

CONOTOXIN TỪ NỌC ỐC CỎI BIỂN (*Conus*) VÀ ỨNG DỤNG CỦA CHÚNG TRONG Y DƯỢC HỌC

Lê Thị Bích Thảo¹, Bùi Thị Huyền¹, Đoàn Việt Bình¹, Nguyễn Thị Kim Dung¹, Nguyễn Thị Minh Phương¹, Đỗ Hữu Chí¹, Bùi Quang Nghị², Nguyễn Bích Nhi¹, Phan Văn Chi¹

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, *lethao@ibt.ac.vn

²Viện Hải Dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT: Những conotoxin có trong nọc của loài ốc cối biển rất đa dạng về cấu trúc, giàu liên kết disulfide và khoá chọn lọc điện áp hoặc phối tử của các kênh ion nên được ứng dụng làm thuốc giảm đau. Chúng tôi đã khảo sát các conotoxin trong nọc của 8 loài ốc cối của Việt Nam bằng phân tích sắc ký lỏng nano kết nối khối phổ. Để ứng dụng trong y dược, ω -conotoxin MVIIA tái tổ hợp đã được biểu hiện ở *E. coli* và xác định hoạt tính giảm đau trên các mô hình thử nghiệm ở chuột. Kết quả là các conotoxin tự nhiên nhận diện được đều thuộc các siêu họ O, M, A và một số peptide nhỏ chưa biết vì thiếu dữ liệu DNA và protein. MVIIA tái tổ hợp (CTX) đã được biểu hiện dung hợp với thioredoxin có trọng lượng phân tử khoảng 20.5 kDa (Trx-CTX) và peptide CTX tinh sạch có kích thước < 3 kDa sau khi loại bỏ thioredoxin và histag. Cả peptide CTX và protein dung hợp Trx-CTX đều có hoạt tính giảm đau như lidocain và morphine. Do vậy, conotoxin tái tổ hợp này có tiềm năng làm thuốc cho điều trị giảm đau hiệu quả.

Từ khóa: Conotoxin, ốc cối, protein/peptide, protein tái tổ hợp, ω -conotoxin.

MỞ ĐẦU

Các loài ốc cối trong giống *Conus* thuộc họ Conidae, phân bố chủ yếu ở các vùng biển nhiệt đới với khoảng 700 loài [22, 5]. Trong nọc của mỗi loài ốc cối có chứa trên 1.000 conopeptide, trong đó, mới chỉ gần 0,1% được nghiên cứu về mặt dược lý, là các protein màng điển hình với độ đặc hiệu cao [15]. Conopeptide có khả năng gắn đặc hiệu với các receptor màng khác nhau, các kênh ion, các chất vận chuyển của hệ thần kinh trung ương và cơ, được sử dụng như công cụ vạn năng trong khoa học thần kinh và là những dược phẩm có giá trị mà đích là hệ thần kinh ở người [22, 4]. Đã có 2.354 trình tự nucleotide (80 loài), 6.113 protein (102 loài) và 156 cấu trúc 3D (33 loài) được phát hiện [7] và có 98 conotoxin có tiềm năng điều trị các bệnh liên quan đến thần kinh và tổn thương thần kinh [2]. Conotoxin có khối lượng phân tử thấp (< 5 kDa) với 10-30 amino acid, là nhóm giàu liên kết disulfide chủ yếu trong nọc của ốc cối làm tăng khả năng bám của conotoxin với đích đặc hiệu [15].

