Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Isolation, Characterization, and Biological Activity of Phospholipase A2 (PLA2) and Hyaluronidase from Iranian Honey Bee Venom (*Apis Mellifera meda*)

Mahmood Nazari

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email address: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

Hedaiat allah Rooshanfekr

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email: roshanfekr_hd@yahoo.com

Fatemeh Salabi

Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz-Iran. E-mail: f.salabi@rvsri.ac.ir

Abstract

Objective

Bee venom contains various enzymes such as hyaluronidase and phospholipase A2, which have medical and pharmaceutical applications. In several studies, the activity of phospholipase A2 and hyaluronidase has been reported in different bee species, but there is no report about these enzymes and their activities in Iranian honey bee venom. Therefore, the purpose of this research was to isolate, identify phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes and measure their activity in crude venom and its fractions of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*).

Materials and methods

One hundred mg of the crude venom was purified using gel filtration chromatography on sephadex G-50, equilibrated with 0.05mM ammonium acetate buffer. SDS-PAGE was used to determine the protein profile of BV and its fractions. Protein concentration, phospholipase A2 and hyaluronidase enzyme activity of *Apis mellifera* crude venom and its fractions were

measured. Protein concentration of *Apis mellifera* crude venom and its fractions was determined using Bradford method. Phospholipase A2 (PLA2) activity was determined using suspension of egg yolk as substrate. The activity of hyaluronidase was determined turbidimetrically.

Results

The preliminary results showed that the 56% of crude venom was protein. Crude venom produced three fractions. Phospholipase A2 activity was observed in the crude venom as well as in the first and second fractions. The second fraction showed the highest phospholipase activity. Hyaluronidase activity was observed in crude venom and only in the first fraction. The optimal activity of bee venome phospholipase A2 enzyme was obtained at pH 7 and 37 °C. In this study, it was found that the activity of hyaluronidase in Iranian honey bee venom has the highest activity at 37 to 39 °C and gradually loses its activity as the temperature increases. Also, the results of this study indicate that the optimum pH for hyaluronidase enzyme activity is 5.5.

Conclusions

Iranian honey bee venom has both phospholipase and hyaluronidase activities, which can be separated using gel filtration chromatography. This study can be introduced as a simple method to isolate, purify and measure the activity of hyaluronidase and phospholipase A2 enzymes of Iranian honey bee venom. Purified hyaluronidase and phospholipase A2 enzymes can be used in industry and research.

Keywords: *Apis Mellifera meda*, Phospholipase, Hyaluronidase.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Nazari M, Roshanfekr H, Salabi F (2023) Isolation, characterization, and biological activity of Phospholipase A2 (PLA2) and Hyaluronidase from Iranian honey bee venom (Apis Mellifera meda). *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 141-156.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 141-156. DOI: 10.22103/jab.2023.13636.1437

Received: March 12, 2023. Received in revised form: May 12, 2023.

Accepted: May 13, 2023. Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز زهر زنبور عسل ایرانی (Apis mellifera meda)

محمود نظری

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران. رایانامه: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

هدایت اله روشنفکر

استاد گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران. رایانامه: roshanfekr_hd@yahoo.com

فاطمه ثعلبی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی– موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر– اهواز، ایران. رایانامه: f.salabi@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

چکیده

هدف: زهر زنبور عسل حاوی آنزیم هایی مختلفی نظیر هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 است که بعضی از آنها کاربرد دارویی و پزشکی دارند. در تحقیقات متعددی، فعالیت فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز در گونه های مختلف زنبور عسل گزارش شده است اما گزارشی در مورد این آنزیم‌ها و چگونگی فعالیت آنها در زهز زنبور عسل ایرانی وجود ندارد. لذا هدف از این تحقیق جداسازی، شناسایی آنزیم‌های فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنها در زهر خام و اجزای زهر زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بود.

مواد و روش ها: ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل با کمک کروماتوگرافی سفادکس G-50 در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی مولار خالص‌سازی شد. جهت بررسی پروفایل پروتئینی زهر و جزءبندی از روش الکتروفورز عمودی استفاده گردید. سپس مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز در زهر خام و فراکسیو ن‌های جدا شده اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین در

زهر خام عسل ایرانی و اجزای آن با استفاده از پروتئین سنجی بروش برادفورد تعیین گردید. میزان فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 با استفاده از سوسپانسیون زرده تخم مرغ به عنوان سوبسترا تعیین شد و میزان فعالیت هیالورونیداز روی هیالورونیک اسید به روش توربیدومتری آزمایش شد.

نتایج: نتایج اولیه نشان داد که ۵۶ درصد زهر خام پروتئین بوده است. زهر خام به ۳ پیک (جزء) مجزا شد. فعالیت فسفولیپاز A2 در زهر خام و پیک اول و دوم مشاهد شد. فراکسیون دوم بیشترین فعالیت فسفولیپازی را نشان داد. فعالیت هیالورونیدازی در زهرخام و تنها در پیک اول مشاهده شد. فعالیت بهینه آنزیم فسفولیپاز A2 در pH برابر ۷ و دمای ۳۷درجه سانتیگراد بدست آمد. در این مطالعه مشخص شد که فعالیت هیالورونیداز در زهر زنبور عسل ایران بیشترین فعالیت را در دمای ۳۷ تا ۳۹ درجه دارد و با افزایش درجهٔ حرارت به تدریج فعالیت خود را از دست می‌دهد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که pH ایده‌آل برای فعالیت آنزیم هیالورونیداز ۵/۵ می‌باشد.

