

بررسی مولکولی رونوشت mRNA ژن کد کننده نورو توکسین مؤثر بر کانال سدیمی موجود در سم عقرب مزوبوتوس

/پتوس در منطقه جنوب غرب ایران

روژین اسدیان^۱، عبدالحسن دولاح^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول: عبدالحسن دولاح، دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

پست الکترونیکی: doulah1403@iau.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۷۳۷۲۳۰۸۷

چکیده

زمینه و هدف: پپتیدهای موجود در زهر عقرب به دلیل ویژگی‌های سمیتی و دارویی که دارند مورد توجه محققین قرار دارند. این مطالعه با هدف بررسی مولکولی، تعیین توالی، ویژگی‌های فیلوژنتیک و کلونینگ ژن کد کننده نورو توکسین مؤثر بر کانال سدیمی در سم عقرب *Mesobuthus eupeus* انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: عقرب‌های مورد مطالعه طی عملیات گشت شبانه از استان خوزستان، حومه شهرستان اهواز صید گردیدند. استخراج RNA از بافت تلسون عقرب انجام شد. پس از سنتز cDNA، قطعه اولیه با استفاده از پرایمرهای دژنره تکثیر شد و توالی آن تعیین گردید. پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی به دست آمده طراحی شدند و تکثیر ژن مذکور مجدداً انجام پذیرفت. در ادامه، ژن تکثیر شده با استفاده از وکتور pTG19-T در باکتری *Escherichia coli DH5-α* کلون شد. پس از غربالگری کلنی‌های ترانسفورم شده، DNA پلاسمیدی استخراج شد و جهت توالی یابی ژن مذکور اقدام شد.

نتایج: مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که پپتید مذکور دارای توالی‌های حفاظت شده مشابه نورو توکسین مؤثر بر کانال سدیمی در عقرب *M. eupeus* است که تائید کننده ماهیت این پپتید است.

نتیجه گیری: علاوه بر تعیین توالی و ویژگی‌های مولکولی و فیلوژنتیک، در این مطالعه ژن مذکور به خوبی در باکتری *E. coli DH5-α* کلون شد که می‌تواند برای مطالعات داروشناسی و پزشکی آتی بر روی این توکسین مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: زهر عقرب، کلونینگ، نورو توکسین کانال سدیمی، *Mesobuthus eupeus*

مقدمه

ترکیبات زیست فعال طبیعی به منظور مطالعه و اکتشاف داروهای جدید توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. در این بین، سموم طبیعی به دلیل اختصاصیت بالایی که می‌توانند برای سلول‌های هدف خود داشته باشند، از جایگاه ویژه‌ای در مطالعات داروشناسی برخوردارند. تعیین ویژگی‌های مولکولی، شیمیایی و داروشناسی سموم به منظور به کارگیری آنان در اهداف پزشکی از اهمیت بسیاری برخوردار است. سموم بیولوژیک همچون سم عقرب از دیرباز به دلیل ویژگی‌های سمیت اختصاصی که بر اجزای سلولی به ویژه اجزای غشای سیتوپلاسمی و کانال‌های یونی دارند، به عنوان ترکیبات زیست فعال مورد استفاده در پزشکی و داروسازی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱).

عقرب‌ها گروهی از بندپایان متعلق به رده عنکبوتیان و راسته اسکورپیونیدا هستند. این موجودات تقریباً در همه نقاط کره زمین بجز قطب یافت می‌شوند و از توانایی بالایی جهت تطابق و بقا در شرایط مختلف آب و هوایی برخوردارند. تقریباً همه گونه‌های عقرب‌ها شبزی هستند و در طول روز زیر سنگ‌ها، پوست درختان، و ... پنهان می‌شوند. سم عقرب‌ها یک ابزار دفاعی برای آنان است که با دفاع از خود در برابر طعمه‌ها، شکارچیان و رقبا، بقای آن‌ها را تضمین می‌کند (۲). تاکنون در سطح جهان بیش از ۲۲۰۰ گونه عقرب مختلف شناسایی شده است که در ۲۰۸ جنس و در ۲۰ خانواده جای گرفته‌اند (۳).

عقرب‌ها به دلیل ویژگی‌های سمیتی زهر به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. زهر عقرب حاوی ترکیبات متنوع و ناهمگون و دارای ویژگی‌های مولکولی و بیولوژیک منحصر به فرد است. تخمین زده می‌شود که بیش از ۱۰۰ هزار ماده مختلف در زهر عقرب‌های دنیا وجود داشته باشد. زهر عقرب دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات مانند آب، مخاط، پپتیدهای با وزن مولکولی کم، آنزیم‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، آمین‌های بیوژنیک، نوکلئوتیدها، موکوپلی‌ساکاریدها، موکوپروتئین‌ها، هیستامین، سروتونین، و چندین ماده ناشناخته دیگر است (۴).

به دلیل ویژگی‌های فارماکولوژیک آن‌ها بر کانال‌های یونی و استفاده بالینی به عنوان سموم عصبی، ترکیبات موجود در زهر عقرب ها به طور گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرند. از بین این ترکیبات، پپتیدهای موجود در زهر عقرب از جایگاه ویژه‌ای در مطالعات سم‌شناسی برخوردارند. این سموم اگرچه بیشتر به دلیل اثرات مضرشان بر ارگانیسم‌ها شناخته شده‌اند، اما به دلیل ویژگی‌هایی همچون خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی و سرکوب کننده سیستم ایمنی، برای توسعه داروها نیز مهم هستند (۱). پپتیدهای با وزن مولکولی پایین حدود یک سوم پپتیدهای زهر عقرب را شامل می‌شوند. این ترکیبات عمدتاً به دلیل برهمکنشی که با کانال‌های یونی دارند سبب اختلال در عملکرد سلول‌های عصبی و ماهیچه‌ای می‌شوند. این پپتیدها بر اساس مکانیسم اثرگذاری‌شان به دو دسته اصلی نوروتوکسین‌های مؤثر بر کانال سدیمی و نوروتوکسین‌های مؤثر بر کانال پتاسیمی دسته‌بندی می‌شوند. کانال‌های سدیم ولتاژ دار مسئول ورود یون‌های سدیم هستند که پتانسیل عمل در سلول‌های عضلانی، عصبی و غدد درون ریز را افزایش می‌دهد. عملکرد پپتیدهای نوروتوکسیک می‌تواند بر فعالیت وابسته به ولتاژ کانال سدیم اثر گذاشته و سبب مهار یا القای بیش از حد آنان گردد (۵، ۶).

