DOI: 10.22092/vj.2020.127979.1626
شماره ۱۲۶ بهار ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه و شناسایی خاصیت پروتئازی در زهرمار شاخدار ایرانی

• **فریبا گلچین فر (نویسنده مسئول)**
استادیار بخش پروتئومیکس و بیوشیمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **رسول مدنی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
بخش پروتئومیکس و بیوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **علی نظری**
استادیار بخش پروتئومیکس و بیوشیمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **آرش غنی زاده**
کارشناس ارشد بخش پروتئومیکس و بیوشیمی‌موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **تارا امامی**
پژوهشگر بخش پروتئومیکس و بیوشیمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۷-۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۱-۲۸
Email: f_golchinfar@yahoo.com

چکیده

مارها یکی از مفیدترین حیوانات این کره خاکی برای تولید انواع دارو، سرم‌ها و واکسن‌ها هستند. زهر مار عمدتا برای بی حرکت کردن و کشتن شکار می‌باشد و از نظر دفاعی احتمالا اهمیت حیاتی دارد. زهر مارها کاربردهای درمانی فراوانی دارد و در تحقیقات بیوشیمی بسیاری استفاده می‌شود. این مایع روغنی شکل، دارای رنگی سفید تا زرد و با *pH* اندکی اسیدی می‌باشند و مخلوط پیچیده‌ای از پلی پپتیدها، پروتئین‌های سمی، آنزیمی و مواد غیر پروتئینی هستند. غده سمی مار از نظر تشریحی شبیه به غده تغییر شکل یافته پاراتیروئید انسان است. این غده در اغلب مارها در فضایی واقع در پشت چشم و روی استخوان فک بالایی که به سمت پایین و عقب چشم امتداد دارد. به عبارت دیگر بین چشم و گوشه دهان قرار می‌گیرد. با حرکت سریع استخوان‌های سرو فشار وارده توسط ماهیچه‌ها به غده سمی، مقداری زهر از راه کانالی که به دندان سمی متصل است به شکار منتقل می‌شود. زهر همه‌ی مارها یکسان نیست اگرچه این عقیده وجود دارد که زهر مارها از اجداد بیولوژیکی مشترک به وجود آمده است. هدف در این مطالعه تشخیص و تعیین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در زهر مار شاخدار ایرانی از مناطق مختلف می‌باشد. در این پژوهش بر روی زهر مار شاخدار ایرانی از سه منطقه سمنان، کرمان و خوزستان تحقیق و بررسی به عمل آمد. ابتدا غلظت پروتئین‌های زهر این مار با استفاده از روش‌های لوری و برادفورد، تعیین گردیدکه میزان *mg/ml* ۹۵/. گزارش گردید. در مرحله بعد، تعداد پلی پپتیدها و وزن مولکولی این پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز عمودی مشخص گردید که به دو صورت احیایی و غیر احیایی انجام شد، و محدوده وزن مولکولی ۱۵ تا ۱۹۰ کیلودالتون تخمین زده شد که این پروفایل پروتئینی در خوزستان، کرمان و سمنان دارای تشابه نسبی بودند. انجام الکتروفورز *Native* و زیموگرافی با سوبسترای کازئین، فعالیت پروتئولیتیک زهر مار شاخدار را تایید نمودو سنجش کمی فعالیت پروتئازی زهر با دو روش هضم کازئین و سوبسترای *BAPNA* معادل با *U/ml* ۱۱/۵۶ تعیین گردید.

کلمات کلیدی: پروتئاز، زهر، فعالیت آنزیمی و مار

Veterinary Researches & Biological Products No 126 pp: 118-127

Study of Protease Properties in Pseudocereastes Percicus Venom

By: Golchinfar F. (Corresponding Author), Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Madani R. Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Department of Microbiology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Nazari A. Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ghanizade A. Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran and Emami T., Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-10-05 **Accepted: 2020-02-17**

Email: f_golchinfar@yahoo.com

Snakes are one of the most useful animals in the world for the production of medicines, sera and vaccines that are made from the venom. Venomous snakes have many therapeutic applications and are very useful in biochemical research. Snake venom is an oily liquid, white to yellow with a slightly acidic pH and is a complex mixture of polypeptides, toxic proteins, enzymes, pharmaceuticals and non-protein substances. Venom of all snakes is not the same, although it is believed that venom of snakes originated from common biological ancestors.

The aim of this study was to determine the activity of protease enzyme in venom of horned snake from different regions. In this study, the venom of the horned snake from three regions of Semnan, Kerman and Khuzestan was investigated. At first, the venom protein concentration of this snake was determined using Lowry and Bradford methods, which was reported to be 950 mg / ml (95%). In the next step, the number of peptides and molecular weight of these proteins were determined by vertical electrophoresis, which were performed in both reducing and non-reducing methods. And the molecular weight range of 15 to 190 kDa was estimated to have relative similarities in Khuzestan, Kerman and Semnan. Native electrophoresis and casein substrate electrophoresis confirmed the proteolytic activity of ruminant venom and quantitative determination of venom proteolytic activity was determined by BAPNA dilution and casein digestion 11.56 U/ml.

Keyword: Protease, Venom, Enzymatic Activity, Snake

مقدمه

مارها تنها موجوداتی هستند که با وجود آن که اغلب مردم از آن‌ها وحشت دارند، از پر طرفدارترین جاندارانی می‌باشند که می‌خواهیم راجع به آن‌ها اطلاعات کسب کنیم. تاکنون حدود ۳۰۰۰ گونه از این موجودات شناسایی شده‌اند که در این میان فقط حدود ۴۰۰ گونه آن‌ها سمی می‌باشند و از میان آنها فقط ۵۰ گونه خطرناک بوده و می‌توانند برای انسان مشکل‌ساز باشند (۴).

گزارش توسط مار هنوز هم یک تهدید جدی در کشورهای توسعه یافته و توسعه نیافته می‌باشد .بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی تقریبا دو نیم میلیون نفر در جهان دچار مارگزیدگی می‌شوند که بیش از ۱۰۰۰۰۰ مورد از آن‌ها به مرگ منتهی می‌شود (۳). تقریبا ۲,۳ میلیون نفر در آفریقا، خاورمیانه، هند و آمریکای جنوبی در ریسک گزش هستند و این در حالیست که حدودا ۳۲۵۰ مورد منجر به مرگ می‌شود (۴).

