جداسازی فراکسیون کشنده از سم عقرب آپیستوبوتوس سوسنی *(Apistobuthus sosane)*

- **بهزاد مسیحی‌پور***: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه جنوب غرب، اهواز
- **مسعود صالح‌مقدم**: دانشگاه پیام نور، مشهد
- **عباس زارع میرک‌آبادی**: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش جانوران سمی، کرج
- **شاهرخ نویدپور**: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش جانوران سمی، کرج
- **هادی ربیعی**: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش جانوران سمی، کرج

تاریخ دریافت: آذر۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۱

چکیده

در استان خوزستان عقرب‌هائی از سه خانوادهٔ بوتیده، اسکورپیونیده و همی‌سکورپیونیده وجود دارند. سموم عقرب‌ها به‌ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده دارای انواع نروتوکسین‌ها بوده که به‌طور اختصاصی با کانال‌های یونی مختلف در غشای سلول‌های تحریک‌پذیر واکنش می‌دهند. آپیستوبوتوس سوسنی از خانوادهٔ بوتیده بوده، عقربی زرد رنگ است که از مناطق ماسه‌ای و شنزارهای استان خوزستان صید گردیده است. اندازهٔ بالغ آن به بیش از ۱۰ سانتی‌متر نیز می‌رسد. وجه مشخص آن مدور بودن بند دوم دم است. هدف از انجام این تحقیق جداسازی و شناسائی فراکسیون کشنده از سم عقرب آیستوبوتوس سوسنی بود. بدین منظور جهت جمع‌آوری عقرب‌ها، آن‌ها در شب به کمک لامپ UV صید شدند، سپس سم آن‌ها به‌روش الکتروشوک تهیه و لیوفیلیزه گشت. سپس موکوپروتئین‌های سم جدا شد و LD_{50} سم خام و فراکسیون توکسیک، به‌روش اسپرمن کاربر بر روی موش‌های سوری ۲۰-۱۸ گرمی با تزریق به رگ دمی حیوان تعیین شد. به‌منظور جدا نمودن فراکسیون‌های کشنده، محلول سم بر روی ستون کروماتوگرافی سفادکس G ۵۰ برده شد که بعد از قرائت جذب لوله‌های جمع‌آوری شده با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر UV در ۲۸۰ نانومتر، فراکسیون‌های آن شناسائی گردید. با انجام الکتروفورسیس سم خام و فراکسیون کشنده در مجاورت مارکر، مشخص شد وزن مولکولی فراکسیون کشنده ٦ کیلو دالتون است.

کلمات کلیدی: عقرب، سم، آپیستوبوتوس سوسنی، پفراکسیون کشنده، سفادکس G۵۰

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: bmasihipour@yahoo.com

مقدمه

آپیستوبوتوس سوسنی عقربی زرد رنگ از عقرب‌های خانواده بوتیده بوده که به‌علت مدور بودن بند دوم دم در اولین نظر قابل تشخیص است و تاکنون فقط در چند نقطه از ایران گزارش شده است. اندازه جانور در حالت بلوغ به بیش از ۱۰ سانتی‌متر می‌رسد (۲۲). محل زیست این عقرب در مناطق ماسه‌ای و شن‌های روان در استان‌های ایلام (منطقه دشت عباس، شهرهای دهلران و موسیان) و در خوزستان (منطقه الباجی و ملاثانی شهرهای بستان، شوش، هویزه، دشت آزادگان و امیدیه) بوده که در این مناطق صید گردیده است.