عقرب‌ها در ایران شامل ۳ خانواده: *Buthidae* (۵۱ گونه)، *scorpionidae* (۳ گونه)، *Hemiscorpiidae* (۵ گونه) می‌باشند. عقرب مزوبوتوس اپئوس (*M. eupeus*) متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده است، که بومی ایران به خصوص منطقه خوزستان است. جنس مزوبوتوس در ایران شامل ۵ گونه شامل *Mesobuthus eupeus* (*M. eupeus*)، *M. gibbosus*، *M. vachon*، *M. tamulus*، *martensii* است. گونه *M. eupeus* دارای پراکندگی گسترده‌ای در مناطق غربی ایران است (۷). مطالعات سم‌شناسی محدودی بر روی پپتیدهای موجود در زهر این عقرب انجام شده است (۸، ۹)، اما ویژگی‌های مولکولی آنان کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف شناسایی مولکولی، تکثیر ژن و کلونینگ، توالی‌یابی و تعیین ویژگی‌های فیلوژنتیک نوروتوکسین مؤثر بر کانال سدیمی موجود در **سم این عقرب مناطق جنوب غربی ایران** انجام پذیرفت. نتایج این مطالعه علاوه بر افزایش دانسته‌ها در مورد ساختار مولکولی و ویژگی‌های فیلوژنتیک این سم، امکان دستیابی به سیستم‌های بیانی به منظور مطالعات داروشناسی و سم‌شناسی آتی را فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

صید و شناسایی عقرب

عقرب‌های مورد مطالعه طی عملیات گشت شبانه از استان خوزستان، حومه شهرستان اهواز صید گردیدند. عقرب‌ها درون جعبه‌های پلاستیکی حاوی پنبه مرطوب به آزمایشگاه انتقال و توسط کارشناسان بخش جانوران سمی موسسه تحقیقات واکسن سرم سازی رازی و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی شدند.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA از بافت تلسون عقرب از کیت تجاری EZ-10 Spin Column Animal Total RNA Mini-Preps Kit شرکت Bio Basic Canada و بر اساس دستورالعمل سازنده کیت استفاده شد. به طور خلاصه، ۵۰ mg از بافت تلسون عقرب را در نیتروژن مایع کاملاً پودر کرده و درون میکروتیوب ریخته و در ۳۵۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده، لیز شد. نیمی از بافت لیز شده به محلول اتانل ۹۶٪ در یک میکروتیوب منتقل شده و سپس از ستون جداسازی کننده RNA عبور داده شد. در نهایت RNA استخراج شده در RNase free water جمع آوری و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی از دستگاه نانودراپ E-POCK انگلستان استفاده شد.

طراحی پرایمر دژنره، ساخت cDNA و تکثیر اولیه قطعات

با توجه به عدم وجود داده‌های توالی ژنی نورو توکسین مذکور در گونه‌های عقرب ایرانی، طراحی پرایمر بر اساس توالی‌های مربوط به پروتئین‌های نورو توکسین‌های مشابه شناسایی شده در عقرب‌های این خانواده انجام شد. برای طراحی پرایمر از توالی‌های موجود در بانک پروتئین و بانک ژنی و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک استفاده شد. بر مبنای اسیدهای آمینه N-terminal و C-terminal پپتید، پرایمر دژنره اختصاصی به ترتیب به‌عنوان پرایمر forward و پرایمر reverse و با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 و oligo7 طراحی شد.

ساخت cDNA و واکنش PCR با استفاده از کیت تجاری One-Step AMV RT-PCR Kit شرکت Bio Basic Canada و مطابق دستورالعمل سازنده کیت انجام پذیرفت. سنتز cDNA در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از پرایمر Oligo dT انجام شد. در ادامه، تکثیر قطعات بر اساس پروتوکول دمایی شامل واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه تکثیر انجام شد. چرخه‌های تکثیر شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون به مدت ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از تکثیر اولیه قطعات، به منظور اطمینان از تکثیر صحیح و جداسازی قطعات تکثیر شده از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد.

در ادامه ژن تکثیر یافته با استفاده از کیت تجاری PCR Clean Up for DNA Sequencing شرکت Bio Basic Inc. و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد.

تعیین توالی ژن تکثیر شده

به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول خالص شده جهت توالی یابی به شرکت Bio Basic Inc. کشور کانادا ارسال شد. در این فرایند بر مبنای پرایمرهای مستقیم و معکوس طراحی شده، توالی یابی دوطرفه (Bidirectional) به روش سنگر انجام گردید. در ادامه با توجه به توالی به دست آمده، پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر دقیق ژن سم انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱- پرایمر اصلی و پرایمر دژنره

پرایمر اختصاصی	پرایمر دژنره
F: GCTCGTGATGCTTATATTG	F: GCNMGNGAYGCNTAYATHG
R: GCGATGGCATTTCCTGG	R: NCKRTGRCAYTTNCCNGG

کلونینگ ژن

برای کلونینگ ژن سم مورد مطالعه از وکتور pTG19-T محصول شرکت Vivantis استفاده شد. کلون سازی ژن در پلاسمید pTG19-T انجام شد. سپس انتقال ژن به باکتری پذیرا شده *E. coli* سوش DH5 α با روش ترانسفورماسیون یک مرحله ای Chung و همکاران (۱۰) انجام شد. به منظور تأیید کلونینگ، باکتری های کلون شده بر روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی سیلین در هر میلی لیتر، 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside X-Gal (20 mg/ml) و Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside IPTG 100mM منتقل شدند. در ادامه به کمک میله شیشه ای L شکل در تمام نقاط پلیت پخش شده و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری ها، کلنی های به رنگ سفید، که نمایانگر باکتری های ترانسفورم شده هستند، انتخاب شدند و در محیط LB جامد آمپی سیلین دار به صورت خطی کشت داده شدند.

استخراج پلاسمید

باکتری DH5- α ترانسفورم حاوی وکتور در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شیک متوسط ۲۰۰ rpm کشت داده شد. سپس استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی و با استفاده از کیت تجاری Bio Basic Inc. و بر اساس دستورالعمل سازنده کیت انجام پذیرفت. در ادامه، استخراج پلاسمیدها با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز **تائید شد. سپس** پلاسمیدهای استخراج شده خالص‌سازی شدند و برای توالی‌یابی به شرکت Bio Basic Inc. کشور کانادا ارسال شدند.

