بررسی پروفایل پروتئینی ونوم حلزون مخروطی (*Conus textile*) جزیره لارک با روش RP-HPLC

- **نسیم تبارکی**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی : ۱٤٥۱٥– ۷۷٥
- **دلاور شهباززاده**: آزمایشگاه ونوم و توکسین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران
- **کامران پوشنگ‌باقری**: آزمایشگاه ونوم و توکسین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران
- **علی ماشینچیان‌مرادی**: گروه شیمی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی : ۱٤٥۱٥– ۷۷٥
- **غلامحسین وثوقی**: گروه بیولوژی دریا،دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی : ۱٤٥۱٥– ۷۷٥
- **پرگل قوام‌مصطفوی***: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی : ۱٤٥۱٥– ۷۷٥

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند۱۳۹۱

چکیده

شناسایی گونه‌های سمی خلیج فارس و آشنایی با ترکیب و خواص سم آن‌ها و هم‌چنین با توجه به اهمیت موضوع از نظر پزشکی و ایجاد خطر برای صیادان، شناخت دقیق ماهیت سم این حلزون حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، حلزون‌های مخروطی از عمق ۷ متری جزیره لارک صید و به‌صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استفاده در دمای ۷۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. مجاری ونوم جدا و در آب دیونیزه هموژنایز شدند. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سوپ رویی به‌عنوان ونوم استخراج شده در نظر گرفته شده و پس از لیوفیلیزه شدن در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. جهت بررسی ونوم استخراج شده از ژل SDS-PAGE و برای تعیین الگوی پروتئینی از روش RP-HPLC استفاده شد. الکتروفورز ونوم مورد مطالعه نشان داد که پروتئین‌ها و پپتیدهای تشکیل‌دهنده دارای محدوده وزنی ۲۵۰–٦ کیلو دالتون بود. کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه وجود بیش از ٤٤ فراکشن بزرگ و کوچک را مشخص نمود.

کلمات کلیدی: حلزون‌های مخروطی، حلزون *Conus textile*، زهر، RP-HPLC، خلیج فارس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mostafavi_pa@srbiau.ac.ir

مقدمه

حلزون‌های مخروطی متعلق به جنس *Conus* (خانواده Conidae) با بیش از ۵۰۰ گونه بزرگترین خانواده موجودات دریایی زنده می‌باشند. این گونه‌ها در محیط‌های مرجانی گرمسیری در تمام دنیا پراکنش دارند و بر اساس نوع تغذیه به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند. گونه‌هایی نظیر *Conus geographus* و *C. striatus* از ماهی‌ها و *Conus textile* و *C. pennaceus* از نرم‌تنان و گونه‌های *C. imperialis* و *C. vexillum* از کرم‌های پرتار تغذیه می‌کنند (۲).

حلزون‌های مخروطی دارای یک کیسه سم و مجرای سم می‌باشند که به یک خرطوم متصل هستند. ساختارهای نیزه‌مانندی دارند که حاوی سم بوده و در مواقع خطر و جهت صید طعمه آن‌ها را به سوی هدف پرتاب می‌کنند. سم این نیزه‌ها بسیار خطرناک و انواعی از آن‌ها برای انسان کشنده است (۲۹ و ۱۶). طبق گزارشات به‌دست آمده، سم این موجود سبب ایجاد فلج و سپس به‌سرعت باعث مرگ طعمه می‌شود (۲۲ و ۱۷). عواملی در ونوم این حلزون وجود دارد که سبب عوارض بالینی و مرگ در انسان می‌شوند که کاملاً شناخته شده نیستند. در تحقیق حاضر بررسی الگوی پروتئینی ونوم این حلزون انجام شد که نتایج این تحقیق در آینده می‌تواند در تولید آنتی ونوم و داروهای ضد درد (مسکن) مورد استفاده قرار گیرد. تحقیقات انجام شده در دنیا که بر روی ونوم برخی از حلزون‌های مخروطی صورت گرفته، نشان داده است که زهر این حلزون‌ها دارای خواص ضددردی می‌باشد (۲۶، ۲۰، ۱۸، ۱۵ و ۱۴).

