

SỞ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO HẢI PHÒNG

**CUỘC THI KHOA HỌC KỸ THUẬT CẤP THÀNH PHỐ
DÀNH CHO HỌC SINH TRUNG HỌC NĂM HỌC 2025-2026**

**Tên dự án: ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG TRUNG HÒA ĐỘ TỔ NỌC RẮN HỒ
CHÚA VÀ RẮN CHÀM QUẠP BẰNG DỊCH CHIẾT TỪ CÂY KIM VÀNG**

**Lĩnh vực dự thi: Hóa Sinh
Loại dự án: Dự án khoa học**

MÃ DỰ ÁN:.....

VỊ TRÍ:.....

Hải Phòng, ngày 10 tháng 11 năm 2025

MỤC LỤC

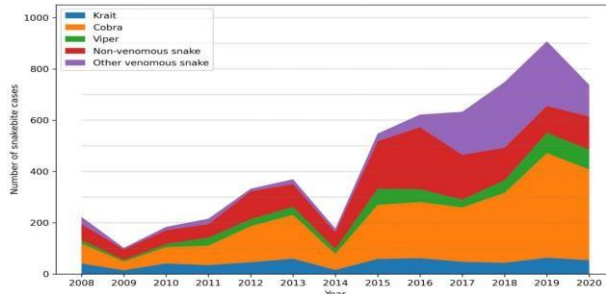
	<i>Trang</i>
1. Câu hỏi nghiên cứu	1
1.1. Tình trạng về tai nạn rắn độc cắn	1
1.2. Các loại thảo dược được sử dụng để điều trị tai nạn rắn độc cắn	2
1.3. Lý do chọn đề tài, câu hỏi nghiên cứu, vấn đề nghiên cứu	3
2. Thiết kế và phương pháp nghiên cứu	4
2.1. Đối tượng nghiên cứu	4
2.2. Phương pháp nghiên cứu	5
3. Thực hiện: thu thập, phân tích và giải thích dữ liệu	6
3.1. Thu thập số liệu	6
3.2. Phân tích và giải thích dữ liệu	7
3.3. Kết luận chung	14
4. Tài liệu tham khảo	14

BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU DỰ ÁN KHKT ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG TRUNG HÒA ĐỘC TỔ NỌC RẮN HỔ CHỨA VÀ RẮN CHÀM QUẠP BẰNG DỊCH CHIẾT TỪ CÂY KIM VÀNG

1. Câu hỏi nghiên cứu

1.1. Tình trạng về tai nạn rắn độc cắn

Tai nạn rắn độc cắn hiện nay là một vấn đề tại cộng đồng mức nhồi tại Việt Nam. Đặc biệt là ở các vùng nông thôn và miền núi nơi điều kiện kinh tế còn nhiều hạn chế. Theo số liệu của trung tâm chống độc bệnh viện Bạch Mai thì số ca bị rắn độc cắn không ngừng gia tăng từ 2008-2020.



Hình 2. Biểu đồ đường tổ hợp thể hiện số ca rắn cắn theo từng loại rắn độc gây ra tại miền Bắc Việt Nam được Trung tâm Chống độc Bệnh viện Bạch Mai ghi chép từ năm 2008 đến 2020 [4].

Rắn độc phổ biến, thường gặp là loài **hổ chúa (Ophiophagus Hannah)** và **chàm quạp (Calloselasma Rhodostoma)** được xếp vào nhóm nguy hiểm với tỉ lệ thương tích cao kèm theo biến chứng nghiêm trọng như hoại tử, tổn thương mô sâu và thậm chí tử vong. Cho đến nay các nghiên cứu về độc tố của hai loài rắn này còn hạn chế, các biện pháp sơ cứu ban đầu chưa có, một số nơi sử dụng những kinh nghiệm dân gian để chữa trị khi bị rắn độc cắn mà chưa có những lãnh giáo khoa học nghệ thuật của nhưng phương pháp dân gian kể trên, trong khi đó huyết thanh kháng độc chủ yếu vẫn phải nhập khẩu với chi phí cao và hiệu quả không tối ưu do sự khác biệt sinh học của các quần thể rắn từng khu vực địa lí.

Từ những bất cập trên, kết hợp với những kinh nghiệm thực tế trong việc sử dụng thảo dược bản địa để sơ cứu những bệnh nhân bị rắn độc cắn, được sự hướng dẫn của thầy cô và các nhà khoa học, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu đề tài này.

1.3. Lý do chọn đề tài, câu hỏi nghiên cứu, vấn đề nghiên cứu và giả thuyết khoa học

Rắn độc cắn là một bệnh lý cấp cứu thường gặp, đặc biệt ở vùng nông thôn. Chúng em từng chứng kiến nhiều người bị rắn độc cắn phải nhập viện cấp cứu, trong đó có những trường hợp đến muộn dẫn đến biến chứng nặng hoặc tử vong. Qua tìm hiểu, Việt Nam có nhiều loài rắn độc, nhưng rắn hổ chúa (*Ophiophagus hannah*) và rắn chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*) là hai loài nguy hiểm nhất. Việc điều trị đặc hiệu cần huyết thanh kháng nọc rắn, tuy nhiên không phải lúc nào cũng có sẵn tại các cơ sở y tế, nhất là ở tuyến dưới.

Từ thực tế đó, chúng em đặt câu hỏi: *Có biện pháp nào sơ cứu hoặc hỗ trợ khẩn cấp tại chỗ giúp giảm độc tính nọc rắn trong khi chờ điều trị đặc hiệu?* Từ những kinh nghiệm tích lũy được trong quá trình nghiên cứu về đông y của gia đình em, chúng em đặc biệt quan tâm đến cây kim vàng - cây thuốc thường xuyên được dùng như một biện pháp sơ cứu ban đầu cho người bị rắn độc cắn. Với ước mơ tiếp nối truyền thống gia đình trở thành thầy thuốc, có thể cứu giúp bệnh nhân bị rắn độc cắn, chúng em quyết tâm tìm hiểu sâu hơn về độc tố của rắn hổ chúa và rắn chàm quạp, cũng như khả năng phân giải độc tố của dịch chiết cây kim vàng (*Barleria lupulina*).

Chúng em đã chia sẻ ý tưởng của mình với bố mẹ, anh trai (đều là Bác sỹ) và cô giáo hướng dẫn. Thật may mắn, ý tưởng của chúng em nhận được sự hỗ trợ đặc biệt từ phía gia đình, cô giáo hướng dẫn cùng các nhà khoa học. Từ đó, dự án “*Đánh giá tiềm năng trung hoà độc tố nọc rắn hổ chúa và rắn chàm quạp bằng dịch chiết từ cây kim vàng*” chính thức được hình thành.

