

## TÁCH VÀ BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CÁC TOXIN NGẮN CỦA NỌC BÒ CẠP *HETEROMETRUS LAOTICUS*

Hoàng Ngọc Anh<sup>1</sup>, Võ Đỗ Minh Hoàng<sup>1</sup>, Nikitin Ilya<sup>2</sup>, Utkin Yuri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Sinh Hoá hữu cơ, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga

Đến Tòa soạn 10-8-2010

### Abstract

The scorpion *Heterometrus laoticus* is wide distributed in the South-West Vietnam. The venom of this scorpion has an analgesic and anti-inflammatory activities. The crude venom of *H. laoticus* was separated into five fractions by column chromatography on Sephadex G-50. These fractions have different chemical and biological properties, one them (fraction 4) being toxic to mice, the other (fraction 5) - to crickets. Two of the fractions (fraction 2 and 5) affect the process of blood coagulation, while the crude venom has no such effect. Several polypeptides with molecular masses in the range from 2000 to 4000 Da were isolated from fraction 5 by combination of gel-filtration on Superdex HR75 column and RP-HPLC. By molecular masses these polypeptides can be assigned to the family of short scorpion toxins. Mass-spectrometry analysis showed that one *H. laoticus* toxin possesses the molecular mass of 3698.8 Da, which is similar to that of potassium channel toxin alpha-KTx 6.13 (3701 Da) isolated from Malaysian black scorpion *H. spinifer*. The structure and biological activity of the isolated toxins is under study.

### 1. MỞ ĐẦU

Nọc độc của các động vật là nguồn giàu các chất có hoạt tính sinh học. Các peptide trong nọc bò cạp có tác dụng lên các kênh ion khác nhau [1]. Các toxin nọc bò cạp tác dụng lên các kênh kali là chuỗi polypeptide chứa từ 31 đến 39 gốc axit amin và được ổn định bằng 3 hoặc 4 cầu disulfit. Các toxin này liên kết với bề mặt ngoài tế bào của kênh và cản trở sự đi qua của ion  $K^+$ . Từ cuối những năm 90 của thế kỷ trước, các nhà hoá sinh rất quan tâm đến những toxin tác dụng lên các kênh  $K^+$  [2]. Các toxin này được sử dụng để tách các kênh  $K^+$  để nghiên cứu cấu trúc và chức năng chúng. Kênh  $K^+$  là các protein màng tế bào, chúng có mặt trong các tế bào bị kích thích và không bị kích thích. Những kênh này đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình khác nhau của tế bào như: sự kích thích của tế bào, sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh, sự tiết ra hormone, sự điều chỉnh thể tích của tế bào.... Ngày nay người ta tìm thấy sự liên hệ mật thiết giữa sự hoạt động bất thường của các kênh  $K^+$  với một số bệnh thần kinh. Đó là một số bệnh liên quan đến sự biến đổi gel của kênh  $K^+$  còn một số bệnh khác liên quan đến sự sản xuất ra tự kháng thể của kênh  $K^+$ . Như vậy nghiên cứu các toxin tác dụng lên các kênh  $K^+$  cho phép thử nghiệm sản xuất một số loại thuốc mới trong y dược để điều trị các bệnh thần kinh như Ashmer, Parkinson ....

Tiếp theo những nghiên cứu về thành phần và được tính của nọc bò cạp *H. laoticus* [3] trong bài

báo này chúng tôi trình bày một số nghiên cứu bước đầu về các toxin ngắn (với khối lượng phân tử 2000 – 4000 Da) tách từ nọc bò cạp *H. laoticus*.

### 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Nguyên liệu

Nọc thu từ bò cạp *H. laoticus* được bắt ở vùng An Giang và nuôi trong phòng thí nghiệm của Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng. Thức ăn của bò cạp là châu chấu và dế. Kích thích bằng xung điện tại đốt thứ 5 hoặc đốt thứ 6 của đuôi bò cạp để thu nọc. Nọc được làm khô trong bình hút ẩm có chứa  $CaCl_2$  khan cho đến khi có khối lượng không đổi, và sau đó giữ ở nhiệt độ  $-20^\circ C$  cho đến khi dùng.

