«مقاله اصیل»

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در فراکسیون های جدا شده از زهر افعی لبتینای ایران

مراد رستمی[1*]، زهره آموزگاری[2]، مژگان نوربهبهانی[3]

1- **دانشجوی MSc، بیوشیمی بالینی و عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده ی پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران**

2- **MSc، گروه بیوشیمی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران**

3- **BS، علوم آزمایشگاهی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران**

چکیده

زمینه: زهر مارها، کمپلکس پیچیده‌ای از اجزای مختلف از جمله پروتئین ها و پپتیدها بوده که اکثر آن ها دارای خواص آنزیمی می باشند. در این بررسی به مطالعه ی وجود آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در زهر و فراکسیون های افعی لبتینای ایران، روی سفادکس G-100، به منظور بررسی مناسب بودن این روش برای جداسازی آنزیم مذکور پرداخته شد.

مواد و روش ها: 100 میلی گرم از زهر خام افعی لبتینای ایران با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-100 که با استفاده از بافر استات آمونیوم 20 میلی مولار (4/6 = pH) به تعادل رسیده بود، به 6 فراکسیون تقسیم شد. فعالیت آنزیم ALP با استفاده از روش سالکوفسکی و همکاران و با استفاده ازسوبسترای پارا نیترو فنیل فسفات اندازه گیری شد.

نتایج: 91 میلی گرم (حدود 79%) از زهر خام افعی لبتینای ایران، پروتئین بود. زهر خام به 6 فراکسیون مجزا تقسیم شد که به ترتیب سرعت خارج شدن از ستون، Peak I (PI) تا Peak VI (PVI) نامگذاری شدند. فعالیت مخصوص آنزیم ALP در زهر خام و PI به ترتیب 4-10 × 4 و3-10 × 1 واحد در میلی گرم به دست آمد. سایر پیک ها هیچ گونه فعالیتی از این آنزیم را از خود نشان ندادند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که زهر افعی لبتینای ایران دارای فعالیت آنزیم ALP بوده و PI نیز کل این فعالیت را به خود اختصاص داده است. سایر پیک های حاصل، فاقد هر گونه فعالیتی از آنزیم ALP بودند.

واژگان کلیدی: افعی لبتینا،آلکالین فسفاتاز،زهر،ایران

*نویسنده ی مسئول:
مراد رستمی،گروه بیوشیمی
دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم
پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
پست الکترونیک:
morad_r56@yahoo.com

تاریخ دریافت:89/7/3 تاریخ پذیرش:89/10/13

مقدمه

زهر مارها به وسیله یک جفت غده اختصاصی در فک بالایی تولید شده(1) و کمپلکس پیچیده‌ای از اجزای مختلف شامل پروتئین ها و پپتیدها و مقادیر بسیار کمتری از لیپیدها، کربوهیدرات ها، اسیدهای نوکلئیک و مواد معدنی می باشند و اکثر پروتئین ها و پپتیدهای آن ها دارای خواص آنزیمی هستند(2، 3، 4). نخستین عملکرد زهر مارها پس از صید طعمه، تسهیل هضم آن با استفاده از آنزیم ها می باشد(4). در حقیقت، بسیاری از اجزای تشکیل دهنده ی زهر مارها دارای شباهت بسیار زیاد به آنزیم های پانکراس می باشند(5). اعتقاد بر این است که تقریبا تمامی عملکرد زهر مارها در نتیجه ی ترکیب عملکرد پروتئین های متعددی اعم از پروتئین های دارای خاصیت آنزیمی و یا غیر آنزیمی می باشد(6). از جمله عملکرد پروتئین های موجود در زهر مارها به بی حرکت نمودن، فلج ساختن، کشتن و هضم طعمه می توان اشاره نمود(1). مارهای سمی به 5 خانواده شامل کروتالیده، ویپریده، الاپیده، هیدروفیده و آتراکتاسپیدیده تقسیم بندی می شوند(7). زهر مارها را براساس اثرات پاتوفیزیولوژیکی خاصی که ایجاد می‌نمایند به چندین دسته ی اساسی تقسیم می کنند. زهر مارهای خانواده‌های ویپریده و کروتالیده اثرات جنینی یا کشنده ی سیستمیک ایجاد می نمایند و اغلب موجب تغییرات اساسی در سیستم گردش خون می شوند. زهر مارهای الاپیده و هیدروفیده به شدت نوروتوکسیک می‌باشند. فعالیت های بیولوژیکی اجزای مختلف زهر مارها به طور هم زمان اثرات سمی و کشنده ای بر روی سیستم های خونی، قلبی- عروقی، تنفسی و عصبی می گذارند(2).

