

## PHÂN TÁCH CÁC PROTEIN TỪ NỌC RẮN HỒ MANG CHÚA *OPHIOPHAGUS HANNAH* TẠI VIỆT NAM VÀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CHÚNG LÊN SỰ BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO MỠ 3T3-L1

Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Hoa, Hà Thị Thu, Nguyễn Thị Hoa, Mai Thùy Linh, Nguyễn Hải Triều, Phạm Thị Lành, Đinh Duy Kháng, Đồng Văn Quyền

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

Ngày nhận bài: 27.12.2015

Ngày nhận đăng: 28.6.2016

### TÓM TẮT

Nọc rắn, một hỗn hợp chứa các phân tử với những hoạt tính sinh học phong phú khác nhau, gần đây đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học. Những nghiên cứu trên thế giới cho thấy một số hợp chất trong nọc rắn tác động đặc hiệu và hiệu quả lên các cơ quan đích của con mồi. Không giống như nọc độc của *Naja naja*, *Echis carinatus*, *Vipera russellii* được sử dụng rộng rãi, có rất ít sự chú ý đối với nọc rắn hổ chúa *Ophiophagus hannah* mặc dù đây là loài rắn độc lớn nhất trên thế giới. Trong nghiên cứu này, sử dụng các cột ly tâm có chứa các màng phân tách với kích thước khác nhau, YM100, YM50, YM30, YM10 và YM3, các phân đoạn protein, peptide có trong nọc rắn *Ophiophagus hannah* thu nhận tại trại rắn Đồng Tâm, Tiền Giang đã được phân tách. Phân tích bằng điện di SDS-PAGE cho thấy, trong số 4 phân đoạn gồm (1) từ 3 kDa đến nhỏ hơn 10 kDa, (2) từ 10 kDa đến nhỏ hơn 30 kDa, (3) từ 30 kDa đến nhỏ hơn 50 kDa và (4) từ 50 kDa đến nhỏ hơn 100 kDa, protein trong phân đoạn 4 chiếm tỉ lệ cao nhất, trong khi phân đoạn 3 chiếm tỉ lệ thấp nhất. Thử nghiệm phân đoạn 1 lên sự biệt hóa của tế bào mô mỡ 3T3-L1 cho thấy, ở nồng độ 10 µg/mL, phân đoạn này ức chế sự biệt hóa tế bào mô mỡ 3T3-L1 nhưng không có tác dụng độc lên sự sinh trưởng của tế bào. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển một sản phẩm ứng dụng trong điều trị bệnh béo phì.

**Từ khóa:** cột ly tâm YM, nọc rắn, *Ophiophagus hannah*, phân đoạn, tế bào mô mỡ 3T3-L1.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Các động vật có nọc độc, đặc biệt là rắn độc gần đây được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu nhiều bởi nọc của loài này chứa nhiều thành phần có khả năng tác động một cách đặc hiệu và hiệu quả đối với các cơ quan đích trên con mồi của chúng (Vivek *et al.*, 2013). Nghiên cứu cho thấy, thành phần trong nọc rắn bao gồm các peptide, protein, lipid, hydrate cacbon và các ion kim loại. Các phân tử peptide và protein này có sự khác biệt lớn về kích thước. Chính điều này làm cho việc phân tách chúng trở nên phức tạp (Aziz *et al.*, 2015). Nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để phân tách nọc rắn trong đó có thể kể đến đó là phương pháp điện di 2 chiều trên gel polyacrylamide (Serrano *et al.*, 2005), phương pháp sắc kí lỏng cao áp-HPLC, phương pháp lọc gel (Vaiyapuri *et al.*, 2010), phương pháp sắc kí trao đổi ion (Chellapandi, Jebakumar, 2008). Một số nhóm nghiên cứu nghiên cứu còn kết hợp các

phương pháp khác nhau như Du *et al.* (2002) đã sử dụng ba phương pháp bao gồm lọc gel, sắc kí trao đổi ion và HPLC để tách Ophioluxin từ nọc rắn hổ mang chúa *Ophiophagus hannah*, một protein hoạt hóa tiểu cầu. Bên cạnh những phương pháp nêu trên, các cột ly tâm chứa màng với kích thước khác nhau đã giúp quá trình phân tách các phân đoạn trong nọc rắn trở nên thuận lợi hơn. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cột ly tâm để phân tách các phân đoạn protein trong nọc rắn *O. hannah* thu nhận từ trại rắn Đồng Tâm (Tiền Giang).

