



## جداسازی و خالص سازی فراکسیون های سمی زهر عقرب

### مزوبوتوس اپیوس

دکتر منیژه کددخائی الیادرانی<sup>۱</sup>، حسین حنیفی<sup>۲</sup>، زهره آموزگاری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

<sup>۲</sup> دانش آموخته بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

### چکیده

زمینه: عقرب مزوبوتوس اپیوس (*Mesobuthus eupeus*) از عقرب های خانواده بوتیده (Butidae) بومی ایران به ویژه در منطقه خوزستان می باشد. زهر عقربها به ویژه عقرب های خانواده بوتیده از ترکیبات فعلی بیولوژیکی مختلف از جمله انواع توکسین ها تشکیل شده است. این توکسین ها انواع مختلفی از کانال های یونی بدن حشرات و یا پستانداران را تحت تأثیر قرار می دهند. جهت مطالعه اجزاء سمی در زهر عقرب ابتدا لازم است این اجزاء خالص شوند، لذا در این مطالعه فراکسیون های سمی زهر عقرب جداسازی و سمحی ترین آنها خالص شدن.

روش کار: اجزاء سمی زهر خام عقرب مزوبوتوس اپیوس به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-۵۰ در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار pH=۴/۷ جداسازی شد. سپس اجزاء سمی ترین فراکسیون بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی جدا شد و خلوص آنها بوسیله الکتروفورز مورد تائید قرار گرفت.

یافته ها: از ۸۱۶ میلی گرم پروتئین زهر خام که روی ستون سفادکس G-۵۰ برده شد، ۸۱۵ میلی گرم پروتئین در ۶ فراکسیون تفکیک شده بدست آمد. فراکسیون های III و IV برای موش ها اثر سمی داشتند و LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50) آنها به ترتیب ۰/۴۰ و ۰/۴۶ میلی گرم بر کیلو گرم بدست آمد. فراکسیون سوم به ۲۰ زیر فراکسیون تفکیک شد، که با بررسی سمیت آنها بر روی موش ها مشخص گردید که زیر فراکسیون های III.19 تا III.14 دارای اثر سمی بودند. از ۲۵۰ میلی گرم پروتئین فراکسیون III که روی ستون برده شد، ۲۴۲/۷۵ میلی گرم (درصد) در زیر فراکسیون های تفکیک شده بدست آمد. زیر فراکسیون ۱۴.۲ III.14.۳ III.14.۴ برای موش ها سمی بودند.

نتیجه گیری: در این مطالعه سه توکسین به صورت خالص بدست آمد. توکسین III.14.4 با LD<sub>50</sub> برابر با ۱۱ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن موش، بیشترین سمیت را دارا بود. از این سه توکسین خالص می توان در تحقیقات بعدی در تهیه آنتی سرم و یا مطالعه خصوصیات ساختمنی و اثرات فیزیولوژی فارماکولوژی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: مزوبوتوس اپیوس، زهر، عقرب، توکسین

دربافت مقاله: ۸۴/۷/۷ - پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۱

\* اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

Email: kakhodaeim@hotmail.com

روی اجزای تشکیل دهنده زهر این نوع عقرب انجام نشده است. برای این که مکانیسم‌های بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی تأثیر توکسین‌های موجود در زهر عقرب‌ها مشخص شوند، باید این توکسین‌ها شناسایی و تخلیص گردند و اثرات هر یک بطور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرد. در این تحقیق تعدادی از توکسین‌های زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس توسط روش کروماتوگرافی ستونی جدا شد و سمت آنها مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق می‌تواند زمینه‌ای برای انجام مطالعات گستره بعدی در بررسی ساختمان توکسین‌ها و مکانیسم عمل هر یک از آنها بر روی پستانداران باشد.

## مواد و روش‌ها

زهر خام لیوفیلیزه عقرب مزوپوتوس اپیوس از مؤسسه رازی اهواز تهیه گردید. این زهر به روش تحریک الکتریکی تهیه شده بود. سفادکس G-۵۰ و CM-Sephadex C-25 از شرکت Pharmacia فولین سیوکالتو، استات آمونیوم، ترامتیلاتیلندی‌آمین (TEMED)، آمونیوم پرسولفات و آلبومین سرم گاوی از Merck شرکت Sigma، گلیسرول و تریس از شرکت BIO-RAD اکریل آمید و بیس اکریل آمید از شرکت خریداری گردیدند.

جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس تمام مراحل جداسازی در ۴ درجه سانتی‌گراد و به روش آنجلینا (Angelina) صورت گرفت (۹). یک گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید، سپس محلول حاصل به مدت ۱۲ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و قسمت محلول ( محلول رویی) از قسمت نامحلول جدا گردید. قسمت رویی حاوی پیتیدها و پروتئین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول

## مقدمه

به طور کلی عقرب‌های ایران متعلق به دو خانواده بوتیده و اسکورپیونیده می‌باشند. عقرب مزوپوتوس اپیوس (*Mesobuthus eupeus*) متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده است. این عقرب یکی از فراوان‌ترین عقرب‌های موجود در خوزستان است. عقرب زدگی یکی از مشکلات عمدهٔ پزشکی در بسیاری از کشورهای گرمسیری است. اکثر عقرب زدگی‌ها عمدتاً ناشی از عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشند. در خوزستان حدود ۴۵ درصد عقرب گزیدگی‌ها مربوط به مزوپوتوس است (۱ و ۲). ترکیبات تشکیل دهندهٔ زهر عقرب و مقدار آنها به نوع عقرب بستگی دارد. زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس، اولیگوپیتیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آمینه و انواع توکسین‌ها تشکیل شده است. این توکسین‌ها به ویژه کانال‌های یونی سدیم و پتاسیم وابسته به ولتاژ در غشاء سلول‌های عصبی را مورد هدف قرار می‌دهند (۳ و ۴). این عمل باعث طولانی شدن پتانسیل عمل و یا تحریک پی‌درپی سلول‌های عصبی و تجمع یون‌های کلسیم یا سدیم در سلول می‌شود که نتیجهٔنهایی آن آزاد شدن غیرفعال نروترانسمیترها از بافت‌های تحت تأثیر قرار گرفته، است (۵). زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده حاوی انواع مختلفی از توکسین‌ها می‌باشند. توکسین‌های زنجیره بلند با ۶۰-۷۰ توالی اسید آمینه و چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای عمدتاً بر روی کانال‌های سدیمی عمل می‌کنند (۶). توکسین‌های زنجیره کوتاه از ۳۰-۴۰ توالی اسید آمینه عمدتاً با سه پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده‌اند که عمدتاً بر روی کانال‌های کلر و پتاسیم عمل می‌کنند (۷ و ۸). عقرب مزوپوتوس 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

خارج شده به وسیله دستگاه جمع کننده اتوماتیک در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر در هر لوله جمع آوری گردید. پس از این که پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند از ستون خارج شدند بالا فاصله ستون توسط یک گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر شسته شد. پس از آن ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱ مولار کلرور سدیم 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 زیر فراکسیون‌ها در ظروف جداگانه جمع آوری شدند. زیر فراکسیون‌های جمع آوری 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 سطح برش کمتر از ۱۲۰۰ در مقابل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند و تغليظ 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 فلنج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD<sub>50</sub> فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد.

زیر فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند و بین آنها زیر فراکسیون III.14 بیشترین سمیت را داشت که برای خالص سازی اجزای آن در مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای خالص سازی اجزای زیر فراکسیون III.14 مقدار ۱۷ میلی‌گرم پروتئین از این زیر فراکسیون 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 pH=۶ گردید پس از جذب نمونه در ژل، ستون ابتدا با بافر استات

رویی پس از تغليظ شدن در حجم ۵ میلی‌لیتر که حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-50 به ابعاد (۲/۷×۱۰۰ cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار (pH=۴/۷) شد. بعد از این که نمونه جذب ژل گردید بافر فوق با سرعت جريان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد. محلول خروجی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتری بطور مجزا توسط دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) جمع آوری شد. جذب نمونه‌ها بالا فاصله 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 جمع آوری شدند. هر یک از فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با سطح برش کمتر از ۱۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغليظ 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 فلنج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD<sub>50</sub> فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین فراکسیون‌ها بر اساس روش لوری (Lowry) اندازه‌گیری گردید (۱۰). از بین فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون فراکسیون سوم به علت داشتن خاصیت سمی قوی‌تر برای جداسازی اجزاء آن توسط کروماتوگرافی ستونی تعویض یون کاتیونی با زمینه 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 (۱×۴۰ cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار (pH=۴/۷) گردید بعد از این که نمونه جذب ژل شد، ستون ابتدا با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ با سرعت جريان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. محلول

