



مقایسه افتراقي اجزاء پروتئيني زهر دوگونه از عقرب هاي بوتيده "Buthidae"

بومي ايران توسط الکتروفورز دو بعدی

علیرضا فرهمندزاد^{*}، رحيم سروري^۱، فيروز ابراهيمی^۱، مهدى كمالی^۱، جمیل زرگان^۱

^۱ مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

^۲ مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

چکیده

زمینه: الکتروفورز دو بعدی يكی از سودمندترین تکنيک‌های جداسازی در پروتوميکس است. هر پروتوم یک نقشه کامل از پروتئين است. توسط اين تکنيک، چندين نوع پروتئين در يك زمان، قابل بررسی می‌باشد. بهمنظور مطالعه مقایسه‌ای محتواي کل پروتئيني زهر عقرب از اين تکنيک استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: در اين مطالعه، تفاوت الگوهای به دست آمده از تفکیک اجزای پروتئینی زهر دوگونه عقرب اندرؤکتانوس کراسی کودا *Androctonus crassicauda* معروف به عقرب سیاه و اودونتوپیتوس دوریه *Odontobuthus doriae* یا عقرب زرد که از خانواده بوتیده هستند، توسط ژل الکتروفورز دو بعدی بر مبنای بار الکتریکی و وزن مولکولی بررسی گردیده است.

یافته‌ها: در محدوده $pH=6/۲-۸/۲$ از عقرب کراسی کودا پیتیدهای کمتر از ۳ تا ۱۴ کیلو دالتون و در محدوده $pH=۶/۳-۸/۵$ از عقرب دوریه پیتیدهای ۱ تا ۴۵ کیلو دالتون جداسازی شد.

نتیجه‌گیری: با اين روش، زمينه ايجاد بانک اطلاعات از شناسنامه زهر عقرب‌های بومي ايران فراهم می‌گردد. با ايجاد تغيير در هر يك از فاكتورهای تأثيرگذار بر زهر عقرب، می‌توان به نتایج قابل توجهی نسبت به تأثير آن عامل در تعیین نوع زهر دست یافت، که با اين روش قابل مطالعه می‌باشد.

وازگان کلیدی: عقرب، بوتیده، زهر، الکتروفورز دو بعدی

دریافت مقاله: ۸۹/۹/۶ - پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۱

* تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، مرکز تحقیقات علوم زیست‌شناسی

مقدمه

قدرت زهر در گونه‌های مختلف عقرب از هم متفاوت است، حتی زهر عقرب‌ها در یک گونه نیز با یکدیگر متفاوت است. اثر زهر بعضی از عقرب‌ها در حد یک آنفلوانزای خفیف و بعضی در حد مرگ است. این تأثیر به خاطر تنوع اسید آمینه‌های پروتئین سم و در نتیجه نحوه اتصال آنها با سلول‌های هدف گزارش شده است (۱۲ و ۱۵).

از عوامل مختلفی که سبب تأثیر زهر بر مصدوم می‌شود و می‌توان به آن اشاره نمود: ۱- نوع سم عقرب ۲- سن عقرب ۳- جنس عقرب ۴- دفعات نیش زدن ۵- میزان سم وارد شده به بدن ۶- آب و هوای منطقه ۷- فصل و زمان نیش زدن عقرب ۸- محل نیش در مصدوم ۹- سن مصدوم می‌باشد (۱۴).

در کشور ایران سرم پلی‌والان ضد عقرب ساخته شده به وسیله مؤسسه رازی بر علیه شش گونه عقرب، *Mesobothus eupeus* (ثورپوس)، *Buthotus saulcyi* (بوتوپوس) سولسای، *Odontobuthus doriae* (او دونتوبوتوس دوریه)، *Androctonus crassicauda* (اندرکتانوس کراسی کودا)، اسکورپیو (Scorpio maurus) و همیسکورپیوس لپتوروس (*Hemiscorpius lepturus*) در دسترس می‌باشد (۱۴). برخی از پیتیدهای زهر عقرب‌ها اثرات داشته و از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نمایند (۶ و ۱۱-۹). همچنین برخی از پیتیدهای سم عقرب اثرات حشره‌کشی و میکروب‌کشی شدید داشته و در مبارزه بیولوژیک با آفات و عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۲). وزن مولکولی پیتیدهای سموم عقرب عموماً بین ۷۰۰۰- ۷۰۰ دالتون و pI آنها حدود ۱۱-۸ می‌باشد.