#### 2.2. Các phương pháp tách và khảo sát các hoạt chất của nọc bò cạp *H. laoticus*

##### 2.2.1. Tách các phân đoạn của nọc bò cạp

Các phân đoạn có hoạt tính khác nhau được tách ra từ nọc bò cạp bằng phương pháp lọc gel trên máy FPLC (Bio-Rad, Mỹ) ở nhiệt độ phòng trên các cột với:

1) Sephadex G-50 (1,5 x 100 cm). Cột đã được cân bằng trước trong đệm ammonium axetat 20 mM (pH 4,7). Lượng nọc chạy mỗi lần 200 mg, tốc độ rửa cột 0,16 ml/phút.

2) Superdex HK 75 (1 × 30 cm). Cột đã được cân bằng trước trong đệm axetat amonium 10 mM (pH 6,2). Lượng nọc chạy mỗi lần 15 mg, tốc độ rửa cột 1 ml/phút.

Các phân đoạn peptide tiếp tục tách bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (RP-HPLC) với cột phân tích Jupiter C18 (4 × 250 mm, 5 $\mu$ m), tốc độ rửa cột 1ml/phút. Cột sắc ký được rửa bằng gradient tuyến tính của các dung dịch sau: A là 0,1% TFA trong nước và B là 0,1% TFA trong axetonitril. Thời gian rửa cột từ 5% B đến 35% B trong 100 phút.

Sự có mặt của protein trong các phân đoạn sắc ký được xác định theo mật độ quang tại bước sóng 280 nm.

### 2.2.2. Khảo sát tính chất các phân đoạn tách ra

Độc tính lên động vật của các phân đoạn tách ra được thử lên chuột nhắt trắng (18-20 g) DDY cả hai giống bằng cách tiêm ven. Lượng protein tiêm vào một chuột là khoảng 0,2 mg. Tác dụng của các phân đoạn được quan sát trong 24 giờ.

Độc tính lên côn trùng của các phân đoạn tách ra được thử lên dế *G. assimilis* (0,3 - 0,9 g) [4]. Dung dịch protein từ 1 đến 6  $\mu$ l được tiêm vào phần bên của bụng dế. Nồng độ của mỗi phân đoạn được sử dụng là 1,5 hay 10  $\mu$ g/ $\mu$ l. Đã sử dụng các liều tiêm: 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30 và 50  $\mu$ g/gdế để khảo sát. Ở mẫu đối chứng, dế được tiêm nước cất. Tác dụng

của các phân đoạn được quan sát trong 24 giờ.

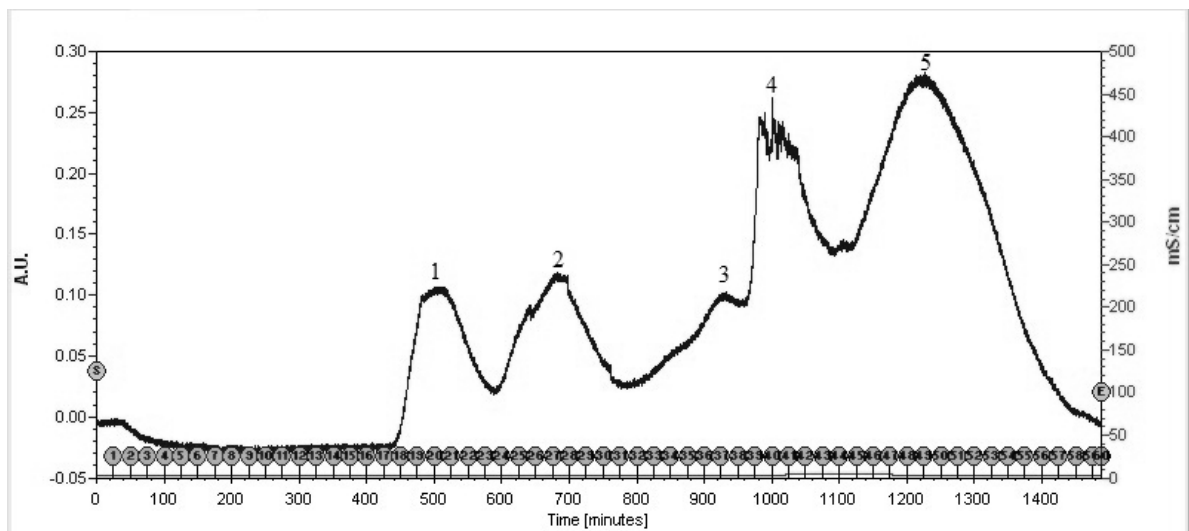
Hoạt tính chống đông máu của các phân đoạn tách ra được xác định trong các xét nghiệm sau: 1) Xét nghiệm thrombin - sử dụng để xác định tốc độ chuyển hoá phân tử fibrinogen thành sợi fibrin trong huyết tương. 2) Fibrinogenoliz - sử dụng để xác định tốc độ chuyển hoá tức thời của fibnogen thành fibrin. 3) APTT (thời gian hoạt hoá sự đông máu cục bộ) - sử dụng để xác định thời gian đông máu cục bộ, sự kiểm soát quá trình đông máu bên trong. 4) Xét nghiệm Prothrombin- sử dụng để xác định thời gian prothrombin, đánh giá sự bất thường của chức năng đông máu theo con đường ngoại sinh. Trong tất cả xét nghiệm, thời gian được tính khi máu đông hoàn toàn và mẫu đối chứng là nước cất.