هم‌اکنون در حدود ۱۵۰۰ گونه از عقرب‌ها شناسائی شده‌اند که از این میان ۵۰ گونه آن‌ها برای انسان خطرناک می‌باشند با این وجود عقرب‌زدگی یکی از مسائل مهم بهداشتی بوده و سالیانه صدها هزار انسان در دنیا به‌وسیله این جانور گزیده می‌شود (۱ و ۲۴). عوارض ناشی از سم عقرب در بدن بسیار متنوع می‌باشد به‌طوری‌که سم عقرب بر بدن بالغین وکودکان اثر می‌گذارد (۲۹). سم عقرب از عناصری مانند کربن، ئیدروژن، ازت و گوگرد تشکیل شده‌است. این ترکیب ماده‌ای پروتئینی بوده و در حالت تازگی و خلوص شفاف و بی‌رنگ، پودر آن سفید تا کرم روشن و کریستال آن زرد رنگ می‌باشد (۲). سم این بندپا ترکیبی از نروتوکسین‌ها و پپتیدهای غیرتوکسیک می‌باشد (۲۱). سم شامل پروتئین‌های مختلف توکسین و آنزیم می‌باشد. سم عقرب دارای ترکیباتی از ۵۰ تا ۱۰۰ توکسین پلی پپتیدی مختلف می‌باشد و بنابراین تقریباً یک میلیون پپتید متفاوت را می‌توان در این‌ها پیدا نمود (۲۶). فاکتورهای سمی شامل نروتوکسین‌ها هستند (۱۸ و ۲۸). پایداری نروتوکسین‌ها به‌دلیل پیوندهای دی‌سولفیدی است که آن‌ها را به‌صورت ساختمان‌های خیلی فشرده نگاه می‌دارد و به همین دلیل آن‌ها به تغییرات pH و دما مقاوم هستند. معرف‌هایی که بتوانند این پیوندها را بشکنند باعث باز شدن ساختمان سه بعدی آن‌ها می‌گردند و آن‌ها را غیرفعال می‌نمایند. قدرت آنتی‌ژنیکی این توکسین‌ها وابسته به طول و تعداد نواحی قابل دسترسی است که در ساختمان سه بعدی فرو رفته‌اند.

توکسین‌های سم عقرب براساس توانائی تاثیر بر روی کانال‌های یونی سلول به چهار گروه تقسیم می‌شوند (۲):

الف) توکسین‌های موثر بر کانال سدیمی(۳)، ب) توکسین‌های موثر بر کانال پتاسیم(۲۰)، ج) توکسین‌های موثر بر کانال کلسیمی و د) توکسین‌های موثر بر کانال کلر(۵)

مواد و روش‌ها

مراحل روش کار به‌ترتیب عبارتند از:

۱- تهیه سم خشک عقرب

۲- تعیین کشندگی (LD۵۰)

۳- آماده سازی سم خام

۴- فیلتراسیون ژل سفادکس G۵۰

۵- تعیین باندهای الکتروفورزسیس

تهیه سم خشک عقرب

با اعزام اکیپ‌های صید عقرب به مناطق ماسه‌ای استان خوزستان نسبت به صید این گونه عقرب در روز به طریقه حفاری و در شب با استفاده از لامپ UV اقدام گردید(۱۹)، سپس نمونه‌ها را به آزمایشگاه منتقل نموده و با کمک دستگاه الکتروشوک بعد از مهار عقرب، از غده سمی آن واقع در انتهای دم عقرب با شوک الکتریکی ۱۲ ولت، سم را استحصال نموده، سم حاصله بعد از فریزر نمودن با کمک دستگاه لیوفیلیزاتور خشک گردید.

تعیین کشندگی (LD۵۰)

براساس روش اسپرمن کاربر که بر روی موش‌های سوری ۲۰ – ۱۸ گرمی انجام شد، مقدار معینی از سم خام در آب مقطر حل گردید و سپس دوزهای مختلفی از آن تهیه و از طریق رگ دم به موش‌ها تزریق گشت. بعد از تزریق دوزهای مذکور (به هر موش ۰/۵ میلی‌لیتر)، مرگ و میر موش‌ها طی ۲۴ ساعت ثبت گردید. بعد از ثبت تلفات حاصل از تزریق دوزهای مختلف سم به حیوانات، LD۵۰ محاسبه شد.

LD۵۰ = ۱۰ /۸۳۵ µ۲/۱±g µ g / Mice

در ادامه میزان LD۵۰ برای فراکسیون Asf۲ نیز تعیین گردید: LD۵۰ = ۴/ ۳۰۸ ± ۰ /۴۶ µ g µ g / mice

نحوه محاسبه LD۵۰

$$X = \frac{\text{دوز کمتر از ٪50} - \text{دوز ٪50}}{\text{دوز کمتر از ٪50} - \text{دوز بالای ٪50}} \times \log 1/25$$

Y = دوز کمتراز ۵۰٪ log

Z= X + Y

LD۵۰ = Anti log Z

آماده سازی سم خام

جهت جدا نمودن موکوپروتئن‌ها از سم خام محلول سم را به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ نموده و محلول رویی جدا شد(۵).

