

## جداسازی و خالص‌سازی فراکسیون‌های سمی زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس (*Mesobuthus eupeus*)

منیژه کدخدائی الیادرائی<sup>۱</sup>، حسین حنیفی<sup>۲</sup>، زهره آموزگاری<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۸۴/۰۸/۰۹، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۲/۲۰

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** عقرب مزوبوتوس اپیوس<sup>۴</sup> از عقرب‌های خانواده بوتیده<sup>۵</sup> بومی ایران به ویژه در منطقه خوزستان می‌باشد. زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده از ترکیبات فعال بیولوژیکی مختلف از جمله انواع توکسین‌ها تشکیل شده است. این توکسین‌ها انواع مختلفی از کانال‌های یونی بدن حشرات و یا پستانداران را تحت تأثیر قرار می‌دهند. جهت مطالعه اجزای سمی در زهر عقرب لازم است ابتدا خالص شوند لذا در این مطالعه فراکسیون‌های سمی زهر عقرب جدا سازی و سمی‌ترین آن‌ها خالص شدند.

مواد و روش کار: اجزاء سمی زهر خام عقرب مزوبوتوس اپیوس به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-50 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار pH=۴/۷ جدا سازی شد. سپس اجزای سمی ترین فراکسیون به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی جدا شد و خلوص آن‌ها به وسیله الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری: از ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین زهر خام که روی ستون سفادکس G-50 برده شد، ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین در ۶ فراکسیون تفکیک شده به دست آمد. سمیت تمام فراکسیون‌ها روی موش آزمایش شد و مشاهده شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها اثر سمی دارند و LD50 آن‌ها به ترتیب ۰/۴ و ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمد. فراکسیون III به علت داشتن LD50 پایین روی ستون CM-Sephadex C-25 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار و pH=۴/۷ برده شد. در این مرحله فراکسیون سوم به ۲۰ زیر فراکسیون تفکیک شد. که با بررسی سمیت آن‌ها بر روی موش‌ها مشخص گردید که زیرفراکسیون‌های III.14 تا III.19 دارای اثر سمی بودند. از ۲۵۰ میلی‌گرم پروتئین فراکسیون III که روی ستون برده شد، ۲۴۲/۷۵ میلی‌گرم (۹۷٪) در زیرفراکسیون‌های تفکیک شده به دست آمد. زیرفراکسیون III.14 دوباره بر روی ستون Sephadex C-25-CM در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار و pH=۶ به کار برده شد. در این مرحله سه توکسین به صورت خالص به دست آمد. توکسین III.14.4 با LD50 برابر با ۰/۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، بیشترین سمیت را دارا بود. در این مطالعه سه توکسین به طور خالص جدا شد که در تحقیقات بعدی می‌توان از آنها در تهیه آنتی‌سرم و یا مطالعه خصوصیات ساختمانی و اثرات فیزیولوژی فارماکولوژی استفاده نمود.

کل واژگان: مزوبوتوس اپیوس، زهر، کروماتوگرافی، خالص‌سازی، توکسین

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره چهارم، ص ۲۹۷-۲۸۹، زمستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دکتر منیژه کدخدائی

E-mail: kakhodaeim@yahoo.com

<sup>۱</sup> استاد گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز (نویسنده مسؤل)

<sup>۲</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

<sup>۳</sup> مربی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

<sup>۴</sup> *Mesobuthus eupeus*

<sup>۵</sup> Buthidae

<sup>۶</sup> Lethal Dose50

منیژه کدخدائی الیادرائی، حسین حنیفی، زهره آموزگاری

## مقدمه

به طور کلی عقرب‌های ایران متعلق به دو خانواده بوتیده و اسکورپیونیده می‌باشند. عقرب مزوبوتوس اپیوس<sup>۱</sup> متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشد. این عقرب یکی از فراوان‌ترین عقرب‌های موجود در خوزستان است. عقرب‌زدگی به عنوان یکی از مشکلات عمده پزشکی در بسیاری از کشورهای گرمسیری می‌باشد. بیشتر عقرب‌زدگی‌ها ناشی از عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشند. در خوزستان حدود ۴۵ درصد عقرب‌گزیدگی‌ها مربوط به مزوبوتوس می‌باشد (۱،۲). ترکیبات تشکیل دهنده زهر عقرب و مقدار آن‌ها به نوع عقرب بستگی دارد. زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس، اولیگوپپتیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آمینه و انواع توکسین‌ها تشکیل شده است این توکسین‌ها به ویژه کانال‌های یونی سدیم و پتاسیم وابسته به ولتاژ در غشای سلول‌های عصبی را مورد هدف قرار می‌دهند (۳،۴). این عمل باعث طولانی شدن پتانسیل عمل و یا تحریک پی‌درپی سلول‌های عصبی و تجمع یون‌های کلسیم یا سدیم در سلول می‌شود که نتیجه نهایی آن آزاد شدن غیرفعال نوروترانسمیترها از بافت‌های تحت تاثیر قرار گرفته می‌باشد (۵). زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده حاوی انواع مختلفی از توکسین‌ها می‌باشند. توکسین‌های زنجیره بلند با ۷۰-۶۰ توالی اسیدآمینه و چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای عمدتاً بر روی کانال‌های سدیمی عمل می‌کنند (۶). توکسین‌های زنجیره کوتاه که از ۴۰-۳۰ توالی اسید آمینه بیشتر با سه پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده‌اند که عمدتاً بر روی کانال‌های کلرو پتاسیم عمل می‌کنند (۷،۸). عقرب مزوبوتوس اپیوس یکی از عقرب‌هایی است که در ایران به ویژه در مناطق کویری و گرمسیری از جمله خوزستان به فراوانی یافت می‌شود و دارای اهمیت بالینی می‌باشد. تا کنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اجزای تشکیل دهنده زهر این نوع عقرب انجام نشده است. برای این که مکانیسم‌های بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی تاثیر توکسین‌های موجود در زهر عقرب‌ها مشخص شوند باید این توکسین‌ها شناسایی و تخلیص گردند و اثرات هر یک به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرد. در این تحقیق تعدادی از توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس توسط روش کروماتوگرافی ستونی جدا شده و سمیت آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق می‌تواند زمینه‌ای برای انجام مطالعات گسترده

