

PHÂN TÍCH HỆ PROTEIN/PEPTIDE NỌC ĐỘC ONG VESPA VELUTINA PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT PROTEOMICS

Nguyễn Tiến Dũng¹, Đỗ Thị Vân Anh¹, Nguyễn Thị Minh Phương¹, Bùi Thị Huyền¹, Phạm Đình Minh¹, Đỗ Hữu Chí¹, Nguyễn Thị Phương Liên², Phan Văn Chí¹, Lê Thị Bích Thảo^{1,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lethao@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.10.2016

Ngày nhận đăng: 20.5.2017

TÓM TẮT

Nọc độc là hỗn hợp phức tạp của nhiều loại hợp chất, trong đó protein và peptide là những thành phần chủ yếu. Bên cạnh tính độc, nọc độc có tiềm năng ứng dụng trong các liệu pháp điều trị bệnh. Nghiên cứu xác định thành phần của nọc độc là bước quan trọng đầu tiên cho những nghiên cứu ứng dụng nọc độc trong y học. Việt Nam là nước có nhiều nguồn nguyên liệu quý trong đó nọc độc có thể sử dụng trong y học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích hệ protein/peptide của nọc độc ong *Vespa velutina* (*V. velutina*), một trong những loài ong đặc trưng cho vùng Đông Nam Á trong đó có Việt Nam, bằng các kỹ thuật proteomics. Nọc độc ong *V. velutina* sau quá trình tách chiết bằng phương pháp thủ công được thủy phân bằng trypsin với sự hỗ trợ của màng lọc và phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng kết nối khối phổ liên tiếp. Quá trình nhận diện, kiểm định protein và giải trình tự *de novo* peptide sau đó được thực hiện bởi phần mềm Peaks. Kết quả, chúng tôi đã xác định được 36 protein từ nọc độc ong *V. velutina*, trong đó có nhiều protein đặc trưng cho nọc độc. Dựa vào chú giải bản thể gen, hệ protein nọc độc ong *V. velutina* được chia thành các nhóm chức năng sau: protein liên kết (53%), protein có hoạt tính xúc tác (33%), protein cấu trúc (8%), protein có hoạt tính chống oxy hóa (4%) và protein có chức năng khác (2%). Bên cạnh đó, 81 peptide đã được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự *de novo*, trong đó có 34 peptide (42%) tiềm năng cho nọc độc. Đây là dữ liệu đầu tiên về hệ protein/peptide của loài ong này trên thế giới, là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng nọc độc ong *V. velutina* trong y học.

Từ khóa: Nọc độc, peptide, protein, proteomics, sắc ký lỏng kết nối khối phổ, *Vespa velutina*.

MỞ ĐẦU

Nọc độc là một hỗn hợp phức tạp của nhiều protein, peptide và các phân tử khối lượng thấp (Lewis, Garcia, 2003; Yan *et al.*, 2016). Hỗn hợp này có chứa các hoạt chất sinh học có tính độc đối với nạn nhân, gây ra các triệu chứng phù nề, tấy đỏ, sưng, đau, sốc phản vệ và có thể dẫn đến tử vong (Moreno, Giralt, 2015). Tuy vậy, một số thành phần của nọc độc ong có tiềm năng ứng dụng trong y học như làm chất kháng khuẩn (Yang *et al.*, 2013), thuốc giảm đau (Moreno, Giralt, 2015), hay thuốc chữa các bệnh rối loạn thần kinh (Silva *et al.*, 2015), bệnh miễn dịch (Hwang *et al.*, 2015), viêm khớp dạng thấp và viêm đa khớp (Moreno, Giralt, 2015; Dongol *et al.*, 2016). Một số nghiên cứu gần đây đã cho thấy nọc độc có nhiều tiềm năng trong điều trị một số bệnh nan y như ung thư (Heinen, da Veiga, 2011) và

HIV (Moreno, Giralt, 2015). Do đó các nghiên cứu ứng dụng nọc độc trong điều trị bệnh đang thu hút được nhiều quan tâm.