تنوعات بسیار زیادی بین محتویات زهر مارها در گونه‌های مختلف، در افراد یک گونه و در مناطق مختلف جغرافیایی وجود دارد. تحقیقات نشان داده است که بین تنوعات جغرافیایی و عوارض کلینیکی ناشی از مارگزیدگی ارتباط وجود دارد(8). افعی لبتینا که در ایران به گرزه مار معروف است، جزو خانواده ی ویپریده و یکی از مارهای بسیار خطرناک در ایران می‌باشد. این مار به رنگ های متفاوت و اغلب به رنگ خاکستری روشن یا تیره، نقره ای متمایل به سیاه، ساده و یکنواخت یا با خال های متفاوت قرمز آجری یا زرد زیتونی همراه با خال های کوچک تیره دیده می شود (9،10).

آلکالین فسفاتاز (ALP) به طور گسترده ای در هر دو سلسله ی گیاهی و جانوری یافت می گردد. ALP دارای توزیع گسترده ای در بافت های مختلف بوده و همچنین از تنوع ایزوآنزیمی بسیار زیاد و تفاوت در ویژگی های کاتالیتیک، فیزیکی و تنظیمی برخوردار می باشد. اعتقاد بر این است که به دلیل تنوع گستردگی این آنزیم، علاوه بر عملکردهای شناخته شده ی آن، همچنان برخی از عملکردهای فیزیولوژیک آن ناشناخته باقی مانده است(11).

در مطالعه ی Alagon و همکاران، مار Bothrops asper آلمانی، فاقد هرگونه فعالیتی برای آلکالین فسفاتاز بوده است(12). Tu و همکاران نیز نشان دادند که فقط زهر خام مار Enhydrina schistose که یک نوع مار آبزی می باشد، دارای فعالیت آلکالین فسفاتازی بوده و فراکشن های آن فاقد هرگونه فعالیتی برای آنزیم مذکور می باشند (6). مطالعات انجام شده برای بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در مارها بسیار محدود بوده و مطالعه ی دیگری در این زمینه یافت نشد. اثرات فارماکولوژیک متعدد، تنوع در ایزوفرم های مختلف این آنزیم، انگیزه‌ای برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم در زهر افعی لبتینای ایران و فراکسیون های جدا شده از آن روی سفادکس G-100، به منظور بررسی مناسب بودن این روش برای جداسازی آنزیم مذکور شد، تا در کارهای تحقیقاتی آینده اقدام به تخلیص، بررسی ویژگی ها و اثرات مختلف آنزیمی و فارماکولوژیکی آن بشود.

مواد و روش ها:

این پژوهش از نوع تجربی می باشد. مواد مصرفی از نوع Analytical grade و شامل سفادکس G -100 ساخت شرکت فارماسیا، استات آمونیوم، سود، کوماسی بلو G -250، اتانول، اسید ارتوفسفریک و آلبومین سرم گاوی از شرکت مرک و پارا نیترو فنیل فسفات خریداری شده از شرکت سیگما بودند. زهر افعی لبتینا (Vipera lebetina) نیز به صورت لیوفیلیزه و به فرم تجارتی بوده که به صورت اهدایی

از موسسه ی تحقیقات رازی دریافت شد. سانتریفوژ مدل 5810 از کمپانی Eppendorf کشور آلمان و اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل Lambda 2 ساخت کشور آلمان نیز در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند.

مراحل مختلف کار به صورت جدا سازی فراکسیون های زهر خام، اندازه گیری پروتئین و اجرای آزمایش های اندازه گیری فعالیت انزیم آلکالین فسفاتاز بود که در زیر به آن ها اشاره می گردد.