Công bố của Petras *et al.* (2015) cho thấy có đến 14 họ protein khác nhau gồm khoảng 32 đến 35 protein trong nọc của *O. hannah* với những hoạt tính sinh học khác nhau. Trong số chúng, nọc độc hướng thần kinh (neurotoxin) là thành phần chiếm đa số (Lei *et al.*, 2011). Những neurotoxin này có thể có tác dụng làm tăng sự dẫn thuốc nhờ việc tương tác với thụ thể của chất truyền dẫn thần kinh nicotin acetylcholine (Zhan *et al.*, 2010) và ức chế sự co cơ

được gây ra bởi carbachol (Chang *et al.*, 2002). PLA2 phân lập từ nọc của loài rắn này có tác dụng làm giảm nhịp tim ở chuột và ức chế sự gắn kết của tiểu cầu (Huang *et al.*, 1993; 1997). Bên cạnh đó, một enzyme bền nhiệt L-amino acid oxidase (OH-LAAO) cũng đã được phân lập. Đây là enzyme có khả năng ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư vú và ung thư phổi mà không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tế bào bình thường xung quanh khối u (Fung *et al.*, 2015). Ngoài ra, OH-LAAO còn có khả năng ức chế sự sinh trưởng của một số loại vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus* và *S. epidermidis* (Lee *et al.*, 2010). Như vậy có thể thấy, cũng giống như nhiều loại nọc đã được nghiên cứu, nọc rắn *O. hannah* là một nguồn nguyên liệu phong phú của các hợp chất với những đặc điểm sinh học khác nhau. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành xác định ảnh hưởng của protein trong phân đoạn 1, tách từ nọc rắn *O. hannah* lên sự sinh trưởng và biệt hóa của tế bào mô mỡ 3T3-L1.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên tắc chọn rắn để thu nọc

Rắn *O. hannah* được chọn để lấy nọc là những con từ 1 năm tuổi trở lên với trọng lượng cơ thể trên 2 kg, không ở trong thời kì mang thai hoặc lột xác. Trước khi lấy nọc, rắn phải được nhịn ăn một tháng.

### Phương pháp thu nhận nọc rắn

Miệng rắn được lau sạch sau đó chủ động cho rắn cắn vào cốc thủy tinh với miệng được bịt bằng cao su đã được vô trùng. Khi rắn đã cắn chặt vào miệng ly, dùng ngón cái và ngón trỏ của tay phải vừa day vừa bóp nhẹ lên tuyến nọc ở 2 góc hàm, nọc sẽ từ từ chảy ra ly qua 2 răng độc. Phương pháp này sau khi lấy nọc, rắn trở lại ăn uống bình thường hơn, do răng không va chạm với vật cứng, nên không bị tổn thương. Nọc rắn sau khi lấy xong được ly tâm ở 4°C với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, phần dịch trong ở phía trên được thu lại và đông khô bằng máy hút chân không.

### Thao tác chuẩn bị và tách chiết các phân đoạn protein từ nọc rắn *O. hannah*

Nọc rắn được hòa vào dung dịch PBS với nồng độ 0,1 mg/ml. Sau khi ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút (v/p) để loại bỏ cặn, phần dịch trong phía trên được chuyển lên cột YM100 để tách các protein có kích thước lớn hơn hoặc bằng 100 kDa ra khỏi

hỗn hợp. Hỗn hợp này sau đó lại tiếp tục được chuyển lên cột YM50 để tách các protein có kích thước lớn hơn hoặc bằng 50 kDa ra khỏi hỗn hợp. Thao tác tương tự được lặp lại với YM30, YM10 và YM3 để tách các phân đoạn có kích thước lớn hơn hoặc bằng 30 kDa, 10 kDa, 3 kDa và nhỏ hơn 3 kDa. Sản phẩm thu được sau đó được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12%.

