

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU RIBONUCLEAZA TRONG NỌC RẮN HỔ MANG CHỨA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

NGUYỄN VĂN THIẾT

Viện Công nghệ sinh học

Ribonucleaza (RNaza) là nhóm enzym có phân bố rất rộng rãi và được nghiên cứu rất nhiều, vì vậy ngoài những chức năng sinh học thông thường của các RNaza là tham gia vào trao đổi chất của các acid nucleic, ngày nay chúng ta đã biết được rất nhiều tính chất (hay chức năng) sinh học mới của các enzym thuộc nhóm RNaza như hoạt tính kháng khuẩn [1, 2], kháng virus [10, 11], hoạt tính gây độc tế bào (hay hoạt tính cytotoxin) [4, 5], hoạt tính ức chế phản ứng miễn dịch [4] □ Đặc biệt là vai trò của nucleaza, trong đó có RNaza trong phòng thủ và tự vệ của cơ thể được bảo tồn từ vi sinh vật cho đến các cơ thể bậc cao như người [3, 6, 12]. Tuy nhiên RNaza từ nọc rắn nói chung còn ít được nghiên cứu. Cho đến nay mới chỉ có RNaza từ nọc rắn hổ mang của Ấn Độ là nhận được ở dạng có độ sạch cao [7], còn RNaza từ nọc rắn của các loài khác mới chỉ được làm sạch một phần. Một số nghiên cứu về RNaza của chúng tôi trong thời gian gần đây cho thấy RNaza trong nọc rắn hổ mang *Naja naja* của Việt Nam là một enzym rất đặc biệt, với pH tối ưu rất thấp ($pH_{opt} = 2,0 - 2,6$), có nhiều dạng phân tử khác nhau và không tương tác với RI (protein-inhibitor của RNaza) nội bào và có khả năng thể hiện hoạt tính cytotoxin [8].

Như chúng ta biết rằng nọc rắn hổ mang chúa (HMC) độc hơn rất nhiều so với nọc rắn hổ mang thường (*Naja naja*). Người khi bị rắn hổ mang chúa cắn mà không được cứu chữa một cách kịp thời thì khả năng tử vong rất cao. RNaza từ nọc rắn hổ mang chúa ở nước ta cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu. Trong công trình này sẽ trình bày những kết quả bước đầu nghiên cứu một số tính chất hoá lý và xúc tác cơ bản (tính bền nhiệt, các tính chất sắc ký, pH_{opt}) của RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa, nhằm mục đích điều tra nguồn enzym quý hiếm này để phục vụ cho mục đích nghiên cứu sau này theo

hướng làm thuốc chống virus và điều trị ung thư.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

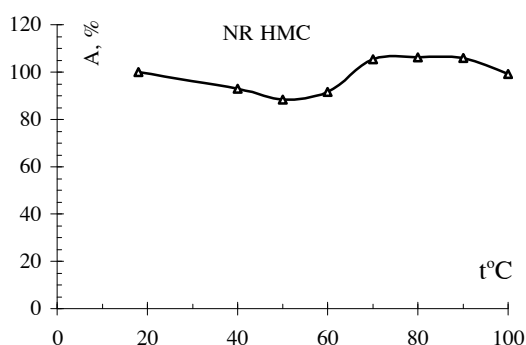
Nọc rắn hổ mang chúa đông khô được mua ở làng nghề nuôi rắn xã Vĩnh Sơn, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc. RNA toàn phần từ nấm men (Sigma) được sử dụng làm cơ chất cho RNaza. RNaza nọc rắn hổ mang chúa được phân tách bằng các phương pháp sắc ký trao đổi ion và sàng lọc phân tử trên cột với các chất mang khác nhau, quá trình được thực hiện trên thiết bị FPLC. CM-xenlulô (CMC) của hãng Sigma, SP Sepharose 4 Fast Flow (SP), Superdex 75 (S-75) và Superdex 200 (S-200) do Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen tại Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Xác định protein bằng phương pháp quang phổ. Hoạt tính RNaza được đo theo phương pháp như đã mô tả trước đây [8] và biểu diễn bằng đơn vị OD_{260} .