نتیجه گیری: زهر زنبور عسل ایرانی دارای هر دو فعالیت فسفولیپازی و هیالورونیدازی می‌باشد که با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون می‌توان آنها را جدا کرد. این بررسی می‌تواند به عنوان روشی برای جداسازی، تخلیص و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل ایرانی معرفی شود. آنزیم‌های هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 خالص سازی شده می‌توانند جهت استفاده در صنعت و تحقیقات مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: زنبور عسل ایران، هیالورونیداز، فسفولیپاز

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نظری محمود، روشنفکر هدایت اله، ثعلبی فاطمه (۱۴۰۲) جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز زهر زنبور عسل ایرانی (Apis mellifera meda). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۱۴۱-۱۵۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

امروزه مطالعه گونه‌های بومی زنبور عسل به منظور شناخت ظرفیت‌ها و حفاظت از آنها بطور گسترده مورد توجه قرار گرفته است (Rohipoor et al. 2019). در این راستا استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی می‌تواند اطلاعات مناسبی برای مطالعه این گونه‌ها فراهم کند. مطالعه گونه‌های بومی علاوه بر جمع‌آوری حجم زیاد اطلاعات، مولفه‌های لازم برای ارزیابی جمعیت‌های مختلف

را فراهم می‌کند (Rohipoor et al. 2021; Mohammadabadi et al. 2018; Mohamadi ahvazi et al. 2019). یکی از این گونه‌های بومی که می‌تواند اهمیت اقتصادی و غذایی داشته باشد، زنبور عسل ایرانی است (Bahador et al., 2016). زنبور عسل از جانوران متعلق به دسته حشرات و راسته پرده بالان است که نقش کلیدی در تولید محصولات کشاورزی از طریق گرده افشانی دارد. علاوه بر این، این جانور توانایی تولید محصولاتی نظیر عسل، ژل رویال، زهر، گرده گیاهان، موم و بره موم را دارد (Morammazi and Mirhosseini 2020). اما با این وجود تاکنون در کشور ما کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است.

زهر زنبور مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها است که در آن برخی آنزیم‌ها (کاتالیزور واکنش‌های خاص)، برخی پپتیدها (که از دو یا چند اسید آمینه تشکیل شده‌اند) و برخی دیگر از جمله انواع اجزای کم مولکولی مانند کربوهیدرات ها (۲ درصد وزن خشک زهر)، فسفولیپیدها (۵ درصد وزن خشک زهر)، اسیدهای آمینه (۱ درصد وزن خشک زهر)، مواد معدنی (۳-۴ درصد وزن خشک زهر)، و ترکیبات فرار (۵-۸ درصد وزن خشک زهر) مشاهده می‌شود. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان هیالورونیداز و فسفولسپاز A2 را نام برد (Lima and Brochetto-Braga 2003; Alia et al. 2013). زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتویید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار گرفته است (Ghabili et al. 2009). بنابراین، خالص‌سازی زهر زنبور عسل و بررسی خواص بیوشیمیایی آن می‌تواند در درک جنبه‌های درمانی آن مفید باشند. همچنین شناسایی عملکرد مفید و مضر هرکدام از این‌ها می‌تواند جهت شناخت بیشتر مکانیسم‌های التهابی مفید واقع گردد (Gihyun and Hyunsu 2006).

فسفولیپاز A2 بعنوان یکی از ترکیبات مهم زهر زنبور عسل می‌باشد که حدود ۱۲-۱۰ درصد ماده خشک زهر را به خود اختصاص می‌دهد و بعنوان یک آلرژن عمده مطرح می‌باشد. این آنزیم در حشرات دیگر، آراکنیدها، مارها و سلول‌های پستانداران یافت می‌شود (Samel et al. 2013). همچنین در سلول ها سبب آزادسازی آراشیدونیک اسید و تولید ایکوزانوئیدها می‌گردد که از واسطه‌های التهابی قوی می‌باشند (Murakami et al. 2015). فسفولیپاز کاربردهای کلینیکی متنوعی دارد. با توجه به کاربردهای کلینیکی فراوان فسفولیپاز A2 ، بنظر می‌رسد که کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن می‌تواند کاربردهای درمانی و دارویی داشته باشد. هیالورونیداز یکی از آنزیم‌های دیگر موجود در زهر زنبور می‌باشد که بعد از میلیتین و فسفولیپاز از اهمیت بالایی برخوردار است. هیالورونیدازهای زهر زنبور عسل با موفقیت در پزشکی همراه با داروهای ضد سرطان استفاده شده است (Moga et al. 2018). آنزیم هیالورونیداز در آسیب موضعی بافت‌ها و التهاب از طریق تخریب هیالورونات بافت پیوندی و کلاژن عروق خونی نقش دارد (Salabi and Jafari 2022; Pessini et al. 2001) وجود این آنزیم در زهر به طور عمده به عنوان فاکتور انتشار زهر شناخته شده است (Morey et al. 2006). تحقیقات زیادی فعالیت فسفولیپاز (Owen et al. 1990; Topchiyeva and Farida 2015; Pattabhiramaiah et al. 2020; Darwish et al. 2021; Abdel-Monsef et al. 2020;) و هیالورونیداز (Santos et al. 2013; Marković-Housley et al. 2000; Kemeny et al. 1984; Topchiyeva and

Mammadova 2016) را در گونه‌های مختلف زنبور عسل گزارش کرده‌اند اما گزارشی در مورد این آنزیم‌ها و چگونگی فعالیت آنها در زهز زنبور عسل ایرانی وجود ندارد. لذا هدف از این تحقیق جداسازی، شناسایی این آنزیم‌های ذکر شده از زهر زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) و اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم‌ها بود.