بعدهی در بررسی ساختمان توکسین‌ها و مکانیسم عمل هر یک از آن‌ها بر روی پستانداران باشد.

## مواد و روش کار

زهر خام لیوفیلیزه عقرب مزوبوتوس اپیوس از موسسه رازی اهواز تهیه گردید. این زهر به روش تحریک الکتریکی تهیه شده بود. سفادکس G50 و Sephadex C-25-CM از شرکت Pharmacia، فولین سیوکالتو، استات آمونیوم، ترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین (TEMED)، آمونیوم پرسولفات و آلومین سرم گاوی از شرکت Sigma، گلیسرول و تریس از شرکت Merck، اکریل آمید و بیس اکریل آمید از شرکت BIO-RAD خریداری گردیدند.

جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس تمام مراحل جداسازی در ۴ درجه سانتی‌گراد و به روش Angelina صورت گرفت (۹). یک گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید، سپس محلول حاصل به مدت ۱۲ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و قسمت محلول (محلول روئی) از قسمت نامحلول جدا گردید. قسمت روئی حاوی پپتیدها و پروتئین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول روئی پس از تغلیظ شدن در حجم ۵ میلی‌لیتر که حاوی ۸۱۶ میلی گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-50 به ابعاد (۱۰۰×۷/۲cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار (pH=۴/۷) گردید. بعد از اینکه نمونه جذب ژل گردید بافر فوق با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد. محلول خروجی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتری به طور مجزا توسط دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک<sup>۲</sup> جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌ها بلافاصله در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/VIS) قرائت شد و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های مختلف در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. هر یک از فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با Cutoff < 1200 به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغلیظ گردیدند. سمیت هر یک از فراکسیون‌ها با تزریق ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش و با مشاهده علائم مسمومیت از قبیل افزایش ضربان قلب و فلج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD50 فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین فراکسیون‌ها بر اساس روش Lowry

<sup>2</sup> Fraction collector

<sup>1</sup> Mesobuthus eupeus

جداسازی وخالص سازی فراکسیون‌های سمی زهر عقرب مزوبوتوس ائیوس (Mesobuthus eupeus)

در ژل، ستون ابتدا با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 6$  و با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد و نمونه‌ها در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر در هر لوله جمع‌آوری شدند. پس از اینکه پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند خارج شدند ستون توسط یک گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 6$  در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر شسته شد. پس از تمام شدن گرادیان، ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱ مولار NaCl شستشو داده شد. جذب نوری محلول خروجی در هر یک از لوله‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب برحسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های جمع‌آوری شده دیالیز و تغلیظ شدند.

#### الکتروفورز زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی:

از نمونه‌های به دست آمده در مراحل مختلف کروماتوگرافی الکتروفوروز روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲/۵ درصد در حضور سدیم دودسیل سولفات<sup>۱</sup> طبق روش Laemmli انجام گردید (۱۱).

#### اندازه‌گیری: LD50 (Lethal dose 50)

برای بررسی سمیت و مقایسه کشندگی فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی، LD50 زهر خام و فراکسیون‌های سمی در موش‌های سوری ۱۸ تا ۲۰ گرمی با استفاده از روش آماری spearman karber بر اساس روش Finney تعیین گردید (۱۲). به این صورت که هر نمونه در دوزهای مختلف تهیه و هر دوز به چهار موش تزریق شدند. برای انتخاب دوزهای مناسب ابتدا از هر نمونه چند دوز مختلف تهیه و هر کدام به دو موش تزریق شد. تا حدود کشندگی (ماکزیمم و مینیمم) به دست آید. سپس بر این اساس دوزها به صورتی انتخاب شدند که در اولین دوز هیچ موشی نمیرد و در آخرین دوز همه موش‌ها بمیرند با مشخص شدن اولین دوز عدد اول را در ضریب فواصل دوزها (۱/۲۵) ضرب نموده تا دوز بعدی به دست آید. بعد از اینکه دوزهای مختلف برای هر نمونه تهیه شد، ۲ میلی‌لیتر از هر دوز به چهار موش (به هر موش ۰/۵ میلی‌لیتر) که قبلاً علامت‌گذاری شده و در قفس‌های جداگانه قرار داده شده بودند به طریق زیر جلدی<sup>۲</sup> تزریق شد.

