

## KẾT QUẢ TÁCH ENZIM RIBONUCLEAZA TỪ NỌC RẮN HỔ MANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION TRÊN CỘT CM-XEN-LU-LÔ

NGUYỄN VĂN THIẾT, GIANG THÁI SON

*Viện Công nghệ sinh học*

Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã cho thấy enzym ribonucleaza (RNaza) trong nọc rắn hổ mang *Naja atra* (Cantor, 1842) Việt Nam thể hiện hoạt tính xúc tác cao nhất trong vùng axit [7, 8], với pH tối ưu ( $pH_{opt}$ ) tương đương với  $pH_{opt}$  của pepsin [1] trong dạ dày của người và các động vật bậc cao khác:  $pH_{opt} = 2,53 \pm 0,30$  [8]; trong khi RNaza trong nọc rắn hổ mang *Naja oxiana* vùng Trung Á [10], RNaza trong nọc rắn hổ mang *Naja naja* vùng Guntur của Ấn Độ [4] và tất cả các enzym khác thuộc siêu họ RNaza A (bao gồm tất cả các RNaza ngoại tiết ở động vật có xương sống, trừ lớp Cá) [5] đều có  $pH_{opt} > 7$ . Hơn nữa, những kết quả nghiên cứu bước đầu của chúng tôi cho thấy RNaza trong nọc rắn hổ mang Việt Nam không bị ức chế bởi protein ức chế RNaza (RI) từ nhau thai người [11]. Điều này có nghĩa là RNaza trong nọc rắn hổ mang không tương tác với RI và như vậy, có khả năng thể hiện hoạt tính xytotoxin, bởi vì không bị ức chế bởi RI nội bào là điều kiện tiên quyết để một RNaza bất kỳ thuộc siêu họ RNaza A biểu hiện được hoạt tính xytotoxin tiềm tàng của nó [2, 3, 6]. Vì vậy việc tách chiết và làm sạch RNaza từ nọc rắn hổ mang để nhận chế phẩm enzym có độ sạch cao, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về tương tác của RNaza nọc rắn với RI là rất cần thiết. Công trình nghiên cứu này sẽ trình bày các kết quả tách RNaza từ nọc rắn hổ mang bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột với CM-xen-lu-lô.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nọc rắn hổ mang đông khô - nguồn RNaza được mua ở làng nghề nuôi rắn tại xã Vĩnh Sơn, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc. Chế phẩm  $E_0$  nhận được bằng hòa tan nọc rắn đông khô vào nước cất 2 lần hay dung dịch đệm cần thiết theo tỷ lệ 10 mg nọc rắn trong 1 ml. Chế phẩm ARN tổng số từ nấm men và nhựa trao đổi ion

cacbôxymethylxenlulô (CM-xen-lu-lô) của hãng Sigma. Glyxin (Gly) của hãng Prolabo. Các hóa chất khác đều có độ sạch phân tích cao.

Phân tách RNaza bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột ( $\varnothing 1,6 \times 12-15$  cm) CM-xen-lu-lô. Trong mỗi lần sắc ký cho lên cột (đã được cân bằng trước với đệm xitrat 10 mM có giá trị pH khác nhau là 5,8; 5,6; 5,5; 5,2; 4,8 và 4,4) khoảng 100 mg nọc rắn đông khô (10 ml chế phẩm  $E_0$ ), rửa cột bằng một thể tích đệm ban đầu, sau đó thôi protein ra khỏi cột bằng gradient nồng độ NaCl 0 ÷ 1,0 M NaCl với thể tích chung là 120 ml (bình chứa: 60 ml NaCl 1 M trong đệm xitrat 10 mM; bình khuấy: 60 ml đệm xitrat 10 mM), tốc độ chảy 1 ml/phút, thu mỗi phân đoạn 3 ml. Sau khi kết thúc công việc sắc ký, hoạt tính của RNaza trong mỗi phân đoạn được xác định theo phương pháp như đã mô tả trước đây [7], còn protein được đo bằng phương pháp quang phổ.