زهر در درجه اول وسیله‌ای است جهت بی حرکت کردن قربانی و از آنجایی که غنی از آنزیم‌های پروتئولیتیک است، موجب تسهیل هضم آن می‌شود. و در درجه دوم وسیله‌ای جهت دفاع در مقابل دشمن است. تحقیقات اولیه زهرها در جهت درمان مارگزیدگی‌ها صورت می‌گرفت، اما امروزه دیدگاه‌های موجود بر جانوران زهردار به طور چشم‌گیری تغییر کرده است. اطلاعات بدست آمده از این دیدگاه‌های تازه شامل اهداف وسیعی از این ملکول‌های زیستی است که به عنوان ملکول‌های نشانه و ابزارهای دارویی جهت بررسی عملکرد زیستی گیرنده‌ها وکانال‌های یونی به کار می‌روند (۹). اطلاعات مربوط به این ملکول‌ها منجر به تولید ترکیبات رهبر برای طراحی داروهای مناسب در مسایل بالینی شده است. لذا تعیین میزان پروتئین و بررسی الگوی الکتروفورز در این زمینه، همچنین مقایسه زهر مار شاخدار از استان‌های مختلف، می‌تواند حاوی اطلاعات مناسبی در این زمینه باشد. زهر نه تنها از حیوانی به حیوان دیگر متفاوت است، بلکه حتی در یک گونه نیز بسته به سن، فصل، جنس، دمای محیط و منطقه جغرافیایی و نوع تغذیه می‌تواند دچار تغییراتی شود (۲)

در ارتباط با ترکیب زهر وایپرهای خاورمیانه از جنس Eristicophis

و Pseudocerastes اطلاعات زیادی در دست نمی‌باشد. این جنس‌ها خواهر یکدیگر محسوب می‌شوند و خواهر همه مارهای Viperinae (۱). Pseudocerastes شامل Pseudocerastes persicus، Pseudocerastes fieldi و اخیرا گونه‌های تازه شناخته شده Pseudocerastes urarachnoides می‌باشند(۷). P. fieldi بطور گسترده‌ای در خاورمیانه وجود دارد. این گونه ساکنان بیابان‌های باز با پوشش خالص متوسط و سنگ‌های پراکنده و با حداکثر طول ۸۹ سانتی‌متر می‌باشند. P. fieldi گونه‌های غالب مارهای وایپر هستند که در هر جا که یافت می‌شود. این زیستگاه‌های مختلف شامل بیابان‌های بازالت و آهکی می‌باشد (۱و ۷).

اجزای تشکیل‌دهنده زهر مار ممکن است فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی داشته باشند. زهر مار می‌تواند بیش از یک سری واکنش را همزمان فعال نماید که احتمال دارد به علت دارا بودن آنتی‌ژن‌های متفاوت باشد (۳). در زهر مارها تعداد زیادی پروتئین و پپتیدهای فعال با اثرات متفاوت وجود دارد. این مولکول‌ها در غده‌های تخصصی که از تکامل غدد بزاقی بوجود آمده و به غده سمی تمایز یافته است، ساخته و ذخیره می‌شوند (۴). مار شاخدار ایرانی Persian Horned Viper یا Pseudocerastes persicus P. persicus در ایران، افغانستان، پاکستان و شمال عمان یافت می‌شود که با P. fieldi نسبت آلوپاتریک دارد (آلوپاتری وآلوپاتریک در مورد گروه‌های موجودات زنده‌ای بکار می‌رود که اگرچه خویشاوند بسیار نزدیک هستند ولی در قلمرو جغرافیایی کاملا جداگانه ای زندگی می‌کنند) به عنوان مثال، در محدوده زاگرس در غرب ایران بصورت دو همسایه یافت گردیدند (۲ و ۹). زهرهای این دو مار وایپرخیلی عمیق مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند.

اثرات بیولوژیکی زهرها پیچیده است، زیرا اجزای مختلف آن اثرات متفاوتی دارند و علاوه بر این می‌توانند در هماهنگی با سایر مولکول‌های زهر عمل کنند. اثر متقابل پروتئین‌های زهر ممکن است فعالیت‌های خود را افزایش داده و یا به گسترش زهر کمک کند. پروتئین‌های سمی زهر نقش‌های متفاوتی را دارا می‌باشند: بی حرکت کردن، فلج کردن، کشتن، مایع‌سازی شکار و بازدارندگی رقبا. وجود هم زمان، تنوعی از ایزوفرم‌های پروتئین‌های یک خانواده در زهر منجر به تغییر اثرات فارماکولوژیک آن‌هاست، این مطلب بیانگر تکثیر ژن‌ها و تکامل داروینی است (۲ و ۴). این واقعیت که اعضای یک خانواده پروتئینی مشابه با ساختار یکسان، تشابه قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. اما اهداف بیولوژیک متفاوتی بیان می‌کنند. آن‌ها ابزارهای ارزشمند بیوتکنولوژی برای مطالعه فرایندهای فیزیولوژیکی هستند.

اجزاء تشکیل‌دهنده زهر در مارهای مختلف، متفاوت می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: پروتئازها (کاتالاز، لاکتات دهیدروژناز، هیالورونیداز، فسفولیپازA۲ ، استیل کولین استراز) میوتوکسین‌ها (فسفولیپازA۲ ، کروتامین، کروتوکسین) فیبرینوژناز (موجب خونریزی در محل می شوند)، نروتوکسین‌ها ممکن است با تاثیر بر غشاءهای postsynaptic موجب تشدید آزادسازی استیل کولین و در نتیجه لرزش و تشنج عضلانی گردند)، کاردیوتوکسین‌ها همولیتیک‌ها، لکتین‌ها، مهارکننده‌های فسفولیپاز، مهارکننده‌های پروتئاز و ترکیبات موثر بر سیستم کمپلمان و نهایتا اجزاء غیر پروتئینی زهر مار که خود سمی نیستند ولی موجب پایدار شدن اعمال فارماکولوژیک اجزاء اصلی زهر می‌گردند از این ترکیبات می‌توان به آمینواسیدها، آمین‌های بیولوژیک، کربوهیدرات‌ها ،لیپیدها، نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها، ریبوفلاوین، اسیدهای آلی، آنیون‌ها و کاتیون‌ها، اشاره کرد(۳و۴). در مورد نقش پروتئازها قابل ذکر است که پروتئازها واکنش‌های تخریب پیوندهای پپتیدی پروتئین را در بافت‌ها کاتالیز کرده و منجر به آسیب دیدگی دیواره رگ‌های خونی و آسیب‌دیدگی فرآیند گردش خون می‌شوند. بر اساس یک فهرست ارایه شده از پروتئازهای موجود در زهر مار، تاکنون بیش از ۱۵۰ پروتئاز مختلف از زهر مار تخلیص شده و به طور کامل یا جزیی شناسایی شده اند (۱۰،۱۱،۱۴).