آنالیزهای بیوانفورماتیک

پس از دستیابی به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای مربوط به ژن و پپتید سم، نسبت به آنالیز بیوانفورماتیک توالی‌ها اقدام گردید. در ابتدا آنالیز توالی اسید آمینه‌ای پپتید شامل بررسی‌های اولیه مربوط به ساختار خطی پپتید و بررسی توالی نوکلئوتیدی **انجام شد. از نرم‌افزار DNASIS Max 3.0 برای بررسی Trimming و translation Frames و نرم‌افزار Bio Edit برای بررسی هم‌ردیف سازی Clustal W و local & global alignment** مربوط به توالی اسید آمینه‌ای استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار Snap Gene 3.2 به منظور آنالیز سازه ژنی و وکتور، بررسی صحت کلون‌سازی ژن، بررسی نقشه ژنی و نوع دایرکشن‌های سازه ژنی استفاده گردید. برای بررسی هم‌ردیف سازی **Clustal Muscle / و رسم درخت فیلوژنتیک Neighbor-Joining method** برای توالی اسید آمینه‌ای نیز از نرم‌افزار **MEGA 10** استفاده شد. نرم‌افزارهای آنلاین **BLASTN algorithm (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)/BLASTP Basic Local Alignment Search Tool (uniprot.org/blast) و Swiss Modeler** هم برای پیش‌بینی ساختار سوم و هم‌ردیف سازی بر اساس فرمت **PDB** مورد استفاده قرار گرفتند. پس از دستیابی به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای مربوط به ژن و پپتید سم، این توالی‌ها در سیستم **BLAST** سایت **NCBI** قرار گرفته شد تا توالی خودمان را با توالی ژن‌های موجود در بانک ژن مقایسه شود. بعد از آن بر مبنای بیشترین میزان شباهت بین توالی ما و توالی‌های دیگر، توالی‌های مشابه از بانک ژن استخراج شدند و با هم هم‌ردیفی شدند و بعد از آن بر مبنای این هم‌ردیفی ماتریکس شباهت و تفاوت‌ها شناسایی شد و بعد از آن بر مبنای این هم‌ردیف سازی آمینو اسیدها، درخت فیلوژنتیک رسم شد و با کمک این درخت میزان شباهت و نزدیکی بین توالی آمینواسیدی سم ما با سایر سموم موجود در بانک ژن در دنیا مقایسه شد. تمام مراحل هم‌ردیفی بر مبنای بانک‌های پروتیینی است که در سایت مرجع **Uniprot** است. در واقع بر مبنای **BLAST**، هم‌ردیفی‌ها در **Uniprot** بر مبنای بانک پروتیینی انجام شد. و بعد با استفاده از الگوریتم‌های **Clustal W** موجود در نرم‌افزار **Bio Edit** هم‌ردیفی‌ها انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار **MEGA10** درخت فیلوژنتیک رسم شد.

نتایج

باکتری‌های کلون شده

پس از تکثیر ژن نوروتوکسین کانال سدیمی، قطعات مذکور در پلاسمید pTG19-T وارد شده و در *E. coli* DH5- α ترانسفورم شدند. پس از کشت باکتری‌های ترانسفورم شده، کلنی‌های آبی و سفید تشکیل شدند. کلنی‌های فاقد پلاسمید نو ترکیب به دلیل سنتز بتاگالاکتوزیداز و تجزیه gal-X و تولید Indolyl به رنگ آبی دیده می‌شوند. کلنی‌های سفید هم نشانگر سلول‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب هستند (شکل ۱). در ادامه کلنی‌های سفید به منظور حصول اطمینان از کلونینگ در محیط LB agar حاوی پنی‌سیلین رشد یافتند. در نهایت صحت کلونینگ با استفاده از استخراج پلاسمید و الکتروفورز ژل آگاروز تأیید شد (شکل ۲). تعیین توالی ژن سم کلون شده

توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی ژن سم کلون شده در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی سم کلون شده

نام ژن	>MeENa
توالی نوکلئوتیدی	GCTCGTGATGCTTATATTGCCAAGCCCCATAACTGTG TATACGAATGTTTGGATCCATTTAGTAGTTATTGCAA CGATTTATGTACCAAGAACGGTGCTAAGAGTGGCTA TTGCCAAATTTTGGGTAAATATGGAAATGGTTGCTGG TGCATAGATTTGCCCGATAATGTACCGATTAGAATACC AGGAAAATGCCATCGC

توالی	ARDA YIAKPHNCVYECLDPFSSYCNDLCTKNGAKSGYCQIL
آمینواسیدی	GKYGNCGWCIDLPDNPVPIRIPGKCHR
توالی	AlaArgAspAlaTyrIleAlaLysProHisAsnCysValTyrGluCysLeuAsp
آمینواسیدی	ProPheSerSerTyrCysAsnAspLeuCysThrLysAsnGlyAlaLysSerGly
	TyrCysGlnIleLeuGlyLysTyrGlyAsnGlyCysTrpCysIleAspLeuProAsp
	AsnValProIleArgIleProGlyLysCysHisArg

آنالیزهای بیوانفورماتیک

بر اساس نتایج، همولوژی بسیار بالای این توالی با توالی پپتیدهای سمی برای پستانداران به عنوان نورو توکسین و نیز همولوژی بالای آن با سموم مؤثر بر کانال‌های سدیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ در هم‌دیف سازی مولکولی توالی اسید آمینه‌ای مشاهده گردید. شکل ۳ آنالیزهای بیوانفورماتیک توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی تکثیر شده را نمایش می‌دهد. شباهت و نزدیکی بالای ۹۰ درصد میان توالی ژن MeENa و توکسین‌های آلفای MeuNaTxalpha-13 و MeuNaTxalpha-5 و MeuNaTxalpha-4 از عقرب (*Buthus eupeus* (Lesser Asian scorpion) دیده شد. این یافته نشان‌دهنده آلفا توکسین بودن سم شناسایی شده در این مطالعه و نیز شباهت بالا به سموم متصل شونده به کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ می‌باشد (شکل ۴).

شکل ۵ هم‌دیف سازی قطعه ژنی MeENa با توالی پپتیدهای موجود در بانک PDB بر مبنای الگوریتم‌های نرم‌افزار BioEdit را نمایش می‌دهد. این هم‌دیف سازی بر مبنای توالی‌های محافظت‌شده Cys و نیز توالی‌های محافظت‌شده انتهای N و C زنجیره پپتیدی سموم مورد بررسی می‌باشد.

