



ZEHİR ANALİZ RAPORU

FİRMA ÜNVANI: MFY Ortaklar Grup Tıbbi İlaç ve İlaç Hammadde Üretimi İnş. Gıda Canlı Hay. İth.İhr. San. Tic. Paz. Ltd. Şti.

FİRMA ADRESİ: Kadirli Organize Sanayi Böl. 2 Sk No:6 Kadirli/Osmaniye

VERGİ NO: 6200590934

AKREP ADI: Androctonus turkiyensis

AİLE: Buthidae

TÜR: Androctonus turkiyensis

CİNSİ: Androctonus

NUMUNENİN TESLİM TARİHİ: 22.08.2023

NUMUNE BİLGİSİ: Toz formda, 1 mL beyaz renkte sıvı Akrep Zehri.

NUMUNE SAFLIĞI: %100

ANALİZ TARİHİ: 22-28. 08.2023

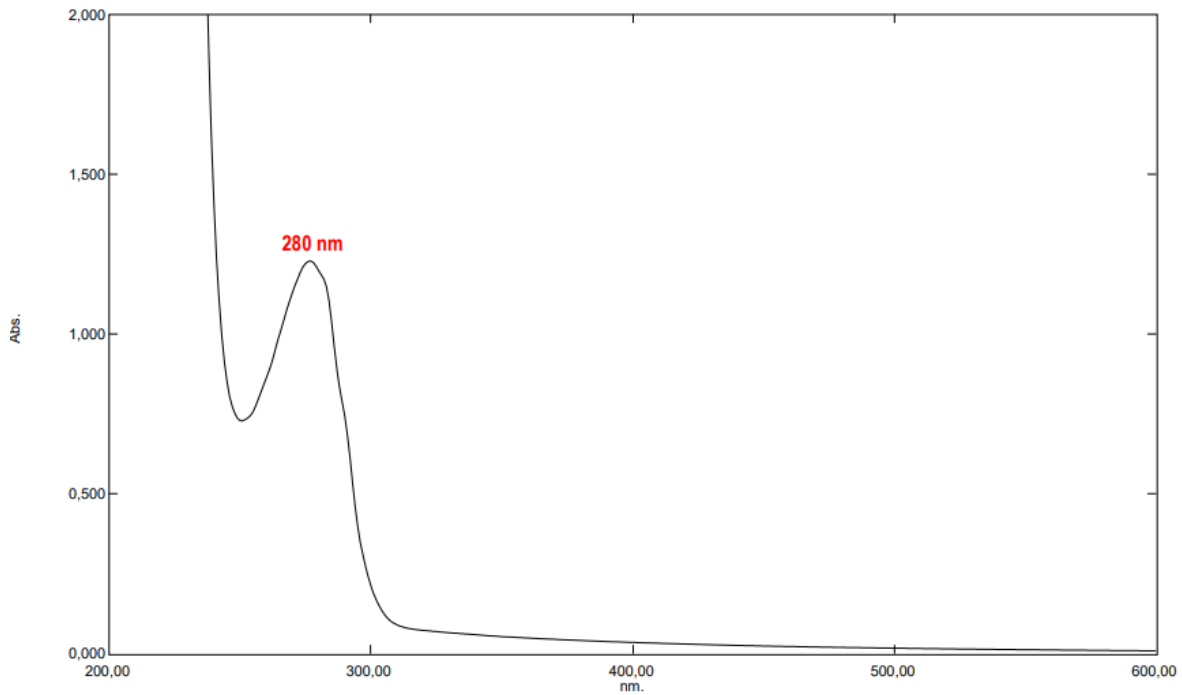
YAPILAN ANALİZLER: UV-visible Spektrofotometrik Analiz, pH Analizi, Protein Konsantrasyonu (Yoğunluk), SDS-PAGE ve HPLC





Spektrum Sonuçları

1 mg/mL olarak hazırlanan *Androctonus turkiyensis* türü akrepten elde edilen venomun spektrum analizi, Shimadzu marka UV-1900i model spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 190 nm - 400 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapılmıştır. 280 nm’de venoma spesifik maksimum pik gözlemlenmiştir (Şekil 1). Bu nedenle HPLC analizlerinde 280 nm baz alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1 *Androctonus turkiyensis* zehirinin spektrum analizi