مواد و روش‌ها

پروتئین‌سنجی به روش لوری *(Lowry)*

متداول‌ترین روش برای تعیین غلظت پروتئین در یک محلول روش لوری می‌باشد (۱۳). اساس این روش واکنش پروتئین‌ها با معرف فولین تحت شرایط قلیایی با مس و احیای فسفومولیبدو تنگستیک اسید به هتروپلی مولیبدونیوم آبی رنگ می‌باشدکه نتیجه کار رنگ آبی پررنگ می‌باشد. حساسیت این آزمایش ۰/۱ -۱میلی گرم پروتئین در میلی‌لیتر است.

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های زهر مار با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید*(SDS-PAGE)*

PAGE تکنیکی است که در آن مولکول‌های زیستی بر اساس اندازه (وزن مولکولی) جداسازی می‌شوند.

SDS یک دترجنت و مخفف Sodium Dodecyl Sulfate می‌باشد. بعد از اضافه کردن آن و احاطه کردن پروتئین‌ها، پروتئین‌ها بار نسبتا همسان پیدا کرده و به صورت خطی در می‌آیند. بدین ترتیب جداسازی فقط بر اساس اندازه صورت می‌پذیرد. SDS به پروتئین بار منفی می‌دهد.

ژل آکریل آمید با پیوندهای عرضی که دارد، مکانی را برای الک کردن مولکول‌هایی که در اثر جریان الکتریکی در حال عبور می‌باشند، به وجود می‌آورد. همه پروتئین‌هایی که دارای بار منفی هستند، توسط میدان الکتریکی که دارای بار مثبت می‌باشد، کشیده می‌شوند، اما شبکه پلیمری در برابر حرکت آن‌ها مقاومت می‌کند. پروتئین‌های کوچکتر سریعتر از مولکول‌های درشت تر در این شبکه حرکت می‌کنند. درنتیجه مولکول‌های درشت‌تر پایین تر قرار می‌گیرند. پس جداسازی در روش SDS-PAGE فقط بر اساس اختلاف در اندازه مولکول‌ها می‌باشد.

Native-Page

Native-Page همانند SDS-Page است، فقط با این تفاوت که در Native-Page ترکیبات احیایی SDS و بتامرکاپتواتانول از همه معرف‌ها حذف می‌شود.

سوبسترای کازئین

در Native-Page و بعد از انجام الکتروفورز ژل را از دستگاه جداکرده و در محلول کازئین ۲ درصد در بافر ۵۰ میلی مولار Ph، Tris-HCL=۷,۵ قرارداده و برای ۶۰ دقیقه در دما ۴ درجه سانتی‌گراد به آرامی بر روی شیکر قرارگرفت تا کازئین به داخل ژل نفوذ نماید. سپس ژل در محلول

کازئین ۲ درصد در بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCL، Ph=۸ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و برای مدت ۲۰ دقیقه به آرامی بر روی شیکر تکان داده شد. سپس ژل را چند مرتبه با آب مقطر شست و شو داده تا کازئین باقیمانده بر روی ژل خارج شود. سپس با استفاده از بافر رنگ حاوی ۰/۱ درصد کوماسی بلو R-۲۵۰ در متانول ۳۵ درصد و اسیداستیک ۷/۵ درصد عمل رنگ‌آمیزی برای یک شبانه روز بر روی شیکر و به آرامی انجام شد و سپس عمل رنگ بری بر روی شیکر با استفاده از متانول ۳۵ درصد و اسید استیک ۷/۵ درصد تا ظهور نواحی روشن بر روی ژل انجام شد. عمل رنگ‌بری باید تا جایی انجام شود که نواحی روشن بر روی زمینه آبی ظاهر شود.

اندازه‌گیری کمی فعالیت آنزیم پروتئاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز به دو روش انجام گردید:

۱- اندازه‌گیری با استفاده از سوبسترای BAPNA (Nx-Benzoyl-DL-Argenine-P-Nitroanilide-HCL) برای سنجش فعالیت آمیدازی آنزیم از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و از سوبسترای BAPNA استفاده گردید(۵).

معرف‌ها

۱- دی متیل سوفاکسید (DMSO)

۲- بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCL ،PH=۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$

۳- محلول بافر-سوبسترا: برای تهیه این محلول ابتدا mg ۴۳/۵ از سوبسترای BAPNA را در mg۱ از DMSO به خوبی حل کرده و سپس حجم آن را با بافر به ml۱۰۰ رسانده می‌شود.

۴- اسیداستیک ۳۰ درصد

ابتدا µL۲۵ از نمونه آنزیمی با µL۱۲۵۰ از محلول بافر-سوبسترا مخلوط شده و سپس برای ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد سپس برای متوقف کردن واکنش µL۲۵۰ اسیداستیک ۳۰ درصد اضافه شده و قرائت نوری در nm۴۱۰ انجام شد هر واحد از فعالیت آنزیمی برابر بودبا µmol۱ از ماده P-Nitroaniline که در مدت زمان ۱ دقیقه از سوبسترای BAPNA تولید می‌شود. در نمونه شاهد نیز از بافر به جای آنزیم استفاده گردید. فعالیت آنزیم از معادله‌ی زیر به دست آمد:

$$\text{Tripsin Activity}\left(\frac{\text{Unit}}{\text{mL}}\right)=\frac{\text{Absorban Ce410nm}\times 1000\times \text{Mixture Volume(mL)}}{8800\times \text{Reaction Time (Min)}\times 0.025}$$

۸۸۰۰(1-1M-Cm) ضریب تاریکی برای P-Nitroaniline است.