در ادامه بر مبنای ماتریکس شباهت ارائه شده در نرم‌افزار BioEdit 7 و نیز MEGA 10 میزان همولوژی ژن MeENa با سایر توالی‌های بانک‌های ژنی تعیین شد (شکل ۶). بر مبنای ماتریکس ارائه شده، ژن MeENa دارای همولوژی بسیار زیادی با توالی نورو توکسین‌های مؤثر بر کانال‌های سدیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ می‌باشد. همچنین مشاهده شد که این ژن دارای ۹۳ درصد همولوژی با نورو توکسین MeuNaTxalpha-13 (G4WFQ2) از عقرب (*Buthus eupeus* (Lesser Asian scorpion) جداسازی و شناسایی شده در کشور چین می‌باشد.

آنالیز فیلوژنتیک مولکولی پیتید MeENa

شکل ۷ درخت فیلوژنتیک پیتید سم MeENa را نمایش می‌دهد. نزدیکی فیلوژنتیک و وابستگی تکاملی میان پیتید سم MeENa از عقرب *M. eupeus* ایرانی شناسایی شده در این مطالعه با سم (G4WFQ2) *MeuNaTxalpha-13* و *MeuNaTxalpha-5* (P86405) و *MeuNaTxalpha-4* (P86404) از عقرب *M. eupeus* چین مشاهده شد. همه توکسین های این کلاستر در درخت فیلوژنتیک دارای همولوژی بسیار بالایی به عنوان سموم آلفای مؤثر بر کانال های سدیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ هستند.

بحث

تعیین روابط تکاملی و ویژگی های فیلوژنتیکی توکسین های موجود در سم عقرب می تواند بستر اطلاعات مناسبی جهت تعیین تنوع عملکردی و ویژگی های فارماکولوژیک های عقرب های مناطق فراهم آورده و برای توسعه داروهای درمانی جدید می تواند کمک کننده باشد (۱۱). با توجه به اینکه ویژگی های مولکولی، توالی رونوشت و توالی پپتیدی نورو توکسین کانال سدیمی عقرب مزوبوتوس / پئوس تاکنون بررسی نشده بود، در این مطالعه برای اولین بار، رونوشت mRNA ژن نورو توکسین مذکور با استفاده از پرایمرهای دزنره تکثیر شد. سپس با طراحی پرایمرهای اختصاصی، رونوشت ژن مذکور به طور کامل و دقیق تکثیر و تعیین توالی گردید. در این مطالعه نشان داده شد که ژن نورو توکسین سم عقرب در باکتری ایکلای DH5- α قابل کلونینگ و تکثیر می باشد. چنین سیستم هایی پیش از این به منظور بیان توکسین های پپتیدی عقرب استفاده شده است (۱۲، ۱۳). در مطالعه ای مشابه، Eskandari و همکاران (۸) یک نورو توکسین جدید BMK از زهر عقرب *M. eupeus* کلون سازی و بیان کردند. آنان همچنین، ویژگی های ایمنی زایی سم مذکور را نشان دادند. بر این اساس، وکتورهای کلونینگ و بیان ژن های نورو توکسین سم عقرب می تواند ابزاری ایده آل جهت تولید این پپتیدها به منظور مطالعات داروشناسی و سم شناسی آنان باشد. در این مطالعه مشاهده شد که نورو توکسین زهر این عقرب دارای ویژگی های مشابه نورو توکسین های مؤثر بر کانال های سدیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ بود و دارای ۹۳ درصد همولوژی با نورو توکسین *MeuNaTxalpha-13* (G4WFQ2) از عقرب *M. eupeus* (Lesser Asian scorpion) جداسازی و شناسایی شده در کشور چین بود.

کانال های سدیم ولتاژ دار (VGSCs) پروتئین های غشایی انتگرال بزرگی هستند که برای شروع و انتشار پتانسیل عمل در سلول های تحریک پذیر حیاتی هستند. بنابراین، سموم کانال سدیم عقرب (NaTx) که فعالیت VGSCs را تغییر می دهند، مهم ترین نوع

سموم عقرب از نظر پزشکی هستند. از نظر فیزیولوژیکی سموم کانال‌های سدیمی به دو گروه آلفا سموم (α -NaTxS) و بتا توکسین ها (β -NaTxS) تقسیم می‌شوند. α -NaTxS به محل گیرنده ۳ VGSCs متصل می‌شوند و از غیرفعال شدن کانال جلوگیری می‌کنند (۱۴)، در حالی که β -NaTxS به محل گیرنده ۴ متصل می‌شوند و پتانسیل آستانه مورد نیاز برای فعال کردن کانال را به ولتاژهای منفی‌تر تغییر می‌دهند.

این سموم حاوی ۵۸-۷۶ باقیمانده اسید آمینه هستند و توسط ۴ پل دی سولفیدی از طریق ۸ باقی‌مانده سیستئین به هم متصل شده‌اند (۱۵). در این مطالعه نیز مشاهده شد که نوروتوکسین زهر *M. eupeus* دارای ۸ رزیدو سیستئین است که احتمالاً در تشکیل ۴ پل دی سولفیدی نقش دارد و از این جهت مشابه گزارش‌های پیشین است. این پیوندهای دی سولفید در تشکیل ساختار سوم پروتئین دخالت دارد. از سویی این یافته با نتایج حسنی نیا و همکاران متفاوت است. آنان گزارش کردند که سموم عقرب‌های منطقه خوزستان دارای ۳ پیوند دی سولفید هستند که با یافته‌های این مطالعه متفاوت است (۱۶). همچنین، مشاهده شد که پپتید مذکور دارای ۶۷ رزیدو اسید آمینه است. گزارش‌های پیشین بر روی توکسین‌های کانال سدیم شناسایی شده **در این عقرب** نشان دادند که سموم این عقرب دارای ۵۲ تا ۸۷ اسید آمینه هستند که با نتایج این مطالعه منطبق است (۱۷). **در مطالعه‌ای دیگر،** Bayatzadeh و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی مدل سازی مولکولی و فیلوژنتیک توکسین جدا شده از *A. crassicauda* پرداختند. آنان توانستند سم پپتیدی با تعداد ۶۴ رزیدو آمینو اسیدی و وزن مولکولی ۷۲۵۵/۲۳ دالتون را جداسازی کنند و با بررسی‌های مولکولی نشان دهند که این سم قابلیت اتصال به کانال‌های سدیم وابسته به ولتاژ را **دارد. آنان همچنین بیان کردند** که پپتید خالص سازی شده احتمالاً یک توکسین مرتبط با کانال سدیمی است (۹).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه **ژن نوروتوکسین کانال سدیمی** زهر عقرب *M. eupeus* برای اولین بار با استفاده از پرایمرهای دژنره و اختصاصی تکثیر شد و با استفاده از وکتور pTG19-T در باکتری *E. coli DH5-α* کلون شد و در نهایت توالی دقیق رونوشت mRNA و پپتید مربوطه تعیین گردید. مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که این پپتید دارای ویژگی‌های حفاظت شده مشابه سایر **پپتیدهای نوروتوکسیک** **کانال** سدیمی بوده و دارای ۸ سیستئین است که احتمالاً در تشکیل ۴ پیوند دی سولفید نقش دارد. نتایج این مطالعه با تعیین توالی

