl sau 1 tháng (Đ/C 0‰) và thấy băng protein 67 kDa cũng xuất hiện rất rõ (hình 3). Như vậy việc xuất hiện rõ nét băng protein này có thể là do điều kiện sốc muối và sự tổng hợp protein này liên quan tới khả năng thích ứng rộng của Rong Cầu đối với sự biến động của độ mặn.

Nhưng khi so sánh với mẫu Đ/C (0‰ NaCl) thì các mẫu rong được chiếu xạ với liều 20 và 60 krade lại có thể sống trong cả 2 môi trường 0‰ và 23‰ NaCl. Như vậy phải chăng việc chiếu xạ ở liều 20 hoặc 60 krade đã có vai trò gián tiếp lên sự tồn tại của rong Cầu trong điều kiện có biến động rộng về độ mặn của môi trường.



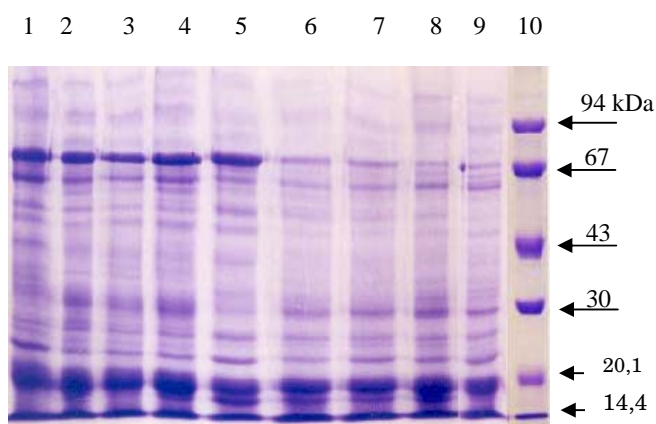
Hình 2: Phổ Protein của các mẫu Rong Cầu chiếu xạ với các liều khác nhau và được nuôi chọn lọc trên môi trường ESS- 1 (23‰ NaCl). Cột 1 - Marker; Cột 2 đến 4 Rong Cầu được chiếu xạ 20, 60 và 100 krade sau 4 tuần. Cột 5 - Đ/C nuôi ở 0‰ NaCl sau 4 tuần; Cột 6- Đ/C nuôi ở ESS-1 (23‰ NaCl)

Kết quả thu được ở đây cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của chiếu xạ lên thành phần protein của một số vi tảo (Bryant, 1982; Takeshi Nishio, 1995), ở *Arabidosis* (Atsushi Tanaka, 2000). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy khi bị chiếu xạ, tế bào trong cơ thể thực vật luôn có cơ chế tự bảo vệ nhờ vào những nhóm chất hoặc các enzym như các axit amin chứa lưu huỳnh (xistein, xistin) các glucation, SOD (superoxid dismutase)... có khả năng ngăn chặn, loại trừ các gốc tự do, đồng thời những chất này còn có thể tham gia vào quá trình giải phóng

những chất bảo vệ sẵn có trong cơ thể (Nguyễn Thị Kim Ngân, 1993). Do đó trong những điều kiện nhất định những cá thể được chiếu xạ có thể có khả năng thích nghi cao với điều kiện bất lợi cao hơn so với các cá thể khác.

2. Phân tích phổ protein của Rong Câu không được chiếu xạ được nuôi chọn lọc trên các môi trường 0‰ và 23‰ NaCl

Phổ protein của Rong Câu không chiếu xạ được nuôi chọn lọc trên các môi trường ESS – 1 có chứa 0‰ và 23‰ NaCl được chỉ ra trên hình 3.



Hình 3: Phổ Protein của các mẫu Rong Câu không chiếu xạ được nuôi chọn lọc trên môi trường ESS-1 0‰ và 23‰ NaCl. Cột 1 ---> 4: 0‰ NaCl từ tuần 1 đến tuần 4. Cột 5 ---> 8: 23‰ từ tuần 1 đến tuần 4. Cột 9 - Đ/C nuôi ở 23‰ NaCl. Cột 10 - Marker.