Khối lượng phân tử của các peptid được xác định trên máy khối phổ MALDI MS (Bruker Daltonik, Đức).

## 2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 2.1. Tách các phân đoạn của nọc bò cạp *H. laoticus* trên gel Sephadex G 50 và khảo sát tính chất của chúng

Sử dụng cột với gel Sephadex G50 để phân tích nọc bò cạp *H. laoticus* cho thấy nọc thô tách ra làm 5 phân đoạn với khối lượng phân tử khác nhau (hình 1). Khảo sát tính chất của các phân đoạn tách ra cho thấy chúng rất khác nhau.



Hình 1: Phân tích nọc bò cạp *H. laoticus* trên cột với Sephadex G 50

Thử độc tính của năm phân đoạn tách ra lên động vật, cụ thể là lên chuột, cho thấy có một phân đoạn có độc tính đó là phân đoạn 4. Sau khi tiêm phân đoạn 4, chuột bị liệt và chết sau 1 giờ 40 phút. Trong khi đó các phân đoạn khác không có độc tính lên chuột. Tiếp theo chúng tôi đã khảo sát độc tính của các phân đoạn tách ra lên côn trùng cụ thể là lên

dế. Kết quả cho thấy phân đoạn 5 có tác dụng độc với dế, trong khi đó phân đoạn 4 không độc với dế ngay cả liều đến 10  $\mu$ g/gdế. Qua khảo sát cho thấy phân đoạn 5 chứa các peptid nằm trong vùng 2000 – 4000 Da. Như vậy khác với nọc bò cạp *H. laoticus* phân bố ở Thái lan, nọc bò cạp *H. laoticus* Việt Nam chứa các toxin độc với côn

trùng nằm trong vùng có khối lượng phân tử nhỏ. Các toxin này có khối lượng phân tử nằm trong vùng 2000 - 4000 Da, trong khi đó toxin HS-1 độc với côn trùng tách từ nọc bò cạp Thái Lan có khối lượng phân tử 8293,496 Da [5]. Nghiên cứu này cho thấy thành phần, tính chất của nọc bò cạp không chỉ phụ thuộc vào giống mà còn phụ thuộc vào vùng phân bố

của chúng, điều này đã được quan sát trong nọc rắn [6].

