

TÁCH VÀ BƯỚC ĐẦU PHÂN TÍCH TÍNH CHẤT CỦA CÁC NOROTOXIN TỪ NỌC CỦA LOÀI BÒ CẠP *BUTHUS* sp.

HOÀNG NGỌC ANH

Viện Hóa học

PISKOREV V.E., BEREZIN B.B., YAMSKOV I.A.

Viện Hóa các hợp chất cơ kim, Matxcova

Hiện nay, việc nghiên cứu các toxin tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong các lĩnh vực electrophysiology và neurochemistry [1]. Loài bò cạp *Buthus* sp. là một nguồn cung cấp các toxin [2,3]. Toxin của nọc bò cạp cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu. Tiếp theo những nghiên cứu trước đây về lectin tách từ nọc bò cạp *Buthus* sp. [4], nọc bò cạp này sau khi loại các mucoprotein không tan, chúng tôi đã tách và bước đầu phân tích tính chất của các norotoxin.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sắc ký lọc qua gel protein được tiến hành ở nhiệt độ phòng, trên cột (1x100 cm) với sephadex G-50 (Pharmacia Thụy Điển). Cột đã được cân bằng trước trong bufer 20 mM axetat ammonium pH = 4,7. Sự có mặt của protein trong các phân đoạn sắc ký được xác định theo mật độ quang ở 280 nm trên máy Uvicord ("LKB" Thụy Điển).

Độc tính của các phân đoạn tách ra được thử trên chuột bạch C57BL/6 cả hai giống (18-20 g) bằng cách tiêm bắp. Để tiêm, phải hoà phân đoạn cần thử vào 0,5 ml dung dịch 0,9% NaCl. Lượng protein trong mỗi lần tiêm phù hợp 0,2 ml dung dịch với mật độ quang bằng $A_{1,0} = 1,000$ tại bước sóng 280 nm (khoảng gần 0,2 mg)[5]. Sử dụng ba mức độ để thể hiện tính độc của các phân đoạn tách ra. Phân đoạn không độc là, sau khi tiêm phân đoạn này, chuột không thể hiện dấu hiệu độc (giống như khi tiêm nước muối không). Phân đoạn độc là, sau khi tiêm nó,

chuột thể hiện bất kỳ một trong số các dấu hiệu sau: bị kích động, chảy nước miếng, chảy nước mắt, ngạt thở, liệt chi (nhưng phục hồi trong thời gian 24 giờ sau khi tiêm). Phân đoạn độc chết là làm chuột chết sau khi thể hiện một hoặc vài dấu hiệu trên.

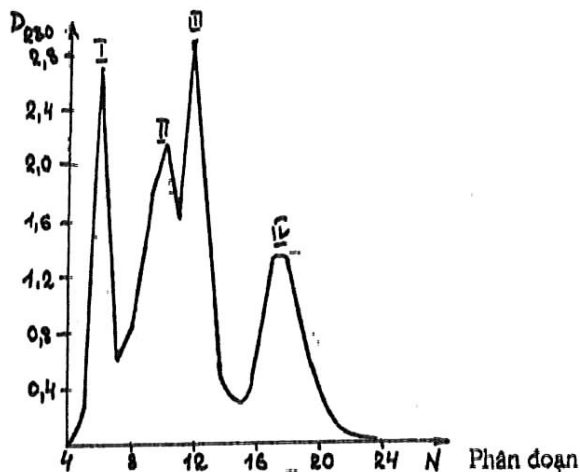
Tiếp theo, để tách các toxin, chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp trong hệ gradient Gilson (Pháp) trên cột (19x150 mm) μ -Bondapak C18 (5 μ m). Sử dụng dung dịch axetonitril để rửa cột theo gradient tuyến tính 0-50%, trong đó dung dịch (A): 0,1% TFA trong nước; còn dung dịch (B): 0,1% TFA trong axetonitril. Tốc độ rửa cột: 5 ml/phút. Sự có mặt của protein trong các phân đoạn sắc ký được phát hiện bằng quang phổ kế tại bước sóng 206 nm. Các phân đoạn chứa toxin được đông khô và làm sắc ký lại trên cột C18 để thu được các toxin sạch.

Điện di được thực hiện trên gel polyacrylamit 15% theo phương pháp Reisfeld [6]. Khối lượng phân tử của các toxin được xác định trên máy MALDI Mass-spectrometry Vision 2000 (Thermo Bio Analysis, Anh).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách các norotoxin từ nọc của loài bò cạp *Buthus* sp.

Nọc của loài bò cạp *Buthus* sp. sau khi lọc qua gel được tách ra làm 4 thành phần với khối lượng phân tử khác nhau thể hiện ở 4 đỉnh (hình 1). Thử hoạt tính sinh học lên chuột cho thấy các đỉnh II và III có độc tính.



Hình 1. Sắc ký lọc qua cột gel sephadex G-50 (1x100 cm) của phần nọc bò cạp tan trong nước. Mẫu mang lên cột 80 mg, tốc độ rửa cột 9,6 ml/h, thể tích các phân đoạn 4,8 ml, dung dịch rửa: buffer axêtat ammonium pH = 4,7

120 phút, sau đó 50-100% 0,1 TFA axêtonitril trong 120 phút. Tốc độ rửa cột 5 ml/phút. Sự có mặt của protein trong dung dịch rửa ra được xác định bằng máy quang phổ tại bước sóng 206 nm.

