مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی فراکسیون های سمی زهرعقرب مزوبوتوس اپئوس ایرانی با سه فرایند کروماتوگرافی مختلف

سید پژمان شیرمردی*[1]، مصطفی عرفانی [1]، عباس زارع میرک آبادی[2]

۱ پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران، تهران
۲ موسسه سرم سازی رازی، کرج

چکیده :

سابقه و هدف: در این مطالعه تهیه و جداسازی فراکشن سمی زهر عقرب مزوبوتوس اپئوس ایرانی که از خانواده عقرب های بوتیده بوده و در سراسر ایران پراکنده می باشد انجام شده است. زهر این عقرب همانند دیگر هم خانواده های این نوع عقرب دارای توکسین های مختلف می باشد که بر روی کانال های یونی تاثیرات زیادی دارند.

مواد و روش ها: برای بررسی و مطالعه این توکسین ها، زهر مذکور توسط سه مرحله جداسازی کروماتوگرافی به ترتیب ژل فیلتراسیون با سفادکس G-۵۰، رزین آنیونیDEAE و رزین کاتیونی CM جداسازی سازی شد. در هر مرحله از جداسازی، هر فراکشن جداسازی شده که توسط فراکشن هایی در طیف UV مشخص گردید به ۲ موش معمولی از طریق رگ دم تزریق و فراکشن سمی آن مشخص شد. سپس برای خالص تر نمودن این فراکشن سمی، آن را تغلیظ نموده و مرحله بعدی کروماتوگرافی انجام می شد.

یافته ها: نتایج تزریق فراکشنهای جدا شده نشان داد که نشان داد که فراکشنهای F۳، F۳۱، F۳۱۶ و F۳۱۹ سمی بوده و باعث مرگ موشها شدند.

نتیجه گیری: تعیین نقاط هدف و محل تمرکز فراکشنهای سمی زهر عقرب به روند درمان عقرب زدگی و طراحی پادزهر مناسب کمک می کند.

واژه های کلیدی: جداسازی، کروماتوگرافی، سم ، مزوبوتوس اپئوس

مقدمه

عقرب های ایرانی از دو خانواده اسکرپیونیده و بوتیده تشکیل شده اند. عقرب مزوبوتوس اپئوس از خانواده بوتیده می باشد که در قسمت های مختلف کشور پراکنده شده است (۱). در مورد پراکندگی کلی عقربهای ایران یادآوری این نکته لازم است که شعاع پراکندگی جغرافیایی تیره بوتیده در ایران بیشتر است. تیرهٔ اسکرپیونیده محدود به مناطقی از شهرهای جنوب، جنوب غربی، استان مرکزی و استان آذربایجان، کرمانشاه، کردستان و خراسان میشود، در حالیکه انواع مختلفی از جنسهای تیره بوتیده از تمام نقاط ایران گزارش شده است. تنوع و پراکندگی وسیع تیره بوتیده در ایران میتواند نتیجهٔ قدمت بیشتر آن نسبت به تیرهٔ اسکرپیونیده باشد. با توجه به اینکه زهر عقرب مزوبوتوس اپئوس ایرانی مرگ آور می باشد، جداسازی و مطالعه اجزای سمی زهر این عقرب می تواند باعث تهیهٔ پادزهر اختصاصی به منظور ارائه خدمات پزشکی بهتر و مؤثرتر به افراد عقرب زده باشد. در نتیجه هدف از اجرای این تحقیق، ارائه اطلاعات مورد نیاز جهت تهیهٔ پادزهر اختصاصی بوده که بوسیلهٔ آن درمان موثری بر روی بیماران عقرب زده انجام خواهد گرفت و راه حل مناسبی برای مقابله با مرگ و میر و عوارض وخیم ناشی از این نوع عقرب زدگی خواهد بود. اخیرا» در مرکز سرم سازی رازی اثر این سم بر روی سیستم تنفسی و قلب بررسی گردید (۸). سم این عقرب دارای مواد تشکیل دهنده مختلفی