سپس مرگ و میر موش‌ها طی ۲۴ ساعت ثبت گردید و LD50 هر نمونه با استفاده از روش ذکر شده از فرمول زیر محاسبه شد:

اندازه‌گیری گردید (۱۰). از بین فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون فراکسیون سوم به علت داشتن خاصیت سمی قوی‌تر برای جداسازی اجزای آن توسط کروماتوگرافی ستونی تعویض یون کاتیونی بازمینه CM-sephadex C-25 انتخاب گردید. بدین منظور ۷ میلی‌لیتر از فراکسیون سوم حاوی ۲۵۰ mg پروتئین وارد ستونی از CM-sephadex C-25 به ابعاد (۴۰×۱ cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار ( $\text{pH} = 4/7$ ) گردید بعد از اینکه نمونه جذب ژل شد، ستون ابتدا با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 4/7$  با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. محلول خارج شده به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر در هر لوله جمع‌آوری گردید. پس از اینکه پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند از ستون خارج شدند بلافاصله ستون توسط یک گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 4/7$  در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر شسته شد. پس از آن ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱ مولار NaCl شستشو داده شد تا پروتئین‌های خارج نشده از ستون جدا شده و خارج شوند. جذب نوری محلول خروجی در هر یک از لوله‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/VIS) در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید و هر یک از زیرفراکسیون‌ها در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند.

زیرفراکسیون‌های جمع‌آوری شده به ترتیب از III.1 تا III.20 نام گذاری شدند. سپس هر یک از این زیر فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با Cutoff < 1200 در مقابل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند و تغلیظ گردیدند. سمیت هر یک از فراکسیون‌ها با تزریق ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش و با مشاهده علائم مسمومیت از قبیل افزایش ضربان قلب و فلج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD50 فراکسیون‌های سمی اندازه گیری شد.

زیرفراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند. و بین آنها زیرفراکسیون III.14 بیشترین سمیت را داشت که برای خالص سازی اجزای آن در مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای خالص‌سازی اجزای زیرفراکسیون III.14، مقدار ۱۷ میلی‌گرم پروتئین از این زیرفراکسیون در حجم ۵ میلی‌لیتر وارد ستونی از CM-sephadex C-25 به ابعاد (۱×۴۰ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 6$  گردید پس از جذب نمونه

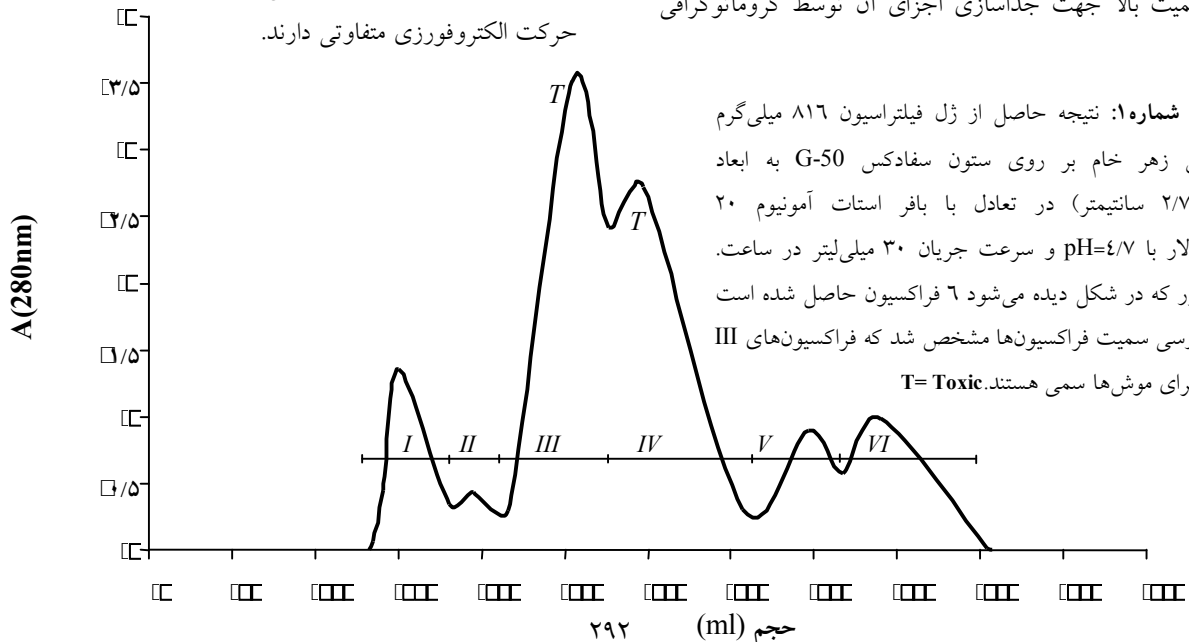
<sup>1</sup> SDS-PAGE

<sup>2</sup> Subcutaneous

تعویض کاتیونی انتخاب گردید. فراکسیون‌های سمی در نمودار با علامت T نشان داده شده‌اند.