با وجود گونه‌های دریایی سمی بسیار، مانند مار دریایی، ژلی‌فیش‌ها، حلزون و اختاپوس و ماهیان سمی، آنتی ونوم‌ها فقط برای مار دریایی، stone fish و ژلی‌فیش *Chironex fleckeri* موجود هستند (۱، ۶،۱۰، ۱۱ و ۲۵). بنابراین شناسایی ماهیت پروتئینی ونوم دیگر گونه‌های دریایی جهت تولید آنتی ونوم حائز اهمیت می‌باشد.

در دو دهه اخیر مطالعات بسیاری در زمینه شناسایی ونوم حلزون‌های مخروطی از لحاظ بیوشیمیایی، ژنتیک، فیزیولوژی و فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها صورت گرفته است (۸،۳۰ و ۳۱).

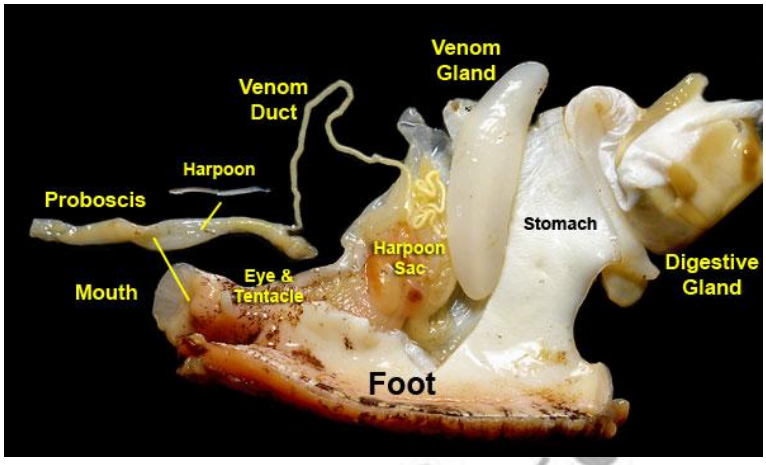
ونوم حلزون‌های مخروطی به‌دلیل وجود پپتیدهای کوچک با پیوندهای دی‌سولفیدی (کونوتوکسین‌ها) از عملکرد کانال‌های یونی و گیرنده‌های نوروترانسمیتری ممانعت می‌کنند (۱۳). کونوتوکسین‌ها معمولاً دارای ۸۰ -۸ اسیدآمینه و گاهی بیش از ۱۰ پیوند دی‌سولفیدی دارند (۲۳، ۱۲ و ۹). فعالیت دارویی هر یک از خانواده‌های کونوتوکسین‌ها می‌تواند با نوع پیچش این توکسین‌ها (تعداد و آرایش پیوندهای دی‌سولفیدی) و محدوده جرم مولکولی آن‌ها مرتبط باشد. در حال حاضر، مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی از کونوتوکسین‌های خانواده امگا از حلزون مخروطی *Conus magus* برای درمان دردهای حاد و مزمن تحت آزمایش‌های کلینیکی می‌باشند. کشف ویژگی‌های اختصاصی توکسین‌های جدید، دانش ما را از نظر فیزیولوژی، داروشناسی، بیوشیمی و ساختار گیرنده‌هایی که این توکسین‌ها به آن‌ها متصل می‌شوند، افزایش خواهد داد و این اطلاعات ممکن است نتایجی را برای توسعه داروهای جدید فراهم کنند(۲۷ و ۳). شناسایی پروفایل پروتئینی و پپتیدی گونه *Conus textile* خلیج فارس از نظر پزشکی حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حلزون‌های مخروطی از عمق ۷ متری جزیره لارک (N 26 52' 25.41" و E 56 20' 01.02") صید (شکل۱) و به‌صورت زنده به تهران منتقل شد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

شکل ۱: موقعیت جغرافیایی جزیره لارک

حلزون‌ها به‌کمک استریومیکروسکوپ تشریح و مجرای ونوم آن‌ها جدا گردید (شکل ۲). سپس مجرای حاوی ونوم در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه توسط دستگاه هموژنایزر هموژن شده و مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوپ رویی را به‌عنوان ونوم در نظر گرفته و پس از لیوفیلیزه شدن تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۵).