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới với hệ động thực vật phong phú. Do đó, nghiên cứu ứng dụng nguồn vật liệu sinh học sẵn có này trong những lĩnh vực khác nhau là rất hứa hẹn. *V. velutina*, một loài ong được phân bố phổ biến ở các nước Đông Nam Á trong đó có Việt Nam, có khả năng tấn công và tự vệ nhờ nọc độc sẵn có (Nguyen *et al.*, 2006, Villamil Cajoto *et al.* 2015). Phân tích thành phần của nọc độc sẽ góp phần tạo ra tiền đề cho những nghiên cứu ứng dụng nọc độc *V. velutina* sau này. Những năm gần đây, sự phát triển của các kỹ thuật proteomics dựa trên khối phổ đã cho phép nhận diện được đồng thời nhiều protein/peptide từ các mẫu sinh học phức tạp (Angel *et al.*, 2012; Van Riper *et al.*, 2013). Nghiên cứu proteomics trên đối tượng nọc độc cho

đến nay đã xác định được hàng trăm protein/peptide từ nhiều loài khác nhau (Yang *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013, Sookrung *et al.*, 2014).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích và xác định hệ protein/peptide của nọc độc ong *V. velutina* phân lập ở Việt Nam. Nọc độc sau quá trình tách chiết được thủy phân và phân tích bằng sắc ký lỏng kết nối khối phổ. Quá trình nhận diện protein và giải trình tự *de novo* peptide được thực hiện bởi phần mềm Peaks. Kết quả, chúng tôi đã phát hiện 36 protein và 81 peptide từ nọc độc ong *V. velutina*. Đây là dữ liệu công bố đầu tiên về hệ protein/peptide nọc độc của loài ong này trên thế giới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Ong *V. velutina* (27 cá thể) thu thập ở vùng núi tỉnh Phú Thọ, Việt Nam được phân loại tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các cá thể ong được bảo quản sống trước khi tiến hành thí nghiệm.

Các hóa chất chủ yếu bao gồm: Trypsin, (loại dùng cho giải trình tự, Sigma, Đức), Dithiothreitol và Iodoacetamide (Sigma, Đức), hóa chất cho điện di SDS-PAGE, hóa chất cho sắc ký lỏng kết nối khối phổ. Các hóa chất cơ bản khác được cung cấp bởi phòng Hóa sinh Protein, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết nọc độc và điện di kiểm tra

Bầu độc và ống độc của ong được tách chiết từ các cá thể ong *V. velutina* (27 cá thể) bằng công cụ giải phẫu chuyên dụng, rửa sạch với đệm PBS lạnh 3 lần và đưa vào cùng 1 ống Eppendorf 2 ml. Bầu độc sau đó sẽ được cắt ra, bổ sung đệm chiết (dung dịch ABC 100 mM) và lắc nhẹ ở 4°C trong 3 giờ, bước này được lặp lại 3 lần. Nhằm mục đích hòa tan hoàn toàn các protein, sau khi chiết với đệm ABC 100 mM, mẫu được chiết thêm 1 lần bằng dung dịch urea 6 M. Mẫu từ các lần chiết khác nhau được bảo quản trong cùng 1 ống Eppendorf 2 ml tại -20°C cho đến khi sử dụng. Hàm lượng protein của mẫu tách chiết được xác định theo phương pháp Bradford như mô tả trước đây (Nguyễn Thị Minh Phương *et al.*, 2012). Quá trình tách chiết được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE theo quy trình của Laemmli (Laemmli, 1970).

