



ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

تنقية بروتين سم الزنبور الأحمر *Vespa orientalis* والأصفر *Polistes olivaceus* وتحديد بعض صفاته الحيوية

محمد عبد الرزاق الصوفي^{1*}، سعدون إبراهيم البياتي²، شهد فلاح عباس²

¹مركز بحوث السوق وحماية المستهلك، جامعة بغداد، بغداد، العراق

²قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق

الخلاصة

جمعت 390 غدة سمية من الزنبور الأحمر *Vespa orientalis* و 418 غدة سمية من الزنبور الأصفر *Polistes olivaceus* من مناطق مختلفة من بغداد وتم تصنيفها بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية من أجل تشخيصها والتعرف على الصفات العامة لكل نوع من الأنواع ومن ثم استخراج الغدة السمية للحصول على السم الذي جرت تنقيته بوساطة المرشح الهلامي Sephacryl S-200، تم الحصول على ثلاث قمم بروتينية لسم الزنبور الأحمر، وعند تقدير الفعالية التحليلية والتخثرية للقمم المنفصلة P1 و P2 و P3 وجد أنها كانت في أعلى قيمة لها عند القمة المنفصلة P1 بفعالية تحليلية 98% ووقت تخثر 47.3 دقيقة، في حين لوحظ انفصال ثلاث قمم بروتينية لسم الزنبور الأصفر، وبينت نتائج تقدير الفعالية التحليلية والتخثرية للقمم المنفصلة P1 و P2 و P3 أن أعلى قيمة لها كانت عند القمة المنفصلة P2 بفعالية تحليلية 91% ووقت تخثر 43.8 دقيقة. بلغ الوزن الجزيئي للقمة (P1) المنفصلة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقمة (P2) المنفصلة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* 22382 و 22387 دالتون على التوالي باستعمال تقنية الترشيح الهلامي Sephacryl S-200، في حين كان المحتوى الكبرهيدراتي 60.057 و 44.460 مايكروغرام/ملتر على التوالي، وبلغت نسبة الحديد 0.88 و 0.44 جزء بالمليون على التوالي، وكان الاس الهيدروجيني الأمثل للفعالية التحليلية والتخثرية 6.5 لكلا النوعين، ولوحظ انهما كان ثابتين في مدى من قيم الاس الهيدروجيني تراوح بين 6 إلى 7.5 و 5.5 إلى 8 على التوالي، وكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية القمة (P1) و (P2) التحليلية والتخثرية 35م، كما لوحظ أن الفعالية التحليلية والتخثرية كانت ثابتة بدرجة حرارة 35م لمدة 30 دقيقة لكلا النوعين.

Purification of Red Wasp *Vespa orientalis* and Yellow Wasp *Polistes olivaceus* Toxin and Estimating Some of its Biological Characteristics

Mohammed A. Al-Soufi^{1*}, Saadoun I. Al-Bayati², Shahad F. Abbas²

¹Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

²Department of Science, College of Basic Education, University of AL-Mustansiriya, Baghdad, Iraq

Abstract

This study included the collecting of 390 gland toxicity of the Red Wasp *Vespa orientalis* and 418 gland toxicity of yellow wasp *Polistes olivaceus* from different areas of Baghdad city. It was classified depending on taxonomic keys in order to diagnose and identify the general characteristics of each species, and then extract gland toxicity to get poison. The poison was purified by gel filtration throw Sephacryl S-200 obtain three peaks of proteins. The activity of lysis and clotting was estimated for peaks separate P1, P2 and P3 for wasp red toxin, the lysis activity of

*Email: alsoufim@yahoo.com

separate P1 was 98% of the poison origin activity and the clotting time was 47.3 minutes, while when estimating the activity of lysis and clotting for peaks separate P1, P2 and P3 for wasp yellow toxin, the lysis activity of separate P2 was 91% of the poison origin activity and the clotting time was 43.8 minutes.

The molecular weight of P1 and P2 wasp was 22387 and 22382 Da respectively by using the gel filtration Sephacryl S-200, while the carbohydrates content were 60.057 and 44.460 mg/ ml respectively, The percentage of iron was 0.88 and 0.44 ppm respectively, the optimum pH of lysis and clotting activity for P1 and P2 was 6.5, and noted that they stable at range 6-7.5 and 5.5 -8 respectively, the optimum temperature of lysis and clotting activity for P1 and P2 was 35°C, and noted that they stable at 35°C for 30 minutes.

Keywords: Purification, Red wasp, Yellow wasp, *Vespa orientalis*, *Polistes olivaceus*, Toxin, Some biological characteristics.

المقدمة

ينتمي كلا من الزنبور الأحمر *Vespa orientalis* والزنبور الأصفر *Polistes olivaceus* الى عائلة Vespidae التي تعود الى رتبة غشائيات الأجنحة Hymenoptera التي تضم ست عوائل فرعية تتوزع في جميع أنحاء العالم [1]، اذ ينتشر النوع الاول في مناطق جنوب شرق أوروبا وشمال شرق أفريقيا والمناطق الجنوبية الغربية من قارة آسيا وفي سوريا ومصر وأثيوبيا وشبه الجزيرة العربية والعراق ووجد أيضا في المكسيك، بينما يتواجد النوع الثاني في المناطق الاستوائية والشبه الاستوائية بمدى عالمي واسع الانتشار [2-3].

يمثل سم الزنابير خليط معقد من البروتينات والبيبتيدات، اذ لوحظ انها بصورة عامة تتألف من ثلاثة اقسام، تمثل الاولى بروتينات السم النموذجية التي يكون لها الفعل السمي المعروف، بينما تمثل الثانية البروتينات المرتبطة هيكلية الواردة الى العضلات والتي تشمل السم الخزين والتي تؤدي دورا هاما في هيكلية العضلات المخططة، في حين تشمل المجموعه الثالثه البروتينات المرتبطة بالوظائف العامة للخلايا الموجوده في الغدد السمية، وهي البروتينات التي تؤدي دورا في وظائف الايض للخلايا الافرازية في الغدة السمية وربما تنشأ من خلايا الغدد السم ولا تشكل السم الصحيح وهذه البروتينات لا تؤدي اي دور وظيفي في آليه التسمم [4-5].