۲- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از روش هضم کازئین

-مواد و معرف های لازم

- معرف Folin & Ciocalteu's phenol reagent

غلظت مطلوب با رقیق سازی محلول ۲ نرمال خریداری شده از شرکت Merck بدست آمد این معرف با کلیه ترکیباتی که عامل فنولی دارند واکنش داده رنگ آبی تولید می‌کند. برای تعیین تیروزین آزاد شده، در طول فرایند سنجش فعالیت آنزیم به کار می‌رود. تیروزین در ترکیب خود عامل فنولی دارد.

- محلول تری کلرو استیک اسید (TCA)

محلول ۱۰٪ از TCA در آب مقطر تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

-بافرفسفات و گلایسین با pHهای مختلف

بافرفسفات در pHهای ۶ تا ۸ و بافر گلایسین در pHهای ۸/۵ تا ۱۰/۵ تهیه گردید

روش کار: سوبسترا به صورت روزانه برای آزمون سنجش فعالیت آنزیمی تهیه شد. برای تهیه بافر با pHهای مختلف نیز با غلظت ۵۰ میلی مولار استفاده شد. ابتدا سوبسترای کازئین را در بافر گلایسین حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در حمام بخار ۳۷ درجه قرار داده می‌شود سپس آنزیم پروتئاز به سوبسترا اضافه و به خوبی مخلوط شده و مخلوط آنزیم و سوبسترا در حمام بخار ۵۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده می‌شود. واکنش هیدرولیز کازئین توسط آنزیم با اضافه کردن تری کلرواستیک اسید ۱۰ (درصدوزنی/حجمی) متوقف شد.

مخلوط بدست آمده پس از گذشت ۳۰ دقیقه در حمام بخار ۳۷ درجه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و فازرویی حاصل با بیکربنات سدیم و معرف فولین کولین به دقت مخلوط و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در حمام بخار ۳۷ درجه، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس جذب نمونه‌های حاصل درطول موج ۶۶۰ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای تهیه نمونه‌های کنترل منفی به روش فوق انجام شد با این تفاوت که آنزیم پس از افزودن محلول TCA به سوبسترا اضافه شد. فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده نمونه‌های مورد ارزیابی و با توجه به معادله منحنی استاندارد تیروزین محاسبه گردید.

واحد فعالیت آنزیم به ازای هرمیلی لیتر (unit /ml) برابر است با مقدار آنزیمی که در یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل کند(۱۸)

منحنی استاندارد تیروزین

محلول تیروزین با غلظت۱/۱ میلی مولار تهیه و سپس رقت‌های مختلف تیروزین از محلول اولیه آماده شد. سپس به۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت تهیه شده ۰/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار اضافه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر معرف ۰/۵ نرمال Folin & Ciolcaltea's افزوده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانش و بر اساس مقدار جذب، منحنی استاندارد تعیین غلظت تیروزین برحسب جذب نوری ترسیم گردید. با استفاده از معادله حاصله، غلظت تیروزین در نمونه‌های سنجش کمی فعالیت آنزیمی محاسبه شد

نتایج

نتیجه تعیین غلظت پروتئین زهر مار به روش لوری

با استفاده از پروتئین استاندارد BSA و تهیه غلظت‌های مختلف از آن و اندازه‌گیری طول موج آنها در ۷۵۰ نانومتر، منحنی استاندارد غلظت پروتئین بر حسب OD رسم شد (شکل۱) و غلظت پروتئین زهر مار بدست آمد که مقدار آن برابر با ۰/۹۵ mg/ml محاسبه گردید.

نتیجه الکتروفورز SDS-PAGE ۱۵٪

الکتروفوز کوچک ۱۵٪ تهیه و ژل با استفاده از کوماسی بلو و نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. در این ژل شش باند مشاهده گردید که با محاسبه Rf و رسم منحنی مربوطه که بر حسب Rf پروتئین‌های مارکر و لگاریتم جرم مولکولی پروتئین‌های مارکر به دست آمد، وزن مولکولی پروتئین‌های زهر مار در این محدوده از ژل به دست آمد.

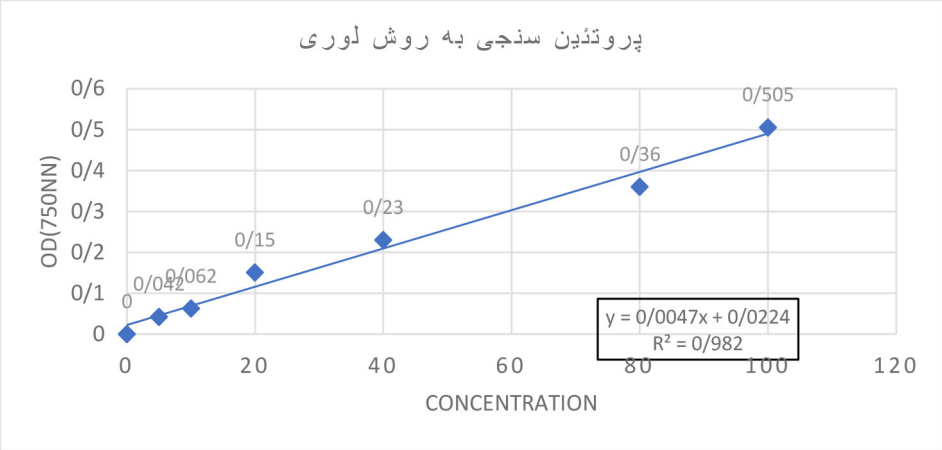
نتایج الکتروفورز *Native-page* کازیین زیموگرافی

الکتروفوز کوچک ۱۵٪ تهیه و ژل با استفاده از کوماسی بلو و نیترات زیموگرافی در واقع نوع خاصی از الکتروفورز است که در طی آن ژل پلی اکریلامید با سوبسترای آنزیم کو-پلیمریزه می‌شود. به طور کلی روش زیموگرافی برای بررسی فعایت ماتریکس متالوپروتئازهایی نظیر کلاژنازها و ژلاتینازها و همچنین فاکتورهای فعال‌کننده پلاسمینوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از اتمام کار، محلول بافری حاوی آنزیم به ژل اضافه شده تا آنزیم در محل تجمع سوبسترا فعالیت کاتالیتیک خود را شروع نماید. پس از رنگ‌آمیزی و رنگ بری هاله‌های شفافی در محل تجمع سوبسترا ظاهر می‌شود که نشانگر فعالیت پروتئولیتیک آنزیم می‌باشد.