Từ việc phân tích những tài liệu khoa học và sự chia sẻ của các lương y nhiều năm trong việc điều trị rắn độc cắn, chúng em được biết dịch chiết cây Kim Vàng bước đầu được ghi nhận có tác dụng trong giải độc, có thể cứu giúp bệnh nhân khi bị rắn độc cắn. Từ đó câu hỏi nghiên cứu được nêu ra như sau: **“Liệu dịch chiết từ cây Kim Vàng có tác dụng trung hoà độc tố nọc của rắn hổ chúa và rắn chàm quạp hay không?”**. Vấn đề nghiên cứu được đặt ra trong dự án này là: **“Cần phân tích xác định thành phần protein trong hai loài rắn hổ chúa và chàm quạp tại Việt Nam và bước đầu đánh giá khả năng trung hoà của dịch chiết Cao Kim Vàng”**

Theo kết quả ghi nhận ban đầu sau khi phân tích thành phần nọc độc và kết quả thử sơ bộ về khả năng trung hoà các enzyme có trong nọc rắn, chúng em đưa ra giả thuyết nghiên cứu: “Dịch chiết từ cây kim vàng có tác dụng trung hoà độc tố nọc rắn hổ chúa và rắn chàm quạp tại Việt Nam”.

Dự án này của chúng em được thực hiện với ba mục tiêu sau:

(1) Phân tích thành phần protein và enzyme có trong nọc rắn hổ chúa (*Ophiophagus hannah*) và rắn chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*) thu thập tại Việt Nam.

(2) Đánh giá hoạt tính enzyme phân giải protein của nọc rắn, nhằm xác định mức độ phá hủy protein của từng loại nọc.

(3) Kiểm nghiệm khả năng ức chế của dịch chiết cây kim vàng (*Barleria lupulina*) đối với các enzyme độc trong nọc rắn.

Các nghiên cứu của chúng em được tiến hành tại khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Số 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân, Hà Nội. Dưới sự hướng dẫn khoa học của các thầy cô giảng viên đang công tác tại khoa Sinh học.

Đề tài có ý nghĩa xã hội cao, vì nếu chứng minh được hiệu quả, nó có thể giúp phát triển thuốc hỗ trợ sơ cứu rắn cắn giá rẻ, sẵn có, đặc biệt cho vùng sâu vùng xa nơi khó tiếp cận huyết thanh đặc hiệu.

Tính mới: Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam thực hiện phân tích thành phần protein trong nọc rắn hổ chúa và rắn chàm quạp tại Việt Nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá khả năng ức chế của nọc rắn hổ chúa và chàm quạp bằng dịch chiết từ Cao Kim Vàng.

Tính cấp thiết: Giúp bổ sung tri thức khoa học về nguồn dược liệu bản địa có tiềm năng kháng nọc rắn. Góp phần giải quyết vấn đề thực tiễn là thiếu huyết thanh và phương tiện cấp cứu ban đầu ở nông thôn. Tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiền lâm sàng và dược học tự nhiên, hướng tới sản phẩm hỗ trợ sơ cứu an toàn, chi phí thấp.

2. THIẾT KẾ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là nọc rắn hổ chúa (*Ophiophagus hannah*) và rắn chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*), cùng dịch chiết từ cây Kim Vàng (*Barleria lupulina*).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các bước tiến hành nghiên cứu

+ Chuẩn bị: Xin phép thí nghiệm, đảm bảo an toàn sinh học. Hiệu chuẩn thiết bị, chuẩn bị hóa chất, mẫu nọc và cây kim vàng.

+ Thu mẫu và chuẩn bị: Thu nọc rắn *C. rhodostoma* và *O. hannah*; định lượng protein (Bradford). Tạo cao chiết nước từ cây kim vàng (*B. lupulina*).

+ Phân tích thành phần nọc: Điện di SDS-PAGE xác định các băng protein chính (PLA₂, SVMP, 3FTx...). Phân tích cường độ băng bằng ImageJ để xác định tỉ lệ enzyme.

+ Đánh giá hoạt tính và ức chế: Thực hiện phản ứng cắt casein với nọc rắn; so sánh với mẫu có/không dịch chiết kim vàng. Chạy SDS-PAGE và thử nghiệm trên đĩa thạch casein; đo đường kính vùng phân giải. Tính % hoạt tính và % ức chế enzyme.

+ Xử lý và báo cáo: Tổng hợp kết quả, vẽ biểu đồ, so sánh giữa hai loài rắn. Viết báo cáo, rút kết luận và đề xuất nghiên cứu tiếp theo. Phương pháp:

+ Phương pháp thực nghiệm: Thực hiện các thí nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính enzyme trong nọc rắn và khả năng ức chế của dịch chiết cây kim vàng. Sử dụng kỹ thuật SDS-PAGE và đĩa thạch casein để quan sát, định lượng mức phân giải protein.

+ Phân tích, định lượng: Định lượng hàm lượng protein trong nọc rắn bằng phương pháp Bradford. Phân tích mật độ băng protein bằng phần mềm ImageJ để xác định tỉ lệ thành phần enzyme và mức độ ức chế.

+ So sánh và đối chứng: So sánh giữa các mẫu nọc rắn có và không xử lý bằng dịch chiết kim vàng, cùng các mẫu đối chứng (PBS, ethanol, EDTA).

+ Tổng hợp và thống kê: Tổng hợp số liệu từ các thí nghiệm, tính trung bình, độ lệch chuẩn và tỷ lệ phần trăm ức chế. Trình bày kết quả bằng bảng, biểu đồ và so sánh giữa hai loài rắn.

+ Tìm hiểu tài liệu: Thu thập, phân tích và đối chiếu với các nghiên cứu trong và ngoài nước về độc tố rắn và các thảo dược kháng nọc.

Dụng cụ, thiết bị:

+ Thiết bị thí nghiệm: Tủ an toàn sinh học, micropipette, ống nghiệm, ống ly tâm, bình thu nọc. Máy ly tâm, máy đo quang phổ (đo hấp thụ Bradford). Bộ điện di SDS-PAGE (nguồn điện, buồng gel, bể điện di, máy khuấy từ). Thiết bị đun cách thủy, bếp gia nhiệt, tủ sấy, cân điện tử, máy đo pH. Tủ lạnh bảo quản mẫu ở -20°C .

+ Dụng cụ phụ trợ: Đĩa petri, pipetman, giá đỡ, cốc thủy tinh, phễu lọc, giấy lọc, lam kính, panh, kéo, găng tay, kính bảo hộ.

+ Phần mềm hỗ trợ: **ImageJ Densitogram Suite**: phân tích cường độ băng protein trên gel SDS-PAGE. **Microsoft Excel**: nhập, tính toán và biểu đồ hóa dữ liệu. **PhotoMeasure / Image Tool**: đo đường kính vòng phân giải trên đĩa thạch casein. **PowerPoint / Word**: tổng hợp và trình bày báo cáo, poster dự án.

2.2.2. Các kỹ thuật phân tích

2.2.2.1. Phân tích thành phần enzyme trong nọc rắn

Để phân lập các thành phần proteinase trong nọc rắn, các mẫu nọc rắn được pha loãng bằng đệm PBS pH = 7.4 về cùng nồng độ $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ trong mỗi phản ứng.

