

## TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH CONOTOXIN TỪ MỘT SỐ LOÀI ỐC CỐI THU THẬP Ở VÙNG BIỂN NHA TRANG, VIỆT NAM

LÊ THỊ BÍCH THẢO, ĐOÀN VIỆT BÌNH,  
NGUYỄN BÍCH NHÌ, PHAN VĂN CHI

*Viện Công nghệ sinh học*

Môi trường biển là một nguồn cung cấp các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học lớn và hiếm trong đó nhiều sản phẩm có các đặc tính cấu trúc mà các sản phẩm tự nhiên ở trên cạn không có. Nghiên cứu về đặc điểm dược học của các sản phẩm này cũng đã kéo theo các phát hiện về nhiều tác nhân có hoạt tính tiềm tàng có thể ứng dụng trong y học lâm sàng [13]. Ốc cối (Conidae) là một trong những họ động vật thân mềm lớn ở biển (đặc biệt vùng biển nhiệt đới) với khoảng hơn 700 loài, có nọc độc, bao gồm cả các loài ăn thịt động vật, ăn các loài ốc khác, ăn sêu và thậm chí cả cá [12, 13]. Chúng không chỉ được biết đến bởi vẻ đẹp của vỏ (có thể mua được ở nhiều cửa hàng bán đồ lưu niệm ở khắp nơi trên thế giới) mà chúng còn được quan tâm bởi các đặc tính sinh học của các chất có trong nọc độc của chúng. Việc tách chiết cũng như làm sáng tỏ cấu trúc của mỗi thành phần từ nọc của chúng đã được bắt đầu từ đầu những năm 1980 và chúng không chỉ giúp ích cho con người trong việc khai thác nguồn dược liệu tự nhiên mà còn đóng góp rất đáng kể cho ngành khoa học thần kinh [1].

Conotoxin là loại độc tố có trong nọc độc của loài ốc cối. Chúng là hỗn hợp các độc tố protein/peptide, enzyme hoặc các phân tử có khối lượng thấp mà loài ốc dùng để bắt mồi, cạnh tranh và tự vệ. Đặc tính của conotoxin là chúng có tác dụng khóa chọn lọc điện áp hoặc phối tử của các kênh ion trong quá trình dẫn truyền tín hiệu của tế bào thần kinh như  $\omega$ -MVIIA từ *Conus magus* bao vây các kênh  $Ca^{++}$  type N;  $\mu$ O-conotoxin,  $\delta$ -PVIA ức chế sự bất hoạt các kênh  $Na^+$ ,  $\kappa$ -PVIIA tương tác với các kênh  $K^+$ ... nên chúng không chỉ có vai trò quan trọng trong săn bắt con mồi mà còn là công cụ hữu ích trong khoa học thần kinh để xác định được các thụ thể nhờ ái lực cao và đặc hiệu của

mình [1, 3, 9]. Trong các họ conotoxin,  $\omega$ -conotoxin là nhóm được sử dụng nhiều trong ngành khoa học thần kinh và những lĩnh vực nghiên cứu về chức năng của các dạng kênh  $Ca^{++}$  như  $\omega$ -conotoxin MVIIA từ *Conus magus* đã phát triển thành thuốc cho điều trị các bệnh giảm đau [1, 4]. Ngoài tác dụng giảm đau, conotoxin còn rất hữu ích cho chỉ định khác trong lâm sàng. Thí dụ  $\kappa$ -conotoxin PVIIA đã được chứng minh là làm giảm mức độ nhồi máu cơ tim trong bệnh thiếu máu cục bộ thử nghiệm trên mô hình chuột, thỏ và chó *in vivo*. Trong thành phần nọc độc của mỗi loài ốc cối có thể chứa đến hơn 200 loại conopeptide do đó ước tính sẽ có khoảng từ 50.000 đến 100.000 conopeptide khác nhau có hoạt tính dược học được tìm thấy từ tất cả các loài *Conus* này [1]. Chính vì vậy mà các conopeptide phải rất khác nhau về trình tự amino acid cũng như đặc tính dược học. Dựa vào trình tự amino acid, conotoxin có thể được phân nhóm thành hai loại lớn là các protein/peptide giàu liên kết disulfide và không giàu disulfide. Trong nhóm peptide giàu disulfide cũng được phân loại thành các siêu họ phụ thuộc vào liên kết disulfide. Hầu hết các conopeptide có cấu trúc gồm từ 12 đến 30 amino acid và có từ 2 đến 4 cầu disulfide. Trong siêu họ đó, mỗi conotoxin khác nhau sẽ có đích tác dụng khác nhau bởi vậy mà người ta tiếp tục phân nhỏ thành các họ phụ thuộc vào đặc tính sinh dược.

