

# NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ TÍNH CHẤT CỦA TOXIN VÀ MỘT SỐ ENZYM THUỶ PHÂN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ NỌC RẮN HỔ MANG VIỆT NAM NAJA NAJA

Đến tòa soạn 1 - 6 - 2006

Trần Đình Toại

Viện Hoá học, Viện KH&CN Việt Nam;

Trần thị Hồng

Trường ĐHKHTN ĐHQG Hà Nội

## SUMMARY

### THE STUDY ON THE ISOLATION AND PROPERTIES OF TOXIN AND SOME HYDROLYSE ENZYMES FROM VIỆT NAM NAJA NAJA SNAKE VENOM

*In our study has been carried out the isolation's process of toxin and some hydrolyse enzymes from Việt nam Naja naja snake venom. The characters of isolated substances have been determinated, for example, molecular weights, antiviral and antimicrobial properties. These characters showed that, the isolated substances are highly bioactived.*

#### I. MỞ ĐẦU

Nọc rắn là hỗn hợp của rất nhiều chất có hoạt tính sinh học (HTSH), phần lớn trong số đó là các protein. Về bản chất cấu trúc, các protein này chia làm 2 loại: enzyme và toxin.

Các toxin trong nọc rắn là các polypeptide và theo tính chất tác động, có thể chia làm ba loại chính: neurotoxin (độc tố thần kinh), cardiotoxin hoặc cytotoxin (độc tố với tim), hematoxin (độc tố với máu) [1, 2].

Các enzyme tìm thấy trong nọc rắn đều là các enzyme thuộc lớp thủy phân Hydrolase [3]. Trong số các enzyme đó thì Ribonuclease, Phospholipase và Protease được quan tâm nhiều hơn cả

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu nọc rắn độc như nọc rắn hổ mang đã được bắt đầu từ những năm 90 của thế kỷ trước [4]. Các kết quả trong phòng thí nghiệm chỉ dừng ở chỗ tách riêng 2 loại thành phần trong nọc rắn là toxin và enzyme [5]. Hoàn toàn chưa có công trình nào công bố về kết quả nghiên cứu riêng từng enzyme. Cũng vì vậy, hiệu quả sử dụng của từng thành phần riêng biệt trong nọc rắn còn hạn chế, chưa tận dụng hết được giá trị quý hiếm của nọc rắn.

Với mục đích nâng cao giá trị của nọc rắn, một nguồn dược liệu có giá trị, đặc trưng cho nguồn gen quý hiếm của khí hậu nhiệt đới nóng ẩm Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chiết tách ra từ nọc rắn hổ mang (*Naja naja*) một số chế phẩm có hoạt tính sinh học

(enzyme, toxin) nhằm tìm hiểu những giá trị được liệu của nó phục vụ trong y học.

## II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Hoá chất

- Nọc rắn hổ mang (*Naja naja*) đông khô (dạng ampul 5 g) được mua từ làng nghề nuôi rắn Vĩnh Sơn, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.

- Hoá chất tinh khiết của hãng Sigma: Citrat, Glycine (Gly), Superdex-75, Adenin ribonucleotide (ARN)

### 2. Thiết bị:

- FPLC (Float Performance Liquid Chromatography).

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

- Quang phổ tử ngoại.

- Máy ly tâm lạnh, máy khuấy từ.

### 3. Phương pháp nghiên cứu

#### a. Phân tách các thành phần có hoạt tính sinh học của nọc rắn

Phân tách các thành phần có hoạt tính sinh học của nọc rắn được tiến hành bằng phương pháp sắc ký với cột Superdex-75 (60 x 20mm) đệm citrat, pH = 2,51

#### b. Các phương pháp xác định protein và hoạt độ enzyme

##### - Phương pháp xác định protein

Hàm lượng protein trong các dạng mẫu nọc rắn và dung dịch được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ cực đại của dung dịch protein ở các bước sóng 280nm được đo trên máy quang phổ tử ngoại UV1601 Shimadzu, sau đó hàm lượng protein được xác định theo biểu đồ [6]

##### - Phương pháp xác định hoạt độ của Ribonuclease

Adenin ribonucleotide (ARN) là cơ chất đặc hiệu của Ribonuclease

- Nguyên lý: ARN hấp phụ cực đại ở bước sóng 260 nm. Khi ARN bị thủy phân mật độ quang của dung dịch tăng (hiệu ứng hyperchrom). Dựa vào sự thay đổi OD<sub>260</sub> ta đo được hoạt tính của Ribonuclease [7].

