

TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH α -CONOTOXIN CỦA MỘT SỐ LOÀI ỐC CỎI THU TẠI VỊNH NHA TRANG

EXTRACT AND IDENTIFY α -CONOTOXIN OF CONE SNAILS COLLECTED FROM NHA TRANG BAY

Nguyễn Thị Anh Thư*, Đặng Thúy Bình, Nguyễn Thị Xuân Diệu
Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang
email: anhthu12th@gmail.com

ABSTRACT

Conotoxins (CTX) from the venom of marine cone snails (genus *Conus*) have been used in pharmacy because they are highly diverse pharmacological activities. In this study, *Conus textile*, *Conus quercinus* and *Conus tessulatus* from Nha Trang beach were extracted RNA from their venome. After amplifying by RT-PCR and sequencing, three peptides were identified. Three of them share an α 4/7 subfamily α -conotoxins common cysteine pattern (CCX4CX7C, two disulfide bonds). The cDNA of Ts1 and Tx3 encode a precursor of 42 residues. The cDNA of Qu8 encodes a precursor of 40 residues. The additional residue Gly of Tx3 and Qu8 is a prerequisite for the amidation of the preceding C-terminal Cys. All three sequences have -X-Arg- common signal sequence before the mature peptide sequences. Percent identities of amino acid sequences of the propeptide region exhibited high conservation, whereas the sequences of the mature peptides are highly divergent. The study of these toxins will facilitate a better understanding of the relationship of their structure and function, as well as the process of their evolutionary relationships.

Key words: α -conotoxin; RT-PCR; *Conus textile*, *Conus tessulatus*, *Conus quercinus*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ốc cối (*Conus* spp.) là loài sinh vật biển không xương sống và rất đa dạng với trên 700 loài, mỗi loài đều tạo ra loại độc tố riêng (Terlau và Olivera 2004). Độc tố của ốc cối là nguồn quan trọng cung cấp các chất có dược tính cao. Độc tố là một hỗn hợp các peptide ngắn, giàu liên kết disulfide (conotoxin - CTX). Nhiều độc tố tấn công cả hai hệ thống thần kinh trung ương và ngoại biên (Wang và Chi 2004), vì vậy có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực khoa học thần kinh. Độc tố được sử dụng trong trị liệu giảm đau, động kinh và các rối loạn thần kinh khác (Heading 2002; Wermeling *et al.* 2003; Nelson 2004; Staats *et al.* 2004). Theo ước tính, tuyến độc tố của 1 loài ốc cối có thể chứa từ 50 đến 200 loại độc tố khác nhau (Armishaw *et al.* 2005).

Mỗi peptide của ốc cối trước tiên được dịch mã thành tiền thân peptide (60 đến 90 amino acid), sau đó được xử lý thành đoạn peptide trưởng thành khoảng 8-40 amino acid. Độc tố (conotoxin) được chia thành các liên họ (A-, O-, M-, T-, P-, S-, I-superfamily) xác định bởi cầu nối disulfide, và tiếp tục chia thành các họ theo cách thức hoạt động của chúng. Một số liên họ khác chưa được xác định bao gồm conopressin, contryphan, conantokin, và contulakin, tất cả trong số chúng chứa cả hai hoặc chỉ chứa một cầu nối disulfide (Olivera *et al.* 2001; Jimenez *et al.* 2003).

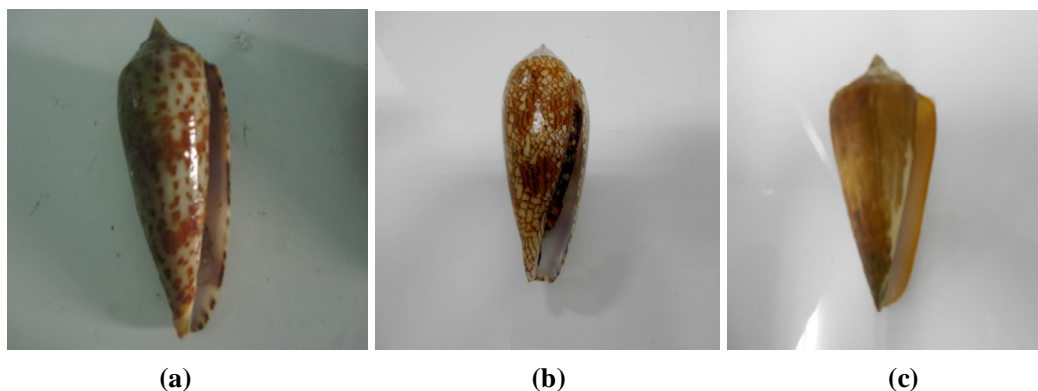
Luo và ctv (2012) đã nhận diện α 4/7-conotoxin TxIB từ *Conus textile*. Peng và ctv (2009) đã xác định Qc1.2 thuộc α 4/4 conotoxin từ *Conus quercinus*. Conotoxin Ts14a từ *Conus tessulatus* có khung cystein C-C-C-C, có 2 cầu nối disulfua C1-C3 và C2-C4 và trình tự bảo tồn ở vùng peptide tín hiệu giống α -conotoxin, là một thành viên mới thuộc liên họ A-superfamily, được đặt tên là α 1-conotoxin (Peng C 2010).

