مقاله پژوهشی

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

منیژه کدخدائی الیادرانی[۱]، حسین حنیفی[۲]، زهره آموزگاری[۳]

تاریخ دریافت ۸٤/۰۸/۰۹، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۲/۲۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عقرب مزوبوتوس اپیوس[٤] از عقرب‌های خانواده بوتیده[٥] 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 اپیوس به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-50 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولارpH=٤/٧ جدا سازی شد. سپس اجزای سمی ترین فراکسیون به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی جدا شد و خلوص آن‌ها به وسیله الکتروفورز مورد تائید قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری: از ۸۱٦ میلی‌گرم پروتئین زهر خام که روی ستون سفادکس G-50 برده شد، ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین در ٦ 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[٦] آن‌ها به ترتیب ۰/٤ و ۰/٤٦ 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 وpH=٤/٧ 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، ۲٤۲/۷۵ 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=٦ به کاربرده 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.

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

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره چهارم، ص۲۹۷-۲۸۹، زمستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دکتر منیژه کدخدائی
E-mail: kadkhodaeim@yahoo.com

[۱] استاد گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز (نویسنده مسؤل)
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی
[۳] مربی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

[4] Mesobuthus eupeus
[5] Buthidae
[6] Lethal Dose50

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

به طور کلی عقرب‌های ایران متعلق به دو خانوادهٔ بوتیده و اسکورپیونیده می‌باشند. عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس[1] 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 عقرب زدگی‌ها ناشی از عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشند. در خوزستان حدود٤٥ درصد عقرب گزیدگی‌ها مربوط به مزوبوتوس می‌باشد(١،٢). 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(٤،٣). 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 نروترانسمیترها از بافت‌های تحت تاثیر قرار گرفته می‌باشد(٥). زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده حاوی انواع مختلفی از توکسین‌ها می‌باشند. توکسین‌های زنجیره بلند با ٧٠-٦٠ توالی اسیدآمینه و چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای عمدتاً بر روی کانال‌های سدیمی عمل می‌کنند(٦). توکسین‌های زنجیره کوتاه که از ٤٠-٣٠ توالی اسید آمینه بیشتر با سه پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده‌اند که عمدتاً بر روی کانال‌های کلرو پتاسیم عمل می‌کنند(٨،٧). 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 بعدی 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، تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین(TEMED)، آمونیوم پرسولفات و آلبومین 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 اپیوس تمام مراحل جداسازی در ٤ درجه سانتی‌گراد و به روش Angelina صورت گرفت(٩). یک گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ١٠ میلی لیتر آب مقطر حل گردید، سپس محلول حاصل به مدت ١٢ دقیقه با دور g ١٨٠٠٠ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و قسمت محلول (محلول روئی) از قسمت نامحلول جدا گردید. قسمت رویی حاوی پپتیدها و پروتئین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول رویی پس از تغلیظ شدن در حجم ٥ میلی‌لیتر که حاوی ٨١٦ میلی گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-50 به ابعاد (١٠٠×٧/٢cm) در تعادل با بافراستات آمونیوم ٢٠ میلی مولار(pH=٤/٧) گردید. بعد از اینکه نمونه جذب ژل گردید بافر فوق با سرعت جریان ٣٠ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد. محلول خروجی در حجم‌های ٣ میلی‌لیتری به طور مجزا توسط دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک[2] جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌ها بلافاصله در طول موج ٢٨٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (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 ٢٤ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغلیظ گردیدند. سمیت هر یک از فراکسیون‌ها با تزریق ٤٠ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش و با مشاهده علائم مسمومیت از قبیل افزایش ضربان قلب و فلج عظلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD50 فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین فراکسین‌ها بر اساس روش Lowry