ژن پتید مذکور و دستیابی به سیستم کلونینگ و بیان امکان مطالعات بیشتر در زمینه داروشناسی و پزشکی مرتبط با این سم را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، مصوب معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز می‌باشد. بدین وسیله، نویسندگان از این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

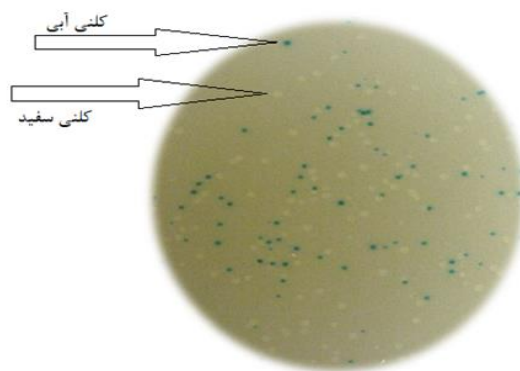
نویسندگان مقاله، تعارض در منافع ندارند.

منابع

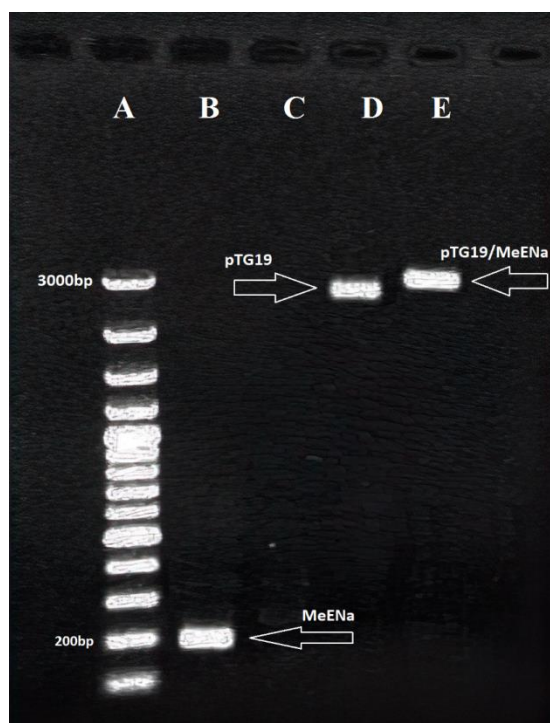
- 1-Roy A, Bharadvaja N. Venom-derived bioactive compounds as potential anticancer agents: a review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021 Mar; 27:129-47. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10073-z>
- 2- Mansouri NJ, Akbarzadeh K, Jahanifard E, Vazirianzadeh B, Rafinejad J. Species diversity and abundance of scorpions in Ahvaz city, Southwest Iran. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2021; 22(2).
- 3- Feola A, Perrone MA, Piscopo A, Casella F, Della Pietra B, Di Mizio G. Autopsy findings in case of fatal scorpion sting: a systematic review of the literature. *InHealthcare* 2020; 8(3): 325. <https://doi.org/10.3390/healthcare8030325>
- 4- Daoudi K, Malosse C, Lafnoute A, Darkaoui B, Chakir S, Sabatier JM, Chamot-Rooke J, Cadi R, Oukkache N. Mass spectrometry-based top-down and bottom-up approaches for proteomic analysis of the Moroccan *Buthus occitanus* scorpion venom. *FEBS Open Bio*. 2021 Jul;11(7):1867-92. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13143>

- 5- Mendes LC, Viana GM, Nencioni AL, Pimenta DC, Beraldo-Neto E. Scorpion peptides and ion channels: an insightful review of mechanisms and drug development. *Toxins*. 2023 Mar 24;15(4):238. <https://doi.org/10.3390/toxins15040238>
- 6- Tobassum S, Tahir HM, Arshad M, Zahid MT, Ali S, Ahsan MM. Nature and applications of scorpion venom: an overview. *Toxin Rev*. 2020; 39(3):214-25. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1530681>
- 7- Kazemi SM, Sabatier JM. Venoms of Iranian scorpions (Arachnida, Scorpiones) and their potential for drug discovery. *Molecules*. 2019;24(14):2670.
- 8- Mohammadpour Dounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Mir Mohammad Sadeghi A, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2012;18:44-52. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100006>
- 9- Bayatzadeh MA, Mirakabadi AZ, Babaei N, Doulah AH, Doosti A. Characterization, molecular modeling and phylogenetic analysis of a long mammalian neurotoxin from the venom of the Iranian scorpion *Androctonus crassicauda*. *Biologia*. 2020; 75(7):1029-41. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00400-1>
- 10- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989 Apr;86(7):2172-5.
- 11- Bayatzadeh MA, Zare Mirakabadi A, Babaei N, Doulah A, Doosti A. Expression and purification of recombinant alpha-toxin AnCra1 from the scorpion *Androctonus crassicauda* and its functional characterization on mammalian sodium channels. *Mol Biol Rep*. 2021; 48(9):6303-12. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06624-2>
- 12- Bouhaouala-Zahar B, Ducancel F, Zenouaki I, Ben Khalifa R, Borchani L, Pelhate M, Boulain JC, El Ayeb M, Ménez A, Karoui H. A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur. J. Biochem*. 1996;238(3).