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số tính chất hoá lý và hoạt tính xúc tác của RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa, ngoài mục đích đã nêu ở trên, còn để tìm hiểu khả năng làm sạch enzym này bằng các phương pháp khác nhau nhằm mục đích thu nhận chế phẩm RNaza có độ sạch càng cao càng tốt, để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về tương tác với RI □.

1. Tính bền nhiệt của của enzym

Theo như chúng tôi được biết thì nọc rắn các loại đều giữ được độ độc rất lâu, nếu được bảo quản tốt ở trạng thái đông khô, do đó chúng tôi đã kiểm tra độ bền nhiệt của RNaza bằng cách xử lý dung dịch enzym (chứa 10 mg nọc rắn/ml - chế phẩm E₀) ở các nhiệt độ khác nhau từ 40°C đến 100°C. Kết quả của 1 trong các thí nghiệm này được trình bày trên hình 1.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc hoạt tính RNaza còn lại trong dung dịch enzym sau khi đun cách thủy 5 phút ở các nhiệt độ khác nhau. Hoạt tính của mẫu enzym giữ ở nhiệt độ phòng (~20°C, tức là không bị xử lý nhiệt) được coi là 100%

Đồ thị trên hình 1 cho thấy khi tăng nhiệt độ (đun cách thủy) từ 18°C đến 100°C, hoạt tính enzym đầu tiên giảm trong vùng nhiệt độ 40 - 60°C (còn ~88% hoạt tính ở 50°C), sau đó lại tăng tới 105 - 106% trong vùng nhiệt độ 70 - 90°C, đun sôi cách thủy ở 100°C chỉ làm giảm không đáng kể (~1%) hoạt tính enzym. Những thí nghiệm lặp lại cũng cho kết quả tương tự, chứng tỏ RNaza từ nọc rắn hổ mang chúa Việt Nam là một enzym rất bền với nhiệt. Kết quả này cho thấy xử lý nhiệt có thể được sử dụng như là một bước để làm sạch và tinh chế enzym này

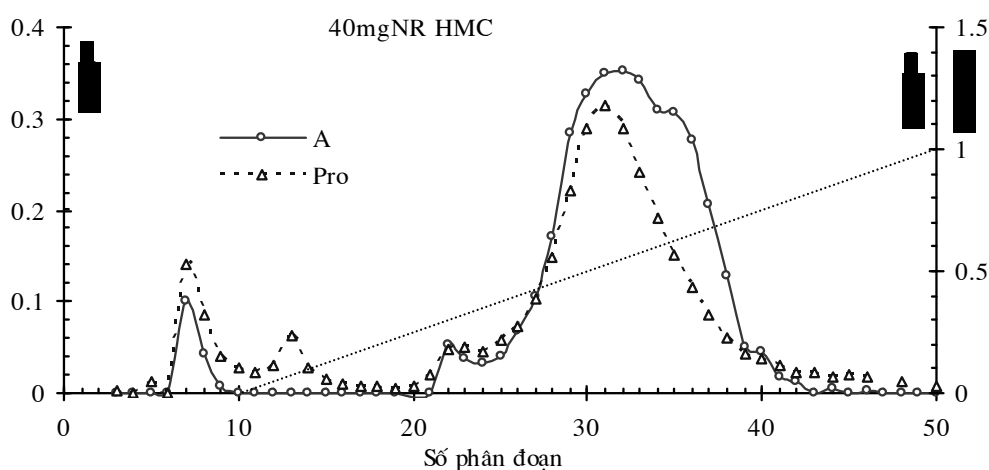
2. Kết quả phân tách RNaza bằng phương

pháp sắc ký trao đổi ion

Các phương pháp sắc ký thường được sử dụng rất hiệu quả để tách chiết và làm sạch các protein trong hầu hết các quy trình tách chiết và tinh chế protein, vì chúng cho phép phân tách các protein dựa theo các khác biệt về kích thước phân tử hay điện tích bề mặt. Do đó chúng tôi đã sử dụng các phương pháp này nhằm 2 mục đích: để nghiên cứu các tính chất của RNaza và tìm kiếm khả năng phân tách và làm sạch enzym này từ nọc rắn hổ mang chúa.