شکل ۲: آناتومی *Conus textile*.مجرای ونوم و نیزه نشان داده است (۱۱)

برای تعیین میزان غلظت پروتئین از دو روش اسید بیسینکونینیک (BCA) و برادفورد استفاده شد (۴).

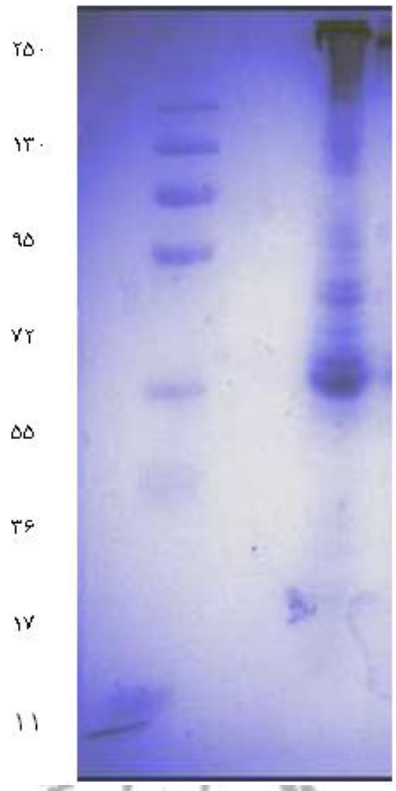
به‌منظور جداسازی پروتئین‌های استخراج شده، از روش الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید - سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد (۲۸). به این منظور، دو ژل تفکیک‌کننده (Resolving) و متمرکزکننده (Stacking) که هرکدام به‌ترتیب ۱۵٪ با pH=8.8 و ۵٪ با pH=6.8 می‌باشند، ساخته شد. از نمونه ونوم آماده شده ۱۵میکروگرم بر میکرولیتر با بافر لودینگ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس نمونه و مارکر پروتئین جداگانه بارگذاری شده و الکتروفورز به‌مدت ۲ ساعت و با جریان ۳۰ میلی‌آمپر انجام گردید. در مرحله بعد، ژل با رنگ کوماسی رنگ‌آمیزی شده و سپس با محلول رنگ‌بر، رنگ‌بری شد. در انتها با دستگاه Gel doc، عکس گرفته شد.

جهت تعیین پروفایل پروتئینی ونوم از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (Knauer, Germany) با پمپ K-1000، ردیاب UV مدل ۲۵۵۰، تزریق کننده دستی، لوپ ۲۰ میکرولیتری، ستون C18 (Eurosfer), 100 C18, 250 × 4.6 mm شرکت Knauer آلمان و نرم‌افزار Chromgate استفاده شد. جداسازی با ایجاد شیب غلظت بین دو محلول A و B انجام شد. آب دیونیزه حاوی ۰/۱٪ TFA به‌عنوان محلول A و استونیتریل خالص حاوی ۰/۱٪TFA به‌عنوان محلول B انتخاب و شیب خطی صفر تا نود درصد محلول B به‌مدت ۶۵ دقیقه اعمال گردید. خروجی ستون در طول موج ۲۸۰ نانومتر رصد گردید. فراکشن‌ها به‌صورت دستی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیزه شدن، جهت انجام آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

نتایج

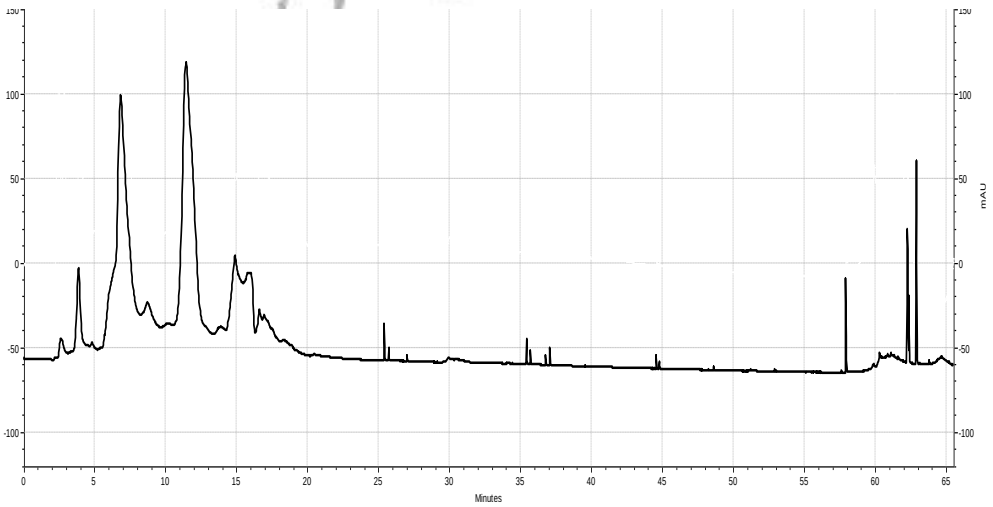
غلظت پروتئین در هر دو روش BCA و برادفورد با توجه به‌میزان جذب قرائت شده و با مطابقت آن با نمودارهای استاندارد BCA و برادفورد، 1میکروگرم بر میکرولیتر برآورد شد.