Conotoxin vẫn đang được quan tâm nghiên cứu thành thuốc giảm đau hiệu quả trong điều trị đau thần kinh, bệnh Parkinson hay tâm thần [12, 4, 5]. Prialat là thuốc được tạo ra ở dạng

dung dịch pha chế của ziconotide sử dụng cho bệnh nhân điều trị đau mạn. Ziconotide là dạng tổng hợp hoá học của omega conopeptide (ω -conopeptide, MVIIA) tự nhiên gồm 25 amino acid có trong nọc của ốc cối biển *C. magus*. MVIIA tác động bằng cách bao vây các kênh Ca trên bề mặt tế bào thần kinh tham gia dẫn truyền tín hiệu đau trong tuỷ sống do đó làm giảm cảm giác đau và có tác dụng giảm đau mạnh hơn morphine từ 100-1.000 lần [4, 45]. Ngoài tác dụng giảm đau, conotoxin còn có triển vọng trong các nghiên cứu về hội chứng rối loạn co giật, đột quỵ, nhồi máu cơ tim, bảo vệ tế bào thần kinh trong các mô hình gây đột quỵ não [6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát và nhận dạng các conotoxin tự nhiên trong nọc của 8 loài ốc thu thập được ở vùng biển Nha Trang và nghiên cứu tạo conotoxin tái tổ hợp có hoạt tính giảm đau nhằm định hướng ứng dụng trong y dược học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

8 loài ốc cối thu thập tại vùng biển Nha Trang: *C. betulinus*, *C. characteristicus*, *C. litteratus*, *C. marmoreus*, *C. quercicus*, *C. striatus*, *C. textile* và *C. vexillum*. Chuột nhắt

trắng dòng Swiss (25-30 g/con) từ Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Các hóa chất: acetonitrile, Tris-HCl, Trifluoro acetic acid (Fluka, Đức), formic acid, methanol (Merck, CHLB Đức), hóa chất điện di SDS-PAGE (Bio-Rad, Hoa Kỳ), Trypsin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ); Vector pBT và pET32c(+) (Novagen, Hoa Kỳ), các enzyme giới hạn, ghép nối, enterokinase (Thermo Life Science, Hoa Kỳ), kit PCR và kit xác định trình tự (Invitrogen, Hoa Kỳ), Sepharose chelating, các cột sắc ký Vydac C18 (GE Healthcare, Hoa Kỳ).

Nhận diện các proteins/peptides trong nọc ốc cối bằng các kỹ thuật proteomics

Giải phẫu ốc thu nhận bầu dục và ống dục theo phương pháp của Cruz et al. (1976) [1]. Cơ quan dục được cắt nhỏ, nghiền và chiết trong đệm acetonitril (ACN). Dịch chiết protein nọc ốc được phân đoạn bằng sắc ký ngược pha HPLC qua cột phân tích Vydac C18 (4,6 mm x 250 mm). Kiểm tra SDS-PAGE các phân đoạn protein theo Laemmli UK, 1970. Protein sau khi được phân tách bằng sắc ký RP-HPLC được thủy phân bằng trypsin, phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng kết nối khối phổ nanoLC/MS. Phổ TOF-MS thu được được phân tích bằng phần mềm Analyst QS và tìm kiếm theo phương pháp mass fingerprinting trên ExPasy [8] với ứng dụng TagIdent. Phân tích MS/MS nhận diện các mảnh peptide và phổ được phân tích bằng phần mềm Mascot 1.8 với cơ sở dữ liệu NCBI nr gồm hơn 8 triệu trình tự khác nhau.

Nghiên cứu biểu hiện, tinh sạch và hoạt tính giảm đau của conotoxin tái tổ hợp

Hai cặp mồi mã hoá cho gen CTX được nối ghép và bắt cặp tạo thành DNA sợi đôi và sử dụng làm khuôn để khuếch đại bằng PCR. Tách dòng đoạn gen khuếch đại vào vector pBT và kiểm tra trình tự gen. Gen CTX sau đó được chuyển vào vector pET32c(+) để biểu hiện ở *E. coli* BL21(DE3) bằng cách cảm ứng với IPTG. Sinh khối tế bào được thu sau 3 h cảm ứng và kiểm tra SDS-PAGE các protein từ sinh khối tế bào. Protein dung hợp được tinh sạch sử dụng chất giá Sepharose Chelating và Imidazole (nồng độ tuyến tính từ 20 mM đến 500 mM). Chọn lọc các phân đoạn protein tinh sạch và