حداقل) بدست 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 ( $1/25$ ) ضرب شد تا دوز بعدی بدست آید. بعد از این که دوزهای مختلف برای هر نمونه تهیه شد،  $2$  میلی‌لیتر از هر دوز به چهار موش (به هر موش  $5/0$  میلی‌لیتر) که قبلاً علامت‌گذاری شده و در قفسهای جداگانه قرار داده شده بودند، به طریق زیر جلدی (Subcutaneous) تزریق شد. سپس مرگ و میر موش‌ها طی  $24$  ساعت ثبت گردید و  $LD_{50}$  هر نمونه با استفاده از روش ذکر شده از فرمول زیر محاسبه شد.

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

$m$  برابر است با

$X_{100}$  برابر است با  $\log$  دوزی که صدرصد 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  $1/25$   
 و حدود ثابت (Fiducial limits) برای  $LD_{50}$  از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

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

$\sum n - 1$  برای  $t0.05$   
 $\sum n$  جمع تعداد موش‌های استفاده شده در دوزهایی به  
 جز دوزهایی که صفر درصد و صدرصد کشندگی دارند  
 می‌باشد.

آمونیوم  $20$  میلی‌مolar با  $pH=6$  و با سرعت جریان  $30$  میلی‌لیتر در ساعت شسته شد و نمونه‌ها در حجم‌های  $3$  میلی‌لیتر در هر لوله جمع‌آوری شدند. پس از این که پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند خارج شدند، ستون توسط یک گرادیان خطی تا  $0/5$  مolar کلرور سدیم در استات آمونیوم  $20$  میلی‌مolar با  $pH=6$  در حجم کلی  $500$  میلی‌لیتر شسته شد. پس از تمام شدن گرادیان، ستون با بافر استات آمونیوم حاوی  $1$  مolar کلرور سدیم شستشو داده شد. جذب نوری محلول خروجی در هر یک از لوله‌ها در طول موج  $280$  نانومتر قرائت و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های جمع آوری شده دیالیز و تغليظ شدند.

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

از نمونه‌های بدست آماده در مراحل مختلف کروماتوگرافی الکتروفوروز روی ژل پلی اکریل آمید  $12/5$  درصد در حضور سدیم دودسیل سولفات (Laemmli) (PAGE-SDS) طبق روش لائملی (Laemmli) انجام گردید (۱۱).

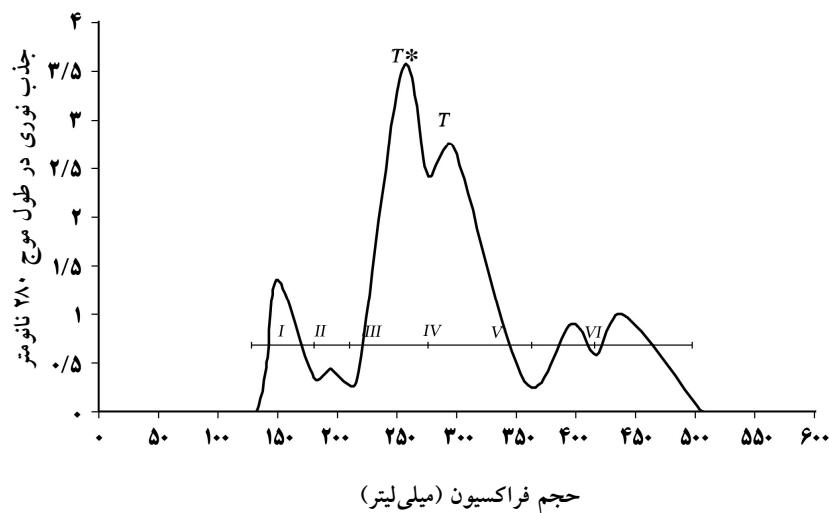
### :**(Lethal dose 50) LD<sub>50</sub>**

برای بررسی سمیت و مقایسه کشندگی فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی،  $LD_{50}$  زهر خام و فراکسیون‌های سمی در موش‌های سوری  $18$  تا  $20$  گرمی با استفاده از روش آماری اسپیرمان کاربر (Spearman Karber) بر اساس روش فینی (Finney) تعیین گردید (۱۲ و ۱۳)، بدین 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 (حداکثر و

## یافته‌ها

نام‌گذاری شدند. با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند که به ترتیب LD<sub>50</sub> فراکسیون سوم ۰/۴ و فراکسیون چهارم ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید.

جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوپوتوس 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 مزوپوتوس اپیوس ۶ فراکسیون حاصل گردید که به ترتیب P II, P I, T\*, T، V و VI نام‌گذاری شدند.



نمودار ۱: نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۲/۷×۱۰۰ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ و سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت.

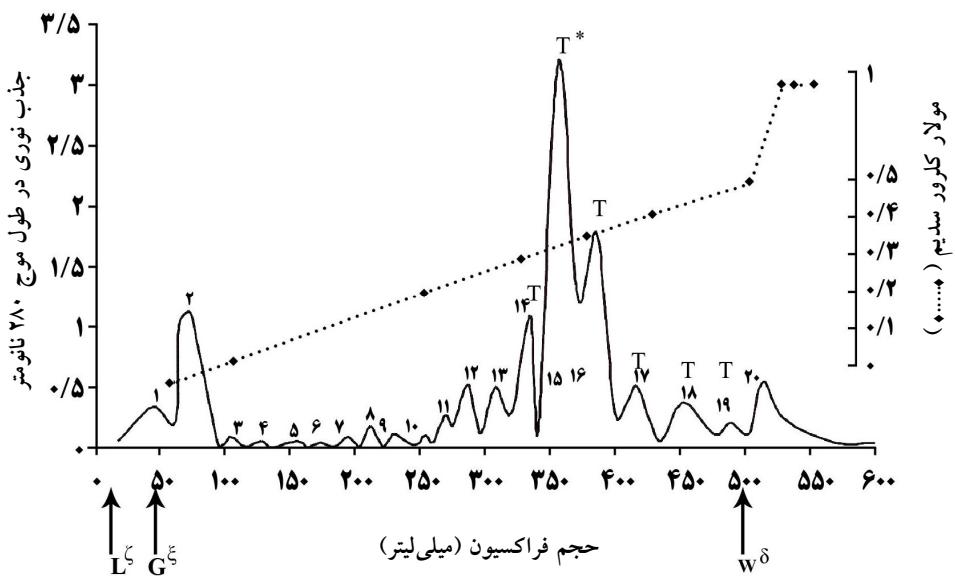
$$\text{سم} = \text{T}^*$$

بودند که در نمودار با علامت T نشان داده شده‌اند، فراکسیون III.14 با LD<sub>50</sub> برابر با ۰/۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش سمی تر بود که برای جداسازی و خلوص بیشتر اجزای آن مجدداً 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.

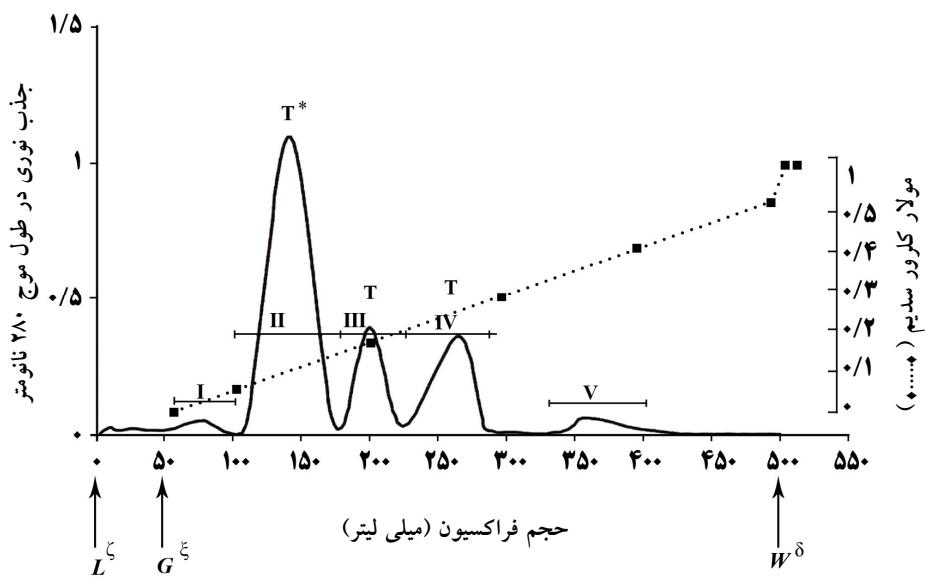
فراکسیون III به علت دارا بودن سمیت بالا جهت جداسازی اجزای آن توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی انتخاب گردید. نتیجه کروماتوگرافی تعویض کاتیونی ۲۵۰ میلی‌گرم پروتئین فراکسیون III در نمودار ۲ نشان داده شده است. در این مرحله فراکسیون از فراکسیون سوم (III.1-III.20) جدا شده است. سمیت فراکسیون‌های حاصل در این مرحله مشخص شد.

فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی



نمودار ۲: کروماتوگرافی تعویض کاتیونی فراکسیون سوم حاصل از مرحله ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد ( $1 \times 40$  سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی  $0-0.5$  مولار کلرور سدیم در بافر استات آمونیوم  $0.2$  میلی مولار با  $pH=4/7$ ،  $100$  میلی لیتر استات آمونیوم حاوی یک مولار کلرور سدیم به ترتیب در سرعت جریان  $30$  میلی لیتر در ساعت.

\* = T مولار کلرور سدیم،  $\zeta$  = افزایش نمونه،  $\xi$  = گرادیان آغازی،  $\delta$  = شستشو با کلرور سدیم - آمونیوم استات یک مولار



نمودار ۳: نتیجه جداسازی اجزای زیرفراکسیون سمی III.14 CM-sephadex C-25 بر روی ستون  $1 \times 40$  سانتی متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی  $0-0.5$  مولار کلرور سدیم در بافر استات آمونیوم  $0.2$  میلی مولار با  $pH=6$  در سرعت جریان  $30$  میلی لیتر در ساعت.

\* = T مولار کلرور سدیم،  $\zeta$  = افزایش نمونه،  $\xi$  = گرادیان آغازی،  $\delta$  = شستشو با کلرور سدیم - آمونیوم استات یک مولار

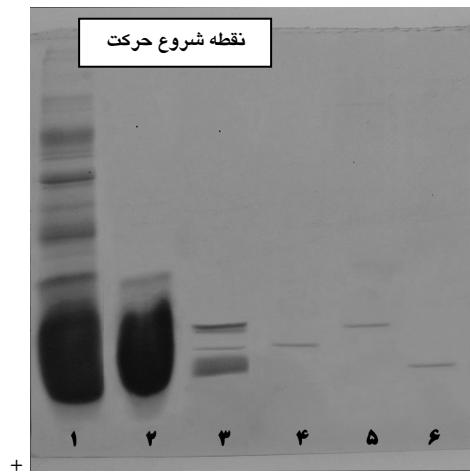
میلی‌گرم پروتئین بود که بعد از بردن روی ستون سفادکس G-۵۰ مقدار ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین از فراکسیون‌های مختلف بدست آمد که بازده کار ۹۹/۸۷ درصد بود. نتایج الکتروفورز زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی در شکل ۱ نشان داده شده است.

در این مرحله زیرفراکسیون ۱۴.۳ به پنج جزء تفکیک گردید که پس از بررسی سمیت آنها بر روی موش‌ها مشخص گردید که فراکسیون‌های III.14.۲ III.14.۳ III.14.۴ برای موش‌ها سمی بودند. سنجش پروتئین، بازده، سمیت و مقادیر LD<sub>50</sub> در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. به طور کلی یک گرم زهر خام حاوی ۸۱۶

جدول ۱: نتایج سنجش پروتئین، سمیت و بازده توکسین‌های خالص شده از فراکسیون \*III.14

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

\* مقدار ۱۷ میلی‌گرم پروتئین از این زیرفراکسیون در حجم ۵ میلی‌لیتر وارد ستونی از CM-Sephadex به ابعاد (۴۰ × ۱ سانتی‌متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ گردید.



شکل ۱: الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE): به ترتیب (۱) سم خام، (۲) فراکسیون III حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، (۳) فراکسیون ۱۴.۳ حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، (۴) فراکسیون سمی (۵) فراکسیون سمی ۱۴.۳ و (۶) فراکسیون سمی ۱۴.۴. خلوص فراکسیون‌های سمی جدا شده در ردیف‌های ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود.