الف- جدا سازی فراکسیون های زهر خام: جدا سازی فراکسیون های زهر خام روی سفادکس G -100 و به روش فرید و همکاران انجام شد (13). تمام مراحل جدا سازی در دمای 4+ درجه ی سانتیگراد انجام شد. 100 میلی گرم از زهر خام در 1 میلی لیتر بافر استات آمونیوم 20 میلی مولار (pH = 4/6) حل شد. سپس محلول حاصل در 2000 rpm و به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ گردید. ابتدا ستون سفادکس G -100 با استفاده از استات آمونیوم 20 میلی مولار (pH = 4/6) به تعادل رسانده شد و سپس محلول زرد رنگ صاف شده رویی حاصل از سانتریفوژ، به تدریج وارد ستونی از سفادکس G -100 به طول 100 و قطر 2 سانتی متر گردید. پس از جذب نمونه، ستون با همین بافر شست و شو داده شد و فراکسیون ها با سرعت جریان 15 میلی لیتر در ساعت، به وسیله ی دستگاه جمع کننده فراکشن اتوماتیک مدل LKB جمع آوری گردیدند. بلافاصله جذب نوری فرکشن های جمع آوری شده در طول موج 280 نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، قرائت گردید و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله ها رسم گردید. سپس پیک های مختلف، دیالیز و لیوفیلیزه شدند.

ب- اندازه گیری مقدار پروتئین: در این تحقیق، مقدار پروتئین نمونه ها با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید (14). بدین منظور، لوله هایی به طور دو تایی برای هر نمونه به اضافه یک شاهد (بلانک) که حاوی 1 میلی لیتر آب مقطر بود، انتخاب شدند. سپس مقدار مناسبی از 100 تا 1000 میکرو لیتر از محلول استاندار پروتئین (سرم آلبومین گاوی 100 میکرو گرم در میلی لیتر) در لوله های ویژه ای ریخته و با استفاده از آب مقطر، حجم هر لوله به 1 میلی لیتر رسانده شد. زهر خام و سایر فراکسیون ها نیز با رقت های معین و به طور جداگانه، با آب مقطر به حجم 1 میلی لیتر رسانده شدند. پس از مخلوط کردن محتویات هر لوله، 5 میلی لیتر از مخلوط معرف برادفورد به هر لوله اضافه شد و محتویات هر لوله به خوبی مخلوط گردید. پس از انکوباسیون نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج 595 نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، قرائت گردید. پس از رسم منحنی استاندارد، مقدار پروتئین نمونه ها نیز تعیین گردید.

جهت تهیه ی 100 میلی لیتر از معرف برادفورد، 10 میلی گرم از کوماسی بلو G -250 در 5 میلی لیتر از اتانول حل گردید و سپس 10میلی لیتر از اسید ارتو فسفریک 85% به آرامی به آن اضافه شد. در نهایت، با استفاده از آب مقطر، حجم محلول به 100 میلی لیتر رسانده شد. جهت حذف ذرات معلق نیز، محلول فوق از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول صاف شده حاصل در ظروف شیشه ای تیره نگهداری گردید.

ج- آزمایش های اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش سالکوفسکی و همکاران (15) همراه با تغییراتی استفاده گردید. در این روش، 6 لوله آزمایش برای نمونه ها و 1 لوله آزمایش نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند. به هر کدام از این لوله ها، 1 میلی لیتر بافر گلیسین- سود 0/1 مولار (pH = 9/5)، 1/2 میلی لیتر سوبسترای پارا نیترو فنیل فسفات 0/001 مولار و 0/3 میلی لیتر کلرید منیزیوم 0/1 مولار اضافه گردید. لوله های فوق در حمام آب گرم 37 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه انکوبه گردیدند. پس از این زمان، 0/1 میلی لیتر سرم فیزیولوژی به لوله ی شاهد افزوده شد و با استفاده از آن، دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج 400 نانومتر، صفر گردید. به سایر لوله ها نیز، 0/1 میلی لیتر از نمونه ها با مقدار پروتئین معین، اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن محتویات هر لوله، بلافاصله تغییرات جذب هر لوله در 37 درجه ی سانتیگراد و در طول موج 400 نانومتر در مقابل لوله ی شاهد،

قرائت و ثبت گردید. بر اساس این روش، 1 واحد فعالیت برابر با مقداری از آنزیم می باشد که 1 میکرو مول از پارا نیترو فنیل فسفات را در 1 میلی لیتر از نمونه در 1 دقیقه آزاد نماید. تغییرات جذب در 1 دقیقه (ΔA400/min) از روی منحنی تعیین و سپس فعالیت مخصوص (unit/mg) هر نمونه نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