Nghiên cứu này tập trung vào các α -conotoxin của 3 loài ốc cối *Conus tessulatus*, *Conus textile* và *Conus quercinus*, xác định trình tự các amino acid của vùng độc tố nhằm làm sáng tỏ mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của độc tố.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP:

Địa điểm và phương pháp thu mẫu:

Ốc cối (*Conus* spp.) được thu tại vịnh Nha Trang trong năm 2012. Các loài khảo sát gồm: *Conus textile*, *Conus tessulatus*, và *Conus quercinus* (Hình 1). Ốc cối được thu sống, vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm và bảo quản ở -40°C . Mỗi loài chọn 5 cá thể cho nghiên cứu độc tố.



Hình 1: 3 loài ốc cối để phân tích trình tự độc tố α -conotoxin thu từ vịnh Nha Trang: *Conus tessulatus* (a), *Conus textile* (b), *Conus quercinus* (c)

Tách chiết RNA tổng số

ARN tổng số của tuyến độc tố ốc cối được tách chiết bằng bộ kit tách chiết RNA IQTM2000 (GeneReach Biotechnology - Đà Loan) được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA tách chiết được bảo quản ở -40°C .

Tổng hợp cDNA và tiến hành phản ứng RT-PCR

cDNA của tuyến độc tố ốc cối được tổng hợp bằng bộ kit tổng hợp cDNA của Công ty cổ phần Việt Á theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đoạn gen mã hóa cho α -conotoxin được khuếch đại bằng cặp mồi gồm mồi xuôi (5' TCT G ATG GCA GGA ATG ACG CAG 3') và mồi ngược (5' TCG TGG TTC AGA GGG TCC TGG 3') (Lou và ctv 2006) được thiết kế dựa trên vùng bảo tồn của đoạn propeptide và của vùng không dịch mã (3' UTR). Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50 μl (bao gồm 20 ng khuôn DNA, Dream Taq buffer 1X (Fermentat), 0,25 nM mỗi loại dNTP, 0,2 pM mỗi mồi, 2 mM MgCl_2 và 1 đơn vị Dream Taq polymerase (Fermentat),) trên máy luân nhiệt Icyler (Bio-rad) theo chương trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu tại 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và giai đoạn cuối ở 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% nhuộm ethidium bromide. Kết quả được ghi nhận sử dụng hệ thống ghi ảnh gel tự động GelDoc và phần mềm Quantity One[®] (Bio-rad).

Cloning (tạo dòng) và giải trình tự

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng bộ kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được chèn vào vector pGEM-T Easy thông qua bộ kit TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen). Sản phẩm mang gen mã hóa cho các conopeptide tiền thân được giải trình tự và phân tích trên máy phân tích trình tự tự động ABI Prism[®] 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems). Các trình tự được kết nối bằng phần mềm Vector NTI v.11. Trình tự độc tố của các loài nghiên cứu được so sánh với các trình tự trên ngân hàng quốc tế Genbank: mã số gen *qc1.1* AY580319, *QC1.3* AY588972, *Tx2* AF146353, *Tx1* AF146352, *TeA21P* DQ141135.