فیلتراسیون ژل سفادکس G۵۰

به‌منظور انجام کروماتوگرافی ستونی، ژل فیلتراسیون یک ستون شیشه‌ای به ابعاد ۱۲۵ × ۳/۵ سانتی‌متر و حجم ۷۵۰ میلی‌لیتر انتخاب و با ژل سفادکس (Superfine) G۵۰ که قبلاً به‌مدت ۴۸ ساعت در بافر استات آمونیوم ۰/۱ مولار و pH =۸/۶ متورم شده بود، پر گردید. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت، بافر استات آمونیوم ۰/۱ مولار از روی آن عبور داده شد تا ستون شرایط لازم برای جداسازی را کسب کند (۲۳ و ۲۱). بعد از این مرحله، محلول سم به روی ستون برده شد و با سرعت جریان (Flow rate) ۶۰ میلی‌لیتر در ساعت توسط همان بافر شتشو داده شد. محلول خروجی در حجم ۹ میلی‌لیتر در ۱۲۰ لوله به‌وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک جمع‌آوری گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV قرائت شد و منحنی جذب برحسب حجم بافر خروجی رسم گردید. فراکسیون‌های مختلف در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. جهت شناسائی فراکسیون توکسیک، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کدام از فراکسیون‌ها در مقابل بافر آمونیوم استات به‌عنوان شاهد از طریق رگ دم به موش آزمایشگاهی تزریق گشت. فراکسسیون توکسیک حیوان بلافاصله کشت شد(۱۱). فراکسیون توکسیک، جهت تغلیظ و آماده شدن برای مراحل بعدی کروماتوگرافی کنار گذاشته شد. میزان پروتئین‌های موجود در هر مرحله به‌روش *lowry* اندازه‌گیری شد. در ادامه فراکسیون توکسیک حاصل خشک گردید.

تعیین باندهای الکتروفورزسیس

در انجام این پروژه بر طبق روش Laemmli، نمونه‌های سم خام، فراکسیون توکسیک به‌دست آمده از ستون G۵۰ درمقابل مارکر لام الکتروفورزی SDS Page تهیه گردید. در اینجا با توجه به نوع نمونه، سم عقرب و فراکسیون‌های سم، غلظت ژل جداکننده ۱۵٪ و غلظت ژل متراکم کننده ۴٪ و مارکر پروتئین Catalog no. ۱۶۱-۰۳۱۷ انتخاب شد. وزن مولکولی باندهای مارکر عبارت بودند از: ۲۰۰۰۰۰، ۱۱۶۲۵۰، ۹۷۴۰۰، ۶۶۲۰۰، ۴۵۰۰۰، ۳۱۰۰۰، ۲۱۵۰۰،۱۴۴۰۰، ۶۵۰۰ دالتون.

رنگ‌آمیزی ژل

در این تحقیق از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی آبی G-۲۵۰ کلوئیدی استفاده شد. در این روش زمینه ژل آنچنان رنگ نمی‌گیرد. حساسیت این روش در حدود ۲۰-۳۰ نانوگرم پروتئین در هر باند است و برای رنگ آمیزی پلی پپتیدهای کوچک روش مناسبی است (۲۷).

نتایج

با کمک اکیپ صید عقرب، تعداد ۷۲۸ عدد عقرب در شب با کمک لامپ جمع‌آوری و از آن‌ها با دستگاه الکتروشوک سم‌گیری شد که مجموعاً ۳/۴۷۷ گرم سم تر به‌دست آمد. از هر عدد عقرب به‌طور میانگین ۰۰۴۸ / ۰ گرم سم تر گرفته شد. سم حاصله، خشک شد که مقدار آن ۳۲/ ۰ گرم بود.

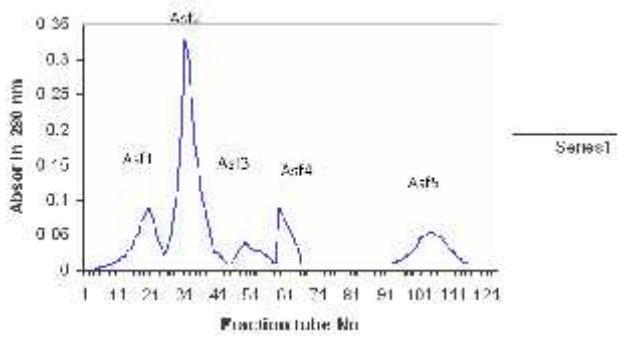
بعد از طی مراحل خالص‌سازی، میزان سم خالص ۰/۱۷۹۲ گرم و میزان موکوس ۰/۱۴۸ گرم به‌دست آمد. بنابراین میزان سم خالص تقریباً ۵۶٪ سم خام اولیه است.