Để thực hiện điện di, nhóm nghiên cứu đã sử dụng gel SDS-PAGE 15% bằng phương pháp sau: 4000 μL gel tách (1000 μL H₂O, 1000 μL Tris-HCl pH 8.8 chứa SDS, 2000 μL 30% bis-acrylamide, 30 μL 10% APS, và 7 μL TEMED); 1010 mL gel cô 4% (610 μL H₂O, 250 μL Tris-HCl pH 6.8, 130 μL 30% bis-acrylamide chứa SDS, 12.5 μL 10% APS, và 3 μL TEMED). 9 μL của mỗi mẫu được trộn với dung dịch đệm khử (0.032 M Tris-HCl, 51% glycerol, 5.1% SDS, 0.1% (v/v) bromophenol blue bão hòa, 4.08% β -mercaptoethanol, pH 6.8) theo tỷ lệ 1:3 và đun nóng trong 10 phút ở 99°C để biến tính protein.

Các mẫu được nạp lên gel và chạy trong hai giai đoạn: 90 volt trong 15 phút và 120V trong 60 phút sử dụng hệ thống điện di Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hertfordshire, UK). Gel thu được được nhuộm bằng dung dịch nhuộm 30% Coomassie Brilliant Blue R330 và tẩy màu trong ít nhất 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Quá trình phân tích cường độ của các băng trong kết quả điện di SDS-PAGE được phân tích bằng phần mềm ImageJ Densitogram Suite [11]. Mỗi lần được lựa chọn cẩn thận và so sánh, tạo ra biểu đồ mật độ (densitometric plot) trong đó cường độ dải được thể hiện dưới dạng các đỉnh (peaks). Diện tích dưới mỗi đỉnh, tương ứng với từng dải protein riêng lẻ, được định lượng bằng các công cụ đo lường tích hợp sẵn. Tỷ lệ cường độ của các băng được tổng hợp và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel.

2.2.2.2. Thử nghiệm hoạt tính phân giải protein trên đĩa thạch casein

Thử nghiệm hoạt tính phân giải protein được thực hiện theo phương pháp của Yuan và Cole (1987), với một số điều chỉnh. 0,5 g agar được hòa tan trong 46 mL đệm Tris 0,5 M (pH 6,5), đun sôi và làm nguội đến khoảng 50°C , sau đó

thêm vào 4 mL casein (1% trong NaOH 1 M) [12]. Hỗn hợp này được phân chia vào các đĩa petri (20 mL/đĩa) và để đông cứng. Các giếng có đường kính khoảng 9 mm được tạo trên bề mặt gel.

Các mẫu bao gồm PBS 1X pH = 7.4 (đối chứng âm), nọc rắn (8 µg), hỗn hợp SV4 với các chất ức chế (EDTA 1 mM), dịch chiết từ cây kim vàng (8 µg) được tiền ủ trong 20 phút ở 37 °C. Sau đó, các mẫu được nhỏ vào từng giếng và ủ ở 37 °C trong 17 giờ. Sau thời gian ủ, vùng thủy phân casein được quan sát bằng cách nhỏ thêm 3 mL acid acetic.

Hoạt tính phân giải được đo lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình của đường kính vùng thủy phân (mm), sử dụng công cụ đo ảnh trực tuyến tại <https://eleif.net/photomeasure>.

Công thức tính phần trăm hoạt tính còn lại:

$$\left(\frac{d_2^2 - 9^2}{d_1^2 - 9^2}\right) \times 100 \text{ trong đó:}$$

d1: đường kính giếng đối chứng (Positive control) d2: đường kính giếng treatment đường kính phần lỗ giếng: 9 mm Công thức tính phần trăm ức chế:

$$1 - \left(\frac{d_2^2 - 9^2}{d_1^2 - 9^2}\right) \times 100 \text{ trong đó:}$$

d1: đường kính giếng đối chứng (Positive control)
d2: đường kính giếng treatment
đường kính phần lỗ giếng: 9 mm

3. THỰC HIỆN: THU THẬP, PHÂN TÍCH VÀ GIẢI THÍCH DỮ LIỆU

3.1. Thu thập số liệu

Cá thể rắn chàm quạp được thu thập trong chuyến tham gia cùng đoàn khảo sát thực địa tại Khu bảo tồn Thiên nhiên Bình Châu - Phước Bửu (tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, tháng 06 năm 2025), vốn thuộc vùng phân bố của loài rắn này. Trong quá trình thu bắt có sử dụng móc chuyên dụng để đảm bảo an toàn, sau đó các mẫu được chụp ảnh, xác định giới tính và được đựng trong các hộp nuôi nhốt bò sát chuyên dụng và được lưu trữ tại Viện Sinh Học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội. Đối với loài rắn hổ chúa, nọc rắn được thu thập từ trại nuôi rắn đạt chuẩn tại tỉnh Phú Thọ.

Quá trình thu nọc được tiến hành trên cả hai loài rắn dưới sự hỗ trợ của các nhà khoa học thuộc Đại học Khoa học Tự nhiên thuộc Đại học Quốc Gia Hà Nội. Trước khi tiến hành lấy nọc, cả hai cá thể rắn không được cho ăn ít nhất 10 ngày nhằm đảm bảo hiệu suất nọc tối ưu. Khoang miệng của rắn được vệ sinh kỹ lưỡng trước khi lấy nọc. Rắn được kích thích để cắn vào miệng bình thủy tinh với thành bình được bịt kín bằng màng parafilm. Khi rắn đã cắn chặt vào bình, các tuyến nọc ở hai bên hàm được xoa bóp nhẹ nhàng nhằm hỗ trợ dòng nọc chảy từ răng nanh chảy vào bình chứa. Phương pháp này giúp giảm thiểu tổn thương và căng thẳng cho rắn, đồng thời đảm bảo chất lượng nọc thu được cho những lần lấy sau. Nọc rắn sau khi lấy được bảo quản ở nhiệt độ - 20 °C để duy trì độ ổn định. Hàm lượng protein của tất cả các mẫu nọc xác định bằng phương pháp Bradford (1976)

[10]. Thông tin chi tiết về 2 cá thể rắn cùng với kết quả đo nồng độ của 3 mẫu nọc rắn SV3 - 5 được trình bày trong bảng 1.