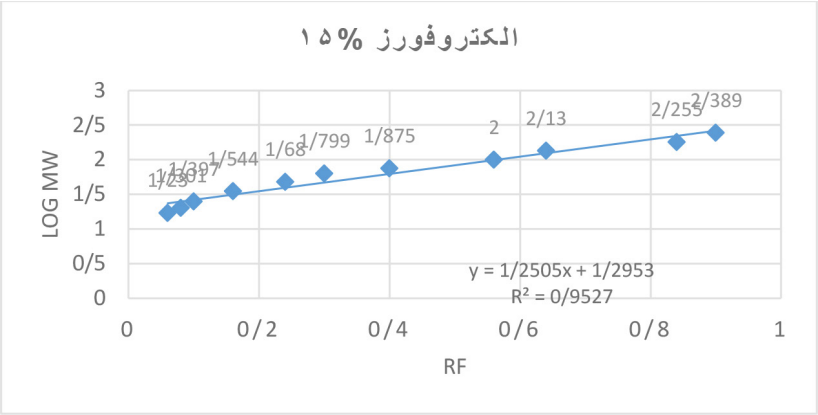
در این مرحله الکتروفورز زهر مار بر روی ژل Native انجام شد از آنجا که نمونه زهر خام به ژل تزریق شده بود نتایج حاصل از این ازمایش(زیموگرام) نشان داد که زهر مار شاخدار ایرانی از نواحی مختلـف دارای خاصیت پروتیولیتیک بوده و کازیین را هضم می‌کند و به عبارت دیگر حضور آنزیم پروتئاز در زهر مار شاخدار ایرانی را اثبات می‌کند(شکل ۴).

تعیین کمی آنزیم پروتئاز زهر مارشاخدار ایرانی

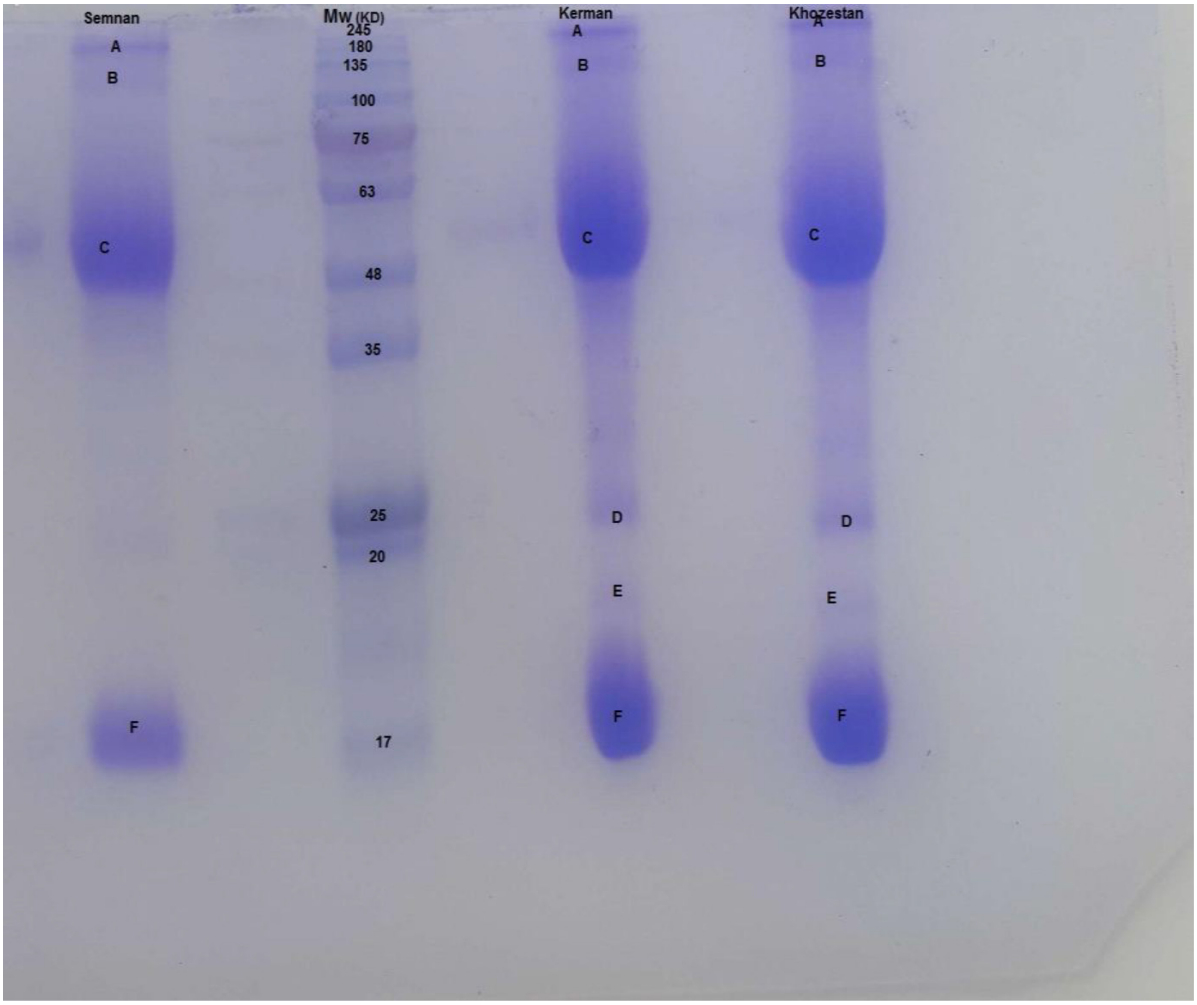
فعالیت کمی آنزیم پروتئاز زهر مارشاخدارایرانی بر اساس معادله نمودار استاندارد غلظت تیروزین (شکل ۵) محاسبه شده است.



