

THÔNG BÁO KHOA HỌC

PHÂN TÍCH PEPTIDE TRONG NỌC ĐỘC CỦA ỐC NÓN CONUS MARMOREUS Ở VÙNG BIỂN KHÁNH HOÀ BẰNG LC MALDI-TOF MS

STUDY ON VENOM PEPTIDE DERIVED FROM CONUS MARMOREUS COLLECTED IN KHANH HOA USING LC MALDI-TOF MS

Nguyễn Bảo¹, Trần Văn Khoa¹, Jean-Pièrre LECAER², Ngô Đăng Nghĩa³, Bùi Trần Nữ Thanh Việt¹, Phan Thị Khánh Vinh¹

Ngày nhận bài: 30/1/2018; Ngày phản biện thông qua: 1/4/2018; Ngày duyệt đăng: 27/4/2018

TÓM TẮT

Độc tố ốc nón có chứa hàm lượng lớn các peptide tấn công lên các kênh ion và thụ thể thần kinh khác nhau. Độc tố của các loài Conus là nguồn dược liệu tiềm năng chưa khai thác. Sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo RP-HPLC để phân tách độc tố của Conus marmoreus ở vịnh Nha Trang, sau đó các phân đoạn được phân tích khối lượng phân tử bằng kỹ thuật MALDI-TOF-MS. Kết quả chạy RP-HPLC cho thấy nọc độc thô có chứa nhiều peptide kỵ nước. Sử dụng kỹ thuật MALDI-TOF-MS đã xác định được tổng cộng 7543 dữ liệu khối lượng thô. Bên cạnh đó, quan sát được 1751 peptide trong nọc độc thô Conus marmoreus ở Vịnh Nha Trang. Trong số đó, chúng tôi xác định được khối lượng phân tử của 39 peptide trong nọc độc loài C. marmoreus ở Việt Nam so với tổng số 92 phân tử peptide của C. marmoreus đã được định danh trước đó.

Từ khóa: Conus marmoreus, Peptide, Nọc độc, LC MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

The venom of cone snails is composed highly conopeptides that target a variety of ion channels and receptors on the nerve system. The venom of Conus genus represents unexploited resources of potential pharmaceutical compounds. The venom of Conus marmoreus collected in Nha Trang Bay was separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and fractions were analyzed using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The results of RP-HPLC showed that the crude venom consists mainly hydrophobic peptides. Using MALDI-TOF MS analysis of crude venom yielded a total of 7543 distinct masses. Besides, there were 1751 compounds found in crude venom of Conus marmoreus in Nha Trang Bay. Among them, we determined the molecular weights of 39 peptides of C. marmoreus venom in Vietnam compared to the total 92 peptides of C. marmoreus previously identified.

Key words: Conus marmoreus, Peptide, Venom, LC MALDI-TOF MS.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Conopeptide là nhóm hợp chất peptide từ nọc độc ốc nón Conus. Các nhà phân loại học ốc ước tính có 500-700 loài Conus được chia làm 3 nhóm chính theo chế độ ăn: cá, nhuyễn thể, giun biển. Mỗi loài Conus có thể sản sinh ra hàng trăm

cho tới hàng ngàn peptide được tính khác nhau tấn công trên một phổ rộng protein xuyên màng (kênh ion, thụ thể bắt cặp protein G, kênh vận chuyển xuyên màng) (Olivera và Teichert 2007, Lewis, Dutertre và cộng sự., 2012). Các phân tử này cung cấp nhiều công cụ nghiên cứu vô

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

² Natural Product Chemistry Institute, National Center for Scientific Research, Gif-sur-Yvette 91198, France

³ Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

giá để khảo sát tỉ mỉ vai trò sinh lý thần kinh của các loại kênh ion chuyên biệt (McIntosh, Hasson và cộng sự., 1995, McIntosh, Santos và cộng sự., 1999). Conopeptide được xem là nguồn dược liệu đầy hứa hẹn để tìm ra thuốc điều trị đặc hiệu các bệnh rối loạn thần kinh vì phân tử peptide nhỏ, dễ tổng hợp, và tính đặc hiệu cao.

Ở vùng biển Việt Nam có khoảng 76 loài ốc nón khác nhau, là một nguồn dược liệu phong phú để khai thác trong đó có một số loài ốc chưa được nghiên cứu chuyên sâu, chủ yếu tập trung nhóm sấn môi giun biển và nhuyễn thể. Bên cạnh đó có nhiều loài ốc nón được nhiều nhà nghiên cứu chuyên sâu về nọc độc, một trong số đó phải kể đến *Conus marmoreus*. Việc nghiên cứu nọc độc của *Conus marmoreus* ở vùng biển Khánh Hòa là cần thiết, bởi đó là cơ sở đánh giá tiềm năng nọc độc của loài này, cũng như cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo. Hơn nữa, thành phần và hoạt tính của các conopeptide từ nọc độc ốc nón thay đổi và có ảnh hưởng lớn bởi điều kiện địa lý, môi trường sống và phương pháp lấy và tách chiết.

