

TÁCH, LÀM SẠCH VÀ BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA MỘT SỐ TỐC-XIN TỪ NỌC BÒ CẠP VIỆT NAM *Lychas mucronatus*

HOÀNG NGỌC ANH

Viện Hóa học

ĐẶNG TRẦN HOÀNG, TRƯƠNG NAM HẢI

Viện Công nghệ sinh học

FOURNIER A.

National Institute of scientific Research Pointe-Claire, Canada

Ở Việt Nam, có một số loài bọ cạp thuộc các họ Buthidae, Scorpionidae và Chaerilidae [1-5]. Những nghiên cứu đầu tiên của chúng tôi cho thấy ở hai tỉnh Bình Phước và Bình Dương có các loài bọ cạp *Lychas mucronatus* và *Heterometrus petersii petersii*. Khi nghiên cứu nọc bọ cạp của loài *L. mucronatus*, chúng tôi đã xác định được có hai nhóm tốc-xin với khối lượng phân tử 3500-5000 và 6000-8000 Da [6]. Từ nọc bọ cạp này, chúng tôi đã tách ra và làm sạch bảy tốc-xin ngắn ($M_r = 3500-5000$ Da); những tốc-xin này có tác dụng ức chế dây thần kinh bị kích thích. Trong số những tốc-xin đó, chúng tôi đã xác định được cấu trúc bậc 1 của tốc-xin 14 [7], với trình tự như sau: **VSIGIKCDPSIDLCEGQCRIRYFTGYCSGDTCHCS**.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tinh chế các nơ-rô-tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp trực tiếp từ nọc thô, không qua bước lọc qua gel và bước đầu xác định cấu trúc bậc 1 của chúng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Bọ cạp nâu (*L. mucronatus*) được thu thập ở tỉnh Bình Phước, trong các tháng 5-6 của hai năm 2003 và 2004. Bọ cạp được nuôi trong chậu nhựa trên có phủ cỏ, lá khô; thức ăn của chúng là côn trùng. Nọc bọ cạp được thu bằng xung điện, rồi đem làm khô trên CaCl_2 khan và giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi dùng. Để tách chiết và làm sạch các tốc-xin, chúng tôi đã sử dụng các hóa chất của hãng Merck.

2. Phương pháp

- Tách, làm sạch và xác định trình tự axit amin của các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19.

Sắc ký lỏng cao áp đảo pha (RP-HPLC) được tiến hành trên máy phân tích Beckman system gold và máy điều chế Flonged MOD col (Mỹ) với cột Phenomenex Jupiter (250×35 mm, $15 \mu\text{m}$, 300 Å) C18; tốc độ rửa cột 20 ml/phút. Cột sắc ký được rửa bằng gradient tuyến tính của các dung dịch sau: A là 0,06% TFA trong nước và B là 0,06% TFA trong 55% axêtonitrin trong nước. Chương trình rửa cột: 0-50% B trong thời gian 90 phút và sau đó 50-100% B trong thời gian 90 phút.

Hoạt tính sinh học của các phân đoạn tốc-xin tách ra được thử lên động mạch của giống chuột bạch C57BL/6 bằng máy xác định mức độ co cơ. Động mạch của chuột được ngâm trong dung dịch sinh lý: 4 g (10 mM) dextroza, 4,2 g (25 mM) NaHCO_3 , 13,8 g (120 mM) NaCl , 10 ml (4,7 mM) KCl , 10 ml (1,2 mM) K_2PO_4 , 10 ml (2,4 mM) MgSO_4 , 5 ml (2,5 mM) CaCl_2 , 2000 ml nước là thể tích cuối cùng của dung dịch sinh lý.

Khối lượng phân tử của các tốc-xin được xác định trên máy Mass-spectrum Voyager (Mỹ).

Để xác định số lượng gốc cystein trong phân tử, các protein được khử hóa và an-kin hóa theo quy trình sau: các protein sạch (30 μg) được hòa trong 3 ml đệm 0,6 M Tris-HCl pH = 8,6 có chứa 6 M guanidin hydroclorit. Thêm vào dung dịch này 30 μl β -mercaptoetanon và giữ trong

khí acgon ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Sau đó, thêm vào đó 0,3 ml 500 mM iodoaxetat, khuấy và giữ trong tối ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ để an-kin hóa protein đã khử. Quá trình làm sạch muối của các protein đã S-an-kin hóa được tiến hành bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột C8.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu mẫu và lấy nọc của loài bò cạp nâu *L. mucronatus*