Thủy phân protein

Protein nọc độc (30 µg) được phân cắt bằng cả 2 phương pháp: phương pháp thủy phân trong dung dịch truyền thống và phương pháp thủy phân có hỗ trợ của màng lọc (filter-aided sample preparation (FASP) - phương pháp FASP). Phương pháp thủy phân trong dung dịch được thực hiện theo quy trình như mô tả trước đây (Nguyễn Thị Minh Phương *et al.*, 2012). Phương pháp thủy phân FASP được thực hiện theo Mann và công sự (Wiśniewski *et al.*, 2009) với một số thay đổi nhỏ. Ở phương pháp này, protein tổng số được hòa trong 500 µl đệm UA (8 M ure; 0,1 M Tris-Cl 0,1 M, pH 8,5) có bổ sung DTT 0,1 M và để ở nhiệt độ phòng trong 1 h. Mẫu sau đó được đưa vào thiết bị lọc và ly tâm ở 11.500 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ hoàn toàn DTT. 100 µl đệm UA có chứa IAA 0,5 M tiếp tục được bổ sung vào và ủ mẫu trong tối 30 phút, sau đó ly tâm 11.500 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ IAA. Thiết bị lọc được tiếp tục rửa 3 lần với đệm UA và 3 lần với đệm pha enzyme (ABC 50 mM). Sau quá trình rửa, enzyme trypsin (loại dùng cho giải trình tự) được bổ sung với tỷ lệ về khối lượng enzyme/protein là 1/30. Phản ứng thủy phân thực hiện ở 37°C trong 16 h. Sau quá trình thủy phân, các peptide được thu nhận bằng cách bổ sung 100 µl đệm ABC 20 mM và ly tâm 11.500 vòng/phút trong 15 phút. Bước này được lặp lại 2 lần. Hỗn hợp peptide sau đó được làm khô bằng SpeedVAC, làm sạch nhờ đầu côn Ziptip, và bảo quản ở điều kiện lạnh (-20°C) đến khi sử dụng.

Phân tích peptide bằng sắc ký lỏng kết nối khối phổ

Mẫu sau thủy phân được hòa vào đệm FA 0,1% và đưa lên cột sắc ký ngược pha (C18, 75 µm id x 15 cm) với tốc độ dòng 0,2 µl/phút. Hỗn hợp peptide được phân tách bởi gradient nồng độ của dung dịch A (FA 0,1% trong H₂O) và B (FA 0,1% trong ACN 90%). Quá trình thổi mẫu được thực hiện ở tốc độ dòng 0,2 µl/phút theo gradient tuyến tính dung dịch B từ 5-100% trong 60 phút. Peptide sau đó sẽ được ion hóa bằng nguồn phun mẫu ESI và phân tích bằng hệ thống khối phổ Orbitrap. Hiệu điện thế được đặt ở nguồn đề ion hoá mẫu là 1800V. Máy khối phổ được cài đặt ở chế độ dương với quá trình quét hoàn chỉnh (full scan) được thực hiện trong dải khối từ 400 amu đến 2000 amu. Hệ thống hoạt động ở chế độ DAA (Data-dependent Acquisition), theo đó quá trình phân mảnh (MS/MS) sẽ được thực hiện với 3 ion có mật độ cao nhất được lựa chọn từ quá trình MS trước đó. Các phổ chứa dữ liệu về các mảnh MS và MS/MS sẽ được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm

Xcalibur (Thermo Scientific, USA).

Nhận diện protein và giải trình tự *de novo*

Để nhận diện protein, phổ MS/MS thu được sẽ được tìm kiếm, so sánh với cơ sở dữ liệu Uniprot cập nhật của tế bào nhân chuẩn (khoảng 19 triệu trình tự) nhờ phần mềm Peaks (Bioinformatics Solutions Inc, Canada). Các thông số phân tích của phần mềm Peaks được cài đặt như sau: sai số của ion tiền thân: 20 ppm; sai số của phân mảnh: 0,5 Da; enzyme: trypsin; cải biến cố định: carbamydomethyl (C), cải biến biến đổi: oxidation (M). Kiểm định quá trình nhận diện protein được thực hiện bởi phần mềm Peaks trong đó các kết quả có điểm số thỏa mãn giá trị FDR (False Discovery Rate) $\leq 0,1\%$ sẽ được lựa chọn (Elias, Gygi, 2007).

Giải trình tự *de novo* của các peptide được thực hiện bởi phần mềm Peaks. Các thông số cơ bản của quá trình giải trình tự được lựa chọn tương tự quá trình nhận diện protein. Điểm khác biệt ở đây là thông số về enzyme phân cắt được đặt ở chế độ không đặc hiệu (Zhang *et al.*, 2012).