بينت العديد من الدراسات ان سموم الزنابير تحمل نشاط قوي مضاد للتخثر وبطيل كثيرا من وقت تكوين الخثرة، اذ اظهر سم الزنبور الاجتماعي Polypia احتواءه على بروتينات مضادة للتخثر وانه يثبط تكوين الفايبرينوجين [6]، بينما يؤثر سم *V. orientalis* بشكل رئيس على عامل التخثر الثامن الذي يسمى ايضا (بعامل استقرار الليفين) الذي يحافظ على توازن خلايا الدم ويمنعها من التخثر وعامل التخثر التاسع الذي يعد احد البروتينات التي تدخل في نظام التخثر وهو ضروري لتكوين البروثرومبين [7]، واطهرت بعض الدراسات تأثير سم الزنابير على تحلل كريات الدم الحمراء لدى الانسان ولبعض الحيوانات، ففي عام 1988 تم دراسة تأثير سم *V. orientalis* في كريات الدم الحمراء لدى الانسان، وقد لوحظ ان له تأثير تحللي قوي ومما يعزز وظيفته الانحلالية وجود تراكيز منخفضة من Ca_2 ووجود Polyvalent cationos و Oriento toxin بشكل متأزر يزيد مجمل النشاط الانحلالي للدم، وينتج تأثير اكبر بكثير مما لو كانت هذه المركبات موجوده بشكل منفصل واحدة عن الاخرى [8].

ونتيجة لتلك الخصائص الهامة فقد توسعت الدراسات حول هذا الموضوع وجرى استعمال تقنيات عدة لتتقية هذه السموم، اذ اعتمدت بعضها على الوزن الجزيئي مثل التتقية بواسطة الترشيح الهلامي حيث استخدم [9] Sephadex G-200 لتتقية سم *Carybdea alata* والحصول على البروتينات التي تسبب تحلل كريات الدم الحمراء لدى الابقار والتي تمتلك وزن جزيئي 42 كيلو دالتون، بينما استعمل [10] Sephadex G-50 في تتقية سم *Vespa magnifica* والحصول على ثلاث قمم ووجد ان القمة الثالثة تحتوي على نشاط مقلص للعضلات الملساء، وأشارت بعض الابحاث الى استعمال تقنيات اخرى مثل التتقية الترحيل الكهربائي للبروتين بهلام متعدد الاكريل امايد والتي استعملت على نطاق واسع في الدراسات الجزيئية للحشرات [3] وتم الحصول على شريط بروتيني يتألف من 48 حزمة تتراوح اوزانها الجزيئية بين 6 الى 375 كيلودالتون، اما سم *Agelais pallipes pallipes* تم تتقيته بواسطة [11] Sephadex G-100، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تتقية سم الزنبور الاحمر والاصفر ودراسة بعض صفاته الحيوية وتحديد بعض العوامل المؤثرة في فعاليته التحليلية والتخثرية.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات الزنابير

تم جمع عينات الدراسة من المستعمرات (خلايا الزنابير الحمراء والصفراء) منذ اوائل الربيع (منتصف شهر اذار) وخلال فصل الصيف (اب وايلول وتشيرين الاول) من سنة 2012 من مناطق مختلفة من مدينة بغداد (الكريعات والطارمية وابو غريب) فضلا عن بعض مناطق محافظة ديالى، بالاعتماد على الصفات المذكورة من قبل [3]، وجرى وضعها في علب محكمة الغلق لا يتسرب اليها الهواء لتقليل نشاط الحشرة والسيطرة عليها بشكل افضل، ثم اختيرت الائنات فقط.

التشخيص

شخصت الحشرات من قبل متحف التاريخ الطبيعي/ جامعة بغداد، وظهرت نتائج التشخيص ان الزنبور الاحمر يعود الى:

Vespa orientalis L. (Hymenoptera: Vespidae)

بينما كان الزنبور الاصفر يعود الى: *Polistes olivaceus* (De Geer) (Hymenoptera: Vespidae)

الحصول على سم الزنابير

استعملت الطريقة التي قام بوصفها [12] في الحصول على سم الزنبور، اذ جرى مسك الحشرة بوساطة الملقط من الوسط وتمت إثارتها بتحريك الجزء الأخير من البطن بوساطة ملقط آخر لأجل إخراج آلة اللسع التي تلجأ إليها الحشرة كوسيلة دفاعية، وبعد ذلك تم سحبها لاستخراج الغدة السمية التي تكون مرتبطة معها، بعدها وضعت كل 30 غدة سمية في هاون خزفي وأضيف لها 10 مللتر من محلول الملح الفسلجي، وتم سحقها بشكل جيد لاستخراج السم، بعد ذلك إجراء الطرد المركزي للمستخلص المستحصل عليه بسرعة مقدارها 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق ثم اهمل الراسب واخذ الرائق ورشح باستعمال مرشح غشائي بقطر 0.22 مايكرومتر للتخلص من البكتريا والفيروسات ثم وزع المستخلص الخام في أنابيب بلاستيكية صغيرة ذات اغطية محكمة وحفظت بدرجة حرارة التجميد -18م.

تقدير تركيز البروتين

استعملت طريقة [13] في تقدير تركيز البروتين، وتم اعداد المنحنى القياسي باستعمال اليومين المصل البقري.

تأثير سم الزنابير في تحلل كريات الدم الحمراء في الإنسان

درس تأثير سم الزنابير في تحلل كريات الدم الحمراء RBC وفقا للطريقة الموصوفة من قبل [14] واتباع الخطوات الاتية:

أ. عينات الدم

جمعت عينات الدم الوريدي من كلا الجنسين ولاعمار مختلفة تتراوح بين 10 سنوات الى 64 سنة وبقوع 20 عينة لكلا الجنسين.

ب. تحضير عالق الدم

وضع 5 مللتر من الدم في انبوية اختبار تحتوي على EDTA وفصل المصل بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقيقة، وبعد ذلك تم اضافة 2 مللتر من محلول الملح الفسلجي الى الدم واعادته في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقيقة وتم تكرار هذه العملية 3 مرات من اجل الحصول على كريات الدم الحمراء فقط، ثم اخذ من هذه العينة 0.5 مللتر واكمل الحجم الى 50 مللتر بمحلول الملح الفسلجي.

ت. تحضير محاليل المستضدات المختلفة

حضرت تخافيف عشرية للسم تراوحت بين 100 الى 10 باستعمال محلول الملح الفسلجي، بعدها اضيف 1 مللتر من كل تخفيف الى 1 مللتر من عالق الدم الذي تم تحضيره مسبقا.