Tiếp theo, để tách các norotoxin từ đỉnh III, chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp trong hệ gradient pha tuần hoàn trên cột C18. Kết quả cho thấy đỉnh III được tách ra làm nhiều phân đoạn protein (hình 2). Thử hoạt tính của các phân đoạn này trên chuột cho thấy các phân đoạn 5, 7, 9, 10, 13, 14 và 19 rất độc. Khi tiêm vào bắp, chuột chết ngay hoặc chết trong vòng 1/2-3 giờ. Những norotoxin này chiếm một phần rất nhỏ trong nọc bò cạp (từ 0,01- 0,12%) và rửa ra khỏi cột từ 33,7- 141 phút (xem bảng). Để làm sạch các norotoxin này, đã làm sắc ký lỏng cao áp lại các phân đoạn đã tách ra trên cột C18, chúng tôi thu được các norotoxin sạch số 5, 7, 9, 10, 13, 14 và 19.

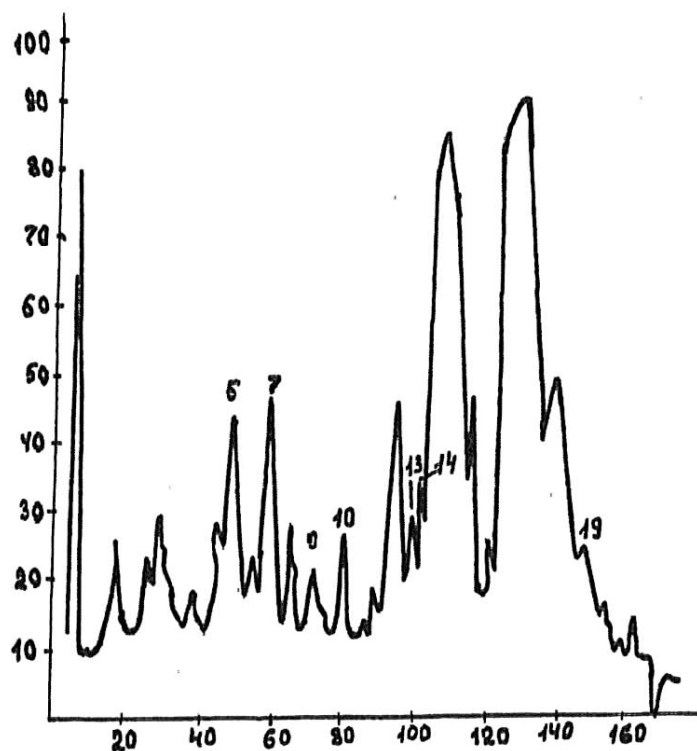
Protein được rửa khỏi cột bằng dung dịch axêtonitril trong nước với gradient tuyến tính: 20-50% 0,1 TFA axêtonitril trong

Bảng

Tính chất hóa-lý của các norotoxin của loài bò cạp *Buthus* sp.

TT	Loại norotoxin	Thời gian rửa ra khỏi cột C ₁₈ (phút)	Hàm lượng norotoxin trong nọc thô (%)
1	5	33,7	0,065
2	7	36,2	0,120
3	9	38,9	0,010
4	10	41,5	0,020
5	13	45,3	0,013
6	14	46,9	0,016
7	19	141	0,017

Phương pháp điện di trên gel polyacrylamit cho thấy các norotoxin tách ra là sạch, không chứa các tạp chất protein khác.



Hình 2. Sắc ký lỏng cao áp của đỉnh III (xem hình 1) trong hệ gradient Gilson (Pháp) trên cột μ -Bendepak C18 (10 μ m, 19 x 150 mm)