مواد و رو ش‌ها

جمع‌آوری زهر: زهر زنبور عسل به وسیله دستگاه زهرگیر زنبورعسل اورین (شرکت اورین عسل اصغرپور) نسخه ۷ (https://avrinasal.ir) از یکی از کندوهای زنبور عسل ایرانی واقع در زنبورستانی در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد. این دستگاه با ارسال شوک و پالس گردشی، باعث تحریک زنبورهای عسل می‌شود و زنبورها زهر خود را روی شیشه فریم زهرگیری می‌ریزند. زهر از روی صفحه، جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

جزءبندی زهرخام با کروماتوگرافی: ستون ژل کروماتوگرافی سفادکس G-50 به مدت ۴۸ ساعت در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی مولار با pH برابر ۴/۷۵ به تعادل رسید. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل در ۲ میلی‌لیتر بافر استات آمونیوم حل گردید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی حاصل به تدریج به ستون تزریق گردید. بعد از اینکه نمونه به خوبی جذب ستون شد، شستشوی ستون با بافر ذکر شده انجام گرفت. محلول خروجی از ستون ژل کروماتوگرافی به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک با سرعت جریان ۶۰ میلی‌لیتر در ساعت جمع آوری شد. سپس جذب نمونه‌های خروجی در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید. تمامی پیک ها (اجزاء) ۲۴ ساعت در مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز و در ۴ درجه سانتیگراد تغلیظ شدند (Zolfagharian et al. 2016).

اندازه گیری فعالیت هیالورونیداز: فعالیت هیالورونیداز روی هیالورونیک اسید (سیگما آلدریچ، ۵۳۷۴۷) به روش توربیدومتری اندازه‌گیری شد (Pukrittayakame et al. 1988). ابتدا در یک سری لولهٔ آزمایش مقادیر مختلف زهر خام و فراکسیون های مورد آزمایش از ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر ریخته و سپس حجم هر لوله با بافر استات حاوی استات سدیم - اسید استیک ۰/۲ مولار با PH برابر ۵/۵ حاوی Nacl ۰/۱۵ مولار به ۴۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر هیالورونیک اسید (۰/۵ میلیگرم بر میلی لیتر در بافر استات) افزوده شد. یک لولهٔ آزمایش حاوی همهٔ مواد آزمایش به جز زهر خام در همین شرایط گذاشته شد که بعداً نمونه ها با آن سنجیده شدند (این لوله به عنوان صد در درصد کدورت در نظر گرفته شد). همهٔ لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد انکوبه شدند و سپس واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر ستیل تری متیل آمونیوم برمید (سیگما آلدریچ، H5882) (۲/۵ درصد وزنی/حجمی‌در سود ۲ درصد) متوقف شد. جذب نوری هر نمونه در طول ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ نانومتر با کمک یک اسپکتروفتومتر مدل (M501 Single Beam Scanning) خوانده شد. فعالیت هیالورونیداز به صورت درصد هیالورونات هیدرولیز شده در مقایسه با جذب لولهٔ آزمایش بدون زهر (آنزیم) به عنوان صد درصد توربیدیتی محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2: از روش مارینتی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 در زهر خام و فراکسیون‌های جدا شده استفاده شد (Marinetti 1965). برای تهیه سوسپانسیون، یک زرده تخم مرغ در سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد سدیم کلراید) حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسید. زرده تخم مرغ به عنوان منبع لسیتین استفاده گردید. سوسپانسیون کار برای اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز با رقیق‌سازی (تهیه رقت ۱۰) این سوسپانسیون در سدیم کلراید ۰/۹ درصد فراهم شد. به ۰/۱ میلی لیتر از زهر با غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ اضافه گردید (در لوله شاهد فقط ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ می‌ریزیم) و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۹۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر مدلM501 Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotomete خوانده شد. اختلاف جذب لوله شاهد با نمونه ها عبارت است از مقادیر فسفولیپاز زهر. هر ۱ درصد اختلاف جذب مربوط به یک واحد در هر میلی گرم بود.

۱۰۰۰* (جذب نمونه – جذب شاهد) = فسفولیپاز (برحسب واحد در میلی گرم)

هر واحد (U) عبارت است از مقادیری از آنزیم که بتواند ۱ درصد کاهش در جذب سوسپانسیون زرده تخم مرغ بوجود آورد. جهت بررسی اثر درجهٔ حرارت روی فعالیت آنزیم هیالورونیداز، فعالیت هیالورونیداز زهر زنبور عسل ایرانی در درجهٔ حرارت‌های مختلف بین ۳۳ تا ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد. برای تعیین بهترین pH مناسب جهت فعالیت هیالورونیداز بافرهای ۰/۲ مولار استات سدیم با pH متفاوت ۴ تا ۸ مورد بررسی قرار گرفت.