Với sự phong phú đa dạng như vậy nhưng cho đến nay chỉ một ít trong số đó đã xác định được đặc tính cụ thể. Vì vậy, nghiên cứu về conotoxin ngày càng được chú trọng quan tâm nhiều hơn. Tại Việt Nam, những nghiên cứu về nọc độc của loài ốc cối mới chỉ được tiến hành trong hai năm qua và đây là những nghiên cứu bước đầu về khảo sát và xác định các

protein/peptide độc có trong nọc của 8 loài ốc cối được thu thập tại vùng biển Nha Trang.

## I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu

Tám loài ốc cối đã được thu thập tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam và định loài tại Viện Hải dương học gồm: *Conus betulinus*, *Conus characteristicus*, *Conus litteratus*, *Conus marmoreus*, *Conus quericus*, *Conus striatus*, *Conus textile* và *Conus vexillum*.

Các hóa chất dùng trong giải phẫu, tách chiết và phân tích protein: acetonitrile (ACN, J.T Baker), Tris-HCl, Trifluoro acetic acid (TFA, Fluka), formic acid (FA), methanol (Merck), cột sắc ký Vydac C18 (4,6 × 250 mm và 75 μm × 150 mm), hóa chất điện di SDS-PAGE (Bio-Rad), Trypsin (Sigma-Aldrich).

Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng dòng Swiss, tất cả đều là chuột đực, trọng lượng 25-30 g mua từ Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Các thức ăn, nước uống đều dùng theo chỉ dẫn của nơi cung cấp.

### 2. Phương pháp

#### a. Thu nhận cơ quan chứa nọc độc

Đập vỡ vỏ ốc bằng búa và rửa sạch phần thịt ốc. Giải phẫu để bộc lộ phần bầu độc và ống độc theo phương pháp của Cruz và nnk. (1976) [6].

#### b. Tách chiết các protein từ nọc độc

Bầu độc và ống độc được cắt nhỏ, nghiền mịn trong nitor lỏng và chiết trong đệm 30% ACN và 0,1% TFA theo tỉ lệ 3: 1 (đệm: mẫu), lắc 16 h ở 4°C. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, thu dịch nổi. Mẫu được chiết 2 lần. Các protein từ phần dịch nổi được đông khô chân không và cất giữ ở -25°C cho các thí nghiệm sau.

#### c. Hoạt tính sinh học

Xác định hoạt tính giảm đau của dịch chiết từ nọc độc theo phương pháp của Zhang được thử nghiệm trên chuột nhắt trắng [16]. Mỗi con chuột được tiêm vào xoang bụng 30 μl dịch chiết protein hoặc là dung dịch muối sinh lý. Sau 15 phút tiêm dịch chiết protein, chuột được gây đau bằng formalin (3,7%) với liều tiêm 15 μl vào một chân sau. Bắt đầu đếm số lần chuột liếm chân ngay sau khi gây đau và ghi

theo chu kỳ 5 phút/lần. Giai đoạn sưng tấy được xác định từ phút thứ 20 đến 30. Mỗi loại peptide được thử nghiệm trên 3 con chuột (n = 3).

#### d. Tinh sạch protein bằng sắc ký ngược pha trên hệ HPLC và phân tích SDS-PAGE

Nọc độc trong dịch chiết thô được phân tách trên cột phân tích Vydac C18 (4,6 mm × 250 mm). Dịch chiết sau khi thu được hòa trong đệm 30% CAN và 0,1 % TFA. 100 μl dịch chiết thô (khoảng 1 mg) được đưa lên cột và được thổi ra với tốc độ dòng 0,5 ml/phút, gradient tuyến tính từ 0-90% ACN/0,1% TFA trong 60 phút, thu mỗi phân đoạn protein 1ml và giữ ở 4°C. Kiểm tra SDS-PAGE các phân đoạn protein theo phương pháp của Laemmli (1970) [10].