که سوم عقربهای خانواده بوتیده برای انسانها سمی هستند ویژگی‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی آنها نسبت به سوم عقربها از خانواده‌های دیگر بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. زهر عقربهای خانواده بوتیده عمدتاً از پلی پپتیدهای نروتوکسیک و پپتیدهای کوچک دیگری با عملکردهای نامعلوم تشکیل شده‌اند (۱۸). با توجه به این که مطالعات زیادی در ارتباط با زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس انجام نشده است، هدف این پژوهش، جداسازی فراکسیون‌های سمی زهر این عقرب بود. زهر خام عقرب مزوپوتوس 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 پروفسور فرانکویس میراندا (Francois Miranda) در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد شد و روش عمومی خالص‌سازی نروتوکسین‌های سموم حیوانات سمی از قبیل مار و عقرب را ارائه نمود. عمل خالص‌سازی توکسین‌ها به وسیله فیلتراسیون روی Sephadex G-۵۰، و به دنبال آن چندین مرحله کروماتوگرافی تعویض یون بر روی رزین‌های مختلف از جمله CM-sephadex C50, Amberlit CG-50, DEAE-Sephadex A-50 و استفاده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G-۵۰ در

همانطور که قبل اشاره شد از زیرفراکسیون III.14 سه توکسین که تأثیر 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.

## بحث

آزمایش‌هایی که در ارتباط با فعالیت بیولوژیکی زهر عقربها بر روی موش‌ها و حشرات صورت گرفته ثابت کرده است که تأثیرات زهر عقربها عمدتاً مربوط به پلی پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین است که توکسین نامیده می‌شوند (۱۴). بر طبق این آزمایشات 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 حل مشکلات پزشکی کمک کننده بوده است (۱۴ و ۱۶)، هر چند که امروزه مهمترین جنبه‌های مورد علاقه استفاده از توکسین‌های خالص شده برای مطالعه مکانیسم مولکولی عمل آنها بر روی غشاء‌های تحریک پذیر و برای جداسازی کانال‌های یونی هستند (۱۷). زهر عقرب مزوپوتوس 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 عقرب‌زدگی در مؤسسه 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 درصد از عقرب‌زدگی‌ها در این استان می‌باشند (۴). از آنجایی

تحقیقی، زهر عقرب مزوبوتوس تامولوس توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با CM-52 جداسازی شده و اثر آن در متاپولیسم گلوتامیک اسید نشان داده شد که فعالیت گلوتامیک دهیدروژناز را مهار می‌کند و دآمینه شدن گلوتامیک کاهش می‌باید (۲۵). در سال ۲۰۰۵ دو توکسین با نامهای T3 و T4 از همین زهر این عقرب شناسایی گردید که علاوه بر داشتن خاصیت نروتوکسیکی باعث ادم ریوی در افراد عقرب گزیده می‌شود (۲۶). همچنین یک نوع آلفا توکسین جدید از زهر عقرب *Butthotus juaicus* جداسازی و تعیین توالی گردید و مشخص شد که بر روی کانال‌های سدیمی حشرات مؤثر است (۲۷). در سال ۲۰۰۴ یک نوع توکسین با نام 1BmBKTx1 از عقرب آسیایی *Buthus martensi Karsch* خالص سازی گردید که یک نوع از کانال‌های پتانسیمی 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 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 میلی‌لیتر محلول زهر خام که حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود، شش فراکسیون بدست آمد و مشاهده شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند. LD<sub>50</sub> فراکسیون‌های 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

مرحله اول جداسازی اجزای زهر عقرب‌ها یک متد عمومی می‌باشد که در ابتدا توسط پروفسور میراندا در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد شد (۱۹). 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 سوم عقرب‌های سایر گونه‌ها کردند. بیشتر تلاش‌ها در کشف پیتیدهای جدید در زهر عقرب‌ها که مؤثر بر کانال‌های یونی بوده‌اند متمرکز شده است. با این وجود در سال‌های اخیر پیتیدهایی با ساختمان و عملکرد جدید در زهر عقرب‌ها یافت شده‌اند. برای مثال پیتیدهای فاقد اسید آمینه سیستئین که خانواده جدید جالبی از ترکیبات زهر می‌باشند. اخیراً یک پیتید از همین نوع، از زهر Bmkbpp *Buthus martensi Karsch* شده است (۲۰). هم چنین توکسین‌های آنتی میکرو بیال جدا شده از زهر چند گونه عقرب متعلق به خانواده پیتیدهای بدون پیوندهای دی‌سولفیدی هستند. عنوان مثال *Hadrurus aztecus* (Hadrurin) از عقرب *Hadrurin* (۲۱)، پارابوتوبورین (Parabutoporin) از عقرب آفریقای جنوبي *Parabuthus schlechteri* (۲۲) و *Pandinus imperator* ۱ و پاندینین ۲ از *Pandinus imperator* (۲۳) جداسازی شده‌اند. تحقیقات زیادی در ارتباط با خالص سازی اجزای زهر عقرب‌ها شده است. یک توکسین با زنجیره کوتاه از زهر عقرب بوتوس تامولوس در ناحیه هندوستان با استفاده از کروماتوگرافی یونی جدا شد و مشخص شد که از ۳۵ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۷۹۶Da تشکیل شده است و کانال‌های یونی را مهار می‌کند (۲۴).