آدرس نویسنده مسئول :پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران، تهران
Email :
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۴

از جمله توکسین های متنوع، اسیدهای آمینه، موکوپروتئینها و اولیگوپپتیدها می باشد (۲و ۵و۷). عمده تاثیر توکسین ها بر روی مسدود کردن کانالهای سدیمی، پتاسیمی و کلرایدی می باشد. توکسین های با زنجیره بزرگتر از ۶۰ اسید آمینه بیشتر بر روی کانالهای سدیمی و زنجیره های ۳۰ تا ۴۰ اسید آمینه بر روی کانالهای پتاسیم و کلرایدی تاثیر می گذارند. برای تهیه سم خالصتر، از روش تحریک الکتریکی غدهٔ سمی نیز استفاده میشود. برای اینکار عقرب زنده را با دو پنس مناسب از ناحیهٔ سر و دم مهار و نیش جانور را وارد ظرف شیشهای کوچک میکنند، دو سر الکترود دستگاه الکتروشوک را برای لحظهای در طرفین غدهٔ سمی قرار میدهند. در اثر عمل انقباض عضلات وابسته، سم خالص داخل ظرف پاشیده میشود. ترشحات اولیهٔ سم، زلال و شفاف است ولی بتدریج کدر و چسبناک میشود. در این حالت سم با مخاط مخلوط شده است. مقدار ولتاژ و فرکانس لازم برای تحریک الکتریکی بسته به نوع عقرب متفاوت است. معمولاً ولتاژهای ۶ تا ۱۰ ولت قادر است سم خالص به صورت شفاف بدست بدهد. در ولتاژهای بالاتر، امکان ترشح مخاط افزایش مییابد.

سم حاصل از هریک از دو روش را میتوان در حالت انجماد و خلاء خشک کرده و بصورت پودر درآورد. از دیسیکاتور نیز برای خشک کردن محلول سم میتوان استفاده کرد. در این حالت سم خشک شده بصورت کریستال درمیآید. سم های حاصل در شیشههای دربسته و در محلی خشک و تاریک نگهداری میشود. ۲ الی ۴ درجه سانتیگراد، درجه حرارت مناسبی برای نگهداری طولانی سم است. سمگیری باید از گونه و در صورت امکان از زیرگونههای یکسان، که همگی متعلق به یک جمعیت و یک ناحیه باشند انجام شود. سم عقرب مادهای است پروتئینی، در حالت تازگی و خلوص، شفاف و بیرنگ و با pH برابر خنثی تا قلیایی است. پودر آن سفید تا کرم روشن و کریستال آن زرد رنگ است.

فراکشنهای سمی (Toxic) سم عقرب را میتوان با استفاده از روشهای الکتروفورز، کروماتوگرافی و همچنین فیلتراسیون روی ژل سفادکس از سم عقرب جدا کرد. وسیعترین تکنیک مورد استفاده برای خالص سازی توکسینهای سم عقرب شامل استخراج محلول سم خام در طی انحلال در آب و سانتریفوژ کردن و به دنبال آن کروماتوگرافی ستونی است. توکسینها پلی پپتیدهای بازی هستند بنابراین یک رزین تعویضکنندهٔ کاتوینی مانند کربوکسی متیل سلولز برای مرحلهٔ دوم خالص-سازی مناسب و کافی به نظر میرسد ولی معمولاً یک مرحلهٔ سوم کروماتوگرافی برای اینکه توکسینها در شکل هموژن بدست آیند، لازم میشود.