#### e. Nhận diện protein bằng sắc ký kết nối khối phổ nanoLC/MS

Dịch chiết sau đó được làm khô chân không và phân tích phổ khối trên hệ thống sắc ký lỏng kết nối khối phổ nanoLC/MS. LC/MS các mẫu được tiến hành trên cột Vydac C18 (75 μm × 150 mm) với dung môi A (0,1% FA) và dung môi B (0,1% FA, 85% ACN), tốc độ dòng 30 (l/phút). Mẫu được thổi ra khỏi cột sắc ký sau đó được ion hóa bằng nguồn ESI của máy khối phổ QSTAR XL xác định phổ khối. Phổ TOF-MS thu được được phân tích bằng phần mềm Analyst QS. Sau đó, giá trị phổ khối (Da) được tìm kiếm theo phương pháp tiêu chuẩn mass fingerprinting trên ExPasy của Thụy Sĩ [<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>] với ứng dụng TagIdent để xác định peptide.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

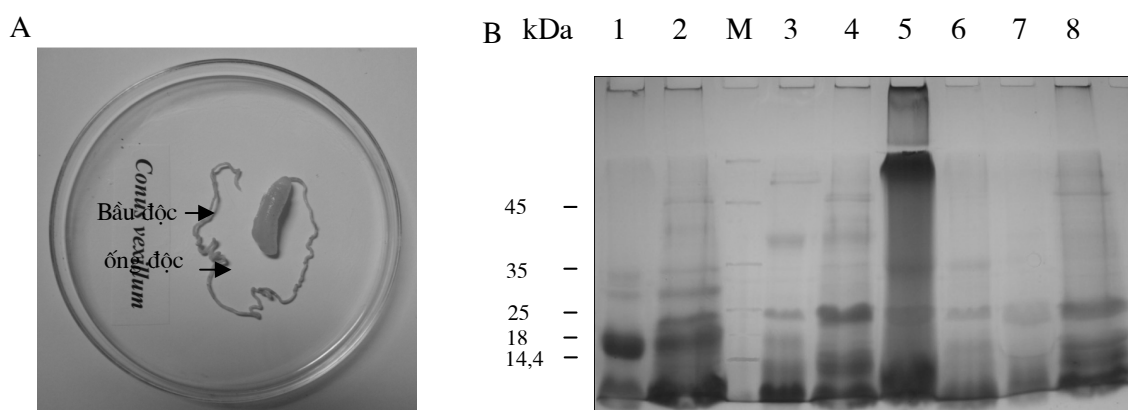
### 1. Tách chiết protein/peptide từ nọc độc của các loài ốc cối (*Conus*)

Tám loài ốc cối sau khi loại bỏ vỏ và phần thịt, bầu độc và ống độc được tách riêng, nghiền nhỏ và chiết với đệm chiết 3 lần. Phần dịch nổi được cất giữ ở -25°C cho tinh sạch và xác định hoạt tính. Các thành phần protein trong cơ quan độc (bầu độc và ống độc) của các loài ốc cối sau khi tách chiết thô được kiểm tra SDS-PAGE.

Cơ quan độc gồm bầu độc và ống độc của loài ốc cối *C. vexillum* (hình 1A) là nơi chứa nọc độc của ốc cối với nhiều loại protein/peptide có hoạt tính sinh học. Hình 1B là kết quả phân tích các protein/peptide có trong dịch chiết nọc độc bằng SDS-PAGE của 8 loài ốc cối:

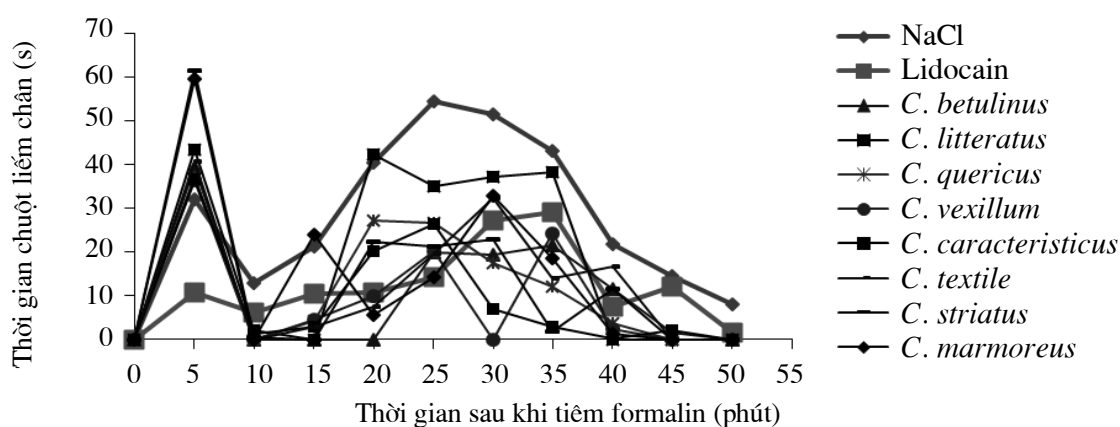
*C. striatus*, *C. textile*, *C. quericus*, *C. vexillum*, *C. characteristicus*, *C. betulinus*, *C. litteratus* và *C. marmoreus*. Thành phần protein trong nọc độc ở tất cả các mẫu ốc khá đa dạng, khác nhau cả về số lượng, thành phần trong đó các protein/peptide có khối lượng thấp hơn 14 kDa chiếm chủ yếu. Kết quả này rất phù hợp bởi các độc tố trong nọc độc của ốc là độc tố thần kinh và thường có khối lượng phân tử nhỏ. Hoạt tính giảm đau của dịch chiết từ nọc độc được xác định theo phương pháp của Zhang được thử nghiệm trên chuột nhắt trắng

và kết quả cho thấy nọc từ 8 loài ốc cối đều có tác dụng giảm đau ở chuột được gây viêm và làm đau bằng formalin. Sau khi gây viêm bằng formalin, chuột phản ứng với các cảm giác đau rất bằng cách liếm gan bàn chân, chỗ trực tiếp đâm mũi kim tiêm và bơm formalin vào. Thời gian chuột (được tiêm nọc của các loài ốc khác nhau, tiêm dung dịch muối sinh lý và tiêm thuốc gây tê thông dụng) liếm chân được ghi lại theo chu kỳ 5 phút một lần (hình 2).



**Hình 1.** Điện di đồ protein từ nọc độc của ốc cối

A. Phân bầu độc và ống độc của loài ốc cối *C. vexillum*; B. SDS-PAGE của các protein/peptidee tách chiết từ cơ quan độc của 8 loài ốc cối *C. striatus*, *C. textile*, *C. quericus*, *C. vexillum*, *C. characteristicus*, *C. litteratus*, *C. betulinus* và *C. marmoreus* theo thứ tự từ đường 1-8



**Hình 2.** Hoạt tính giảm đau của nọc ốc cối

Trong tất cả các loài đã thử nghiệm (ngoại trừ nọc của ốc cối *C. litteratus*), chúng đều có tác dụng giảm đau như lidocain (một loại thuốc gây tê được sử dụng rộng rãi trên thị trường). So sánh giữa nọc độc của các loài thì tác dụng giảm đau của 3 loài *C. betulinus*, *C. vexillum* và

*C. striatus* xuất hiện sớm hơn các loài còn lại và được duy trì tương đối tốt trong thời gian thí nghiệm. Sự khác biệt này có thể là do đặc tính của các loài bởi trong nọc độc của mỗi loài có thể có từ 50-200 loại protein/peptide độc khác nhau và hàm lượng của mỗi loại cũng khác nhau

[13]. Vì vậy, việc phân tách và xác định thành phần các loại protein/peptide có trong nọc của mỗi loài ốc cối là rất cần thiết để có thể khai thác chúng một cách có hiệu quả.

## 2. Tinh sạch và xác định độc tố

Dịch chiết thô từ cơ quan độc của các loài ốc cối được tiến hành sắc ký ngược pha trên hệ HPLC qua cột Vydac C18. Các phân đoạn protein thu được được đông khô chân không và đo khối 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. Sau đó, giá trị phổ khối (Da) được tìm kiếm theo phương pháp tiêu chuẩn mass fingerprinting trên ExPasy (Thụy Sĩ) với ứng dụng TagIdent để xác định peptide. Đây là phương pháp xác định peptide theo dấu hiệu về khối lượng và pI của các peptide và đặc biệt vẫn có thể dễ dàng nhận diện được protein từ chỉ riêng thông tin này. Một đặc điểm nữa là chúng thường chỉ nhận diện được các peptide có khối lượng nhỏ dưới 3500 Da nên rất phù hợp với việc xác định các conopeptide của ốc cối.