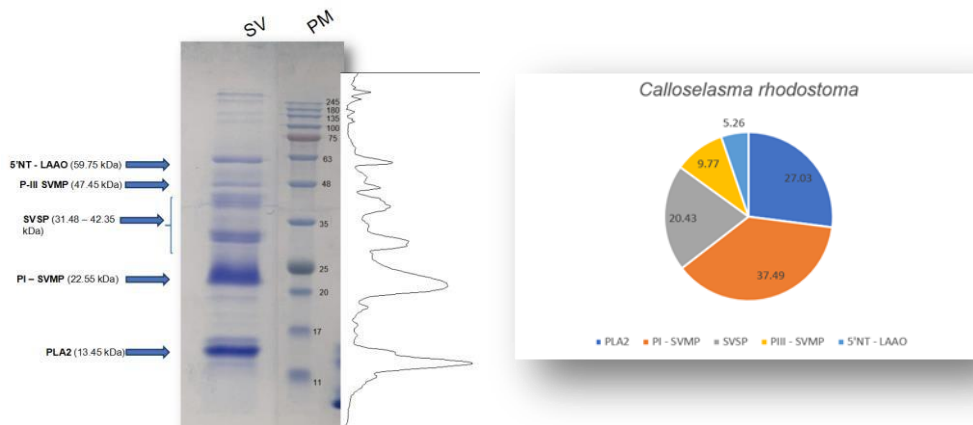
Bảng 1. Thông tin về các mẫu rắn và kết quả định lượng protein của các mẫu nọc rắn bằng phương pháp Bradford (1976).

Tên loài	Nồng độ (mg/mL)	Chú thích
<i>C. rhodostoma</i> (chàm quạp)	230.27	Kích thước: 1 m. Chế độ ăn: Chuột trắng (<i>Mus musculus</i>) và chim sâu (<i>Zosterops japonicus</i>). Tình trạng: Bình thường, không có dấu hiệu bị bệnh.
<i>O. hannah</i> (hổ chúa)	48.21	Kích thước: 2 - 4.5 m Chế độ ăn: rắn bông chì (<i>Hypsiscopus plumbea</i>). Tình trạng: Bình thường, không có dấu hiệu bị bệnh.

Tạo cao chiết nước từ cây Kim vàng: Sử dụng 300g lá và thân cây kim vàng được rửa sạch, cắt nhỏ, lấy khoảng 300 g cho vào thiết bị chiết, thêm 1 lít nước sạch đã được lọc qua hệ thống RO. Qua trình chiết được tiến hành ở nhiệt độ 70°C, trong thời gian 7 giờ. Sau 7 giờ lọc bỏ bã thu dịch chiết. Cô đuổi dung môi thu cao chiết cô đặc của cây kim vàng.

3.2. Phân tích và giải thích dữ liệu

3.2.1. Phân tích thành phần protein trong nọc rắn chàm quạp (*C. Rhodostoma*)



Hình 3. Kết quả điện di protein SDS-PAGE và dự kiến của thành phần protein trong mẫu nọc rắn. SV: Nọc rắn *C. rhodostoma*; PM: thang chuẩn

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 3) cho thấy số lượng và mật độ các băng protein của mẫu nọc của loài *C. rhodostoma*. Trong cả ba mẫu SV, phần lớn protein trong nọc rắn di chuyển dưới băng 45 kDa của thang chuẩn. Đáng chú ý, năm protein được dự đoán lần lượt là PLA₂ (13.05 kDa), P-I SVMP (22.18 kDa), SVSP (31.26 - 40.8 kDa), P-III SVMP (47.26 kDa), và 5'NTLAAO (56.3 kDa) [13, 14, 15].

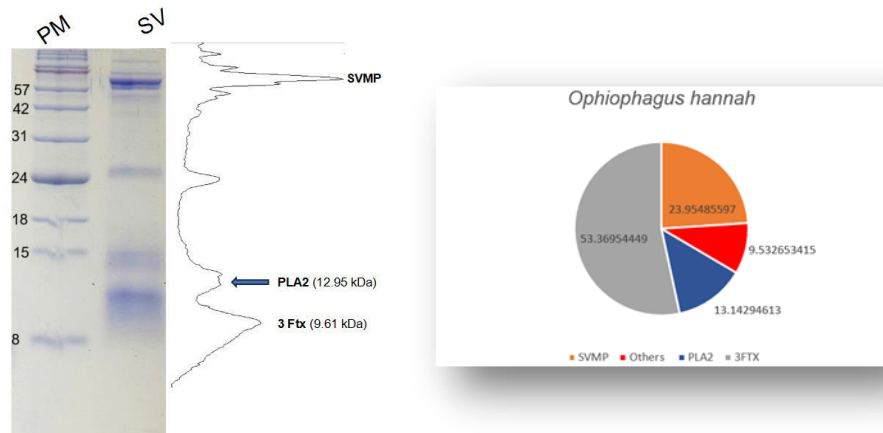
Biểu đồ so sánh thành phần protein (Hình 3) cho thấy sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ thành phần protein trong nọc rắn *C. rhodostoma* được thu thập tại Việt

Nam. Cụ thể, Kết quả định lượng tương đối (biểu đồ tròn) cho thấy PISVMP chiếm tỷ lệ cao nhất (37,49%), tiếp theo là PLA₂ (27,03%), SVSP (20,43%), P-III SVMP (9,77%) và 5'NT-LAAO (5,26%). Sự chiếm ưu thế của các nhóm metalloproteinase và phospholipase A₂ cho thấy nọc rắn *C. rhodostoma* có đặc tính xuất huyết và hoại tử mô mạnh, đồng thời tác động lên hệ thống đông máu thông qua hoạt tính của serine protease. Các enzyme như LAAO và P-III SVMP góp phần tăng cường độc tính toàn thân và phản ứng viêm tại chỗ.

Như vậy, cấu trúc proteomic của nọc *C. rhodostoma* được đặc trưng bởi sự chiếm ưu thế của các enzyme ngoại bào gây tổn thương mô và mạch máu, phản ánh rõ đặc điểm độc tính xuất huyết - hoại tử điển hình của họ Viperidae. Những dữ liệu này là cơ sở quan trọng cho việc nghiên cứu cơ chế tác động sinh học của nọc rắn và phát triển các biện pháp trung hòa độc tố hoặc kháng huyết thanh đặc hiệu trong tương lai.

3.2.2. Phân tích thành phần protein trong nọc rắn hổ chúa (*O. Hannah*)

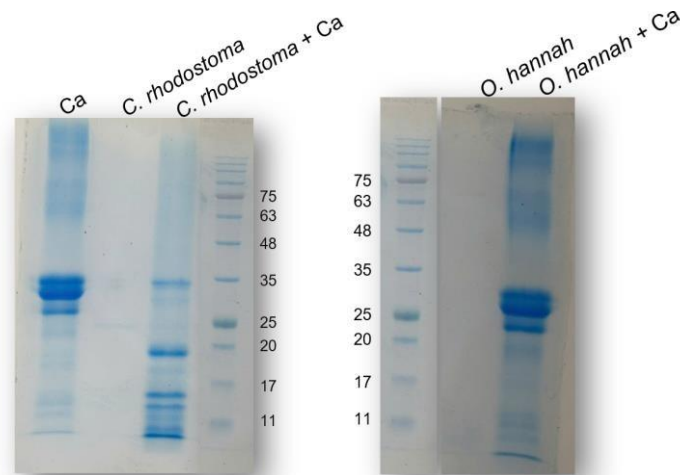
Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4) cho thấy số lượng và mật độ các băng protein của mẫu nọc của loài *O. hannah*. Phần lớn protein trong nọc rắn di chuyển dưới băng 57 kDa của thang chuẩn. Đáng chú ý, ba protein được dự đoán lần lượt là 3 FTx (9.61 kDa), PLA₂ (13.05 kDa, và SVMP [15].