Một trong những công cụ hiệu quả để đánh giá mức độ phức tạp về thành phần peptide/protein của độc tố là kết hợp kỹ thuật phân tách của sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phân tích khối phổ (Mass spectrometry-MS). Ở đây chúng tôi phân tách độc tố trên cột C_{18} và các phân đoạn độc tố được phân tích bằng kỹ thuật MALDI-TOF-MS (Rodriguez, Dutertre và cộng sự., 2015). Phép đo khối phổ là một phương pháp giúp xác định khối lượng phân tử và hóa học có trong một mẫu bằng cách đo tỷ lệ khối lượng trên điện tích và số lượng của các ion pha khí.

Trong khi đó, MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) là kỹ thuật ion hóa

mẫu dựa trên sự hỗ trợ của các chất nền (acid hữu cơ yếu) và năng lượng laser. Kỹ thuật này được xem là một trong các phương pháp phân tích khối phổ có độ phân giải tốt và cho kết quả với độ chính xác cao.

Tóm lại, HPLC kết hợp kỹ thuật khối phổ MS là phương pháp thường được sử dụng để đánh giá độ phức tạp cũng như những khác biệt về thành phần-cường độ peptide trong nọc độc của cùng một loài. Chính vì lý do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp RP-HPLC kết hợp MALDI-TOF MS trên đối tượng là ốc nón *Conus marmoreus* ở vùng biển Khánh Hòa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Ốc nón *Conus* được khai thác từ bờ biển Kê Gà của vịnh Nha Trang (tỉnh Khánh Hòa), được giữ sống trong bể nhỏ nước biển và vận chuyển về Trung tâm thí nghiệm thực hành (Đại học Nha Trang). Sau khi phân loại học ốc theo phương pháp đã ghi nhận trước đó (Röckel, Korn và cộng sự., 1995), chúng tôi thu được 4 mẫu ốc nón *C. marmoreus* (Linnaeus, 1758) (chiều dài 60 - 70 mm) trong các loài ốc nón *Conus* khai thác được. Ốc sau khi vệ sinh vỏ bên ngoài được bảo quản đông ở -80°C trong tủ đông sâu (Ultra-Low Temperature Freezer -86°C , MDF 236 Lab, Hàn Quốc).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1 Phương pháp phân tích

2.1.1 Phẫu tách tuyến độc và chiết nọc độc thô

Mẫu ốc *C. marmoreus* được đập vỡ vỏ ốc và thu nhận phần thịt ốc. Tiến hành phẫu tách phần thịt bằng kẹp và kéo nhọn để lấy tuyến nọc độc. Tuyến nọc độc được cắt nhỏ, nghiền trong cối sứ và chiết bằng 0,1% trifluoroacetic acid (TFA) qua 4 lần. Phần dịch chiết sau ly tâm được đông khô và bảo quản đông ở nhiệt độ -80°C . Cho 7 mg bột nọc độc đông khô hòa tan

trong 1 mL 0,1% TFA và ly tâm trong 5 phút ở 2000xg để loại bỏ phần nguyên liệu không tan. Phần dịch trong thu hồi, được lọc qua màng lọc Amicon Ultra 10 kDa (Millipore), ly tâm 12,000xg trong 20 phút ở 4°C. Nồng độ protein của nọc độc thô được xác định theo phương pháp Bradford trên máy đo phổ NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), kết quả đối chiếu với mẫu protein huyết thanh bò chuẩn và insulin.

2.1.2 Phân tích và phân đoạn nọc độc *C. marmoreus* bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo

Phân đoạn nọc độc thô *C. marmoreus* được thực hiện lặp lại 3 lần chạy trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp (Shimadzu LC-class 10) sử dụng cột phân tích Vydac C₁₈ (300 Å, 5mm, 4.6 mm i.d. 250 mm). Các phân tử peptide của nọc độc xác định ở các bước sóng UV (220 nm, 254 nm, 280 nm) và rửa giải cùng một chương trình gradient với pha động A (1000 mL H₂O/1 mL TFA) và pha động B (900 mL CH₃CN/100 mL H₂O/1 mL TFA). Chương trình gradient gồm 0% của pha động B trong 10 phút đầu, tăng 0-100% của pha động B trong 90 phút với tốc độ dòng 1mL.phút⁻¹ (Hình 1). Mỗi phân đoạn thực hiện thu dung dịch pha động qua cột Vydac C18 và thoát ra ngoài trong thời gian 1 phút. Chương trình sắc ký thực hiện trong 100 phút và việc thu mẫu từng phân đoạn được thực hiện cẩn thận lặp lại 3 lần. Tổng thể tích của mỗi phân đoạn trong 3 lần thu là 3 mL, sau đó mẫu được sấy ly tâm chân không (ở nhiệt độ 25°C bằng thiết bị SpeedVac™ Concentrator) trong 12 giờ để chuẩn bị cho phân tích khối phổ.