نتیجه کروماتوگرافی تعویض کاتیونی ۲۵۰ میلی گرم پروتئین فراکسیون III در نمودار ۲ نشان داده شده است. در این مرحله ۲۰ فراکسیون از فراکسیون سوم (III.1-III.20) جدا شده است. سمیت فراکسیون‌های حاصل در این مرحله مشخص شد. فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند که در نمودار با علامت T نشان داده شده‌اند. فراکسیون III.14 با LD50 برابر با ۰/۳۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش سمی‌تر بود که برای جداسازی و خلوص بیشتر اجزای آن دوباره توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با تغییر pH از ۴/۷ در مرحله قبل به ۶ انتخاب گردید.

نتیجه حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون فراکسیون III.14 (حاوی ۱۷ میلی‌گرم پروتئین) در نمودار ۳ نشان داده شده است. در این مرحله زیرفراکسیون III.14 به پنج جز تفکیک گردید که پس از بررسی سمیت آن‌ها بر روی موش‌ها مشخص گردید که فراکسیون‌های III.14.2، III.14.3، III.14.4 برای موش‌ها سمی بودند. سنجش پروتئین، بازده، سمیت و مقادیر LD50 در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. به طور کلی یک گرم زهر خام حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود که بعد از بردن روی ستون سفادکس G-50 مقدار ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین از فراکسیون‌های مختلف به دست آمد که بازده کار ۹۹/۸۷ درصد بود. نتایج الکتروفورز زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد از زیرفراکسیون III.14 سه توکسین که تاثیر سمی بر روی موش‌ها داشتند خالص گردید آزمایش الکتروفورز خلوص آن‌ها را نشان می‌دهد و همان‌طور که در شکل دیده می‌شود این سه توکسین حرکت الکتروفورزی متفاوتی دارند.



نمودار شماره ۱: نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۱۰۰×۲/۷ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ و سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود ۶ فراکسیون حاصل شده است و با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی هستند. T= Toxic

$$m = x_{100} \pm \frac{d}{n} \left( \sum r - \frac{n}{2} \right)$$

m برابر است با log LD50

X<sub>100</sub> برابر است با log دوزی که صددرصد کشندگی داشته باشد.

n تعداد موش‌های استفاده شده در هر دوز

r تعداد موش‌های مرده در هر دوز

d برابر است با log ضریب فواصل دوزها یعنی log 1/25

وحدود ثابت (Fiducial limits) برای LD50 از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$V(m) = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum [r(n-r)]$$

$$\text{Fiducial limits} = \text{antilog}(m \pm t_{0.05} \sqrt{V(m)})$$

t برای n-1 درجه آزادی

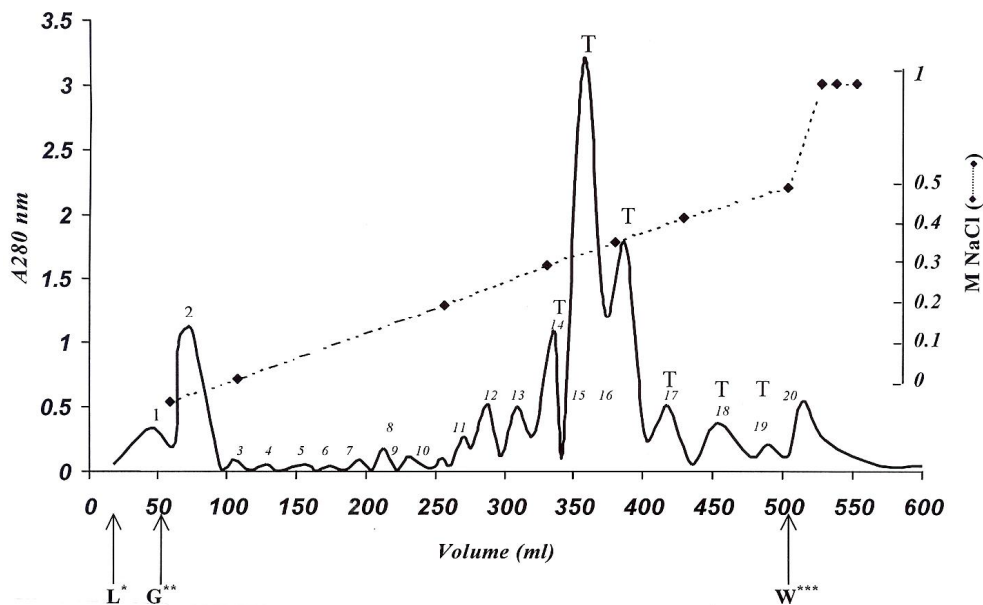
∑n جمع تعداد موش‌های استفاده شده در دوزهایی به جز دوزهایی که صفر درصد و صددرصد کشندگی دارند می‌باشد.