ث. قراءة النتائج

قرأت النتائج للعينات المحضرة من الخطوة السابقة بعد حضنها لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة 37م باستعمال جهاز الامتصاص الضوئي على طول موجي مقداره 540 نانومتر.

تأثير سم الزنابير في وقت تخثر الدم

درس تأثير سم الزنابير في وقت تخثر الدم وفقا للطريقة التي قام بوصفها [7] عن طريق تحضير سلسله من التخافيف العشرية تتراوح بين 100 الى 10 لسم الزنابير باستعمال محلول الملح الفسلجي في انابيب صغيرة، ثم جرى اضافة 0.5 مللتر من الدم

الوريدي المباشر الذي لا يحوي على اي ماده مانعه للتخثر ومقارنة وقت تخثر الدم لهذه المعاملات مع معامل السيطرة الذي يتكون من الدم فقط، وتم تسجيل النتائج بالمشاهدة العينية لحساب الوقت اللازم للتخثر بالدقيقة.

تنقية السم بوساطة المرشح الهلامي S-200 Sephacryl

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل [9] مع اجراء بعض التحويرات عليها وذلك باستبدال مادة الترشيح الهلامي بمادة S-200 Sephacryl التي عبأت بعمود ذي ابعاد 1.5×60 سم وجرت موازنة العمود واسترداد الانموذج بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 بسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ ساعة وبواقع 3 مللتر/ جزء، بعدها قرأت الاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر، وتم تقدير كل من تركيز البروتين وتأثير السم في وقت تحلل كريات الدم الحمراء وتخثر الدم للقمم المنفصلة.

الكشف النوعي والتقدير الكمي للكربوهيدرات في القمم المنقاة

استعمل المرشح الهلامي S-200 Sephacryl الذي عبأ بعمود ذي ابعاد 1.5×60 سم للكشف النوعي عن وجود الكربوهيدرات في القمم المنقاة، وجرت موازنة العمود واسترداد الانموذج بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.05 مولار، وبعد جمع الاجزاء المنفصلة بواقع 3 مللتر/ جزء بسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ ساعة وانتهاء عملية الفصل تم قراءة الاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر للكشف النوعي عن البروتين، بينما استعملت موجة ضوئية طولها 490 لاثبات وجود ارتباط تساهمي بين البروتين والكربوهيدرات في البروتينات السكرية وفقا لما ذكره [15]، في حين تم تقدير الكربوهيدرات في القمم المنقاة وفقا لطريقة الفينول-حامض الكبريتيك التي قام بوصفها [16].

الكشف النوعي والتقدير الكمي للحديد في القمم المنقاة

استعمل المرشح الهلامي S-200 Sephacryl المعبأ بعمود ذي ابعاد 1.5×60 سم للكشف النوعي عن وجود الحديد في القمم المنقاة، وجرت موازنة العمود واسترداد الانموذج بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 بسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ ساعة وبواقع 3 مللتر/ جزء وبعد انتهاء عملية الفصل تم قراءة الاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر للكشف النوعي عن البروتين، بينما استعملت موجة ضوئية طولها 557 لاثبات وجود الحديد وفقا لما اشار اليه [15]، بينما تم تقدير نسبة الحديد في القمم المنقاة باستعمال جهاز مطياف الامتصاص الذري Atomic absorption spectrophotometer-AA 7000 وفقا لما جاء في [17]، اذ تم قراءة النماذج واستخراج نسبة الحديد بتركيز جزء بالمليون بشكل مباشر بعد ان رشحت باستعمال مرشحات غشائية بقطر 0.22 مايكرون.

تقدير الوزن الجزيئي للقمم المنقاة باستعمال الترشيح الهلامي

قدر الوزن الجزيئي للقمم المنقاة وفقا للطريقة التي قام بوصفها [9] مع اجراء بعض التحويرات باستعمال مادة الترشيح الهلامي S-200 Sephacryl بدلا من Sephadex G-200، وتم تحضير العمود بابعاد 1.5×60 سم وجرت موازنة العمود والاسترداد بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 بسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ ساعة وبواقع 3 مللتر/ جزء، وعين حجم الفراغ (Vo) باستعمال محلول الدكستران الأزرق، بينما عين حجم الاسترداد (Ve) باستعمال البروتينات القياسية والقمم المنقاة، وتم استخراج الوزن الجزيئي للسم من المنحنى القياسي للعلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية ونسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ (Ve/Vo).

تحديد الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات القمم المنقاة

عين الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية القمم المنقاة بإتباع الطريقة الموصوفة من قبل [18] وذلك بتعديل الاس الهيدروجيني لمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 الى مستويات مختلفة تراوحت بين 4 الى 8 بإضافة حامض الهيدروكلوريك او هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1 عياري، بعدها أضيف 1 مللتر من السم إلى 1 مللتر من المحاليل الدارئة المحضرة بمديات مختلفة وتم قياس تحلل الدم بشكل مباشر، في حين عين الاس الهيدروجيني الأمثل لثبات القمم المنقاة وذلك بمزج 1 مللتر من السم مع 1 مللتر من المحاليل الدارئة المحضرة بمديات مختلفة من الاس الهيدروجيني التي تراوحت بين 4 إلى 8 وجرى حضن المزيج لمدة 30 دقيقة ثم قياس تحلل الدم.

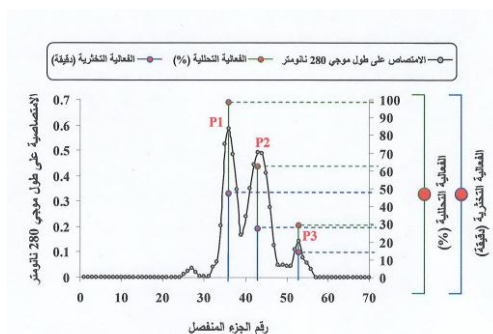
تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات القمم المنقاة

عينت درجة الحرارة المثلى للفعالية بإضافة 1 ملتر من السم إلى 1 ملتر من محلول فوسفات الصوديوم الدائري بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 المحض بدرجات حرارية عدة تراوحت بين 25 إلى 80 م وقياس تحلل الدم بشكل مباشر، في حين حددت درجة الثبات الحراري بحضن 1 ملتر من السم في حمام مائي بدرجة حرارة تراوحت بين 25 إلى 80 لمدة 30 دقيقة ثم تبريده ومزجه مع 1 ملتر من محلول فوسفات الصوديوم الدائري بتركيز 0.3 مولار وأس هيدروجيني 6 وقياس تحلل الدم وفقا لما وصفه [19]