- Đơn vị hoạt độ: Một đơn vị hoạt độ của Ribonuclease là lượng enzyme xúc tác thủy phân ARN trong các điều kiện tối ưu (nồng độ cơ chất bão hòa, t°C phòng, pH tối ưu), làm tăng mật độ quang của hỗn hợp phản ứng (1 ml) tại bước sóng hấp thụ 260 nm lên 0,01 đơn vị sau 60 giây phản ứng.

Hoạt độ enzyme được đo trực tiếp trên máy quang phổ Diode Array SP 8452 Hewlett Packard hoặc trên máy Gene Quant ARN/ADN calculator.

##### - Phương pháp xác định hoạt độ phospholipase

Nguyên tắc của phương pháp: phospholipase xúc tác phản ứng chuyển hóa lecithin thành lysolecithin và giải phóng axit béo tự do [8]. Do được lượng axit béo tự do hoặc lượng lysolecithin tạo thành hoặc lượng lecithin mất đi cho phép đánh giá hoạt tính của phospholipase. Axit béo tự do làm mất màu của cresol đỏ. Cresol đỏ có cực đại hấp thụ ở bước sóng 578 nm.

##### - Phương pháp xác định hoạt độ protease.

Nguyên tắc của phương pháp: protease xúc tác phản ứng thủy phân protein thành peptide và amino axit. Tiến hành phản ứng thủy phân casein- protein dự trữ bằng protease tách ra nọc rắn. Do sản phẩm tạo thành bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 280nm. Từ đó xác định hoạt độ của protease

##### c. Phương pháp thử độc tính của toxin

Độc tính của các chế phẩm toxin tách từ nọc rắn được thử hoạt tính trên chuột bạch C57Bl/6 với cả hai giống có trọng lượng 18-20g. Chế phẩm toxin dạng dung dịch được tiêm vào bắp thịt chuột với liều lượng 1ml/con. 1ml chế phẩm chứa 0,02 mg toxin. Độ độc chia làm 3 mức độ: 1 - Không độc, 2 - Độc và 3 - Độc chết [5].

#### **d. Phương pháp khảo sát hoạt tính sinh học**

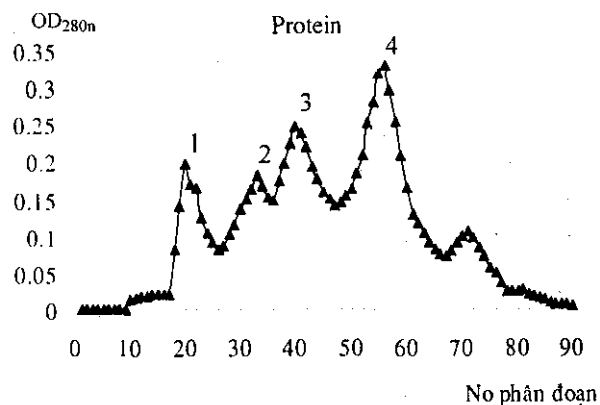
Khảo sát hoạt tính sinh học được tiến hành tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam:

- Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được tiến hành theo phương pháp khuếch tán trên thạch, sử dụng khoanh giấy lọc đã tẩm chất theo nồng độ tiêu chuẩn. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được tiến hành theo phương pháp Vanden Bergher và Vlietinck trên phiên vi lượng 96 giếng [9].