[1] Mesobuthus eupeus

[2] Fraction collector

Archive of SID

www.SID.ir

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-sephadexC-25 انتخاب گردید. بدین منظور ۷ میلی‌لیتر از فراکسیون سوم حاوی ۲۵۰mg پروتئین وارد ستونی از CM-sephadex C-25 به ابعاد(۴۰×۱cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم۲۰ میلی مولار (pH=۴/۷) گردید بعد از اینکه نمونه جذب ژل شد، ستون ابتدا با بافراستات آمونیوم ۲۰ میلی مولار با pH =۴/۷ با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. محلول خارج شده به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر درهر 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 pH=۴/۷ درحجم کلی ۵۰۰ میلی لیتر شسته شد. پس از آن ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱مولار 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 وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر (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 عظلات 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 (۴۰×۱ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ گردید پس از جذب نمونه در ژل، ستون ابتدا با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH =۶ و با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر درساعت 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 pH=۶ 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 آماده در مراحل مختلف کروماتوگرافی الکتروفوروز روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد در حضور سدیم دودسیل سولفات[1] 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 همهٔ 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 میلی لیتر از هر دوز به چهار موش (به هر موش ۰/۵ میلی لیتر) که قبلاً علامت‌گذاری شده و در قفس‌های جداگانه قرار داده شده بودند به طریق زیر جلدی[2] 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:

[1] SDS-PAGE
[2] Subcutaneous

Archive of SID

www.SID.ir

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

m برابر است با log LD50

X_{100} برابر است با log دوزی که صددرصد کشندگی داشته باشد.

n تعداد موش‌های استفاده شده درهر دوز

r تعداد موش‌های مرده در هر دوز

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

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

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

$$\text{Fiducial limits} = \text{antilog}(m \pm t0.05\sqrt{v(m)})$$

t 0.05 برای $\sum n - 1$ درجه آزادی

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

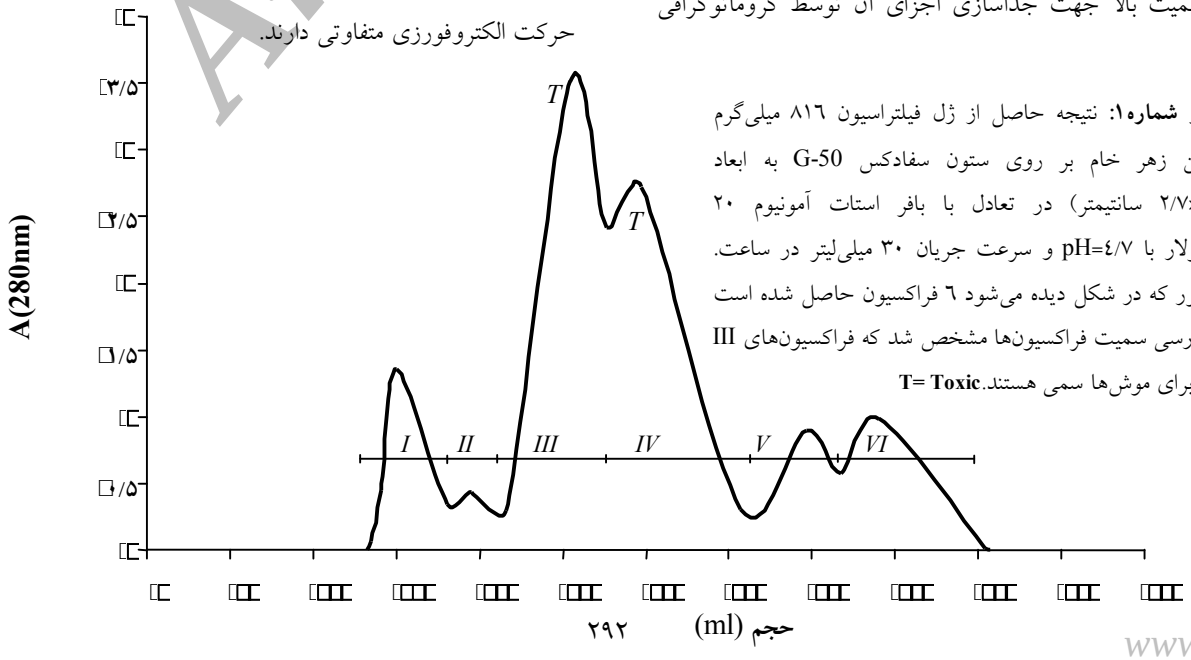
یافته‌ها

جداسازی توکسین های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس:

نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 در نمودار۱ نشان داده شده است. توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از زهر خام مزوبوتوس اپیوس اپیوس ٦ فراکسیون حاصل گردید که به ترتیب P I، P II، P III، P IV، P V، PVI نامگذاری شدند. با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند که به ترتیب LD50 فراکسیون سوم ۰/٤ و فراکسیون چهارم ۰/٤٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید. فراکسیون III به علت دارا بودن سمیت بالا جهت جداسازی اجزای آن توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی انتخاب گردید. فراکسیون‌های سمی در نمودار با علامت T نشان داده شده‌اند.

نتیجه کروماتوگرافی تعویض کاتیونی ۲۵۰ میلی گرم پروتیئن فراکسیون III در نمودار ۲ نشان داده شده است۰ 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 با۰/۳۲ 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 ٤/۷ در مرحله قبل به ٦ انتخاب گردید.

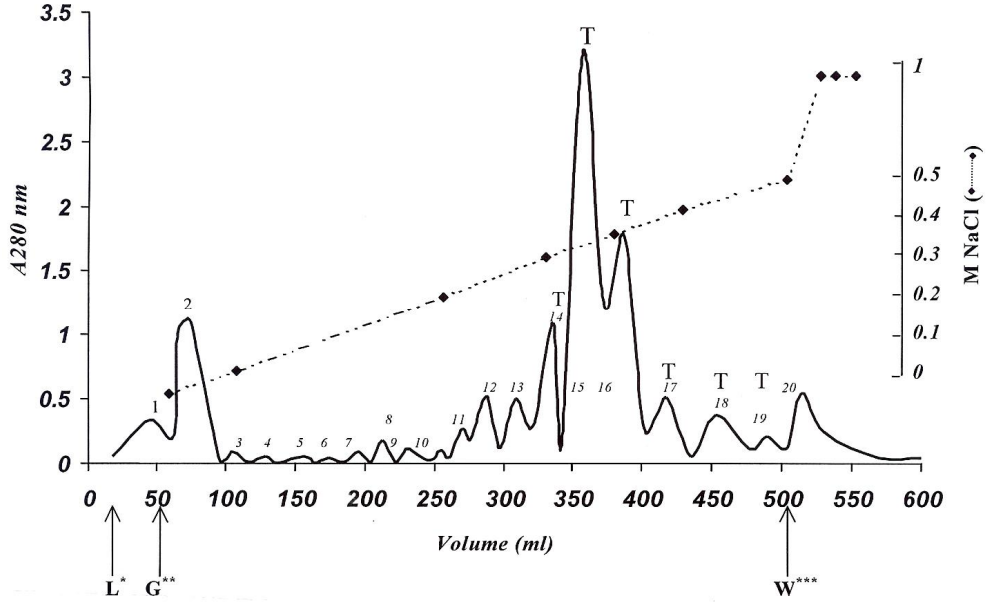
نتیجه حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیونن فراکسیون III.14 (حاوی ۱۷ میلی‌گرم پروتئین) در نمودار ۳ نشان داده شده است. در این مرحله زیرفراکسیون III.14 به پنج جز تفکیک گردید که پس از بررسی سمیت آن‌ها بر روی موش‌ها مشخص گردید که فراکسیون‌های III.14.2، III.14.3، III.14.4 برای موش‌ها سمی بودند. سنجش پروتئین، بازده، سمیت و مقادیر LD50 در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. به طور کلی یک گرم زهر خام حاوی ۸۱٦ 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.