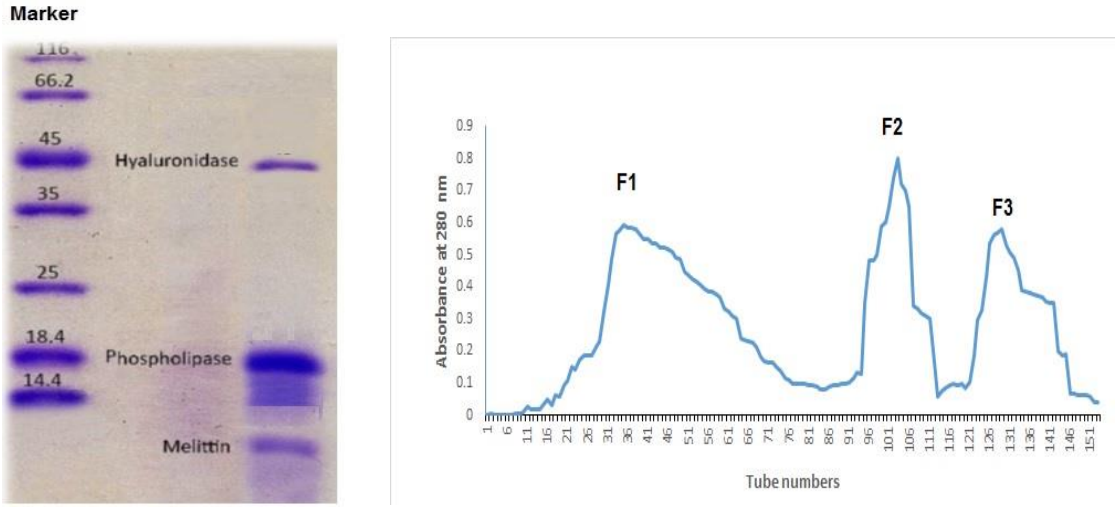
پروتئین سنجی: مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد (Bradford 1976). جذب نوری تمام لوله ها پس از کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با محلول بلانک در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و نمودار استاندارد تهیه گردید. در نهایت غلظت پروتئین مجهول با استفاده از جذبی که در محدوده جذب پروتئین استاندارد قرار دارد، طبق معادله خط نمودار محاسبه گردید (Greenfield 2018).

الکتروفورز عمودی: برای مشاهده تعداد باندهای پروتئینی در زهر خام زنبور عسل از تکنیک الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) به روش لاملی (Laemmli 1970) با ژل ۱۲ درصد و از رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده شد. در این روش جهت جدا نمودن باند های پروتئینی، از ژل متراکم کننده ۴ درصد و ژل جدا کننده ۱۲ درصد استفاده شد. جهت آماده سازی نمونه ۷ میلی گرم زهر را با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل کرده یک شبانه روز در یخچال نگه داشته تا سم فعال گردد. سپس ۲۵ میکرولیتر از این محلول را با ۲۵ میکرولیتر بافر نمونه SDS-PAGE مخلوط نموده و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۲ میکرولیتر آن را داخل چاهک مربوطه ریخته و برای تعیین وزن مولکولی باندهای بدست آمده، از مارکر پروتئینی (Thermo Fisher Scientific Pierce™ unstained protein MW marker) استفاده گردید. سپس ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم شد و تا زمان رسیدن خط رنگ

به انتهای ژل عمل الکتروفورز ادامه یافت. پروتئین ها براساس وزن مولکولی روی ژل حرکت کردند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از دستگا ه خارج گردید و جهت رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو استفاده گردید. جهت تهیه محلول رنگ ۲ گرم پودر کوماسی بلو را با ۹۰۰ میلی لیتر متانول ۵۰ % و ۱۰۰ میلی لیتر اسید به منظور تهیه محلول رنگ، استیک گلاسیال مخلوط گردید. جهت ساخت محلول رنگ بر ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر و۱۵۰ میلی لیتر اسید استیک با هم مخلوط شد. ژل پس از نیم ساعت قرارگرفتن در محلول رنگ آمیزی، از محلول رنگ خارج و در محلول رنگ بر قرار گرفت، تا باندهای پروتئینی آبی رنگ مشخص گردند. سپس از ژل تصویر تهیه گردید. در انتها، نتایج آزمایشات مختلف بر حسب میانگین ± انحراف معیار با ۳ بار تکرار بیان گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج و بحث