الکتروفورز ونوم استخراج شده پس از رنگ‌آمیزی با رنگ کوماسی بلو و رنگ‌بری حضور حدود ۱۲ پروتئین و پپتید را مشخص نموده و نشان داد که اجزای تشکیل‌دهنده ونوم دارای محدوده وزنی ۲۵۰-۶ کیلو دالتون می‌باشند (شکل ۳).



شکل ۳: با استفاده از ژل ۱۵٪ پلی اکریلامید *Conus textile*، الکتروفورز ونوم

براساس کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه در طول موج ۲۸۰ نانومتر، بیش از ۴۴ پیک بزرگ و کوچک مشاهده گردید(شکل ۴). پیک‌های جمع‌آوری شده لیوفلیزه گردیده و جهت استفاده در آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.



شکل ۴: کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه ونوم حلزون *Conus textile* خلیج فارس توسط دستگاه RP-HPLC با ستون C18 درطول موج ۲۸۰ نانومتر

بحث

روش مناسب جهت استخراج ونوم حلزون‌های مخروطی حائز اهمیت است. در این مطالعه با توجه به تحقیقات پیشین، استخراج ونوم انجام شد (۵).

تعیین غلظت پروتئین استخراج شده به کمک روش‌های اسید بیسینکونینیک (BCA) و برادفورد انجام شد که مشابه با مطالعات انجام شده در این زمینه است(۴ و ۲۵).

برای اطمینان از صحت استخراج ونوم و بررسی الگوی پروتئین‌ها و پپتیدهای آن، ژل پلی اکریلامید با غلظت ۱۵٪ مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

در تحقیق حاضر، روش انجام HPLC برای سم *Conus textile* خلیج فارس، جهت تفکیک کامل فراکشن‌های پپتیدی و پروتئینی بهینه‌سازی شد که شیب غلظتی و ستون (C18) انتخاب شده مشابه با بررسی‌های پیشین در رابطه با گونه‌های دیگر این خانواده می‌باشد (۷).

جداسازی مناسب اجزای سم می‌تواند در تحقیقاتی نظیر بررسی خواص بیولوژیکی فراکشن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به کروماتوگرام حاصل از HPLC، بیش‌تر پروتئین‌ها و پپتیدهای این حلزون، هیدروفوبیسیته پایینی دارند و در غلظت‌های کمتر استونیتریل از ستون جدا می‌شوند.

مقایسه الگوی کروماتوگرافی سم *C. textile* خلیج فارس با مناطق دیگر نشان‌دهنده تفاوت بین تعداد و الگوی فراکشن‌های به‌دست آمده می‌باشد که این اختلاف می‌تواند به‌دلیل تکامل موجود بر اساس شرایط زیست محیطی باشد (۲۴،۱۹).

در این مطالعه برنامه HPLC برای زهر *Conus textile* با بالاترین میزان تفکیک فراکشن‌ها بهینه‌سازی شد که در تحقیقات آینده برای مطالعه فعالیت‌های بیولوژیکی فراکشن‌ها، مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

منابع

1- **Bazaa, A.; Marrakchi, N.; Ayeb, M.; Libia, S. and Calvete, J., 2005.** Snake venomics: Comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes Cerastes cerastes Cerastes vipera and Macrovipera lebetina. Proteomics. Vol. 5, No. 2, pp.: 4223-4235.