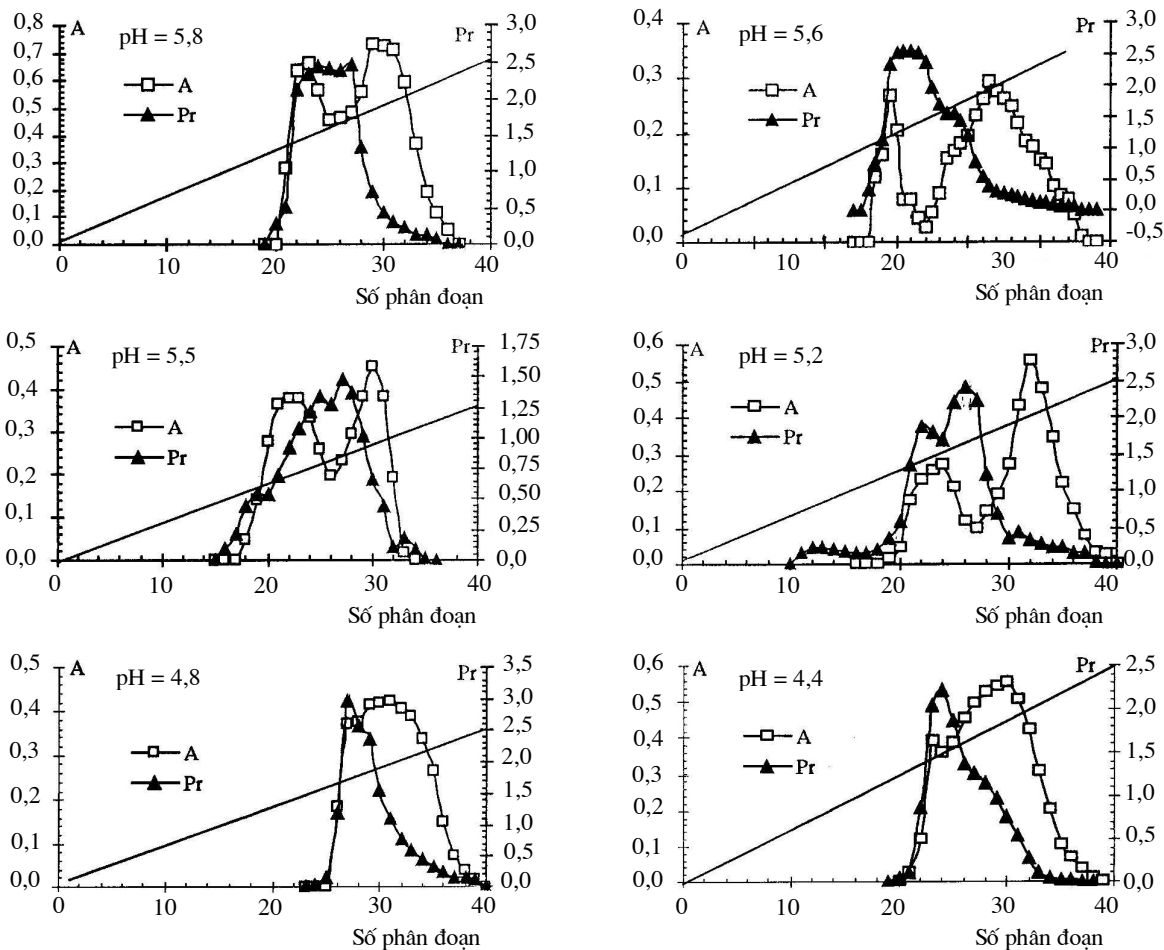
### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Kết quả sắc ký chế phẩm $E_0$