عقرب‌ها بندپایانی هستند که تاکنون حدود ۱۲۵۰ گونه از آن در دنیا شناسائی شده است. که معمولاً زهر یک عقرب شناسایی شده واجد حدود یک صد پیتید مختلف است و لذا می‌بایست بیش از ۱۰۰۰۰ نوع پیتید از سوم زهر عقرب شناسایی شده باشد اما در میان این تعداد فقط حدود ۲۰۰ نوع پیتید به لحاظ ساختاری و عملکردی شناسایی شده‌اند (۱) لذا چشم‌انداز زمینه تحقیق در این حوزه بسیار وسیع است.

از سال ۱۹۷۵ تاکنون کاربرد الکتروفورز دو بعدی غالباً در زمینه تخلیص پروتئین، تشخیص بیماری‌ها و تأثیر داروها بوده است و در زمینه شناسایی زهر عقرب با این روش تنها به تشخیص و مقایسه پروفایل آنها پرداخته می‌شود. محققین دنیا غالباً برای دستیابی به پیتیدهای خاص زهر عقرب از روش‌های دیگر چون کروماتوگرافی مایع فاز معکوس استفاده کرده‌اند، لذا سابقه بکارگیری الکتروفورز دو بعدی جهت شناسایی زهر عقرب در دنیا محدود و در ایران گزارش نشده است و برای اولین بار از این روش استفاده می‌شود، که حائز اهمیت است.

زهر عقرب، ترکیبی از غلظت‌های متنوعی از نوروتوكسین، کاردیوتوكسین، نفروتوكسین، هموتوكسین و آنزیم‌هایی چون فسفو دی‌استرازها، فسفولیپازها، هیالورونیدازها، گلیکوزامین گلیکان‌ها، هیستامین، سروتونین، تریپتوفان و آزادکننده‌های سایتوکاینی می‌باشد و معمولاً خاصیت آبگریزی و بازی دارند. ساختمان عمومی پروتئین سم عقرب از یک یا دو آلفا هلیکس و صفحات بتا تشکیل شده که در میان آنها تعداد سیستئین باقیمانده تقریباً موجب پایداری پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختمان بیشتر سوم عقرب‌ها می‌شود (۱۴ و ۱۶).

۵۰ عدد عقرب آندروکتانوس کراسی‌کودا از منطقه خوزستان صید گردید و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. سم‌گیری به‌وسیله الکتروشوک صورت گرفت. بعد از استحصال زهر، بلافاصله آن را با سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول روئی در دمای زیر ۴ درجه سانتی‌گراد جهت مراحل بعد نگهداری گردید.

غلظت‌سنگی پروتئین

غلظت‌سنگی به‌روش برادفورد با استفاده از پروتئین استاندارد BSA انجام گرفت (۱۷).

الکتروفورز

برای بررسی اولیه، از ژل الکتروفورز SDS-PAGE با غلظت ۱۵ درصد استفاده شد و سپس جهت شناسایی پیشدهای زهر، روش الکتروفورز دو بعدی اجرا گردید.

مراحل الکتروفورز دو بعدی

IEF- بعد اول

بعد اول، ژل IEF یک ژل معمولی ۵ درصد می‌باشد. بعد از آماده‌سازی ژل، طبق دستورالعمل ابتدا ولتاژ روی ۲۰۰ ولت ثابت به‌مدت ۹۰ دقیقه و با تغییر ولتاژ بر ۴۰۰ ولت به‌مدت ۹۰ دقیقه تنظیم گردید. بعد از پایان این مرحله ژل IEF در محلول متداول‌سازی به‌مدت ۳۰-۱۵ دقیقه قرار گرفت.

سپس ژل را از محلول خارج ساخته، بخش مربوط به پروتئین به‌شکل یک نوار باریک به پهنهای ۱/۰ تا ۱ سانتی‌متر با تیغ جدا گردید و بر روی صفحه شیشه‌ای قرار داده شد.

