مقایسه فراکسیون های سمی زهر نماتوسیت عروس دریایی خلیج فارس با دو روش کروماتوگرافی

مریم پرویز[۱]، یدالله نیکپور قنواتی*[۱]، احمد تقوی مقدم[۲]،کمال غانمی[۱]

۱. گروه شیمی دریا دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم دریایی خرمشهر
۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۱۱

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2017.14761

چکیده

در این مطالعه، جداسازی فراکشن‌های سمی زهر نماتوسیت عروس دریایی *Crambionella orsini*، که از گونه‌های رایج در خلیج فارس است، با دو روش متفاوت کروماتوگرافی آنیونی و ژل فیلتراسیون انجام شد و سپس هر دو کروماتوگرافی مقایسه شد. سم این گونه از عروس دریایی، همانند گونه‌های دیگر خاصیت همولیتیک دارد. پس از فرایند استخراج سم از نماتوسیت‌های موجود در تنتاکول‌ها و لبه‌های چتر این گونه، سم خام به دست آمده از دو روش کروماتوگرافی با سفادکس G-200 و رزین آنیونی DEAE به صورت جزئی خالص‌سازی شد. در هر مرحله از فرایند فراکشن‌گیری، جذب هر فراکشن به دست آمده در ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و سپس برای مشخص شدن فراکشن سمی هر فراکشن به ۳ موش معمولی از طریق رگ دمی تزریق شد و در نهایت داده‌های حاصل شده از هر دو نحوه کروماتوگرافی با هم مقایسه شد.نتایج نشان داد که در مورد کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون فرکشن دوم به دست آمده سمی بود و در مورد کروماتوگرافی آنیونی فراکشن اول و دوم خاصیت همولیتیکی داشت.

تعیین روش مناسب برای خالص‌سازی این زهر نماتوسیت، می‌تواند به یافتن یک روش جامع برای خالص‌سازی سموم دریایی به خصوص عروس دریایی کمک بالقوه‌ای کند؛ همچنین می‌تواند منجر به یافتن یک پادزهر اختصاصی در روند گزش عروس دریایی این گونه نماید.

واژه‌های کلیدی: عروس دریایی، نماتوسیت، کروماتوگرافی ژل سفادکس، کروماتوگرافی تعویض یونی، فرکشن.

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: nikpour.kmsu@gmail.com

۱. مقدمه

عروس دریایی گونه *Crambionella orsini* که از خانواده *Catostylidae* است در آب‌های خلیج فارس پراکنده است و تا به حال چندین مورد از گزش آن‌ها گزارش‌شده‌است. با جداسازی و خالص‌سازی اجزای سمی این عروس دریایی می‌توان پادزهر اختصاصی آن را تهیه کرد و به بیمارانی که دچار گزیدگی شده‌اند، خدمات پزشکی بهتر و موثرتری ارائه داد. بنابراین ،هدف از این مطالعه، یافتن روشی بهتر برای انجام خالص‌سازی این سم در بین روش‌های رایج و یک مقایسه کلی از دو روش کروماتوگرافی ذکر شده برای استفاده در مطالعات آینده در این زمینه خواهد بود. با توجه به کم بودن مقدار زهر در نماتوسیت، جداسازی و خالص‌سازی آن کاری دشواراست. در حال حاضر خالص‌سازی پروتئین‌های زیست فعال با اثرات قلبی و عروقی از این سموم هنوز در انتظار دستیابی به موفقیت بزرگ در زمینه تجهیزات فنی است (Bailey et al., 2005; Noguchi et al., 2005; Kintner et al., 2005). به طور کلی گزش عروس دریایی سبب درد موضعی، انقباض ماهیچه‌ای و حتی در گزش برخی گونه‌ها سبب واکنش‌های سیستماتیک مانند شوک ، مشکلات تنفسی، مشکلات قلبی عروقی و گاهی حتی با اثرات مهلک همراه است (Burnett, 2001). سیندوسیت‌های تخصصی در تنتاکول‌های عروس دریایی به عنوان نماتوسیت شناخته می‌شوند. نماتوسیت‌ها مخزن اولیه‌ی سم عروس دریایی هستند و در صورت تماس مستقیم، این نماتوسیت‌ها سم شان را به بدن قربانی(انسان و یا حیوان) تخلیه می‌کنند و باعث ایجاد عواقب مختلف می‌شوند. به عنوان یک سم پپتیدی، سم عروس دریایی طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی مثل فعالیت‌های همولیتیکی و آنزیمی را دارد که می‌تواند بر ماهیچه‌ها، اعصاب، تنفس و سیستم گردش خون اثر بگذارد و همچنین سبب نکروزهای پوستی شود(Baxter and Marr, 1969; Turner and Freeman, 1969) زهر نیدارین ممکن است شامل ترکیبات وازواکتیو مثل ۵-هیدروکسی تیپتامین (5HT)، کاتکول آمین‌ها، هیستامین، هیستامین آزاد و ترکیبات نئورواکتیو مثل آمونیوم ۴ تایی[1] و برخی آمینواسیدهای اصلی و پپتید-های کوچک و پروتئین‌هایی از جمله آنزیم‌ها، مثل پروتئاز، فسفولیپاز و یا عوامل لیز سلولی و همولیتیک باشد (Chung et al., 2001).