Trong sắc ký trao đổi ion thì sự khác biệt về lực tương tác ion-ion giữa protein và chất mang có ý nghĩa quyết định để phân tách các protein trong hỗn hợp. Về phần mình, sự khác biệt này lại phụ thuộc vào pH của môi trường bao quanh các phân tử protein, bởi vì điện tích bề mặt của các phân tử protein phụ thuộc vào pH của môi trường. Vì vậy, việc sắc ký chế phẩm  $E_0$  đã được tiến hành tại các pH khác nhau trong vùng pH = 4,4 - 5,8 (nhựa CM-xen-lu-lô bền trong dải pH axit từ 4 - 6) của đệm xitrat 10 M, để tìm giá trị pH mà tại đó, việc tách chiết RNaza là tốt nhất. Kết quả sắc ký chế phẩm  $E_0$  ở các giá trị pH này được trình bày trên hình 1. Đầu tiên, quá trình sắc ký đã được tiến hành tại pH = 5,8, sau đó giảm dần giá trị pH xuống đến pH = 4,4. Từ những sắc ký đồ nhận được, ta thấy ở tất cả các giá trị pH,

protein của nọc rắn đều được thổi ra khỏi cột dưới dạng một đỉnh protein chính không đối xứng, với một đuôi (vai) phía bên phải có hàm lượng protein thấp hơn nhiều trong vùng đỉnh chính. Đỉnh protein nhận được chiếm phần lớn tổng số protein cho lên cột (> 80%). Sự phân bố

protein như vậy theo các phân đoạn cho thấy các protein của nọc rắn có điện tích rất gần nhau, tạo thành một phổ protein liên tục và các protein của nọc rắn đã không tách được thành các đỉnh riêng biệt bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên CM-xen-lu-lô trong vùng pH = 4,4 - 5,8.



**Hình 1.** Sắc ký đồ của chế phẩm E<sub>0</sub> nhận được sau quá trình sắc ký trao đổi ion trên cột với CM-xen-lu-lô ở các giá trị pH khác nhau của đệm xitrat

A. hoạt tính của RNaza được đo trong đệm Gly 10 mM, pH = 2,5, tính bằng đơn vị OD260; Pr. protein, tính bằng đơn vị OD280; đường chéo là gradient nồng độ NaCl, nồng độ NaCl tính theo giá trị trục tung bên phải được nhân với 4 hoặc 8 (trong trường hợp sắc ký tại pH = 5,5).

Kết quả xác định hoạt tính của RNaza cho thấy ở các giá trị pH > 5,0, luôn có 2 đỉnh RNaza phân biệt rõ rệt trên sắc ký đồ; đỉnh RNaza I nằm trong vùng đỉnh protein chính, còn đỉnh RNaza II - nằm trong vùng vai phía bên phải đỉnh protein chính. Đỉnh RNaza I phản hấp phụ khỏi cột ở nồng độ muối NaCl khoảng 0,6 M và đỉnh RNaza II - ở nồng độ NaCl khoảng

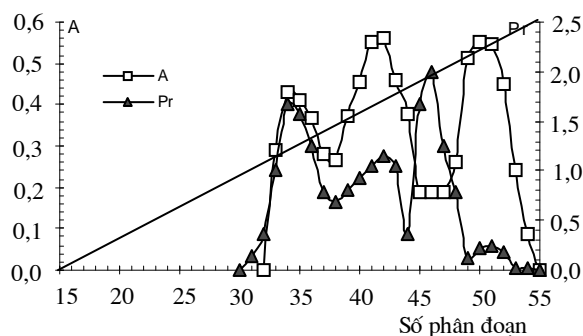
0,8 M. Khi quá trình sắc ký được tiến hành tại các giá trị pH < 5,0, thường chỉ nhận được một đỉnh RNaza rộng, bao trùm toàn bộ đỉnh protein và đuôi phía bên phải của nó.

Việc phân tích kỹ các sắc ký đồ cho thấy: khi sắc ký tiến hành ở pH = 5,8 thì hoạt tính enzym của 2 đỉnh RNaza gần như tương đương nhau, đỉnh RNaza I trùng hoàn toàn với nửa trái của đỉnh

protein chính, còn đỉnh RNaza II - tuy nằm ở phía bên phải đỉnh protein chính nhưng cũng rất gần với đỉnh protein này. Khi giảm dần giá trị pH từ 5,8 xuống đến 5,2, ta quan sát được các xu hướng biến đổi sau: 1) hoạt tính enzym của đỉnh RNaza I giảm dần trong khi hoạt tính enzym của đỉnh RNaza II lại tăng dần lên; 2) đỉnh RNaza II càng tách xa ra khỏi đỉnh protein chính và ở giá trị pH =

5,2 thì đỉnh RNaza II hầu như đã tách được ra hoàn toàn khỏi đỉnh protein chính và 2 đỉnh RNaza cũng phân tách ra khỏi nhau tốt nhất.