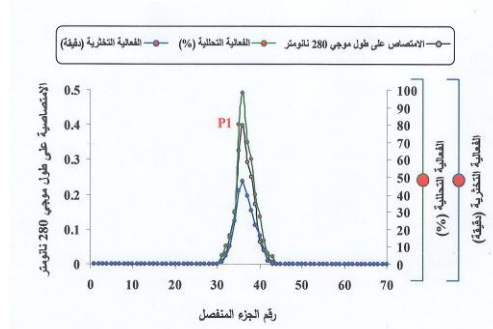
النتائج والمناقشة

تنقية بروتينات سم الزنبور الأحمر والأصفر

يلاحظ من الشكل-1 ظهور قمم بروتينية عدة عند امرار سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200، وعند تقدير الفعالية التحليلية والتخثرية للقمم المنفصلة P1 و P2 و P3 وجد بأنها كانت في اعلى قيمة لها عند القمة المنفصلة P1، اذ بلغت الفعالية التحليلية 98% من فعالية السم الاصلية، في حين كان وقت التخثر 47.3 دقيقة، وكانت الفعالية التحليلية 62% من فعالية السم الاصلية، بينما كان وقت التخثر 27.53 دقيقة للقمة المنفصلة P2، وبلغت الفعالية التحليلية 29% من فعالية السم الاصلية، في حين كان وقت التخثر 13.67 دقيقة للقمة المنفصلة P3، وفي ضوء النتائج المشار اليها في اعلاه فقد تم اختيار القمة المنفصلة (P1) لسم الزنبور الاحمر *V. orientalis* لاجل تنقيتها ودراسة صفاتها الجزيئية، لذا تم جمع الاجزاء المنفصل القريبة من قمة المنحنى لتجنب حدوث التداخلات مع القمم المجاورة للحصول على هذه القمة باعلى درجات النقاوة، وتم امرارها في عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 مرة اخرى للحصول على القمة المنفصلة (P1) بشكل نقي، اذ يلاحظ من الشكل-2 ظهور قمة واحدة للبروتين عند طول موجي مقداره 280 نانومتر تطابقت معها كلا من الفعالية التحليلية (%) والتخثرية (دقيقة) بشكل تام.



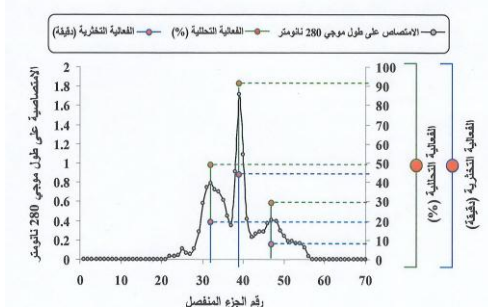
شكل 1- تنقية بروتينات سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* باستعمال تقانة كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بوساطة عمود Sephacryl S-200.



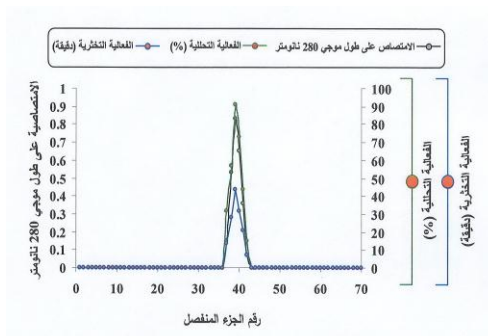
شكل 2- تنقية القمة المنفصلة (P1) من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* باستعمال تقانة كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بوساطة عمود Sephacryl S-200.

يشير الشكل-3 الى ظهور قمم بروتينية عدة عند امرار سم الزنبور الاصفر *P. olivaceus* على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200، ولوحظ عند تقدير الفعالية التحليلية والتخثرية للقمم المنفصلة P1 و P2 و P3 ان اعلى قيمة لها كانت عند القمة المنفصلة P2، اذ بلغت الفعالية التحليلية 91% من فعالية السم الاصلية، بينما كان وقت التخثر 43.8 دقيقة، وكانت الفعالية التحليلية 49% من فعالية السم الاصلية، في حين كان وقت التخثر 19.28 دقيقة للقمة المنفصلة P1، وبلغت الفعالية التحليلية 29%

من فعالية السم الاصلية، بينما كان وقت التخرن 7.52 دقيقة للقمة المنفصلة P3، ومن خلال النتائج المستحصلة فقد تم اختيار القمة المنفصلة (P2) لسم الزنبور الاصفر *P. olivaceus* لاجل تنقيتها ودراسة صفاتها الجزيئية، لذا تم جمع الاجزاء المنفصل القريبة من قمة المنحنى لتجنب حدوث التداخلات مع القمم المجاورة للحصول على هذه القمة باعلى درجات النقاوة، وتم امرارها على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 مرة اخرى للحصول على القمة المنفصلة (P2) بشكل نقي، اذ يبين الشكل-4 ظهور قمة واحدة للبروتين عند طول موجي مقداره 280 نانومتر تطابقت معها كلا من الفعالية التحليلية (%) والتخترية (دقيقة) بشكل تام.



شكل 3- تنقية بروتينات سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* باستعمال تقانة كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بوساطة عمود Sephacryl S-200.

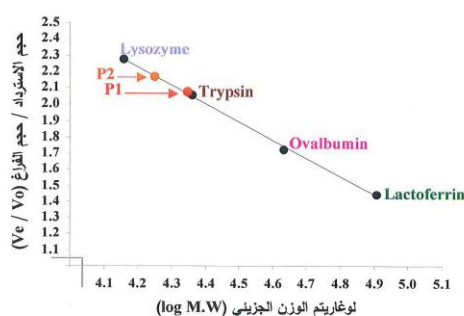


شكل 4- تنقية القمة المنفصلة (P2) من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* باستعمال تقانة كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بوساطة عمود Sephacryl S-200.