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tác dụng của các phân đoạn tách ra lên quá trình đông máu với bốn xét nghiệm khác nhau. Kết quả các xét nghiệm này được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Tác dụng của các phân đoạn lên quá trình đông máu với nồng độ 10 mg/ml

Phân đoạn (thời gian máu đông)	1, sec	2, sec	3, sec	4, sec	5, sec
	Các xét nghiệm (thời gian máu đông ở mẫu đối chứng)				
Xét nghiệm thrombin ( 10,2 giây)	10,6	11,6	*	9,0	8,8
Fibrinogenoliz (12,6 giây)	8,9	11,5	*	7,7	8,9
APTT (thời gian hoạt hoá sự đông máu cục bộ) (8,4 giây)	6,1	5,8	*	**	215,1
Xét nghiệm Prothrombin (17,5 giây)	17,8	**	*	17,9	15,1

\*: máu đông rất nhanh; \*\*: máu không đông trong thời gian quan sát (hơn 30 phút).

Qua các xét nghiệm (bảng 1) cho thấy, trong xét nghiệm Prothrombin phân đoạn 2 gây ra sự không đông máu trong thời gian quan sát (hơn 30 giây) do tác dụng lên Prothrombin. Cũng tương tự như vậy phân đoạn 4 và 5 gây ra quá trình chậm đông máu trong xét nghiệm APTT do tăng thời gian đông máu

cục bộ. Để xác định chính xác tác dụng của phân đoạn 2 trong xét nghiệm Prothrombin và tác dụng của các phân đoạn 4 và 5 trong xét nghiệm APTT, chúng tôi đã pha loãng các phân đoạn này ra gấp đôi và tiến hành lại hai xét nghiệm trên. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Tác dụng của các phân đoạn lên quá trình đông máu với nồng độ 5 mg/ml

Phân đoạn (thời gian máu đông)	2, sec	4, sec	5, sec
	Các xét nghiệm (thời gian máu đông ở mẫu đối chứng)		
APTT (thời gian hoạt hoá sự đông máu cục bộ) (11,2 giây)	*	16,8	117,8
Xét nghiệm Prothrombin (15,2 giây)	33,6	*	*

\* Các phân đoạn không làm xét nghiệm.

Trong xét nghiệm Prothrombin phân đoạn 2 kéo dài thời gian đông máu hơn gấp đôi so với mẫu đối chứng (xem bảng 2). Ở xét nghiệm APTT phân đoạn 4 kéo dài một ít thời gian đông máu, trong khi đó phân đoạn 5 làm tăng thời gian đông máu hơn 10 lần so với mẫu đối chứng (xem bảng 2). Những nghiên cứu này cho thấy trong nọc bò cạp có hai nhóm toxin gây tác dụng chậm đông máu với hai cơ chế khác nhau.

Khác với tác dụng của các phân đoạn 2, 4 và 5 lên quá trình đông máu, nọc bò cạp thô với nồng độ 8,3 mg/ml không có tác dụng lên quá trình đông máu ở bốn xét nghiệm trên. Những khảo sát này cho thấy

trong nọc bò cạp thô các thành phần tương tác với nhau và ức chế một số tính chất của nhau.

### 3.2. Tách các toxin trong phân đoạn 5 bằng phương pháp sắc ký FPLC trên cột với Superdex HR 75 và HPLC với cột RP C18 và khảo sát tính chất của chúng

Để nghiên cứu các toxin tác dụng với côn trùng chúng tôi đã tiến hành sắc ký phân đoạn 5 trên cột lọc gel Superdex HR 75. Kết quả phân đoạn 5 tách ra làm 3 phân đoạn thứ cấp sau: 5.1, 5.2 và 5.3. Các phân đoạn này đông khô sau đó hoà tan 1/3 mỗi

phân đoạn trong 200 µl nước cất và khảo sát tác dụng của chúng trong xét nghiệm APTT.

### 3.2.1. Khảo sát tác dụng của các peptid trong các phân đoạn thứ cấp 5.1, 5.2 và 5.3 lên thời gian đông máu cục bộ (APTT)

Kết quả xét nghiệm APTT của các phân đoạn thứ cấp này được trình bày trong 2 bảng sau.

**Bảng 3:** Tác dụng của các phân đoạn thứ cấp trong xét nghiệm APTT

Thời gian máu đông ở mẫu đối chứng (giây)	18,2		
Các phân đoạn	5.1	5.2	5.3
Thời gian máu đông ở mẫu thử (giây)	*	18,1	182,0

\*máu không đông trong thời gian quan sát (hơn 30 phút).