Trong một số lần sắc ký ở pH > 5,0, thay vì nhận được 2 đỉnh RNaza bình thường như nêu trên, lại nhận được tới 3 đỉnh RNaza phân biệt phản hấp phụ khỏi cột ở các nồng độ muối NaCl tương ứng bằng 0,5; 0,65 và 0,86 M (hình 2).



**Hình 2.** Sắc ký đồ của chế phẩm E<sub>0</sub> trong trường hợp nhận được 3 đỉnh RNaza (các ký hiệu và ghi chú như hình 1)

Trong 3 đỉnh RNaza nhận được thì đỉnh III có hoạt tính enzym cao nhất, đỉnh enzym này cũng phân tách được ra khỏi đỉnh protein chính trên sắc ký đồ, giống như các trường hợp nhận được 2 đỉnh RNaza, và vì vậy mà độ sạch của chế phẩm RNaza thu được trong đỉnh này cũng cao nhất.

Như vậy, từ các kết quả nhận được, ta thấy sắc ký chế phẩm E<sub>0</sub> trên cột CM-xen-lu-lô được tiến hành tại pH = 5,2 là tốt nhất, bởi vì tại giá trị pH này, đỉnh enzym chính (đỉnh II) gần như được tách ra hoàn toàn khỏi đỉnh protein chính của nọc rắn; hàm lượng protein trong các phân đoạn thuộc đỉnh này rất thấp và hoạt tính đặc trưng của chế phẩm RNaza tương ứng nhận được tăng khoảng 10 lần so với chế phẩm E<sub>0</sub>.

Cho đến nay, chúng tôi đã tiến hành khoảng 30 lần sắc ký chế phẩm E<sub>0</sub> ở giá trị pH = 5,2 và 10 lần ở các giá trị pH khác lớn hơn 5,0, nhưng chỉ trong 4 lần sắc ký là nhận được 3 đỉnh RNaza phân biệt (trong đó có 2 lần sắc ký ở pH = 5,2 và 2 lần sắc ký ở pH = 5,5); trong tất cả các lần sắc ký còn lại, chỉ nhận được 2 đỉnh RNaza. Trong trường hợp sắc ký nhận được 2 đỉnh RNaza, sự phân bố hoạt tính giữa 2 đỉnh tương ứng là 34% và 66% và 2 dạng RNaza ứng với 2 đỉnh này được ký hiệu là SK-12 và SK-22; còn trong trường hợp sắc ký nhận được 3 đỉnh, sự phân bố hoạt tính giữa chúng tương ứng là:

24%; 39% và 37% - theo tổng hoạt tính RNaza ra khỏi cột và 3 dạng RNaza ứng với 3 đỉnh này được ký hiệu là SK-13, SK-23 và SK-33.