a. Kết quả sắc ký trao đổi ion trên cột với CM-xenlulôza

Sắc ký trao đổi ion chỉ được tiến hành trên 2 chất mang cationit, vì chúng tôi đã có thông tin sơ bộ là RNaza trong nọc rắn hổ mang không phân tách được trên cột DEAE-xenluloza, mà lại tách được trên cột CMC thành nhiều đỉnh riêng biệt [9]. Sắc ký được tiến hành trong đệm xitrat 10 mM, pH 5,2. Trong các thí nghiệm này mỗi lần sắc ký lấy 25 - 50 mg nọc rắn đông khô hoà vào 5 - 10 ml dung dịch đệm, li tâm loại cặn, thu lấy dịch trong cho lên cột đã được cân bằng trước với dung dịch đệm. Enzym được thổi khỏi cột bằng gradient nồng độ NaCl 0 - 1,0 M trong thể tích là 120 ml, thu mỗi phân đoạn 3 ml. Sau khi kết thúc sắc ký, tiến hành đo hoạt tính RNaza và lượng protein trong tất cả các phân đoạn. Sắc ký đồ của nọc rắn hổ mang chúa nhận được sau sắc ký trên cột CMC được trình bày trên hình 2.



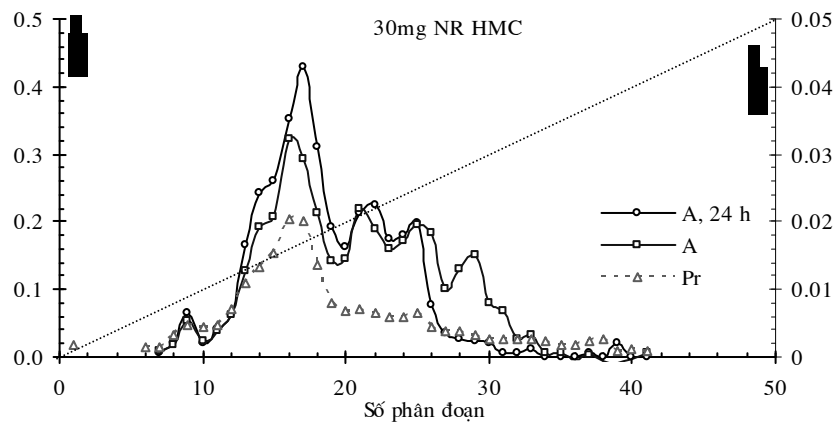
Hình 2. Sắc ký đồ nọc rắn hổ mang chúa nhận được trên cột trao đổi ion với CM-xenlulôza (Ø1 × 11 cm). A. Hoạt tính RNaza, OD₂₆₀; Pr. Hàm lượng protein, OD₂₈₀; Đường chéo là gradient nồng độ NaCl (0 - 1,0 M), với thể tích chung là 120 ml

Kết quả sắc ký trên cột CMC cho thấy protein nọc rắn hổ mang chứa được tách thành 4 đỉnh: 1 đỉnh protein không hấp phụ trên cột trao đổi ion, 3 đỉnh protein được phản hấp phụ khỏi cột bằng gradient nồng độ NaCl, trong đó có 2 đỉnh nhỏ ra khỏi cột trước và 1 đỉnh lớn ra khỏi cột sau. RNaza của nọc rắn tách thành 2 đỉnh, trong đó đỉnh enzym nhỏ trùng với đỉnh protein không hấp phụ trên cột, ra trước gradient nồng độ muối và đỉnh enzym lớn trùng với đỉnh protein lớn. Ngoài ra có thể còn có 1 đỉnh RNaza nhỏ trùng với đỉnh protein nhỏ ở phía bên trái đỉnh protein lớn. Hình 2 cũng cho thấy, phần lớn protein của nọc rắn được thổi ra khỏi cột tập trung trong đỉnh protein lớn, lượng chế phẩm nọc rắn cho lên cột càng nhiều đỉnh protein chính này càng rộng, thậm chí còn che phủ cả đỉnh protein nhỏ thứ 3 ở phía bên trái của đỉnh protein lớn này và khi đó trên sắc ký đồ chỉ