loại bỏ thioredoxin và đuôi histidine bằng enterokinase. CTX được tinh sạch bằng cột cut-off 5 kDa (VIVASPIN 500) và phân tích khối phổ MALDI-TOF xác định khối lượng phân tử của peptide. Xác định hoạt tính giảm đau của CTX trên chuột nhắt trên mô hình gây đau thực nghiệm bằng formalin với đối chứng là lidocain và phương pháp bản nóng với đối chứng là morphine.

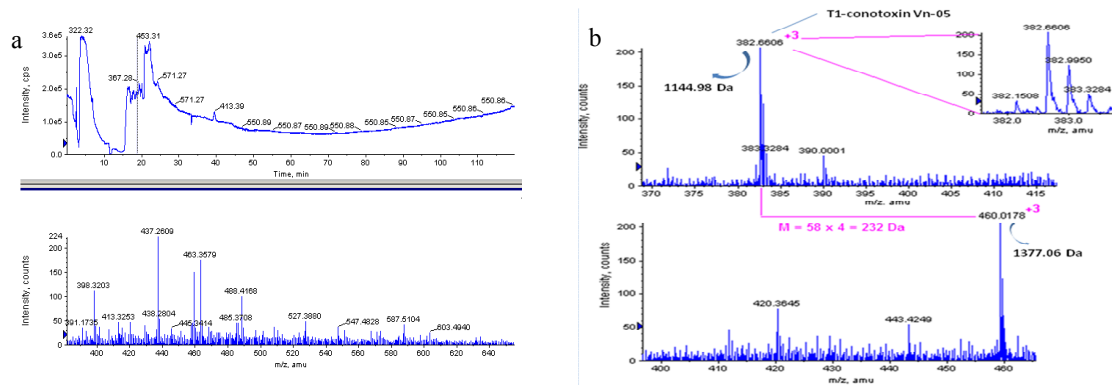
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhận diện các proteins/peptides trong nọc ốc cối bằng các kỹ thuật proteomics

Phân tích hệ protein/peptide trong nọc dục của 8 loài ốc cối cho thấy một số conotoxin đã nhận diện được có sự trùng lặp với một số tác giả trên thế giới (bảng 1). Cụ thể, trong nọc của loài *C. litteratus* đã xác định được cả ω -conotoxin MVIIA (2639 Da) và ω -conotoxin MVIIC (2749 Da) là hai conotoxin đặc hiệu với các kênh Ca^{++} type N, thuộc siêu họ O với 3 cầu disulfide hay δ -conotoxin TxVIA (3034.2 Da) thuộc siêu họ O, họ delta, Y-PIIIE thuộc siêu họ M, họ ϕ và cấu trúc peptide gồm 3 liên kết disulfide. *C. textile* đã phát hiện ω -conotoxin TxVII, δ -conotoxin TxVIA. Loài *C. marmoreus* cũng có ω -conotoxin SVIA, SVIB, δ -conotoxin SVIE tương tự như các peptide đã phát hiện được ở loài *C. striatus* và δ -CTxVIA giống như ở loài *C. textile*, đồng thời cũng phát hiện cả độc tố μ O-MrVIB. Ở loài *C. characteristicus* đã nhận diện được conotoxin Ca 1.1 thuộc siêu họ A (1875 Da) và có 2 cầu disulfide. Loài *C. quercinus* có độc tố Qc 1.1c (2333 Da) và Qc 1.2 đều thuộc siêu họ A. Loài *C. betulinus* đã phát hiện được Be 1.1 (2140 Da), Be 1.2 (1694 Da) cũng thuộc siêu họ A với 2 liên kết disulfide. Còn ở loài *C. vexillum* đã phát hiện được VxVIA (2778 Da) và VxVIB (3821 Da) đều thuộc siêu họ O1 với 3 liên kết disulfide. Riêng loài *C. striatus* đã nhận diện được nhiều nhất. Ngoài các conotoxin đã nhận diện được còn rất nhiều protein khác có kích thước nhỏ tương tự như kích thước chung của conotoxin nhưng vẫn chưa nhận diện được là do sự phức tạp của thành phần nọc dục, sự thiếu hụt các dữ liệu về DNA. Cấu trúc của các độc tố peptide cũng khó xác định do kích thước quá nhỏ (10-80 amino acid), liên kết disulfide có thể lên đến