Hình 4. Kết quả điện di protein SDS-PAGE và dự kiến của thành phần protein trong mẫu nọc rắn. SV: Nọc rắn *O. hannah*; PM: thang chuẩn

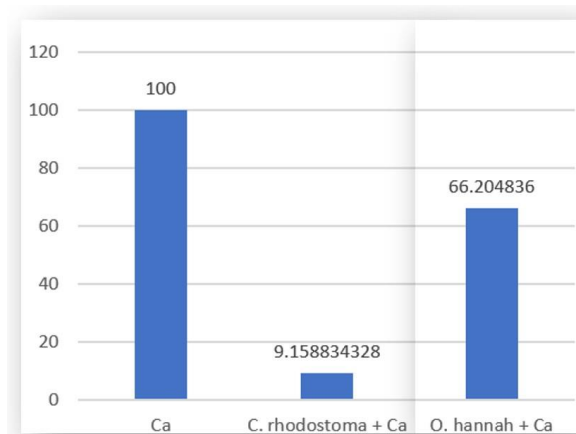
Phân tích tỷ lệ thành phần cho thấy nhóm 3FTx chiếm ưu thế với khoảng 53,37% tổng lượng protein trong nọc. Đây là nhóm độc tố đặc trưng của họ Elapidae, có tác dụng chính lên hệ thần kinh thông qua cơ chế ức chế dẫn truyền synap. SVMP chiếm khoảng 23,95%, có vai trò trong quá trình gây hoại tử mô và ảnh hưởng đến hệ thống đông máu. PLA₂ chiếm khoảng 13,14%, góp phần vào hoạt tính gây viêm và phá hủy màng tế bào. Nhóm còn lại (Others, 9,53%) bao gồm các protein chưa được định danh hoặc ít phổ biến hơn.

3.2.3. Đánh giá hoạt tính enzyme trong nọc rắn dựa khả năng phân cắt với cơ chất casein



Hình 5. Kết quả điện di protein SDS-PAGE phản ứng cắt cơ chất casein của enzyme trong nọc rắn.

Ca: cơ chất casein



Hình 6. Phần trăm độ đậm còn lại của các băng casein sau khi phản ứng với enzyme trong nọc rắn

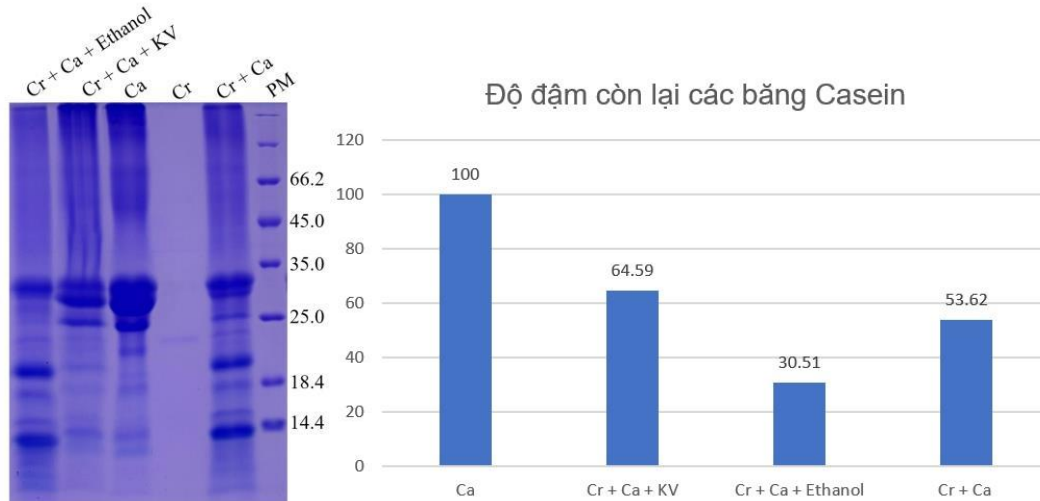
Mẫu đối chứng chỉ chứa casein xuất hiện khoảng 3 băng protein đậm, với kích thước dưới 35 kDa, thể hiện cấu trúc toàn vẹn của casein chưa bị phân giải. Khi ủ với nọc rắn *C. rhodostoma*, các băng protein casein gần như biến mất, chỉ còn lại một số dải phân tử nhỏ ở vùng thấp (dưới 20 kDa), cho thấy casein đã bị cắt mạnh thành các peptide nhỏ. Ngược lại, mẫu ủ với nọc *O. hannah* vẫn còn một số băng protein rõ nét, chứng tỏ mức độ phân cắt casein thấp hơn so với *C. rhodostoma*.

Khi thêm nọc rắn *C. rhodostoma* vào cơ chất casein, có thể nhận thấy nọc *C. rhodostoma* biểu hiện hoạt tính protease mạnh hơn đáng kể so với nọc *O. hannah*. Điều này phù hợp với đặc điểm sinh học của hai loài: *C. rhodostoma* - họ Viperidae giàu enzyme protease như metalloproteinase và serine protease, trong khi nọc của *O. hannah* - họ Elapidae chủ yếu chứa độc tố thần kinh có hoạt tính enzymatic thấp hơn. Kết quả định lượng trong hình 8 củng cố nhận định trên. Phần trăm cường độ băng casein còn lại sau phản ứng giảm mạnh khi ủ với nọc *C. rhodostoma*, chỉ còn khoảng 9,16% so với mẫu đối chứng, trong khi nọc *O.*

hannah còn khoảng 66,20%. Như vậy, enzyme trong nọc *C. rhodostoma* có khả năng thủy phân casein cao gấp nhiều lần so với enzyme trong nọc *O. hannah*.

Kết hợp hai kết quả, có thể kết luận rằng nọc rắn *C. rhodostoma* thể hiện hoạt tính protease mạnh, đặc trưng cho các loài thuộc họ Viperidae, trong khi nọc rắn *O. hannah* có hoạt tính thấp hơn, phù hợp với bản chất của họ Elapidae vốn giàu độc tố thần kinh hơn là enzyme thủy phân protein.