### Nuôi cấy tế bào

Tế bào mô mỡ 3T3-L1 được nuôi cấy trong 2 ngày ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trên đĩa 12 giếng với mật độ là 60.000 tế bào/2 mL/giếng. Môi trường DMEM sử dụng để nuôi cấy được bổ sung 10% fetal bovine serum (FBS). Sau 2 ngày nuôi cấy, môi trường DMEM mới chứa hỗn hợp có tác dụng kích thích sự biệt hóa tế bào bao gồm 10% FBS, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (5 mmol/L), dexamethasone (1 mmol/L) và insulin (5 mmol/L) được thay thế và tế bào được nuôi trong 2 ngày. Sau đó, môi trường DMEM mới chứa 10% FBS và 5 mmol/L insulin được thay thế và tế bào được nuôi tiếp trong 2 ngày. Sau đó môi trường DMEM mới chứa 10% FBS được thay thế. Trong quá trình gây biệt hóa tế bào, phân đoạn 3 kDa-10 kDa được bổ sung tới nồng độ cuối cùng là 1 µg/mL và 10 µg/mL (Katja *et al.*, 2012). Sau 8 ngày nuôi cấy, sự thay đổi về hình thái tế bào được chụp bằng kính hiển vi điện tử. Ảnh hưởng của phân đoạn 1 lên sự sinh trưởng của tế bào mô mỡ 3T3-L1 được xác định bằng việc sử dụng trypan blue để nhuộm tế bào và đếm dưới kính hiển vi.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Thu nhận và phân tách các phân đoạn protein và peptide từ nọc *O. hannah*

Rắn độc là một trong những đối tượng hấp dẫn các nhà nghiên cứu bởi tiềm năng ứng dụng trong khoa học của chúng (Lewis, Garcia 2003; Vivek *et al.*, 2013). Để thu nhận được nọc rắn, việc lựa chọn đối tượng, thời điểm phù hợp như đã nêu trên là cần thiết. Trong nghiên cứu này, nọc rắn *O. hannah* đã được thu nhận thành công. Nọc rắn sau khi đông khô (Hình 1) có màu vàng, dạng tinh thể nhỏ, không mùi.

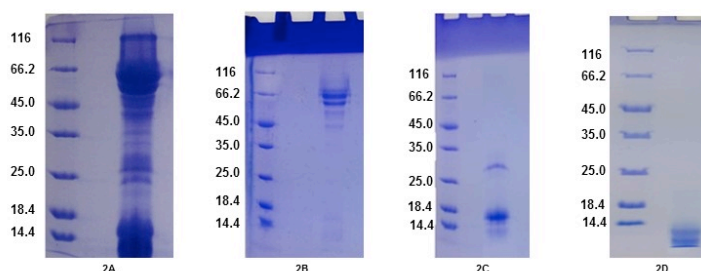
Nghiên cứu cho thấy nọc rắn *O. hannah* có thể chứa đến 14 họ protein với khoảng 32 đến 35 protein khác nhau (Petras *et al.*, 2015). Ngoài ra những thành phần lipid, hydrate cacbon và các ion kim loại cũng được ghi nhận (Aziz *et al.*, 2015). Nọc sau đó được hòa tan trong PBS, sau đó ly tâm để loại bỏ những thành phần không tan ra khỏi hỗn hợp, pha loãng và điện di trên gel polyacrylamide 12%. Kết

qua điện di trên hình 2 cho thấy, tương tự như một số công bố trước đó về tính đa dạng trong thành phần nọc rắn *O. hannah* (Petras *et al.*, 2015), nọc rắn *O.*

*hannah* thu nhận tại trại rắn Đồng Tâm (Tiền Giang) cũng chứa nhiều thành phần với khối lượng phân tử khác nhau (Hình 2A).



Hình 1. Nọc rắn *Ophiophagus hannah* ở dạng tinh thể nhỏ sau khi được đông khô.