Từ hình 3 chúng ta nhận thấy rằng Rong Câu không chiếu xạ được nuôi trên môi trường ESS-1 0‰ NaCl thì băng protein 67kDa xuất hiện rất rõ và đạt cực đại ở tuần thứ 4. Tiếp sau đó Rong Câu được nuôi trở lại môi trường ESS – 1 có 23‰ NaCl thì băng protein này mờ dần và trở lại giống với đối chứng. Một điều chúng tôi cần nhấn mạnh ở đây là: Nếu kéo dài thời gian nuôi rong trên môi trường 0‰ NaCl trên 4 tuần thì rong bắt đầu chết nhanh. Điều này cũng phù hợp với điều

kiện và thực tế nuôi trồng Rong Câu ngoài tự nhiên ở các đầm nuôi vào mùa mưa (mưa kéo dài làm độ mặn trong đầm nuôi giảm rất thấp và sau đó nếu có nắng trở lại - độ mặn trong đầm lại tăng lên - đã làm cho Rong Câu chết hàng loạt). Nhưng nếu Rong Câu được chiếu xạ (đặc biệt là liều 60 krad) thì khi rong được nuôi trên môi trường có chứa 0‰ NaCl thì băng protein 67 kDa cũng xuất hiện rất rõ (hình 1 và 2) nhưng băng này có xu hướng ổn định kéo dài và rong có thể tồn tại trên 7

tháng (kết quả không chỉ ra ở đây) so với rong ở công thức đối chứng. Kết quả thu được này đã cho chúng ta thấy được vai trò của chiếu xạ đã ảnh hưởng đến sự ổn định việc tổng hợp thành phần protein có trọng lượng phân tử 67 Kda nói trên và phải chăng chính protein này đã giúp cho Rong Câu có thể tồn tại một thời gian khá dài trong điều kiện môi trường bất lợi. Tuy nhiên để có thể hiểu rõ hơn nữa bản chất và vai trò của băng protein 67 Kda này thì đòi hỏi phải có những nghiên cứu tiếp tục bằng các phương pháp khác như điện di 2 chiều protein SDS-PAGE hay phân tích bằng Western blot.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atsushi Tanaka, 2000. Seminar on methodology for plant mutation and breeding for quality effective use of physical/chemical mutagens. P. 123-127.
2. Bryant P. E., 1982. "Environment for inducible DNA - associated protein formed during the development of increased resistance to radiation in Chlamydomonas... Radiation biology and chemistry: Research developments, p. 303 – 313.
3. Daniel M. B., Michael D. R., Stuart J. E., 1996. Lowry assay. Protein Methods, pp. 68 - 71.
4. Laemmli U., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. Vol. 4: Nature, 227: 680 - 685.
5. Lê Trần Bình và cộng sự, 2001. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy Rong Câu Chỉ Vàng (*Gracilaria asiatica*) trong điều kiện phòng thí nghiệm. (Tạp chí di truyền và ứng dụng đã chấp nhận in).
6. Nguyễn Thị Kim Ngân, 1993. Bài giảng lý sinh. Trang 102 - 112. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
7. Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Văn Lâm, Hoàng Minh Hiền, Phạm Ngọc Sơn, Lê Trần Bình, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đặng Diễm Hồng, 2001. Bước đầu thăm dò sự biến đổi protein ở các dòng Rong Câu chiếu xạ. Báo cáo Hội Nghị Hóa Sinh Y Dược Hà Nội và các tỉnh phía Bắc tháng 8/2001, trang 100 -105.
8. Takeshi Nishio, 1995. Seed Protein Mutans in Rice – Genetic analysis and utilization in rice breeding. Contributed papers. Workshop on mutation breeding using radiation technology on cereal crops. Philippines, pp. 159 - 166.