شکل۱- منحنی استاندارد بر حسب غلظت های مختلف BSA و جذب نوری آن ها



شکل ۲- تعیین وزن مولکولی نمونه بر حسب RF پروتئین های مارکر و وزن مولکولی آن ها در الکتروفورز ٪ ۱۵



شکل ۳- تصویر ژل پس از انجام الکتروفورزSDS-PAGE ۱۵٪

زهر مارمنطقه سمنان : A =۱۹۰ B= ۱۳۰ C=۵۰ F= ۱۵

زهر مار منطقه کرمان و خوزستان : A =۱۹۰ B= ۱۳۰ C= ۵۰ D= ۲۵ E= ۱۹ F=۱۵

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده میزان پروتئین کل زهر مار شاخدار ایرانی ۰/۹۵ mg/ml ومحدوده وزن مولکولی پروتئین‌های زهر مار شاخدار ایرانی در نواحی ۱۵ تا ۱۹۰ کیلو دالتون بصورت ۶ باند گزارش گردید و بر این اساس فعالیت آنزیم پروتئاز موجود در زهر مار شاخدار ایرانی که به دو روش استاندارد و با بهره‌گیری از نمودار استاندار تیروزین محاسبه گردید بطوری که در شرایط دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH =۷/۵ میزان ۱۱/۵۶ u/ml بدست آمد.

بحث

طبق مطالعات وسیعی که توسط محققین در مناطق مختلف کشور صورت گرفته است بیش از ۲۱ گونه مار سمی و ۳۵ گونه مار غیرسمی در ایران زاد و ولد می‌کنند. (۷و۹) یکی از گونه‌های مارهای سمی ایران پسودو سراستس پرسیکوس Pseudocerastes-perrsicus یا مار شاخدار ایرانی است که از جنس PseuDoCerastes و از خانواده VipEride یا افعی‌ها

شکل ۴- ژل Native با سوبسترای کازئین (زیموگرام)

مارکر : M تریپسین : T خوزستان : Kh کرمان : Z سمنان : S

می‌باشد که در مناطق وسیعی از خاک ایران از جمله در شمال شرقی و شمال غربی مرکز جنوب و جنوب شرقی یافت می‌شود با پیشرفت علوم پایه پزشکی مطالعات فراوانی روی سموم مارهای مختلف صورت گرفته است و بعضی از محققین سعی نموده‌اند ارتباطی بین سمیت سموم با فعالیت‌های آنزیمی آن پیدا کنند. (۱۵و۱۷)

با توجه به اینکه مار شاخدار ایرانی مختص ایران و چند کشور همسایه می‌باشد و در کشورهای پیشرفته تحقیقی در مورد خواص بیولوژیک این زهر صورت نگرفته بررسی بر روی این زهر در دستور کار این پروژه قرارگرفت.

در همین راستا گزارش های بدست آمده از مطالعات پیشین به قرار زیر می‌باشد:

در تحقیقی که توسط طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۷۶ در ایران روی خواص بیولوژیکی زهر مار شاخدار ایرانی صورت گرفت، وزن مولکولی پروتئین‌های زهر ۳۸ تا ۸۲/۵ KD گزارش گردید و همچنین ایشان فعالیت فسفولیپاز A۲ را به روش Smith و روش Ouyang اندازه‌گیری و نتیجه آن را ۹۱ درصد اعلام نمودند(۲۲). قابل ذکر است که ایشان مطالعات اولیه‌ایی جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های این زهر داشتند که با تکمیل این مطالعات در بررسی حاضر وزن مولکولی زهر مار شاخدار ایرانی که از نواحی مختلف مورد بررسی قرارگرفت بین ۱۵ تا ۱۹۰ کیلو دالتون گزارش گردید، همچنین ایشان بررسی برروی خواص پروتئازی زهر انجام نداده بودند. بررسی روی پروتئین‌های زهر مار شاخدار به سال ۱۹۸۶ با مطالعات دانشمندانی از جمله AVNER BDOLAH بر می‌گردد که گزارشات او در نشریه Toxicon در خصوص محدوده‌ای از وزن مولکولی پروتئین‌ها از ۱۶تا ۲۰۰ کیلو دالتون بود که این گزارش با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد(۱). همچنین امینی نسب و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در FEBS Lett مطالعاتی در خصوص انواع زهرهای مار ازجمله مار شاخدار ایرانی داشته‌اند که البته پپتیدهای زهر را از جهت اسیدهای آمینه مورد مطالعه قراردادند و مطالعه ایشان در راستای بررسی پروتئازی این زهر نبوده است (۲).

مطالعاتی در خصوص جداسازی و اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی در سم مار جعفری در سال ۲۰۱۴ توسط Volodymyr Chernyshenkoa و همکارانش انجام شده که رفتار پروتئازی را در زهر مارهای مورد مطالعه ایشان، ثابت می‌کرد و نتایج آن در مجله Biochimie چاپ شده است(۲۳). در این پروژه از مطالعات سایر اندیشمندان که در جهت به اثبات رساندن فعالیت پروتئازی در زهر انواع مارهای مختلف فعالیت نموده بودند بهره‌گیری شده است. از جمله فعالیت‌هایی که در ایران آقای قربان پور و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام دادند و مطالعاتشان رادر مجله J. Venom. Anim. Toxins چاپ نمودند که البته این مطالعات بر روی اندازه‌گیری سرین پروتئاز بر روی زهر نوعی مار افعی بود (۷) و همچنین از مطالعات Vaiya Puri و همکارانش که در سال ۲۰۱۱ در مجله J. Pone چاپ شده که سرین پروتئاز را در زهر نوعی مار gabonica مورد بررسی قرارداده اند (۲۱). همچنین از مطالب Zaqueo و همکارانش در مقاله چاپ شده در سال ۲۰۱۴ در Biomed Res Int که به خصوصیات پروتئازی در زهر مار pirajai اشاره می‌کند (۲۴). البته مطالعات ایشان هریک در خصوص مارهای از گونه‌های دیگری بوده که در این خصوص