Hình 2. Ảnh điện di nọc rắn *O. hannah* (2A) và các phân đoạn 4 (2B), 2 (2C), 1 (2D) với protein chuẩn (kDa) trên gel polyacrylamide 12%.

Nọc rắn *O. hannah* với nồng độ 1mg/mL được lên cột YM100 là loại cột chứa màng lọc mà khi ly tâm nó sẽ giữ lại các phân tử có kích thước  $\geq 100$  kDa và cho các phân tử có kích thước  $< 100$  kDa đi qua (dung dịch nằm phía dưới màng). Dung dịch này tiếp tục được đưa lên cột YM50 để giữ lại các phân tử có kích thước  $\geq 50$  kDa và cho đi qua những phân tử nhỏ hơn 50 kDa (phía dưới màng). Thao tác được lần lượt áp dụng đối với các cột YM30, YM10 và YM3. Các phân đoạn protein nằm trong khoảng 50 đến 100 kDa (Hình 2B), 10 đến 30 kDa (Hình 2C) và 3 đến 10 kDa (Hình 2D) đã được thu nhận. Kết quả điện di trên hình 2A cho thấy nọc rắn ban đầu chứa nhiều phân tử với các kích thước khác nhau, trong đó

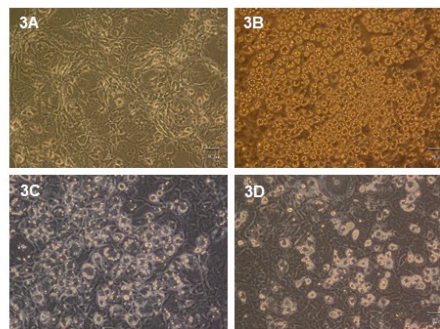
có vẻ như các phân tử protein kích thước khoảng 50 đến 100 kDa chiếm đa số. Phân đoạn protein nằm trong khoảng 50 kDa đến 100 kDa này đã được phân tách nhờ việc sử dụng cột YM100 và YM50. Tuy nhiên, một tỷ lệ nhỏ của các protein phân tử không nằm trong khoảng này vẫn thấy xuất hiện trong mẫu (Hình 2B). Về mặt cơ học, trong quá trình ly tâm, những phân tử có khối lượng lớn sẽ chìm xuống đáy nhanh nhất. Đặc biệt những phân tử có kích thước lớn hơn kích thước màng sẽ là nguyên nhân gây tắc màng. Kết quả làm cho các phân tử nhỏ hơn kích thước màng bị giữ lại phía trên. Vì vậy, khi sử dụng cột ly tâm, việc pha loãng nồng độ mẫu đồng nghĩa với việc kéo dài thời gian ly tâm sẽ tạo điều kiện để

các phân tử nhỏ có thời gian đi qua màng. Áp dụng việc pha loãng đối với phân đoạn nhỏ hơn 50 kDa, sử dụng cột YM30 và YM10, kết quả trên hình ảnh điện di 2C cho thấy, phân đoạn nằm trong khoảng 10 đến 30 kDa xuất hiện với một tỉ lệ cao. Tương tự như vậy, phân đoạn nằm trong khoảng 3 đến 10 kDa cũng đã được thu nhận (Hình 2D). Như đã trình bày trong phần tổng quan, sự đa dạng về kích thước của các phân tử trong nọc rắn đã làm cho việc tách chiết trở nên phức tạp. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự kết hợp của các kĩ thuật khác nhau đã mang lại hiệu quả cho việc phân tách các thành phần của nọc rắn (Serrano *et al.*, 2005; Vaiyapuri *et al.*, 2010; Chellapandi, Jebakumar, 2008; Du *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2002). Để đạt được hiệu quả phân tách cao các thành phần trong nọc rắn *O. hannah*, đặc biệt là các thành phần chiếm tỉ lệ thấp, chúng tôi nhận thấy cần phải có sự kết hợp giữa phương pháp ly tâm và phương pháp khác như lọc gel hoặc HPLC.