فراکشن‌های سمی زهر نماتوسیت عروس دریایی را می‌توان با استفاده از روش‌های الکتروفورز، کروماتوگرافی و همچنین فیلتراسیون بر روی ژل سفادکس از زهر عروس دریایی جدا کرد. وسیع‌ترین تکنیک خالص‌سازی برای زهر نماتوسیت عروس دریایی شامل استخراج سم در طی قرارگیری تنتاکول‌ها در آب دریا و به دنبال آن کروماتوگرافی ستونی است (Bloom et al., 1998; Brinkman and Burnell, 2008; Chung et al., 2001). از آنجا که طبق مطالعات دیگران سم نماتوسیت عروس دریایی کاربردهای متنوعی در زمینه‌های دارویی دارد؛ همچنین در مواردی هم مشاهده‌شده که این سم، قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی است(Cuiping et al., 2011) خالص‌سازی این سم یک قدم بزرگ در پیشبرد این هدف است ، از این رو هدف از این مطالعه مقایسه دو روش کروماتوگرافی معمول در فرایند خالص‌سازی این سم است تا روشی صحیح و تاحدودی جامع را برای این فرایند پیشنهاد کند.

۲. مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی بکار رفته در این تحقیق، از نوع مرک آلمان ودرجه آنالیتیکال بوده، ژل‌های

[1] quaternary ammonium

سفادکس– G-200 ورزین تعویض یونی تولید کارخانه فارما سیا سوئد بودند.

عروس دریایی *crambionella orsini* در تیرماه ۱۳۹۴ از مصب رودخانه اروند جمع‌آوری و همراه با مقداری از آب همان منطقه در یک ظرف محتوی یخ نگهداری، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. تنتاکول‌ها و لبه‌های چتر به صورت دستی جدا گردید و در آب دریا که همراه با صید عروس دریایی از همان ناحیه نمونه‌برداری شده بود، در شیشه‌های دربسته به مدت ۴ روز در دمای ۴ درجه نگهداری شد و روزی ۴ نوبت شیشه‌ها تکان‌داده‌شدند. پس از مدت‌زمان ۴ روز تنتاکول‌ها و لبه‌های چتر دور ریخته شد و محلول از یک صافی معمولی عبور داده‌شد و محلول زیر صافی برای وجود نماتوسیت‌ها توسط میکروسکوپ AFM با بزرگنمایی ۲۰۰× بررسی شد، سپس محلول حاوی نماتوسیت‌ها فریز درایر و در فریزر 70- نگهداری شد. نمونه‌های فریزدرایر شده با نسبت ۱:۶ در آب دیونیزه حل و برای شکافت دیواره‌های نماتوسیت‌ها، سه نوبت در دوره‌های ۲۰ ثانیه‌ای سونیکات شد و در بین هر دوره، به مدت ۱ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. شکافت دیواره‌های نماتوسیت‌ها به صورت میکروسکوپی تا زمان تکمیل فرایند بررسی شد سپس محلول به‌دست‌آمده برای ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد درg ۲۰۰۰× سانتریفیوژ شد. نمونه‌های سانتریفیوژ شده در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شدند(Bloom et al., 1998)