LD۵۰

ابتدا LD۵۰ برای سم خام محاسبه شد. بدین نحو که دو دوز، حداقل (۴ ماکرو گرم)، که هیچ موشی نمیرد و حداکثر (۲۰ ماکرو گرم)، که ۱۰۰٪ موش‌ها کشته شوند،

ژل فیلتراسیون G۵۰

از سم خالص، پنج فراکسیون Asf۱، Asf۲، As۴۳، Asf۴ و Asf۵ به‌دست آمد (شکل ۱). نتایج نشان داد که Asf۲ فراکسیون کشنده است (جدول ۱) آمده است.



شکل۱ – نمودار ژل فیلتراسیون G۵۰ سم عقرب آیستوبوتوس سوسنی

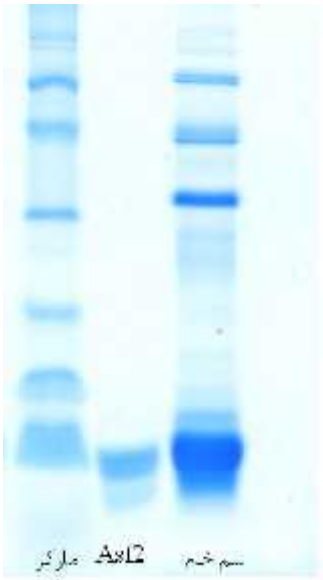
جدول ۱- بازدهی ژل فیلتراسیون G۵۰

مراحل تخلیص	فراکسیون	میزان پروتئین (میلی‌گرم)	درصد بازدهی بازدهی نسبت به ۳۲۰ میلی‌گرم پودر سم خام	LD۵۰ (میکروگرم/ موش)
استخراج و دیالیز	سم خام	۱۷۹/۲	۵۶٪	۱۰/۸۳۵
سفادکس G۵۰	Asf۱	۲۳/۸۶۵	۱۸٪/۲	*۴/۳۰۸
	Asf۲*	۴۹/۷۶۴	۳۶٪/۷	
	Asf۳	۱۱/۹۳۳	۹٪/۴	
	Asf۴	۲۲/۶۴۵	۱۶٪/۷	
	Asf۵	۲۰/۰۶۸	۱۷٪/۶	
	جمع کل	۱۳۵/۵۹۹	۹۴٪/۶	

* فراکسیون توکسیک

الکتروفورسیس

بررسی‌ها نشان داد که سم خام دارای دو باند ضعیف در محدوده ۱۱۰و ۱۱۵ هزار ذالتون، یک باند مشخص در ۹۸ هزار، یک باند ضعیف در ۶۴ هزار، یک باند قوی در ۵۰ هزار، دو باند در ۲۷و ۲۸ هزار، یکی در ۱۵ هزار، یک باند ضعیف در ۱۰ هزار، یک باند ضعیف در ۷۵۰۰ و یک باند قوی در محدوده ۵ تا ۶ هزار دالتون دارد. فراکسیون کشنده Asf۲، باند مشخص و قوی در محدوده ۶ هزار دالتون دارد(شکل ۲).