**Ảnh hưởng của phân đoạn 1 của nọc rắn *O. hannah* lên sự biệt hóa của tế bào mô mỡ 3T3-L1**

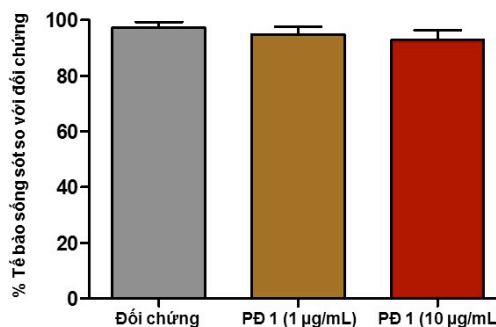
Như chúng ta đã biết, nọc rắn là một trong những đối tượng tiềm năng của y học. Một số thành phần trong nọc rắn đã được nghiên cứu chế tạo thuốc điều trị bệnh cho con người (Camargo *et al.*, 2012). Thêm vào đó, nghiên cứu khác cho thấy PLA2 của nọc rắn có thể kiểm soát bệnh béo phì, một quá trình tăng lên về số lượng và kích thước của tế bào mô mỡ (được gọi là quá trình biệt hóa tế bào), do vậy phân đoạn 1 đã được thử nghiệm lên sự biệt hóa của tế bào mô mỡ 3T3-L1. Sau 8 ngày nuôi cấy, kết quả quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi (Hình 3) cho thấy lộ đối chứng là tế bào mô mỡ được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh bê, là loại huyết thanh chứa ít nhân tố sinh trưởng nên không kích thích tế bào mô mỡ 3T3-L1 biệt hóa. Trên hình 3B, khi được tiếp xúc lần lượt với môi trường DMEM chứa hỗn hợp các nhân tố có tác dụng kích thích sự biệt hóa ở giai đoạn đầu (preadipogenesis), bao gồm IMBX, desamethasone, insulin và FBS và sau đó tiếp đến là insulin, FBS (adipogenesis) và cuối cùng là FBS. Sau quá trình biệt hóa, các hạt mỡ đã xuất hiện ở hầu hết các tế bào này.

Tuy nhiên, khi bổ sung 1 µg/mL protein trong phân đoạn 1 của nọc rắn, số lượng tế bào tích mỡ giảm đi so với đối chứng (Hình 3C). Ở nồng độ 10 µg/mL, số lượng tế bào tích mỡ đã giảm đi rõ rệt (Hình 3D). Như vậy có thể thấy, hoạt tính ức chế sự tích lũy mỡ ở tế bào mô mỡ 3T3-L1 của protein phân đoạn 1 phụ thuộc vào nồng độ.



**Hình 3.** Tế bào mô mỡ 3T3-L1 (3A) được biệt hóa (3B) khi có mặt của protein phân đoạn 1 của nọc rắn *O. hannah* với nồng độ 1 µg/mL (3C) và 10 µg/mL (3D).

Nọc rắn được biết đến với khả năng gây độc cao đối với nhiều loại tế bào. Do vậy tác động của phân đoạn này lên sự sinh trưởng của tế bào mô mỡ 3T3-L1 đã được kiểm tra. Theo kinh nghiệm cho thấy, nếu sở hữu hoạt tính thì ở nồng độ khoảng 10<sup>-6</sup>M, peptide sẽ thể hiện hoạt tính của chúng. Phân đoạn 1 bao gồm các phân tử có kích thước nằm trong khoảng 3 kDa đến 10 kDa, nồng độ 10<sup>-6</sup>M sẽ tương đương với khoảng 3 µg/mL đến 10 µg/mL. Tuy nhiên trong thử nghiệm đầu tiên này, 2 nồng độ là 1 µg/mL và 10 µg/mL đã được lựa chọn để đáp ứng được sự khác biệt rõ rệt (nếu có) về kết quả. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở 2 nồng độ được thử nghiệm, 1 µg/mL và 10 µg/mL, phân đoạn 1 này không ảnh hưởng lên sự sinh trưởng của tế bào (Hình 4).