còn 2 đỉnh RNaza. Đỉnh RNaza lớn và đỉnh protein lớn tuy trùng nhau, nhưng đầu đỉnh của chúng hơi lệch nhau 1 chút (nồng độ muối tương ứng với các đỉnh này là 0,55 và 0,525 M NaCl). Như vậy, phương pháp sắc ký trên cột CMC đã tách được ít nhất 2 đỉnh RNaza. Mặt khác, nếu xét về khía cạnh làm sạch enzym thì sắc ký trên cột CMC ở pH = 5,25 là không thích hợp, để sử dụng sắc ký trên chất mang này một cách hiệu quả cần phải tìm giá trị pH khác thích hợp hơn.

b. Kết quả sắc ký trao đổi ion trên cột SP Sepharose 4 Fast Flow

Quá trình sắc ký trên cột với chất mang là cationit khác - SP Sepharose 4 Fast Flow (SP), cũng được tiến hành tương tự như với chất mang CMC. Kết quả của một trong các thí nghiệm này được trình bày trên hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ chế phẩm nọc rắn hổ mang chứa nhận được trên cột trao đổi ion SP Sepharose 4 Fast Flow (Ø1 × 20 cm). Ghi chú như trên hình 2. Gradient nồng độ muối (0 - 1,0 M)

Kết quả trên hình 3 cho thấy khi sắc ký trên cột SP, thì toàn bộ protein của nọc rắn hổ mang chứa đều hấp phụ trên cột trao đổi ion. Tuy nhiên, khi thổi protein ra khỏi cột bằng gradient nồng độ NaCl, các protein vẫn không tách ra được thành các đỉnh riêng biệt, mà ra khỏi cột ở dạng 1 đỉnh chính với các chân đỉnh rất rộng, đặc biệt là chân đỉnh phía bên phải. Kết quả đo hoạt tính RNaza cho thấy có tới 5 đỉnh RNaza riêng biệt, trong đó có 4 đỉnh chính và 1 đỉnh phụ, được ký hiệu tương ứng là E1 (đỉnh phụ), E3, E3, E4 và E5, với nồng độ muối mà chúng phản hấp phụ khỏi cột tương ứng là 0,18; 0,32; 0,42; 0,52 và 0,59 M NaCl, trong đó E1 trùng với đỉnh protein phụ, E2 trùng với đỉnh protein

chính và 3 đỉnh enzym còn lại nằm ở vai phải của đỉnh protein chính. Tuy nhiên, sau 24 h đo lại hoạt tính, thì chỉ có 4 đỉnh đầu còn hoạt tính, đỉnh E5 bị mất hết hoạt tính. Như vậy, trong nọc rắn hổ mang chứa có ít nhất 4 dạng (đỉnh) RNase phát hiện được bằng phương pháp sắc ký trên cột SP.

3. Kết quả phân tách RNaza bằng phương pháp sắc ký sàng lọc phân tử

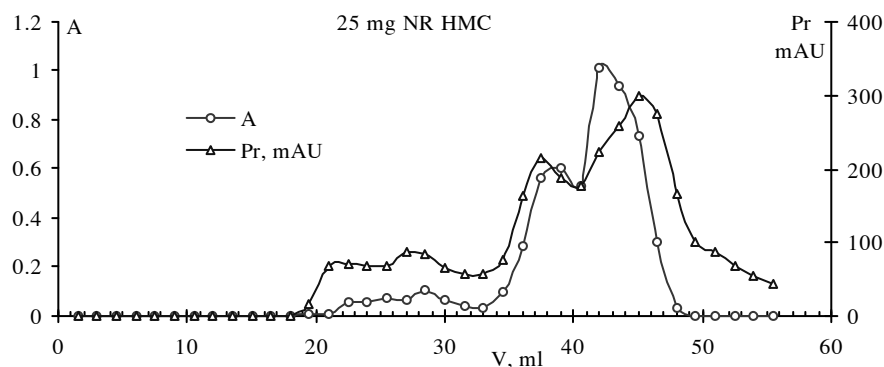
Sau khi biết được thông tin về việc phân tách các protein nọc rắn hổ mang chứa theo điện tích không mang lại hiệu quả cao do điện tích của chúng khá gần nhau, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tìm khả năng phân tách chúng theo

kích thước bằng phương pháp sắc ký sàng lọc phân tử trên cột với chất mang là Superdex 200 và 75.