شکل۲- الکتروفورز سم خام و فراکسیون‌ها در مقابل مارکر

بحث

در این تحقیق سم به‌روش تحریک الکتریکی تهیه و لیوفیلیزه گردید. بدین منظور سم به همراهی موکوپروتئین‌هائی که مقدار آن بسته به گونه عقرب متفاوت می‌باشد، استحصال شد. در عقرب‌های ایرانی خانواده بوتیده، میزان موکوس درصدی از وزن سم خشک را تشکیل می‌دهد که جهت خالص‌سازی بایستی این مواد را حذف نمود. در این تحقیق میزان موکوس ۴۴٪ سم خشک برآورد گردید که شبیه به عقرب‌هائی از قبیل ادونتوبوتس و یا مزوبوتوس می‌باشد. البته نبایستی این نکته را از نظر دور داشت که سم حاصل از تحریک الکتریکی نسبت به روش سایش غده‌ها، کم‌ترین میزان موکوپروتئین‌ها را دارد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، مقادیر LD_{50} به‌دست آمده برای سموم عقرب‌های خانواده بوتیده تزریق شده به موش سوری، در آندرکتونوس کراسیکودا ۶/۴ میکروگرم/ موش، در مزوبوتوس اپیوس ۵۰-۳۰ میکروگرم/ موش و در ادنتوبوتوس دوریه، ۴۰-۳۵ میکروگرم/ موش است (۳۱) که در مقایسه با آپیستوبوتوس سوسنی که میزان آن ۱۰/۸۳ میکروگرم/ موش بود، نشان می‌دهد که LD_{50} سم عقرب آپیستوبوتوس سوسنی نزدیک به سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا می‌باشد. به‌نظر می‌رسد با توجه به این‌که هر دو گونه در یک منطقه‌اند و در یک خانواده نیز قرار می‌گیرند سم آن‌ها بایستی شباهت‌هایی با یکدیگر داشته باشند و از طرف دیگر نشان‌دهنده این امر است که حذف موکوپروتئین‌ها به‌خوبی صورت پذیرفته است. مقادیر LD_{50} برای توکسین‌های خالص شده به‌مراتب کم‌تر از سم خام می‌باشد که این به‌دلیل جدا شدن اجزای غیر سمی از ترکیبات توکسیک طی مراحل خالص‌سازی است. در این تحقیق نیز کاهش معنی‌دار عدد LD_{50} در Asf۲ نسبت به سم خام مشاهده گردید. این امر را در تحقیقی که زارع و همکاران بر روی گونه‌ای از عقرب ادونتوبوتوس انجام داده‌اند نیز می‌توان دید (۲۹). استفاده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G۵۰ در مرحله اول جداسازی سم عقرب‌ها، ۵ فراکسیون از سم خام را نشان داد که فراکسیون دوم Asf۲ که ۲۷/۸٪ از سم خام را تشکیل داده بود خاصیت کشندگی داشت. نتایج خالص‌سازی سم در این مرحله نشان‌دهنده تغلیظ فراکسیون توکسیک می‌باشد. تحقیقات انجام شده بر روی سم گونه‌های دیگر عقرب‌ها در کشور نیز باینگر این موضوع است که عقرب‌های خانواده بوتیده دارای یک و یا حداکثر دو فراکسیون توکسیک هستند (۲۱، ۲۲، ۲۵، ۲۹ و ۳۰). نتایج تحقیق اخیر موید این موضوع است که فراکسیون توکسیک کم‌تر از سی درصد سم خام را تشکیل می‌دهد. با خالص‌سازی بیش‌تر، میزان کشندگی سم افزایش یافته و LD_{50} عدد کمتری را نشان می‌دهد.

نتایج ژل الکتروفورسیس در سم خام عقرب آپیستوبوتوس سوسنی، حاکی از وجود پروتئین‌هایی در محدوده وزنی ۱۱۵ هزار دالتون تا ۵ هزار دالتون است. پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا، بیش‌تر شامل آنزیم‌های موجود در سم از قبیل هیالورونیداز و فسفولیپازها می‌باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهد مولکول‌های پپتیدی که خاصیت سمی دارند از نظر وزن مولکولی میزان پایینی حدود ۵ تا ۶ کیلو دالتون را در بین سایر مولکول‌های سم دارند.

این تحقیق نیز نشان داد که فراکسیون سمی Asf۲ ۶ کیلو دالتون دارد. به‌نظر می‌رسد که توکسین‌های کشنده با داشتن وزن مولکولی نزدیک به‌هم دارای شباهت‌های با یکدیگر باشند. حدود ۶۰٪ ردیف اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده توکسین‌های عقرب‌ها شبیه یکدیگرند. به‌همین دلیل در درمان عقرب‌گزیدگی از سرم پلی‌والان استفاده می‌شود و بر علیه تک‌تک گونه‌های عقرب، سرم ساخته نمی‌شود (۱۰).

تشکر و قدردانی

در خاتمه از دکتر سید شمس الدین قائم مقامی رئیس محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز و آقایان علی اکبر حبیب‌زاده، علیرضا بهمام، حمید بهرانی تکنسین‌های موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز هم‌چنین کارکنان بخش جانوران سمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج که در انجام این تحقیق همکاری داشته‌اند کمال تشکر و سپاس‌گذاری به عمل می‌آید.