5 và có sự cải biến sau phiên mã cao. Ngoài ra, trong số các trình tự protein/peptide thu được có rất nhiều trình tự peptide khá giống với các peptide trong nọc của một số loài khác như rắn châu Phi, rắn hổ mang bành, bọ cạp. Đây chính là sự đa dạng phức tạp của nọc độc ốc cối không chỉ về số lượng mà còn cả các thành

phần độc tố. Cho đến nay chỉ có khoảng 1.700 trình tự conotoxin hoàn chỉnh đã được xác định trong gần 90 loài ốc cối đã nghiên cứu [7]. Do đó, nọc của conus là nguồn dược liệu dồi dào vẫn đang cần được tìm kiếm và khai thác. Hình 1 minh họa kết quả xác định các conotoxin trong nọc ốc cối.



Hình 1. Kết quả nhận dạng conotoxin trong nọc ốc cối bằng phân tích phổ khối

a. Phổ tổng số nanoLC-ESI-Q-TOF MS của loài ốc cối *C. vexillum*; b. Phổ kết quả xác định T1-conotoxin Vn-05 trong nọc ốc cối *C. striatus*

Bảng 1. Danh sách số lượng các conotoxin trong nọc của 8 loài ốc cối

Loài	Các độc tố đã nhận dạng	Các độc tố chưa rõ ràng
<i>Conus betulinus</i>	17	89
<i>Conus characteristicus</i>	11	71
<i>Conus litteratus</i>	21	56
<i>Conus marmoreus</i>	52	87
<i>Conus quercinus</i>	9	85
<i>Conus striatus</i>	31	97
<i>Conus textile</i>	44	111
<i>Conus vexillum</i>	7	77

Tạo conotoxin tái tổ hợp và xác định hoạt tính giảm đau trên mô hình chuột

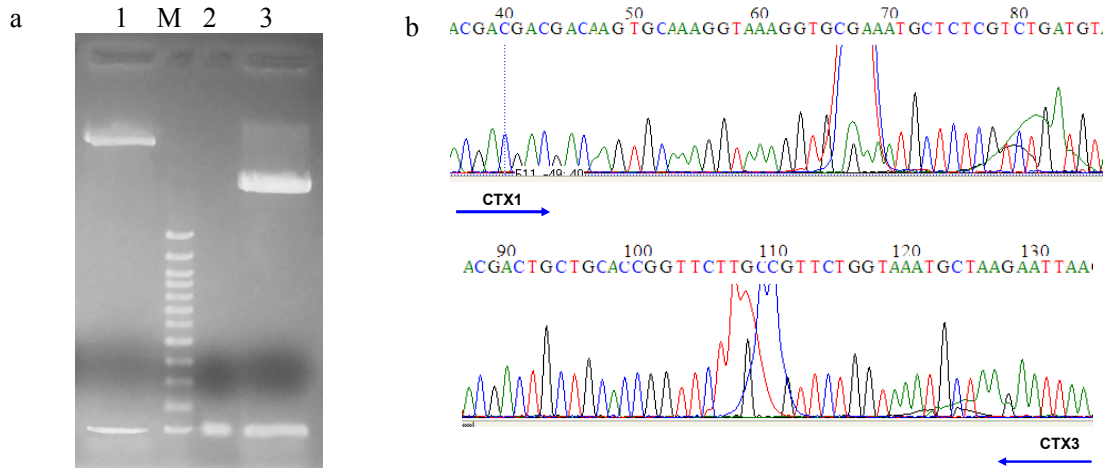
Gen mã hóa cho ω -conotoxin MVIIA (CTX) đã thiết kế với hai cặp môi CTX1, CTX2 và CTX3, CTX4 dựa trên trình tự peptide có số đăng kí 1TT3_A trên Protein Database. Tiến hành ghép nối giữa CTX1 với CTX3 và CTX2 với CTX4 và cho bắt cặp bổ sung giữa 2 đoạn gen đã nối ghép sau đó khuếch đại bằng PCR cho sản phẩm gen có kích thước 100 bp (hình 2a, đường số 2). Gen sau khi được tách dòng (hình 2a, dòng 1) và xác định trình tự (hình 2b)