اتفقت جميع الدراسات التي أجريت على سموم الزنابير أنها عبارة خليط معقد من البروتينات والبيبتيدات [20]، لذا فقد اتبعت طرائق عدة لفصل وتنقية هذه السموم من اجل دراسة صفاتها الجزيئية اعتمادا على بعض الصفات التي تمتلكها البروتينات بشكل عام والتي يمكن استغلالها لتحقيق الغاية المنشودة كالوزن الجزيئي والشحنة، فقد استعمل [9] تقانة الترشيح الهلامي بوساطة هلام Sephadex G-200 لتنقية السم من *Carybdea alata* والحصول على البروتينات التي تسبب تحلل كريات الدم الحمراء لدى الأبقار، بينما ذكر [10] انه حصل على ثلاث قمم بروتينية عند تنقية سم *V. magnifica* باستعمال الترشيح الهلامي بهلام Sephadex G-50 ووجد أن القمة الثالثة تحتوي على نشاط مقلص للعضلات الملساء، وأكد ذلك [21] من خلال استعماله تقانة التبادل الأيوني بوساطة المبادل CM-Sephadex ووجد أن القمة الثالثة الموجودة في سم *V. magnifica* المستحصل عليها باستعمال الترشيح الهلامي بهلام Sephadex G-50 تحوي على 12 جزء، وعند التحري عن فعالية هذه الاجزاء المنفصلة لاحظ أن الجزء المنفصل الأخير يحتوي على نشاط مقلص للعضلات الملساء، وعليه قام بتنقيته باستعمال تقانة كروماتوغرافي السائل عالي الأداء (HPLC) وحصل من خلاله على 20 جزء منفصل، كما تمكن [11] من تنقية سم *Agelaia pallipes* والحصول على أجزاء منفصلة عدة لها فعالية تحليلية باستعمال تقانة الترشيح الهلامي بوساطة هلام Sephadex G-100، كما أشارت بعض الأبحاث الأخرى إلى استعمال تقانات أخرى كالترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد (PAGE) على نطاق واسع في الدراسات الجزيئية للحشرات والتي تعتمد على مقدار حركة البروتينات الموجودة في السم خلال المجال الكهربائي بوجود أو غياب العوامل الماسخة [3].

تقدير الوزن الجزيئي

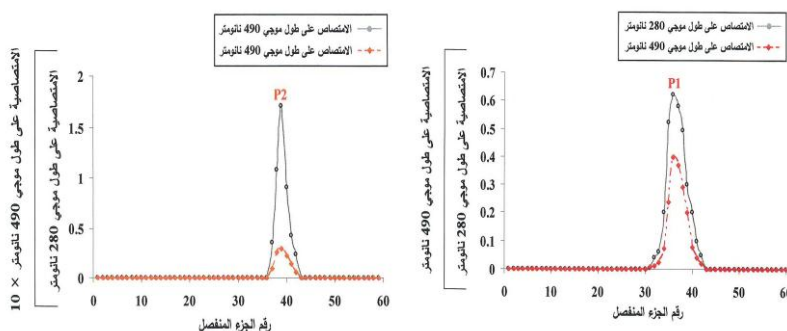
تبين النتائج المستحصل عليها ان الوزن الجزيئي للقممة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* بلغ 17782 دالتون، بينما كان الوزن الجزيئي للقممة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* 22382 دالتون الشكل-5، وعند مقارنة هذه النتائج مع البحوث والدراسات السابقة حول تحديد الاوزان الجزيئية للبروتينات المفصولة لوحظ وجود تباين في النتائج المستحصل عليها، فقد اشار [9] الى ان البروتين المنفصل من سم *C. alata* المسؤولة عن تحلل كريات الدم الحمراء لدى الايقار يمتلك وزنا جزيئيا مقداره 42000 دالتون، اما [3] فقد بين حصوله على 48 بروتين منفصل من سم *V. orientalis* تراوح الوزن الجزيئي لهم بين 6000 الى 375000 دالتون، في حين اكد [11] انه حصل على ثلاثة بروتينات منفصلة من سم *A. pallipes* كانت باوزان جزيئية مقدارها 14000 و 42000 و 74000 دالتون، ويعزى التباين في قيم الوزن الجزيئي للبروتينات المنفصلة الى الطريقة المتبعة في تنقية البروتينات المنفصلة من السم والتقانة المستعملة في تحديد الوزن الجزيئي كالترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي فضلا عن حالة البروتين المنفصل ذاته، اذ تعطي البروتينات السكرية بشكل عام في الترشيح الهلامي وزنا جزيئيا اكبر من الواقع وذلك بسبب مساهمتها في زيادة سرعة حركة البروتين خلال عمود الفصل المستعمل [22].



شكل 5- المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للقممة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقممة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus*.

دراسة المحتوى الكربوهيدراتي

أظهرت النتائج المستحصلة أن نسبة الكربوهيدرات في القممة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* بلغت 60.057 مايكروغرام/ ملتر، في حين كانت 44.460 مايكروغرام/ ملتر في القممة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* عند تقديرها بطريقة الفينول حامض الكبريتيك، وهذا يدل على أن تلك البروتينات من نوع البروتينات السكرية، وعند التحري عن نوع الارتباط بين الكربوهيدرات والبروتين فيها، لوحظ انه من النوع التساهمي، إذ يبين الشكل-6 لكل من القمتين (P1) و (P2) وجود ارتباط تساهمي بين كلا البروتينين والكربوهيدرات نتيجة تطابق قيمة الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر مع الامتصاصية على طول موجي 490 نانومتر بالرغم من استعمال محلول داري ذي قوة أيونية عالية كان الهدف منه فك كافة الارتباطات اللاتساهمية في حالة وجودها من اجل التحقق من كون البروتينات المنفصلة هي من نوع البروتينات السكرية.

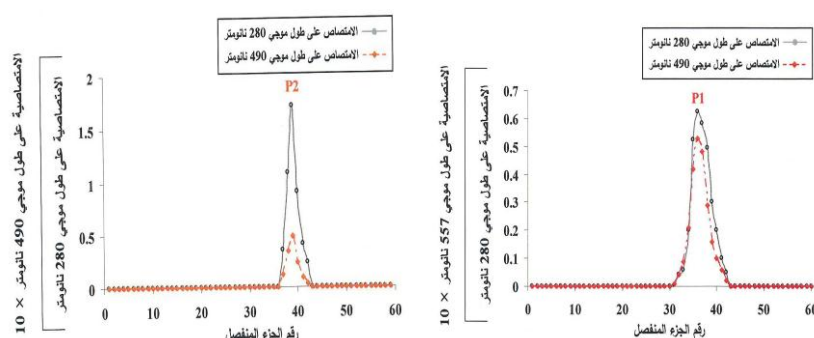


شكل 6- اثبات وجود ارتباط تساهمي بين البروتين والكربوهيدرات للقممة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقممة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* باستعمال كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-200.

