

## NGHIÊN CỨU CÁC THÀNH PHẦN CỦA NỌC RẮN HỔ ĐẤT (*NAJA KAOUTHIA*)

NGUYỄN HỒNG THANH, NGUYỄN KIM TẤN, TRƯƠNG NAM HẢI

*Viện Công nghệ sinh học*

**HOÀNG NGỌC ANH**

*Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng*

Rắn hổ mang (Cobra) phân bố ở nhiều địa phương của Việt Nam gồm ba giống khác nhau [1]: Rắn hổ hai gọng kính *Naja atra*, gặp nhiều ở miền Bắc; rắn hổ mèo *Naja sumatrana*, gặp nhiều ở miền Đông Nam bộ và miền Trung; rắn hổ đất *Naja kaouthia*, gặp nhiều ở miền Tây Nam bộ.

Trong số các rắn hổ mang trên thì rắn hổ đất (*N. kaouthia*) là loại rắn độc, gây tử vong nhiều nhất cho người ở Nam bộ. Ở châu Á, rắn hổ đất phổ biến ở bắc Ấn Độ (đông Delhi), Assam, Nepal, Bangladesh, Burma, Thái Lan, Bắc Malaya, Campuchia, miền Nam Việt Nam, nam Lào, Trung Quốc [2]. Từ nọc rắn hổ đất châu á (*N. kaouthia*) người ta đã tách ra các  $\alpha$ -neurotoxin, muscarinic toxin và cytotoxin [3, 4]. Mặc dù việc nghiên cứu nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*) đã được tiến hành ở nhiều nước, nhưng cho đến nay thành phần độc tố của nọc rắn hổ đất Việt Nam vẫn chưa được nghiên cứu, vì vậy chúng tôi tiến hành những nghiên cứu này.

Tiếp theo những nghiên cứu về nọc rắn hổ mang miền Bắc *N. atra* [5, 6], trong bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các tiểu phần tách từ nọc rắn hổ đất miền Nam *N. kaouthia* với mục đích tìm kiếm các hoạt tính mới để ứng dụng trong y dược.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Nọc được thu từ rắn hổ đất (*N. kaouthia*) nuôi ở trại rắn Đồng Tâm, Tiền Giang. Thu nọc bằng cách xoa bóp rắn bằng tay, sau đó đem đông khô và giữ ở 4°C đến khi dùng. Máy FPLC của hãng Amersham (Thụy Điển) và máy HPLC

của hãng Shimazu (Nhật Bản) được sử dụng để phân tích nọc rắn. Các hóa chất dùng trong phân tích được mua từ hãng Merck (Đức).

#### 2. Phương pháp tách các phân đoạn của nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*)

##### a. Tách các phân đoạn của nọc rắn *N. kaouthia*

Tách các phân đoạn của nọc rắn thô bằng phương pháp lọc qua gel trên máy FPLC (Amersham, Thụy Điển) với cột Sephacryl S-100 (2,6 × 60 cm). Cột sắc ký đã được cân bằng trong đệm ammonium acetat 0,1 M (pH 6,2), lượng nọc thô chạy cột mỗi lần là 50 mg, tốc độ rửa cột đạt 0,8 ml/phút

Tách các phân đoạn của nọc rắn thô bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp tiến hành trên máy RP-HPLC (Shimazu, Nhật) với cột bán điều chế C18 (10 × 250 mm; 5  $\mu$ m), tốc độ chạy cột 5 ml/phút. Cột sắc ký được chạy với gradient tuyến tính của các dung dịch sau: A là 0,1% TFA trong nước và B là 0,1% TFA trong 60% acetonitril trong nước. Chương trình chạy cột: 0-40% B trong 5 phút và 40-100% B trong 25 phút. Lượng nọc thô đưa lên cột mỗi lần là 6 mg.

##### b. Khảo sát tính chất của các phân đoạn của nọc rắn đã tách ra

Độc tính của các phân đoạn tách ra được thử lên chuột C57BL/6 cả hai giống (18-20 g) bằng cách tiêm bắp. Tác dụng của các phân đoạn lên chuột được quan sát trong 24 giờ. Lượng prôtêin mỗi lần tiêm vào chuột như được công bố trong bài báo [5].