**Bảng 4:** Tác dụng của các phân đoạn thứ cấp trong xét nghiệm APTT sau khi pha loãng ra 5 lần

Thời gian máu đông ở mẫu đối chứng (giây)	20,9		
Các phân đoạn	5.1	5.2	5.3
Thời gian máu đông ở mẫu thử (giây)	164,1	25,8	44,2

Qua những khảo sát này cho thấy các phân đoạn thứ cấp 5.1 và 5.3 có tác dụng kéo dài thời gian đông máu đáng kể so với mẫu đối chứng. Tiếp theo chúng tôi phân tích phân đoạn thứ cấp 5.3 bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp trên cột C18. Phân đoạn thứ cấp 5.3 tách ra làm 15 phân đoạn thứ cấp khác. Thử tác dụng của các phân đoạn thứ cấp mới tách ra lên quá trình đông máu ở xét nghiệm APTT cho thấy các phân đoạn thứ cấp 5.3.1 và 5.3.9 có tác dụng kéo dài thời gian đông máu đáng kể là 67,2 giây và 70,0 giây so với mẫu đối chứng là 15,2 giây. Đó là các phân đoạn chứa các toxin tác dụng lên quá trình đông máu. Từ các phân đoạn này chúng tôi sẽ tách, khảo sát các toxin và sẽ có các công bố tiếp theo.

### 3.2.2. Tách và khảo sát tính chất của peptid trong phân đoạn thứ cấp 5.2

Qua sắc ký lỏng cao áp trên cột C18, phân đoạn thứ cấp 5.2 tách ra 7 peptid (xem hình 2A) trong đó đã xác định khối lượng phân tử của một peptid 5.2.5 là 3698,8 Da (xem hình 2B). Peptid này có khối lượng phân tử gần giống với khối lượng phân tử của toxin alpha-KTx 6.13 được tách từ nọc bò cạp đen *H. spinifer* của Malaysia. Toxin này có khối lượng phân tử 3701 Da và tác dụng lên kênh kali [7]. Như vậy peptid 5.2.5 có thể là toxin nằm trong nhóm các

toxin ngăn tác dụng lên kênh  $K^+$ . Trong tài liệu cho thấy từ nọc bò cạp *H. spinifer* người ta đã tách ra một loạt các toxin ngăn, có tác dụng lên các kênh  $K^+$  [7]. Các peptid tách từ phân đoạn 5 của nọc bò cạp *H. laoticus* có khối lượng phân tử nằm trong vùng 2000 – 4000 Da, tương đương với khối lượng phân tử của các toxin tác dụng lên các kênh  $K^+$ .

Ngoài phân đoạn 5.2.5, chúng tôi còn tách một loạt peptid khác từ các phân đoạn thứ cấp 5.1 và 5.3. Trong những nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sẽ khảo sát tác dụng hoá sinh của các peptid đã tách ra.

Như vậy qua nghiên cứu sơ bộ chúng tôi nhận thấy trong phân đoạn 5 có hai loại toxin đó là các toxin tác dụng lên mạch máu và một số khác có khối lượng phân tử tương đương với khối lượng phân tử của các toxin tác dụng lên các kênh  $K^+$ . Chúng tôi sẽ khảo sát tính chất của các peptid này và công bố trong những nghiên cứu tiếp theo.