## 2. Một số tính chất của các đỉnh (dạng) RNaza phân tách được bằng sắc ký

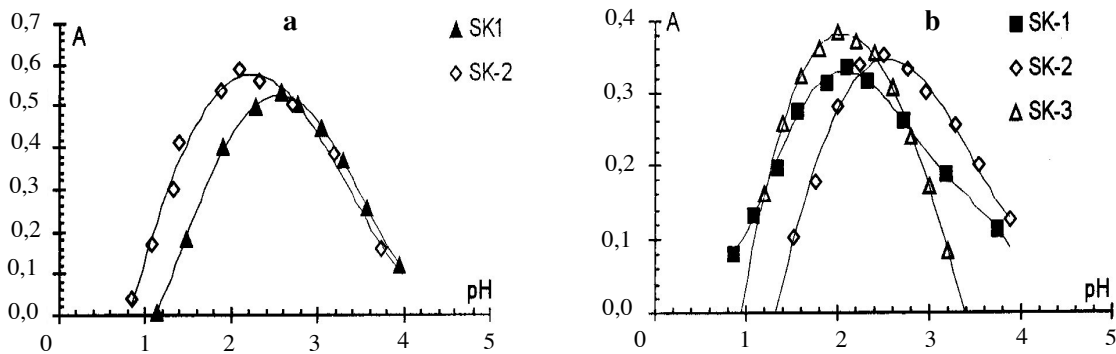
### a. Ái lực với cột CM-xen-lu-lô

Từ các kết quả ở phần trên ta thấy, RNaza trong nọc rắn hổ mang Việt Nam tương tác rất mạnh với nhựa CM-xen-lu-lô. Cả 3 dạng RNaza của nọc rắn đều phản hấp phụ khỏi cột trao đổi ion ở các nồng độ muối rất cao (> 0,5 M NaCl). Điều này cho phép kết luận rằng 3 dạng RNaza của nọc rắn có tổng điện tích dương bề mặt lớn và khác biệt nhau rất nhiều.

Theo nồng độ muối mà các dạng SK-12, SK-22 và các dạng SK-23, SK-33 ra khỏi cột, ta thấy dạng SK-12 tương ứng với dạng SK-23, còn dạng SK-22 tương ứng với dạng SK-33; điều này rất phù hợp với kết quả xác định giá trị pH tối ưu (pH<sub>opt</sub>) của các dạng RNaza này sẽ được trình bày trong phần sau.

### b. pH tối ưu của các đỉnh RNaza

Kết quả xác định pH<sub>opt</sub> của các đỉnh (dạng) RNaza tách được bằng phương pháp sắc ký chế phẩm E<sub>0</sub> được trình bày trên hình 3.



**Hình 3.** Đồ thị biểu diễn mối phụ thuộc của hoạt tính của các đỉnh RNaza nhận được sau sắc ký chế phẩm  $E_0$  trên cột CM-xen-lu-lô vào pH. Hoạt tính của RNaza được đo trong các đệm Gly 10 mM  
**a.** trường hợp nhận được hai đỉnh RNaza; **b.** trường hợp nhận được ba đỉnh RNaza.

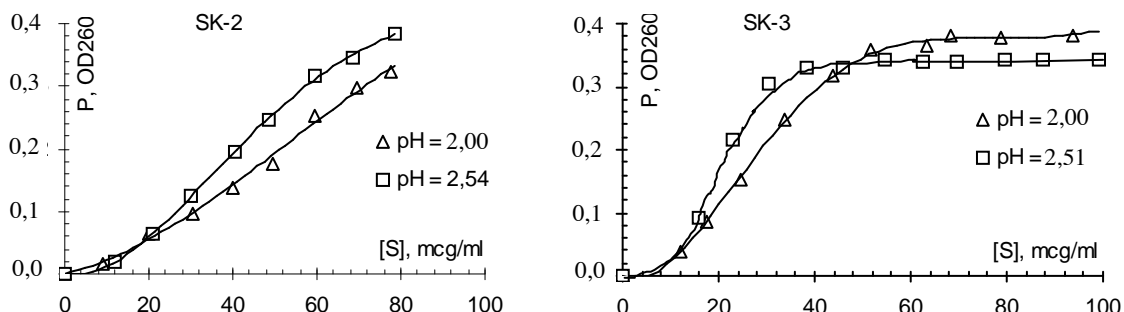
Từ những kết quả được trình bày trên hình 3, ta thấy: trong trường hợp sắc ký nhận được 2 đỉnh RNaza, đỉnh SK-1<sub>2</sub> có  $pH_{opt} = 2,57$  và đỉnh SK-2<sub>2</sub> có  $pH_{opt} = 2,09$ ; trong trường hợp nhận được 3 đỉnh RNaza, đỉnh SK-1<sub>3</sub> có  $pH_{opt} = 2,08$ , đỉnh SK-2<sub>3</sub> có  $pH_{opt} = 2,51$  và đỉnh SK-3<sub>3</sub> có  $pH_{opt} = 2,0$ . Như vậy, giá trị  $pH_{opt}$  của các đỉnh RNaza đã cùng cố kết luận đưa ra ở phần trên là: đỉnh SK-1<sub>2</sub> tương ứng với đỉnh SK-2<sub>3</sub> (giá trị  $pH_{opt}$  của chúng như nhau, bằng 2,57 và 2,51 tương ứng) và đỉnh SK-2<sub>2</sub> tương ứng với đỉnh SK-3<sub>3</sub> (giá trị  $pH_{opt}$  của chúng, bằng 2,09 và 2,0 tương ứng). Còn đỉnh SK-1<sub>3</sub> chỉ nhận được trong 4 lần trên tổng số khoảng 40 lần sắc ký. Đỉnh RNaza này mặc dù ra khỏi cột sớm hơn 2 đỉnh kia, nhưng lại có giá trị  $pH_{opt}$  giống như đỉnh SK-3<sub>3</sub>.