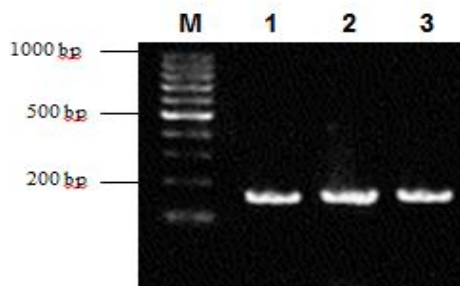
Danh pháp và phân tích trình tự của họ α -conotoxin

3 trình tự thu được từ các loài ốc cối được ký hiệu như sau: *Conus tessulatus* (Ts1), *Conus textile*, (Tx3) và *Conus quercinus* (Qu8). Trình tự của các loại độc tố được xác nhận bằng chương trình BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sau đó, sử dụng phần mềm chuyển trình tự nucleotide thành amino acid (<http://www.fr33.net/translator.php>) và chọn frame không có các stop codon, đồng thời có khung CC-C-C để phân tích.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại gen độc tố

Sản phẩm PCR khuếch đại từ cDNA của tuyến độc tố 3 loài ốc cối *Conus tessulatus*, *Conus textile* và *Conus quercinus* có kích thước 150 bp phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 2). Kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Luo và ctv (2006).



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen α -conotoxin của ốc cối. Giếng M: thang chuẩn DNA 100bp (GeneRuler™); Giếng 1: sản phẩm của *Conus textile*; Giếng 2: sản phẩm của *Conus quercinus*; Giếng 3: sản phẩm của *Conus tessulatus*.

Trình tự amino acid của α -conotoxin

Sản phẩm PCR được cloning và giải trình tự. Đoạn trình tự thu được có chiều dài lần lượt là *Conus tessulatus* 153bp, *Conus textile* 153bp, và *Conus quercinus* là 150bp. Kết quả phân tách được 3 đoạn peptide Ts1 từ *Conus tessulatus*, Tx3 từ *Conus textile*, Qu8 từ *Conus quercinus* có cấu trúc là tiền peptide của α -conotoxin bao gồm một vùng tiền peptide có đuôi N, theo sau là vùng độc tố trưởng thành và kết thúc bởi đuôi 3'-UTR. Tất cả các đoạn peptide trưởng thành có 17-21 amino acid và khung cơ bản của α -conotoxin (CC-C-C) với 4 và 7 amino acid giữa các cystein nên chúng được xếp vào phân họ α 4/7 conotoxin (Hình 3).

Tiền thân độc tố của Ts1 có chiều dài 42 amino acid, bao gồm đuôi N (N-terminal) và khung cystein (vùng in đậm). Vùng độc tố trưởng thành của Ts1 được phân tách với vùng tiền trưởng thành tại vị trí XR có chiều dài 20 amino acid (Hình 3a).

Tiền thân độc tố của Tx3 có chiều dài lần lượt 42 amino acid, bao gồm đuôi N (N-terminal) và khung cystein (vùng in đậm). Vùng độc tố trưởng thành của Tx3 được phân tách với vùng tiền trưởng thành tại vị trí XRR có chiều dài tương ứng là 21 amino acid. Sau vùng độc tố trưởng thành của Tx3 có 2 gốc Glycine nên được amide hóa cắt ngắn đuôi C (C-terminal) còn lại 17 amino acid (Hình 3b).

Tiền thân độc tố của Qc8 có chiều dài 40 amino acid, bao gồm đuôi N (N-terminal) và khung cystein (vùng in đậm). Vùng độc tố trưởng thành của Qc8 được phân tách với vùng tiền trưởng thành tại vị trí XR có chiều dài 21 amino acid. Sau vùng độc tố trưởng thành của Qc8 có 3 gốc Glycine nên cũng được amide hóa cắt ngắn đuôi C (C-terminal) còn lại 17 amino acid (Hình 3c).

(a) Ts1 từ *Conus tessulatus*

ATT	TCT	GAT	GGC	AGG	AAT	GAC	GCA	GCC	AAC	GAC	AAA	GCG	TCT	GAC	CTG	48
I	S	D	G	R	N	D	A	A	N	D	K	A	S	D	L	
GTC	GGT	CTG	AAC	GTC	AGG	GGA	TGC	TGT	TCT	CAT	CCT	GCC	TGT	TAC	GTG	96
V	G	L	N	V	R	G	C	C	S	H	P	A	C	Y	V	
AAT	AAT	CCA	CAC	ATT	TGT	ACT	CGA	AGA	CGC	TGA	tgctccaggaccctctgaaccacg				153	<u>N</u>