## یافته‌ها

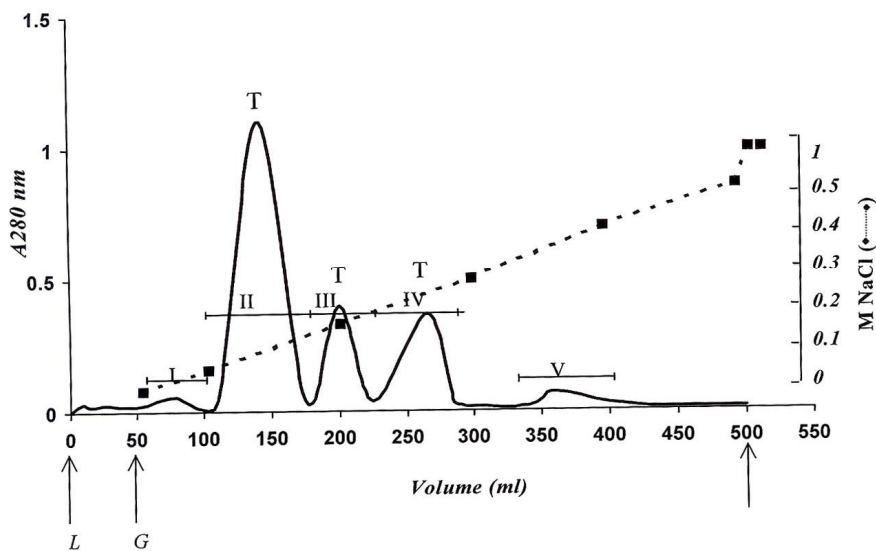
### جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس:

نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 در نمودار ۱ نشان داده شده است. توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از زهر خام مزوبوتوس اپیوس اپیوس ۶ فراکسیون حاصل گردید که به ترتیب P I، P II، P III، P IV، P V، P VI نامگذاری شدند. با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند که به ترتیب LD50 فراکسیون سوم ۰/۴ و فراکسیون چهارم ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید. فراکسیون III به علت دارا بودن سمیت بالا جهت جداسازی اجزای آن توسط کروماتوگرافی

جداسازی وخالص سازی فراکسیون‌های سمی زهر عقرب مزوبوتوس ایپوس (Mesobuthus eupeus)



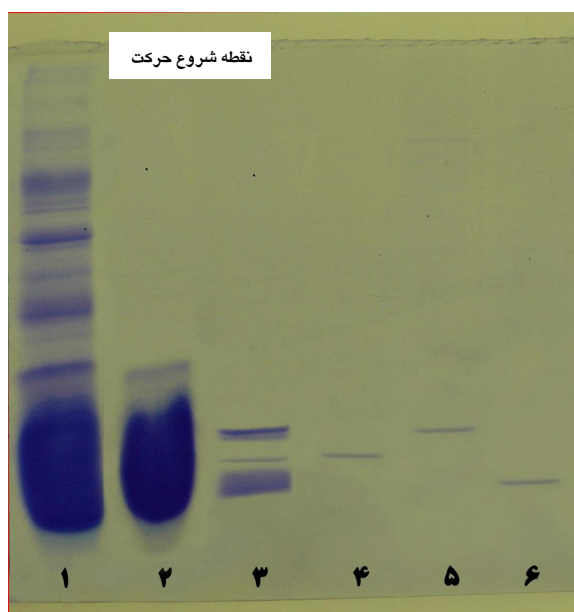
نمودار شماره ۲: کروماتوگرافی تعویض کاتیونی فراکسیون سوم حاصل از مرحله ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۱×۴۰ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵-۰ مولار NaCl در حجم کلی ۵۰۰ میلی لیتر از بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار با pH=۴/۷، ۱۰۰ میلی لیتر استات آمونیوم حاوی یک مولار کلرور سدیم. به ترتیب سرعت جریان ۳۰ میلی لیتر در ساعت. زیر فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند که در شکل با علامت T نشان داده شده‌اند. T = Toxic  
 L\* = loading the sample , G\*\* = Starting gradient, W\*\*\* =Washing with 1 M NaCl –ammonium acetate



نمودار شماره ۳: نتیجه جداسازی اجزای زیرفراکسیون سمی III.14 بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۱×۴۰ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵-۰ مولار NaCl در حجم کلی ۵۰۰ میلی لیتر از بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار با pH=۶ در سرعت جریان ۳۰ میلی لیتر در ساعت. فراکسیون‌های III.14.2 ، III.14.3 ، III.4.4 برای موش‌ها سمی بودند.