بعد دوم- SDS-PAGE Tricine

ژل‌ها ابتدا در محلول (TCA) اسیدتری‌کلرواستیک ۱۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و سپس در محلول

سموم عقرب، عموماً به دو دسته نوروتوکسین‌ها و سایتوتوکسین‌ها تقسیم می‌شوند. نوروتوکسین‌ها، کانال‌های یونی پتاسیم، سدیم، کلسیم و کلر سیستم عصبی و سایتوتوکسین‌ها سلول و بافت اندام موجودات را هدف قرار می‌دهند (۱، ۸ و ۱۲).

از آنجا که تأثیرات سموم نوروتوکسیک عقرب به مراتب بیشتر از سموم سایتوتوکسیک است، لذا بیشتر مطالعات بر روی سموم نوروتوکسیک متمرکز شده است. عقرب‌های مورد بررسی در این تحقیق، عقرب‌های ادونتوبوتوس دوریه و آندروکتانوس کراسی‌کودا که از خانواده بوتیده بوده انتخاب گردید، زیرا به لحاظ فراوانی و پراکندگی جغرافیایی و از نقطه نظر آمار عقرب‌گزیدگی بعد از عقرب جراره، رتبه دوم را در ایران حائز اهمیت است (۱۶).

طی تحقیقات به عمل آمده، میزان سمیت زهر عقرب آندروکتانوس کراسی‌کودا، با (LD ۵۰) ۱۹۰ میکروگرم به‌ازای هر ۲۰ گرم موش است، و (LD ۵۰) عقرب ادونتوبوتوس دوریه ۸۰-۵۰۰ میکروگرم به‌ازای هر ۱۰۰۰ گرم موش است (۴). آنچه در این تحقیق به آن توجه شده است، تهیه پروفایل یا نقشه کامل از سموم زهر عقرب‌های موردنظر با استفاده از روش ژل الکتروفورز دو بعدی بوده که مبنای تحقیقات بعدی می‌تواند باشد.

مواد و روش کار

مواد مورد آزمایش تماماً از شرکت مرک آلمان تهیه گردیده است.

روش جمع‌آوری و نگهداری عقرب‌ها

تعداد ۶۰ عقرب ادونتوبوتوس دوریه از مناطق بیابانی اطراف شهر تهران طی چند مرحله عملیات صحراوی و

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، و غلظت پروتئین زهر عقرب کراسیکودا ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. ابتدا، جداسازی پروتئین‌های زهر توسط الکتروفوروز تحت شرایط سدیم دو دسیل سولفات پلی‌اکریل‌آمید انجام گرفت.

در تصویر ۲ تأثیر حرارت دادن بافر و نمونه در اجرای ژل و تفکیک بهتر فراکسیون‌ها با ژلی که بافر و نمونه آن حرارت داده نشده است مقایسه و نشان داده شده است.



تصویر ۲) مقایسه تأثیر حرارت بر نمونه در ژل

ستون‌ها از سمت چپ به راست:

۱-مارکر Fermentas-low molecular weight SM 3410

۲-مارکر molecular weight

۳-نمونه به مدت ۵ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد

۴-نمونه بدون حرارت

سپس به منظور جداسازی بهتر فراکسیون‌های زهر از ژل‌تریسین با غلظت ۱۶/۵ درصد استفاده گردید. (تصویر ۳)، و نتایج آن به شرح زیر به دست آمد: زهر عقرب کراسیکودا دارای پروتئین‌های به جرم مولکولی ۳، ۶/۵، ۱۴ و ۱۵ کیلو دالتون و زهر عقرب دوریه شامل پیتیدهای ۳، ۶/۵، ۱۵ و ۲۷ کیلو دالتون بود. البته ژلهای ناپیوسته نسبت به ژلهای پیوسته قدرت تغکیک‌کنندگی بیشتری داشتند.

(CAT) اسیدتری کلرواستیک ۱ درصد به مدت ۲ ساعت تا یک شباهه روز قرار داده شد تا آمفویلت‌ها خارج شدند.