(b) Tx3 từ *Conus textile*

GAT	TTC	TGA	TGG	CAG	GAA	TGA	CGC	AGC	CAA	ACG	TCT	GGC	CTG	GTC	AGT	48
D	F	*	W	Q	E	*	R	S	Q	T	S	G	L	V	S	

CTG	ACT	GAC	AGG	AGA	CCA	GAA	TGC	TGT	ACT	GAT	CCT	CGC	TGT	AAC	TCG	96
L	T	D	R	R	P	E	C	C	T	D	P	R	C	N	S	
AGT	CAT	CCA	GAA	CTT	TGT	GGA	GGA	AGA	CGC	TGA	tgtccaggaccctctgaaccag					153
(c) Qc8 từ <i>Conus quercinus</i>																
TCT	GAT	GGC	AGG	AAT	GAC	GCA	GCC	AAT	GAC	AAA	GCG	TCT	GAC	CTG	ATG	48
S	D	G	R	N	D	A	A	N	D	K	A	S	D	L	M	
GCT	CTT	AGG	GAT	GGA	TGC	TGT	TCC	AAT	CCT	TCC	TGT	TCC	GTG	AAC	AAT	96
A	L	R	D	G	C	C	S	N	P	S	C	S	V	N	N	
CCA	GAC	ATC	TGT	GGC	GGA	GGA	CGC	TGA	tgetccaggaccctctgtccacgaate					150		
P	D	I	C#	G	G	G	R	STOP	C-terminal							

Hình 3: Trình tự nucleotide và peptide của 6 trình tự (a) *Ts1*, (b) *Tx3*, (c) *Qu8*. Vùng peptide trưởng thành được gạch dưới. Các ký tự nhỏ là vùng nucleotide không mã hóa. Các Cystein và codon kết thúc được in đậm. Trước đuôi C-terminal có glycine được chỉ ra bằng dấu #. Dấu * là bộ ba kết thúc (stop codon). Ký hiệu amino acid theo danh pháp quốc tế.

So sánh trình tự amino acid các α -conotoxin của ốc cối

Bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu National Center for Biotechnology Information (NCBI) để tìm kiếm các trình tự gen và peptide tương đồng với các conotoxin được tìm thấy từ *Conus textile*, *Conus tessulatus* và *Conus quercinus*, 11 tiền thân α -conotoxin đã được mô tả (Hình 4).

Có 4 tiền thân peptide thu từ loài ốc ăn động vật thân mềm (ĐVTM) *Conus textile* (Tx1, Tx2, Tx3 và TeA21P), 3 tiền thân peptide từ loài ốc ăn giun biển *Conus quercinus* (qc1.1, QC1.3, Qc8) và 1 tiền thân peptide từ loài ốc ăn giun biển *Conus tessulatus* (Ts1). Có 4 tiền thân peptide có đầy đủ vùng tín hiệu. Hầu hết các gốc amino acid của vùng tín hiệu là các amino acid ưa nước (M, F, L, V, A). Chúng có một trình tự chung Met-Gly-met-Arg-Met-Met-Phe-X1-X2-Phe-X3-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Thr-Val-X5-X6. Các gốc bảo tồn thì được đánh dấu (phần đánh dấu), tại vị trí X1-X2 đại diện Thr-Val, Ile-Met hoặc Val-Val; X3 đại diện cho Leu hoặc Met; X4 đại diện cho Thr, Ile hoặc Ser; và X5-X6 đại diện cho các gốc Val-Ser, Asp-Thr hoặc Val-Thr. Vùng peptide tiền trưởng thành được in đậm bao gồm phần lớn các amino acid ưa nước (19–43%) và nhiều amino acid cơ bản như: Arg, Lys, His (13–26%). Có 8 gốc được bảo tồn trong vùng tiền trưởng thành 21–28 amino acid. 1 hoặc 2 gốc amino acid trước vùng trưởng thành thường là Lys hoặc Arg tạo điều kiện cho quá trình cắt bởi enzyme endoprotease. Vùng độc tố trưởng thành có duy nhất 4 gốc Cys được bảo tồn hoàn toàn có một motif chung (-CCX4CX7C-) liên quan đến α 4/7 conotoxin (Hình 4).