Kết quả thu được khi phân tích hệ protein/peptide trong nọc độc của 8 loài ốc cối đều đã nhận diện được một số conotoxin đã được công bố bởi các tác giả khác trên thế giới [17]. Cụ thể là trong nọc độc của loài *C. litteratus* đã xác định được omega-conotoxin MVIIA (khối lượng 2639 Da), omega-conotoxin MVIIIC (khối lượng 2749 Da) là các conotoxin đặc hiệu với các kênh Ca<sup>++</sup> type N, thuộc siêu họ O với 3 cầu disulfide và với 26 amino acid. Một

sản phẩm peptide được tổng hợp phiên bản của CTX-MVIIA (ziconotide) đã được cơ quan quản lý dược phẩm và thực phẩm (FDA) của Mỹ chấp thuận cho thử nghiệm các loại đau mãn và đau cấp. Ngoài ra trong nọc của *C. litteratus* còn phát hiện có delta-conotoxin TxVIA (3034.2 Da) thuộc siêu họ O, họ delta, còn conotoxin Y-PIIIE thuộc siêu họ M, họ phi và cấu trúc peptide gồm 3 liên kết disulfide.

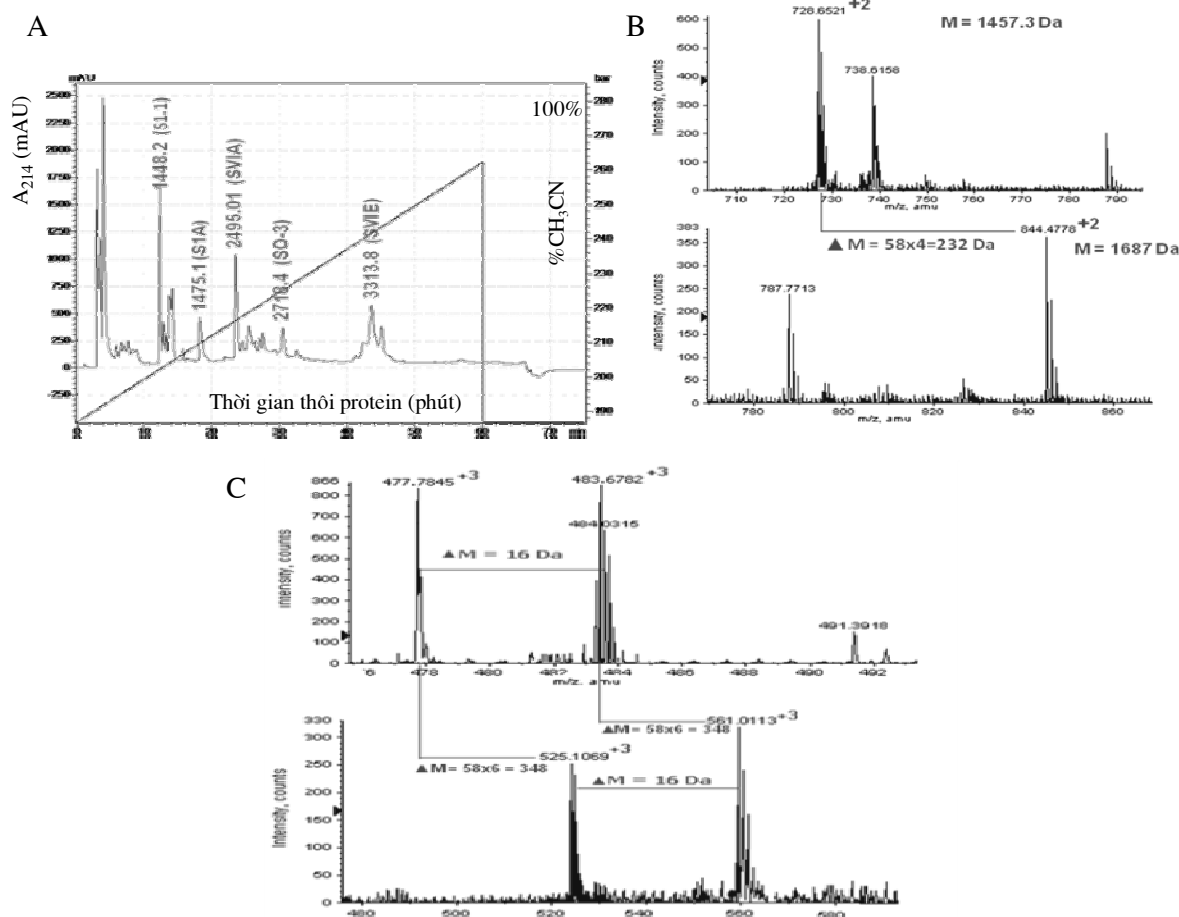
Trong nọc độc của loài ốc cối *C. textile* đã phát hiện có omega-conotoxin TxVII, delta-conotoxin TxVIA. Loài *C. marmoreus* cũng có omega-conotoxin SVIA (SVIA), SVIB, delta-conotoxin SVIE (SVIE) tương tự như các peptide đã phát hiện được ở loài *C. striatus* và delta - CTxVIA giống như ở loài *C. textile* đồng thời cũng phát hiện cả độc tố  $\mu$ O-MrVIB (độc tố đã được tổng hợp hóa học và có hoạt tính giảm đau kéo dài hơn Lidocain 7-8 lần). Các loài còn lại như *C. characteristicus* đã nhận diện được conotoxin Ca 1.1 thuộc siêu họ A với khối lượng phân tử là 1875 Da và có 2 cầu disulfide. Loài *C. quercinus* có độc tố Qc 1.1c (kích thước 2333 Da) và Qc 1.2 đều thuộc siêu họ A. ở 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 [10]. Riêng loài *C. striatus* đã nhận diện được nhiều nhất và hình ảnh phân tách, nhận diện phổ khối của một số peptide được thể hiện trên hình 3 và bảng 1.