a. *Kết quả sắc ký sàng lọc phân tử trên cột Superdex 200 (S-200)*

Sắc ký sàng lọc phân tử đã được tiến hành

với 3 lượng nọc rắn khác nhau là 12; 25 và 50 mg (pha trong 1-1,5 ml dung dịch đệm xitrat natri 10 mM, pH = 5,25), mỗi phân đoạn thu với thể tích 1 - 1,5 ml. Sắc ký đồ nhận được sau khi chạy sắc ký với 25 mg nọc rắn đông khô được biểu diễn trên hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ của chế phẩm nọc rắn hổ mang đông khô nhận được trên cột Superdex 200 (Ø1 × 60 cm). A. Hoạt tính RNaza, OD₂₆₀; Pr. Hàm lượng protein, OD₂₈₀; V. Thể tích ra khỏi cột, ml

Kết quả sắc ký với các lượng nọc rắn khác nhau được tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1

Phân bố hoạt tính RNaza giữa các đỉnh enzym (%) từ kết quả chạy sắc ký trên cột S-200 với các lượng nọc rắn hổ mang chứa khác nhau

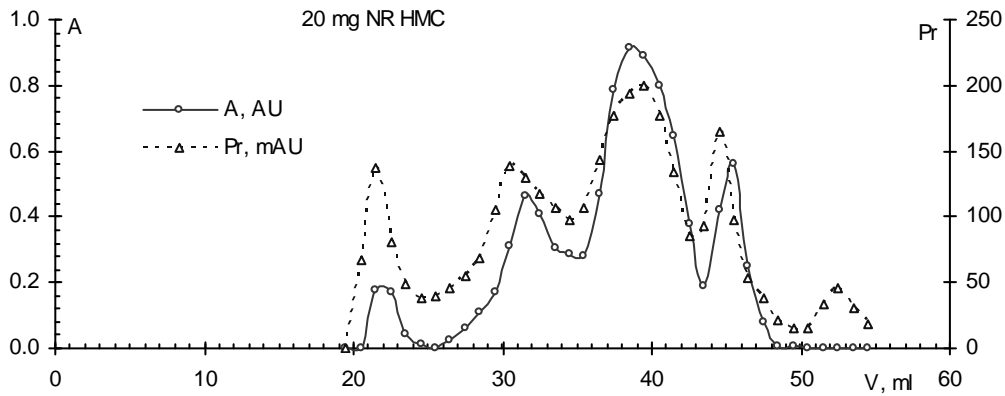
Lượng nọc rắn cho lên cột sắc ký	% hoạt tính của các đỉnh enzym		
	Đỉnh 1	Đỉnh 2	Đỉnh 3
50 mg	10,8	31,8	48,4
25 mg	8,6	33,1	58,5
12 mg	2,7	21,3	76,0

Kết quả chạy sắc ký trên cột S-200 cho thấy protein của nọc rắn hổ mang chúa được phân tách ra thành 3-4 đỉnh, còn RNaza - phân tách ra được thành 3 đỉnh, trong đó có 2 đỉnh chính (E2 và E3) gần trùng với 2 đỉnh protein lớn và 1 đỉnh phụ (E1) nằm trong vùng 2 đỉnh protein nhỏ. Khi tăng lượng nọc rắn được sử dụng cho chạy sắc ký từ 12 lên 50 mg, tỉ lệ % hoạt tính của đỉnh chính E3 giảm từ 76% xuống 48,4%, trong khi đó hoạt tính của đỉnh phụ E1 lại tăng từ 2,7% lên 10,8%, còn tỉ lệ % hoạt tính enzym của đỉnh chính E2 biến đổi không nhiều (bảng 1).