منابع

۱. **Abid, N.S.; Guijarro, J.L.; Benkhalifa, Rym.; Manegazza, M.; Cheikh, A.; Ben Aissa, M.; Haumont, P.Y.; Delepierre, M. and El-Ayeb M., ۲۰۰۵.** A new type of scorpion Na+ channel toxin like polypeptide active on K+ channels. Biochem. J. ۳۸۸: ۴۵۵-۴۶۴.

۲. **Al-Asmari, A.k.; Al-Saif, A.A. and Abdo N.M., ۲۰۰۷.** Morphological identification of scorpion species from Jazan and Al–Munawara regions Saudi Arabia. J. venom. Aanim. Toxins Incle. Trop. Dis. Vol.۱۳, No. ۴, pp.۸۲۱-۸۴۳.

۳. **Badhe, R.V., ۲۰۰۶**. Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, coconsis, pocock) venoms from western and southern India. J. venom. Aanim. Toxins Incle. Trop. Dis. Vol.۱۲, No. ۴, pp.۶۱۲-۶۱۹.

۴. **Cestele, S.; Gordon, D.; Kopeyan, C. and Rochat, H., ۱۹۹۷.** Toxin III from *Leiurus quinquestriatus*: a specific probe for receptor site ۳ on insect sodium channel. Insect Biochem. Mol. Biol. Vol. ۲۷, ۶, ۵۲۳-۵۲۸.

۵. **Cohen, L.; Lipstein, N. and Gordon, D., ۲۰۰۶**.

scorpion toxin receptor sites on voltage – gated Na channels imply a novel role for weakly active components in arthropod venom. FASEB. J. Vol. ۲۰, No. ۱۱, pp. ۱۹۳۳ – ۱۹۵۳.

۶. **Dalia, G.; Karbat, I.; Ilan, N.; Cohen, L.; Kahn, R.; Gilles, N.; Dong, K.; Stuhmer, W.; Tytgat, J. and Gurevitz, M., ۲۰۰۷.** The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. Toxicon. ۴۹:۴۵۲-۴۷۲.

۷. **Debin, J.A.; Maggio, J.E. and Strichartz. G.R., ۱۹۹۳.** Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. Am. J. Physiol.۲۶۴:۳۶۱-۳۶۹.

۸. **Djebari, L.F., ۱۹۹۸. Use of toxic fraction isolated from Algerian Androctonus austrails hector scorpion venom for the assessment of antivenom serum.** Arch. Inst. Passtur Algr. ۶۲:۲۵۴-۶۶.

۹. **Dutertre, S. and Lewis, R.J., ۲۰۱۰.** Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. Journal of Biological Chemistry. ۲۸۵:۱۳۳۱۵-

families and their geographical distribution. J. Venom. Anim. Toxins. Vol. ۷, No. ۱, pp.۳۲۱-۳۳۰.

۱۹. **Lowe, C., ۲۰۰۳.** A powerful new light source for ultraviolet detection of scorpion in the field. Euscorpius. Occianal publication in scorpiology. ۸:۱-۷.

۲۰. **Maertens, C.; Tytgat, J.; Droogmans, G. and Nilius, B., ۲۰۰۰.** Chlorotoxin does not inhibit volume regulated calcium activated. Br. J. Pharmacol. ۱۲۹:۷۹۱ – ۸۰۱.

۲۱. **Miller, C., ۲۰۰۰.** An overview of the potassium channel family.Genomic Biol.۱:

۲۲. **Navidpour, S.; Kovarik, F.; Solegelad, M. and Fet, V., ۲۰۰۸.** Scorpion of Iran (Arachnida, Scorpiones) part I: khoozestan. Euscorpius. Occasional publications in scorpiology. ۶۵:۱-۶.

۲۳. **Ozkan, O.; Adiguzel, S. and Karatas, S., ۲۰۰۶.**

crassicauda (Oliver, ۱۸۰۷) (Scorpiones: Buthidae) from Turkey. J. Anim. Toxins and Trop Dis. Vol.۱۲, No.۴, pp.۵۴۹ -۵۵۹.

۲۴. **Razi, E. and Malekanrad, E., ۲۰۰۸.** Asymmetric pulmonary edema after scorpion sting: A case report. Rev. Inst. Meds. Paulo. Vol. ۵۰, No. ۶, pp.۳۴۷ – ۳۵۰.