Tính kháng khuẩn của các phân đoạn tách ra được xác định trên vi khuẩn Gram(-) như *E. coli*, *P. aeruginosa*, và vi khuẩn Gram(+) như *B.*

*subtilis*, *S. aureus*. Tính kháng nấm của các phân đoạn tách ra được xác định trên các nấm mốc như *A. niger*, *F. oxysporum* và nấm men như *C. albicans*, *S. cerevisiae*.

Điện di được tiến hành trên các gel polyacrylamid 12% và 14% theo Laemmli [7].

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

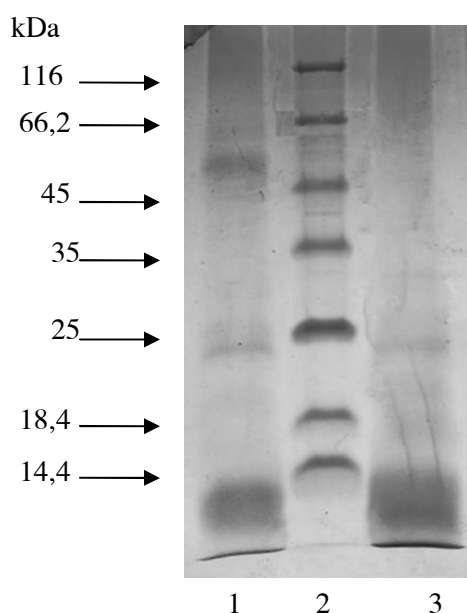
### 1. Tách các phân đoạn của nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*)

Cho đến nay đã có một số nghiên cứu chế tạo huyết thanh kháng nọc rắn hổ đất Việt Nam [8, 9], tuy vậy vẫn chưa có một nghiên cứu nào về tách và khảo sát tính chất của các nơ-rô-tóc-xin từ nọc rắn này. Vì vậy, mục tiêu của chúng tôi trong nghiên cứu này là tách và khảo sát các thành phần của nọc rắn hổ đất để mở rộng ứng dụng của chúng trong y dược.

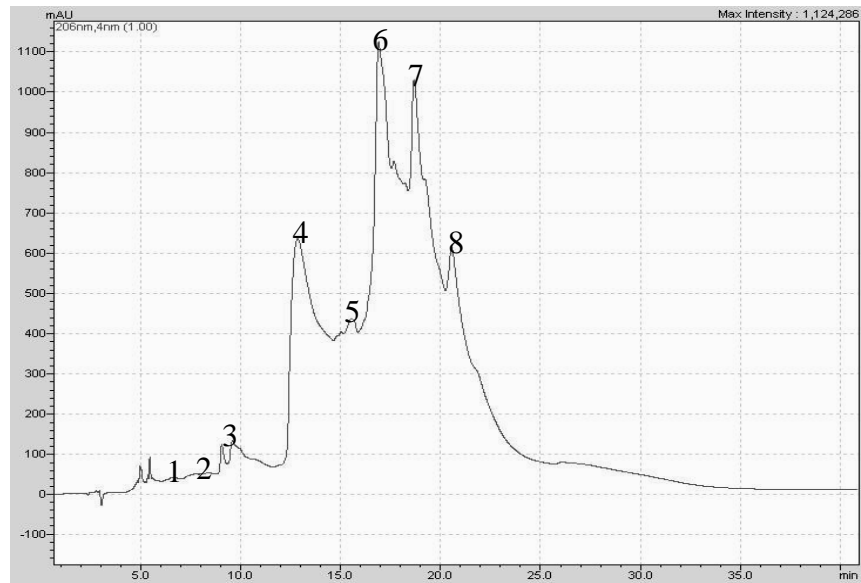
Những nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy rằng: nọc rắn hổ 2 gọng kính (*N. atra*) qua cột gel Sephacryl S-100 (2,6 × 60 cm) tách ra làm bảy phân đoạn khác nhau [5]. Sử dụng những điều kiện như vậy để phân tích nọc rắn