متعلق به فراکسیون‌های غیرسمی است. در بین Zirfrakson‌های سمی، Zirfrakson ۱۴. III. یشترين سميت را نشان داد. جداسازی اجزاي اين Zirfrakson سمی نيز با استفاده از رزین CM-Sephadex C-25 صورت گرفت با اين تفاوت ke باfer مورد استفاده داراي pH=۶ می‌باشد. تغيير pH در اين مرحله باعث جدا شدن سه توکسين مختلف شد. نتایج آزمایش الکتروفورز خلوص اين توکسين‌ها را تائید نمود. بنابراین در این تحقیق توانستیم توکسين‌های سمی را از زهر عقرب جدا نمائیم و از بین آنها سه توکسين را که سمی‌ترین اثر را بر موش داشتند به طور خالص جدا کنیم. توکسين‌های 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 بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه که هزینه انجام این پروژه را تأمین نمود، تشکر و قدردانی می‌نماید.

#### References:

1. Kamali K. Mعرفی عقربهای مهم خوزستان و اطلاعاتی درباره بیولوژی عمومی عقربهای، روش درمان عقرب زدگی و مبارزه با آنها. مجله علمی کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز ۱۳۶۳؛ تک نگاشت شماره ۱: ۳۴-۱.
2. The medical and social significance of scorpionism in the southern provinces of Iran. Arachnodata. The Arachnological Information and Consulting Agency (at: <http://www.arachnodata.ch/frameset2.htm>).
3. Garcia ML, Gao Y, McManus OB, et al. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 2001; 39: 739-48.
4. Cestele S, Qu Y, Rogers JC, et al. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 1998; 21:919-31.
5. Hill RG. The status of naloxone in the identification of pain control mechanisms operated by endogenous opioids. *Neurosci Lett* 1981; 21: 217-22.
6. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian

- scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 2002; 40:1239-58.
7. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10:456-61.
  8. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 2000; 1: REVIEWS0004.
  9. Ramirez AN, Gurrola GB, Martin BM, et al. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1988; 26:773-83.
  10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
  11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
  12. Finney DJ. The median lethal dose and its estimation. *Arch Toxicol* 1985; 56: 215-8.
  13. Possani LD, Fletcher PL Jr., Alagon AB, et al. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1980; 18:175-83.
  14. Legros C, Kaabi H, El Ayeb M, et al. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 2001; 20:934-42.
  15. Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. *Adv Cytopharmacol* 1979; 3: 325-34.
  16. Possani LD, Fernandez de Castro J, et al. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxious* Hoffmann) venom. *Toxicon* 1981; 19: 323-9.
  17. Cestele S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 2000; 82: 883-92.
  18. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998; 36: 823-46.
  19. Miranda F, Kupeyan C, Rochat H, et al. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus*, *tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus*, *quinquestriatus*. *Eur J Biochem* 1970; 16: 514-23.
  20. Zeng XC, Li WX, Peng F, et al. 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 martensii* Karsch. *IUBMB life* 2000; 49: 207-10.
  21. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, et al. Hadurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2000; 267:5023-31.
  22. Verdonck F, Bosteels S, Desmet J, et al. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia* 2000; 16: 247-60.
  23. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 2001; 359:35-45.
  24. Dhawan RD, Joseph S, Sethi A, et al. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *FEBS Lett* 2002; 528: 261-6.
  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; 6:167-70.
  26. Deshpande SB, Alex AB, Jagannadham MV, et al. Identification of a novel pulmonary oedema producing toxin from Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom. *Toxicon* 2005; 45: 735-43.
  27. Arnon T, Potikha T, Sher D, et al. Bjalphait: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; 35: 187-95.
  28. Xu CQ, Brone B, Wicher D, et al. BmBKTx1, a novel Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *J Biol Chem* 2004; 279:34562-9.