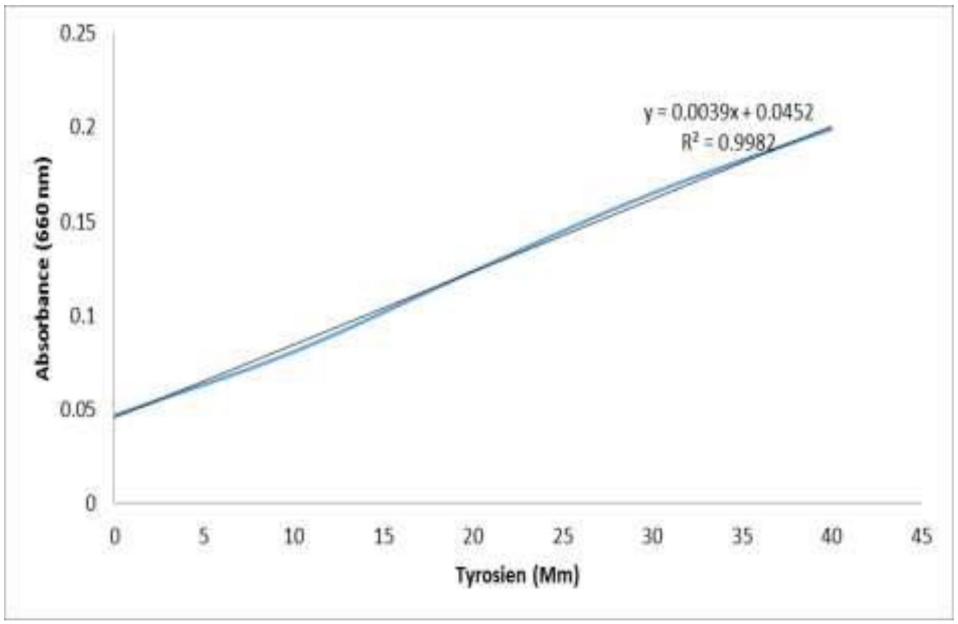
از تجربیاتشان در مورد گونه مار شاخدار ایرانی استفاده شد. در خصوص تایید فعالیت پروتئازی در زهر مار می‌توان از کارهای پونکه (Ponce) در سال ۲۰۰۷ که با ترکیبی از روش‌های ژل کروماتوگرافی بر روی Superdex۷۵ و کروماتوگرافی با بازده بالا بر روی I-BondapackC۱۸، آنزیم شبه ترومبین ۴-BaIII را از زهرمار Bothrops Atrox جداسازی نمود. وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده ۳۳/۰۸ KD تخمین زده شد. توالی اسید آمینه ۴-BaIII و پارامترهای کلینیکی آن نیز مشخص شد. با روش‌های متداول معمولا آنزیم شبه ترومبین ۱٪ از زهر را تشکیل می‌دهد. در حالی که پونکه با این روش ۱/۲۵٪ آنزیم را از زهر جداسازی نموده است. (۱۶)

Silva و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ ذکر نمود با ترکیبی از روش های افینیتی کروماتوگرافی بر روی P-Aminob Enzamidie-Agarose و ژل کروماتوگرافی با بازده بالا بر روی Shin Pack ۱۵۰-Diol، یک آنزیم شبه ترومبین با عنوان ۴۸-BJ را از زهرمار Bothrops Iararacussu جداسازی نمودندو وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده را ۵۲ KD تخمین زدند.(۱۹)

Magalhaes و همکارانش در سال ۲۰۰۷ یک آنزیم شبه ترومبین با عنوان ieuc را از زهر مار Bothrops Jararacussu جداسازی نمودند که برای جداسازی از یک روش سه مرحله‌ای شامل ژل کروماتوگرافی بر روی ۲۰-Sepha Cryl S ، افینیتی کروماتوگرافی بر روی Sepharose-Agmatine و در نهایت کروماتوگرافی تبادل یونی بر روی ۶BDEAE--CL Sepharose استفاده نمود. وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده ۳۵KD تخمین زده شد.(۱۲)

همچنین در سال ۲۰۱۵ Silva MF و همکارانشان در مقاله‌ای که در مجله Toxin چاپ نموده‌اند تحقیقات وسیعی برروی زهر خام O.bauri انجام داده‌اند که در این تحقیقات ویژگی‌های بیولوژیکی و آنزیمی را توصیف نموده‌اند و نشان داده‌اند که آنزیم‌های متعلق به فیبرینوژناز با فعالیت‌های چند منظوره همولیتیک وپروتئازی و فعالیت ضدمیکروبی و ضد انگلی را دارا می‌باشند (۲۰). Etsuko Oyama و همکارانش در سال ۲۰۱۷ مطالعاتشان را در نشریه Molecules در خصوص بررسی روی پروتئاز موجود در زهر چند نوع مار به چاپ رسانده‌اند که بررسی ایشان و نحوه تعیین رفتار پروتئازی زهر مارهای موردمطالعه ایشان همسویی مشخصی با بررسی رفتار پروتئازی در زهر مارشاخدار مورد ارزیابی در این تحقیق نشان داد(۸).

در مطالعه‌ای که بر روی زهرمار شاخدار ایرانی انجام گرفت، میزان پروتئن بدست آمده از زهر مارشاخدار در سه منطقه مورد مطالعه (سمنان ، کرمان و خوزستان) مقدار ۰/۹۵ mg/ml تعیین شد و نتایج حاصل ازالکتروفورز با ژل SDS- PAGE ۱۵٪ تعداد ۶ باند پروتئینی را نشان داد که در نواحی ۱۵ کیلو دالتون تا ۱۹۰ کیلو دالتون بودند مقایسه این سه منطقه از جهت پروفایل پروتئینی بسیار نزدیک بودند فعالیت پروتئولیتیک زهر مار شاخدار ایرانی در این مناطق مورد بررسی قرار گرفته و حضور آنزیم پروتئاز با روش هضم کازئین تایید گردید که با مطالعات سایر دانشمندان همخوانی دارد. همچنین فعالیت آنزیم پروتئاز با دو روش استفاده از سوبسترای BAPNA و سوبسترای کازئین به میزان ۱۱/۵۶ U/ml بدست آمد که میزان قابل ملاحظه‌ای بوده و با نسبت



شکل ۵- منحنی استاندارد تیروزین

فعالیت پروتئازی در زهر سایر گونه‌های ماری که دانشمندان پیشین گزارش نموده‌اند همخوانی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقاتی واکسن وسرم سازی رازی می‌باشد، لذا نویسندگان این مقاله از همه همکاران بخش تحقیقاتی پروتئومیکس وبیوشیمی و بخش تولیدی جانوران سمی که به شکل مستقیم و غیر مستقیم در مراحل انجام فعالیت‌های این پژوهش همکاری داشتند کمال تشکر وقدر دانی را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Avner Bdolah, 1986. Comparison of venoms from two subspecies of the false horned viper Pseudocerastes persicus. Toxicon ,Volume 24, Issue 7, 1986, Pages 726-729 https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90036-X

2. Amininasab M, Elmi MM, Endlich N, Endlich K, Parekh N, Naderi-Manesh H, Schaller J, Mostafavi H, Sattler M, Sarbolouki MN, Muhle-Goll C. 2004. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of Pseudocerastes persicus. *FEBS Lett* . 16;557(1-3):104-8. PMID: 14741349 DOI: 10.1016/s0014-5793(03)01455-8

3. Broadley CM. 1968.The venemous snakes in Central and South Africa. In: Bücherl, W, Buckley E, Deulofeu V (eds) Venomous Animals and Their Venoms. Academic Press, New York, London4: 433-436.