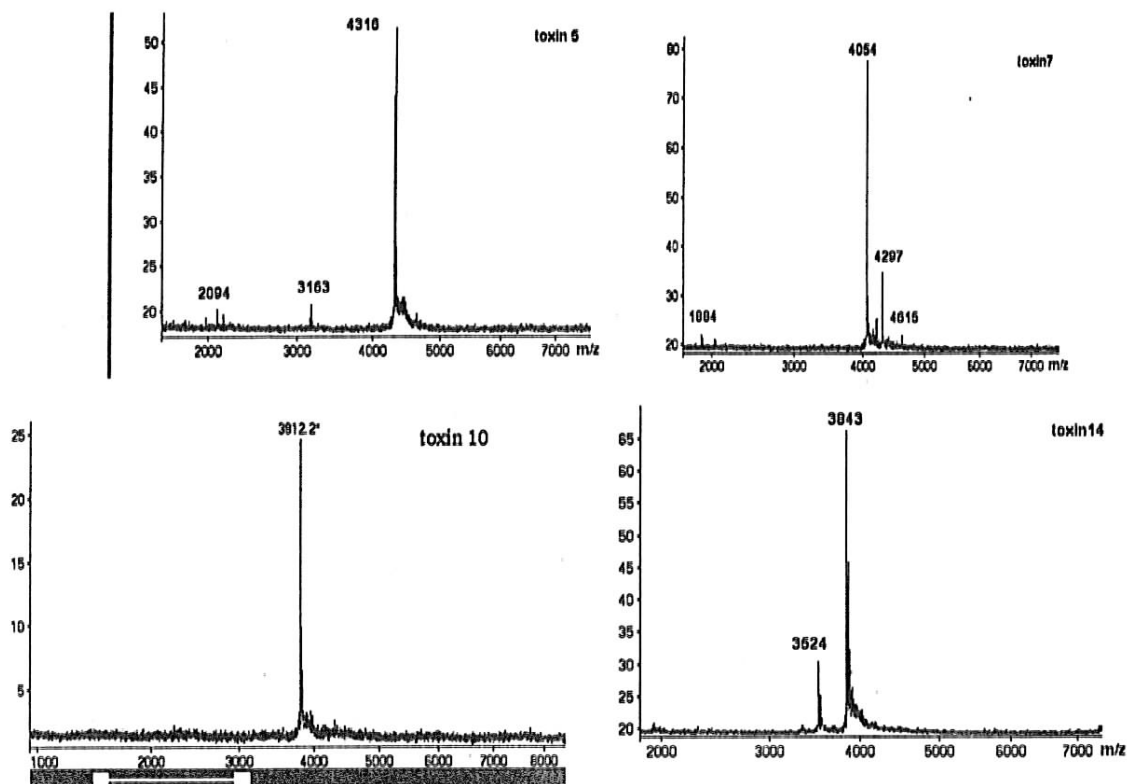
2. Đặc điểm của các norotoxin của nọc bò cạp *Buthus* sp.

Sử dụng phương pháp khối phổ đã xác định các norotoxin số 9, 5, 7, 19, 14 và 10 có khối lượng phân tử tương ứng: 4948 Da; 4316 Da; 4054 Da; 3958 Da; 3843 Da và 3812 Da. Khối phổ của bốn trong những norotoxin này được trình bày trong hình 3. Đó là các norotoxin "ngắn", khối lượng phân tử của chúng nằm trong khoảng từ 3800 Da đến 4500 Da. Tài liệu về norotoxin của nọc bò cạp cho biết khối lượng phân tử của chúng có thể đóng vai trò quan trọng để chỉ thị được tính của chúng. Những norotoxin tách từ nọc bò cạp có khối lượng phân tử nằm trong vùng 3000-4000 Da thì thường ức chế hoạt động của kênh K^+ (kali) của tế bào

thần kinh, trong khi đó các norotoxin ức chế hoạt động của kênh Na^+ (natri) có khối lượng phân tử nằm trong vùng từ 6000 đến 8000 Da [7]. Như vậy, các norotoxin tách từ nọc bò cạp *Buthus* sp. có thể có tác dụng ức chế sự hoạt động của các kênh ion K^+ (kali).

III. KẾT LUẬN

Như vậy, bằng hai bước sắc ký: sắc ký lọc qua gel sephadex G-50 và sắc ký lỏng cao áp trên cột C-18, chúng tôi đã tách và làm sạch các norotoxin với khối lượng phân tử từ 3500 đến 5000 Da, từ nọc của loài bò cạp *Buthus* sp. Các norotoxin này tác dụng lên trạng thái sinh lý của động vật.



Hình 3. Khối phổ của các nơrotoxin 5, 7, 10, 14 ghi trên máy khối phổ MALDI Vision 2000 (Thermo Bio Analysis, Anh)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bon C., 2000: Biochemie, 82: 791-792.
2. Posani L. D. et al., 1999: Eur. J. Biochem., V. 264: 287-300.
3. Legos C., Martin-Euclaire M. F., 1997: C. R. Soc. Biol, 191: 345-380.
4. Hoàng Ngọc Anh, Berezin B. B., Yamskov I. A., 1998: Tạp chí Sinh học, 20(2): 39-42.
5. Sampalo S. V., Laure C. J., Giglio J. R., 1983: Toxicon, 21(2): 265-277.
6. Reilsfeld R. A., Lewis V. J., Williams D.E., 1962: Nature, 195: 281-282.
7. Roml-Lebrun R. et al, 1997: Biochemistry, 36: 13473-13482.

ISOLATION AND PRELIMINARY STUDY THE SCORPION NEUROTOXINS *BUTHUS* sp.

HOANG NGOC ANH et al

SUMMARY

A number of neurotoxins were isolated from the venom of the scorpion *Buthus* sp. by the combination of sephadex G-50 gel-filtration and RP-HPLC. These neurotoxins had molecular weights from 3500 to 5000 Da. The tests of the isolated neurotoxins activity proceeded by injection administered at the buttocks of the C57BL/6 mice. After injection from 1/2 to 3 hours, these mice were died. These neurotoxins occupied from 0.01-0.12% of the venom of the scorpion *Buthus* sp. We have shown that these isolated neurotoxins effectively acted on the physiological state of animals.

Ngày nhận bài: 14-6-2001