Như vậy, từ các kết quả sắc ký và xác định  $pH_{opt}$  của các đỉnh RNaza nhận được sau sắc ký có thể kết luận rằng trong nọc rắn hổ mang đông khô có từ 2 đến 3 dạng phân tử khác nhau của RNaza. Để cho tiện lợi, các đỉnh RNaza này được ký hiệu theo thứ tự ra khỏi cột của chúng, tức là theo hướng tăng của nồng độ muối NaCl

mà tại đó, chúng bị phản hấp phụ khỏi cột CM-xen-lu-lô: đỉnh RNaza ra sớm nhất, phản hấp phụ khỏi cột CM-xen-lu-lô ở nồng độ muối khoảng 0,5 M NaCl, được ký hiệu là SK-1; đỉnh RNaza ra thứ hai, phản hấp phụ khỏi cột CM-xen-lu-lô ở nồng độ muối khoảng 0,60 - 0,65 M NaCl, được ký hiệu là SK-2; đỉnh RNaza ra sau cùng, phản hấp phụ khỏi cột CM-xen-lu-lô ở nồng độ muối rất cao: 0,80 - 0,86 M NaCl, được ký hiệu là SK-3. Theo cách ký hiệu này thì 2 đỉnh RNaza thường nhận được trong đại đa số các lần sắc ký chế phẩm nọc rắn đông khô  $E_0$  trên cột CM-xen-lu-lô phải được gọi là SK-2 và SK-3, thay cho SK-1 và SK-2 như trước đây [9].

#### c. Tính chất động học

Do dạng SK-1 đôi khi mới nhận được, còn 2 dạng SK-2 và SK-3 luôn nhận được trong tất cả các lần sắc ký, cho nên trong phần này, chỉ so sánh các tính chất động học của 2 dạng RNaza này. Kết quả nghiên cứu động học bão hòa enzym bởi cơ chất của 2 dạng RNaza SK-2 và SK-3 ở vùng giá trị pH tối ưu của chúng được trình bày trên hình 4.



**Hình 4.** Đồ thị biểu diễn động học bão hòa enzym bởi cơ chất của 2 dạng RNaza SK-2 và SK-3 tại các giá trị pH tương ứng với giá trị  $pH_{opt}$  của chúng. Động học được nghiên cứu trong đệm Gly 10 mM

Từ các đồ thị trên hình 4, ta thấy các đường cong động học bão hòa enzym bởi cơ chất của cả 2 dạng RNaza SK-2 và SK-3 đều có dạng sigma (dạng hình chữ S) hay không tuân theo động học Michaelis-Menten thông thường. Hơn nữa, dạng SK-3 có ái lực với cơ chất cao hơn nhiều so với dạng SK-2; nếu dạng SK-3 đã đạt bão hòa ở nồng độ cơ chất  $[S] > 40 \mu\text{g ARN/ml}$  ở  $\text{pH} = 2,51$  và  $[S] > 60 \mu\text{g ARN/ml}$  ở  $\text{pH} = 2,0$ , thì dạng SK-2 dường như còn lâu mới đạt bão hòa, thậm chí ở nồng độ cơ chất  $[S] = 80 \mu\text{g ARN/ml}$ ; ở nồng độ cơ chất cao như vậy mà lượng sản phẩm tạo thành (P) gần như vẫn tỉ lệ tuyến tính với nồng độ cơ chất ở  $\text{pH} = 2$  hoặc chưa có dấu hiệu đạt bão hòa ở  $\text{pH} = 2,54$ .