b. *Kết quả sắc ký sàng lọc phân tử trên cột với Superdex 75 (S-75)*

Để tìm hiểu rõ hơn khả năng phân tách RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa bằng phương pháp sắc ký sàng lọc phân tử, chúng tôi đã sử dụng chất mang S-75 (có độ phân giải protein tối ưu từ 3 000 - 70 000 Da, hẹp hơn so với S-200). Quá trình sắc ký trên chất mang này cũng được tiến hành như với chất mang S-200. Kết quả chạy sắc ký với 20 mg nọc rắn được trình bày trên hình 5.

Sắc ký đồ trên hình 5 cho thấy, protein của nọc rắn phân tách được thành 5 đỉnh riêng biệt, và RNaza tách được thành 4 đỉnh (trùng với 4 đỉnh protein đầu), với thể tích ra khỏi cột tương ứng là 21,3; 31,3; 38,3 và 45,3 ml và phân bố hoạt tính giữa các đỉnh RNaza này là 4,4; 23,8; 55,4 và 16,4%.

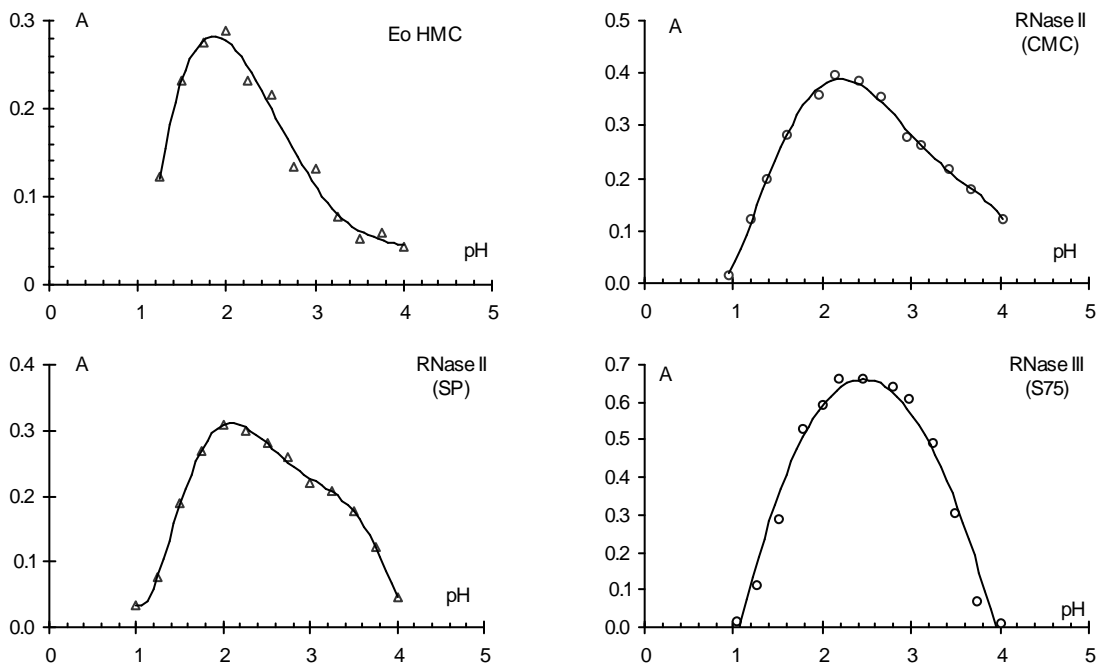


Hình 5. Sắc ký đồ của chế phẩm nọc rắn hổ mang chứa đông khô nhận được sau sắc ký trên cột Superdex 75 (ghi chú như trên hình 4)

4. Kết quả nghiên cứu sự phụ thuộc hoạt tính của RNaza từ nọc rắn hổ mang chứa vào pH

Trong tất cả các thí nghiệm trình bày ở các

phần trên, hoạt tính RNaza đều được đo trong đệm glyxin 10 mM pH 2,5. Trên hình 6 là kết quả nghiên cứu mối phụ thuộc hoạt tính RNaza trong các chế phẩm enzym khác nhau từ nọc rắn hổ mang chứa.