برای انجام ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-200، ابتدا ستون شیشه‌ای با ابعاد ۱/۵×۳۰ سانتیمتر انتخاب و با سفادکس G-200 که به خوبی متورم شده بود، پر شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت بافر فسفات 0/05 مولار با pH=7.2 از روی ژل عبورداده‌شد تا ستون کاملا آماده جداسازی شود. سپس ۱.۵ میلی‌لیتر از سم خام ذخیره شده بر روی ژل بارگذاری شد و با سرعت 6 ml/hr توسط بافر فسفات اولیه در حجم‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در ۶۴ لوله آزمایش با استفاده از دستگاه فرکشن-کولکتور جداسازی و جمع آوری شد. سپس جذب لوله توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب لوله‌ها در برابر شماره آن‌ها رسم شد (Bloom et al., 1998). (نمودار ۱). محتویات لوله-هایی که مربوط به هر فرکشن بود، مخلوط شد و برای تعیین خاصیت همولیتیک از هرکدام از فرکشن‌ها به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ۲ موش از طریق رگ دمی تزریق شد. موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در قفس نگهداری شدند تا به طور قطع کشنده بودن فراکسیون-ها مشاهده شود.

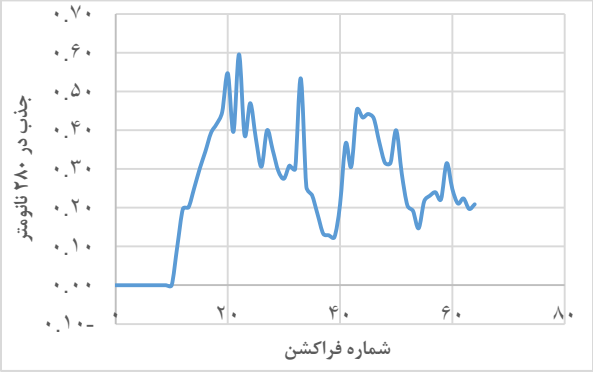
سم خام استخراج شده به‌وسیله کیسه دیالیز با molecular weight cut-off برابر با ۳۵۰۰ کیلودالتون درمقابل 20Mm تریس باز، 20Mm تریسین، 10mM کلرید کلسیم با pH=8/9 به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد دیالیز شد. سپس رزین DEAE را در آب ریخته تا به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسید. پس از آنکه رزین ته‌نشین شد، محلول رویی را به راحتی می‌توان جدا کرد. برای تزریق رزین به ستون یک تکه کاغذ صافی در انتهای ستون قرار گرفت تا در حین ریختن رزین در ستون، رزین از انتهای آن خارج نشود. سپس در حدود 1/3 ستون آب ریخته شد و رزین به ستون تزریق شد. بافر اولیه این ستون، همان بافر استفاده شده در فرایند دیالیز است که pH آن روی ۸/۹ تنظیم شد. سپس در حدود ۵ میلی‌لیتر از سم خام دیالیز شده با سرعت ۶ میلی‌لیتر درساعت و ۱ میلی‌لیتر در هر لوله بر روی ستون بارگذاری شد. جهت افزایش قدرت یونی از گرادیان نمک NaCl به صورت step-wise استفاده شد، به این صورت که پس از آن‌که ستون با بافر اولیه به تعادل رسید، از محلول‌های نمک NaCl با غلظت‌های 0/1M ، 0/2M ، 0/3M و 2M برای شویش ستون استفاده شد. تمام لوله‌ها پس از فراکشن‌گیری بر روی

یخ قرار گرفتند(Chung et al., 2001; Li et al., 2013) جذب لوله‌ها توسط اسپکتروفتومتر uv ویزیبل در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده‌شد. لوله‌ها ی مربوط به هر فرکشن با هم مخلوط شد و از هرکدام از فرکشن‌ها 0/5 میلی‌لیتر به دو موش از طریق رگ دمی تزریق شد.

