



مقایسه افتراقی اجزاء پروتئینی زهر دو گونه از عقرب‌های بوتیده "Buthidae"

بومی ایران توسط الکتروفورز دو بعدی

علیرضا فرهنگزاد^{۱*}، رحیم سروری^۲، فیروز ابراهیمی^۱، مهدی کمالی^۲، 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 یکی از سودمندترین تکنیک‌های جداسازی در پروتئومیکس است. هر پروتئوم یک نقشه کامل از پروتئین است. توسط این تکنیک، چندین نوع پروتئین در یک زمان، قابل بررسی می‌باشد. به منظور مطالعه مقایسه‌ای محتوای کل پروتئینی زهر عقرب از این تکنیک استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تفاوت الگوهای به دست آمده از تفکیک اجزای پروتئینی زهر دو گونه عقرب *اندروکتانوس کراسی* *کودا* *Androctonus crassicauda* معروف به عقرب سیاه و *اودونتوبوتوس 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 $pH=6/2-8/2$ از عقرب کراسی کودا پپتیدهای کمتر از ۳ تا ۱۴ کیلو دالتون و در محدوده $pH=6/3-8/5$ از عقرب دوریه پپتیدهای ۱ تا ۴۵ کیلو دالتون جداسازی شد.

نتیجه‌گیری: با این روش، زمینه ایجاد بانک اطلاعات از شناسنامه زهر عقرب‌های بومی ایران فراهم می‌گردد. با ایجاد تغییر در هر یک از فاکتورهای تأثیرگذار بر زهر عقرب، می‌توان به نتایج قابل توجهی نسبت به تأثیر آن عامل در تعیین نوع زهر دست یافت، که با این روش قابل مطالعه می‌باشد.

واژگان 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

E-mail: rezaf235@yahoo.com

مقدمه

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 پپتید مختلف است و لذا می‌بایست بیش از ۱۰۰۰۰۰ نوع پپتید از سموم زهرعقرب شناسایی شده باشد اما در میان این تعداد فقط حدود ۲۰۰ نوع پپتید به لحاظ ساختاری و عملکردی شناسایی شده‌اند (۱) لذا چشم‌انداز زمینه تحقیق در این حوزه بسیار وسیع است.

از سال ۱۹۷۵ تاکنون کاربرد الکتروفورز دوبعدی 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 پپتیدهای خاص زهر عقرب از روش‌های دیگر چون کروماتوگرافی مایع فاز معکوس استفاده کرده‌اند، لذا سابقه بکارگیری الکتروفورز دوبعدی جهت شناسایی زهرعقرب در دنیا محدود و در ایران گزارش نشده است و برای اولین بار از این روش استفاده می‌شود، که حائز اهمیت است.

زهرعقرب، ترکیبی از غلظت‌های متنوعی از نوروтокسين، کاردیوتوکسين، نفروتوکسين، هموتوکسين و آنزیم‌هایی چون فسفودی‌استرازها، فسفولیپازها، هیالورونیدازها، گلیکوزامین گلیکان‌ها، هیستامین، سروتونین، تریپتوفان و آزادکننده‌های سایتوکاینی می‌باشد و معمولاً خاصیت آگزیزی و بازی دارند. ساختمان عمومی پروتئین سم عقرب از یک یا دو آلفا هلیکس و صفحات بتا تشکیل شده که در میان آنها تعداد سیستمین باقیمانده تقریباً موجب پایداری پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختمان بیشتر سموم عقرب‌ها می‌شود (۴-۱ و ۱۶).

قدرت زهر در گونه‌های مختلف عقرب از هم متفاوت است، حتی زهرعقرب‌ها در یک گونه نیز با یکدیگر متفاوت است. اثر زهر بعضی از عقرب‌ها در حد یک آنفلوآنزای خفیف و بعضی در حد مرگ است. این تأثیر به‌خاطر 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 ضدعقرب ساخته شده به‌وسیله مؤسسه رازی برعلیه شش گونه عقرب مزوبوتوس ائوپوس (*Mesobothus eupeus*)، بوتوتوس سولسای (*Buthotus saulcyi*)، اودونتوبوتوس دوریه (*Odontobuthus doriae*)، اندروکتانوس کراسی‌کودا (*Androctonus crassicauda*)، اسکوریپو ماروس (*Scorpio maurus*) و همیسکورپیوس لپتوروس (*Hemiscorpius lepturus*) در دسترس می‌باشد (۱۴ و ۱۶). برخی از پپتیدهای زهر عقرب‌ها اثرات Antiproliferative و Apoptogenic داشته و از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نمایند (۶ و ۹-۱۱). همچنین برخی از پپتیدهای سم عقرب اثرات حشره‌کشی و میکروب‌کشی شدید داشته و در مبارزه بیولوژیک با آفات و عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۲). وزن مولکولی پپتیدهای سموم عقرب عموماً بین ۷۰۰۰ - ۷۰۰ دالتون و pI آنها حدود ۱۱-۸ می‌باشد.