	Vùng tín hiệu (S)	Peptide tiền trưởng thành (Pro)	Peptide trưởng thành (M)
Tx2	MGMRMMFTVFLVVLATTVVS	FTSGRRTFHGRNAAA	KASGLVSLTDRR <u>PECCSHPACNVDHPEICR</u>
QC1.3	MGMRMMFIMFMLVVLAITVVS	FTSDHA	SDGRNTAANDKASKLMALR <u>NECCDNPPCKSSNPDLCDWRS</u>
qc1.1	MGMRMMFIMFMLVVLAITVVS	FTSDHA	SDGRNTAANDKASKLMALR <u>DECCPDPPCKASNPDLCDWRS</u>
Tx1	MGMRMMFVVFLVVLASTVVS	STSGRRAFHGRNAAA	KASGLVSLTDRR <u>PECCSDPRCNSSHPELC*GRRR</u>
TeA21P		SDGRNDAA	KASGLVSLTDRR <u>PECCSDPRCNSSHPELC*G</u>
Ts1		SDGRNDAANDKASDLVGLNVR	<u>GCCSHPACYVNNPHICTRRR</u>
Tx3		RSQTSGLVSLTDRR	<u>PECCDPRCNSSHPELC*GRRR</u>
Qc8		SDGRNDAANDKASDLALRD	<u>GCCSNPSCSVNNPDIC*GGRR</u>

Hình 4: So sánh 3 trình tự conotoxins mới tìm thấy với các trình tự tương đồng khác trong họ α 4/7 conotoxin. Các gốc bảo tồn được bôi đen, vùng độc tố trưởng thành được gạch chân. Ký tự trước G (Gly) chỉ quá trình amide hóa đuôi C.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xác định 3 trình tự độc tố α 4/7 conotoxin Ts1, Tx3, Qc8 từ các loài tương ứng *Conus tessulatus*, *Conus textile*, *Conus quercinus* và so sánh với các trình tự gen, các peptide tương đồng có trên genbank.

Vùng độc tố trưởng thành của độc tố ốc cối là một đoạn peptide ngắn khoảng 20 amino acid và có sự đa dạng, vùng peptide tiền trưởng thành có tính bảo tồn cao. Một số amino acid đặc biệt trong các vùng khác nhau của tiền thân độc tố α 4/7 conotoxin có tỷ lệ tương đồng cao. Tuy nhiên, quá trình biến đổi hậu dịch mã và hoạt động sinh học của các độc tố chưa được

ngiên cứu sâu. Đặc biệt, độc tố của 3 loài *Conus textile*, *Conus tessulatus*, *Conus quercinus* cung cấp một nguồn hữu ích trong ngành dược lý để khảo sát các đặc trưng của nAChRs. Do đó việc phân tích cấu trúc conotoxin là cần thiết cho nghiên cứu chức năng của các gen tương ứng, mặc dù thực tế là tiềm năng hoạt động sinh học rất khó xác định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- C. J. Armishaw and P. F. Alewood, 2005. "Conotoxins as research tools and drug leads." Current Protein and Peptide science **6**(3): 221-240.
- C. E. Heading, 2002. "Conus peptides and neuroprotection." Curr Opin Investig Drugs **3**(6): 915-920.
- E. C. Jimenez, R. P. Shetty, M. Lirazan, J. Rivier, C. Walker, F. C. Abogadie, D. Yoshikami, L. J. Cruz and B. M. Olivera, 2003. "Novel excitatory Conus peptides define a new conotoxin superfamily." Journal of Neurochemistry **85**(3): 610-621.
- L. Nelson, 2004. "Venomous snails: One slip, and you're dead." Nature **429**(6994): 798-799.
- B. M. Olivera and L. J. Cruz, 2001. "Conotoxins, in retrospect." Toxicon **39**(1): 7-14.
- Y. M. Peng C, Wang Y, Shao X, Yuan D, Liu J, Hawrot E, Wang C, Chi C, 2010. "A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily." Peptides. **31**(11): 2009-2016.
- P. S. Staats, T. Yearwood, S. G. Charapata, R. W. Presley, M. S. Wallace, M. Byas-Smith, R. Fisher, D. A. Bryce, E. A. Mangieri, R. R. Luther, M. Mayo, D. McGuire and D. Ellis, 2004. "Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial." Jama **291**(1): 63-70.
- D. Wermeling, M. Drass, D. Ellis, M. Mayo, D. McGuire, D. O'Connell, V. Hale and S. Chao, 2003. "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intrathecal Ziconotide in Chronic Pain Patients." The Journal of Clinical Pharmacology **43**(6): 624-636.