2.1.3. Phân tích khối phổ các phân đoạn độc tố phân tách theo phương pháp MALDI-TOF-MS

Các phân đoạn nọc độc *C. marmoreus* được phân tích bằng máy phân tích khối phổ 4800 MALDI TOF/TOF™ (AB Sciex, Pháp). Thiết bị được trang bị một laser Nd: YAG hoạt động ở bước sóng 355 nm. Mỗi phân đoạn

RP-HPLC sấy khô được hòa tan lại trong 20 µL của 60 % acetonitrile/0,1 % trifluoroacetic axit. Lấy mỗi phân đoạn 0,5 µL trộn với 0,5 µL dung dịch axit cyano-4-hydroxycinnamic (với nồng độ 4 mg/ml trong acetonitrile/methanol 55:30), sau đó nhỏ nhẹ nhàng lên vị trí đặt mẫu của đĩa từ 96-lỗ (AB Sciex) và chờ mẫu khô trước khi đi phân tích. Kết quả thu nhận được thực hiện trên chế độ bay phản hồi điện tích dương.

2.2 Phương pháp xử lý số liệu

Nhận dạng phổ khối MS của conopeptide

Dữ liệu thô của phổ khối lượng (các giá trị *m/z* phát hiện trong mỗi phân đoạn) được xuất ra Excel 2010 Microsoft Office, tiền xử lý bằng công cụ "Remove duplicate masses" và công cụ "Compare mass lists" trên trang web ConoServer (<http://www.conoserver.org>). Các phổ khối lượng chênh lệch trong khoảng 0,1 Da được loại bỏ (Kaas, Yu và cộng sự., 2012). Dữ liệu khối lượng phân tử được lọc tiếp để phát hiện các peptide có liên kết với Na⁺ và K⁺. Dữ liệu đã xử lý của nọc độc *C. marmoreus* (vùng biển Khánh Hòa, Việt Nam) so sánh về khối lượng phân tử với cơ sở dữ liệu chuỗi conopeptide đã công bố của *C. marmoreus* trích xuất từ cơ sở dữ liệu ConoServer.

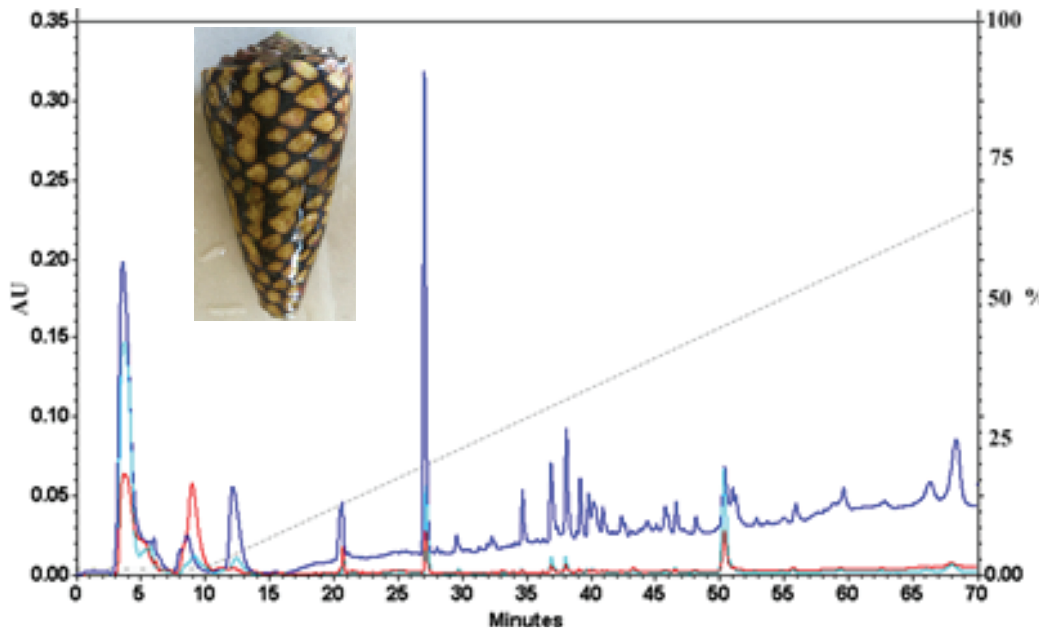
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Sắc ký đồ pha đảo của nọc độc thô *C. marmoreus*

Kết quả sắc ký đồ pha-đảo (viết tắt là RP-HPLC) của nọc độc thô ốc nón *C. marmoreus* được thể hiện trong Hình 1. Chương trình gradient bắt đầu từ phút thứ 10 (với chương trình gradient 0-100% B trong 90 phút) thể hiện bằng đường nét đứt trên sắc ký đồ. Các sắc ký đồ được chồng lên nhau theo thời gian ở các bước sóng UV khác nhau đặc trưng cho một đặc điểm thành phần của peptide, lần lượt như ở bước sóng 220 nm (xanh) đặc trưng các liên kết peptide (-CH-NH-); bước sóng 254 nm (màu xanh lá mạ) hấp thụ mạnh đặc trưng cho

tyrosine; bước sóng 280 nm (màu đỏ) hấp thụ mạnh đặc trưng cho tryptophane. Từ phút 70 trở đi không thể hiện trong Hình 1 vì không còn phân tử peptide nào hấp thụ thêm, tuy nhiên tổng thể sắc ký đồ (tương ứng 90 phút) được thể hiện trong Hình 2. Kết quả sắc ký đồ đa bước sóng UV cung cấp một số thông tin sơ bộ

về thành phần phân bố ưa nước-kỵ nước của hỗn hợp peptide nọc độc, hàm lượng tương đối giữa các thành phần peptide nọc độc theo thời gian lưu trên cột pha đảo (ở bước sóng 220 nm) cũng như thành phần peptide có khả năng hiện diện tyrosine, tryptophane bên trong