يلاحظ من النتائج المشار إليها في أعلاه يلاحظ أن القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* و القمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* هي من نوع البروتينات السكرية Glycoprotein التي تتكون من وجود جزيئات سكرية في تركيب البروتين وتشمل طيف واسع من المركبات البروتينية مثل الأنزيمات والهرمونات والكلوبيولينات المناعية [20]، ويعود وجود الكربوهيدرات بصورة عامة في بعض أنواع البروتينات إلى فسلفة الكائن الحي في إنتاج مثل هذه الأنواع من البروتينات، إذ يؤدي وجود الكربوهيدرات إلى إكسابها حماية عالية تجاه الظروف الخارجية التي يعمل بها البروتين من درجة حرارة واس هيدروجيني فضلا عن مساهمته الفاعلة في تدعيم الشكل الفراغي للبروتين وإكسابه الصلابة المطلوبة ليؤدي العمل المطلوب في الخلية [22].

دراسة محتوى الحديد

جرى التحري عن وجود الحديد النوعي في القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* باستعمال تقانة الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 على طول موجي مقداره 557 نانومتر، وقد لوحظ وجود تطابق بين قمة الامتصاصية على هذا الطول الموجي وقمة الامتصاصية على طول موجي مقداره 280 نانومتر، وهذا يثبت احتواء القمتين (P1) و (P2) على الحديد كما في الشكل-7، وبينت نتائج تقدير نسبة الحديد باستعمال جهاز الامتصاص الذري أنها بلغت 0.88 جزء بالمليون في القمة (P1)، بينما كانت 0.44 جزء بالمليون في القمة (P2).



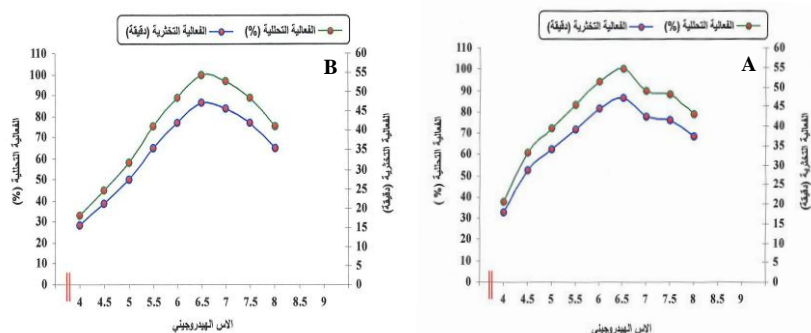
شكل 7- الكشف عن وجود الحديد للبروتين في القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الاصفر *P. olivaceus* باستعمال كروماتوگرافي الترشيح الهلامي بمغود S-200.Sephacryl

من خلال النتائج المشار إليها في أعلاه يلاحظ أن القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* هما من أنواع البروتينات المعدنية Metallo proteins التي تعرف بأنها البروتينات التي تمتلك جزء غير بروتيني من المعادن كالحديد والنحاس والزنك والمغنسيوم، ومن أمثلتها الفيريتين وهو عبارة عن بروتين يستعمله الجسم في تخزين الحديد من الأنسجة ليتم استعماله في حالة نقص نسبة الحديد في الجسم ومنها أيضا الهيموكلوبين المكون من أربع مجاميع من الهيم في كل واحدة منها ذرة حديد أي أن كل جزء هيموكلوبين يمتلك أربع ذرات حديد، الذي له دورا هاما في عمل رابطة ضعيفة مع الأوكسجين من اجل نقله من الرئتين إلى الجسم لإتمام عملية الأوكسدة ونقل ثاني أوكسيد الكربون من خلايا الجسم إلى الرئتين [20]، كما يساهم وجود الايونات المعدنية في جزيئة البروتين إلى المحافظة على الهيئة الفراغية المطلوبة للبروتين من اجل إتمام عمله والمساهمة الفاعلة توجيه البروتينات نحو الهدف المطلوب نظرا لقدرته في تبادل الايونات التي يمتلكها، وفي أحيان كثيرة فأن سحب المعدن من جزيئة البروتين يؤدي إلى انهياره وفقدان فعاليته التي خلق من اجلها [22].

تحديد الاس الهيدروجيني الأمثل في الفعالية والثبات

يظهر الشكل-8A أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* التحليلية والتخثرية بلغ 6.5، بينما شهدت الفعالية التحليلية انخفاضا عند قيم الاس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8 وحتى بلغت 38 و 79% من الفعالية الأصلية على التوالي، في حين انخفض وقت التخثر من 47.3 دقيقة عند الاس الهيدروجيني الأمثل ليصل إلى 17.9 و 37.3 دقيقة عند الاس الهيدروجيني 4 و 8 على التوالي، ويلاحظ من الشكل-8B أن الفعالية التحليلية للقمة (P1) كانت ثابتة في مدى من قيم الاس الهيدروجيني تراوح بين 6 إلى 7.5 إلا انها فقدت 67 و 25% من فعاليتها الأصلية عند قيم الاس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8، وسجل أعلى وقت للتخثر عند اس هيدروجيني مقداره 6.5 ليبلغ 47.3 دقيقة، في حين كان وقت التخثر ثابتا في

مدى من قيم الـ اس الهيدروجيني تراوح بين 6 إلى 7.5 إلا انه انخفض عند قيم الـ اس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8 مسجلا وقتا مقداره 15.6 و 35.4 دقيقة على التوالي.

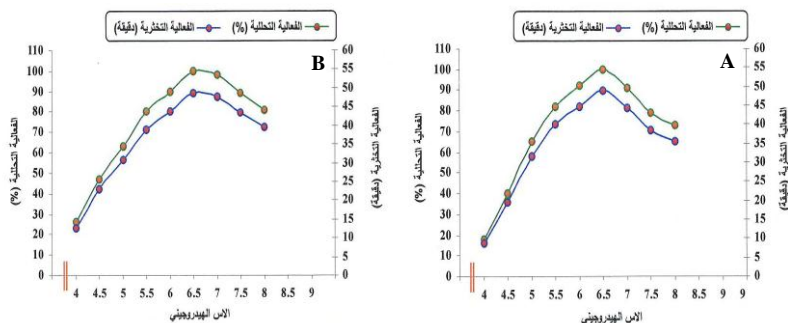


شكل 8- الـ اس الهيدروجيني الأمثل في فعالية وثبات القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis*، اذ يمثل:

A: منحى الـ اس الهيدروجيني الأمثل للفعالية التحليلية والتخثرية.