hổ đất (*N. kaouthia*) qua cột lọc gel thì chúng tôi chỉ thu được một phân đoạn lớn. Tiếp theo điện di nọc rắn hổ hai gọng kính (*N. atra*) và nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*). Hình 1 cho thấy thành phần nọc rắn hổ đất chứa chủ yếu là các thành phần có khối lượng phân tử thấp còn các thành phần có khối lượng phân tử lớn thì lượng không đáng kể. Kết quả này khác với nọc rắn hổ hai gọng kính. Nhận xét này phù hợp với kết quả chạy cột lọc gel của hai loại nọc này. Như vậy việc sử dụng cột lọc gel với những điều kiện như phân tích nọc rắn hổ hai gọng kính là không phù hợp để phân tích các thành phần của nọc rắn hổ đất.

Mặt khác, khi chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp để phân tích nọc rắn hổ đất cho thấy nọc thô tách ra làm 8 phân đoạn khác nhau hình 2. Thử độc tính của các phân đoạn tách ra cho thấy sáu phân đoạn có độc tính. Kết quả khảo sát sơ bộ cho thấy phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha trên cột bán điều chế C18 (10 × 250 mm, 5 μm) phù hợp hơn với mục đích của chúng tôi trong phân tích nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*), vì vậy chúng tôi đã chọn phương pháp này để phân tích các phân đoạn của nọc rắn hổ đất.



**Hình 1.** Kết quả điện di nọc thô của hai giống rắn hổ mang trên gel polyacrylamid 14%  
1. nọc rắn hổ hai gọng kính; 2. marker; 3. nọc rắn hổ đất.



**Hình 2.** Sắc ký lỏng cao áp nọc rắn hổ đất Việt Nam (*N. kaouthia*) trên cột C18 bán điều chế

Như vậy, tiếp theo những nghiên cứu nọc rắn hổ hai gọng kính (*N. atra*) [5, 6] chúng tôi đã tiến hành tách các tốc-xin trực tiếp từ nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*) bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp. Thực hiện tách các tốc-xin trực tiếp từ nọc thô, bỏ bước lọc qua gel cùng với các bước đông khô kèm theo. Vì vậy tiết kiệm được thời gian, đồng thời giảm việc biến tính các tốc-xin trong quá trình đông khô và đỡ mất chất. Bằng phương pháp đó lượng nọc thô để tách các tốc-xin cần ít hơn (chỉ vài trăm miligram nọc thô là có thể tách được các tốc-xin sạch) [10].

## 2. Khảo sát tính chất của các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*)

Hình 2 cho thấy nọc rắn hổ đất qua phương pháp sắc ký lỏng cao áp trên cột C18 đã tách ra làm 8 phân đoạn khác nhau. Thử độc tính các phân đoạn tách ra trên chuột cho thấy sáu phân đoạn: 1, 2, 3, 4, 5 và 7 có độc tính còn hai phân đoạn: 6 và 8 không độc. Trong các phân đoạn độc kể trên thì độc nhất là các phân đoạn 4 và 5, chuột bị liệt và chết sau 15 phút; sau đó đến phân đoạn 3 chuột bị co giật và chết sau 30 phút; còn các phân đoạn 1, 2 và 7 thì ít độc hơn, chuột yếu và chết sau từ 1 giờ 30 phút đến 3 giờ (bảng 1).

Bảng 1

**Thử độc tính lên chuột của các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*)**

Số phân đoạn	Quan sát chuột sau khi tiêm các phân đoạn tách ra	Nhận xét
1	Chuột yếu và chết sau 1 giờ 30 phút	Độc gây chết
2	Chuột yếu và chết sau 1 giờ 30 phút	Độc gây chết
3	Chuột co giật và chết sau 30 phút	Độc mạnh gây chết
4	Chuột liệt, yếu và chết sau 15 phút	Độc rất mạnh gây chết
5	Chuột liệt, yếu và chết sau 15 phút	Độc rất mạnh gây chết
6	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc
7	Chuột yếu và chết sau 3 giờ	Độc gây chết
8	Chuột bình thường sau khi tiêm	Không độc