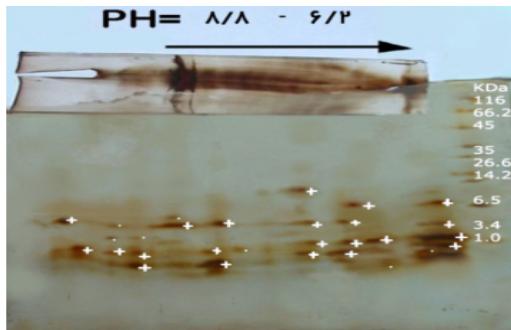
پس از انتقال نوار ژل IEF بر روی صفحه شیشه‌ای و آماده شدن ژل تریسین، صفحات شیشه‌ای به تانک متصل و بعد از پرنمودن مخازن از بافرها، الکتروودها به دستگاه وصل گردید و ولتاژ بر روی ۹۰ ثابت گردید و به مدت ۲۰ ساعت ژل رانده شد. سپس ژل از صفحات شیشه‌ای جدا و حدود نیم ساعت درون محلول آب بدون یون، جهت شستشو قرار داده، و برای ثابت شدن، در محلول گلوتارالدیئد ۵ درصد به مدت یک ساعت غوطه‌ور گردید. با اتمام زمان، سه‌بار و هر بار به مدت ۱۰-۵ دقیقه ژل شستشو شد و در ادامه یک دقیقه در محلول تیوسولفات قرار داده و بلافاصله یک دقیقه با آب بدون یون ژل شستشو گردید و مراحل رنگ‌آمیزی انجام گرفت.

رنگ‌آمیزی با نیترات نقره

بعد از ثابت شدن به وسیله گلوتارالدیئد ۵ درصد و انجام شستشوی کامل ژل، به مدت ۲۰ دقیقه در داخل محلول نقره قرار گرفته و پس از پایان این مرحله، یک دقیقه با آب شستشو شد و سپس درون محلول ظهر گذارده تا نقطه‌های پروتئینی به تدریج ظاهر گردید. ژل در داخل ظرف حاوی محلول توقف حدود ۱۰ دقیقه قرار گرفت و به محض تغییر رنگ زمینه، ژل از درون ظرف خارج گردید (تصاویر ۴ و ۵). به منظور نگهداری، ژل درون محلول الكل اتیلیک ده درصد قرار گرفت.

یافته‌ها

قبل از آماده سازی ژل، غلظت‌سننجی انجام گرفت. غلظت پروتئین زهر عقرب ادونتوبوتونس دوریه ۷۵



تصویر(۵) ژل الکتروفورز دو بعدی، الگوی پپتیدهای زهر عقرب کراسیکودا

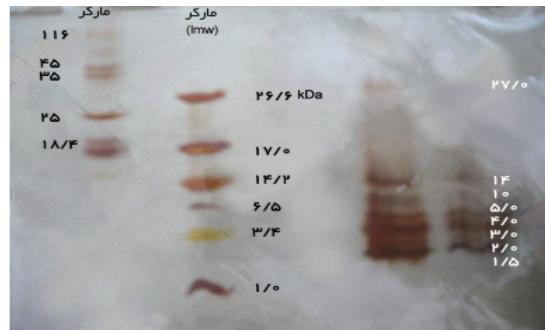
در الکتروفورز دو بعدی، جرم مولکولی پپتیدهای زهر عقرب دوریه در سه بخش طبق جداول ارائه شده، در محدوده ۴۵-۶۶ کیلو دالتون با pH ۶/۳-۸/۵، در محدوده ۲۵ کیلو دالتون با pH ۶/۳-۸/۵ و در محدوده ۱-۶/۵ کیلو دالتون محاسبه شد، اما وزن مولکولی غالب پپتیدهای زهر عقرب کراسیکودا در محدوده >۳-۶/۵ کیلو دالتون و در pH ۶/۲-۸/۲ مشاهده گردید.