B: منحى الـ اس الهيدروجيني الأمثل لثبات الفعالية التحليلية والتخثرية.

يبين الشكل-9A أن الـ اس الهيدروجيني الأمثل لفعالية القمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* التحليلية والتخثرية بلغ 6.5، إلا أن الفعالية التحليلية شهدت انخفاضا عند قيم الـ اس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8 لتكون 18 و 37% من الفعالية الأصلية على التوالي، كما سجل وقت التخثر انخفاضا ملحوظا من 48.8 دقيقة عند الـ اس الهيدروجيني الأمثل 6.5 ليكون 8.7 و 35.6 دقيقة عند الـ اس الهيدروجيني 4 و 8 على التوالي، ويشير الشكل-9B إلى أن الفعالية التحليلية للقمة (P2) كانت ثابتة في مدى من قيم الـ اس الهيدروجيني تراوحت بين 5.5 إلى 8، إلا انها فقدت 74 و 19% من فعاليتها الأصلية عند قيم الـ اس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8، وبلغ أعلى وقت تخثر 48.8 دقيقة عند اس هيدروجيني مقداره 6.5، في حين كان وقت التخثر ثابتا في مدى من قيم الـ اس الهيدروجيني تراوح بين 6 إلى 7.5 إلا انه انخفض عند قيم الـ اس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 8 مسجلا وقتا مقداره 12.6 و 39.5 دقيقة على التوالي.



شكل 9- الـ اس الهيدروجيني في فعالية وثبات القمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus*، اذ يمثل:

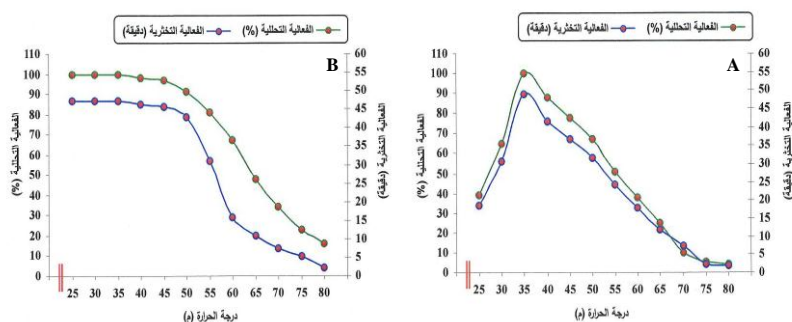
A: منحى الـ اس الهيدروجيني الأمثل للفعالية التحليلية والتخثرية.

B: منحى الـ اس الهيدروجيني الأمثل لثبات الفعالية التحليلية والتخثرية.

يلاحظ مما سبق وجود بعض التباين في قيم الـ اس الهيدروجيني المسجلة لفعالية وثبات القمة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* والقمة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* والذي يعزى إلى اختلاف المصدر وتركيب السم ومحتواه من الأحماض الامينية ونسبة الكربوهيدرات، إذ يعزى السبب في انخفاض الفعالية التحليلية والتخثرية عند قيم الـ اس الهيدروجيني المتطرفة إلى حدوث تغييرات واضحة في هيئة البروتين مما يؤدي إلى فقدان الفعالية نتيجة تغير الهيئة الفراغية للشكل الثنائي والثلاثي للبروتين، إذ يؤثر التغيير في قيم الـ اس الهيدروجيني على المجاميع الفعالة القابلة للتأين والموجودة في جزيئة البروتين [18].

تحديد درجة الحرارة المثلى في الفعالية والثبات

يشير الشكل-10A إلى حصول زيادة واضحة في الفعالية التحليلية والتخثرية للقمّة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis* بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 35م ثم انخفضت الفعالية التحليلية بشكل تدريجي حتى بلغت حوالي 4% من فعالية السم القسوى عند درجة حرارة 80م، بينما انخفض وقت التخثر من 48.8 دقيقة عند درجة الحرارة المثلى ليصل إلى 1.8 دقيقة عند درجة حرارة 80م، بينما يبين الشكل-10B أن الفعالية التحليلية والتخثرية للقمّة (P1) كانت ثابتة بدرجة حرارة 35م لمدة 30 دقيقة، إلا أنها بدأت بالتناقص مع ازدياد درجة الحرارة، إذ فقد 2 و3 و9 و19 و33 و52 و66 و77 و84% من فعاليتها التحليلية الأصلية عند درجة حرارة 40 و45 و50 و55 و60 و65 و70 و75 و80م على التوالي، وانخفض وقت التخثر من 47.3 دقيقة عند درجة حرارة 35م ليكون 46.3 و45.8 و43 و31.2 و16 و10.8 و7.5 و5.2 و2.3 دقيقة عند درجة حرارة 40 و45 و50 و55 و60 و65 و70 و75 و80م على التوالي.

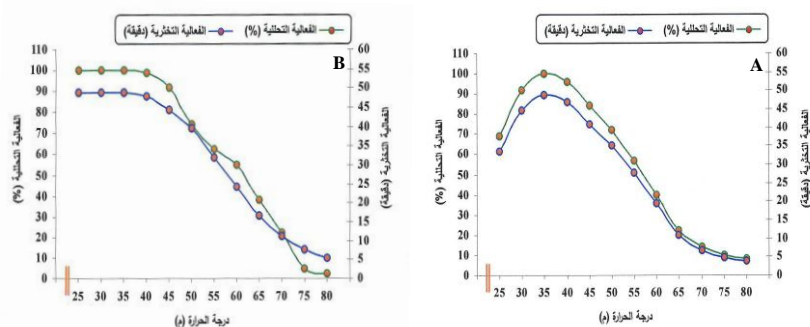


شكل 10- درجة الحرارة المثلى في فعالية وثبات القمّة (P1) المنقاة من سم الزنبور الأحمر *V. orientalis*، إذ يمثل:

A: درجة الحرارة المثلى للفعالية التحليلية والتخثرية.

B: درجة الحرارة المثلى لثبات الفعالية التحليلية والتخثرية.