Phân loại protein theo chức năng

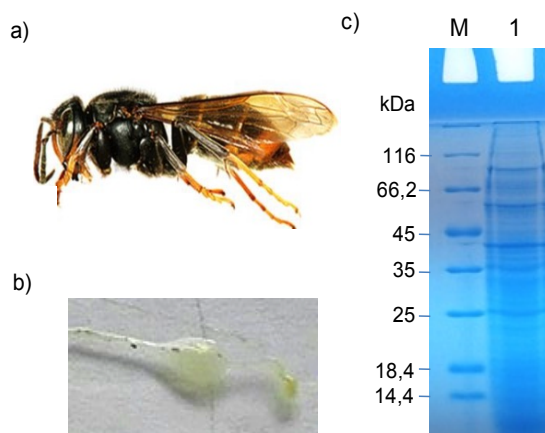
Các protein đã nhận diện và kiểm định sẽ được phân loại theo chức năng trên cơ sở chú giải bản thể gene (Gene Ontology Annotation) tương ứng với protein đó (Gene Ontology Consortium, 2008). Quá trình phân loại theo chức năng được thực hiện nhờ phần mềm STRAP (Bhatia *et al.*, 2009) với sự hỗ trợ của Trung tâm nghiên cứu proteomics về bệnh mạch vành của Trường Đại học Boston, Hoa Kỳ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu thập mẫu ong và tách chiết nọc độc

Tổng cộng, 27 cá thể ong *V. velutina* (Hình 1a) thu thập từ vùng núi Phú Thọ, Việt Nam được sử dụng để tách chiết nọc độc phục vụ cho nghiên cứu. Ong sau thu thập được đưa và điều kiện lạnh (-20°C) trong 1 h, sau đó mổ để tách thu bầu độc và ống độc (Hình 1b). Bầu độc và ống độc sẽ được rửa sạch bằng đệm PBS lạnh 3 lần, sau đó cắt ra để tách chiết và thu nhận nọc độc. Tổng cộng, 4,9 mg protein đã được tách chiết và thu nhận từ 27 cá thể ong *V. velutina*. Để đánh giá sơ bộ kết quả tách chiết, phương pháp điện di SDS-PAGE đã được sử dụng. Hình ảnh điện di (Hình 1c) cho thấy, phổ băng protein của nọc độc ong *V. velutina* khá rõ nét với dải khối lượng phân tử phân bố rộng, từ vài kDa cho đến trên 60 kDa. Kết quả này, với sự tương đồng với những nghiên cứu

trước đây về nọc độc của ong *Chelonus inanitus*, bộ cạp và một số loài ong khác thuộc chi ong bắp cày (Kulkeaw *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2010; Estrada-Gómez *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2016) cho thấy nọc ong *V. velutina* đã được tách chiết thành công.



Hình 1. Minh họa hình ảnh ong *V. velutina* (a), bầu độc của ong *V. velutina* (b) và kết quả điện di SDS-PAGE mẫu nọc độc tổng số đã tách chiết (c). M, thang protein chuẩn; 1, mẫu nọc độc tổng số.

Hệ protein nọc độc *V. velutina*

Một trong những khó khăn của phân tích proteome là sự thiếu hụt cơ sở dữ liệu của loài nghiên cứu. Giải pháp khả thi trong trường hợp này là sử dụng cơ sở dữ liệu chéo loài (cross-species database) hoặc sử dụng phương pháp giải trình tự *de novo* (Liska, Shevchenko, 2003; de Graaf *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu của chúng tôi, do chưa có cơ sở dữ liệu của ong *V. velutina*, cơ sở dữ liệu Uniprot của sinh vật nhân chuẩn được sử dụng để nhận diện protein với sự hỗ trợ của phần mềm Peaks. Quá trình nhận diện được kiểm định lại dựa vào giá trị FDR (Elias, Gygi, 2007) theo đó, các kết quả tìm kiếm thỏa mãn $\text{FDR} \leq 0,1\%$ sẽ được lựa chọn cho các phân tích tiếp theo. Từ danh sách nhận diện của phần mềm Peaks, các kết quả không thỏa mãn giá trị $\text{FDR} \leq 0,1\%$ và các protein trùng lặp sẽ được loại bỏ. Tổng cộng, chúng tôi phát hiện 36 protein từ nọc ong *V. velutina* (Bảng 1). Đây là dữ liệu đầu tiên về hệ protein nọc độc của loài ong này trên thế giới.