### **III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN**

#### **1. Phân tách các thành phần có hoạt tính sinh học của nọc rắn bằng cột sắc ký với Superdex-75**

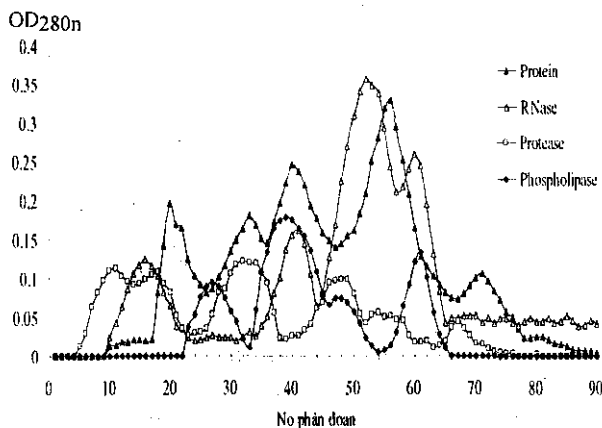
Trên cơ sở những kết quả về chiết tách làm sạch các thành phần trong nọc rắn hổ mang bằng các phương pháp khác nhau, chúng tôi xây dựng quy trình tách riêng biệt từng thành phần có HTSH từ nọc rắn với mục đích thu được hiệu quả cao nhất. Để đạt được mục đích ấy, chúng tôi đã lựa chọn Superdex-75 làm chất mang cho cột sắc ký. Sắc ký được tiến hành trên máy FPLC



**Hình 1. Kết quả xác định Protein trong các phân đoạn sắc ký:**

- 1- Ribonuclease; 2- Phospholipase;  
3- Protease; 4- Toxin

Các thành phần của nọc rắn (các enzyme và toxin) trong từng ống nghiệm thu được sau sắc ký đều được kiểm tra hàm lượng protein (Hình 1). Dựa vào đồ thị protein và kết quả thử độc tính của toxin cũng như hoạt tính các enzyme (Hình 2) cho phép thu các phân đoạn chứa các thành phần có hoạt tính sinh học khác nhau.

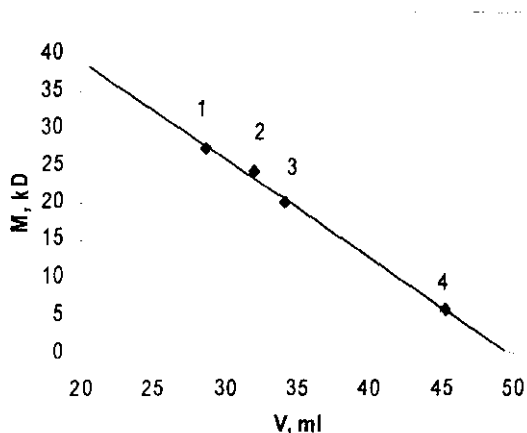


**Hình 2. Kết quả xác định Protein và hoạt độ của các enzyme trong các phân đoạn sắc ký**

#### **2. Xác định trọng lượng phân tử của các chất trong nọc rắn hổ mang.**

Kích thước phân tử các thành phần trong nọc rắn hổ mang được xác định dựa vào các chất chuẩn: Ribonuclease A (27,4 kDa), Trypsin (24 kDa), Trypsin Inhibitor (20kDa) và Insulin (5,75 kDa). Kết quả sắc ký các chất chuẩn được trình bày trong bảng 2. Từ các giá trị trọng lượng phân tử của các chất chuẩn, xây dựng đồ thị chuẩn để xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm trong nọc rắn hổ mang (Hình 3). Kết quả cho thấy, các toxin có trọng lượng phân tử chừng 6-7 kDa. Kết quả này phù hợp với kết quả của một số tác giả đã công bố trước đây về toxin từ nọc rắn hổ mang N. naja Việt Nam [4, 5]

Trên cơ sở đồ thị chuẩn (Hình 3, Bảng1) cho phép để xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm trong nọc rắn hổ mang. Kết quả xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm trong nọc rắn hổ mang được trình bày trong bảng 1.