جدول: نتایج سنجش پروتئین، سمیت و بازده توکسین‌های خالص شده از فراکسیون III.14

مرحله خالص سازی	فراکسیون	توتال پروتئین (mg)	بازده (%)	سمیت	LD <sub>50</sub> (mg/kg mouse)
CM-Sephadex C-25	III.14	۱۷	۱۰۰	سمی	۰/۳۲
	III.14.1	۰/۵۱	۳	غیرسمی	--
	III.14.2	۸/۳۳	۴۹	سمی	۰/۵۳
	III.14.3	۳/۹۱	۲۳	سمی	۰/۴۲
	III.14.4	۳/۵۷	۲۱	سمی	۰/۱۱
	III.14.5	۰/۲۵	۱/۵	غیر سمی	--
	بازده کل			۹۷/۵	



شکل: الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) :: به ترتیب (۱) سم خام، (۲) فراکسیون III حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، (۳) فراکسیون III.14 حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، (۴) فراکسیون سمی III.14.2، (۵) فراکسیون سمی III.14.3 و (۶) فراکسیون سمی III.14.4. خلوص فراکسیون‌های سمی جدا شده در ردیف‌های ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود.

## بحث

حل مشکلات پزشکی کمک کننده بوده (۱۶، ۱۴). هر چند که مهم‌ترین جنبه‌های مورد علاقه امروزی استفاده از توکسین‌های خالص شده برای مطالعه مکانسیم مولکولی عمل آن‌ها بر روی غشاهای تحریک‌پذیر و برای جداسازی کانال‌های یونی هستند (۱۷). زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته است یکی از شش نوع عقربی است که در ایران دارای اهمیت بالینی بوده و ایجاد ناراحتی‌های عصبی می‌کند و جهت تهیه سرم پلی‌والان ضد عقرب زدگی در موسسه

آزمایش‌هایی که در ارتباط با فعالیت بیولوژیکی زهر عقرب‌ها بر روی موش‌ها و حشرات صورت گرفته ثابت کرده است که تاثیرات زهر عقرب‌ها بیشتر مربوط به پلی‌پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین است که توکسین نامیده می‌شوند (۱۴). بر طبق این آزمایش‌ها توکسین‌های مختلفی از زهر خام جدا شده که به طور مستقیم پستانداران یا حشرات را مورد هدف قرار می‌دهند (۱۵). مطالعه زهر عقرب‌ها و خالص‌سازی توکسین‌ها به ویژه برای تهیه سرم و برای

جدید در زهر عقرب‌ها که مؤثر بر کانال‌های یونی بوده‌اند متمرکز شده است. با این وجود در سال‌های اخیر پپتیدهایی با ساختمان و عملکرد جدید در زهر عقرب‌ها یافت شده‌اند. برای مثال پپتیدهای فاقد اسید آمینه سیستئین که خانواده جدید جالبی از ترکیبات زهر می‌باشند اخیراً یک پپتید از همین نوع، از زهر *Buthus martensi Karsch* با نام Bmkbpp خالص شده است (۲۰). همچنین توکسین‌های آنتی میکروبیال جدا شده از زهر چند گونه عقرب متعلق به خانواده پپتیدهای بدون پیوندهای دی‌سولفیدی هستند. به عنوان مثال هادرورین<sup>۱</sup> از عقرب *Hadurus aztecus* (۲۱)، پارابوتوپورین<sup>۲</sup> از عقرب آفریقای جنوبی *Parabuthus schlechteri* (۲۲) و پاندینین<sup>۱</sup> و پاندینین<sup>۲</sup> از *Pandinus imperator* (۲۳) جداسازی شده‌اند. تحقیقات زیادی در ارتباط با خالص‌سازی اجزای زهر عقرب‌ها شده است. یک توکسین با زنجیره کوتاه از زهر عقرب بوتوس تامولوس در ناحیه هندوستان با استفاده از کروماتوگرافی یونی جدا شده و مشخص شده که از ۳۵ اسید آمینه با وزن مولکولی Da3796 تشکیل شده است و کانال‌های یونی را مهار می‌کند (۲۴). در تحقیقی زهر عقرب مزوبوتوس تامولوس توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با CM-52 جداسازی شده است و اثر آن در متابولیسم گلوتامیک اسید نشان داده شده است که فعالیت گلوتامیک دهیدروژناز را مهار می‌کند و دامنه شدن گلوتامیک کاهش می‌یابد (۲۵). در سال ۲۰۰۵ دو توکسین با نام‌های T3 و T4 از همین زهر همین عقرب شناسایی گردید که علاوه بر داشتن خاصیت نروتوکسیکی باعث ادم ریوی در افراد عقرب‌گزیده می‌شود (۲۶). همچنین یک نوع آلفا توکسین جدید از زهر عقرب *Buthus juaicus* جداسازی و تعیین توالی گردید و مشخص گردید که بر روی کانال‌های سدیمی حشرات مؤثر است (۲۷). در سال ۲۰۰۴ یک نوع توکسین با نام BmBKTx1 از عقرب آسیایی *Buthus martensi Karsch* خالص‌سازی گردید که یک نوع از کانال‌های پتاسیمی موجود در حشرات و انسان را بلوک می‌کند (۲۸). در ارتباط با توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اطلاعاتی در دست نیست لذا در این تحقیق جداسازی توکسین‌های زهر این نوع عقرب انجام شد و سمی‌ترین توکسین به طور خالص جدا شد. در مرحله اول از تکنیک ژل فیلتراسیون