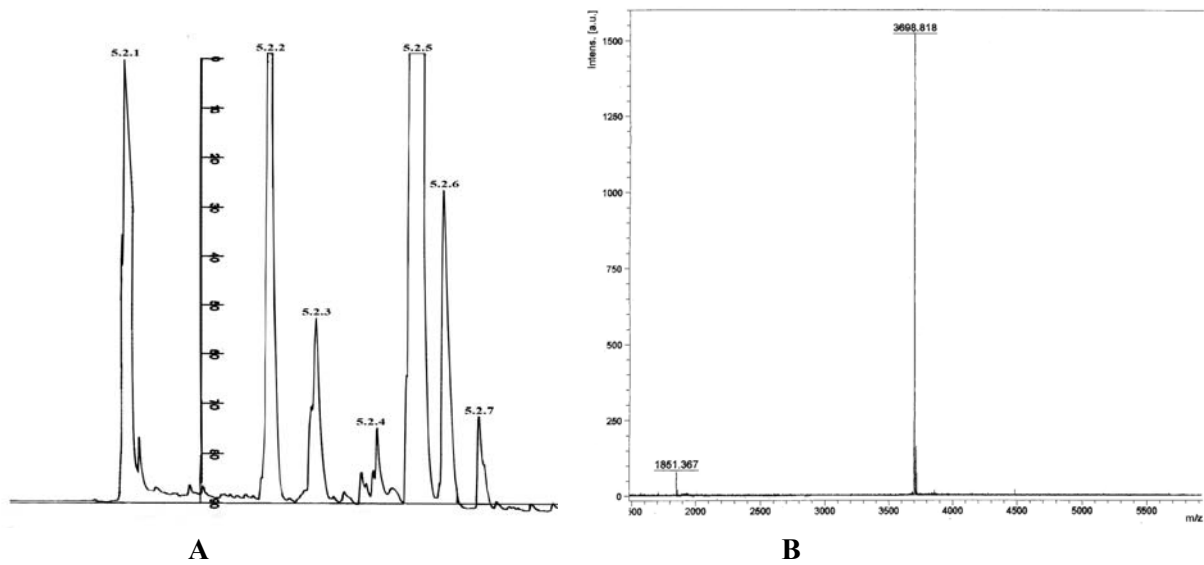
## 4. KẾT LUẬN

1. Nọc bò cạp *H. laoticus* được tách ra làm 5 phân đoạn bằng phương pháp sắc ký cột với Sephadex G50. Trong các phân đoạn đó có một phân đoạn có độc tính với động vật, phân đoạn khác có độc tính với côn trùng và trong đó có hai phân đoạn có tác dụng với quá trình đông máu.

2. Từ phân đoạn độc với côn trùng đã tách được peptid có khối lượng phân tử 3698,8 Da. Peptid này có khối lượng phân tử gần giống với khối lượng phân tử của toxin tác dụng với kênh kali là toxin alpha-KTx 6.13 là 3701 Da. Tính chất của các peptid tách ra sẽ được xác định trong những nghiên cứu tiếp theo.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. D. Possani, B. Becerril, M. Delepiere, J. Tytgat. Eur. J. Biochem., V. 264, 287 - 300 (1999).
2. M. L. Garcia, M. Hanner, H. G. Knaus, R. Koch, W. Schmalhofer, R. S. Slaughter, G. J. Kaczorowski. Adv. Pharmacol, Vol. 39, 425 - 471 (1997).
3. Hoàng Ngọc Anh, Phạm Nguyên Đông Yên, Nguyễn Thị Mai Hương, Võ phùng Nguyên. Tạp chí Hoá học, T. 47(2), Tr. 133-137 (2009).
4. V. G. Starkov, A. V. Osipov, Y. N. Utkin. Toxicon, V. 49, P. 995 - 1001 (2007).
5. N. Uawonggul, S. Thammasirirak, A. Chaveerach, T. Arkaravichien, W/ Bunyatratchata, W/ Ruangjirachuporn, P. Jearranaiprepame, T. Nakamura, M. Matsuda, M. Kobayashi, S. Hattori, S. Daduang. Toxicon, V. 49, 19 - 29 (2007).
6. T. H. Tsai, H. Y. Tsai, A. Saha, A. Gomes. FEBS Journal, V. 274, 512 - 525 (2007).
7. Y. Sugahara, S. Nirthanan, K. Kobayashi, T. Kohno, J. Tytgat, P. Gopalakrishnakone, K. Sato. The



*Hình 3:* Sắc ký và khối phổ của peptid 5.2.5  
(A) sắc ký lỏng cao áp của phân đoạn thứ cấp 5.2; (B) khối phổ của peptid 5.2.5

*Liên hệ:* **Hoàng Ngọc Anh**  
Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng  
Số 1 Mạc Đĩnh Chi  
Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh  
Email: hnanh@vast-hcm.ac.vn, Tel. 0945875569