4. Denis V. Anderade and Augusto S.1999. Relationship of venom ontogeny and diet in Bothrops. Departamento de Zoologia 200-204. http://w.w.w.jstor.org/stable/3893080.

5. Erlanger. B,F ,.Kokowsky., N and Cohen,. W. 1961,. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics Volume* 95, Issue 2, 271-278 https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X

6. Gabriela D. Tanaka, Maria de Fa ´tima D. Furtado, Fernanda C. V. Portaro, Osvaldo Augusto Sant'Anna1, Denise V. Tambourgi. 2010. Diversity of Micrurus Snake Species Related to Their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. *journal. pntd.* Volume 4 Issue 3. DOI:10.137/journal.pntd.0000622.

7. Ghorbanpur M, Zare M A, Zokeef, Zolfagarrian H, 2010, indentification and partial purify ication of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake agkistrodonhalys, J. Venom. Anim. Toxins incl. *Trop. Dis vol.*16 no. http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010005000005

8. Etsuko Oyama, Hidenobu Takahashi,2017. Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan. *Molecules* 22,1305: 2-11 DOI:10.3390/molecules22081305

9. Golchinfar, F. Madani, Rasool. Emami, T. 2015. Designing a competitive ELISA for evaluation of anti-snake venom serum potency. *Veterinary journal* (pajuhesh & sazandegi). 110: 9-16

10. Hsiang A, Davis M. 2015. The origin of snakes : revealing the ecology, behavior and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomenics and the fossil record. B*MC Evolutionary Biology,* 15:87.
http://doi.org/10.1186/s12862-015-0358-5.

11. Koh, DC; Armagun, A; Jeaseelan, K. 2006. Snake venom components and their applications biomedicine. *cell* 63: 3030-41. PMID:17103111 DOI:10.1007/s00018-006-6315-0

12. Magalhães A1, Magalhães HP, Richardson M, Gontijo S, Ferreira RN, Almeida AP, Sanchez EF.2007 Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of Bothrops leucurus. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. ;146(4):565-75. PMID: 16481207
DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.12.033

13. Mary Ann K, Markwell, Suzanne M. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in memberan and lipoprotein samples. 87:206-210. http://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9.

14. Nalbantsoy,A; Karabay-Yavasoglu, NU; Sayim, F; Deliloglu-Gurhan, I; Arikan, H; Yildiz, MZ. 2012. Determination of in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity of venom from the Cypriot blunt-nosed viper Macrovipera lebetina lebetina and antivenom production.Vol.18: 208-216.
http://dx.doi.org/10.1590/s1678-91992012000200011.

15. Oukkache, N.; Lalaoui, M.; Ghalim, N. 2012. General characterization of venom from the Moroccan snakes Macrovipera mauretanica and Cerastes cerastes. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis* 18: 411–420.
http://dx.doi.org/10.1590/s1678-91992012000400009.

16. Ponce-Soto LA1, Bonfim VL, Novello JC, Navarro Oviedo R, Yarlequé Chocas A, Marangoni S. 2007 Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian Bothrops atrox venom. Protein J. 2;26(6):387-94. PMID: 17522968 DOI: 10.1007/s10930-007-9078-z

17. RanaWaka, David G, Lallo and H Janaka de silva. 2013. Neuro*toxicity in snake bite.* Oct:e2302. Vol.7(10).
PMCID:PMC3794919. DOI:10.1371/Journal.pntd.0002302.

18. Rm Kini . 2005. Structure – function relationships and mechanism anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon*. Elsevier. 45(8):1147-61 PMID:15922780.
DOI:10.1016/j.toxicon.2005.02.018.

19. Silva-Junior F P, Guedes HLM, Garvey L C, Bourguignonc, Enrico DC, Salvatore GDS, 2007, BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermos stability and active site accessibility., *toxicon* 50(1):18-31. PMID: 17433397 DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.02.018

20. Silva MF, Mota CM, Miranda Vdos S, Cunha Ade O, Silva MC, Naves KS, de Oliveira F, Silva DA, Mineo TW, Santiago FM. 2015. Biological and Enzymatic Characterization of Proteases from Crude Venom of the Ant Odontomachus bauri. *Toxins* (Basel). 30;7(12):5114-28. doi: 10.3390/toxins7124869. PMID: 26703729

21. Vaiyapuri S1, Wagstaff SC, Harrison RA, Gibbins JM, Hutchinson EG.. 2011
Evolutionary Analysis of Novel Serine Proteases in the Venom Gland Transcriptome of Bitis gabonica rhinoceros. *PLoS One*. 6(6):e21532. doi: 10.1371/journal.pone.0021532.

22. Tabatabaei,M. Toofani, M. 2001. Determination of biological characteristics of Persian horned viper venom. 0ffice of planning & coordination of research affairs.p:2-6.cod:19609.

23. Volodymyr Chernyshenkoa.,Tetyana Platonovaa., Yevgen Makogonenkoa., Andriy Rebrieva., Lyuba Mikhalovskab., Tamara Chernyshenkoa Serhiy., Komisarenkoa.2014 . Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the Echis multisquamatis snake venom. *Biochimie*. Volume 105: 76-83, https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.015

24. Zaqueo KD, Kayano AM, Simões-Silva R, Moreira-Dill LS, Fernandes CF, Fuly AL, Maltarollo VG, Honório KM, da Silva SL, Acosta G, Caballol MA, de Oliveira E, Albericio F, Calderon LA, Soares AM, Stábeli RG.2014 . Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from Bothrops pirajai snake venom. *Biomed Res Int*. 595186. doi: 10.1155/2014/595186 PMID: 24719874.