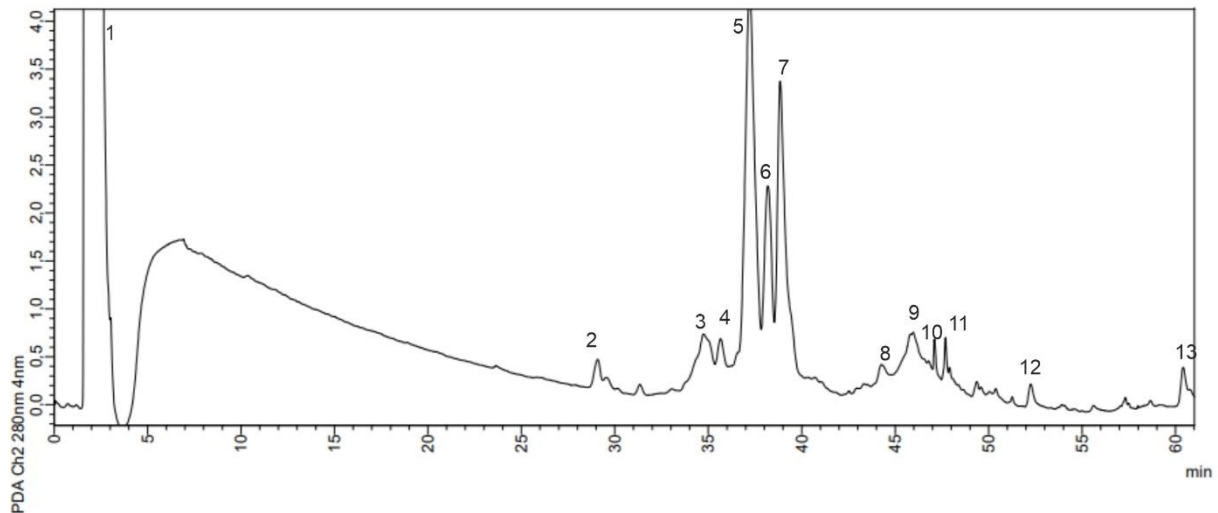


pH Analizi

Toz haline getirilmiş zehirler 1000 ppm'lik bir konsantrasyonda süspansiyon form hazırlandı. pH değeri pH/Cond meter SevenDirect SD23 ölçüm cihazı ile tespit edilmiş olup akrep sıvı örneğinin **pH'sı 3.5** olarak belirlendi.

HPLC Analizleri

Toz haline getirilmiş zehirler 1000 ppm'lik bir konsantrasyonda HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) cihazına yüklendi. Shimadzu Prominence-i LC2030 3D HPLC cihazında gradyan programında yapılmıştır. Zehirdeki proteinlerin maksimum absorbansını belirlemek için spektrum alındı. Bu sonuçlar doğrultusunda 280 nm dalga boyunda HPLC analizi yapıldı. Zehirdeki proteinler, farklı zamanlarda fraksiyonlarda tespit edildi (Şekil 2). **HPLC analizi sonucu *Androctonus turkiyensis* zehrinde başlıca 13 farklı protein/peptit saptanmıştır.** Fraksiyonların ne kadar süreyle tutulduğu, konsantrasyonları ve alanları belirtilmiştir (Tablo 1).



Şekil 2. *Androctonus turkiyensis* zehri HPLC Analiz sonucu.

Tablo 1. *Androctonus turkiyensis* zehirinin fraksiyonların tutunma süreleri

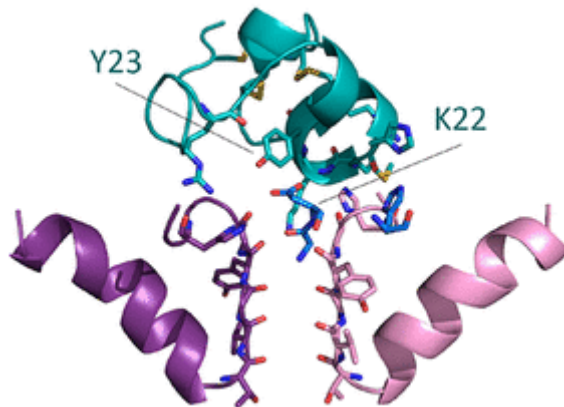
Fraksiyon Sayısı	Tutunma Zamanı (dakika)
1	1.60
2	29.12
3	34.97
4	36.04
6	37.21
7	38.19
8	44.10
9	44.90
10	46.58
11	47.26
12	47.91
13	52.48