Hình 1. Sắc ký đồ pha-đảo (RP-HPLC) của nọc độc thỏ ốc nón *C. marmoreus* qua cột Vydac C18 (300 Å, 5mm, 4.6 mm i.d. 250 mm) với tốc độ dòng 1mL.phút⁻¹.

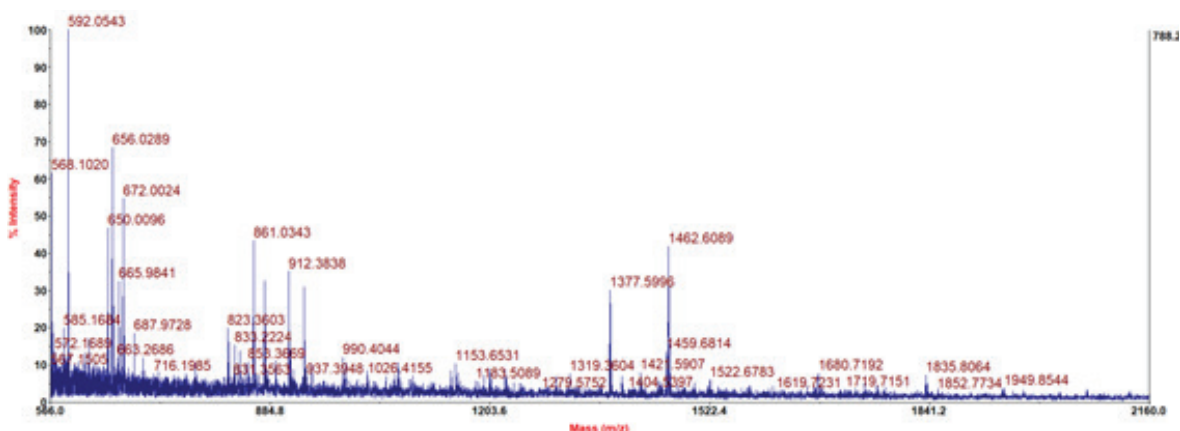
chuỗi peptide (theo thời gian lưu), cụ thể như các phân tử có thời gian lưu ở phút 27 và 50.

Với nọc độc thỏ *C.marmoreus* thì thành phần conopeptide đã phân tập trung vào vùng kỵ nước từ phút 35 trở đi, so với nọc độc của ốc nón *Conus bandanus* được công bố trước đó (Nguyen, Caer và cộng sự., 2014). Kết quả conopeptide rửa giải của nọc độc *C.marmoreus* ở vùng biển Khánh Hòa trên sắc ký đồ cột phân tích khá tương đồng với kết quả sắc ký đồ ion của nọc độc *C.marmoreus* ở vùng biển Great Barrier Reef (Queensland, Úc) (Dutertre, Jin và cộng sự., 2013). Tuy nhiên, có sự khác nhau về số lượng và hàm lượng thành phần conopeptide giữa hai nghiên cứu. Điều này có thể giải thích một trong các yếu tố như điều kiện địa lý và sinh thái khác nhau làm việc sản

sinh ra độc tố khác nhau, thậm chí trên cùng một cá thể ốc nón sản sinh ra độc tố không giống nhau vào thời điểm khác nhau đã được làm rõ trên nọc độc thu nhận từ cá thể sống *Conus purpurascens* (Rodriguez, Dutertre và cộng sự., 2015).

2. Phân tích MALDI-TOF-MS của các phân đoạn độc tố

Phân tích các phân nọc độc phẫu tách bằng phương pháp MALDI-TOF-MS mang lại nhiều ưu điểm ở các mức khác nhau. Các giá trị *m/z* của các thành phần trong mỗi phân đoạn được ghi lại ở chế độ phản xạ (*m/z* 800-5500 Da), vì nó cho phép đo khối lượng phân tử (KLPT) có độ phân giải và độ chính xác cao hơn so với chế độ tuyến tính. Phương pháp đặt mẫu giọt-đề khô (dried-droplet-spotting) để



Hình 2. Phổ khối $[M+H]^+$ của MALDI-TOF MS ở phân đoạn phút thứ 26 của nọc độc *C.marmoreus*

phân tích các phân đoạn nọc độc phẫu tách có độ nhạy cao trong phát hiện KLPT.