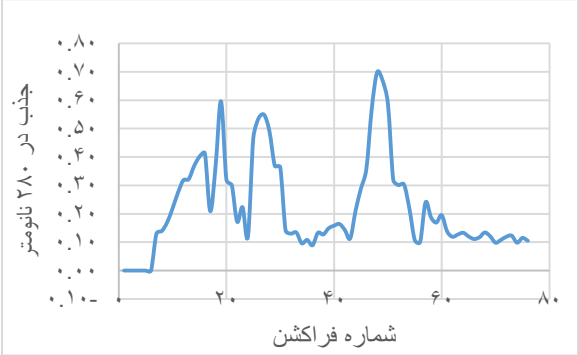
۳. نتایج

آنالیز پروتئینی فراکشن‌های به‌دست‌آمده از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون G-200 نشان داد که بیشترین مقدار جذب برای لوله‌های 21 تا ۲۳ بوده‌است. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان‌داده‌شده‌است، این لوله‌ها نماینده فراکشن شماره ۲ در بین ۱۲ فرکشن به‌دست-آمده از این ستون هستند. پس از تزریق فرکشن‌ها به موش‌ها و بررسی اثر آنها بر روی موش‌ها در نهایت فراکسیون سمی که سبب مردن موش می‌شد شناسایی شد. ملاک سمی بودن فراکشن‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه، کشنده بودن فراکشن برای موش نرمال بوده است، که در این مورد فراکشن شماره ۲ که دارای بیشترین جذب در بین فراکشن‌های به دست آمده بود، به عنوان فراکشن سمی شناسایی شد. جهت اطمینان از کشنده بودن فراکشن و اطمینان از این که حضور بافرها باعث کشندگی نشده است، خود بافر به تنهایی به موش تزریق شد و مشاهده شد که موش‌ها زنده ماندند.

همین فرایند برای فرکشن‌های به‌دست‌آمده از کروماتوگرافی آنیونی هم تکرار شد (نمودار ۲). طبق نتایج به‌دست‌آمده، مشاهده شد که در مورد کروماتوگرافی آنیونی ۸ پیک به‌دست‌آمد که بزرگترین پیک مربوط به فرکشن ششم بوده است و بعد از تزریق فرکشن‌ها به موش‌ها مشاهده شد که بعد از ۵ دقیقه موش‌هایی که فرکشن اول و دوم به آنها تزریق شده است هر دو ابتدا فلج شده و سپس مردند. برای اطمینان از سمی نبودن بقیه فرکشن‌ها، موش‌هایی که فرکشن‌های دیگر به آن‌ها تزریق شده بود، به مدت ۲۴ ساعت در قفس نگهداری شدند.



نمودار ۱- منحنی جذب در ۲۸۰ نانومتر برای فرکشن‌های به‌دست‌آمده از تزریق سم خام به ستون سفادکس



نمودار ۲- منحنی جذب در ۲۸۰ نانومتر برای فرکشن‌های به‌دست‌آمده از تزریق سم خام به ستون آنیونی

جدول ۱- مقایسه پایداری فرکشن سمی در رقت های مختلف

نسبت غلظتی	درصد همولیز ستون آنیونی	درصد همولیز ستون سفادکس	درصد همولیز سم خام
۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۵	۳۰	۴۰	۹۰
۰/۲۵	۰	۲۰	۴۰
۰/۱۲۵	۰	۰	۰
۰/۰۶۲۵	۰	۰	۰

برای فرکشن‌هایی که خاصیت همولیتیک داشته‌اند و از ستون‌های سفادکس و آنیونی به دست آمدند و همچنین سم خام رقت‌سازی سریالی صورت گرفت و طبق جدول ۱ مشاهده‌شد که فرکشنی که از ستون