سموم عقرب، عموماً به دو دسته نوروтокسين‌ها و سایتوتوكسين‌ها تقسیم می‌شوند. نوروтокسين‌ها، کانال‌های یونی پتاسیم، سدیم، کلسیم و کلر سیستم عصبی و سایتوتوكسين‌ها سلول و بافت اندام موجودات را هدف قرار می‌دهند (۱، ۲، ۸ و ۱۲).

از آنجا که تأثیرات سموم نوروтокسيك عقرب به مراتب بیشتر از سموم سایتوتوكسيك است، لذا بیشتر مطالعات بر روی سموم نوروтокسيك متمرکز شده است. عقرب‌های مورد بررسی در این تحقیق، عقرب‌های اودونتوبوتوس 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 جراحه، رتبه دوم را در ایران حائز اهمیت است (۱۶).

طی تحقیقات به‌عمل آمده، میزان سمیت زهر عقرب آندروکتانوس کراسی‌کودا، با (LD ۵۰) ۱۹۰ میکروگرم به‌ازای هر ۲۰ گرم موش است، و (LD ۵۰) عقرب اودونتوبوتوس دوریه ۵۰۰-۸۰ 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 اودونتوبوتوس دوریه از مناطق بیابانی اطراف شهر تهران طی چند مرحله عملیات صحرایی و

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.

غلظت‌سنجی پروتئین

غلظت‌سنجی 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 پپتیدهای زهر، روش الکتروفورز دو بعدی اجرا گردید.

مراحل الکتروفورز دو بعدی

بعد اول- IEF

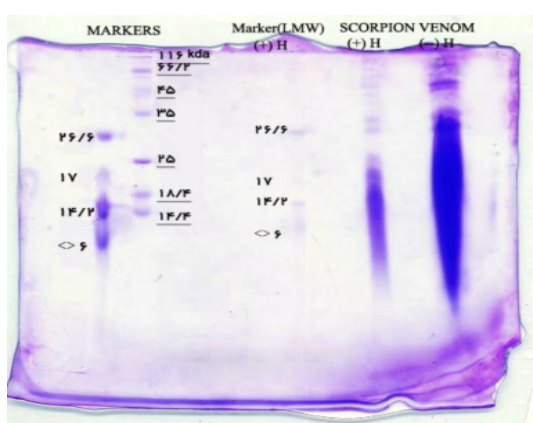
بعد اول، ژل IEF یک ژل معمولی ۵ درصد می‌باشد. بعد از آماده‌سازی ژل، طبق دستورالعمل ابتدا ولتاژ روی ۲۰۰ ولت ثابت به‌مدت ۹۰ دقیقه و با تغییر ولتاژ بر ۴۰۰ ولت به‌مدت ۹۰ دقیقه تنظیم گردید. بعد از پایان این مرحله ژل IEF در محلول متعادل‌سازی به‌مدت ۳۰-۱۵ دقیقه قرار گرفت.

سپس ژل را از محلول خارج ساخته، بخش مربوط به پروتئین به‌شکل یک نوار باریک به پهنای ۵/۰ 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

میلی گرم بر میلی لیتر، و غلظت پروتئین زهر عقرب کراسی کودا ۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. ابتدا، جداسازی پروتئین های زهر توسط الکتروفورز تحت شرایط سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید انجام گرفت. در تصویر ۲ تأثیر حرارت دادن بافر و نمونه در اجرای ژل و تفکیک بهتر فراکسیون ها 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 SDS-PAGE

ستون ها از سمت چپ به راست:

۱- مارکر Fermentas-low molecular weight SM 3410

۲- مارک molecular weight

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

۴- نمونه بدون حرارت

سپس به منظور جداسازی بهتر فراکسیون های زهر از ژل ترپسین با غلظت ۱۶/۵ درصد استفاده گردید. (تصویر ۳)، و نتایج آن به شرح زیر به دست آمد: زهر عقرب کراسی کودا دارای پروتئین های به جرم مولکولی ۳، ۶/۵، ۱۴ و ۱۵ کیلو دالتون و زهر عقرب دوریه شامل پپتیدهای ۳، ۶/۵، ۱۵ و ۲۷ کیلو دالتون بود. البته ژل های ناپیوسته نسبت به ژل های پیوسته قدرت تفکیک کنندگی بیشتری داشتند.

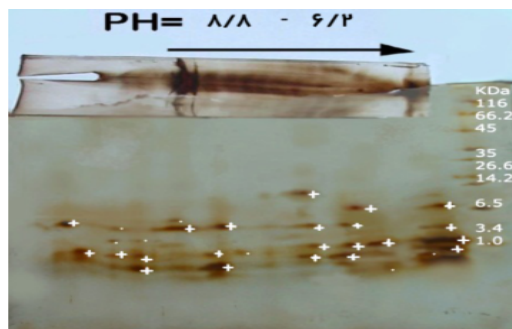
(CAT) اسیدتری کلرواستیک ۱ درصد به مدت ۲ ساعت تا یک شبانه روز قرار داده شد تا آمفولیت ها خارج شدند. پس از انتقال نوار ژل IEF بر روی صفحه شیشه ای و آماده شدن ژل ترپسین، صفحات شیشه ای به تانک متصل و بعد از پرمودن مخازن از بافرها، الکترودها به دستگاه وصل گردید و ولتاژ بر روی ۹۰ ثابت گردید و به مدت ۲۰ ساعت ژل رانده شد. سپس ژل از صفحات شیشه ای جدا و حدود نیم ساعت درون محلول آب بدون یون، جهت شستشو قرار داده، و برای ثابت شدن، در محلول گلو تارالدئید ۵ درصد به مدت یک ساعت غوطه ور گردید. با اتمام زمان، سه بار 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 رنگ آمیزی انجام گرفت.

رنگ آمیزی با نیترات نقره

بعد از ثابت شدن به وسیله گلو تارالدئید 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 ظهور گذارده تا نقطه های 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 الکل اتیلیک ده درصد قرار گرفت.

یافته ها

قبل از آماده سازی ژل، غلظت سنجی انجام گرفت. غلظت پروتئین زهر عقرب ادونتوبوتوس دوریه ۷۵



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

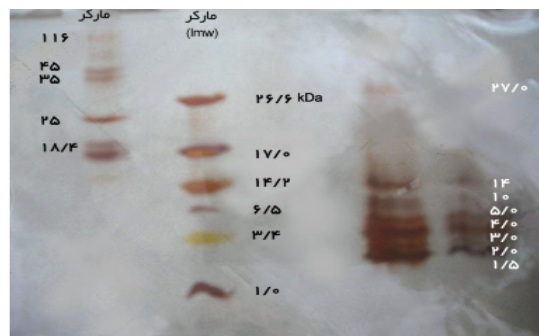
در الکتروفورز دو بعدی، جرم مولکولی پپتیدهای زهر عقرب دوریه در سه بخش طبق جدول ارائه شده، در محدوده ۴۵-۶۶ کیلو دالتون با pH ۸/۵-۶/۳، در محدوده ۲۵ کیلو دالتون با pH ۸/۵-۶/۳ و در محدوده ۱-۶/۵ کیلو دالتون محاسبه شد، اما وزن مولکولی غالب پپتیدهای زهر عقرب کراسیکودا در محدوده ۶/۵-۳ کیلو دالتون و در pH ۸/۲-۶/۲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

جدول ۱) مقایسه مجموع پپتیدهای زهر دو عقرب بر مبنای بار الکتریکی و وزن مولکولی توسط الکتروفورز دوبعدی