3.2.4. Khả năng ức chế hoạt tính enzyme phân giải protein bằng dịch chiết từ cây kim vàng (*B. Lupulina*)

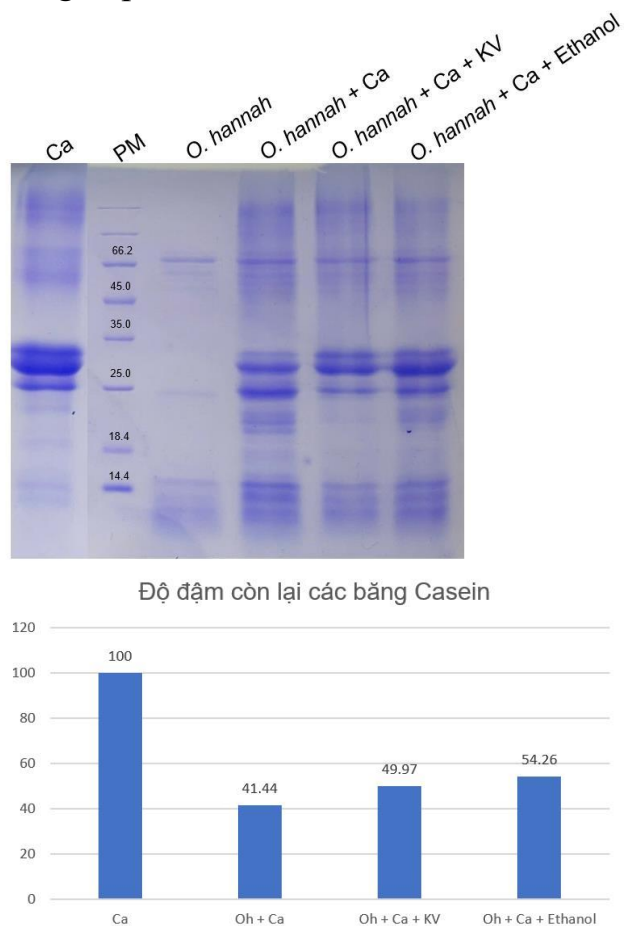


Hình 7. Kết quả điện di protein SDS-PAGE thể hiện hoạt tính phân giải protein của protease trong nọc rắn *C. rhodostoma* trên cơ chất casein, đồng thời đánh giá khả năng ức chế của dịch chiết từ *B. lupulina*. KV: Dịch chiết từ cây kim vàng.

Khi ủ hỗn hợp nọc rắn với casein (*C. rhodostoma* + Ca), cường độ băng casein ở vùng 25-35 kDa giảm rõ rệt, đồng thời xuất hiện nhiều băng nhỏ hơn ở vùng thấp dưới 20 kDa. Điều này chứng tỏ enzyme protease trong nọc *C. rhodostoma* đã xúc tác quá trình thủy phân casein thành các peptide nhỏ hơn. Đáng chú ý, trong mẫu Cr + Ca + KV, cường độ băng casein tăng lên so với mẫu Cr + Ca, với độ đậm còn lại của ba băng casein khoảng 64.6% cho thấy dịch chiết cây kim vàng (KV) làm giảm rõ rệt hoạt tính phân giải protein của enzyme trong nọc rắn. Hiện tượng này gợi ý rằng KV có thể chứa các hợp chất phenolic, flavonoid hoặc alkaloid có khả năng ức chế hoạt động protease. Đối với Cr + Ca + ethanol, độ đậm băng casein chỉ còn lại khoảng 30.5%, thể hiện sự kém hiệu quả trong việc ức chế hoạt tính của enzyme. Kết quả trên thể hiện dịch chiết cây kim vàng có khả năng ức chế rất hiệu quả hoạt tính protease trong nọc *C. rhodostoma*, qua đó làm giảm mức độ phân giải protein cơ chất.

Khi ủ hỗn hợp nọc rắn với casein (*O. hannah* + Ca), cường độ băng casein ở vùng 25-35 kDa giảm rõ rệt, đồng thời xuất hiện nhiều băng nhỏ hơn ở vùng thấp dưới 20 kDa. Điều này chứng tỏ enzyme protease trong nọc *O. hannah* đã xúc tác quá trình thủy phân casein thành các peptide nhỏ hơn. Đáng chú ý, trong mẫu *O. hannah* + Ca + KV, cường độ băng casein tăng lên so với mẫu *O. hannah* + Ca, với độ đậm còn lại của ba băng casein khoảng 50% cho thấy dịch chiết cây kim vàng (KV) làm giảm rõ rệt hoạt tính phân giải protein của enzyme trong nọc rắn. Hiện tượng này gợi ý rằng KV có thể chứa các hợp chất phenolic, flavonoid

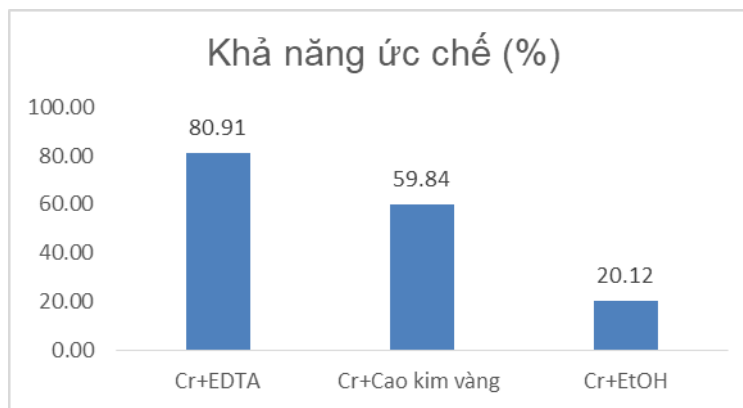
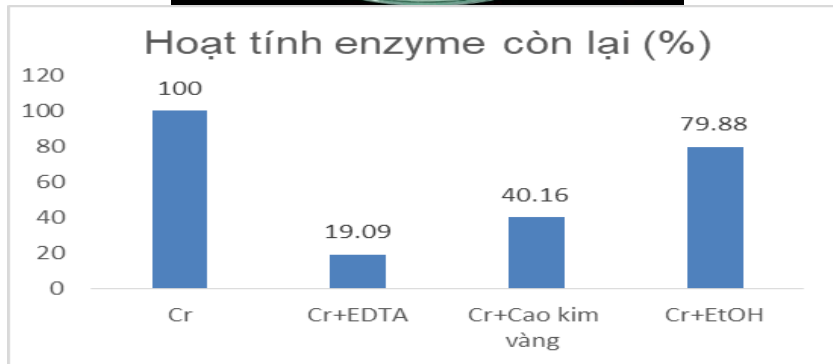
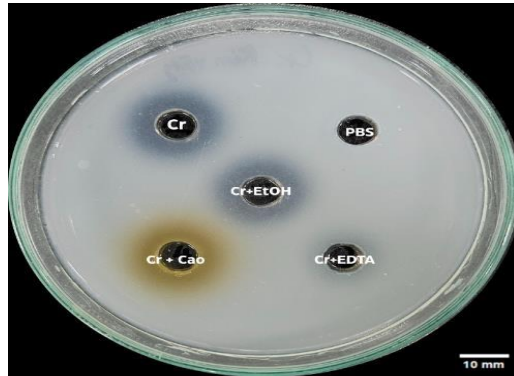
hoặc alkaloid có khả năng ức chế hoạt động protease. Đối với *O. hannah* + Ca + ethanol, độ đậm bằng casein còn lại khoảng 55%, tuy nhiên xuất hiện các băng đậm giống với giếng chứa enzyme và cơ chất. Kết quả trên thể hiện dịch chiết cây kim vàng có khả năng ức chế hoạt tính protease trong nọc *O. hannah*, qua đó làm giảm mức độ phân giải protein cơ chất.