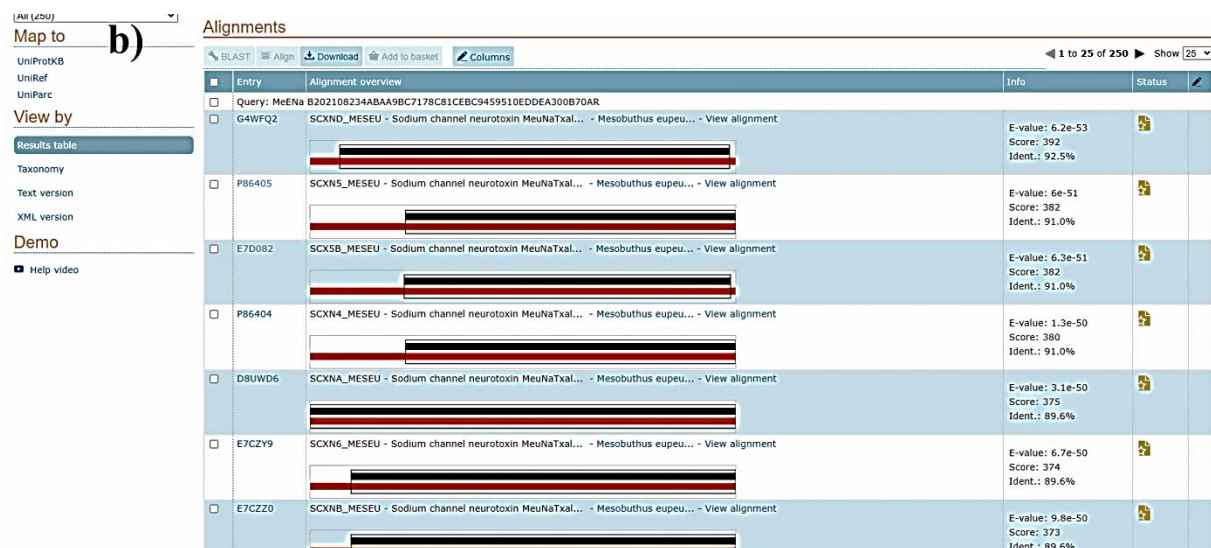
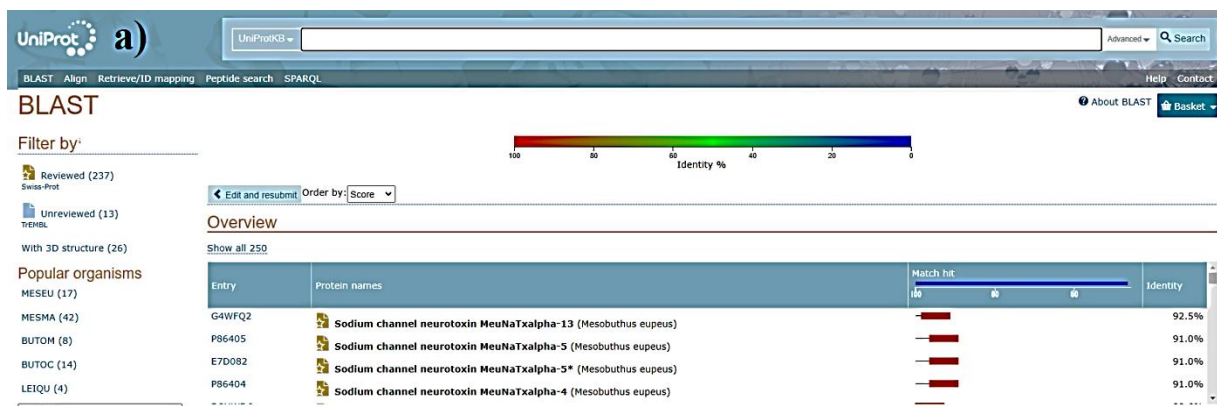
- 13- Jalali A, Baradaran M, Galehdari H, Ghoncheh P, Soorki MN. Analysis of Some Putative Novel Peptides from Iranian Scorpion Venom Glands, *Hemiscorpius lepturus*, Using cDNA Library Construction. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2023;18(1).
- 14- Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*. 2007; 49(2):142-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.023>
- 15- Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani L. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013; 76:328-42.
- 16- Niya FH, Nassiri MT, Jolodar A, Roshanfekar H. Amplification and molecular identification of cDNA sequence coding for a peptide toxin from the venomous gland of the Khuzestan province scorpion *Mesobuthus eupeus*. 2016.
- 17- Baradaran M, Jalali A, Naderi-Soorki M, Jokar M, Galehdari H. First transcriptome analysis of Iranian scorpion, *Mesobuthus eupeus* venom gland. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2018; 17(4):1488.



شکل ۱- کلنی‌های باکتری‌های رشد یافته به منظور غربالگری سلول‌های کلون شده: کلنی‌های سفید حاوی پلاسמיד نو ترکیب حامل ژن پروتئین سم MeENa می‌باشند.



شکل ۲- تصویر باندهای الکتروفورز مربوط به پلاسמיד خالی pTG19-T و پلاسמיד حاوی ژن پروتئین سم pTG19/MeENa و ژن پروتئین سم MeENa



شکل ۳. آنالیز فیلوژنتیک و همردیف سازی توالی پپتید سم شناسایی شده در بانک‌های پروتئینی

UniProtKB - G4WFQ2 (SCXND_MESEU)

Display [Help video](#) [BLAST](#) [Align](#) [Format](#) [Add to basket](#) [History](#)

Entry

Protein: Sodium channel neurotoxin MeuNaTxalpha-13
 Gene: N/A
 Organism: *Mesobuthus eupeus* (Lesser Asian scorpion) (*Buthus eupeus*)
 Status: Reviewed - Annotation score: ●●●○○ - Experimental evidence at transcript levelⁱ

Functionⁱ

Alpha toxins bind voltage-independently at site-3 of sodium channels (Nav) and inhibit the inactivation of the activated channels, thereby blocking neuronal transmission.

GO - Molecular functionⁱ

- sodium channel inhibitor activity [Source: InterPro](#)
- toxin activity [Source: UniProtKB-KW](#)

Complete GO annotation on QuickGO ...

GO - Biological processⁱ

- defense response [Source: InterPro](#)
- pathogenesis [Source: InterPro](#)

Complete GO annotation on QuickGO ...