Akrep Zehri Peptidlerinin Analizi

Androctonus turkiyensis türü akrebin zehri incelendiğinde var olan peptidler analiz edildiğinde 2 adet potasyum kanalına bağlanan polipeptid tespit edilmiştir. α -KTx 3.6 Potasyum kanalı inhibitörü olan bu peptid Tablo 2 de belirtilen hedef kanalları inhibe etmektedir. Hücre içi sodyum/potasyum dengesini bozarak hücreleri ölüme sürüklemektedir.

Tablo 2. *Androctonus turkiyensis* zehrinde belirlenen peptidlerin dizileri ve olası hedef kanalları

Adı	Sinonimi	Amino asit Dizisi	Hedef Kanalı
α -KTx 3.6	Voltage-gated potassium channels blocker	FTNVSCCTSKECWSVCQRLHNTS RGKCMNKKCRCYS	rKv1.1, rKv1.2, ve hKv1.3



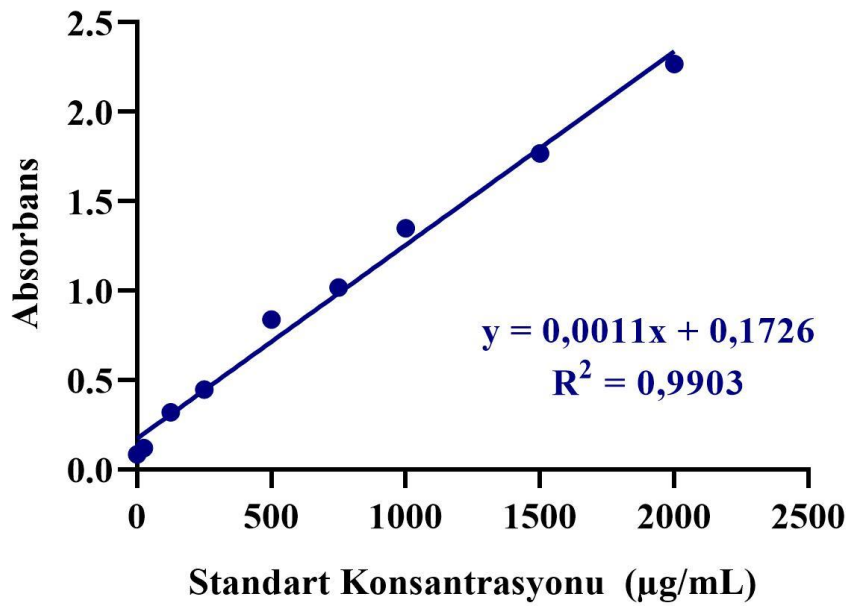
α -KTx 3,6



Akrep Zehri Protein konsantrasyonunun Belirlenmesi

Akreplerden elde edilen ham venomun içerdiği protein miktarı, kolorimetrik bir tahlil olan Bisinkoninik asit (BCA) ile belirlenmiştir. Örnekler 37°C'lik yarım saat inkübasyondan sonra 562 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 ve 0 µg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. (Şekil 3) Örnekler ve standart tekrarlı olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk (OD) değerleri kullanılarak BSA sonuçları ile standart grafiği oluşturularak, eğim formülü Microsoft Excel yazılımından hesaplanmış olup, GraphPad Prism 8 yazılımı ile grafik elde edilmiştir.