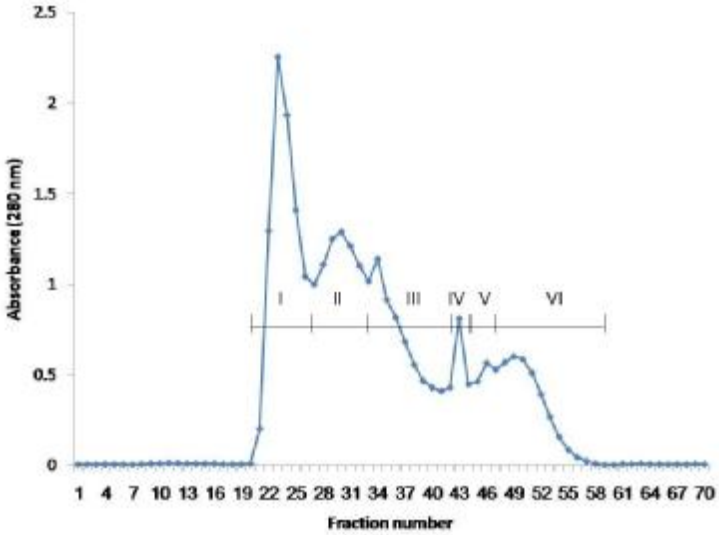
در این فرمول، ΔA400/min= تغییرات جذب در 1 دقیقه در طول موج 400 نانومتر، V= حجم نمونه مورد آزمایش بر حسب میلی لیتر و ε PNP = ضریب خاموشی پارا نیترو فنیل فسفات که برای PNP و در 400 نانومتر، Cm-1L. mole-1 16200 می باشد.

در ابتدا، فعالیت و فعالیت مخصوص برای 0/1 میلی لیتر از هر نمونه حاوی مقدار معینی پروتئین تعیین شد و سپس فعالیت کل Total unit برای زهر خام و هر فراکسیون نیز محاسبه گردید.

نتایج:

نتیجه ی کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون 100 میلی گرم زهر خام افعی لبتینای ایران که حاوی 91 میلی گرم پروتئین بود، در شکل 1 نشان داده شده است. بر اساس این روش، پروتئین های زهر خام بر اساس وزن ملکولی به 6 فراکسیون مجزا تقسیم شدند. این فراکسیون ها به ترتیب سرعت خارج شدن از ستون به صورت Peak I (PI)، Peak II (PII)، Peak III (PIII)، Peak VI (PVI)، Peak V (PV) و Peak VI (PVI) نام گذاری شدند.

نتایج کلی سنجش شکل پروتئین و بازده حاصل از آن در جدول 1 آورده شده است. در این مطالعه، به طور کلی، 100 میلی گرم از زهر خام افعی لبتینای ایران حاوی 91 میلی گرم پروتئین بود که پس از انتقال به ستون کروماتوگرافی G -100، مقدار 71/91 میلی گرم پروتئین استخراج شد که معادل 79% میزان پروتئین اولیه می باشد. میزان پروتئین پیک های مختلف به ترتیب PI>PII>PIII>PVI>PIV>PV بود که در آن PI بیشترین و PV نیز حاوی کمترین مقدار پروتئین بود.



شکل1: کروماتوگرافی زهر خام افعی لبتینای ایران روی ستون سفادکس G-100 که با بافر استات آمونیوم 20 میلی مولار و PH = 6/8 به تعادل رسیده و توسط بافر مذکور با سرعت جریان 15 میلی لیتر در ساعت شست و شو داده شد. جذب نوری نمونه ها در طول موج 280 نانومتر قرائت گردیده است.

جدول1: نتایج سنجش حجم نمونه، غلظت پروتئین و بازده میزان پروتئین زهر خام و فراکسیون های آن

فاکتور اندازه گیری شده	حجم نمونه (میلی لیتر)	غلظت پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر)	پروتئین توتال (میلی گرم)	بازده (%)
C.V*	1	91	91	100
PI	12	1/96	23/52	25/85
PII	9	1/99	17/91	19/68
PIII	12	1/16	13/92	15/30
PIV	4/5	0/96	4/32	4/75
PV	4/5	0/88	3/96	4/35
PVI	18	0/46	8/28	9/10

*C.V = Crude venom

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز در جدول 2 نشان داده شده است. همان طوری که در جدول نیز آمده است، فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام 4×10^{-4} واحد در میلی گرم می باشد. پس از جداسازی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تنها در PI مشاهده شد و سایر پیک ها هیچ گونه فعالیتی از این آنزیم را از خود نشان ندادند. فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز در PI معادل 1×10^{-3} به دست آمد.