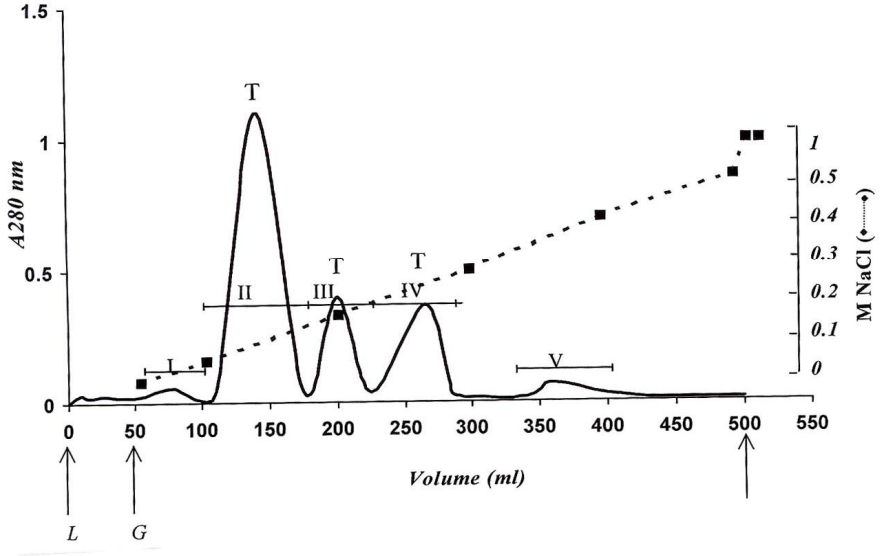
نمودار شماره۱: نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱٦ میلی‌گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۱۰۰×۲/۷ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=٤/۷ و سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت. همانطور که در شکل دیده می‌شود ٦ فراکسیون حاصل شده است و با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی هستند. **T= Toxic**

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره۲: کروماتوگرافی تعویض کاتیونی فراکسیون سوم حاصل از مرحله ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۴۰×۱سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵-۰ مولار NaCl در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر از بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷، ۱۰۰ میلی‌لیتر استات آمونیوم حاوی یک مولار کلرور سدیم. به ترتیب سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت. زیر فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند که در شکل با علامت T نشان داده شده‌اند. L*= loading the sample , G**= Starting gradient, T= Toxic
W *** =Washing with 1 M NaCl –ammonium acetate

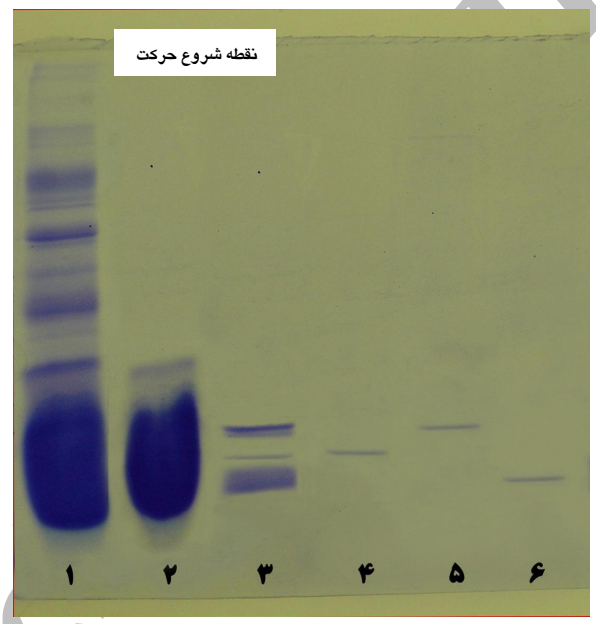


نمودار شماره ۳: نتیجه جداسازی اجزای زیرفراکسیون سمی III.14 بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۴۰×۱ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵-۰ مولار NaCl در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر از بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH =٦ در سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت.فراکسیون‌های III14.2 ، III.14.3 و III.4.4 برای موش‌ها سمی بودند.