سرم‌سازی رازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این عقرب متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشد که در ایران به ویژه در مناطق کویری و گرمسیری از جمله خوزستان به فراوانی یافت می‌شود و مسئول ۴۵٪ از عقرب زدگی‌ها در این استان می‌باشند (۴). از آنجایی که سموم عقرب‌های خانواده بوتیده برای انسان‌ها توکسیک هستند ویژگی‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی آن‌ها نسبت به سموم عقرب‌ها از خانواده‌های دیگر بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. زهر عقرب‌های خانواده بوتیده بیشتر از پلی‌پپتیدهای نروتوکسیک و پپتیدهای کوچک دیگری با عملکردهای نامعلوم تشکیل شده‌اند (۱۸). با توجه به اینکه مطالعات زیادی در ارتباط با زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس انجام نشده است در این پروژه هدف جداسازی فراکسیون‌های سمی زهر این عقرب می‌باشد. زهر خام عقرب مزوبوتوس اپیوس به طور لیوفیلیزه از موسسه رازی تهیه گردید. این سم به روش شوک الکتریکی تهیه و لیوفیلیزه شده بود. زهر عقرب‌ها حاوی موکوپروتئین می‌باشد که مقدار آن، بسته به روش سم‌گیری متفاوت است. سم‌گیری به روش تحریک الکتریکی و یا تحریک فیزیولوژیک عقرب نسبت به روش سایش غده‌ها مناسب‌تر است زیرا در این حالت کمترین میزان موکوپروتئین‌ها در زهر خام ترشح می‌شود. ماهیت پروتئینی عوامل توکسیک از زهر عقرب در سال ۱۹۰۴ توسط ویلسون مطرح شد ولی خالص‌سازی نهایی توکسین‌های عقرب توسط پروفیسور Francois Miranda در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد شد و متد عمومی خالص‌سازی نروتوکسین‌های سموم حیوانات سمی از قبیل مار و عقرب را ارائه نمود. عمل خالص‌سازی توکسین‌ها به وسیله فیلتراسیون روی Sephadex G-50 و به دنبال آن چندین مرحله کروماتوگرافی تعویض یون بر روی رزین‌های مختلف از جمله DEAE-Sephadex A- و CM-sephadex C50، Amberlit CG-50 انجام پذیرفت (۱۹). استفاده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G-50 در مرحله اول جداسازی اجزای زهر عقرب‌ها یک متد عمومی می‌باشد که در ابتدا توسط پروفیسور Miranda در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد شد (۱۹). با استفاده از تکنیک ژل فیلتراسیون جداسازی اولیه صورت می‌گیرد و عوامل غیرسمی از عوامل سمی جدا می‌شوند. پس از ارائه این طرح کلی در خالص‌سازی توکسین‌ها، محققین زیادی با انجام مراحل فوق و با تغییراتی جزئی در مراحل کار سعی در خالص‌سازی توکسین‌های سموم عقرب‌های سایر گونه‌ها کردند. بیشتر تلاش‌ها در کشف پپتیدهای

<sup>1</sup> Hadrurin

<sup>2</sup> Parabutoparin

<sup>3</sup> Pndinin1 and Pandinin2

مقدار پروتئین نیز نشان می‌دهد که بازده کل حاصل از جداسازی در این مرحله ۹۷ درصد می‌باشد که از این مقدار ۶۹/۰۴ درصد متعلق به فیراکسیون‌های سمی و ۲۸/۰۶ درصد متعلق به فیراکسیون‌های غیر سمی است. در بین زیرفیراکسیون‌ها سمی، زیرفیراکسیون III.14، بیشترین سمیت را نشان داد. جداسازی اجزای این زیرفیراکسیون سمی نیز با استفاده از رزین CM-Sephadex C-25 صورت گرفت با این تفاوت که بافر مورد استفاده دارای pH=۶ می‌باشد. تغییر pH در این مرحله باعث جدا شدن سه توکسین مختلف شد. نتایج آزمایش الکتروفورز خلوص این توکسین‌ها را تأیید نمود. بنابراین در این تحقیق توانستیم توکسین‌های سمی را از زهر عقرب جدا نمائیم و از بین آنها سه توکسین را که سمی‌ترین اثر را بر موش داشتند به طور خالص جدا نمائیم. توکسین‌های خالص شده در تحقیقات آینده جهت تهیه آنتی‌سرم و همچنین مطالعه اثرات فیزیولوژیک و پاتولوژی مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۶۲ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می‌باشد که در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی انجام شده است. مجری طرح بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه که هزینه انجام این پروژه را تأمین نموده تشکر و قدردانی می‌نماید.