آنیونی به‌دست‌آمد، در غلظت‌های بسیار پایین هم توانسته است خصلت همولیتیکی خود را هرچند محدود، حفظ کند و در سلول‌های قرمز خونی گوسفند لیز سلولی ایجاد کند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

به طورکلی چند دلیل سبب می‌شود که مطالعه بر روی عروس دریایی با دشواری همراه باشد: اول اینکه سم عروس دریایی شامل مواد پروتئینی حساس است که تا حد زیادی مانع از شناسایی و جداسازی اجزا تشکیل-دهنده سم می‌شود. دوم این دلیل را می‌توان ذکر کرد که تکنیک‌های مورد استفاده برای استخراج سم از تنتاکول‌های عروس دریایی و یا حتی از کل حیوان سم را با کیفیت مشکوکی به دست می‌دهد زیرا بافت‌های غیر نماتوسیتی در عروس دریایی حاوی توکسین‌های متعددی است که آنها هیچ‌گاه به طعمه تزریق نمی‌شوند و نباید به عنوان یک جز از سم نماتوسیت درنظر گرفته شوند، سوم اینکه جمع آوری برخی از گونه‌های عروس دریایی مشکل است زیرا آن‌ها اندازه‌ی کوچک و طبیعتی گریزان دارند (Feng et al., 2010). در این مطالعه تمرکز ما بر دو روش عمده خالص‌سازی پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های همولیتیک عروس دریایی گونه خلیج فارس بوده‌است. در میان این دو روش، دیده‌شده که خالص‌سازی به‌وسیله ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-200 روش مفیدتری در جداسازی فرکشن سمی را در روند خالص‌سازی نشان می‌دهد؛ در مورد خالص‌سازی با این روش مشاهده شده‌است که پیک‌ها تیزتر و کاملا مجزا هستند؛ پس جداسازی فرکشن به صورت بسیار خوبی صورت گرفته است. اما درمورد فرکشن‌های حاصل از رزین آنیونی مشاهده شد که این فرکشن‌ها بازیابی بهتری در مورد خاصیت همولیتیک نسبت به فرکشن-های ژل فیلتراسیون نشان می‌دهند. مقایسه فعالیت همولیتیک برای رقیق سازی‌های سریالی در مورد فرکشن سمی به‌دست‌آمده از سم خام در هر دو روش ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی آنیونی نشان داد که بهترین برگشت‌پذیری برای فعالیت همولیتیک در مورد فرکشن‌های سمی به‌دست‌آمده از کروماتوگرافی آنیونی است. همچنین مشاهده‌شد پایداری فعالیت همولیتیک پس از خالص‌سازی نسبت به سم خام بهبود یافته است و می‌توان به این نتجه رسید که فرایند خالص‌سازی، علاوه بر جداسازی هرچه بهتر فرکشن سمی، به پایداری خصلت همولیتیک هم کمک می‌کند. از مقایسه هر ۲ فرایند می‌توان به این نتیجه رسید که در مورد این نوع عروس دریایی و گونه‌های مشابه روش خالص-سازی جزءبه‌جزء و کاملی را که می‌توان پیشنهاد داد، مشتمل بر هر دو نوع کروماتوگرافی خواهد بود؛ به این صورت که به دلیل آن‌که کروماتوگرافی اندازه‌ای جداسازی بهتر و مشخص‌تری را برای فرکشن همولیتیک ارائه می‌کند، به عنوان مرحله اول یک فرایند خالص‌سازی و کروماتوگرافی آنیونی به این دلیل که پس از فرایندهای رقیق شدن توانایی حفظ خصلت همولیتیک فرکشن سمی را داراست،به عنوان مرحله دوم فرایند، از آنجا که در این مرحله، فرکشن خالص شده‌ی حاصل از ستون اول تا حد زیادی در طی فرایند کروماتوگرافی رقیق شده است، استفاده شود.

منابع

Baxter, E. H. and Marr, A. G. M., 1969. Sea wasp (*Chironex fleckeri*) venom: lethal, haemolytic and dermonecrotic properties. Toxicon, 7(3): 195–210.