Hình 8. Kết quả điện di protein SDS-PAGE thể hiện hoạt tính phân giải protein của protease trong nọc rắn *O. hannah* trên cơ chất casein, đồng thời đánh giá khả năng ức chế của dịch chiết từ *B. lupulina*. KV: Dịch chiết từ cây kim vàng.

3.2.5. Đánh giá hoạt độ của enzyme nọc rắn và khả năng ức chế của dịch chiết từ cây kim vàng (*B. Lupulina*) bằng phương pháp đĩa thạch casein

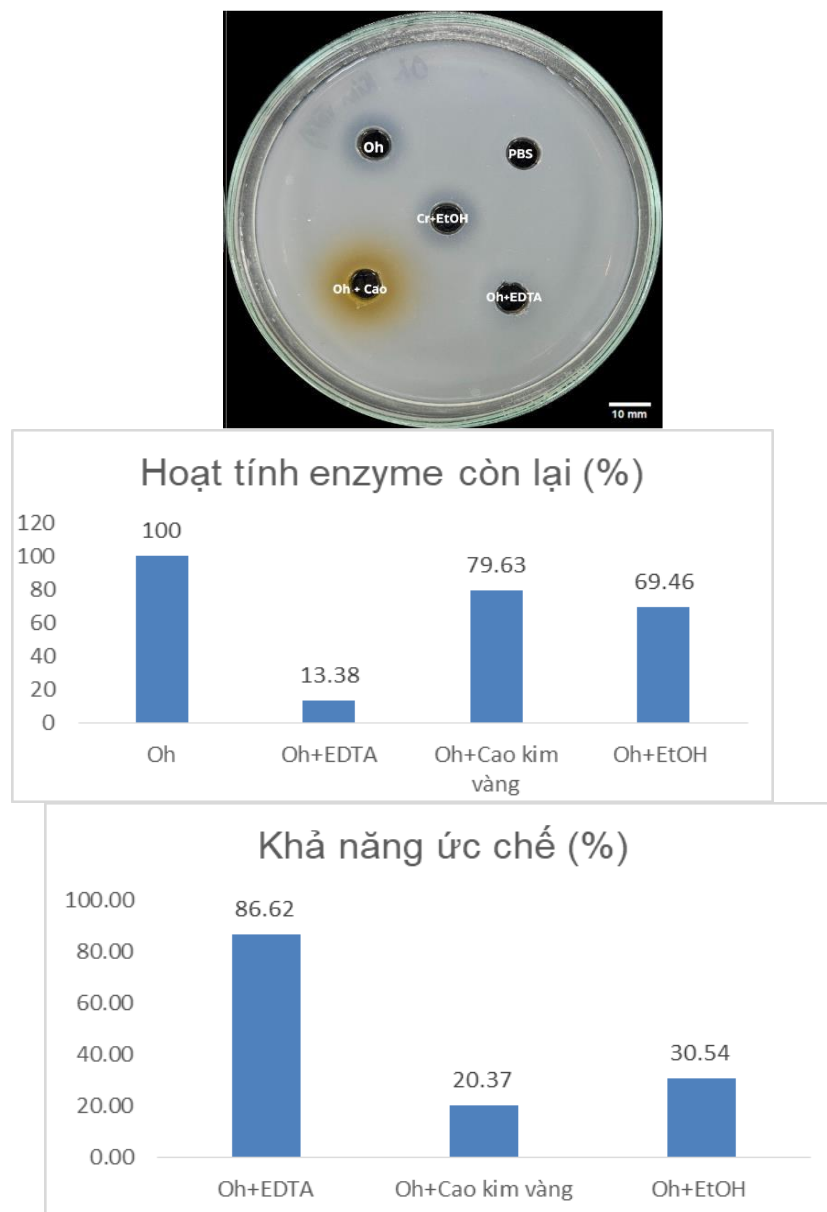
Hình 9 cho thấy kết quả thí nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme protease của nọc rắn *C. rhodostoma* (Cr) thông qua khả năng phân giải cơ chất casein tạo vòng trong suốt xung quanh giếng trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng âm PBS không xuất hiện vòng phân giải, khẳng định phản ứng phân giải hoàn toàn do enzyme trong nọc gây ra. Khi so sánh các mẫu thí nghiệm, giếng chứa nọc Cr nguyên chất tạo vòng phân giải lớn nhất, tương ứng với 100% hoạt tính enzyme, chứng tỏ protease trong nọc có hoạt lực mạnh. Ở mẫu Cr + EDTA, kích thước vòng phân giải giảm rõ rệt, chỉ còn 19,09% hoạt tính enzyme, tức khả năng ức chế đạt 80,91%. Điều này cho thấy các enzyme protease trong nọc Cr chủ yếu thuộc nhóm metalloproteinase (SVMP), do EDTA là chất tạo phức với ion kim loại cần thiết cho hoạt tính của enzyme.



Hình 9. Hoạt tính phân giải protein của nọc rắn *C. rhodostoma* trên đĩa thạch casein.
Cr: nọc rắn *C. rhodostoma*

Đáng chú ý, ở mẫu Cr + dịch chiết cây kim vàng, vòng phân giải cũng giảm đáng kể, tương ứng còn 40,16% hoạt tính enzyme (ức chế 59,84%). Kết quả này chứng minh rằng các hoạt chất trong dịch chiết kim vàng có khả năng ức chế enzyme protease của nọc rắn, có thể thông qua tương tác với trung tâm hoạt động của enzyme hoặc biến đổi cấu trúc bậc ba của protein. Ngược lại, mẫu Cr + ethanol cho thấy hoạt tính enzyme vẫn duy trì ở mức cao (79,88%), tức chỉ ức chế khoảng 20,12%, chứng minh rằng ethanol không có vai trò đáng kể trong việc ức chế enzyme, mà hiệu quả chủ yếu đến từ các hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết kim vàng.

Có thể kết luận rằng dịch chiết cây kim vàng thể hiện khả năng ức chế đáng kể hoạt tính protease trong nọc *C. rhodostoma*, tuy chưa mạnh bằng EDTA, nhưng mang tiềm năng tự nhiên cho hướng nghiên cứu các chất trung hòa nọc rắn có nguồn gốc thực vật.