### References:

۱. رادمش م. بررسی عقرب‌زدگی درخوزستان. مجله دارو و درمان ۱۳۶۵؛ سال سوم شماره ۲۸: ۱۹-۱۲.
02. Radmanesh M, Clinical study of Hemiscorpio leptus in Iran. J Trop Med Hyg 1990; 93(5): 327-32.
03. Garcia ML, Gao Y, Mcmanus OB, Kaczorowski GJ. Potassium channels: from scorpion venom to high-resolution structure. Toxicon 2001; 39: 739-744.
04. Cestele S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA. Voltage sensor- trapping: Enhanced activation of sodium channel by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. Neuron 1998; 21: 919-931.
05. Haug T, Sigg D, Ciani S, Toro L, Stefani E, Olcese R. Regulation of K<sup>+</sup> flow by a

بر روی سفادکس G-50 برای جداسازی فیراکسیون‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس استفاده گردید. بدین ترتیب اجزای زهر خام بر اساس اختلاف وزن مولکولی جدا شدند. در این مرحله از ۵ میلی لیتر محلول زهر خام که حاوی ۸۱۶ میلی گرم پروتئین بود. شش فیراکسیون به دست آمد و مشاهده شد که فیراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند. LD50 فیراکسیون‌های III و IV به ترتیب ۰/۴ و ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید. نتایج سنجش پروتئین نشان داد که بازده نهایی ژل فیلتراسیون زهر خام ۹۹/۸۷ درصد بود که بازده بسیار خوبی می‌باشد. فیراکسیون‌های III و IV حدود ۶۸/۴٪ مقدار پروتئین اولیه زهر خام را که بر روی ستون برده شد در برمی‌گیرند. با توجه به جداسازی زهر عقرب مزوبوتوس توسط سفادکس G-50 مولکول‌های پپتیدی که خاصیت سمی دارند از نظر وزن مولکولی حد متوسطی را در بین سایر مولکول‌های زهر دارند. در مرحله دوم زیرفیراکسیون‌های فیراکسیون سوم که سمی‌ترین فیراکسیون حاصل از جداسازی با روش ژل فیلتراسیون بود با استفاده از ستون CM-sephadex C-25 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار با pH= ۴/۷ و گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار NaCl در همان بافر جدا گردید. رزین CM-Sephadex C-25 یک رزین تعویض یونی کاتیونی است. اجزاء فیراکسیون III حاصل از ژل فیلتراسیون توسط کروماتوگرافی ستونی CM-Sephadex C-25 به بیست زیر فیراکسیون تفکیک گردید مطالعه سمیت آنها بر روی موش‌ها نشان داد که زیرفیراکسیون‌های III.14 تا III.19 اثر سمی دارند. نتایج سنجش

ring of negative charge is the outer pore of BKCa Channel part1: Asparate 292 modulates K<sup>+</sup> conduction by external surface charge effect. J Gen Physiol 2004; 124(2): 137-84.

06. Goudet C, Wu Chi C, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon 2002; 40: 1239-1258.
07. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. Curr Opin Struct Biol 2000;10(4): 456-461.
08. Miller C. An overview of the potassium channel family. Genomic Boil 2000; 4(2): 148-51.



09. Ramirez AN, Gurrola GB, Martin BM, Possani LD. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1988; 26(9): 773-783.
10. Lowry OH, Rosebrough N, Furr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.
12. Finney DJ. The median lethal dose and its estimation. *Arch Toxicol* 1985; 56(4): 215-218
13. Lourival D, Possani Paul L, Fletcher JR, Andres BC. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1980; 18(2): 175-83.
14. Legros C, Kaabi H, Ayeub M, Ceard B, Vacher H, Bougis PE. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 2002; 20: 934-942.
15. Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxin: Chemistry and mode of action. In: B. Ceccarelli, F Clementi (Editors) *Advances in Cytopharmacology*. New York: Raven Press; 1979. P 325-334.
16. Possani LD, Fernandez de Castro J, Julia JZ. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius hoffman*) venom. *Toxicon* 1981; 19: 323-329.
17. Sandrine C, Catterall AW. Molecular mechanism of neurotoxin on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 2000; 82: 883-892.
18. Goyffon M, Gutte C. Dangerous scorpion from Niger. *Bul Soc Pathol Exot* 2005; 98(4): 293-5.
19. Miranda F, Kupeyan C, Rochat H. Purification of animal neurotoxins. *Eur J Biochem* 1970; 16: 514 – 523.
20. Zeng XC, Li WX, Peng F, Zho ZH. Cloning and characterization of a novel CDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BMKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch. *IUBMB Life* 2000; 49: 207-210.
21. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5023-5031.
22. Verdonck F, Bosteels S, Desmet J, Moerman L, Noppe W, Willems J, et al. A novel class of pore-forming peptides in The venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (scorpion: *Buthidae*). *Cimbebasia* 2000; 16: 247-260.
23. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from vnom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 2001; 359: 35-45.
24. Dhawan RD, Joseph S, Sethi A, Lala AK. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *FEBS Lett* 2002; 528(1-3): 261-266.
25. Lokanatha V, Rajendra W. Fractionation of scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom and the impact of specific fractions on glutamate metabolism. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002; 6(3):167-170.
26. Deshpande SB, Alex AB, Jagannadham MV, Rao GR, Tiwari AK. Identification of a novel pulmonary oedema producing toxin from Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom. *Toxicon* 2005; 45(6):735-743.
27. Arnon T, Potikha T, Sher D, Bjalpha IT. A novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; 35(3):187-195.
28. Xu CQ, Brone B, Wicher D. BmBKTx1, A novel  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34562-34569.