Bailey, P. M., Bakker, A. J., Seymour, J. E. and Wilce, J. A., 2005. A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish– *Chironex Fleckeri*, *Chiropsalmus*, 233–242.

Bloom, D. A., Burnett, J. W. and Alderslade, P., 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. Toxicon, 36(8): 1075–1085.

Brinkman, D. and Burnell, J., 2008. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri.* Toxicon, 51(5): 853–863.

Burnett, J. W., 2001. Medical aspects of jellyfish envenomation: pathogenesis, case reporting and therapy. In Jellyfish Blooms: Ecological and Societal Importance, 155: 1–9.

Chung, J. J., Ratnapala, L. A., Cooke, I. M. and Yanagihara, A. A., 2001. Partial purification and characterization of a hemolysin (*CAH1*) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. Toxicon, 39(7): 981–990.

Cuiping, L., Pengcheng, L., Jinhua, F., Rongfeng, L. and Huahua, Y., 2011. Cytotoxicity of the venom from the nematocysts of jellyfish *Cyanea nozakii Kishinouye*. Toxicology and Industrial Health, 28 (2):186-92.

Feng, J., Yu, H., Li, C., Xing, R., Liu, S., Wang, L. and Li, P., 201). Isolation and characterization of lethal proteins in nematocyst venom of the jellyfish *Cyanea nozakii Kishinouye*. Toxicon, 55(1): 118–125.

Kintner, A. H., Seymour, J. E. and Edwards, S. L., 2005. Variation in lethality and effects of two Australian chirodropid jellyfish venoms in fish. Toxicon, 46(6): 699–708.

Li, R., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Qing, Y., Li, K. and Li, P., 2013. Isolation and in vitro partial characterization of hemolytic proteins from the nematocyst venom of the jellyfish *Stomolophus meleagris.* Toxicology in Vitro, 27(6): 1620–1625.

Noguchi, K., Sakanashi, M., Matsuzaki, T., Nakasone, J., Sakanashi, M., Koyama, T. and Sakanashi, M., 2005. Cardiovascular effects and lethality of venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized rats. Toxicon, 45(4): 519–526.

Turner, R. J. and Freeman, S. E., 1969. Effects of *Chironex fleckeri* toxin on the isolated perfused guinea pig heart. Toxicon, *7*(4): 277–286.

Fractionation comparison of Persian Gulf jellyfish nematocyst venom by two methods of chromatography

M. Parviz[1], Y. Nikpoor Ghanavati *[1], A. Taghavi Moghadam [2], K. Ghanemi [1]

1. Department of Marine Chemistry, College of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University.
2. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Ahvaz, Iran.

Abstract

In this paper, the nematocyst venom of the crambionella orsini jellyfish was fractionated by size-exclusion and anion-exchange chromatography. Crambionella orsini is a jellyfish common to the Persian Gulf. The results of the mentioned methods have been investigated. The crambionella orsini's venom has a hemolytic effect, which is similar to the other species.

After the extraction of the nematocyst venom, the crude venom was partially purified using sephadex G-200 gel filtration and DEAE anion exchange chromatography. Protein elution was monitored by UV detection at 28 ۰nm. To determine the hemolytic fraction, every fraction was injected to 3 mice via their tail vein. Finally, all the data from both chromatography methods were compared. The gel filtrations second fraction and the first and second fractions of the anion exchange chromatography showed hemolytic activity.

Determining an appropriate method for the purification of this venom can help find a comprehensive method for other marine venoms, especially jellyfish venoms, and may eventually help find specific antidotes for the stings of jellyfish of these species.

Keywords: jellyfish, nematocyst, gel filtration chromatography, anion exchange chromatography, crambionella orsini

Figure 1- absorbance in 280 nm for fractions that obtain from injection of crude venom to sephadex chromatography column

Figure 2- absorbance in 280 nm for fractions that obtain from injection of crude venom to anion exchange chromatography column

Table1- stability comparison of lethal fraction in different dilution

*Corresponding author, E-mail: nikpour.kmsu@gmail.com