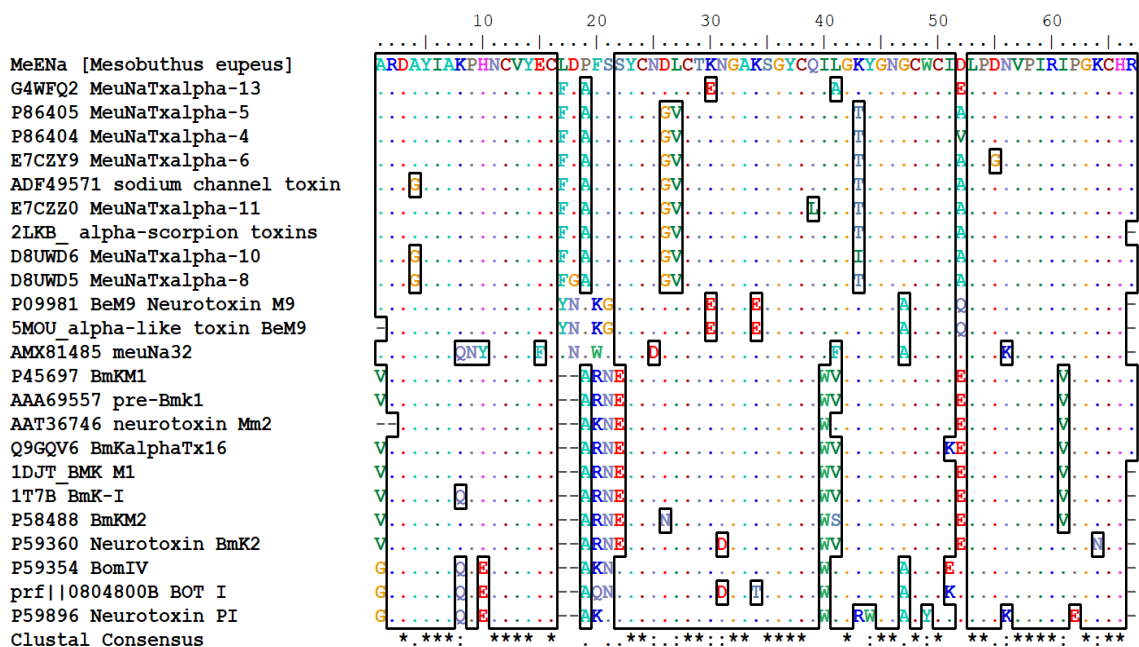
Keywordsⁱ

Molecular function	Ion channel impairing toxin, Neurotoxin, Toxin, Voltage-gated sodium channel impairing toxin
--------------------	--

Feature table

- ☒ Function
- ☒ Names & Taxonomy
- ☒ Subcellular location
- ☐ Pathology & Biotech
- ☒ PTM / Processing
- ☒ Expression
- ☐ Interaction
- ☒ Structure
- ☒ Family & Domains
- ☒ Sequence
- ☒ Similar proteins
- ☒ Cross-references

شکل ۴. آنالیز سم MeuNaTxalpha-13 در Uniprot

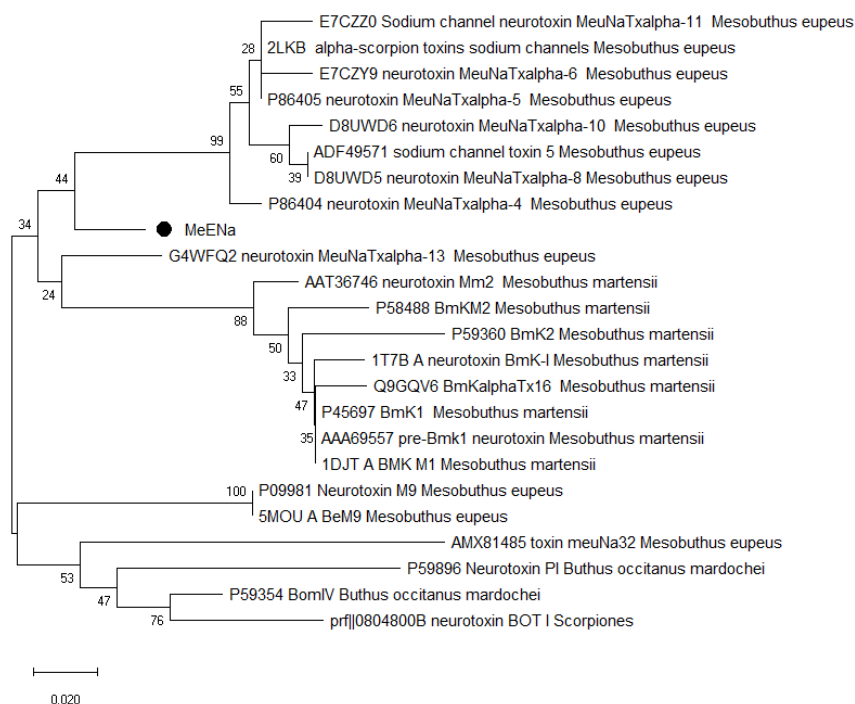


شکل ۵- هم‌ردیف سازی بر مبنای الگوریتم BioEdit، پپتید MeuNa در کنار 23 پپتید سمی استخراجی از Blast بانک پروتئین