Bò cạp phân bố nhiều ở miền Nam nước ta, trong đó chủ yếu ở vùng Đông Nam bộ và tỉnh Đắc Nông. Việc bắt bò cạp thường được tiến hành vào đầu mùa mưa (từ giữa tháng 5 đến đầu tháng 7); đó cũng là mùa sinh sản của chúng. Đầu mùa mưa năm 2003, chúng tôi đã tiến hành bắt bò cạp nâu ở miền Nam rồi mang ra Hà Nội nuôi và lấy nọc; do khí hậu khác nhau nên bò cạp chết rất nhanh, vì vậy trong mùa đó, từ 1300 bò cạp lấy được 450 mg nọc, mà nọc không được tốt (lượng cặn không tan trong nước chiếm 10%) và việc tách các tốc-xin gặp nhiều khó khăn. Do kết quả như vậy nên mùa mưa năm 2004, chúng tôi đã quyết định bắt lượng bò cạp nhiều lên và lấy nọc tại chỗ để tăng số lượng nọc thu được. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát bò cạp ở các tỉnh Đắc Nông, Tây Ninh, Bà Rịa-Vũng Tàu và Bình Phước. Kết quả cho thấy ở tỉnh Đắc Nông, có nhiều bò cạp đen *H. petersii* (hình 2), còn ở vùng Đông Nam bộ có nhiều bò cạp nâu *L. mucronatus* (hình 1).



Hình 1. Bò cạp nâu *L. mucronatus*

Trong các loài bò cạp này, chúng tôi quan tâm đến nọc của bò cạp nâu và dựa vào kết quả của khảo sát này, chúng tôi đã tổ chức bắt được khoảng 4000 con bò cạp nâu tại tỉnh Bình Phước, nuôi và lấy nọc của những bò cạp này tại thành phố Hồ Chí Minh. Việc nuôi bò cạp tại thành phố Hồ Chí Minh phù hợp với khí hậu nên bò cạp sống và phát triển tốt, giúp cho việc thu được lượng nọc cần thiết. Sau 1 tháng nuôi và lấy nọc, chúng tôi đã thu được 1000 mg nọc khô với chất lượng tốt.



Hình 2. Bò cạp đen *H. petersii petersii*

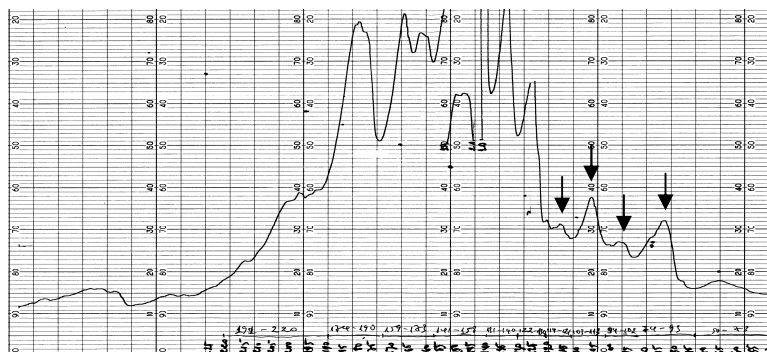
2. Tách, làm sạch và khảo sát đặc tính của các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày phương pháp tách, làm sạch các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 của nọc bò cạp nâu trực tiếp từ nọc thô bằng sắc ký lỏng cao áp, sau đó dùng khối phổ để định hướng tách các tốc-xin quan tâm.

Trước đây, các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 đã được tách ra từ đỉnh 3 (sau lọc qua gel), khảo sát hoạt tính lên dây thần kinh của ếch và xác định khối lượng phân tử của chúng tương ứng là: 4316 Da, 4054 Da, 4948 Da, 4133 Da và 3958 Da [6], nhưng trình tự axit amin chưa được xác định. Trong nghiên cứu này, dựa vào khối lượng phân tử của các tốc-xin đã biết, chúng tôi đã tiến hành tách các tốc-xin này từ nọc thô bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp và sử dụng khối phổ để định hướng các phân đoạn cần làm sạch; phương pháp này đã làm tăng hiệu quả tách các tốc-xin lên.