يلاحظ من الشكل-11A وجود زيادة في الفعالية التحليلية والتخثرية للقمّة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus* بارتفاع درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 35م ثم انخفضت الفعالية التحليلية بشكل تدريجي حتى بلغت حوالي 8% من فعالية السم القسوى عند درجة حرارة 80م، في حين انخفض وقت التخثر من 48.8 دقيقة عند درجة الحرارة المثلى ليصل إلى 3.9 دقيقة عند درجة حرارة 80م، بينما يشير الشكل-11B إلى أن الفعالية التحليلية والتخثرية للقمّة (P2) كانت ثابتة بدرجة حرارة 35م لمدة 30 دقيقة، إلا أنها بدأت بالتناقص مع ازدياد درجة الحرارة، إذ فقد 1 و8 و26 و38 و45 و62 و78 و95 و98% من فعاليتها التحليلية الأصلية عند درجة حرارة 40 و45 و50 و55 و60 و65 و70 و75 و80م على التوالي، وانخفض وقت التخثر من 48.8 دقيقة عند درجة حرارة 35م ليكون 47.8 و44.4 و39.5 و32 و24.4 و16.5 و11.2 و7.8 و5.3 دقيقة عند درجة حرارة 40 و45 و50 و55 و60 و65 و70 و75 و80م على التوالي.



شكل 11- درجة الحرارة المثلى في فعالية وثبات القمّة (P2) المنقاة من سم الزنبور الأصفر *P. olivaceus*، إذ يمثل:

A: درجة الحرارة المثلى للفعالية التحليلية والتخثرية.

B: درجة الحرارة المثلى لثبات الفعالية التحليلية والتخثرية.

أظهرت جميع الدراسات السابقة ان سم الزنبور عبارة عن مادة بروتينية، لذا فأنها غالباً ما تتأثر بالظروف المحيطة بها مثل الاختلاف في درجة الحرارة، إذ يؤدي ازدياد درجات الحرارة إلى حصول تغييرات واضحة في مكونات التفاعل يرافقه حصول زيادة مستمرة في الفعالية التحليلية والتخثرية بسبب زيادة فرصة حدوث التصادمات نتيجة زيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تأثير درجات الحرارة، إلا أن ازدياد درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى للتفاعل تؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية بسبب تأثيرها بشكل سلبي في تركيب البروتين والهبة الفراغية التي يتمثل بها [18].

المصادر

1. Buck, M., Marshall, S. A. and Cheung, D. K. B. **2008**. Identification atlas of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of the northeastern Nearctic region, *Canadian Journal of Arthropod Identification*, 5, pp:1-492.
2. Dvořák, L. **2006**. Oriental hornet *Vespa orientalis* linnaeus, 1771 found in Mexico (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae), *Entomological Problems*, 36(1), p: 80.
3. Abdel-Gahny, G. M., Zalat, S. M., Abo-Ghalia, A. H. and Semida, F. M. **2008**. Ecological studies of some insects associated with Bedouin settlements in St Katherine Protectorate, South Sinai, Egypt, *Egyptian Journal of Biology*, 10, pp:95-103.
4. Hoffman, D. R. **2006**, Hymenoptera venom allergens, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 30(2), pp:109-128.
5. Dos Santos, L. D., Santos, K. S., Pinto, J. R., Dias, N. B., de Souza, B. M., dos Santos, M. F., Perales, J., Domont, G. B., Castro, F. M., Kalil, J. E. and Palma, M. S. **2010**. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism, *Journal of Proteome Research*, 6(9, 8), pp:3867-3877.
6. Czaikoski, P. G., Menaldo, D. L., Marcussi, S., Baseggio, A. L., Fuly, A. L., Paula, R. C., Quadros, A. U., Romão, P. R., Buschini, M. L., Cunha, F. Q., Soares, A. M. and Monteiro, M. C. **2010**. Anticoagulant and fibrinolytic properties of the venom of *Polybia occidentalis* social wasp, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 21(7), pp:653-659.
7. Haim, B., Rimon, A., Ishay, J. S. and Rimon, S. **1999**. Purification, characterization and anticoagulant activity of a proteolytic enzyme from *Vespa orientalis* venom, *Toxicon*, 37(5), pp:825-829.
8. Tučhibaev, M. U., Akhmedova, N. U. and Muksimov, F. A. **1988**. Hemolytic effect of phospholipase A2 and orientotoxin from venom of the great hornet, *Vespa orientalis*, *Biochemistry*, 53(3), pp:434-443.
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), pp:981-990.
10. Chen, L., Chen, W., Yang, H. and Lai, R. **2010**. A novel bioactive peptide from wasp venom, *Journal of Venom Research*, 1, pp:43-47.
11. Costa, H. and Palma, M. S. **2000**. Agelotoxin: a phospholipase A₂ from the venom of the neotropical social wasp *Agelaius pallipes* (Hymenoptera-Vespidae), *Toxicon*, 38, pp: 1367-1379.
12. Mukund, H. and Gawade, S. P. **2011**. Evaluation of effects of photo oxidized *Vespa orientalis* venom on memory and learning in rats, *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(4), pp:422-429.
13. Bradford, M. M. **1976**. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, pp:248-254.
14. Mortari, M. R., Cunha, A. O. S., de Oliveira, L., Gelfuso, E. A., Vieira, E. B. and dos Santos, W. F. **2005**. Comparative toxic effects of the venoms from three wasp species of the genus *polybia* (Hymenoptera, Vespidae), *Journal of Biological Sciences*, 5(4), pp:449-454.
15. الصوفي، محمد عبد الرزاق علي. **2001**. فصل انزيم البيروكسيد وتنقيته وتوصيفه من الحليب النباتي لنبات الديباج *Calotropis procera* وامكانيه استخداماته التطبيقية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
16. Dubois, N., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. **1956**. Colorimetric method for detection of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, pp:350-356.

17. Horwitz, W. **2000**. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed., Gaithersburg, Md., AOAC International.
18. Dutta, T. Kr., Jana, M., Pahari, P. R. and Bhattacharya, T. **2006**. The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodyptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida), *Turkish Journal of Zoology*, 30, pp:187-195.
19. Szasz, G. **1974**. The effect of temperature on enzyme activity and on the affinity of enzymes to their substrates, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 12(4), pp:166-170.
20. Heng, L., Pengfei, G., Xiumei, W., Zizhong, Y., Weihong, L., Joachim, S., Chenggui, Z. and Yu, Z. **2012**. Utilization of polislidae wasp Venom as potential insect drugs in the R&D of wellness industry, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1, pp:241-249.
21. Xu, X., Li, J., Lu, Q., Yang, H., Zhang, Y. and Lai, R. **2006**, A two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom, *Toxicon*, 47, pp:249-253.
22. Wittmann, V, **2008**, *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, Part 8, Glycoproteins: Properties, pp:1771-1793.