روش کار و نتایج

روش آمادهسازی سم خام لیوفیلیزه

پس از استخراج زهر عقرب توسط روش شوک الکتریکی، آن را لیوفیلیزه نموده و در فریزر نگهداری می شود. سپس برای انجام این کار ابتدا مقداری از پودر لیوفیلیزه سم خام عقرب مزوبوتوس اپئوس که توسط روش تحریک الکتریکی بدست آمده بود در آب مقطر حل و به مدت ۳ ساعت به هم زده می شود. سپس این محلول بمدت ۴۸ ساعت درون کیسه دیالیز و در سردخانه با دمای حدود ۴درجه سانتیگرادقرار گرفت. کیسه دیالیز ۳۲میلی متر جهت این کار استفاده می شود. پس از دیالیز، نمونه مورد نظر بمدت ۱۷ دقیقه در سانتریفوژ SIGMA ۶K۱۵ ساخت کشور آلمان و روتور ۱۲۱۷۲و با۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و قسمت محلول از موکوپروتئینهای نامحلول جدا گشت، حضور موکوپروتئین ها موجب سد شدن ستون ژل خواهد شد. بعد از سانتریفوژ نمودن محلول از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده می شود.

ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-۵۰

برای انجام این مرحله ابتدا ستون شیشهای به ابعاد ۲/cm۵*cm۱۲۵ انتخاب و با سفادکس G-۵۰ متورم شده پر گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت بافر استات آمونیوم ۰/۱ مولار با ۸pH=/۶ از روی آن عبور داده شد تا ستون کاملاً شرایط لازم برای جداسازی را کسب کند. بافر استات آمونیوم یک بافر فرار می باشد، بنابراین فراکشن های جمع آوری شده را می توان به راحتی و به سرعت تغلیظ و یا لیوفیلیزه کرد.

بعد از آن مقدار ۲۰۰ میلی گرم از سم لیوفیلیزه شده ای که موکوپروتئینهای آن جدا شده بود در ۱۸ میلی لیتر آب مقر حل شده و روی ستون برده شد و با سرعت ml/hr ۶۰ توسط بافر آمونیوم استات اولیه در حجم های ۱۰ میلیلیتری در ۱۲۷ لولهٔ

آزمایش جداسازی و جمع گردید.

سپس جذب لوله ها در دستگاه UV در طول موج nm۲۸۰ (که حداکثر جذب پروتئینها در این طول موج میباشد.) خوانده شد و منحنی جذب لوله ها در برابر شمارهٔ آنها رسم گردید (شکل ۱).

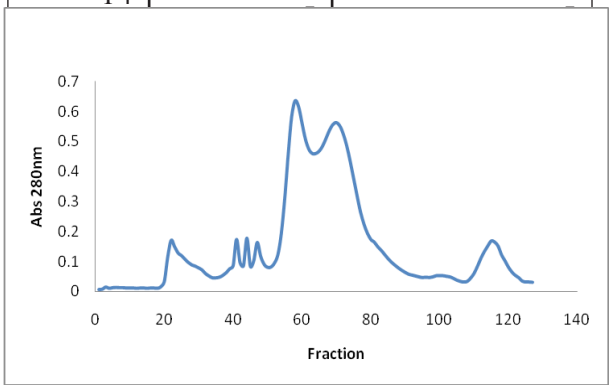
در این نمودار ۴ فراکشن مجزا قابل مشاهده است. محتویات لوله هایی که مربوط به هر فراکشن بود مخلوط گردید و جهت تعیین سمیت فراکشن ها از هر کدام به میزان ۰/۵ میلیلیتر به رگ دم موش تزریق شد و فراکسیون سمی که سبب مردن موش شد جهت تغلیظ و آماده شدن برای مراحل بعدی کروماتوگرافی کنار گذاشته شد.

ملاک سمی(Toxic) بودن فراکشن های بدست آمده در انجام این آزمایش، کشنده بودن فراکشن برای موش نرمال بوده است. این بر اساس مشاهدات و روش کار میراندا در سال ۱۹۷۰ می باشد. در این کار هریک از ۴ فراکسیون به ۲ موش تزریق شد و سمیت فراکشن شماره ۳ با کشتن هر دو موش نرمال مشخص گردید (جدول۱). قابل ذکر است موش ها به مدت ۲۴ ساعت در قفس نگه داشته شدند تا بطور قطع کشنده بودن توکسین ها دیده شود اما ملاحظه شد که فراکشن های دیگر بعد ازگذشت ۲۴ ساعت اثر کشندگی نداشتند. این نکته قابل ملاحظه بود که قبل از مرگ، موش ها فلج می شدند. جهت اطمینان از کشنده بودن فراکشن ها و اطمینان از اینکه دخالت و حضور بافرها باعث کشندگی نشده است در این آزمایش سعی شد تا کشنده بودن و یا سمی بودن فراکشن ها قبل و بعد از دیالیز بررسی شود. لذا بافر استات آمونیوم به تنهایی تزریق شد و نتیجه آزمایش اثبات نمود که اثر کشندگی تنها مربوط به فراکسیون های سمی می باشد و بافر دخالتی ندارد.