đã được thiết kế vào vector pET 32c để biểu hiện ở *E.coli* (hình 2a, dòng 3).

CTX tái tổ hợp đã được biểu hiện ở dạng dung hợp với thioredoxin (Trx) ở *E.coli* và tinh sạch có kích thước khoảng 20 kDa (Hình 3a, đường số 1). Protein dung hợp Trx-CTX có hoạt tính giảm đau (liều thử nghiệm 6 μ g/g chuột) khi so sánh với hoạt tính của morphine (5 μ g/g) được thử nghiệm ở chuột nhắt trên mô hình bản nóng (hình 3b). Peptide CTX đã được tinh sạch có kích thước rất nhỏ (khoảng 3 kDa) (hình 3c đường số 2). CTX tái tổ hợp (liều thử nghiệm 3,5 μ g/chuột) có hoạt tính giảm đau tốt như chất

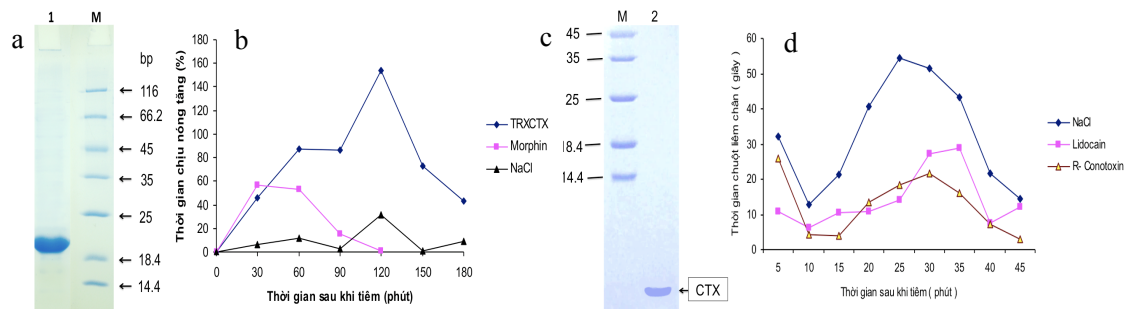
đối chứng lidocain (500-600 µg/chuột) khi sử dụng tác nhân gây đau bằng formalin cho chuột (hình 3d). Từ đó cho thấy cả peptide CTX và protein dung hợp Trx-CTX tái tổ hợp đều có hoạt tính giảm đau và có triển vọng phát triển thành thuốc. Đặc biệt các peptide chủ yếu được

tạo ra ở dạng dung hợp với Trx giúp cho quá trình tạo cấu trúc không gian (cầu nối disulfide), thuận lợi cho quá trình tinh sạch, tăng hiệu suất tinh chế [33]. Do đó cả CTX và Trx-CTX cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về đặc tính để có thể làm nguyên liệu để sản xuất thuốc.