۲۵. **Srinivason, K.N., ۲۰۰۱.** Scorpion a molecular dara base of scorpion toxins. ۴۰: ۲۳-۳۱.

۲۶. **Uawonggul, N.; Thammasirirak, S.; Chaveerach, A.; Arkaravichien, T.; Bunyatratchata, W.; Ruangjirachuporn, W.; Jearranaiprepame, P.; Nakamura, T.; Matsuda, M.; Kobayashi, M.; Hattori, S. and Daduang, S., ۲۰۰۷.** Purification and characterization of Heteroscorpine-۱ (HS-۱) toxin from Hetermetrus laoticus scorpion venom. Toxicon. Vol. ۴۹, No. ۱, pp.۱۹-۲۹.

۲۷. **Wagner, S., ۲۰۰۳.** Purification and primary structure determination of T f۴ the first bioactive peptide isolated from the venom ۱۳۳۲۰

۱۰. **Fontecilla, J.C.; Al-Massy, R.J.; Suddath, F.I.; Watt, D.A. and Bugg, C., ۲۰۰۸.**

protein from scorpion venom new structural class of neurotoxins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.Vol. ۷۷, No. ۱۱, pp. ۶۴۹۶-۶۵۰۰.

۱۱. **Gordon, D. and Zlotkin. E., ۱۹۹۳.** Binding of an alpha scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential. FEBS Lett. ۳۱۵:۱۲۵-۱۲۸.

۱۲. **Grishin, E.V.; Korolkova, Y.V.; Kozlov, S.A.; Lipkin, A.V.; Nesyreva, E.D. and Pluzhnikov, K.A. ۱۹۹۶.** Structure and function of potassium channel inhibitor from black scorpion venom. Pure & Appl. Chem. Vol. ۶۸, No. ۱۱, pp.۲۱۰۵-۲۱۰۳.

۱۳. **Goudet, C.; Wu, C.C. and Tytgat, J., ۲۰۰۲.**

from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karseh. Toxicon.۴۰:۱۲۳۹-۱۲۵۸.

۱۴. **Goyffon, M. and Kovoor, J., ۱۹۸۷.** Chactoid venoms. Hand book Experimental pharmacology. Arthropod venoms. ۴۸: ۳۹۵ -۴۱۸.

۱۵. **Guan, R.J.; Wang, C.G.; Wang, M. and Wang, D.C. ۲۰۰۲.** A depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus martensi* kirsch. Biochem. Biophys.Acta. Vol. ۱۵۴۹, No. ۱, pp.۹-۱۸.

۱۶. **Isom, L.L.; De Jongh, K.S.; Patton, D.E.; Reber, B.F.; Offard, J.; Charbonneau, H.; Walsh, K., Goldin, A.L. and Catterall, W.A., ۱۹۹۲.** Primary structure and fanctional expression of the beta I subunit of the rat brain sodium channel. Science.۲۵۶:۸۳۹-۸۴۲.

۱۷. **Lourenco, G.A., ۲۰۰۲.** Neurotoxic effects of fractions isolated tityus bahiensis scorpion venom. Toxicon. Vol. ۴۰, No. ۲, pp.۱۴۹-۱۵۷.

۱۸. **Lourenco, W.R., ۲۰۰۱.** The scorpion

of Brazilian scorpion *Tityus faseiolatus.* Toxicon. ۴۱: ۷۳۷-۷۴۵.

۲۸. **Walker, J.M., ۲۰۰۷.** Protein hand book protocols. Second edition. Humana press. pp ۷-۹.

۲۹. **Zare Mirakabbadi, A.; Zolfagharian, H.; Hedayat, A. and Jalali, A., ۲۰۰۷.** Clinical and biochemical manifestations produced by scorpion (*Hemiscorpius lepturus*) venom in experimental animals. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop Dis. ۱۳:۷۵۸ – ۷۶۵.

۳۰. **Zarei, A.; Rafinejad, J.; Shemshad, K. and Khaghani, R. ۲۰۰۹**. Faunistic study and biodiversity of scorpions in Qeshm Island (Persian Gulf), Iranian journal of Arthopod borne diseases. Vol.۳, No.۱, pp. ۴۶-۵۲.

۳۱. **Zlothin, E.; Miranda, F. and Rochat, H., ۱۹۷۸**.

Buthidae scorpion venoms. Hand book of Experimental pharmacology. Arthropod venoms. ۴۸:۳۱۷- ۳۶۹.