2- **Baby, J.; Sheeja, R.; Jeevitha, M.V.; Ajiha, S.U. and Jini, D., 2010.** Conotoxins: a potential natural therapeutic for pain relief. Pharmacy and pharmaceutical sciences. Vol. 3, No. 1, pp.: 975-985.

3- **Balamurgan, K.; Akalanka, D.; Raju, S. and Sharma, A., 2007.** Some Neuropharmacological Effects of the Crude Venom Extract of *Conus musicus* in Mice. East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 10, No. 2, pp.: 28-33.

4- **Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. Vol. 72, No. 1, pp.: 248-254.

5- **Cartier, G.E., 1996.** A new a-conotoxin which targets a3b2 nicotinic acetylcholine receptors. J. Biol. Chem. Vol. 271, No. 1, pp.: 7522-7528.

6- **Cruz, L. J.; Corpuz, G. and Olivera, B.M., 1976.** A preliminary study of Conus venom protein. Veliger. Vol. 18, No.1, pp.: 302-308.

7- **Cruz, L.J.; Gray, W.R. and Olivera, B.M., 1978.** Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. Arch. Biochem. Biophys. Vol. 190, No. 1, pp.: 539-548.

8- **Cruz, L.J.; Gray, W.R.; Olivera, B.M.; Zeikus, R.D.; Kerr, L.; Yoshikami, D. and Moczydlowski, E., 1985a.** *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. J. Biol. Chem. Vol. 260, No. 1, pp.: 9280-9288.

9- **Cruz, L.J.; Gray, W.R.; Olivera, B.M.; Zeikus, R.D.; Kerr, L.; Yoshikami, D. and Moczydlowski, E., 1985b.** *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. J. Biol. Chem. Vol. 260, No. 1, pp.: 9280-9288.

10- **Currie, B.J., 2003.** Marine antivenoms. Journal of drugassessment. Vol. 41, No. 3, pp.: 301-308.

11- **Endean, R. and Rudkin, C., 1963.** Studies of the venoms of some Conidae. Toxicon. Vol. 1, No. 1, pp.: 49-64.

12- **Garratte, J.E.; Buczek, O.; Watkins, M.; Olivera, B.M. and Bulaj, G., 2005.** Biochemical and gene expression analysis of conotoxins in conus. Biochemical and biophysical research communications. vol. 328, No. 1, pp.: 362-367.

13- **Gray, W.R.; Luque, A.; Olivera, B.M.; Barrett, J. and Cruz, L.J., 1981.** Peptide toxins from *Conus geographus* venom. J. Biol. Chem. Vol. 256, No. 1, pp.: 4734-4740.

14- **Han, T.S., 2008.** Curr. Pharm. Design. Vol. 14, No. 1, pp.: 2462-2479.