Hình 2. Tách dòng và thiết kế vector biểu hiện gen mã hoá cho ω-conotoxin MVIIA (CTX)

- a. Kết quả tách dòng và thiết kế vector biểu hiện CTX;
- b. Kết quả xác định trình tự gen mã hoá cho CTX.



Hình 3. Tạo protein/peptide tái tổ hợp và thử nghiệm hoạt tính giảm đau

- a. Tinh sạch Trx-CTX; b. Hoạt tính giảm đau của Trx-CTX so sánh với morphine và NaCl;
- c. Tinh sạch peptide CTX; d. Hoạt tính giảm đau của CTX so sánh với Lidocain và NaCl

KẾT LUẬN

Đã nhận dạng và phát hiện được một số conotoxin đặc trưng trong nọc của các loài ốc cối thuộc giống *Conus*, đều có cấu trúc từ 2-3 cầu disulfide và nhiều peptide được vẫn chưa được khẳng định rõ ràng. Conotoxin tái tổ hợp từ CTX được tạo ra cả ở dạng dung hợp và nguyên bản có hoạt tính giảm đau và có tiềm năng làm nguyên liệu sản xuất thuốc.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ bởi Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học, Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cruz L. J., Corpuz G., Olivera B. M., 1976. A preliminary study of *Conus* venom protein. *Veliger*, 18: 302-308.

2. Essack M., Bajic V. B., Archer J. A. C., 2012. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Mar Drugs*, 10: 1244-1265.
3. Gao B., Zhangsun D., Wu Y., Lin B., Zhu X., Luo S. 2013. Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeX- IVAWT. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(3): 1223-1230.
4. Joseph B., Bajan S. S., Jeevitha A. M. V., Ajisha S. U., Jini D., 2011. Conotoxins: a potential natural therapeutic for pain relief. *Int J of Pharm Sci.*, 3(2): 1-5.
5. Lewis R. J., Dutertre S., Vetter I., Christie M. J., 2012. *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 64(2): 259-298.
6. Yamamoto T., Takahara A., 2009. Recent updates of N-type calcium channel blockers with therapeutic potential for neuropathic pain and stroke. *Curr. Top Med. Chem.*, 9(4): 377-95.
7. <http://www.Conoserve.org>
8. <http://web.expasy.org/tagident/>

CONOTOXINS FROM VENOME OF CONE SNAILS (*Conus*) AND IT'S APPLICATION FOR PHARMACEUTICAL MEDICINE

Le Thi Bich Thao¹, Bui Thi Huyen¹, Doan Viet Binh¹, Nguyen Thi Kim Dung¹, Nguyen Thi Minh Phuong¹, Do Huu Chi¹, Bui Quang Nghi², Nguyen Bich Nhi¹, Phan Van Chi¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Institute of Oceanography, VAST

SUMMARY

Conotoxins in venoms of marine cone snails are structural diversity, rich disulfide-bridges that selective block of ion channel voltages or receptors, therefore it is used for development of analgesic drugs. In this paper, we investigated conotoxins from venoms of eight cone snails of the genus *Conus* in Vietnam by using a nano-liquid chromatography linked mass spectrometry. For medical application, the recombinant ω -conotoxin MVIIA was expressed in *E. coli* and determined analgesic activity by testing on the mice. As the results, the conotoxins were identified in venoms of eight conus mainly belong to O, M, A super families. In addition, many small peptides were determined, however these databases are not clear due to reference of DNA and protein databases is deficient. Recombinant MVIIA (CTX) was expressed in the fusion with thioredoxin in molecular weight of 20.5 kDa (Trx-CTX) and the original CTX peptide was purified in size of below 3 kDa after removing thioredoxin and his tag. Both of CTX peptide and Trx-CTX fusion protein showed an analgesic activity when compared to lidocaine and morphine. Hence, these recombinant proteins could be potential drugs for effective analgesic treatment.

Keywords: *Conus*, conotoxin, protein/peptide, recombinant protein, ω -conotoxin.

Ngày nhận bài: 21-9-2015