Sử dụng 600 mg, trong số 1000 mg nọc bò cạp thô đã thu được vào các tháng 5-6 của năm 2004, bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo

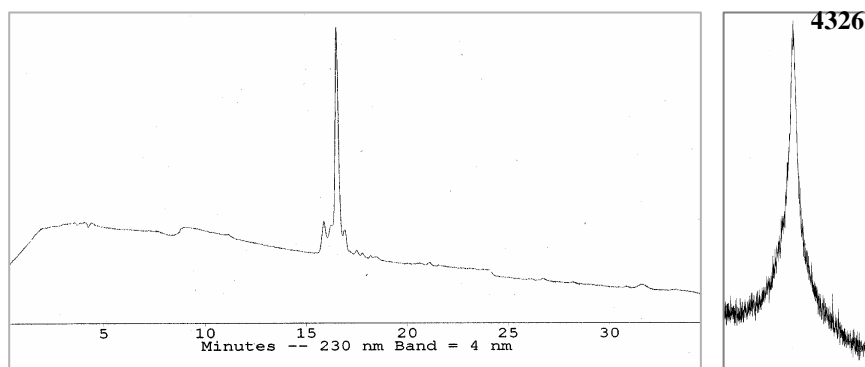
pha (RP-HPLC) trên cột C18, chúng tôi đã tách ra một loạt các protein được trình bày trong hình 3.



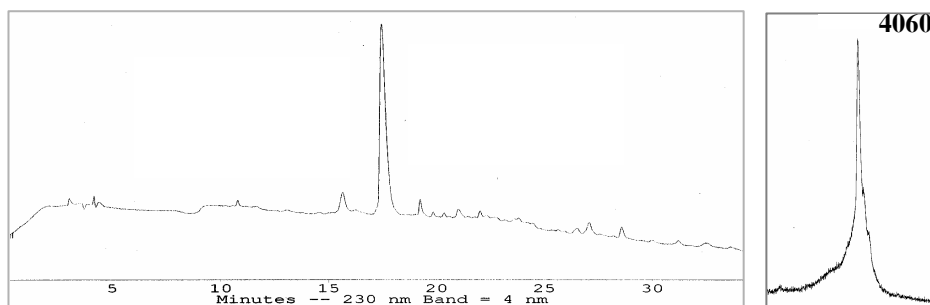
Hình 3. Sắc ký lỏng cao áp đảo pha (RP-HPLC) của nọc thô của bò cạp nâu *L. mucronatus* trên cột C18. Các tốc-xin quan tâm nằm ở vùng được đánh dấu mũi tên

Đo khối phổ của các phân đoạn đã tách ra cho thấy những tốc-xin mà chúng tôi quan tâm nằm trong vùng được đánh dấu mũi tên trên sắc ký đồ (hình 3). Khảo sát tác dụng của các phân đoạn này lên động mạch cổ của chuột cho thấy chúng làm co cơ của động mạch của chuột; điều đó nói lên các tốc-xin này tác dụng lên các kênh thần kinh và chúng là các nơ-rô-tốc-xin, phù hợp với những

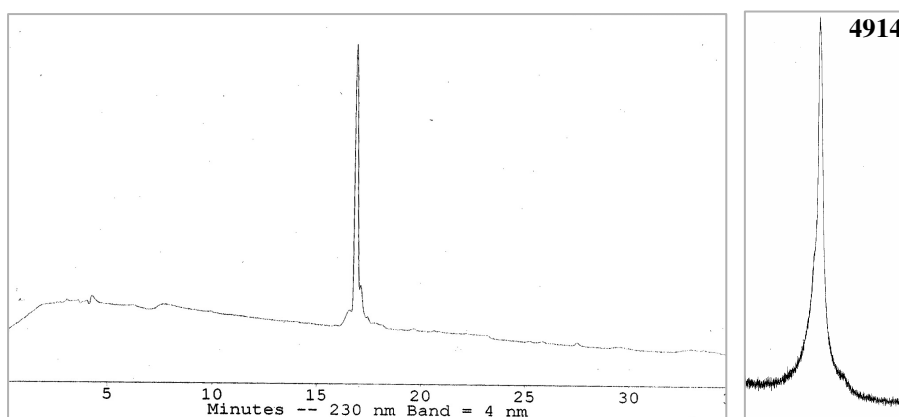
nghiên cứu trước đây của các tốc-xin này. Để thu được các tốc-xin sạch, các phân đoạn đã tách ra được đem đông khô và chạy lại sắc ký lỏng cao áp trên cột C18 phân tích hoặc điều chế, tùy thuộc vào lượng các phân đoạn thu được. Sau vài lần chạy sắc ký lỏng cao áp kết hợp với khối phổ để định hướng, 5 tốc-xin đã được tách và xác định khối lượng phân tử như trình bày trong các hình 4-8.