جدول (۱) مقایسه مجموع پپتیدهای زهر دو عقرب بر مبنای بار الكتریکی و وزن مولکولی توسط الکتروفورز دو بعدی

MW	pH			MW	pH			
	۸/۲	۷/۷	۷/۲		۸/۵	۸	۷/۷	۶/۳
۶۶/۲	-	-	-	-	۶۶/۲	۳	۲	-
۴۵	-	-	-	-	۴۵	۲	۱	۳
۳۵	-	-	-	-	۳۵	-	۱	-
۲۵	-	-	-	-	۲۵	۵	۲	۱
۱۷	-	-	-	-	۱۷	-	-	-
۱۴	-	-	۱	-	۱۴	-	-	-
۶/۵	۱	۲	۲	۱	۶/۵	-	۲	۱
>۳	۴	۲	۵	۳	۱	۲	۱	۲
جمع			۳۰	پپتید (کراس)	جمع			۳۰

بحث

امروزه بیشترین کاربرد الکتروفورز دو بعدی در زمینه‌ی پزشکی دارویی در تخلیص پروتئین‌ها و تعیین پروفایل به منظور تشخیص بیماری‌ها می‌باشد (۱۳). در زمینه مقایسه پروفایل پروتئین و پپتیدهای زهر عقرب به روش



تصویر(۳) مقایسه الگوی پپتیدهای زهر عقرب‌های دوریه و کراسیکودا توسط ژل تریسین با غلظت ۱۶/۵ درصد

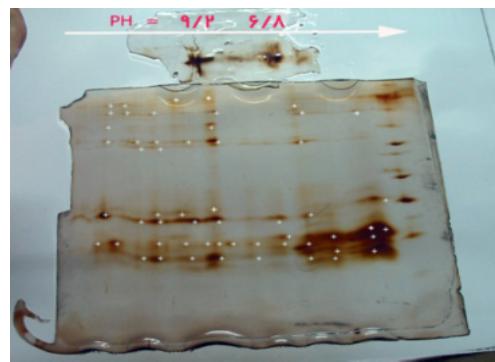
ستون‌ها از سمت چپ به راست: ۱-مارکر

۲-مارکر low molecular weight

۳-الگوی پپتیدهای زهر عقرب دوریه

۴-الگوی پپتیدهای زهر عقرب کراسیکودا

در مرحله اول الکتروفورز دو بعدی، هدف از تشخیص تمام پروتئین‌های نمونه با تعیین pI پروتئین مورد نظر بود، لذا از آمفولیت با دامنه وسیع pH=۳/۵-۱۰ استفاده شد، سپس برای افزودن قابلیت تفکیک در محدوده خاصی از pH، از آمفولیت با دامنه‌های pH برابر با ۴-۶ و ۶-۸ استفاده گردید. بعد از ثبت پروتئین در ژل، برای تعیین وزن مولکولی پروتئین مرحله دوم اجرا شد. در بعد دوم ۱۶/۵ الکتروفورز، ژل پلی‌اکریل آمید تریسین با غلظت درصد اجرا شد. نتایج به صورت نقاط پراکنده در سطح ژل ظاهر گشت، که هر نقطه می‌توانست نماینده یک پپتید از زهر با مشخصات بار الكتریکی و وزن مولکولی آن باشد.



تصویر(۴) ژل الکتروفورز دو بعدی، الگوی پپتیدهای زهر عقرب دوریه

ثبات pH با فری ایجاد گردید.

در بررسی‌های اولیه، "SDS-PAGE" معمولاً در جداسازی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالای ۱۵ کیلو دالتون به کار رفته زیرا از ارزش کمتری در جداسازی پیتیدهای زهرعقرب برخوردار بوده، بنابراین صرفاً برای تفکیک پروتئین‌های غیرسمی از سمی مورد استفاده قرار گرفت.

در بعد اول، ژل IEF یک ژل معمولی ۵ درصد بود، و نقش اصلی در تفکیک پروتئین‌های زهر را آمفوپلیت‌ها، ولتاژ بالا و صفحات کاست کوچک ژل داشتند. تجربه نشان داد که نتایج اجرای چند ژل کوچک بهتر از یک ژل بزرگ بوده است.

برای ارزیابی شب pH ژل IEF از محلول KCl ده درصد میلی‌مول استفاده گردید.