Để tìm hiểu rõ hơn vai trò của protein nọc độc ong *V. velutina*, hệ protein đã nhận diện và kiểm định được phân loại theo chức năng dựa vào chú giải bản thể gen (Gene Ontology Annotation) tương ứng (Gene Ontology Consortium, 2008). Kết quả phân loại (Hình 2) cho thấy, protein liên kết chiếm tỉ lệ cao nhất (53%), tiếp đến lần lượt là protein có hoạt tính xúc tác (33%), protein cấu trúc (8%), protein có

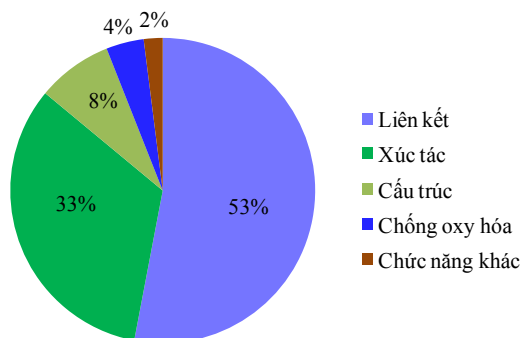
hoạt tính chống oxy hóa (4%) và protein giữ các chức năng khác (2%).

Trong nhóm protein xúc tác, chúng tôi phát hiện một số protein và enzyme điển hình cho nọc độc như phospholipase A1 (PLA1) và arginine kinase. PLA1 là protein phổ biến trong nọc độc của rắn (Richmond, Smith, 2011) và một số loài thuộc chi ong bắp cày như *Vespa magnifica* (Yang *et al.*, 2008), *Vespa affinis* (Sukprasert *et al.*, 2013). Trong cơ chế tác động của nọc độc, PLA1 tham gia vào quá trình gây dị ứng, viêm và tạo huyết khối trong động mạch chủ (Yang *et al.*, 2008; Richmond *et al.*, 2011). Arginine kinase đóng vai trò thiết yếu đối với quá trình phosphoryl hóa protein và là tác nhân gây dị ứng tiềm tàng trong thực phẩm (Yu *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2010). Enzyme này đã được phát hiện trong nọc độc của ong mật (Li *et al.*, 2013) và một số loài ong bắp cày như *Polybia paulista* (dos Santos *et al.*, 2010) và *Vespa affinis* (Sookkrung *et al.*, 2014).

Ở nhóm protein có hoạt tính oxy hóa, peroxiredoxin 1 (PRDX1) và superoxide dismutase (SOD) là những protein đáng lưu tâm. PRDX1 tham gia điều chỉnh quá trình phát triển, phân bào và chết theo chương trình của tế bào (Ding *et al.*, 2016). Protein này đã được phát hiện trong nghiên cứu proteomics nọc độc mật (Peiren *et al.*, 2005) và nghiên cứu transcriptomics trên đối tượng ong *Anisopteromalus calandrae* (Perkin *et al.*, 2015). SOD - một enzyme quan trọng bảo vệ tế bào trước các nguyên tử oxy hoạt động, là một chất tiết phổ biến trong nọc độc của nhiều loài khác nhau như bọ cạp (Ramanaiah, Venkaiah, 1992) và ong ký sinh *Leptopilina boucardi* (Colinet *et al.*, 2011). SOD được giải phóng và hoạt động như tác nhân gây độc trong nọc độc để chống lại đáp ứng miễn dịch của vật chủ, có vai trò quan trọng trong quá trình ký sinh của một số loài ong ký sinh (Colinet *et al.*, 2011).

Bảng 1. Danh sách protein được nhận dạng trong mẫu nọc độc *V. velutina*.