Dublike çalışılan *Androctonus turkiyensis* için protein konsantrasyonu **1736 ±12 µg/mL** protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

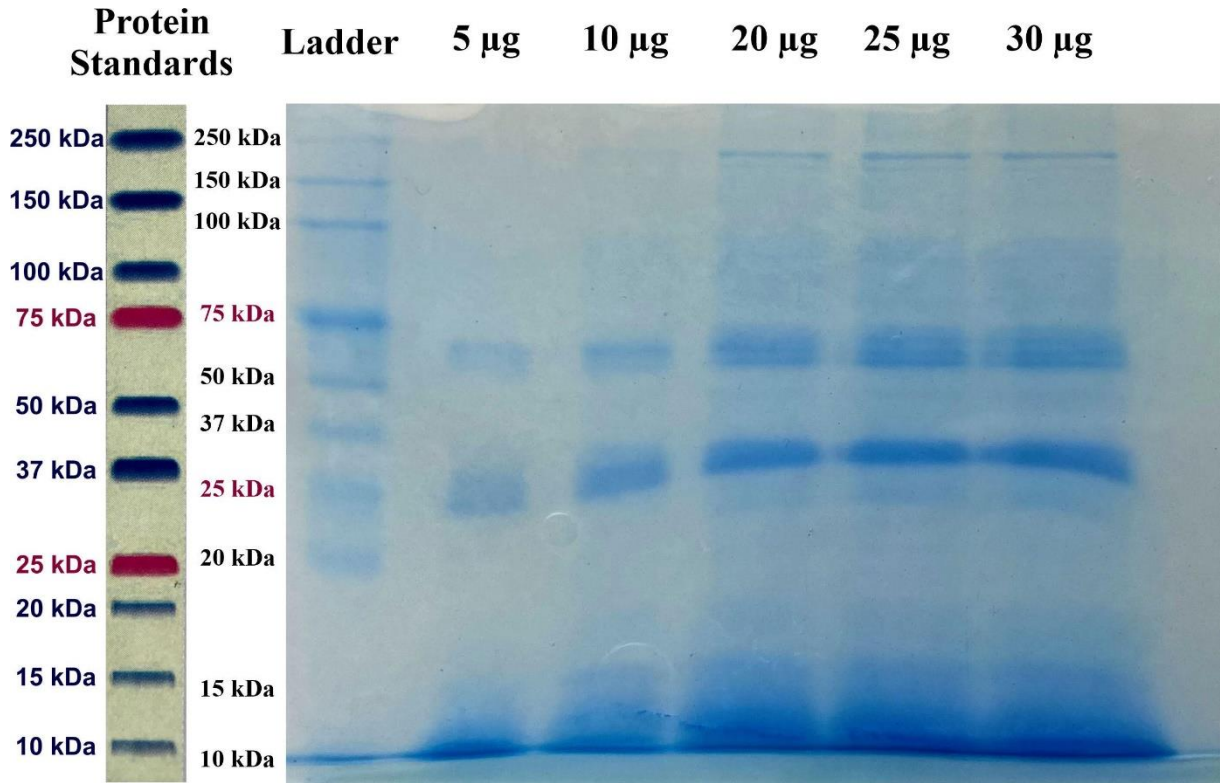


Şekil 3. BSA standart eğrisi



SDS-PAGE Analizleri

Androctonus turkiyensis zehrinin elektroforetik ayrımı, indirgeme koşulları altında %4-12 akrilamidden oluşan dikey elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. **Şerit 1:** Moleküler ağırlık standartı (10-250 kDa aralığında), **Şerit 2:** 5 µg *Androctonus turkiyensis* venomu, **Şerit 3:** 10 µg *Androctonus turkiyensis* venomu, **Şerit 4:** 20 µg *Androctonus turkiyensis* venomu, **Şerit 5:** 25 µg *Androctonus turkiyensis* venomu, **Şerit 6:** 30 µg *Androctonus turkiyensis* venomu, Solda belirtilen işaretler kDa olarak ifade edilmiştir. Jel, Coomassie mavisi kullanılarak boyanmıştır. **SDS-PAGE analizi sonrasında *Androctonus turkiyensis* zehrinde 10-75 kDa büyüklüklerde proteinlerin varlıkları tespit edilmiştir. Ancak peptidlerin Total akrep zehri içerisinde proteinlerin 25 ve 50 kDa ağırlığında yoğunlaştığı özellikle 25 kDa büyüklüğünde protein/peptid yoğunluğu görülmektedir.**



Şekil 1 SDS-PAGE zehir profilleri.