Hình 6. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc hoạt tính RNaza trong một số chế phẩm enzym khác nhau từ nọc rắn hổ mang chứa vào pH, trong đó E_o HMC là chế phẩm enzym nhận được khi hòa tan (10 mg/ml) nọc rắn hổ mang chứa đông khô trong dung dịch đệm, RNaza II và III là các chế phẩm enzym ứng với các đỉnh RNaza nhận được sau sắc kí trên cột với các chất mang tương ứng. Hoạt tính RNaza được đo trong hỗn hợp đệm Glixin-Xitrat 10 mM.

Từ các đồ thị biểu diễn mối phụ thuộc A - pH trên hình 6 ta thấy, RNaza nọc rắn hổ mang

chứa trong tất cả các chế phẩm enzym khác nhau đều thể hiện hoạt tính xúc tác trong vùng giá trị

pH axit, giống như RNaza trong nọc rắn hổ mang [8]. Thống kê theo tất cả các lần xác định pH tối ưu của RNaza cả trong chế phẩm nọc rắn hổ mang chúa đông khô và trong các đỉnh RNaza nhận được trong các lần sắc ký khác nhau, chúng tôi nhận được giá trị trung bình là $pH_{opt} = 2,00 \pm 0,25$ (với $n = 28$).

Trên đây là một số kết quả sơ bộ nghiên cứu về RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa. Từ các kết quả nhận được chúng ta thấy RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa là một enzym rất bền nhiệt. Đây cũng là một tính chất chung của nhiều enzym thuộc nhóm RNaza. Tính chất này có thể được sử dụng trong tách chiết và làm sạch RNaza từ nguồn enzym này. Kết quả phân tách RNaza bằng các phương pháp sắc ký trao đổi ion cho thấy ở giá trị pH 5,25 các protein của nọc rắn khác biệt nhau không nhiều về điện tích bề mặt, cho nên chúng được thổi ra khỏi các cột trao đổi ion không thành các đỉnh protein riêng biệt tách ra cách nhau, mà hầu hết protein trong nọc rắn đều tập trung trong 1 đỉnh protein lớn, có 2 vai dài với một số đỉnh nhỏ về 2 phía của đỉnh protein chính này. Nếu như cột CMC chỉ phân tách được RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa thành 2 - 3 đỉnh (dạng), thì cột SP lại tách được tới 5 đỉnh (dạng) RNaza khác nhau. Tuy nhiên, đỉnh RNaza thứ năm lại mất hoạt tính enzym nhanh (sau 24 h đo lại đã không còn hoạt tính, hình 3). Mặt khác, các protein trong nọc rắn hổ mang chúa lại khác biệt nhau khá nhiều về kích thước phân tử: cột S-200 tách được 4 đỉnh protein khá rõ ràng và 3 đỉnh RNaza; trong khi đó cột S75 tách được 5 đỉnh protein và 4 đỉnh RNaza; các đỉnh enzym này có vị trí trùng gần như hoàn toàn với các đỉnh protein tương ứng, chỉ đỉnh protein thứ 5 ra khỏi cột sau cùng ứng với vùng kích thước phân tử rất nhỏ là không có hoạt tính enzym. Từ các kết quả này ta thấy khi sắc ký được tiến hành trong đệm xitrat 10 mM pH 5,25, sắc ký trên các cột SP và S75 cho phép tách RNaza thành các dạng phân tử khác nhau về điện tích và kích thước tương ứng, nhưng hầu như không làm sạch được RNaza. Để sử dụng các phương pháp sắc ký cho làm sạch RNaza từ nọc rắn hổ mang chúa một cách hiệu quả, cần phải tiến hành các nghiên cứu tối ưu hoá để các điều kiện sắc ký, cho phép tách được RNaza ra khỏi các protein khác của nọc rắn.