Với cách tiếp cận này, phương pháp MALDI-TOF-MS xác định được tổng cộng 7543 dữ liệu khối lượng thô, riêng biệt. Các khối lượng trùng nhau trong khoảng 0,1 Da được loại bỏ. Bên cạnh đó, những phân tử liên kết với Na và K hoặc cả hai kim loại này, lần lượt là 14, 14 và 6 KLPT. Tổng cộng có 1751 hợp chất được nhận diện với KLPT riêng biệt trong nọc độc thô của ốc nón *C. marmoreus* ở vịnh Nha Trang. Kết quả này thấp hơn khá nhiều so với nghiên cứu cùng loài ở vùng biển nước Úc, cụ thể là xác định được 2710 peptide (Dutertre, Jin và cộng sự., 2013). Sự khác biệt lớn này có thể giải thích do ảnh hưởng của địa lý, môi trường sống, mà loài ốc *C. marmoreus* sản sinh ra thành phần độc tố khác nhau. Bên cạnh đó có sự khác biệt nhau nhiều về phương pháp thu độc tố. Trong nghiên cứu này, ốc nón được khai thác vào một thời điểm nhất định và độc tố thu được theo phương pháp phẫu tách, còn Sébastien D. và cộng sự, tiến hành thu độc tố định kỳ từ ốc nón còn sống trong bể nước biển.

Phổ MALDI-TOF-MS của từng phân đoạn nọc độc được kiểm tra trực quan một

cách cẩn thận để xác định sự hiện diện và cường độ xuất hiện của các conopeptide. Hình 2 thể hiện phổ khối $[M+H]^+$ của MALDI-TOF MS ở phân đoạn sắc ký phút thứ 26 của đồ nọc độc *C.marmoreus*. Trong phân đoạn này thể hiện trên sắc ký đồ là một peak hấp thụ cao nhất ở bước sóng UV có $\lambda 220\text{nm}$, tuy nhiên phân đoạn chứa nhiều khối lượng đồng vị (monoisotopic mass) $[M+H]^+$ với m/z 1462,60, 1377,59, 912,38, 861,03. Điều đó cho thấy các phân tử này có KLPT chính xác trong tự nhiên lần lượt là 1461,59 Da, 1376,58 Da do các phân tử này được tích điện 1 proton H^+ nên $z = 1$. Bên cạnh đó, chỉ tiêu cường độ xuất hiện của một phân tử thể hiện tương quan tỉ lệ thuận đến hàm lượng chất hiện diện bên trong hỗn hợp. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu tách chiết chất có hoạt tính sinh học, cho phép đánh giá độ tinh sạch của một phân đoạn sắc ký, đồng thời đánh giá mức độ tạp của một hợp chất để điều chỉnh phương pháp tách chiết-tinh sạch phù hợp. Như phân đoạn phút 26, ta có thể thấy tồn tại ít nhất 4 phân tử peptide có cường độ gần như ngang nhau. Nếu phân đoạn này có thể hiện hoạt tính thì việc tiến hành ít nhất một bước “tinh sạch” là cần thiết.

Bảng 1. So sánh KLPT của conopeptide quan sát được của nọc độc *C. marmoreus* ở biển Nha Trang với cơ sở dữ liệu của *C. marmoreus* ở ConoServer (Kaas, Yu và cộng sự., 2012).