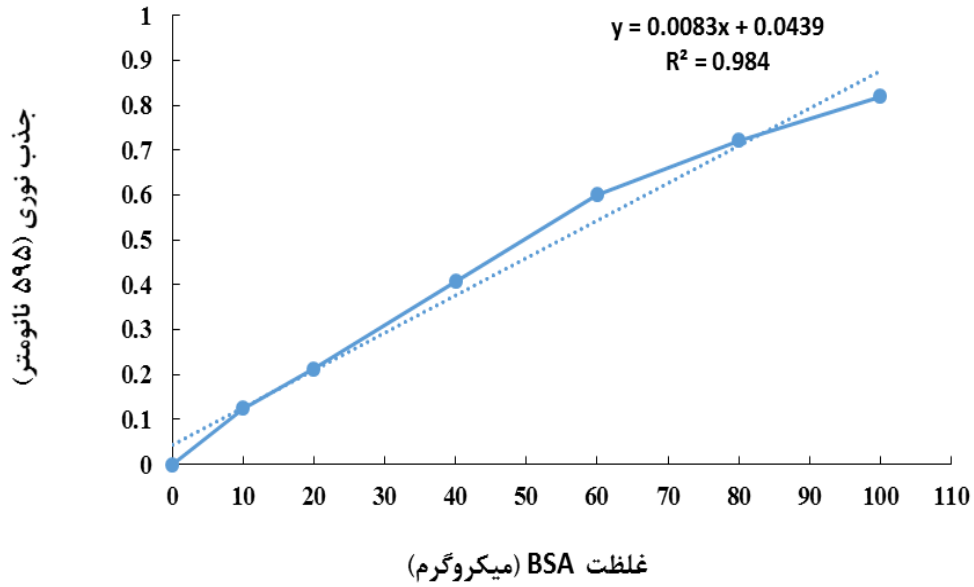
با استفاده از ژل کروماتوگرافی تعداد ۳ پیک (فراکسیون) از زهرزنبور عسل بدست آمد و نمودار مربوط به آن رسم گردید (شکل ۱ الف). فراکسیون ها با F1 تا F3 بر روی شکل نشان داده شده است. پس از انجام کروماتوگرافی، فراکسیونهای حاصل از کروماتوگرافی لیوفیلیزه شدند. با انجام الکتروفورز عمودی، مشخص شد که زهر خام زنبور عسل دارای ترکیباتی با وزن مولکولی در محدوده ۳ تا ۴۵ کیلو دالتون هستند (شکل ۱ ب) و با توجه به گزارشات دیگر محققین میتوان گفت که این باندهای ایجاد شده شامل ملیتین، فسفولیپاز و هیالورونیداز اسید هستند (Babaie and Ghaempanah 2020). طبق شکل ۱، پیک های F1 تا F3 حاوی پروتئین های با وزن مولکولی بالا تا پایین از ستون کروماتوگرافی استخراج شدند. به نظر می‌رسد پیک F1 حاوی هیالورونیداز، F2 حاوی فسفولیپاز و F3 حاوی ملیتین است (شکل ۱). زهر خام دارای چهار باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳، ۱۹ و ۴۵ کیلودالتون (کیلودالتون) است. دیگر محققین هم با انجام کروماتوگرافی برای زهر زنبور عسل ایران ۳ پیک را گزارش کردند (Babaie and Ghaempanah 2020) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. با ترسیم مقادیر استاندارد در برابر عدد جذب آنها منحنی استاندارد به دست آمد (شکل ۲). مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام زنبورعسل و اجزای آن با توجه به نمودار منحنی استاندارد در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج کلی سنجش پروتئین در جدول ۴ نشان داده شده است. به طور کلی ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام حاوی ۵۶ میلی‌گرم پروتئین بود که بعد از بردن روی ستون ۴۳/۵ میلی‌گرم پروتئین (تقریبا ۶۶ درصد) استخراج شد. بیشترین مقدار پروتئین در پیک ۱ و ۲ مشاهده شد. بررسی فعالیت هیالورونیداز از زهر خام روی هیالورونیک اسید انجام شد. اثر pH بر روی فعالیت هیالورونیداز زهر زنبور عسل در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشخص است حداکثر فعالیت هیالورونیداز در pH برابر ۵/۵ می‌باشد. اثر درجهٔ حرارت بر روی فعالیت هیالورونیداز در جدول ۲ ارائه شده است. حداکثر فعالیت هیالورونیداز در ۳۷ تا ۳۹ درجه سانتیگراد مشاهده شد.



B A

شکل ۱. A) کروماتوگرام حاصل از ژل کروماتوگرافی زهر زنبور عسل B) SDS-PAGE زهر خام زنبور عسل

Figure 1. A) Chromatogram obtained from bee venom chromatography gel, B) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of Apis mellifera crude venom



شکل ۲. منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت های مختلف محلول استاندارد BSA

Figure 2. The standard curve obtained from measuring different concentrations of BSA standard solution

جدول ۱. فعالیت هیالورونیداز زهر زنبور عسل در pH های مختلف

Table 1. Effect of pH on the honey bee venom hyaluronidase activity

pH های مختلف Different pH	4	5	5.5	6	7	8
هیالورونات هیدرولیز شده Hydrolyzed hyaluronate	60.1 ± 3.3	85.5 ± 1.6	92.7 ± 1.5	83.7 ± 2.8	70.1 ± 2.2	25.6 ± 3.6

اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند و n = ۳ می‌باشد.

Results are shown as mean ± SE (n = 3).

جدول ۲: فعالیت هیالورونیداز زهر زنبور عسل در دماهای مختلف

Table 2. Effect of temperature on the honey bee venom hyaluronidase activity

درجه حرارت مختلف Different temperature	33	35	37	39	41	43	45
هیالورونات هیدرولیز شده Hydrolyzed hyaluronate	83.1 ± 2.2	86.5 ± 1.6	92.7 ± 1.5	87.5 ± 2.8	81.1 ± 2.5	75.1 ± 1.4	71.6 ± 1.8

اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند و n = ۳ می‌باشد.

Results are shown as mean ± SE (n = 3).

اثر غلظت های مختلف زهر خام زنبور عسل بر میزان فعالیت هیالورونیداز مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در جدول ۳ مشاهده میشود زهر خام حاوی فعالیت هیالورونیداز میباشد که با افزایش غلظت پروتئین زهر این فعالیت افزایش مییابد، ولی از غلظت ۲۰۰ میکروگرم به بعد میزان فعالیت در محدوده ای ثابت میشود. همچنین فعالیت هیالورونیداز در اجزای جداشده زهر زنبور مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در جدول ۴ ارائه شده فقط در پیک ۱ فعالیت هیالورونیدازی مشاهده شد. در پیک دوم و سوم فعالیت هیالورونیدازی مشاهده نشد.