**Hình 4.** Ảnh hưởng của phân đoạn 1 (PD1) lên sinh trưởng của tế bào mô mỡ 3T3-L1.

Tính cho đến thời điểm này, những nghiên cứu về rắn *O. hannah* cho thấy đây là một loài rắn độc có kích thước lớn nhất trên thế giới. Nọc của loài rắn này có thể chứa đến hơn 30 loại protein khác nhau.

Một số trong số chúng đã được nghiên cứu về cấu trúc (Roy *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1998), và chức năng (Fung *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2002). Mặc dù các công bố cho thấy, nọc rắn sở hữu nhiều hoạt tính có ích đối với nghiên cứu y dược tuy nhiên khả năng ức chế sự biệt hóa tế bào, cụ thể là sự tích mỡ ở tế bào mô mỡ 3T3-L1 của phân đoạn I trong nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của nọc rắn *O. hannah* lên tế bào mô mỡ 3T3-L1. Kết quả này sẽ góp phần làm tăng tính phong phú về hoạt tính sinh học của nguồn nguyên liệu này. Mặc dù vậy, đây chỉ là kết quả thử nghiệm ban đầu của cả một phân đoạn. Việc phân tách và xác định cụ thể thành phần mang lại hoạt tính nêu trên cũng như cơ chế tác động của nó đối với sự tích mỡ của tế bào mô mỡ 3T3-L1 là rất cần thiết và đang được chúng tôi nghiên cứu tiếp.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tách chiết các peptide từ nọc rắn Việt Nam *Ophiophagus hannah* có tác dụng lên sự giải phóng insulin từ tế bào beta”. Công trình được thực hiện tại phòng Vi sinh vật học phân tử và có sử dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện nghiên cứu lương thực Quốc gia-Nhật Bản.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aziz TM, Bourgoïn-Voillard S, Combemale S, Beroud R, Fadl M, Seve M, De Waard M (2015) Fractionation and proteomic analysis of the *Walterinnesia aegyptia* snake venom using OFFGEL and MALDI-TOF-MS techniques. *Electrophoresis* 36(20): 2594-2605.
- Camargo AC, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SM (2012) Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon* 59(4): 516-523.
- Chang LS, Liou JC, Lin SR, Huang HB (2002) Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Biochem Biophys Res Commun* 294(3): 574-578.
- Chellapandi P, Jebakumar SRD (2008) Purification and antibacterial activity of Indian Cobra and Viper venoms. *eJBio* 4(1): 11-16.
- Du XY, Clemetson JM, Navdaev A, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ (2002) Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *J Biol Chem* 277(38): 35124-35132.
- Fung SY, Lee ML, Tan NH (2015) Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom l-amino acid oxidase. *Toxicon* 96: 38-45.
- Huang MZ, Gopalakrishnakone P, Kini RM (1997) Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* snake venom. *Life Sci* 61(22): 2211-2217.
- Huang MZ, Wang QC, Liu GF (1993) Effects of an acidic phospholipase A2 purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon* 31(5): 627-635.
- Katja ZVV, Martin W, Matthias B (2012) Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 425(1): 88-90.
- Lee ML, Fung SY, Chung I, Pailoor J, Cheah SH, Tan NH (2014) King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. *Int J Med Sci* 11(6): 593-601.
- Lee ML, Tan NH, Fung SY, Sekaran SD (2011) Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153(2): 237-242.
- Lei W, Zhang Y, Yu G, Jiang P, He Y, Lee W, Zhang Y (2011) Cloning and sequence analysis of an *Ophiophagus hannah* cDNA encoding a precursor of two natriuretic peptide domains. *Toxicon* 57(5): 811-816.
- Liu WD, Pei FK, Liu AZ, Pang YX (1998) Three dimensional solution structure of neurotoxin CM-11 from the *Ophiophagus hannah*. *Shanghai* 30(3): 257-262.
- Petras D, Heiss P, Süssmuth RD, Calvete JJ (2015) Venom proteomics of Indonesian king cobra, *Ophiophagus hannah*: integrating top-down and bottom-up approaches. *J Proteome Res* 14(6): 2539-2556.
- Lewis RJ, Garcia ML (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2: 790-802.
- Roy A, Zhou X, Chong MZ, D'hoedt D, Foo CS, Rajagopalan N, Nirthanan S, Bertrand D, Sivaraman J, Kini RM (2010) Structural and functional characterization of a novel homodimeric three-finger neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *J Biol Chem* 285(11): 8302-8315.
- Serrano SMT, Shannon JD, Wang D, Camargo ACM, and Fox JW (2005) A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5(2): 501-510.