ID	Tên	Liên họ gen	Họ được học	Trình tự peptide	KLPT (Da) từ ConoServer	KLPT (Da) quan sát được
P02491	Mr1.1	A superfamily	alpha conotoxin	GCSSHPACSVNNPDIC (nh2)	1613.58	1613.64
P04662	Mr1.8	A superfamily		ROECCTHOACHVSNPELCS	2109.81	2109.06
P06002	Mr1.8a	A superfamily		ECCTHPAGHVSNPCLC (nh2)	1736.65	
P05431	Mr1.9	M superfamily		VCCPFGGCHLECTADD (nh2)	1663.59	1663.60
P05493	Mr8.2	B2 superfamily		ALVSOQRPCPTRECKCRECKCRECOCRIHSCLSAWDSRGIWMRT	5280.28	
P05507	Mr22.1	E superfamily		WPRLYSDSCVVRGRNMHTCFKQTCGLTVKRNGLNCSLTCSCRR	8406.93	
				GESCLHGEYIDWDSRGLKVHICPKPWF		
P05495	Mr6.23	H superfamily		STDCNGVOCFGGCVTINGNDECRELDIC	3004.09	3004.06
P05514	Mr6.24	H superfamily		STDCNGVOCFGGCVTINGNDECREIGCE	3076.11	
P05503	Mr6.26	H superfamily		IEEDCGYVOCEFGCRIIDGKEKCREIDCQ	3462.41	3462.29
P05505	Mr6.27	H superfamily		DDFMIRIMCGDEFCTYDCCEIVDGGSSKCKQPDCP	3746.39	
P05367	Mr1.1	I1 superfamily		DKWGTCSLLGKGRHHSDDCWDLCCTGKTCVMTVLOCLFSLIVRWT	5295.4	
P05369	Mr1.1.2	I1 superfamily		DKWGTCSLLGKGRHHSDDCWDLCCTGKTCVMTVLPCHFFPL	4692	
P05371	Mr1.1.3	I1 superfamily		HKWAGASLLGKDCGHSPDCCGDLCCIGGKCVMTIDIPCHYFFP	4507.83	
P01524	Gla-MrH1	I2 superfamily		SCDS(Gla)FSS(Gla)FC(Gla)QP(Gla)(Gla)RICSCSTHYVCHLSSKRDKQCMTWNRCLSAQTGN	5860.16	
P05409	Mr026	I2 superfamily		LCDSYISSELCEHPEETCLLPQSYVLSVESIQTGSVYVLSVPHISKTS (nh2)	5323.56	
P05398	Mr12.10	I2 superfamily		SCDS(Gla)FSS(Gla)FC(Gla)QP(Gla)ERICSCSTHYVCHLSSRKGSOCTTWNRLSAQTGN	5856.24	
P05400	Mr12.11	I2 superfamily		LCDSYISS(Gla)JC(Gla)HP(Gla)(Gla)TCFCPNHMCPLSPYRQDQCMYW(Gla)ACLIF	5548.03	
P05402	Mr12.12	I2 superfamily		LCDSYISS(Gla)JC(Gla)HP(Gla)(Gla)TCFCPNHMCPLSPYRQDQCMYW(Gla)ACHIF	5572	
P05405	Mr12.13	I2 superfamily		LCDSYISS(Gla)JC(Gla)HP(Gla)(Gla)TCFCPNHMCPLSPYRQDQCMYW(Gla)ACHIF	5559.97	
P05395	Mr12.9	I2 superfamily		SCDS(Gla)FSS(Gla)FC(Gla)QP(Gla)(Gla)RICSCSTHYVCHLSSRDKQCMTWNRCLSAQTGN	5929.23	
P05411	Mr14.6	I2 superfamily		LCDSYISS(Gla)JC(Gla)HP(Gla)(Gla)ETCLLPQSYVLSVESIQTGSVYVLEACRIFTKTS (nh2)	5596.55	
P02835	conomorphin-Mr1	M superfamily		DWEYHAHPKONSRT	1929.84	
P05440	conomorphin-Mr2	M superfamily		DWVNHAPHKONSRT	1818.81	1818.78
P05418	Mr034	M superfamily		DCCPVAGMPLWMQPLLWMTSFVIGTSSSNE	3297.47	
P05420	Mr035	M superfamily		LVVGDQLCYRVLKCLMKN	2205.18	
P05511	Mr038	M superfamily		N(Gla)FLTHIFS(BI)HP(TW)CPWC (nh2)	2409.87	
P02869	Mr1e	M superfamily		CCSSWCKHLC	1301.45	1301.63
P05416	Mr3.11	M superfamily		CCRIACNLKCNOC (nh2)	1551.57	1551.54
P05422	Mr3.12	M superfamily		LCCWKKEWCHARCTCC (nh2)	1836.66	1836.69
P05424	Mr3.13	M superfamily		LCCWIHWCHARCTCC (nh2)	1829.80	1829.80
P05426	Mr3.14	M superfamily		ICCPQGGCHOLCQCCCG	1748.55	1748.51
P05428	Mr3.15	M superfamily		VCCPHGGCHQICQCCCG	1743.53	1743.48
P05433	Mr3.16	M superfamily		VCCSFGSDCLCQCCD (nh2)	1664.48	1664.44
P05435	Mr3.17	M superfamily		VCCPFGECKSLCYCCGA	1778.6	
P05437	Mr3.18	M superfamily		CCHRNWDHLCSCCGS	1819.55	
P02495	Mr3.3	M superfamily		ECCGSFAGRFGCVPCV	1776.6	
P02689	Mr3.8	M superfamily		CCHWNVCDHLCSCCGS	1849.53	1849.47
P01422	MrIIA	M superfamily		GCCGSFAGRFGCVOCV	1720.57	1720.43
P01465	MrIIB	M superfamily		SKQCCHLAACRFGCTOCCW	2125.79	1392.59
P01486	MrIIC	M superfamily		CCAPSACRILGCROCCR	1707.63	1707.58
P02696	MrIIE	M superfamily		CCRLSCGGLCHHOCC (nh2)	1462.48	1462.50
P02697	MrIIE	M superfamily		VCCPFGGCHELCYCCD (nh2)	1743.54	1743.83
P01485	MrIIF	M superfamily		VCCPFGGCHELCYCCD (nh2)	1693.56	1693.50
P02698	MrIIG	M superfamily		DCCOLPACPFGCNOCC (nh2)	1666.52	1666.49

(tiếp tục)