Bảng 1

Dữ liệu về các protein/peptide xác định được trong nọc của ốc cối *C. striatus*

Đỉnh, KL/ĐT (m/z)	Điện tích (z)	KLPT đo được	KLPT tính toán	Cầu S-S	Tên protein	Dạng được cải biến
477,78	3	1431,3	1432	2	Alpha-conotoxin S1.1;	-NH <sub>2</sub>
483,68	3	1448,1	1448	2	Alpha-conotoxin S1.1.	-NH <sub>2</sub> ; hyP
725,09	2	1448,2	1448	2	Alpha-conotoxin S1.1.	-NH <sub>2</sub> ; hyP
728,66	2	1457,3	1457	2	Alpha-conotoxin S1A	-NH <sub>2</sub>
738,11	2	1475,2	1475	2	Alpha-conotoxin S1A	-NH <sub>2</sub> ; hyP
492,69	3	1475,1	1475	2	Alpha-conotoxin S1A	-NH <sub>2</sub> ; hyP
832,34	3	2495,01	2495	3	Omega-conotoxin SVIA	-NH <sub>2</sub> ; hyP
907,13	3	2718,4	2718	3	Omega-conotoxin SO-3	-NH <sub>2</sub>
912,78	3	2735,3	2735	3	Omega-conotoxin SO-3	-NH <sub>2</sub> ; hyP
1105,6	3	3313,8	3314	3	Delta-conotoxin SVIE	

Ghi chú: KL/ĐT. Khối lượng/điện tích; KLPT. Khối lượng phân tử.



**Hình 3.** Sắc ký đồ conotoxin từ *Conus striatus*

Alpha-conotoxin S1.1 (S1.1); Omega-conotoxin (SVIA); Đơn vị khối (Da); A. Sắc ký đồ HPLC của dịch chiết thô từ nọc ốc cối *C. striatus* qua cột Vydac C18 (4,6 mm × 250 mm, kích thước hạt 5 μm); B, C. Phổ khối của peptide Alpha-conotoxin S1.A và S1.1 thu được sau khi phân tích phân đoạn có đỉnh với đơn vị khối 1475 và 1482 ở trên hình A qua cột Vydac C18 (75 μm × 150 mm) và đo phổ TOF-MS.