Uniprot

Seq->	MeEnA	G4WFO2.1P86405.2.1	P86404.2.1	E7CZY9.1.1	ADF49571	E7CZ20.1.1	2LKB_A-1	D8UWD6.1	D8UWD5.1	P09981.1	5MOU_A.1	AMX81485	P45697.2.1	AAA69557	AAT36746	Q9GQV6.1	1DJT_A-1	1T7B_A-3	P58488.1	P59360.1	P59354.1	prf 0804	P59896.1
MeEnA ID	ID	0.925	0.91	0.91	0.895	0.895	0.895	0.895	0.88	0.865	0.85	0.835	0.835	0.835	0.835	0.82	0.82	0.805	0.805	0.805	0.82	0.791	0.776
G4WFO2.1	0.925 ID		0.91	0.91	0.895	0.895	0.895	0.895	0.885	0.865	0.85	0.835	0.776	0.85	0.85	0.835	0.835	0.835	0.82	0.82	0.82	0.791	0.761
P86405.2.1	0.91	0.91 ID		0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.97	0.97	0.805	0.791	0.746	0.805	0.805	0.805	0.791	0.791	0.776	0.791	0.776	0.776	0.746
P86404.2.1	0.91	0.91	0.985 ID		0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.955	0.955	0.805	0.791	0.746	0.805	0.805	0.805	0.791	0.791	0.776	0.791	0.776	0.746
E7CZY9.1.1	0.895	0.895	0.985	0.97 ID		0.97	0.97	0.97	0.97	0.955	0.955	0.791	0.776	0.731	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.761	0.776	0.761	0.731
ADF49571	0.895	0.895	0.985	0.97	0.97 ID		0.97	0.97	0.985	0.985	0.791	0.776	0.731	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.761	0.776	0.761	0.731
E7CZ20.1.1	0.895	0.895	0.985	0.97	0.97 ID		0.97	0.955	0.955	0.791	0.776	0.731	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.761	0.776	0.761	0.731
2LKB_A-1	0.895	0.895	0.985	0.97	0.97	0.97 ID		0.955	0.955	0.818	0.803	0.757	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.803	0.787	0.803	0.787	0.757
D8UWD6.1	0.895	0.895	0.97	0.955	0.955	0.985	0.955	0.955 ID		0.97	0.791	0.776	0.731	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.761	0.776	0.761	0.731
D8UWD5.1	0.88	0.88	0.97	0.955	0.955	0.985	0.955	0.955	0.97 ID		0.791	0.776	0.731	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.761	0.776	0.761	0.731
P09981.1	0.865	0.85	0.805	0.805	0.791	0.791	0.791	0.818	0.791	0.791 ID		0.984	0.803	0.776	0.776	0.791	0.761	0.787	0.772	0.772	0.772	0.818	0.757
5MOU_A.1	0.85	0.835	0.791	0.791	0.776	0.776	0.776	0.803	0.776	0.776	0.984 ID		0.787	0.776	0.776	0.803	0.761	0.787	0.772	0.772	0.772	0.818	0.757
AMX81485	0.835	0.776	0.746	0.746	0.731	0.731	0.731	0.757	0.731	0.731	0.803	0.787 ID		0.716	0.716	0.701	0.701	0.727	0.742	0.712	0.712	0.787	0.772
P45697.2.1	0.835	0.85	0.805	0.805	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.716 ID		1	0.938	0.984	0.984	0.969	0.953	0.938	0.83	0.8
AAA69557	0.835	0.85	0.805	0.805	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.776	0.776	0.716	1 ID		0.938	0.984	0.984	0.969	0.953	0.938	0.83	0.8
AAT36746	0.835	0.835	0.805	0.805	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.803	0.701	0.938	0.938 ID		0.923	0.923	0.907	0.907	0.876	0.846	0.8	0.769
Q9GQV6.1	0.82	0.835	0.791	0.791	0.776	0.776	0.776	0.776	0.776	0.776	0.761	0.761	0.701	0.984	0.984	0.923 ID		0.969	0.953	0.938	0.923	0.83	0.815
1DJT_A-1	0.82	0.835	0.791	0.791	0.776	0.776	0.776	0.803	0.776	0.776	0.787	0.787	0.727	0.984	0.984	0.923	0.969 ID		0.984	0.968	0.953	0.843	0.812
1T7B_A-3	0.805	0.82	0.776	0.776	0.761	0.761	0.761	0.787	0.761	0.761	0.772	0.772	0.742	0.969	0.969	0.907	0.953	0.984 ID		0.953	0.937	0.859	0.828
P58488.1	0.805	0.82	0.791	0.791	0.776	0.776	0.776	0.803	0.776	0.776	0.772	0.772	0.712	0.953	0.953	0.907	0.938	0.968	0.953 ID		0.921	0.828	0.796
P59360.1	0.805	0.82	0.776	0.776	0.761	0.761	0.761	0.787	0.761	0.761	0.772	0.772	0.712	0.938	0.938	0.876	0.923	0.953	0.937	0.921 ID		0.828	0.828
P59354.1	0.82	0.791	0.776	0.776	0.761	0.761	0.761	0.787	0.761	0.761	0.818	0.818	0.787	0.83	0.83	0.846	0.83	0.843	0.859	0.828	0.828 ID		0.937
prf 0804	0.791	0.761	0.746	0.746	0.731	0.731	0.731	0.757	0.731	0.731	0.787	0.787	0.757	0.8	0.8	0.8	0.815	0.812	0.828	0.796	0.828	0.937 ID	0.843
P59896.1	0.776	0.746	0.746	0.746	0.731	0.731	0.731	0.757	0.731	0.731	0.757	0.757	0.772	0.753	0.753	0.769	0.738	0.765	0.781	0.75	0.75	0.89	0.843 ID

شکل ۶- ماتریکس شباهت ارائه شده در نرم افزار BioEdit 7، میزان همولوژی ژن MeENa با سایر توالی های بانک های ژنی



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک سم پتید MeENa. آنالیز نزدیکی فیلوژنتیک بین MeENa و 23 توالی پپتیدی دیگر از بانک پروتئینی

شامل توالی های سدیم کانال توکسین ها و سموم خانواده بوتیده. سم MeENa با علامت ● در درخت مشخص است.

Molecular investigation of the mRNA transcript of the neurotoxin encoding the sodium channel in the venom of the scorpion *Mesobutus eupeus* in the southwestern region of Iran
Rojin Asadian¹, Abdolhassan Doulah^{2,*}

1- MSc, Department of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

***Corresponding author:**

Dr. Abdolhassan Doulah

Email: doulah1403@iau.ac.ir

Abstract

Background and aim: Peptides in scorpion venom are of interest to researchers due to their toxic and medicinal properties. This study was carried out with the aim of molecular investigation, sequencing, phylogenetic characterization and cloning of the gene encoding the neurotoxin effective on the sodium channel in the venom of the scorpion *Mesobutus eupeus*.

Materials and Methods: The studied scorpions were caught during a night patrol operation from Khuzestan province, Ahvaz city. RNA samples were extracted from scorpion telson tissue. After

cDNA synthesis, the initial fragment was amplified using degenerated primers and the amplicon was sequenced. Next, specific primers were designed based on the obtained sequence and the amplification of the gene was done. The amplified gene was cloned using the pTG19-T vector in the competent *Escherichia coli DH5-α* host bacterium. After screening the transformed colonies, plasmid DNA was extracted and the gene was sequenced.

Results: Bioinformatic studies showed that the peptide has conserved sequences similar to the peptide neurotoxin effective on the sodium channel in the scorpion *M. eupeus*, which confirms the nature of this peptide.

Conclusions: In addition to determining the sequence and molecular and phylogenetic characteristics, in this study the mentioned peptide gene was cloned in *E. coli DH5-α*, which can be used for future pharmacological and medical studies on this toxin.

Keywords: Scorpion venom, Cloning, Sodium channel neurotoxin, *Mesobuthus eupeus*