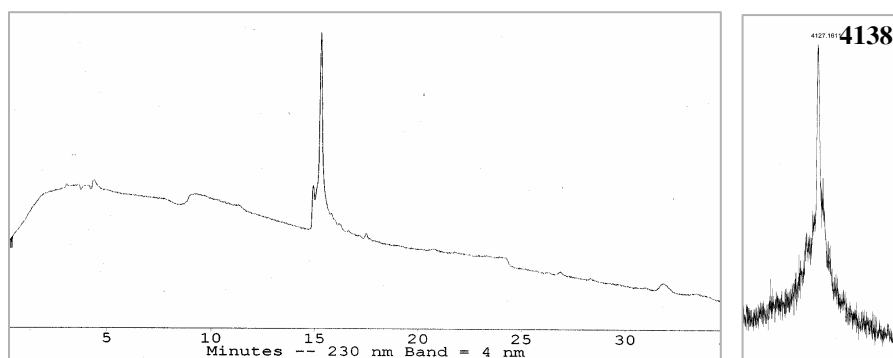
Hình 4. Sắc ký đồ HPLC và khối phổ của tốc-xin 5 (Mr = 4326)



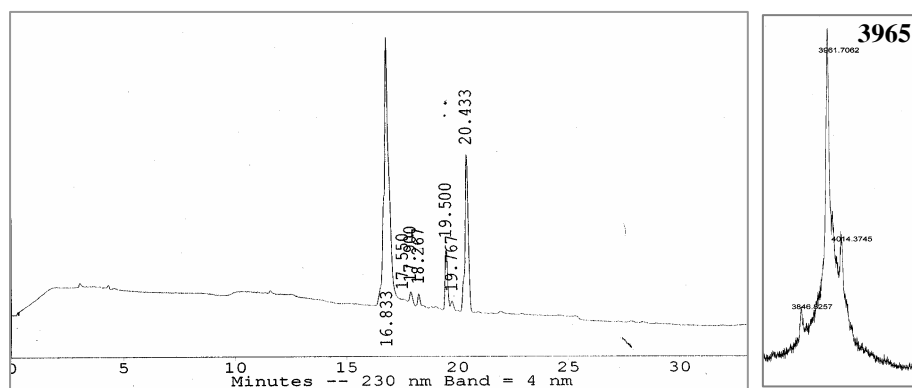
Hình 5. Sắc ký đồ HPLC và khối phổ của tốc-xin 7 (Mr = 4060)



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC và khối phổ của tốc-xin 9 ($M_r = 4914$)



Hình 7. Sắc ký đồ HPLC và khối phổ của tốc-xin 13 ($M_r = 4138$)



Hình 8. Sắc ký đồ HPLC và khối phổ của tốc-xin 19 ($M_r = 3965$)

Việc so sánh khối lượng phân tử của các tốc-xin được tách ra với khối lượng phân tử của các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 đã được tách ra trước đây cho thấy chúng là một.

Như vậy, bỏ qua bước lọc qua gel, kết hợp hai phương pháp sắc ký lỏng cao áp và khối phổ,

từ 600 mg nọc thô, chúng tôi đã tách, làm sạch và khảo sát đặc tính của 5 tốc-xin. Bằng cách này, chúng tôi đã nâng cao hiệu quả tinh sạch các tốc-xin của nọc bọ cạp; trước đây, để thực hiện công việc này, chúng tôi đã phải sử dụng 2000 mg nọc thô [6].

3. Xác định sự có mặt của cầu đisunphít trong phân tử của các tốc-xin đã tách ra

Để xác định cấu trúc bậc một của các tốc-xin nhận được, đầu tiên là phải tiến hành khử hóa và an-kin hóa chúng để giải phóng các cầu đisunphít. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khử hóa và an-kin hóa các tốc-xin như mô tả trong phần phương pháp và kết quả được trình bày trong phần này của bài báo. Đây là bước đầu trong việc xác định cấu trúc của chúng.

Kết quả khử và an-kin hóa các tốc-xin cho thấy :

- Tốc-xin 5 có khối lượng phân tử 4326 Da; sau khử hóa và an-kin hóa, có khối lượng phân tử 4684 Da, tăng lên 356 Da, tương đương với 6 nhóm C_2H_4NO ($Mr = 58$ Da; $356 : 58 = 6,14$) đã gắn vào các gốc xystein. Như vậy, trong phân tử của tốc-xin 5 có 6 gốc xystein tạo thành 3 cầu đisunphít.