**Hình 3 :** Đồ thị chuẩn để xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm

Marker: 1- Ribonuclease A, 2- Trypsin, 3- Trypsin Inhibitor, 4- Insulin

**Bảng 1.** Trọng lượng phân tử của các Marker và các chế phẩm tách từ nọc rắn hổ mang

| No | arker<br>(chất chuẩn) | Các chất có<br>HTSH tách từ<br>nọc rắn hổ<br>mang <i>N. naja</i> | V, thể tích<br>dung dịch<br>ra khỏi cột<br>sắc ký,<br>ml. | M, trọng<br>lượng<br>phân tử<br>tương<br>ứng, kDa |
|----|-----------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1  | Ribonuclease A        |                                                                  | 28,7                                                      | 27,4                                              |
| 2  | Trypsin               |                                                                  | 32                                                        | 24                                                |
| 3  | Trypsin Inhibitor     |                                                                  | 34,2                                                      | 20                                                |
| 4  | Insulin               |                                                                  | 45,1                                                      | 5,75                                              |
| 5  |                       | Ribonuclease                                                     | 36                                                        | 19                                                |
| 6  |                       | Phospholipase,                                                   | 24,5                                                      | 37,5                                              |
| 7  |                       | Protease                                                         | 37,5                                                      | 14-16                                             |
| 8  |                       | Toxin                                                            | 42                                                        | 7-10                                              |
|    |                       |                                                                  | 46                                                        | 6-7                                               |

Kết quả xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm trong nọc rắn hổ mang *Naja naja* Việt Nam cho thấy:

**Bảng 2.** Hoạt tính sinh học của các chế phẩm từ nọc rắn hổ mang

| Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định |               |                                     |                      |                      |                    |
|---------------------------------------|---------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| No                                    | Mẫu           | Nồng độ ức chế tối thiểu MIC, µg/ml |                      |                      |                    |
|                                       |               | Vi khuẩn Gr (-)                     |                      | Nấm men              |                    |
|                                       |               | <i>E. coli</i>                      | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>C. albicans</i> |
| 1                                     | Phospholipase | (-)                                 | 50                   | 50                   | (-)                |
| 2                                     | Toxin         | 25                                  | 50                   | (-)                  | (-)                |

(xem tiếp trang 72)

Ribonuclease có tới 2 phân đoạn tương ứng với các giá trị trọng lượng phân tử khác nhau là 37,5; 19. Giá trị trọng lượng phân tử cao nhất của enzyme thủy phân này là 37,5 kDa phù hợp với kết quả xác định trọng lượng phân tử bằng sắc ký sàng lọc phân tử với chất mang là Sephadex G-75.

Phospholipase có trọng lượng phân tử 14-15 kDa. Như vậy, trọng lượng phân tử của Phospholipase nọc rắn hổ mang *Naja naja* Việt Nam gần giống với kết quả công bố về trọng lượng phân tử Phospholipase A2 chiết từ nọc rắn cobra *Naja n. kaouthia* (Thái lan), gọi là Herpoxin có trọng lượng phân tử 14 kDa [10].

Các protease có trọng lượng phân tử 7-10 kDa. Các toxin có trọng lượng phân tử 6-7 kDa,

### 3. Khảo sát HTSH của các chế phẩm từ nọc rắn hổ mang

Kết quả khảo sát HTSH của các chế phẩm từ nọc rắn hổ mang được trình bày trong bảng 2

Từ các kết quả khảo sát HTSH ta thấy rằng chế phẩm từ nọc rắn hổ mang đều thể hiện các HTSH đáng quý như hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.

Toxin có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định rất mạnh với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 25 µg/ml đối với *E. coli* và 50 µg/ml đối với *P. aeruginosa*.

Phospholipase, như tài liệu đã công bố, bản chất là một toxin, gọi là Herpoxin, có tác dụng ức chế virus Herpes simplex loại 1 loại 2 và virus Cytomegalus (CMV) [10]. Phospholipase thu được từ nọc rắn có hoạt tính kháng vi khuẩn *P. aeruginosa* và kháng nấm men *S. cerevisiae* (Bảng 2)

### 3. KẾT LUẬN

Qua các phân tích hàm lượng một số nguyên tố vi lượng và đất hiếm của đất trồng trọt xã Phúc Trạch và các xã Hương Trạch, Hà Linh ở lân cận, chúng tôi rút ra kết luận:

- Có khác nhau đáng kể về hàm lượng của nguyên tố vi lượng kẽm: đất xã Phúc Trạch có hàm lượng cao hơn nhiều so với các vùng đất đối chứng.