جدول 2: نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در زهر خام و فراکسیون های آن

فاکتور اندازه گیری شده	پروتئین توتال (میلی گرم)	فعالیت آنزیم (واحد آنزیمی)	فعالیت مخصوص (واحد آنزیمی در میلی گرم)	بازده (%)
C.V	91	0/036	4×10^{-4}	100
PI	1/96	0/024	1×10^{-3}	66/7
PII	1/99	0	0	0
PIII	1/16	0	0	0
PIV	0/96	0	0	0
PV	0/88	0	0	0
PVI	0/46	0	0	0

بحث:

ALP به دلیل تنوع گستردگی بافتی آن، دارای ایزوفرم های مختلفی با ویژگی های عملکردی و کاتالیتیک مختلفی می باشد (11). علی رغم این گستردگی توزیعی و عدم درک کامل عملکردهای این آنزیم، مطالعات بسیار کمی بر روی این آنزیم در مارها و به ویژه در مارهای ایران انجام شده است. گواه این مطلب، وجود مقالات بسیار ناچیز و انگشت شمار در مجلات مختلف و بررسی های اینترنتی می باشد.

در این مطالعه، طی کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G -100، 6 فراکسیون مختلف به دست آمد؛ در حالی که در مطالعه ی شانکی و همکاران که بر روی زهر افعی لبتینای ایران و با روش مذکور انجام شده بود، 5

فراکسیون مختلف به دست آمده بود (16) که نشان دهنده ی تفکیک بهتر و مناسب تر کروماتوگرافی در مطالعه ی ما می باشد. به نظر می رسد که این تفکیک بهتر در نتیجه سرعت کمتر عبور بافر در مقایسه با مطالعه شانکی و همکاران (16) باشد.

در این مطالعه نشان داده شد که فعالیت مخصوص آنزیم ALP در زهر خام افعی لبتینای ایران 4×10^{-4} واحد در میلی گرم می باشد. پس از جدا سازی فراکسیون های مختلف، تنها PI دارای فعالیت مخصوصی برای آنزیم مذکور به میزان 1×10^{-3} واحد در میلی گرم بود و سایر پیک ها هیچ گونه فعالیتی را از این آنزیم از خود نشان ندادند.

در مطالعه ی شانکی و همکاران بر روی زهر افعی لبتینای ایران، مشخص شده است که زهر این مار دارای فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 در زهر خام و در فراکسیون های PI، PII و PIII بوده و سایر فراکسیون ها فاقد هر گونه فعالیتی برای این آنزیم می باشند. در مطالعه آن ها، بیشترین فعالیت برای فسفولیپاز A2 در PII به دست آمده است (16).

Tu و همکاران نیز نشان دادند که زهر خام Enhydrina schistose که یک نوع مار آبزی می باشد، دارای فعالیت آلکالین فسفاتازی بوده؛ در حالی که پس از جدا سازی فراکسیون های مختلف که توسط کروماتوگرافی ستون کربوکسی متیل سلولز انجام شده است، فعالیتی برای آنزیم ALP مشاهده نشده است. در مطالعه ی آن ها نیز همانند مطالعه ی ما از سوبسترای پارا نیتروفنیل فسفات و روش های اسپکتروفتومتری استفاده شده است (6). این یافته، بر خلاف یافته ی مطالعه ما می باشد که در آن فعالیت آنزیم ALP هم در زهر خام و هم حداقل در یکی از فراکسیون های به دست آمده پس از کروماتوگرافی با سفادکس 100- G مشاهده شد. این یافته می تواند نشان دهنده ی قدرت تفکیک بهتر استفاده از سفادکس 100- G در مقایسه با کربوکسی متیل سلولز در انجام کروماتوگرافی و خالص سازی زهر مارها باشد. چرا که در مطالعه ی Tu و همکاران، این اتفاق که فعالیت برخی آنزیم ها در زهر خام مشاهده شده است اما پس از جدا سازی فراکسیون های مختلف، فعالیتی برای آن ها دیده نشده است، علاوه بر ALP، هیالورونیداز، فسفودی استراز، داکسی ریبونوکلئاز، استیل کولین استراز و لوسین آمینو پپتیداز را نیز شامل می شده است (6).