Hình 3 và bảng 1 là kết quả minh họa xác định được một số protein/peptide có trong dịch chiết từ nọc ốc của loài ốc cối *C. striatus*. Bằng phương pháp sắc ký ngược pha trên hệ HPLC lần 1 và lần 2 là sắc ký ngược pha trên hệ nanoLC kết hợp đo phổ TOF-MS, đã xác định được một số conopeptide có khối lượng tương tự như các protein/peptide đã được xác định là α-conotoxin S1.1 (S1.1); μ-omega-conotoxin SO-3 (MrSO-3); delta-conotoxin SVIE (SVIE); alpha-conotoxin S1A (S1A); μ-omega-conotoxin SVIA (MrSVIA). μ-omega thuộc siêu họ O cũng được biết đến như là μ-conotoxin của siêu họ M làm ức chế các kênh Na<sup>+</sup>. Các conotoxin được nhận diện trong nọc của loài ốc *C. striatus* này cũng chính là các protein/peptide đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới công bố [5, 6].

Ngoài ra, trong số các trình tự protein/peptide thu được ở phân ống độc cũng nhận dạng được rất nhiều trình tự peptide khá giống với trình tự các peptide độc từ nọc của một số loài khác như rắn châu Phi, rắn hổ mang bành, bọ cạp, cấu trúc của các kênh Na, K, cấu trúc của protein gắn kết với acetylcholine [9]. Đây chính là sự đa dạng phức tạp của nọc ốc cối không chỉ về số lượng mà còn cả các thành phần độc tố.

Mặc dù các số liệu thu được còn hạn chế nhưng chúng cũng chứng tỏ thành phần độc tố của mỗi loài ốc cối rất đa dạng và phong phú. Hầu hết các độc tố phát hiện được đều đặc trưng bởi các liên kết giàu cysteine. Với các protein có kích thước nhỏ hơn 2 kDa đặc trưng có 4 cystein với 2 cầu disulfide (alpha-conotoxin S1.1, alpha-conotoxin S1A) còn protein lớn hơn 2 kDa có

thể có 3 (omega-conotoxin SVIA, delta-conotoxin SVIE) hay 4 cầu disulfide. Chức năng sinh học của các peptide giàu cysteine liên quan mật thiết đến các cầu nối disulfide [6]. Hơn nữa, cầu này còn đại diện cho bộ khung cấu trúc của peptide đó và vì thế chúng tương đối ổn định. Mặc dù vậy, để có thể khẳng định chính xác trình tự và cấu trúc của các conotoxin này, các protein cần được phân tích phổ bằng các phương pháp phổ khối MS/MS kết hợp với xác định trình tự cDNA, giải trình tự theo phương pháp Edman hoặc kết hợp các phương pháp này.

Ngoài các conotoxin đã nhận diện được ở trên, 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 độc, sự thiếu hụt các dữ liệu về DNA. Một trở ngại nữa đối với việc làm sáng tỏ cấu trúc của các độc tố peptide là do chúng có kích thước quá nhỏ chỉ với khoảng từ 10 đến 80 amino acid, liên kết disulfide có thể lên đến 5 và một số loại có sự cải biến sau phiên mã cao độ [15]. Tuy nhiên, với các kết quả thu được bằng phương pháp nghiên cứu này cũng mở ra hướng nghiên cứu khả quan về sự đa dạng của các độc tố thần kinh có nguồn gốc từ tự nhiên cũng như chủ động tạo ra các nguồn dược liệu bằng công nghệ DNA tái tổ hợp.

### III. KẾT LUẬN

Đã thu thập và tách chiết được cơ quan độc (bầu độc và ống độc) của 8 loài ốc cối của Việt Nam: *Conus betulinus*, *Conus characteristicus*, *Conus litteratus*, *Conus marmoreus*, *Conus quericus*, *Conus striatus*, *Conus textile*, *Conus vexillum* và xác định được cả 8 loài đều có độc tính và có tác dụng giảm đau trên chuột.

Đã tinh sạch và nhận dạng được một số conotoxin đặc trưng có trong nọc độc của các loài ốc cối và các protein/peptide này đều có cấu trúc giàu cystein với 2 hoặc 3 liên kết disulfide như omega-conotoxin MVIIA, delta-Conotoxin TxVIA, omega-conotoxin SVIA, SVIB, Alpha-conotoxin S1.1, (Omega-conotoxin SO-3, Delta-conotoxin SVIE).

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tạo conotoxin tái tổ hợp và thử nghiệm hoạt tính giảm đau” cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2011-2012.