15- **Kim, S.K. and Wijesekara, I., 2010.** Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides. A review. Journal of Functional Foods. vol. 2, No. 1, pp.: 423-429.
16- **Kohn, A.J.; Saunders, P.R. and Wiener, S., 1960.** Preliminary studies on the venom of the marine snail Conus. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 90, No. 1, pp.: 706-725.
17- **Kohn, A.J.; Nybakken, J.W. and Mool, V., 1972.** Radula tooth structure of the gastropod *Conus imperialis*. Science. Vol. 176, No. 1, pp.: 49-51.
18- **Lee, S.; Yoonji, K.; Back, S.K.; Choi, H.W.; Lee, J.Y.; Jung, H.H. and Ryu, J.H., 2010.** Analgesic effect of highly reversible ω- conotoxin FVIA on N-type Ca+2 channels. Molecular pain. Vol. 4, No. 1, pp.: 1-12.
19- **Olivera, B.M.; Rivier, J.K.; Scott, H. and Cruz, L.J., 1991.** Conotoxins. J. Biol. Chem. Vol. 33, No. 1, pp.: 22067- 22070.
20- **Olivera, B.M., 1994.** Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The v-conotoxins and v- agatoxins. Ann. Rev.Biochem. Vol. 63, No. 1, pp.: 823-867.
21- **Olivera, B.M., 1999.** Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns. Ann. New York Acad. Sci. Vol. 870, No. 1, pp.: 223–237.
22- **Olivera, B.M. and Teichert, R.W., 2007.** Diversity of the Neurotoxic Conus peptides, A Model for Concerted pharmacological Discovery. Molecular Interventions. Vol. 7, No. 5, pp.: 253-262.
23- **Ramilo, C.A.; Zafaralla, G.C. and Nadasdi, L., 1992.** Novel a- and v-conotoxins from *Conus striatus* venom. Biochemistry. Vol. 31, No. 1, pp.: 9919-9926.
24- **Rigby, A.C.; Meunier, E.L.; Kalume, D.E.; Czerwiec, E. and Hambe, B., 1999.** A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic ca+2 influxes. Neurobiology. Vol. 96, No. 1, pp.: 5758-576.
25- **Shahbazzade, D.; Srariabid, N.; Feng, N.; Ram, L.; Borchani, M.; Ronjat, A.; Akbari, I.N.; Pessah, M.D.E. and Elayeb, M., 2007.** Hemicalcin, new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscirpius lepturus* which is active on waard, ryanodine-sensitive ca2+ channel. Biochem.J. Vol. 404, No. 2, pp.: 89-96.
26- **Shen, G.S.; Layer, R.T. and McCabe, R.T., 2000.** Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. Drug Discov Today. Vol. 5, No. 2, pp.: 98-105.
27- **Stix, G., 2005.** A toxin against pain. Sci. Am. Vol. 292, No. 1, pp.: 88-93.
28- **Szewczyk, B. and summers, D.F., 1992.** Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene Difluride membranes (Immobilon) after transferfrom SDS-PAGE andt heiruseas Immunogens. Ed.M.Manson. Methods in molecular biology. vol. 10. The Humana press. Totowa, N.J.
29- **Terlau, H.; Shon, K.J.; Grilley, M.; Stocker, M.; Stuhmer W. and Olivera, B.M., 1996.** Strategy for rapid immobilization of prey by a fish hunting marine snail. Nature. Vol. 381, No.1, pp.: 148-151.
30- **Terlau, H. and Olivera, B.M., 2004.** Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol Rev. Vol. 84, No. 1, pp.: 41-47.
31- **Zeikus, R.; Gray, W.R. and Olivera, B.M., 1987.** Invertebrate vasopressin/ oxytocin homologs. Characterization of peptides from Conus geographus and Conus striatus venoms. J. Biol. Chem. Vol. 262, No .1, pp.: 15821-15824.

Protein profiling of Larak Island Cone snail venom by RP-HPLC

- **Nasim Tabaraki:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515 Tehran, Iran
- **Delavar Shahbaz Zadeh:** Venom and Toxin Laboratory, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, P.O.Box: 13146 Tehran, Iran
- **Kamran Pooshang Bagheri:** Venom and Toxin Laboratory, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, P.O.Box: 13146 Tehran, Iran
- **Ali machinchian:** Department of Marine Chemistry, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515 Tehran, Iran
- **Gholam Hossein Vosoughi:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515 Tehran, Iran
- **pargol Ghavam mostafavi*:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515 Tehran, Iran

Received: December 2012 Accepted: February 2013

Keywords: Cone snails, *Conus textile*, Venom, RP-HPLC, Persian Gulf

Abstract

Identification of venomous species of Persian Gulf cone snails and characterization of venom composition and their features is so important from the point of danger for underwater divers as well as medical importance. In this research, the specimens of *Conus textile* were collected off Larak Island from depth of 7 m. The collected samples were transferred to laboratory alive and were stored at -70^{0}C. The venom´s ducts were separated and homogenized with deionized water. The mixture centrifuged at 13000 rpm for 15 minutes at 4˚C. Supernatant was considered as extracted venom and stored at -20˚ C after lyophylization. The entity of venom determined by SDS-PAGE and RP-HPLC methods used to investigate the extracted venom and system to determine protein pattern. The results obtained with SDS-PAGE showed that proteins and peptides of venom were ranged between 6 to 250KD. Chromatogram of the venom demonstrated more than 44 large and small fractions.

* Corresponding Author's email: mostafavi_pa@srbiau.ac.ir