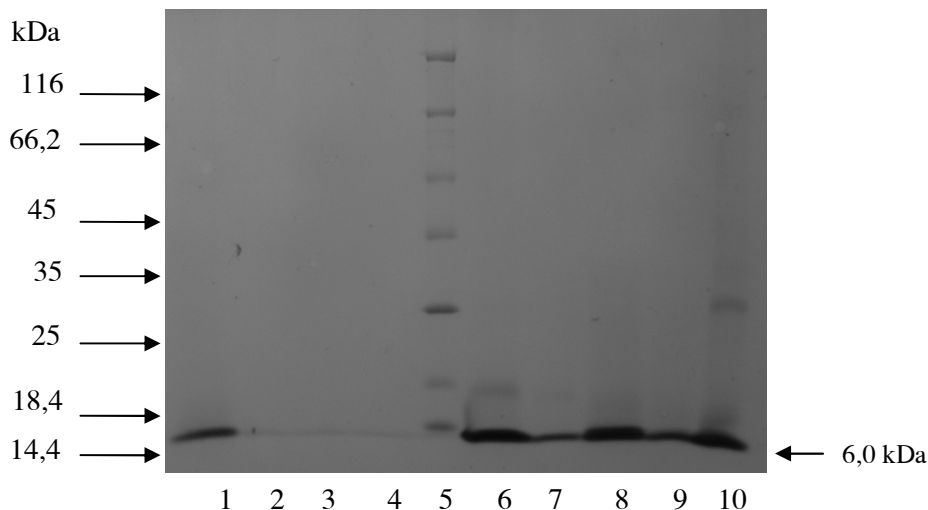
Để khảo sát thành phần prôtêin của các phân đoạn tách ra bằng phương pháp điện di cho thấy các phân đoạn độc 4, 5 và 7 chứa chủ yếu các prôtêin nằm trong vùng 6-8 kDa tương ứng với

khối lượng phân tử của các nơ-rô-tốc-xin của nọc rắn (hình 3). Trong các phân đoạn độc thì hàm lượng prôtêin của các phân đoạn 1, 2, 3 rất ít, trong bản điện di này không hiện, nhưng

trong bản điện di khác tăng hàm lượng các phân đoạn này lên 20 lần thì nhìn thấy được vết của các phân đoạn này trên bản điện di, các vết này có khối lượng phân tử khoảng 13-14 kDa tương đương với khối lượng phân tử của phospholipaza (kết quả không trình bày ở đây). Như vậy, kết quả khảo sát cho thấy trong số các phân đoạn có

độc tính tách ra từ nọc rắn hổ đất thì các phân đoạn 4, 5 và 7 chứa các nơ-rô-tốc-xin, vì vậy, chúng tôi sẽ sử dụng chúng để tách các nơ-rô-tốc-xin và khảo sát tính chất của chúng.

Tiếp theo chúng tôi đã khảo sát tính kháng khuẩn và kháng nấm của các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất (bảng 2).



**Hình 3.** Kết quả điện di các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*)

1. nọc thô; 2. pic No 1; 3. pic No 2; 4. pic No 3; 5. marker;  
6. pic No 4; 7. pic No 5; 8. pic No 6; 9. pic No 7; 10. pic No 8.

*Bảng 2*

**Thử hoạt tính các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*) trên vi khuẩn và nấm mốc**

S TT	Nồng độ ức chế tối thiểu ( MIC: µg/ml)							
	Vi khuẩn Gram(-)		Vi khuẩn Gram(+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*Ghi chú:* 1-8. các phân đoạn tách ra bằng HPLC.

Kết quả thử tính kháng khuẩn và kháng nấm của các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất cho thấy khác với các thành phần của nọc rắn hổ hai gọng kính, các thành phần tách ra từ nọc rắn hổ đất không có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm. Như vậy các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất chỉ có độc tính với động vật chứ không có độc tính đối với các vi sinh vật kiểm định.

### III. KẾT LUẬN

1. Bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp nọc rắn hổ đất (*N. kaouthia*) được phân tách thành tám phân đoạn prôtêin có tính chất khác nhau. Trong số các phân đoạn tách ra có sáu phân đoạn có độc tính và độc nhất là các phân đoạn 4 và 5. Các phân đoạn này có khối lượng phân tử tương đương khối lượng phân tử các nơ-rô-tốc-xin nọc rắn và chúng sẽ được sử dụng trong nghiên cứu tiếp theo để tách các nơ-rô-tốc-xin.