P05487	Mr15.1	N superfamily	CSSGKTCGSVEOVLCCARSDCYCRLIJOTRSYWVOICVCP	4308.85
P05489	Mr15.2	N superfamily	CRSGKTCORVGDYVCC(GIa)RSDCFCKLVOARPFWRVRCICL	4606.03
P02677	Mr1r137	O1 superfamily	DDECEPGDFGFKGFPCCSGWCFLWCA	3322.24
P02679	Mr1r332	O1 superfamily	CLDGEIEGILFPSCSGWCVLVCA	2654.11
P02680	Mr1r34	O1 superfamily	ECLADYYCVLFPVNGMCCSGICVFCIAQKY	3633.53
P05448	Mr056	O1 superfamily	ACSCKWEYCVIPILGFVYCCPGLNIWSFRLRLVMSSTPICATLA	5060.54
P05457	Mr06.1	O1 superfamily	CIDGG(GIa)CDIFFQTAAVGGALFSSAH(GIa)TVMSSSTPLCAIWLDL	4563.03
P05459	Mr062	O1 superfamily	CIDAG(GIa)CDLLQNAAVGGALFSSAHKTTVMSSSTOLCAT(BT)LDL	4589
P05461	Mr073	O1 superfamily	CIDGGEICDIFFPKLLQWVHYSLRMKLP	3570.77
P05455	Mr14.7	O1 superfamily	CIDGGEICGFOAAAAGGALFSSAHEHTVMSSSTPLCAT(BT)LDL	4418.87
P03066	Mr6.1	O1 superfamily	CLDAGEMCDLFSKCCSGWCHLFCa	2838.11
P03119	Mr6.3	O1 superfamily	CPNTGELDVVEQNCCYTYCFIVVCL	2924.17
P04665	Mr6.6	O1 superfamily	CLDAGEMCDLFSKCCSGWCHLVCa	2790.11
P04666	Mr6.8	O1 superfamily	CIDGGEICDIFFPNCSSGWCHLVCa	2787.13
P01554	Mr1VIA	mu conotoxin	ACRKKWEYCVIPILGFVYCCPGLICGPFVVCV	3486.66
P01556	Mr1VIB	mu conotoxin	ACSCKWEYCVIPILGFVYCCPGLICGPFVVCV	3403.58
P05442	Mr6.17	O1 superfamily	ACRQKWEYCVIPILGFVYCCPGLICGPFVVCV	3472.61
P05444	Mr6.18	O1 superfamily	ACRKKWEYCVIPILGFVYCCPGLICGPFVVCV	5303.57
P05451	Mr6.20	O1 superfamily	ECLADYYCVLFPVNGMCCSGICVFCIAQAY	3576.47
P05465	Mr6.22	O1 superfamily	CIDGGEICDIFFPNCSSGWCHLFCa	2865.96
P02570	contryphan-M	O2 superfamily	N(GIa)S(GIa)CPwHPWC(nh2)	1471.49
P05389	contryphan-M2	O2 superfamily	ESECPWHPWC(nh2)	1269.35
P02676	Mr15.1	O2 superfamily	QGEDVWMPCTSNWECSSLDCEMYCTQ(nh2)	3212.13
P05378	Mr6.12	O2 superfamily	GGKATWMSCSGWECCSMCDMYC(nh2)	2650.83
P05386	Mr6.13	O2 superfamily	DGLPGSIHSSFOCCSGWCKPRVC	2791.11
P05382	Mr6.14	O2 superfamily	SCDQTGEPVLEQCCYGCWCTNHGTCY	3007.04
P05384	Mr6.15	O2 superfamily	SCVPGRPCASNEQCCTRWCTPRIC	2932.26
P05380	Mr6.16	O2 superfamily	ITAES(BT)WEGECLGWSNGCTHOSDCCSNYCKGIYCDL	4105.41
P05373	Mr6.28	O2 superfamily	QCEDVWMPCTSNWECSSLDCEMYCTQ(nh2)	3237.19
P05376	Mr6.29	O2 superfamily	ZC(GIa)DV(BT)MPTSSHW(GIa)CCLDCEMYCTQI	3472.02
P05393	Mr8.1	S superfamily	CTDSCEFQVLCRGFTDCYGTNNCYAINHKKQICVCTN	4388.61
P05391	Mr016	S superfamily	CTDSCEFQGRFVSGYLRLRNKQLLLCHKP	3521.78
P02691	Mr5.1b	T superfamily	CCPGWELCC(GIa)WDDGW	1840.56
P02694	Mr5.4a	T superfamily	CCQVMPQCC(GIa)WN	1482.45
P02695	Mr5.4b	T superfamily	CCQVPOCC(GIa)WN	1464.49
P02962	Mr5.6	T superfamily	NGCCRAGDCCS	1083.3
P05471	Mr5.8	T superfamily	CCQVPOCC(GIa)WVSD	1651.58
P01384	Mr1A	T superfamily	NGVCCGYKLCCHOC	1407.52
P01737	Mr1B	T superfamily	VGVCCGYKLCCHOC	1392.59
P02699	Mr1A	T superfamily	NACCVROCC	1107.41
P05516	Mr081	T superfamily	ILQMLGTNAAAQAGNCAASGMIMGKGGK	2538.18
P05518	Mr087	T superfamily	TLOKLNKTLIPNSATVL	1966.18
P05519	Mr088	T superfamily	TLTKAFEFQTLIPNSATVL	1946.07
P05484	Mr10.2	T superfamily	ACCVYKICYOC	1276.47
P01738	CMrX	T superfamily	GICCGVSFCYOC	1262.42
P02692	Gla-MrIII	T superfamily	FCRRTQ(GIa)VCC(GIa)AIKN(nh2)	1828.70
P02693	Gla-MrIV	T superfamily	CCITF(GIa)SCC(GIa)FDL	1595.49
P01537	CMrVIA	T superfamily	VCCGYKLCCHOC	1236.45