Cuối cùng cũng phải nhận xét rằng, cũng như

RNaza từ nọc rắn hổ mang *Naja naja*, RNaza từ nọc rắn hổ mang chúa *Ophiophagus hannah* cũng thể hiện hoạt tính xúc tác cao nhất trong vùng axit, với giá trị $pH_{opt} = 2,0$. Như vậy, RNaza trong nọc rắn hổ mang và hổ mang chúa rất giống nhau về các tính chất sinh học và xúc tác: chúng đều có pH_{opt} trong vùng axit, đều là các enzym rất bền nhiệt và tồn tại ở nhiều dạng phân tử khác nhau. Điều này có lẽ chỉ ra mối quan hệ họ hàng rất gần nhau của 2 loài rắn này của nước ta. Theo mối phụ thuộc hoạt tính xúc tác vào pH, 2 loài rắn hổ mang này của nước ta khác xa rất nhiều các loài rắn hổ mang khác cũng như các loài rắn khác đã được nghiên cứu trên thế giới với giá trị $pH_{opt} > 7$.

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả trình bày trên đây có thể kết luận như sau: RNaza trong nọc rắn hổ mang chúa Việt Nam là enzym rất bền nhiệt, thể hiện hoạt tính xúc tác cao nhất trong vùng axit với giá trị $pH_{opt} = 2,00 \pm 0,25$ và có ít nhất 4 dạng phân tử khác nhau về kích thước và điện tích bề mặt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Harder J., Schroder J. M.**, 2002: J. B. C., 277: 46779-46784.
2. **Hooper L. V., Stappenbeck T. S., Hong C. V., Gordon J. I.**, 2003: Nat. Immunol., 4: 269-273.
3. **James R., Cleanthous C., Moore G. R.**, 1996: Microbiology, 142: 1569-1580.
4. **Kim J. S., Soucek J., Matousek J., Raines R. T.**, 1995: JBC, 270: 10525-10530.
5. **Leland P. A., Staniszewski K. E., Kim B. M., Raines R. T.**, 2001: J. B. C., 276: 43095-43102.
6. **Lers A. et al.**, 1998: Plant Mol. Biol., 36: 439-449.
7. **Mahalakshmi Y. V., Jagahnadham M. V., Pandit M. W.**, 2000: IUBMB Life, 49: 309-316.
8. **Nguyễn Văn Thiết**, 2005: Tạp chí Dược liệu, 10(5): 153-158.
9. **Nguyễn Văn Thiết, Giang Thái Sơn**, 2006: Tạp chí Sinh học, 28(3): 83-87.

10. Potenza N., Salvatore V., Migliozi A., Martone V., Nobile V., Russo A., 2006: Nucleic Acids Research, 34: 2906-2913 (PMID: 6179462).
11. H. F. Rosenberg, Domachowske J. B., 2001: Journal of Leukocyte Biology, 70: 691-698.
12. Sen G. C., Lengyel P., 1992: JBC, 267: 5017-5020.

THE RESULTS OF STUDIES ON RIBONUCLEASE FROM KING COBRA VENOM (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

NGUYEN VAN THIET

SUMMARY

In this paper Ribonuclease (RNase) from Vietnam king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom was characterized in detail by ion-exchange chromatographic methods and its some properties were studied. It seems that king cobra venom RNase is very thermostable: treatment by heating enzyme solutions (in a water bath) for 5 min at temperature from 70°C to 100°C almost does not abolish its activity. The existence of this enzyme in multiple molecular forms was confirmed by chromatographic methods, including ion-exchange chromatography on columns with CM-cellulose and SP Sepharose 4 Fast Flow and gel-filtration on columns with Superdex 200 and Superdex 75. These methods have revealed at least 4 molecular forms of this enzyme differing in net charge and 4 forms differing in molecular size. The enzyme is the most active in the pH range of 1.5 - 4.0 and its pH optimum is about 2.00 ± 0.25 in glycine or in mix glycine-citrate (in a ratio 1: 1) buffers. These properties of RNase from Vietnam king cobra venom is very similar to those ones of the enzyme from Vietnam cobra venom.

Ngày nhận bài: 13-3-2007