ژلتريسین، یکی از قابل اعتمادترین روش‌ها در فرآیند جداسازی پیتیدهای زهرعقرب در محلول‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین و نیز ارزیابی خلوص پروتئین است. لذا در بعد دوم از ژلتريسین ۱۶/۵ درصد به جای SDS-PAGE استفاده گردید. بهمنظور کالیبره کردن روش، آزمایش‌های متعددی با غلظت‌های مختلف بافر و کاست‌ها با اندازه‌های گوناگون با ولتاژ و زمان‌های اجرای متفاوت انجام گرفت، نتایج به دست آمده نشان داد، مناسب‌ترین شرایط برای اجرای ژل دو بعدی، غلظت ژل ۱۶/۵ درصد با ولتاژ ثابت ۹۰، زمان ۲۰ ساعت و کاست

شیشه‌ای در ابعاد متوسط بود (۱۳).

نتایج الکتروفورز دو بعدی نشان داد که به طور کلی محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های زهرعقرب کراسی کودا از زهرعقرب دوریه پائین‌تر است، و شاید دلیل زهراگین بودن این عقرب نسبت به عقرب دیگر همین باشد.

الکتروفورز دو بعدی هیچ گونه تحقیقی تاکنون صورت نگرفته است. در این روش، تنها روش توانمند در زمینه شناسایی و مقایسه پیتیدهای پروفایل زهرعقرب است. نکته قابل ملاحظه آن است که ابتدا باید هدف از انجام الکتروفورز مشخص می‌گردد، که آیا دستیابی به پروتئین‌هایی با ویژگی‌های خاص، و یا آنکه تهیه یک نقشه کامل از پروتئین‌های نمونه زهر موردنظر بوده است. بهمنظور دستیابی به پروتئین‌های خاص، شاید با افروden مراحل آماده‌سازی نمونه، کیفیت نتیجه نهایی بهتر می‌شود، اما این امر به قیمت از دست دادن تعدادی از پروتئین‌ها تمام می‌گردد.

در این تحقیق چون تهیه نقشه کامل از پروتئین‌های نمونه مدنظر بود تا مقایسه صحیح و دقیق صورت گیرد، لذا عموم پروتئین‌های زهر حفظ گردید. بررسی‌های به عمل آمده نشان می‌دهد در طی چند دهه اخیر، تحقیقاتی که محققین در دنیا بر روی زهر عقرب انجام داده‌اند، غالباً بهمنظور دست یافتن به پیتیدهای خاص از زهر عقرب با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مایع و یا فاز معکوس و یا تکنیک‌های مشابه آن بوده است (۱). در کشور ایران برای اولین بار چنین روشی جهت شناسایی و مقایسه پروفایل زهرعقرب به کار می‌رود.

طبق معمول، ابتدا زهرعقرب در آب مقطر بدون یون، حل و سپس توسط سانتریفیوژ خالص و غلظت آن تعیین گردید.

نوع بافر و ظرفیت بافری، از عوامل بسیار اساسی در الکتروفورز محسوب می‌شود، و بالا بردن غلظت یونی بافر به افزایش توان الکتریکی و گرمایی انجامد، که موجب انحراف باندها خواهد گردید، لذا حداقل ظرفیت بافری که می‌توانست شرایط pH را ثابت نگهداشته، با پر نمودن مخازن الکترودها از بافر، شرایط

قابل مطالعه می‌باشد.

با اتكای بر نتایج مطالعات پرتونوم زهر عقرب‌های بومی، می‌توان عقرب‌ها را براساس تأثیرات گوناگون سمشان بر حشرات پستانداران و سختپوستان و همچنین در تهیه و تولید آنتی‌سرم‌های منو و الان و یا پلی والان منطقه‌ای که فاقد آنتی‌بادی‌های غیر لازم بوده دسته‌بندی نمود، تا علاوه‌بر کاهش عوارض جانبی چون شوک آنفیلاکسی، دارای صرفه اقتصادی قابل توجه نیز باشند.