www.SID.ir

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

مرحله خالص سازی	فراکسیون	توتال پروتئین (mg)	بازده (٪)	سمیت	LD_{50} (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	٤۹	سمی	۰/۵۳
	III.14.3	۳/۹۱	۲۳	سمی	۰/٤۲
	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، (٤) فراکسیون سمی III.14.2، (۵) فراکسیون سمی III.14.3 و (٦) فراکسیون سمی III.14.4 . خلوص فراکسیون‌های سمی جدا شده در ردیف‌های ٤،۵ و ٦ مشاهده می‌شود.

بحث

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(١٤). بر طبق این آزمایش‌ها توکسین‌های مختلفی از زهر خام جدا شده که به طور مستقیم پستانداران یا حشرات را مورد هدف قرار می‌هند(١۵). مطالعه زهر عقربها و خالص‌سازی توکسین‌ها به ویژه برای تهیه سرم و برای حل مشکلات پزشکی کمک کننده بوده(١٦،١٤). 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(١٧). زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس 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 پلی والان ضد عقرب زدگی در موسسه

www.SID.ir

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 ٤٥٪ از عقرب زدگی‌ها در این استان می‌باشند(٤). 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(١٨). 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 ١٩٠٤ توسط ویلسون مطرح شد ولی خالص‌سازی نهایی توکسین‌های عقرب توسط پروفسور Francois Miranda در سال ١٩٧٠ 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 SephadexG-50 و به دنبال آن چندین مرحله کروماتوگرافی تعویض یون بر روی رزین‌های مختلف از جمله Amberlit CG-50، CM-sephadex C50 و DEAE-Sephadex A-50 انجام پذیرفت(١٩). استفاده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G-50 در مرحله اول جداسازی اجزای زهر عقرب‌ها یک متد عمومی می‌باشد که در ابتدا توسط پروفسور Miranda در سال ١٩٧٠پیشنهاد شد(١٩). با استفاده از تکنیک ژل فیلتراسیون یک 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 خالص سازی توکسین‌های سموم عقرب‌های سایر گونه‌ها کردند. بیشتر تلاش‌ها در کشف پپتیدهای 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 خانوادهٔ جدید جالبی از ترکیبات زهر می‌باشند اخیراً یک پپتید از همین نوع، از زهر Buthus martensi Karsch با نام Bmkbpp خالص شده است(٢٠). همچنین توکسین‌های آنتی میکروبیال جدا شده از زهر چند گونه عقرب متعلق به خانواده پپتیدهای بدون پیوندهای دی‌سولفیدی هستند. به عنوان مثال هادرورین[1] از عقرب Hadrurus aztecus (٢١)، پارابوتوپورین[2] از عقرب آفریقای جنوبی Parabuthus schlechteri (٢٢) و پاندینین١ و پاند ینین٢[3] از Pandinus imperator (٢٣) جداسازی شده‌اند. تحقیقات زیادی در ارتباط با خالص‌سازی اجزای زهر عقرب‌ها شده است. یک توکسین با زنجیره کوتاه از زهر عقرب بوتوس تاملوس در ناحیه هندوستان با استفاده از کروماتوگرافی یونی جدا شده و مشخص شده که از ٣٥ اسید آمینه با وزن مولکولی Da3796 تشکیل شده است و کانال‌های یونی را مهار می‌کند(٢٤). در تحقیقی زهر عقرب مزوبوتوس تاملوس 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 دآمینه شدن گلوتامیک کاهش می‌یابد(٢٥). در سال ٢٠٠٥ 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 عقرب گزیده می‌شود(٢٦). همچنین یک نوع آلفا توکسین جدید از زهر عقرب Buthotus juaicus جداسازی و تعیین توالی گردید و مشخص گردید که بر روی کانال‌های سدیمی حشرات موثر است(٢٧). در سال ٢٠٠٤ 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(٢٨). 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