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

بحث

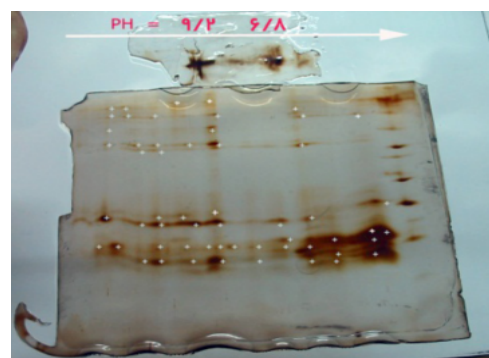
امروزه بیشترین کاربرد الکتروفورز دوبعدی در زمینه پزشکی دارویی در تخلیص پروتئین‌ها و تعیین پروفایل به‌منظور تشخیص بیماری‌ها می‌باشد (۱۳). در زمینه مقایسه پروفایل پروتئین و پپتیدهای زهر عقرب به‌روش



تصویر ۳) مقایسه الگوی پپتیدهای زهر عقرب‌های دوریه و کراسیکودا توسط ژل‌تریسین باغلظت ۱۶/۵ درصد

ستون‌ها از سمت چپ به راست: ۱-مارکر Fermentas-molecular weight
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 ۸-۶ استفاده گردید. بعد از تثبیت پروتئین در ژل، برای تعیین وزن مولکولی پروتئین مرحله دوم اجرا شد. در بعد دوم الکتروفورز، ژل پلی‌اکریل‌آمیدتریسین با غلظت ۱۶/۵ درصد اجرا شد. نتایج به‌صورت نقاط پراکنده در سطح ژل ظاهر گشت، که هر نقطه می‌توانست نماینده یک پپتید از زهر با مشخصات بار الکتریکی و وزن مولکولی آن باشد.



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

ثبات pH بافری ایجاد گردید.

در بررسی‌های اولیه، "SDS-PAGE" معمولاً در جداسازی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالای ۱۵ کیلو دالتون به کار رفته زیرا از ارزش کمتری در جداسازی پپتیدهای 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 آمفولیت‌ها، 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 شیب pH ژل IEF از محلول KCl ده درصد میلی‌مول استفاده گردید.

ژل‌تریسین، یکی از قابل اعتمادترین روش‌ها در فرآیند جداسازی پپتیدهای زهرعقرب در مخلوط‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین و نیز ارزیابی خلوص پروتئین است. لذا در بعد دوم از ژل‌تریسین ۱۶/۵ درصد به جای SDS-PAGE استفاده گردید. به منظور کالبره 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 دوبعدی 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 هیچ‌گونه تحقیقی تاکنون صورت نگرفته است. در این روش، تنها روش توانمند در زمینه شناسایی و مقایسه پپتیدهای پروفایل زهرعقرب است. نکته قابل ملاحظه آن است که ابتدا باید هدف از انجام الکتروفورز مشخص می‌گردید، که آیا دستیابی به پروتئین‌هایی با ویژگی‌های خاص، و یا آن‌که تهیه یک نقشه کامل از پروتئین‌های نمونه زهر موردنظر بوده است. به منظور دستیابی به پروتئین‌های خاص، شاید با افزودن مراحل آماده‌سازی نمونه، کیفیت نتیجه نهایی بهتر می‌شد، اما این امر به قیمت از دست دادن تعدادی از پروتئین‌ها تمام می‌گردید.

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 به منظور دست یافتن به پپتیدهای 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 گرما می‌انجامد، که موجب انحراف باندها خواهد گردید، لذا حداقل ظرفیت بافری که می‌توانست شرایط pH را ثابت نگهداشته، با پرنمودن مخازن الکترودها از بافر، شرایط

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 ژنتیکی 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

قابل مطالعه می‌باشد.

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

References:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Inceoglu B, Lango J, Jing J, et al. One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *Proe Nation Acad Sci* 2003; 100: 922-7.
6. 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.
7. Possani LD, Becerrill B, Delepierre M, et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem* 1999; 264: 287-300.
8. Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 1997; 35: 821-35.
9. 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.
10. Wang WX, Ji YH. Venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *J Neurooncol* 2005; 73: 1-7.
11. 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 Jilin Uni Med Ed* 2006; 32: 625-8.
12. Nentwing L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2651-68.
13. 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.
14. Farzanpay R. A catalogue of the Scorpions occurring in Iran, up to January 1986. *Rev Arachn* 1988, 8: 33-44.
15. Zargan J, Sobati H, Farahmandzad AR. Result study of funa 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.*
16. 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.*
17. 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.

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. Ebrahimi ¹, R. sorouri ², M. Kamali ², J. Zargan ¹

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