Ghi chú: nh2: C-ter amidation; O: Hydroxyproline; Gla: Gamma carboxylic glutamic acid; w: D-tryptophan; f: D-phenylalanine; BTr: Bromotryptophan;

Z: Pyroglutamic acid; Độ dung sai: 0.05Da

Ngoài ra, kết quả Bảng 1 kết hợp với dữ liệu khối phổ của các phân đoạn nọc độc, ta thấy còn rất nhiều phân tử conopeptide mới chưa được định danh. Đây là cơ sở tiềm năng để khai thác nguồn dược quý từ nọc độc ốc nón *C. marmoreus* vùng biển Khánh Hòa. Hình 3 thể hiện kết quả tổng thể phân đoạn độc tố ở bước sóng $\lambda 220\text{nm}$ tích hợp phổ khối [M] của conopeptide phát hiện được với cường độ cao và định danh-định vị các phân tử đã công bố của *C. marmoreus* trên sắc ký đồ pha đảo. Kết quả Hình 3 cho thấy tổng thể sắc ký đồ của nọc độc ốc nón *C. marmoreus* thể hiện độ phức tạp về thành phần của nọc độc. Kết quả khối lượng phân tử của độc tố conotoxin phù hợp với các conotoxin, đã được định danh của các nghiên cứu trước, được chỉ ra trong sắc ký đồ.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu thể hiện rõ tính đa dạng trong thành phần của nọc độc của ốc nón

C. marmoreus ở vùng biển Khánh Hòa, cụ thể đã xác định được 1751 hợp chất trong nọc độc thô. Trong số đó, chúng tôi quan sát được khối lượng phân tử của 39 peptide trong nọc độc loài *C. marmoreus* ở Việt Nam so với tổng số 92 phân tử peptide của *C. marmoreus* đã được ghi nhận trước đó. Đa phần trong số phân tử phát hiện thuộc liên họ M (như MrIIIA, MrIIIB, MrIIIC...), mà các conopeptide của liên họ này có xu hướng tương tác với các kênh ion Na và Ka trên hệ thần kinh. Những kết quả bước đầu này là cơ sở để chúng tôi nghiên cứu ứng dụng một số sản phẩm chức năng trên nọc độc *C. marmoreus* trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài mã số 106-NN.02-2015.14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dutertre, S., A. H. Jin, Q. Kaas, A. Jones, P. F. Alewood and R. J. Lewis (2013). "Deep venomomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom." *Mol Cell Proteomics* 12(2): 312-329.
2. Kaas, Q., R. Yu, A. H. Jin, S. Dutertre and D. J. Craik (2012). "ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database." *Nucleic Acids Res* 40(Database issue): D325-330.
3. Lavergne, V., S. Dutertre, A. H. Jin, R. J. Lewis, R. J. Taft and P. F. Alewood (2013). "Systematic interrogation of the *Conus marmoreus* venom duct transcriptome with ConoSorter reveals 158 novel conotoxins and 13 new gene superfamilies." *BMC Genomics* 14: 708.
4. Lewis, R. J., S. Dutertre, I. Vetter and M. J. Christie (2012). "Conus venom peptide pharmacology." *Pharmacol Rev* 64(2): 259-298.
5. McIntosh, J. M., A. Hasson, M. E. Spira, W. R. Gray, W. Li, M. Marsh, D. R. Hillyard and B. M. Olivera (1995). "A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels." *J Biol Chem* 270(28): 16796-16802.
6. McIntosh, J. M., A. D. Santos and B. M. Olivera (1999). "Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes." *Annu Rev Biochem* 68: 59-88.
7. Mueller, A., H. Starobova, M. C. Insera, A. H. Jin, J. R. Deuis, S. Dutertre, R. J. Lewis, P. F. Alewood, N. L. Daly and I. Vetter (2015). "alpha-Conotoxin MrIC is a biased agonist at alpha7 nicotinic acetylcholine receptors." *Biochem Pharmacol* 94(2): 155-163.
8. Nguyen, B., J. P. Caer, G. Mourier, R. Thai, H. Lamthanh, D. Servent, E. Benoit and J. Molgo (2014). "Characterization of a novel *Conus bandanus* conopeptide belonging to the M-superfamily containing bromotryptophan." *Mar Drugs* 12(6): 3449-3465.
9. Olivera, B. M. and R. W. Teichert (2007). "Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model for concerted pharmacological discovery." *Mol Interv* 7(5): 251-260.
10. Röckel, D., W. Korn and A. Kohn (1995). "Manual of the Living Conidae, Volume 1: Indo-Pacific Region: 1-517." Hackenheim. Verlag Christa Hemmen.
11. Rodriguez, A. M., S. Dutertre, R. J. Lewis and F. Mari (2015). "Intraspecific variations in *Conus purpurascens* injected venom using LC/MALDI-TOF-MS and LC-ESI-TripleTOF-MS." *Anal Bioanal Chem* 407(20): 6105-6116.