2. Khảo sát tính kháng khuẩn và kháng nấm của các phân đoạn tách ra từ nọc rắn hổ đất cho thấy chúng không có tính kháng vi sinh vật kiểm định. Điều này cho thấy nọc rắn hổ đất Miền Nam (*N. kaouthia*) rất khác nọc rắn hổ hai gọng kính Miền Bắc (*N. atra*) mà trước đây chúng tôi đã khảo sát.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Kiên, Nguyễn Quốc Thắng**, 1995: Các loài rắn độc ở Việt Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. **Cox M. J.**, 1995: Herpetological Review, 26(3): 156-157.
3. **Meng Q. X. et al.**, 2002: Com. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol., 132(1): 113-121.
4. **Osipov A. V. et al.**, 2004: Eur. J. Biochem., 271: 2018-2027.
5. **Hoàng Ngọc Anh, Bùi Thanh Xuân, Trương Nam Hải**, 2006: Tạp chí Hóa học, 44(1): 57-61.
6. **Hoàng Ngọc Anh, Bùi Thanh Xuân, Đặng Trần Hoàng, Trương Nam Hải**, 2006: Tạp chí Hóa học, 44(4): 449-453.
7. **Laemmli U. K.**, 1970: Nature, 227: 680-685.
8. **Trịnh Xuân Kiêm**, 1992: Tạp chí Dược học, 1: 17-19.
9. [www.vnn.vn/khoahoc/2004/06/160399](http://www.vnn.vn/khoahoc/2004/06/160399).
10. **Hoàng Ngọc Anh, Đặng Trần Hoàng, Trương Nam Hải, Fournier A.**, 2006: Tạp chí Sinh học, 28(2): 44-49.

### STUDY COMPONENTS OF VIETNAMESE COBRA VENOM *NAJA KAOUTHIA*

NGUYEN HONG THANH, NGUYEN KIM TAN,  
TRUONG NAM HAI, HOANG NGOC ANH

### SUMMARY

The cobra snakes are distributed in many regions of Vietnam. They contain three species: *Naja atra* snakes are distributed in the North of Vietnam; *Naja sumatra* snakes are distributed in the central part of Vietnam and in the east of Cochin; *Naja kaouthia* snakes are distributed in the west of Cochin. Among these cobra snakes the *N. kaouthia* are most dangerous snakes for people in the Cochin. The  $\alpha$ -neurotoxins, muscarinic toxins and cytotoxins were isolated from snake venoms of Asian *N. kaouthia*. The compositions of snake venoms depend on their geographic distribution. Until now the compositions of Vietnamese *N. kaouthia* snake venom were not studied, so we carried out this work.

Venom was collected from *N. kaouthia* snakes breeding in the snake camp in Dong Tam, Tien Giang. Our analysis of *N. kaouthia* snake venom showed the method RP-HPLC on a Supelcosil C18 column is better than method FPLC on a Sephacryl S-100 for this aim. By method RP-HPLC on a Supelcosil C18 column the *N. kaouthia* snake venom separated into eight fractions. Toxicity assay on mice showed that six from isolated fractions are toxic (fractions: 1, 2, 3, 4, 5 and 7). The method electrophoresis was used to study protein

compositions of isolated fractions and it showed that the toxic fractions 1, 2, 3 have molecular mass in the range of 13-14 kDa, that similar to those of phospholipase. In this time the most toxic fractions 4 and 5 have molecular mass in the range of 6-8 kDa, that similar to neurotoxins isolated from Thai cobra *N. kaouthia*. These fractions will be used for further isolation of neurotoxins. Study anti-bacterium and anti-fungus activities of isolated fractions showed they have no these activities. This result showed the compositions of *N. kaouthia* snake venom distributed in the South of Vietnam were very different from the compositions of *N. atra* snake venom distributed in the North of Vietnam. The compositions of *N. atra* snake venom have anti-bacterium and anti-fungus activities.

*Ngày nhận bài: 14-11-2007*