### III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả được trình bày ở trên, có thể kết luận như sau:

Bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột với CM-xen-lu-lô, đã tách được từ 2 đến 3 dạng RNaza trong nọc rắn hổ mang khác biệt nhau nhiều về điện tích bề mặt. Trong đó, 2 dạng SK-2 và SK-3 nhận được trong tất cả các lần sắc ký, còn dạng SK-1 chỉ nhận được trong một số ít lần sắc ký. Các dạng SK-1 và SK-3 có pH tối ưu như nhau, với  $\text{pH}_{\text{opt}} \approx 2$  còn dạng SK-2 có  $\text{pH}_{\text{opt}} \approx 2,5$ . Hai dạng enzym chính SK-2 và SK-3 không chỉ khác nhau về ái lực với nhựa CM-xen-lu-lô và giá trị  $\text{pH}_{\text{opt}}$ , mà còn khác biệt nhau nhiều về các tính chất động học: dạng SK-3 có ái lực với cơ chất cao hơn nhiều so với dạng SK-2.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Fersht A.**, 1977: Enzyme structure and mechanism. Freeman and Company Ltd.
2. **Haigis M. C., Kurten E. L., Raines R. T.**, 2003: Nucleic acids Research, 31: 31024 — 1032.
3. **Leland P. A., Raines R. T.**, 2001: JBC, 8: 405-413.
4. **Mahalakshmi Y. V., Jagahnadham M. V., Pandit M. W.**, 2000: IUBMB Life, 49: 309-316.
5. **Raines R. T.**, 1998: Chem. Rev., 98: 1045-1065.
6. **Raines R. T.**, 1999: Enzymatic mechanism: 235-249, IOC press, Washington DC.
7. **Nguyễn Văn Thiết**, 2002: Tạp chí Dược liệu, 7(6): 181-185. Hà Nội.
8. **Nguyễn Văn Thiết, Ngô Thị Hải Yến**, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 515-518. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
9. **Nguyễn Văn Thiết, Ngô Thị Hải Yến**, 2004: Tạp chí Dược liệu, 9(3): 89-93. Hà Nội.
10. **Vasilenko S. K., Babkina G. T.**, 1965: Biokhimiya, 30(4): 705-712 (in Russian).
11. **Ngô Thị Hải Yến, Nguyễn Văn Thiết**, 2004: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 195-198. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

## RESULTS OF THE RIBONUCLEASE ISOLATION FROM THE COBRA VENOM BY ION-EXCHANGE COLUMN WITH CM-CELLULOSE METHOD

NGUYEN VAN THIET, GIANG THAI SON

### SUMMARY

In this paper, the cobra (*Naja atra* Cantor, 1842) venom ribonuclease (RNase) was isolated of ion-exchange column with CM-cellulose method. The chromatographic isolation was carried out at different values of pH within an interval of  $\text{pH} = 4.4 - 5.8$ . At  $\text{pH} > 5.0$ , the cobra venom RNase was almost always eluted from the column in two picks at salt concentrations of about 0.6 M and 0.8 M NaCl; but in some cases - in three picks at salt concentrations of about 0.5 M, 0.65 M and 0.86 M NaCl, respectively; whereas, at  $\text{pH} < 5.0$ , the cobra venom RNase was always eluted from the column in single broad pick. The forms of the cobra venom RNase corresponding to these picks were designated as SK-1, SK-2 and SK-3, respectively. It seemed that these RNase forms were differed from each other in many properties, such as an optimum of pH ( $\text{pH}_{\text{opt}}$ ) and the kinetic property. Thus, the  $\text{pH}_{\text{opt}}$  of the form SK-2 was about 2.5, whereas this value of the forms SK-1 and SK-3 was the same and about 2.0. Besides, two main forms SK-2 and SK-3 had sigmoidal curves of the saturation of the enzyme with the substrate, but they differed significantly in an affinity to the substrate.

Ngày nhận bài: 14-11-2005