[1] Hadrurin
[2] Parabutoporin
[3] Pndinin1 and Pandinin2

Archive of SID

www.SID.ir

بر روی سفادکس G-50 برای جداسازی فراکسیون‌های 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 ۸۱٦ میلی گرم پروتئین بود. شش فراکسیون به دست آمد و مشاهده شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند. LD50 فراکسیون‌های III و IV به ترتیب ۰/٤ و۰/٤٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید. نتایج سنجش پروتئین نشان داد که بازده نهایی ژل فیلتراسیون زهر خام۹۹/۸۷ درصد بود که بازده بسیار خوبی می باشد. فراکسیون‌های III و IV حدود ٦۸/٤٪ مقدار پروتئین اولیه زهر خام را که بر روی ستون برده شد در برمی‌گیرند. با توجه به جدا سازی 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 زیرفراکسیون‌های فراکسیون سوم که سمی‌ترین فراکسیون 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= ٤/۷ و گرادیان خطی تا۰/۵ مولار NaCl در همان بافر جدا گردید. رزین CM-Sephadex C-25 یک رزین تعویض یونی کاتیونی است. اجزاء فراکسیون III حاصل از ژل فیلتراسیون توسط کروماتوگرافی ستونی CM-Sephadex C-25 به بیست زیر فراکسیون تفکیک گردید مطالعه سمیت آنها بر روی موش‌ها نشان داد که زیرفراکسیون‌های III.14 تا III.19 اثر سمی دارند. نتایج سنجش مقدار پروتئین نیز نشان می‌دهد که بازده کل حاصل از جداسازی در این مرحله ۹۷ درصد می‌باشد که از این مقدار ٦۹/۰٤ درصد متعلق به فراکسیون‌های سمی و ۲۸/۰٦ درصد متعلق به فراکسیون‌های غیر سمی است. در بین زیرفراکسیون‌ها سمی، زیرفراکسیون III.14، بیشترین سمیت را نشان داد. جداسازی اجزای این زیرفراکسیون سمی نیز با استفاده از رزین CM-Sephadex C-25 صورت گرفت با این تفاوت که بافر مورد استفاده دارای pH=٦ می باشد. تغییر pH در این مرحله باعث جدا شدن سه توکسین مختلف شد. نتایج آزمایش الکتروفورز خلوص این توکسین‌ها را تائید نمود. بنابراین در این تحقیق توانستیم توکسین‌های سمی را از زهر عقرب جدا نمائیم و از بین آنها سه توکسین را که سمی ترین 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 ۱٦۲ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می‌باشد که در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی انجام شده است. مجری طرح بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه که هزینه انجام این پروژه را تامین نموده تشکر و قدردانی می‌نماید.

References:

۰۱. رادمنش م. بررسی عقرب‌زدگی درخوزستان. مجله دارو و درمان ۱۳٦۵؛ سال سوم شماره ۲۸: ۱۹-۱۲.

02. Radmanesh M, Clinical study of Hemiscorpoin 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 veoms 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-scorpeion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. Nearon 1998; 21: 919-931.
05. Haug T, Sigg D, Ciani S, Toro L, Stefani E, Olcese R. Regulation of K^+ flow by a ring of negative change is the outer pore of BKCa Channel part1: Asparate 292 modulates K^+ 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.

Archive of SID

www.SID.ir

09. Ramirez AN, Gurrola GB, Martin BM, Possani LD. Isolatron of several toxins from the venom of the scorpion centruroiedes limipidus 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, Ayeb 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 neuroroxin on voltage-gated sodium channels. Biochimie 2000; 82: 883-892.
18. Goyffon M, Gutte C. Dangerous scorption 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 scopion 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.

Archive of SID

www.SID.ir