در مطالعه Alagon و همکاران که بر روی مار Bothrops asper آلمانی انجام شده است، هیچ گونه فعالیتی برای اسید فسفاتاز و یا آلکالن فسفاتاز یافت نشده است. آن ها توانستند حضور 3 فسفولیپاز، 4 نوع استراز مختلف و حداقل یک نوع هیالورونیداز را در این مار مشخص نمایند. آن ها همچنین نشان دادند که در زهر این مار، فعالیت فسفودی استرازی نیز مشاهده می شود (12).

نتایج جدا سازی فراکسیون های زهر افعی لبتینای ایران روی سفادکس 100- G، نشان می دهد که ژل فیلتراسیون یک ابزار مناسب برای جدا سازی فراکسیون های مختلف زهر این مار بوده و از این تکنیک می توان در خالص سازی بیشتر آنزیم ها و اجزای مختلف موجود در زهر این مار به منظور بررسی ویژگی ها و عملکردهای مختلف آن ها بهره گرفت که بررسی ها و مطالعات بیشتر در این زمینه، منوط به کارهای تحقیقاتی بیشتر می باشد.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق با پشتیبانی مالی کمیته ی تحقیقات دانشجویی معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره 38. S. 87 انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد. از تمامی کارکنان گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که در مراحل مختلف اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می شود. همچنین از زحمات سرکار خانم الهام طالبی زاده، کارشناس مسئول کمیته ی تحقیقات دانشجویی و سرکار خانم مریم صفار زاده، مسئول دفتر فصلنامه جنتاشاپیر کمیته ی تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز نیز قدردانی می گردد.

References منابع

1-Sanz L. Ayvazyan N, Calvete JJ. Snake venomics of the Armenian mountain vipers Macrovipera lebetina obtuse and Vipera raddei. J of Proteomics. 2008; 71: 198-209.
2-DU XY, Sim DS, Lee WH, Zhang Y. Blood cells as Targets of snake Toxins. Blood cells, molecules and diseases. 2006; 36: 414-421.
3-Kochva E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxicon. 1987; 25: 65-106.
4-Mebs D. Toxicity in animals. Trends in evolution? Toxicon. 2001; 39: 87-98.
5-Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon. 1998; 36: 1749-800.
6-Tu AT, Toom PM. Isolation and characterization of the toxic component of Enhydrine schistose (common sea snake) venom. J of Biological Chemistry. 1971; 246(4): 1012-16.
7-Dokmetjian JC, Del Canto S, Vinzon S, Bonino MB . Biochemical characterization of the Micrurus pyrrhocryptus venom. Toxicon. 2009; 53: 375-82.
8-Maity G, Mandal S, Chatterjee A, Bhattacharya D. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A2 from Russell's viper venom. Journal of chromatography. 2006; Available online at www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997639.
9-Latifi M. Iranians venom . Tehran . Department of Environmental publications. 1985; 4-20.
10-Ohsaka A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venom. In: Chen YL (ed). Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer; 1979: 480-546.
11-Iyer SK, Daron HH, Aull JL. Purification and properties of alkaline phosphatase from boar seminal plasma. J Reprod Fert. 1988; 82: 657-64.
12-Alagon AC, Molinar RR, Possani LD, Fletcher Jr PL, Cronan Jr JE, Julia ZJ. Venom from the snake Bothrops asper German. Biochem J. 1980; 185: 695-704.
13-Farid TM,Tu AT. Characterization of cerastobin, a thrombin–like enzyme form the venom of cerastes viper (Shara sand viper). Biochemistry. 1989; 28(1): 371-7.
14-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.
15-Sulkowski E, Bjork W, Laskowski MS. A specific and nonspecific alkaline monophosphatase in the venom of Bothrops atrox and their occurrence in the purified venom ohosphodiesterase. J Biol Chem. 1963; 238: 2477-86.
16-Shanaki bavarsad M, Amoozgari Z, Noorbehbahani M. Phospholipase A2 activity in crude venom and fractions separated from Iranian Vipera Lebetina venom. Scientific Medical Journal; Ahwaz Medical Sciences University Iranian Journal of Medical Education. 2010; 8(3); 355-60.