جدول ۳. اثر غلظت زهر بر فعالیت آنزیم هیالورونیداز زهر خام زنبور عسل ایران

Table 3. Effect of venom concentration on the honey bee venom hyaluronidase activity.

زهر خام (میکرو گرم) Crude venom (µg)	فعالیت هیالورونیداز (٪) Hyaluronidase activity (٪)
50	66.44 ± 1.74
100	80.23 ± 1.21
200	92.70 ± 1.50
300	93.12 ± 2.35
400	94.92 ± 1.28

اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند و n= ۳ می‌باشد.

Results are shown as mean ± SE (n = 3).

نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 در زهر خام و اجزای آن در جدول ۴ آورده شده است. در پیک ۱ و پیک ۲ فعالیت فسفولیپازی مشاهد شد. پیک ۲ بیشترین فعالیت فسفولیپازی را نشان داد. در پیک سوم فعالیت فسفولیپازی مشاهده نشد.

جدول ٤. میزان پروتئین و فعالیت هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 در زهر خام و اجزای زهر خام زنبور عسل ایران

Table 4. The amount of protein and activity of hyaluronidase and phospholipase A2 in crude venom and its fractions of Iranian honey bee venom

		فسفولیپاز A2 (U / mg)	فعالیت هیالورونیداز (٪)	پروتئین کل (میلی گرم)
		Phospholipase A2	Hyaluronidase activity(٪)	Total protein (mg)
Crude venom	زهر خام	720 ± 10.5	92.70 ± 1.5	56.00
Fraction F_1	پیک ۱	475 ± 15.2	97.04 ± 2.60	23.9
Fraction F_2	پیک ۲	936 ± 22.3	0.0	10.3
Fraction F_3	پیک ۳	0.0	0.0	3.5

اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند و n = ۳ می‌باشد.

Results are shown as mean ± SE (n = 3).

نتایج جزءبندی زهر زنبور عسل ایرانی روی ژل سفادکس G-50 نشان داد که ژل فیلتراسیون یک ابزار مفید برای جداسازی اجزای زهر زنبور عسل ایرانی است. در این آزمایش ژل کروماتوگرافی تعداد ۳ پیک مشخص و بزرگ را نشان داد که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (Babaie and Ghaempanah 2020; Zolfagharian et al. 2016). این محققین بیان داشتند پیک ۱ احتمالا شامل هیالورونیداز پیک ۲ شامل فسفولیپاز و پیک ۳ شامل میلیتین است. ذوالفقاری و همکاران (۲۰۱۶) بیان داشتند خاصیت باکتری‌کشی پیک ۱ و ۲ بدلیل حضور فسفولیپاز باشد (Zolfagharian et al. 2016). فسفولیپاز A2 با تخریب فسفولیپید موجود در غشا سلولی از رشد باکتری جلوگیری می‌کند (Samel et al. 2013). نتایج ما نشان داد که پیک ۱ و ۲ هر دو فعالیت فسفولیپازی را نشان می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که زهر زنبور عسل ایرانی حاوی هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 فعال و قوی است و آنزیم فسفولیپاز A2 می‌تواند سریعا باعث هیدرولیز فسفولیپیدهای موجود در لیپو پروتئین‌های زرده تخم‌مرغ گردد. به دلیل عملکرد آنزیم فسفولیپاز A2 بر لسیتین و آزادسازی ایزولسیتین که منجر به لیز شدن غشای گلبول قرمز می‌شود اثرات همولیتیکی این آنزیم را توجیه می‌کند (Ketelhut et al. 2003). فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز از آنزیم های مهم زهر زنبور عسل هستند. آنزیم فسفولیپاز A2 از آنزیم های ترشحی هستند که پیوند استری گلیسروفسفولیپیدها را هیدرولیز می‌کند (Dennis 1997).

هیالورونیدازها دارای عملکردهای بیولوژیکی از محدوده ایجاد انواع بیماری‌های عفونی مختلف از طریق تجزیه هیالورونیک اسید انسانی تا دخالت در روندهای باروری پستانداران هستند. هیالورونیک اسید از موکوپلی ساکاریدهایی است که به عنوان ماده زمینه‌ای یا نگهدارنده در عناصر ساختمانی نسوج از قبیل الاستین و کلاژن یافت می شوند. هیالورونیداز موجود در زهر یک فاکتور انتشاردهنده است. این آنزیم انتشار توکسین به درون بافت‌های بدن قربانی را از طریق تجزیه گلیکوز آمینوگلیکان ها در بافت‌های همبند تسهیل می‌کند، بنابراین مسمومیت سیستمیک را منجر می‌شوند. هیالورونیداز آلرژن مهم سم زنبور است (Bordon et al. 2015). همانطورکه نتایج نشان می‌دهند (جدول ۳) آنزیم هیالورونیداز با فعالیت بالایی در زهر زنبور عسل ایرانی وجود دارد به نحوی که مقدار ۴۰۰ میکروگرم از این زهر می‌تواند تقریبا ۹۵ درصد هیالورونات به کار برده شده را هیدرولیز کند، فعالیت این آنزیم با افزایش غلظت زهر افزایش می‌یابد ولی از غلظت ۲۰۰ میکروگرم به بعد فعالیت تقریباً ثابت و در حدود ۹۳ درصد هیدرولیز می‌باشد. همانطورکه نتایج در جدول ۴ نشان داده شده پیک ۱ هم خاصیت فسفولیپازی و هم هیالورونیدازی دارد در حالی که پیک دوم فقط فعالیت فسفولیپازی دارد. مطابق با این نتایج محققین بیان داشتند پیک اول بیشترین خاصیت باکتری‌کشی است چون احتمالا حاوی میلیتین و فسفولیپاز است و پیک ۲ در رتبه بعدی قرار گرفت (Zolfagharian et al. 2016).

مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت بعضی از هیالورونیدازها به طور قابل ملاحظه‌ای در حرارت‌های مختلف حفظ می‌شود ولی بعضی از آنها در دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتیگراد به سرعت فعالیت خود را از دست می‌دهند. در این مطالعه مشخص شد که فعالیت هیالورونیداز در زهر زنبور عسل ایران بیشترین فعالیت را در ۳۷ تا ۳۹ درجه دارد و با افزایش درجهٔ حرارت به تدریج فعالیت خود را از دست می‌دهد. همچنین نتایج این مطالعه مشخص می‌کند که pH بهینه برای فعالیت آنزیم هیالورونیداز ۵/۵ می‌باشد و در pH های پایین تر و بالاتر از ۵/۵ این آنزیم فعالیت خود را از دست می‌دهد. نتایج این تحقیق با دیگر محققین همخوانی دارد. در پژوهشی Abdel-Monsef et al (2020) نشان دادند که زهر زنبور عسل مصری حاوی هیالورونیداز است و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم هیالورونیداز زنبور عسل مصری (APIS MELLIFERA LAMARCKII) ۳۷ درجه و pH برابر با ۵/۴ است (Abdel-Monsef et al. 2020). همچنین Darwish et al (2021) فسفولیپاز A2 را با استفاده از ژل سفادکس s300 از زهر خام خالص‌سازی کردند و میزان فعالیت فسفولیپاز A2 را در زهر خام و اجزای زهر زنبور عسل مصری اندازه‌گیری کردند و دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم ۳۷ درجه و pH بهینه را ۷/۹ گزارش کردند (Darwish et al. 2021). آنها نشان دادند که فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل مصری فعالیت بسیار بالایی دارد و می‌تواند فعالیت ضد لخته خوبی از خود نشان دهد و در آینده شاید بتوان به عنوان داروی ضد لخته از آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری: خالص‌سازی زهر زنبور عسل و بررسی خواص بیوشیمیایی آن می‌تواند در درک جنبه‌های درمانی آن مفید باشند. این بررسی می‌تواند به عنوان روشی برای جداسازی و تخلیص آنزیم های هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل ایرانی

و تعیین میزان فعالیت‌های آنها و بررسی اثرات مختلف بیوشیمیایی و بیولوژیکی آنها باشد. آنزیم‌های هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 خالص شده می‌توانند جهت استفاده در صنعت و تحقیقات مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری: از کلیه مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت تامین مالی این پروژه (طرح کلان به شماره ۱/۴۱۱/۶۱۸ با عنوان تولید آنتی ونوم زنبورگزیدگی) و از مسئولین و کارشناسان محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز جهت در اختیار قرار دادن آزمایشگاه ها قدردانی و تشکر بعمل می‌آید. همچنین از جناب آقای مهندس جواد اصغرپور جهت تهیه سم زنبور عسل قدردانی می‌گردد. در پایان لازم است از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری شود.

منابع

بهادر یاسر، محمدابادی محمدرضا، خضری امین و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهایISSR . پژوهشهای تولیدات دامی ۷(۱۳)، ۱۹۲-۱۸۶.

ذوالفقاریان حسین، مهاجری محمد، بابایی مهدی، مصوری نادر، جوادی ایرج (۱۳۹۶) بررسی اثر ضدباکتریائی زهر خام زنبور عسل و فراکسیونهای حاصل از آن به روش انتشار از دیسک. نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی ۱۱۴، ۱۲۶-۱۱۷.

روحی پور مرضیه، نظری محمود، بیگی نصیری محمدتقی (۱۳۹۸) تعیین ساختار، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی ناحیه کنترل میتوکندریایی بز عدنی. پژوهشهای تولیدات دامی ۱۰(۲۶)، ۸۹-۸۴.

روحی پور مرضیه، نظری محمود، بیگی نصیری محمدتقی (۱۳۹۹) تعیین ساختار، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی ناحیه کنترل میتوکندریایی بز عدنی. مجله ژنتیک نوین ۱۵(۴)، ۳۰۴-۲۹۷.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافتهای مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۳-۱۱۱.

محمدی اهوازی غزال، نظری محمود، محمدآبادی محمدرضا، حیدری رضا (۱۳۹۸) آنالیز ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR1 میتوکندری در سه نژاد گوسفند ایرانی. مجله ژنتیک نوین ۱۴(۳)، ۲۱۹-۲۱۱.

مرمضی سالم، میرحسینی محمدعلی (۱۳۹۹) بیان ژن HSP90 و ارتباط آن با دمای محیط و تردد زنبور عسل ایرانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۲۰۴-۱۸۱.