از آنجا که هدف ما در انجام این کار جداسازی توکسین های موثر روی پستانداران بوده است، بدیهی است که غیر سمی(Nontoxic) بودن فراکشن های دیگر بعلت عدم قدرت کشندگی روی موش دلیل بر نفی وجود فعالیت های احتمالی دیگر مثلا روی حشرات یا دیگر گروههای طبقه بندی کننده توکسین های عقرب نمی باشد.

جدول ۱- اثر کشندگی یا سمیت هر فراکشن در ۲ موش نرمال

Fraction	اثر کشندگی درموش اول	اثرکشندگی درموش دوم
F1	_	_
F2	_	_
F3	+	+
F4	_	_



شکل ۱- منحنی جذب در ۲۸۰ نانومتر به فراکشن های مختلف

آماده سازی ستون آنیونی

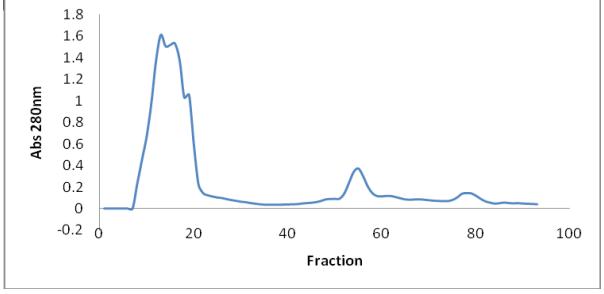
ابتدا رزین DEAE را در آب ریخته و به حجم ۲۰۰ سی سی می رسانیم سپس مقدار حدود ۱۱ گرم NaCl جهت ایجاد محلول ۱ مولار به آن اضافه می شود و به مدت ۳۰ دقیقه محلول به خوبی به هم زده می شود. بعد از آن رزین ته نشین شده و آب نمک روی ژل قرار می گیرد و به راحتی می توان آن را خارج کرد. برای تزریق رزین به ستون ابتدا کمی پشم شیشه ته لوله قرار داده تا رزین از ستون خارج نشود، سپس حدود یک سوم ستون را آب ریخته و آرام رزین به ستون تزریق می شود. کنترل هدایت (Conductivity) خروجی و ورودی الزامی می باشد، (ورودی ۳ میکرو زیمنس و خروجی ۳۰ می باشد). بافر این ستون تریس باز ۲۰میلی مولار است که با افزودن مقداری اسید کلریدریک pH آن روی ۸/۳ تنظیم می شود. جهت افزایش قدرت یونی از گرادیان نمک نیم مولار استفاده می شود و میزان ۵۰۰ میلی لیتر از هر کدام تهیه می شود و بصورت سری قرار می گیرند.

پمپ و دستگاه Fraction Collector روی سرعت ۲۰ میلی لیتر بر ساعت و ۵ میلی لیتر در هر لوله، تنظیم شده سپس ۵۰ میلی لیتر از محلول فراکشن ۳ که از مرحله قبل سمیت آن احراز

شده بود آماده و به ستون تزریق می شود. پس از شستشوی کامل ستون رزین، طیف UV لوله های پرشده مشخص گردید و نمودار آن رسم (شکل ۲) وفراکسیون های سمی و غیر سمی مشخص شد. در این قسمت از خالص سازی ۳ فراکشن مشاهده شد که به ازای هر فراکسیون ۲ موش جهت تعیین فراکشن های سمی انتخاب و فراکشن شماره یک (F۳۱) سمیت خود را نشان داد (جدول۲).