- Tốc-xin 7 có khối lượng phân tử 4058 Da; sau khử hóa và an-kin hóa, có khối lượng phân tử 4423 Da, tăng lên 351 Da, tương đương với 6 nhóm C_2H_4NO ($Mr = 58$ Da; $351 : 58 = 6,05$) đã gắn vào các gốc xystein. Như vậy, trong phân tử của tốc-xin 7 có 6 gốc xystein tạo thành 3 cầu đisunphít.

- Tốc-xin 9 có khối lượng phân tử 4916 Da; sau khử hóa và an-kin hóa, có khối lượng phân tử 5330 Da, tăng lên 413 Da, tương đương với 7 nhóm C_2H_4NO ($Mr = 58$ Da; $413 : 58 = 7,1$) đã gắn vào các gốc xystein. Như vậy, trong phân tử của tốc-xin 9 có 7 gốc xystein nhưng tạo thành 3 cầu đisunphít.

- Tốc-xin 13 có khối lượng phân tử 4138 Da; sau khử hóa và an-kin hóa, có khối lượng phân tử 4490 Da, tăng lên 356 Da, tương đương với 6 nhóm C_2H_4NO ($Mr = 58$ Da; $356 : 58 = 6,14$) đã gắn vào các gốc xystein. Như vậy, trong phân tử của tốc-xin 13 có 6 gốc xystein tạo thành 3 cầu đisunphít.

- Tốc-xin 19 có khối lượng phân tử 3965 Da; sau khử hóa và an-kin hóa, nó có khối lượng phân tử 4314 Da, tăng lên 348 Da, tương đương

với 6 nhóm C_2H_4NO ($Mr = 58$ Da; $348 : 58 = 6$) đã gắn vào các gốc xystein. Như vậy, qua khử hóa và an-kin hóa, đã xác định được trong phân tử của tốc-xin 19 có 6 xystein tạo thành 3 cầu đisunphít.

Như vậy, việc khử hóa và an-kin hóa cho thấy trong phân tử của các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 có 3 cầu đisunphít, giống như cấu trúc của các nơ-rô-tốc-xin ngắn của nọc bò cạp.

III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng 600 mg, trong 1000 mg nọc đã thu được của loài bò cạp nâu *Lychas mucronatus*, bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp phối hợp với khối phổ và căn cứ vào khối lượng phân tử đã biết của các tốc-xin, chúng tôi đã tách và làm sạch các tốc-xin 5, 7, 9, 13 và 19 từ nọc thô của loài bò cạp này.

2. Kết quả khử hóa và an-kin hóa các tốc-xin này cho thấy, trong phân tử của chúng, có 3 cầu đisunphít; tính chất này đặc trưng cho tính chất cấu trúc của các nơ-rô-tốc-xin của nọc bò cạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lourenco W. R.**, 1994: Biogeographica, 70: 155-160.
2. **M'Barek S. et al.**, 2003: J. Biol Chem., 278: 31095-31104.
3. **Possani L. D. et al.**, 1999: Eur. J. Biochem., 264: 287-300.
4. **Gordon D. et al.**, 2003: Eur. J. Biochem., 270: 2663-2670.
5. **Debin J. A. et al.**, 1993: Am. J. Physiol., 264 (Cell. Physiol.33), C361-C369.
6. **Hoang N. A. et al.**, 2001: Bulletin Experimental Biology and Medicine, 132: 398-400.
7. **Hoang N. A. et al.**, 2003: Applied Biochemistry and Microbiology, 39: 122-126.

**ISOLATION, PURIFICATION AND PRELIMINARY
STRUCTURAL DETERMINATION OF THE TOXINS
FROM SCORPION *Lychas mucronatus***

HOANG NGOC ANH, DANG TRAN HOANG, TRUONG NAM HAI, FOURNIER A.

SUMMARY

Our study has showed that the scorpion species *H. petersii petersii* was abundant in the Dacnong province, but the scorpion one *L. mucronatus* many distributed in the Tayninh, Binhphuoc and Baria-Vungtau provinces. Five neurotoxins were isolated, purified and identified from the venom of *L. mucronatus* by using the RP-HPLC on C18 column and Mass-Spectrum. These isolated toxins had molecular masses as: 4326 Da, 4060 Da, 4914 Da, 4138 Da and 3965 Da respectively, that were similar to the molecular masses of the known toxins 5, 7, 9, 13 and 19 [6]. The structural determination of these toxins showed that in their molecules, there were three disulfide bridges what were typical for the short scorpion neurotoxins.

Ngày nhận bài: 4-2-2005