STT	Tên protein	Điểm số nhận diện	STT	Tên protein	Điểm số nhận diện
1	14-3-3 protein zeta	203,84	19	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H	33,79
2	Actin_muscle	159,17	20	Nesprin-1	68,22
3	Alpha-actinin_sarcomeric	144,93	21	Paramyosin_long form	67,05
4	Arginine kinase	122,82	22	PDZ and LIM domain protein Zasp	38,67
5	Argininosuccinate synthase	102,64	23	Peroxiredoxin 1	66,29
6	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	57,43	24	Phosphoglycerate kinase	64,88
7	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA	33,79	25	Phospholipase A1	51,28
8	Filamin-A	122,82	26	Probable histone H2Axb	48,0
9	Glutamate dehydrogenase-mitochondrial	92,2	27	Probable phospholipase A1 magnifin	44,02
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	80,68	28	Pyruvate kinase	39,15
11	Heat shock 70 kDa protein	75,27	29	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	57,43
12	Histone H2A	74,81	30	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 calcium ATPase 2	57,43
13	Histone H3.3	72,91	31	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	38,71
14	Inactive hyaluronidase B	33,69	32	Threonine-tRNA ligase	38,49
15	Muscle LIM protein Mlp84B	72,91	33	Tropomyosin	35,56
16	Myosin heavy chain_muscle	68,43	34	Tropomyosin-1	34,15
17	Myosin regulatory light chain 2	54,66	35	Tropomyosin-2	33,68
18	Myosin-2	29,03	36	Troponin T	32,49



Hình 2. Phân loại protein nọc độc *V. velutina* theo chức năng

Trong tập hợp protein đã phát hiện, bên cạnh nhóm protein xúc tác và protein có chức năng chống oxy hóa, một số protein cấu trúc cũng được phát hiện như actin, myosin, tropomyosin... Sự xuất hiện của những protein này, như đề cập trong nghiên cứu trước đây (dos Santos *et al.*, 2010) là hệ quả của quá trình tách chiết nọc độc theo phương pháp thủ công.

Giải trình tự *de novo* peptide nọc độc

Peptide chiếm tỷ lệ lớn và là thành phần có hoạt tính quan trọng của nọc độc. Theo ước tính, nọc độc của mỗi loài có thể chứa đến hàng trăm peptide bên cạnh protein và các hợp chất khác (Lewis, Garcia, 2003). Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện peptide từ nọc ong *V. velutina* bằng quy trình kết hợp phương pháp thủy phân FASP, sắc ký lỏng kết nối khối phổ và giải trình tự *de novo*. Sau quá trình thủy phân FASP, những peptide khối lượng phân tử nhỏ đi qua màng lọc sẽ được thu nhận, làm sạch và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng kết nối khối phổ liên tiếp. Quá trình giải trình tự *de novo* được thực hiện bởi phần mềm Peaks dựa trên dữ liệu về phổ MS/MS của peptide. Kết quả phân tích cho thấy, 81 peptide trong nọc độc *V. velutina* đã được xác định.

Một trong những đặc điểm đáng chú ý của peptide nọc độc là trong phân tử có chứa nhiều amino acid kỵ nước và amino acid kiềm tính. Đặc tính này có vai trò quan trọng đối với chức năng của peptide nọc độc, đặc biệt là các peptide có hoạt tính kháng sinh (Corzo *et al.*, 2001; Konno *et al.*, 2016). Nhằm tìm hiểu sâu hơn chức năng của các peptide đã được giải trình tự *de novo* từ nọc độc ong *V. velutina*, tỷ lệ của amino acid kỵ nước và amino acid kiềm tính của peptide đã được khảo sát dựa vào công cụ tin sinh học trực tuyến Peptide 2.0 (<http://peptide2.com/index.php>). Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cao của peptide kỵ nước và peptide

giàu amino acid kiềm tính. Trong số 81 peptide đã phát hiện, 34 peptide (42%) có tỷ lệ amino acid kỵ nước >50%, trong đó nhiều peptide có tỷ lệ amino acid kỵ nước >75%. Những peptide có tính kỵ nước cao này là những peptide tiềm năng của nọc độc ong *V. velutina* lần đầu tiên được xác định.