جدول ۲- اثر کشندگی یا سمیت هر فراکشن در ۲ موش نرمال

Fraction	اثرکشندگی درموش اول	اثرکشندگی درموش دوم
F31	+	+
F32	-	-
F33	-	-



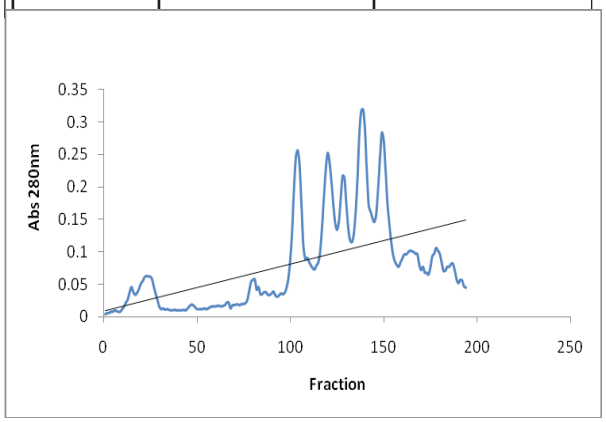
شکل ۲- منحنی جذب در ۲۸۰ نانومتر به فراکشن های مختلف

آماده سازی ستون کاتیونی

در این قسمت همانند روش قبل ابتدا ژل CM توسط نمک یک مولار آماده می شود. سپس بافر سدیم استات ۲۰ میلی مولار با pH برابر ۴/۸ به همراه گرادیان نمک نیم مولار تهیه می شود. پمپ و دستگاه Fraction Collector را روی سرعت ۲۰ میلی لیتر بر ساعت و ۵ میلی لیتر در هر لوله تنظیم وسپس۴۴ میلی لیتر محلول فراکسیون (F۳۱) که از مرحله قبل آماده شده بود به ستون تزریق می شود. بعد از شستشوی کامل ستون و جمع آوری خروجی، طیف UV آن مشخص و نمودار را رسم شد (شکل ۳). مقادیر هر فراکسیون که در لوله های مختلف قرار دارند روی هم ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت دیالیز می شوند. در این قسمت از خالص سازی ۱۰ فراکسیون مشاهده شد که با تزریق هر فراکسیون به ۲ موش نرمال فراکشن ۶و۹ سمی بودند (جدول ۳).

جدول ۳- اثر کشندگی یا سمیت هر فراکشن در ۲ موش نرمال

Fraction	اثرکشندگی درموش اول	اثرکشندگی درموش دوم
F311	-	-
F312	-	-
F313	-	-
F314	-	-
F315	-	-
F316	+	+
F317	-	-
F318	-	-
F319	+	+
F3110	-	-



شکل ۳- منحنی جذب در ۲۸۰ نانومتر به فراکسیون های مختلف

بحث

تحقیقات متعددیی جهت بررسی فعالیتهای بیولوژیکی زهر حشرات و خزندگان مختلف بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است و ثابت شده است که تاثیرات زهر عقربها بیشتر به پپتیدهایی با وزن پایین است (۱و۶و۸). بررسی زهر عقربهای ایرانی و همچنین جداسازی فراکشنهای سمی آنها این امکان را به محققان خواهد داد تا بتوان با شناخت محل تمرکز فراکشن های سمی در بدن و مسیر توزیع آنها به اقدامات درمانی و طراحی پادزهرهای مناسب دست یابند (۳و۷). با توجه به گستردگی گونه های مختلف عقرب در کشور، جداسازی فراکشنهای سمی زهر گونه های مختلف این عقرب ها بخصوص خانواده بوتیده از اهمیت ویژه ای برخوردار است. زهر عقربهای خانواده بوتیده بیشتر از پپتیدهای نوروتوکسیک و پپتیدهای کوچک دیگری که عملکرد مشخصی ندارند تشکیل شده است. با توجه به پراکندگی زیاد زهر عقرب مزوبوتوس در کشور و اهمیت