References

Abdel-Monsef Mohammed M, Zidan Hind A, Darwish Doaa A, et al. (2020) Biochemical Isolation and Characterization of Hyaluronidase Enzyme from Venom of Egyptian Honey Bee Apis Mellifera Lamarckii. J Apic Sci 64(1), 153-164.

Alia O, Laila M, Antonious A (2013) Antimicrobial effect of melittin isolated from Syrian honeybee (Apis mellifera) venom and its wound healing potential. Int J Pharm Sci Rev Res 21, 318-324.

Babaie M, Ghaempanah A (2020) Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of Apis mellifera bee venom on NIH laboratory mice. J Neyshabur Univ Med Sci 8(3), 23-34.

Bahador Y, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in kerman province using ISSR markers. Res Anim Prod 7, 186–192 (In Persian).

Bordon KC, Wierel GA, Amorim FG, et al. (2015) Arthropod venom hyaluronidases biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 22(21), 43.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy Biochem 72(1), 248-54.

Darwish DA, Masoud HMM, Abdel-Monsef MM, et al. (2021) Phospholipase A2 enzyme from the venom of Egyptian honey bee Apis mellifera lamarckii with anti-platelet aggregation and anti-coagulation activities. J Genet Eng Biotech 19(1), 10.

Dennis EA (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. Trends Biochem Sci 22, 1-2.

Ghabili K, Shoja MM, Parvizi M (2009) Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. Med Hypotheses 73(3), 459-60.

Greenfield EA (2018) Protein Quantitation. Cold Spring Harbor Protocols. 6th edition: pdb.prot098202

Kemeny DM, Dalton N, Lawrence A, et al. (1984) The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, Apis mellifera. Eur J Biochem 139, 217-223.

Ketelhut DFJ, Mello MH, Veronese ELG, et al. (2003) Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from Bothrops jararacussu snake venom. Biochemie 58, 983-91.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lima PR, Brochetto-Braga MR (2003) Hymenoptera venom review focusing on Apis mellifera. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 9, 149-162.

Marinetti GV (1965) The action of phospholipase A2 on lipoproteins. Biochem Biophys Acta 98, 554-6.

Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, et al. (2000) Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom. Structure 8(10), 1025-1035.

Moga MA, Dimienescu OG, et al. (2018) Anticancer Activity of Toxins from Bee and Snake Venom- An Overview on Ovarian Cancer. Molecules 23(3), 692-713.

Mohamadi ahvazi Gh, Nazari M, Mohamadabadi MR, et al. (2019) Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. Mod Genet J 14(3), 211-219 (In Persian).

Mohammadabadi M, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotech J 10(3), 111-123 (In Persian).

Morammazi S, Mirhosseini MA (2020) Expression of HSP90 Gene and its Relationship with Ambient Temperature and Foraging Rate in Apis Mellifera Meda. Agric Biotech J 12(4), 185-205 (In Persian).

Morey SS, Kiran K, Gadag J (2006) Purification and properties of hyaluronidase from Palamneus gravimanus (Indian black scorpion) venom. Toxicon 47(2), 188-95.

Murakami M, Sato H, Miki Y, et al. (2015) A new era of secreted phospholipase A2. J Lipid Res 56, 1248-1261.

Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, et al. (1990) Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (Apis mellifera L.) of different ages. Toxicon 28(7), 813-820.

Pattabhiramaiah M, Ramesh K, Vishwanath KV, et al. (2020) Computational analysis of PhospholipaseA2 in the honey bee venom. J Apic Res 59(4), 706-721.

Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, et al. (2001) A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. Toxicon 39(10), 1495-504.

Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, et al. (1988) The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. Toxicon 26(7), 629-37.

Rohipoor M, Nazari M, Beigi Nassiri MT (2019) Genetic and Phylogenetic Analysis of Adani Goat Population Based on Cytochrome B Gene. Res on anim prod 10(26), 84-89 (In Persian).

Rohipoor M, Nazari M, Beigi nassiri M (2021) Population structure, Genetic diversity and phylogenetic analysis of control region of mtDNA in Adani goat breed. Mod Genet J 15(4), 297-304 (In Persian).

Salabi F, Jafari H (2022) New insights about scorpion venom hyaluronidase; isoforms, expression and phylogeny. Toxin Rev. DOI: 10.1080/15569543.2021.2018613

Samel M, Vija H, Kurvet I, et al. (2013) Interactions of PLA2-s from Vipera lebetina, Vipera berus berus and Naja naja oxiana venom with platelets, bacterial and cancer cells. Toxins 24, 203-223.

Santos KS, Stephano MA, Marcelino JR, C, et al. (2013) Production of the First Effective Hyperimmune Equine Serum Antivenom against Africanized Bees. PLoS ONE 8(11), e79971.

Topchiyeva A, Mammadova FZ (2016) The seasonal activity of hyaluronidase in venom of a honey bee (Apis mellifera L. caucasica) in various regions of Azerbaijan. J Ento and Zoo Stu 4(4), 1388-1391.

Topchiyeva S, Farida M (2015) The Study on Activity of Bee Venom Phospholipase A2 from Apis mellifera caucasia L in Honey Bees. Nova J Med and Bio Sci 4(3), 1-10

Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M, et al. (2016) Investigation of the Antibacterial effect of crude venom of honey bee (Apis mellifera) and its fractions by disk diffusion method. Vet J (Pajouhesh & Sazandegi) 114, 117-126 (In Persian).