Hình 10. Hoạt tính phân giải protein của nọc rắn *O. hannah* trên đĩa thạch casein. Oh: nọc rắn *O.hannah*

Tại hình 10 khi so sánh các mẫu thí nghiệm, giếng chứa nọc *O. hannah* nguyên chất tạo vòng phân giải lớn nhất, tương ứng với 100% hoạt tính enzyme, chứng tỏ protease trong nọc có hoạt lực mạnh. Ở mẫu Oh + EDTA, kích thước vòng phân giải giảm, với 13,38% hoạt tính enzyme còn lại, tức khả năng ức chế đạt 86,62%. Đáng chú ý, ở mẫu Oh + dịch chiết cây kim vàng, vòng phân giải cũng giảm đáng kể, tương ứng còn 79,63 % hoạt tính enzyme (ức chế 20,37%). Kết quả này chứng minh rằng các hoạt chất trong dịch chiết kim vàng có khả năng ức chế enzyme protease của nọc rắn, có thể thông qua tương tác với trung tâm hoạt động của enzyme hoặc biến đổi cấu trúc bậc ba của protein. Tại giếng chứa mẫu Oh + ethanol cho thấy hoạt tính enzyme vẫn duy trì ở mức cao (69,46%), tức chỉ ức chế khoảng 30,54%, chứng minh rằng ethanol có vai trò đáng kể trong việc ức chế enzyme. Có thể kết luận rằng dịch chiết cây kim vàng tuy có thể hiện khả năng ức chế hoạt tính protease trong nọc *O. hannah*, tuy nhiên

cần phải tối ưu hóa cơ chất để thể hiện rõ khả năng phân cắt của enzyme trong nọc rắn. **3.3. Kết luận chung**

3.3.1. Kết luận

Kết quả phân tích protein bằng kỹ thuật SDS-PAGE cho thấy nọc độc của loài chàm quạp (*C. Rhodostoma*) chứa ít nhất năm loại protein khác nhau. Trong đó, PI - SVMP là thành phần chiếm ưu thế, bên cạnh các enzyme chính khác như SVMP và PLA₂, vốn là các yếu tố quan trọng gây ra tổn thương mô và rối loạn đông máu ở nạn nhân bị rắn cắn. Đối với mẫu nọc rắn hổ chúa (*O. Hannah*), loại enzyme 3 FTx và PLA₂ chiếm ưu thế vượt trội, tuy nhiên vẫn có sự xuất hiện của SVMP

Các thử nghiệm đánh giá khả năng trung hòa độc tố cho thấy dịch chiết từ cây kim vàng có hiệu quả ức chế đáng kể đối với enzyme trong nọc độc của rắn chàm quạp (*C. Rhodostoma*) và rắn hổ chúa (*O. Hannah*) nội địa. Hiệu quả này được ghi nhận thông qua giảm rõ rệt hoạt tính enzyme trong các thử nghiệm in vitro, chứng minh tiềm năng ứng dụng của sản xuất các sản phẩm điều trị nọc rắn từ thảo dược.

3.3.2. Kiến nghị

Dựa trên những kết quả thu được từ nghiên cứu này, chúng em kiến nghị cần tiếp tục triển khai các hướng nghiên cứu chuyên sâu nhằm làm sáng tỏ đặc tính sinh học và cơ chế tác động của các thành phần chính trong nọc độc rắn chàm quạp (*C. Rhodostoma*) và rắn hổ chúa (*O. Hannah*). Cụ thể, cần tiến hành quy trình tinh sạch và định danh chi tiết các phân đoạn proteinase, đặc biệt là nhóm SVMP và 3 FTx và SVSP, kết hợp với xác định đặc điểm hóa lý và hoạt tính sinh học của các isoform PLA₂. Việc này không chỉ giúp hiểu rõ hơn vai trò gây độc của từng enzyme, mà còn tạo tiền đề cho việc phát triển các chất ức chế đặc hiệu nhằm cải thiện hiệu quả điều trị lâm sàng.

Song song đó, cần đẩy mạnh khai thác nguồn tri thức bản địa - vốn rất phong phú về các bài thuốc dân gian có sử dụng thảo dược trong điều trị rắn cắn. Đây là nguồn dữ liệu quý giá cho quá trình sàng lọc các hợp chất tự nhiên có khả năng kháng nọc hoặc hỗ trợ điều trị.

Ngoài ra, cần thúc đẩy việc phối hợp đa ngành để đánh giá toàn diện hiệu quả của các hợp chất thảo dược được phát hiện, từ đó hướng đến phát triển các liệu pháp hỗ trợ điều trị rắn cắn có nguồn gốc tự nhiên, an toàn, chi phí thấp và dễ tiếp cận tại các khu vực nông thôn, nơi nguy cơ bị rắn độc cắn vẫn còn cao và việc tiếp cận với huyết thanh đặc hiệu còn hạn chế.

4. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization (WHO). (2021). Snakebite envenoming. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
2. Pucca, M. B., Knudsen, C., S. Oliveira, I., Rimbault, C., A. Cerni, F., Wen, F. H., ... & Monteiro, W. M. (2020). Current knowledge on snake dry bites. *Toxins*, 12(11), 668.
3. Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The lancet*, 375(9708), 77-88.

4. Le, T. Q., Le, L. T., Nguyen, H. H., Ha, H. T., Nguyen, N. T., Nguyen, T. Q., ... & Nguyen, T. T. (2025). Profile of snakebite cases admitted to the Poison Control Center of Bach Mai Hospital in northern Vietnam from 2008 to 2020. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 118.
5. Gupta, Y. K., & Peshin, S. S. (2012). Do herbal medicines have potential for managing snake bite envenomation?. *Toxicology international*, 19(2), 89.
6. Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R. G., Fonnegra, R., ... & Quintana, J. C. (2004). Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 969-977
7. Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Char, J. S., & Marangoni, S. (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. *Toxicon*, 52(6), 655-666.
8. Gupta, Y. K., & Peshin, S. S. (2012). Do herbal medicines have potential for managing snake bite envenomation?. *Toxicology international*, 19(2), 89.
9. Chatterjee, I., Chakravarty, A. K., & Gomes, A. (2006). Daboia russellii and Naja kaouthia venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R. Br. *Journal of ethnopharmacology*, 106(1), 38-43.
10. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
11. Chen, Y., Yu, Q., & Xu, C. B. (2017). A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int J Clin Exp Med*, 10(10), 14904-14910.
12. Yuan, L. I. N. G., & Cole, G. T. (1987). Isolation and characterization of an extracellular proteinase of *Coccidioides immitis*. *Infection and immunity*, 55(9), 1970-1978.
13. Tao, N. T., Minh, V. B., Nhan, N. P. S., Ngoc, A. T. T., Nhan, L. T., & Yen, P. B. (2025). Investigation of the Venom Protein Profile of the Malayan Pit Viper *Calloselasma rhodostoma* (kuhl, 1824) from Vietnam and Toward Toxin Neutralization. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 41(2).
14. Tang, E. L. H., Tan, C. H., Fung, S. Y., & Tan, N. H. (2016). Venomics of *Calloselasma rhodostoma*, the Malayan pit viper: A complex toxin arsenal unraveled. *Journal of Proteomics*, 148, 44-56.
15. Danse, J. M. Molecular biology of snake venom phospholipases A₂. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*, 29-71 (1997).