شناخت هرچه بیشتر زهر این عقرب تلاش شد در موسسسه سرم سازی کرج سم عقرب توسط روش شوک استخراج و سپس لیوفیلیزه گردید. البته روشهای استخراج زهر عقرب متفاوت بوده که دو روش عمده آن روش شوک الکتریک و روش سایش غدد می باشد. تجربه نشان داده که روش اول مناسب تر بوده و پروتئین های بزرگی همچون موکوها کمتر در زهر ترشح می شوند. پس از گرفتن زهر این عقرب و لیوفیلیزه کردن آن، حدود ۲۰۰ میلی گرم از آن را جهت بررسی و جداسازی برداشته شد. برای جداسازی ۳ مرحله در نظر گرفته شد. در مرحله اول کروماتوگرافی (ژل کروماتوگرافی) ۴ فراکشن به دست آمد که با تزریق هرکدام از آنها به ۲ موش نرمال و مردن هر دو موش سمیت فراکشن F۳ که سومین پیک طیف UV بود مشخص گردید. سپس این فراکشن سمی را بر روی ستون رزین آنیونی بارگذاری کرده که ۳ فراکشن مشاهده شد. با تزریق به موش، فراکشن اول طیف، F۳۱ سمی بود. در ادامه این فراکشن بر روی ستون رزین کاتیونی بارگذاری شد که در طیف خروجی ۹ فراکشن مشاهده شد که فراکشن ۶ و۹ (F۳۱۶,F۳۱۹) سمی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده می توان با خالص سازی تکمیلی توسط HPLC به فراکشنهای خالص تری دست یافت و در ادامه توالی اسیدهای آمینه پپتیدهای موجود در فراکشن سمی را برای مطالعات تکمیلی تعیین نمود. با خالص سازی های بیشتر می توان به توالی اسیدهای آمینه این فراکشن ها دست یافت و از این طریق به پادزهرهای اختصاصی تر رسید. از پپتیدهای موجود در زهر عقربها نیز جهت درمان تومورهای سرطانی می توان استفاده کرد.

با اعمال فرایندهای جداسازی مختلف مشاهده شد که در مرحله اول خالص سازی یک فراکشن سمی، در مرحله دوم یک فراکشن و در مرحله سوم دو فراکشن سمی استخراج گردید. با توجه به شناخت این فراکشن ها می توان با تحقیقات بیشتر توالی اسیدهای آمینه آنها را به دست آورده و پادزهر مناسبی برای آنها بصورت اختصاصی تهیه کرد.

منابع

(۱)- کدخدایی الیادرانی م، آموزگاری ز ، حنیفی ح. فعالیت آنزیم فسفولیپاز A۲ و هیالورونیدازدر زهر عقرب مزوبوتوس اپئوس. فصلنامه علمی پژوهشی فیض. سال دهم، شماره ۴ (پیاپی ۴۰)

(2) Gwee MC. Nirthanan S. Khoo HE. Gopalakrishnakone P. Kini RM. Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 9: 795-801.

(3) Klaassen CD, Watkins III JB. Casarett & Doull's essentials of toxicology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p. 281-3.

(4) Ozkan O, Kat I. Mesobuthus eupeus scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005;11(4):479-91.

(5) Pujatti PB, Simal CJR and Santos R. Preparation of Crotalus Venom Radiolabeled with Technetium-99m as a Tool for Biodistribution Study. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005; 48: 9-12.

(6) Radmanesh M. Androctonus crassicauda sting and its clinical study in Iran. J Trop Med Hyg. 1990;93(5):323-6.

(7) Tu AT. Scorpion Venoms. In venoms: Chemistry and Molecular Biology. John and Sons, 1977; 459-483.

(8) Zayerzadeh E et al. Cardiopulmonary complications induced by Iranian Mesobuthus eupeus scorpion venom in anesthetized rabbits, J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 2010;16(1) : 46-59.