References:

- Possani LD. Structure of scorpion toxins. In: Tu AT, editor. Handbook of Natural Toxins. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1984: p. 513-50.
- Martin-Eauclaire MF, Courayd F. Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: Chang LW, Dyer RS, editors. Hand book of neurotoxicology. 1st ed. New York: Marcell Dekker; 1995: p. 683-716.
- Zlotkin E, Miranda F, Rochat H. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Bettini, editor. Handbook of experimental pharmacology-arthropod venoms. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1978: p. 17-69.
- Dutra AAA, Pimenta AMC, De Lima ME. Individual, intra-specific and gender variations in *Tityus bahiensis* venom: how different are they?. In: VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Pirenópolis - GO. 1st ed. Vencendo as Fronteiras da Biodiversidade Molecular. Pirenópolis - GO : SBTX, 2002, 132.
- Inceoglu B, Lango J, Jing J, et al. One scorpion, two venoms: prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. Proe Nation Acad Sci 2003; 100: 922-7.
- Omran MAA. Cytotoxic and apoptotic effects of Scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell line. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2003; 9: 255-76.
- Possani LD, Becerril B, Delepine M, et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. Eur J Biochem 1999; 264: 287-300.
- Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. Toxicon 1997; 35: 821-35.
- Omran MAA. In vitro Anticancer effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus* and Egyptian Cobra venom on Human Breast and prostate cancer cell lines. J Med Sci 2003; 3: 66-8.
- Wang WX, Ji YH. Venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. J Neurooncol 2005; 73: 1-7.
- Li JW, Hu J, Zhang GR, et al. Effects of anti-cancer peptide fraction III from *Buthus Martensii Karsch* on apoptosis of human liver cancer cells. J Jinlin Uni Med Ed 2006; 32: 625-8.
- Nentwing L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 2651-68.
- Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An adapted protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 1995; 16: 1034-59.
- Farzanpay R. A catalogue of the Scorpions occurring in Iran, up to january 1986. Rev Arachn 1988, 8: 33-44.
- Zargan J, Sobati H, Farahmandzad AR. Result study of fauna and dispersion of different scorpion species in frontier cities of Ilam(Persian). Proceedings of the 11th Iranian symposium on infectious diseases and tropical medicine: 2002 May 18-19, Tehran, Iran.
- Zargan J, Ebrahimi F, Farahmandzad AR. Biochemistry study of environmental factors effects on protein structure of male and female of *Hemiscorpius lepturus* venoms. Proceedings of the healthy and military health conference, in Iran: 2002 Feb – Mar 28-3, Kermanshah, Iran.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

نتیجه‌گیری

با این روش، زمینه ایجاد بانک اطلاعات از شناسنامه زهر عقرب‌های بومی ایران فراهم می‌گردد و با توجه به اینکه شکل‌گیری زهر در غده‌های زهری عقرب به عوامل مختلفی مانند تنوع زننیکی گونه‌ها، منطقه جغرافیایی، نوع تغذیه، جنسیت و شرایط محیط بستگی دارد، ایجاد تغییر در هر یک از فاکتورهای اشاره شده می‌تواند نتایج قابل توجهی را نسبت به تأثیر آن عامل در تعیین نوع زهر ارائه دهد، که با این روش

Original Article***Differential comparison on protein components of the venoms obtained from two species of the Iranian endemic scorpions, Buthidae family******AR. Farahmandzad^{*1}, F. Ebrahimi¹, R. sorouri², M. Kamali², J. Zargan¹***¹ *Science Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran, IRAN*² *Nanotechnology Research Center, Bghiatollah University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*

(Received 27 Nov, 2010 Accepted 20 Feb, 2011)

Abstract

Background: Two Dimensional Electrophoresis (2DE) is the most commonly and useful separation technique in proteomics. Each proteome snapshot becomes a protein profile. By means of this technique, several proteins are studied simultaneously.

Methods: In this study, by use of (2DE) method, the differences of two profiles of Buthidae endemic scorpions, A.Crassicauda known as "black scorpion" and "O. doriae" yellow scorpion", were investigated.

Results: For A.Crassicauda scorpion there were about 20 spots (peptides) in 6.2 - 8.2 pH ranges and molecular weight was less than 3 to 14 kDa and O. doriae scorpion 30 peptides, in 6.3 - 8.5 pH ranges, 1 to 45 kDa that fractionated and identified.

Conclusion: By this method, the field of bioinformative data bank from Iranian endemic scorpions' venom could be prepared. By making change of any effective factors on scorpion venom, considerable results due to influence of the factor on determining kind of venom can be achieved and studied.

Keywords: scorpion, *Buthidae*, venoms, two dimensional electrophoresis

*Address for correspondence: Science Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran, IRAN; E-mail: rezaf235@yahoo.com