1. **Becker S. and Terlau H.**, 2008: Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79: 1-9.
2. **Benjamin V. J.**, 2005: Inferring the mode of speciation in Indo-West Pacific *Conus* (Gastropoda: Conidae). *J. Biogeogr*, 32: 1429-1439.
3. **Bruce G. L., David W. S., David K., John D., Ken R. G., Narmatha S., Zeinab K.**, 2006: Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon*, 48(7): 810-829.
4. **Bulaj G., Olivera B. M.**, 2008: Folding of conotoxins: Formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of *Conus* peptides. *Antioxid Redox Signal*, 10(1): 141-156.
5. **Corpuz G. P. et al.**, 2005: Definition of the M-conotoxin superfamily: Characterization of novel peptides from molluscivorous *Conus* venoms. *Biochemistry*, 44 (22): 8176-8186.
6. **Daly N. L., Craik D. J.**, 2009: Structural Studies of Conotoxins *IUBMB Life*, 61: 144-150.
7. **Daly N. L., Ekberg J. A., Thomas L., Adams D. J., Lewis R. J. and Craik D. J.**, 2004: Structures of muO-conotoxins from *Conus marmoreus*. I nhibitors of tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels in mammalian sensory neurons. *J. Biol. Chem.*, 279(24): 25774-25782.
8. **Han Y. H. et al.**, 2006: Characterization of novel M-superfamily conotoxins with new disulfide linkage. *FEBS J.*, 273: 4972-4982.
9. **Heinemann S. H. and Leipold E.**, 2007: Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cell Mol Life Sci*, 64: 1329-1340.
10. **Laemmli U. K.**, 1970: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

11. **Loughnan M. et al.**, 2006: Novel alpha D-conopeptides and their precursors identified by cDNA cloning define the D-conotoxin superfamily. *J. Biol. Chem.*, 281: 24745-24755.
12. **Milne T. J.**, 2008: PhD thesis (Australia).
13. **Pi C. et al.**, 2006: Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics*, 88: 809-819.
14. **Saravanan R., Sambasivam S., Shanmugam A., Kumar D. S., Vanan T. T. and Nazeer R. A.**, 2009: Isolation, purification and biochemical characterization of conotoxin from *Conus* *figulinus* Linnaeus (1758). *Indian J. Biotechnol*, 8: 266-271.
15. **Ueberheide B. M., Fenyo D., Alewood P. F. and Chail B. T.**, 2009: Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. *PNAS*, 106(17): 6910-6915.
16. **Zhang M. M. et al.**, 2007: Structure/function characterization of micro-conotoxin KIIIa, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. *J. Biol. Chem.*, 282(42): 30699-30706.
17. <http://www.conoserver.org>.
18. <http://www.expasy.org/tools/tagident.html>.

## EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF CONOTOXINS FROM SEVERAL *CONUS* COLLECTED IN NHA TRANG COAST, VIETNAM

LE THI BICH THAO, DOAN VIET BINH,  
NGUYEN BICH NHI, PHAN VAN CHI

### SUMMARY

Venoms of *Conus* contain a cocktail of peptides that mainly target different voltage- and ligand-gated ion channels (commonly known as conopeptides or conotoxins), therefore they are classified as neuropeptides. Due to their extraordinary pharmacological properties, conopeptides gained increasing interest in recent years. We extracted and identified some conotoxins from eight Cone snails collected in Nha Trang coast (Vietnam): *C. betulinus*, *C. characteristicus*, *C. litteratus*, *C. Marmoreus*, *C. quericus*, *C. striatus*, *C. Textile* and *C. vexillum*. Venoms from eight conus species were dissected and extracted. The extracted crude venoms were tested for analgesic activity on mice. On the hand, these crude venoms were initially separated on a Vydac C18 column. The fractions were then separated on nanoLC chromatography system combined with tandem mass spectrometry to identify conotoxins. The results showed that venoms of eight Cone snails were found to produce analgesic activity in the formalin test and among them. The extracted crude venoms were tested analgesic activity on mice. The venoms of *C. betulinus*, *C. vexillum*, *C. characteristicus*, *C. textile* and *C. quericus* gained higher analgesic activity than that of remained species. In each species, several toxic proteins/peptides were identified and the sequences of that are similar to toxic components of *Conus* species. The identified conotoxins were disulfide- rich conopeptides containing 4 or 6 cysteines based on published data.

**Keywords:** Conotoxin, *Conus*, venoms.

*Ngày nhận bài: 27-4-2011*