Vaiyapuri S, Harrison RA, Bicknell AB, Gibbins JM, Hutchinson G (2010) Purification and functional characterisation of rhinocerase, a novel serine protease from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS One* 5(3): 1-10.

Vejayan J, Khoon TL, Ibrahim H (2014) Comparative analysis of the venom proteome of four important Malaysian snake species. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 4; 20(1):6.

Vivek KV, Keyur B, Hardik B, and Utsav P (2013)

Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(2): 156-162.

Xu S, Gu L, Wang Q, Shu Y, Song S, Lin Z (2003) Structure of a king cobra phospholipase A2 determined from a hemihedrally twinned crystal. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 1574-1581.

Zhan C, Yan Z, Xie C, Lu W (2010) Loop 2 of *Ophiophagus hannah* toxin b binds with neuronal nicotinic acetylcholine receptors and enhances intracranial drug delivery. *Mol Pharm* 7(6): 1940-1947.

## FRACTIONATION OF PROTEINS FROM THE VENOM OF SNAKE *OPHIOPHAGUS HANNAH* IN VIETNAM AND THEIR EFFECTS ON ADIPOGENESIS IN 3T3-L1 CELLS

Nguyen Thi Tuyet Nhung<sup>✉</sup>, Vu Thi Hien, Pham Thi Hoa, Ha Thi Thu, Nguyen Thi Hoa, Mai Thuy Linh, Nguyen Hai Trieu, Pham Thi Lanh, Dinh Duy Khang, Dong Van Quyen

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

### SUMMARY

Snake venom is a mixture of different components with a great variety of biological effects. Some components in snake venom have been found to act specifically and potently on their targets. Unlike the venom of *Naja naja*, *Echis carinatus*, *Vipera russellii* which are widely used, there is little attention has been given to *Ophiophagus hannah* even this is the largest venomous snake in the world. In this study, using *O. hannah* venom collected at Dong Tam Snake Farm in Tien Giang Province, we have collected 4 protein fractions using membrane cut-off centrifugal filters, ie., YM100, YM50, YM 30, YM10 and YM3. Of the 4 fractions including (1) proteins from 3 kDa to smaller than 10 kDa, (2) proteins from 10 kDa to smaller than 30 kDa, (3) proteins from 30 kDa to smaller than 50 kDa and (4) proteins from 50 kDa to smaller 100 kDa, fraction 4 accounted for the highest proportion whereas fraction 3 is the lowest proportion. Following the demonstration of many medicinal uses of snake venom, potential effect of fraction 1 on obesity was examined. Although multiple molecular processes are involved in the progression of the disease, obesity can accompany increase in adipocyte size as a consequence of accumulation of lipid droplets within the fat cell, as well as increased number of adipocytes resulting from differentiation of precursor cells. In our study, two different concentrations of 1 µg/mL and 10 µg/mL proteins in fraction 1 were investigated for effectiveness on the 3T3-L1 cells differentiation and adipogenesis. The obtained results showed that, at the concentration of 10 µg/mL, this fraction inhibited the adipogenesis which have been shown by accumulation of lipid droplets within the 3T3-L1 cells. Besides, at a concentration of 10 µg/mL, fraction 1 had no cytotoxic effect on cell viability of 3T3-L1 cells.

**Keywords:** 3T3-L1 cell line, membrane cut-off centrifugal filters YM, snake venom, *Ophiophagus hannah*.

---

<sup>✉</sup> Author for correspondence: E-mail: [nttnhung@gmail.com](mailto:nttnhung@gmail.com)