- Hàm lượng mỗi nguyên tố đất hiếm trong đất Phúc Trạch đều cao hơn đáng kể so với trong đất của các vùng đối chứng. Đất của tất cả các vùng này đều thuộc dạng tương đối nghèo nguyên tố đất hiếm.

Các đặc điểm này có thể là một phần nguyên nhân gây nên sự khác biệt về chất lượng và năng suất cây bưởi đặc sản ở xã Phúc Trạch - Hương Khê - Hà Tĩnh.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Văn Đằm. *Nguyên tố vi lượng và phân vi lượng*. NXB KHKT-Hà Nội, (1994).
2. Lê Văn Khoa (chủ biên). *Phương pháp phân tích đất, nước, phân bón, cây trồng*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, (2001).
3. Hồ Viết Quý. *Các phương pháp phân tích quang học trong hoá học*. NXB ĐHQG-Hà Nội, (1999).
4. Hồ Viết Quý. *Chiết tách, phân chia, xác định các chất bằng dung môi hữu cơ*. NXB KHKT - Hà Nội, (2002).
5. Katalymov M. V, Peive Ya. V, Vlaxuyuk P. A. *Nguyên tố vi lượng trong trồng trọt*- Tập 1. Người dịch: Nguyễn Văn Hiến Vũ Minh Kha, .... NXB KH-KT -1977.
6. Hùng Bích Côn, Trần Bồng. *Hy thổ nông lâm*. Trĩ kim Công nghiệp xuất bản xã - Bắc Kinh, (2000).

### NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH...(tiếp theo trang 68)

#### IV. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu đưa ra quy trình phân tách và xác định trọng lượng phân tử các chế phẩm có hoạt tính sinh học từ nọc rắn hổ mang *Naja naja* Việt Nam: toxin và các enzyme thủy phân: Ribonuclease, Phospholipase, Protease.

Các chất từ nọc rắn hổ mang có hoạt tính sinh học cao kháng khuẩn và kháng nấm mạnh.

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của ĐHQGHN và Chương trình NCCB.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alexey V. Osipov, Maria V. Astapova, Victor I. Tsetlin and Yuri N. Utkin. *The first representative of glycosylated three-fingered toxins Cytotoxin from the Naja kaouthia cobra venom*. Eur. J. Biochem. 271, 2018-2027, (2004).
2. Kumar T. K. S., Pandian S. T. K., Jayaraman G., Peng H., Yu C.. *Understanding the structure, function and folding of Cobra toxins*; Proc. Nalt. Sci. Counc. ROC (A), 23(1), pp. 1-19, (1999).
3. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature*, (1992).
4. Nguyễn Văn Cường, Nghiênn Thuý Châu, Nguyễn Thị Vinh, Nguyễn Tài Lương, Trịnh

Hữu Hằng. *Phân đoạn và xác định tính chất các tiểu phần protein của nọc rắn hổ mang (Naja naja)*, Tạp chí Sinh học, T. 14(2), tr: 43-48, (1992).

5. Hoàng Ngọc Anh; Đặng Trần Hoàng; Trương Nam Hải. *Khảo sát và tách toxin từ nọc rắn hổ mang Việt Nam (N. Naja)*. Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học. Viện Hoá học, Viện KH&CN Việt Nam. Hà Nội, Tháng 12 năm 2005, Tr: 79-83, (2005).
6. Под общей редакцией Профессора Н. П. Мешковой и Академика С. Е. Северина. *Практикум По Биохимии* Изд. Московского Университета. 96-99, (1979).
7. Nguyễn Văn Thiết. *Nghiên cứu hoạt tính ribonucleolytic của nọc rắn hổ mang Việt Nam (Naja naja)*, Tạp chí Dược liệu, T. 7(6), tr:181-185, (2002).
8. Bockerhoff H., Jensen R. G. *Lipolytic enzymes*. NXB "Mir", Moscow, 247-249, (1978).
9. Vanden Bergher D. A., Vlietinck A. J. *"Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plant"*, in: Method in Plant Biochemistry, V.6, Chapter 3, 47-69, (1991).
10. US patent#: 5,565,431: *"Cancer Cell Inhibitors and Method"*, claims products for treating cancer using Kaotree, Atroporin or a combination, (1996).