KẾT LUẬN

Bằng các kỹ thuật proteomics, 36 protein đã được nhận diện từ nọc ong *V. velutina* phân lập ở Việt Nam. Hệ protein nọc độc *V. velutina* được phân loại thành các nhóm: protein liên kết (53%), protein có hoạt tính xúc tác (33%), protein cấu trúc (8%), protein tham gia vào quá trình chống oxy hóa (4%), và protein chưa rõ chức năng (2%). Đây là những dữ liệu đầu tiên về hệ protein nọc ong *V. velutina* ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Bên cạnh đó, chúng tôi đã phát hiện 81 peptide từ nọc ong *V. velutina* bằng phương pháp giải trình tự *de novo*. Trong đó, 34 peptide (42%) có tính kỵ nước cao là những peptide tiềm năng của nọc độc ong *V. velutina* lần đầu tiên được phát hiện.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của PTNTĐ về Công nghệ Gen cho đề tài: “Nghiên cứu khảo sát các protein/peptide có hoạt tính kháng tế bào ung thư trong nọc độc mặt quỷ của Việt Nam” (Mã số: NV03-PTNTĐ 2015).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Angel TE, Aryal UK, Hengel SM, Baker ES, Kelly RT, Robinson EW, Smith RD (2012) Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem Soc Rev* 41(10): 3912-3928.
- Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME (2009) Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem* 81(23): 9819-9823.
- Colinet D, Cazes D, Belghazi M, Gatti JL, Poirié M (2011) Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *J Biol Chem* 286(46): 40110-40121.
- Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, Nakajima T (2001) Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359: 35-45.
- de Graaf DC, Aerts M, Danneels E, Devreese B (2009) Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics* 72(2): 145-154.

- Ding C, Fan X, Wu G (2016) Peroxiredoxin 1 - an antioxidant enzyme in cancer. *J Cell Mol Med* 21: 193-202
- Dongol Y, Dhananjaya BL, Shrestha RK, Aryal G (2016) Wasp Venom Toxins as a Potential Therapeutic Agent. *Protein Pept Lett* 23(8): 688-698.
- dos Santos LD, Santos KS, Pinto JR, Dias NB, de Souza BM, dos Santos MF, Perales J, Domont GB, Castro FM, Kalil JE, Palma MS (2010) Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J Proteome Res* 9(8): 3867-3877.
- Elias JE, Gygi SP (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4(3): 207-214.
- Estrada-Gómez S, Cupitra NI, Arango WM, Muñoz LJ (2014) Intraspecific variation of *centruroides edwardsii* venom from two regions of Colombia. *Toxins (Basel)* 6(7): 2082-2096.
- Gene Ontology Consortium (2008) The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D440-4.
- Heinen TE, da Veiga AB (2011) Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 57(4): 497-511.
- Hwang DS, Kim SK, Bae H (2015) Therapeutic Effects of Bee Venom on Immunological and Neurological Diseases. *Toxins (Basel)* 7(7): 2413-2421.
- Konno K, Kazuma K, Nihei K (2016) Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. *Toxins (Basel)* 8(4): 114.
- Kulkeaw K, Chaicumpa W, Sakolvaree Y, Tongtawe P, Tapchaisri P (2007) Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. *Toxicon* 49(7): 1026-41.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lewis RJ, Garcia ML (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2: 790-802.
- Li R, Zhang L, Fang Y, Han B, Lu X, Zhou T, Feng M, Li J (2013) Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. *BMC Genomics* 14: 766.
- Liska AJ, Shevchenko A (2003) Expanding the organismal scope of proteomes: cross -species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* 3: 19-28.
- Moreno M, Giralt E (2015) Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins (Basel)* 7(4): 1126-1150.
- Nguyen LTP, Saito F, Kojima J, Carpenter JM (2006) Vespidae of Viet Nam (Insecta: Hymenoptera) 2. Taxonomic Notes on Vespinae. *Zoolog Sci* 23: 95-104.
- Nguyễn Thị Minh Phương, Phạm Đức Đan, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi (2012) Phân tích hệ protein huyết thanh bệnh nhân đái tháo đường type 2. *Tạp chí Sinh học* 34(2): 253-258.
- Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumenb J, Jacobs FJ (2005) The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta* 1752(1): 1-5.
- Perkin LC, Friesen KS, Flinn PW, Oppert B (2015) Venom gland components of the ectoparasitoid wasp, *Anisopteromalus calandrae*. *J Venom Res* 6: 19-37.
- Ramanaiah M, Venkaiah B (1992) Characterization of superoxide dismutase from south Indian scorpion venom. *Biochem Int* 26(1): 113-123.
- Richmond GS, Smith TK (2011) Phospholipases A1. *Int J Mol Sci* 12(1): 588-612.
- Silva J, Monge-Fuentes V, Gomes F, Lopes K, dos Anjos L, Campos G, Arenas C, Biolchi A, Gonçalves J, Galante P, Campos L, Mortari M (2015) Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins (Basel)* 7(8): 3179-3209.
- Sookrung N, Wong-din-Dam S, Tungtrongchitr A, Reamtong O, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Visitsunthorn N, Manuyakorn W, Chaicumpa W (2014) Proteome and allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components. *J Proteome Res* 13(3): 1336-1344.
- Sukprasert S, Rungsa P, Uawonggul N, Incamnoi P, Thammasirirak S, Daduang J, Daduang S (2013) Purification and structural characterisation of phospholipase A1 (Vespapase, Ves a 1) from Thai banded tiger wasp (*Vespa affinis*) venom. *Toxicon* 61: 151-164.
- Van Riper SK, de Jong EP, Carlis JV, Griffin TJ (2013) Mass spectrometry-based proteomics: basic principles and emerging technologies and directions. *Adv Exp Med Biol* 990: 1-35.
- Villamil Cajoto I, Balo Araujo S, Paredes Vila S, Neira Rojo O (2015) Asian black hornet (*Vespa velutina*) multiple stings and secondary rhabdomyolysis. *Rev Clin Esp* 215(4): 245-246
- Vincent B, Kaeslin M, Roth T, Heller M, Poulain J, Cousserans F, Schaller J, Poirié M, Lanzrein B, Drezen JM, Moreau SJM (2010) The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach. *BMC Genomics* 11: 693.

- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6(5): 359-362.
- Yan Z, Fang Q, Wang L, Liu J, Zhu Y, Wang F, Li F, Werren JH, Ye G (2016) Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. *Sci Rep* 6: 19604.
- Yang H, Xu X, Ma D, Zhang K, Lai R (2008) A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon* 51(2): 289-296.
- Yang X, Wang Y, Lee WH, Zhang Y (2013) Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* 74: 151-157.
- Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP (2003) Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 170(1): 445-453.
- Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B (2012) PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics* 11(4): M111.010587.

PROTEOMICS ANALYSIS OF VENOM ISOLATED FROM VESPA VELUTINA COLLECTED IN VIETNAM

Nguyen Tien Dung¹, Do Thi Van Anh¹, Nguyen Thi Minh Phuong¹, Bui Thi Huyen¹, Pham Dinh Minh¹, Do Huu Chi¹, Nguyen Thi Phuong Lien², Phan Van Chi¹, Le Thi Bich Thao¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Wasp venoms are complex mixtures of various types of compounds, of which proteins and peptides are major components. Beside its toxicity, wasp venom is potential for treatment of diseases. Characterization of venom proteins and peptides is the first and most important step toward its applications in medicine. Vietnam possesses many valuable materials, of which venoms could be used in medicine. In the present work, we aim to identify proteins and peptides in the venom of *Vespa velutina* (*V. velutina*), a species of social wasp indigenous to Southeast Asia including Vietnam using proteomic techniques. The venom isolated from *V. velutina* by manual extraction was digested with trypsin via the FASP (Filter Aided Sample Preparation) method and analyzed with liquid chromatography tandem - mass spectrometry (LC-MS/MS). The following protein identification, protein validation, and peptide *de novo* sequencing were carried out using the Peaks software. In total, we detected 36 proteins from *V. velutina* venom and many of them had been reported as venom-specific proteins. According to Gene Ontology Annotation (GOA), *V. velutina* venom proteins were functionally classified into five categories: binding proteins (53%), catalytic proteins (33%), structural proteins (8%), antioxidants (4%), and proteins with other functions (2%). In addition, 81 peptides were detected in the venom of *V. velutina* by *de novo* sequencing, of which 34 peptides (42%) are potential venom peptides. We introduced for the first time the collection of proteins and peptides from *V. velutina* venom, providing the basis for its further application in medicine.

Keywords: *Venom, peptide, protein, proteomics, Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Vespa velutina*