شناسایی مولکولی پپتیدتوکسین MeBTX از غدد زهری عقرب *مزوبوتوس اپئوس* ایران

عباس جلودار[۱]، علیرضا مسعودی[۲]، سعید مهرزادی[۲] و عاطفه داوودی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۳۰

خلاصه

پلی‌پپتیدهای زهر عقرب علاوه بر عملکرد روی کانال‌های یونی، در فعالیت‌های ضد میکروبی نیز نقش دارند. در این مطالعه یک پپتید توکسین از زهر یکی از فراوان‌ترین عقرب‌های بومی ایران به نام *مزوبوتوس اپئوس (Mesobuthus eupeus)* تکثیر و توالی نوکلئوتیدی آن مورد شناسایی ملکولی قرار گردید. پس از شناسایی عقرب، مجموع کل RNA از غده زهر آن استخراج و غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. سپس به منظور ساخت cDNA، از کل RNA به عنوان رونوشت و از الیگو (dT) اصلاح شده به عنوان آغازگر استفاده گردید. در ادامه، با استفاده از تکنیک RT-PCR پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، یک قطعه cDNA تکثیر گردید. با استفاده از برنامه آنالیز پپتید راهنما مشخص شد که این پلی‌پپتید کد شده توسط این cDNA دارای یک پپتید راهنما می‌باشد که اسید آمینه گلایسین در وضعیت بیستمین اسید آمینه به عنوان شروع پلی‌پپتید بالغ محسوب می‌گردد. همترازی این پلی‌پپتید با توالی‌های مشابه در بانک ژن NCBI نشان داد که این ژن به میزان ۹۶، ۹۴ و ۶۷ درصد با نروتوکسین‌های طویل از عقرب‌های *M. martensii*, *Buthus occitanus Israelis* و *Tityus costatus* به ترتیب، شباهت دارد. مقایسه این cDNA با ژن‌های مشابه از دیگر گونه‌های عقرب نشان داد که این ژن در ناحیه بین اسید آمینه ۸۵-۵۵ حاوی یک دومین بنام "Arthropod defensin" است. این دومین که غنی از سیستئین می‌باشد به خانواده‌ای از پپتیدهای ضد باکتریایی که عمدتاً روی میکروب‌های گرم مثبت مؤثرند، متعلق است. وجود تشابه بالا به همراه وجود ۶ سیستئین محافظت شده و همچنین نتایج فیلوژنی همگی دلالت بر این دارد که این ژن احتمالاً یک عضو جدید از خانواده پپتید توکسین‌ها از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* ایران است که در مقایسه با توالی‌های مشابه از منشاء مشترکی سرچشمه گرفته‌اند.

کلمات کلیدی: cDNA، RT-PCR، توکسین، ضد باکتری، *مزوبوتوس اپئوس*، عقرب، ایران

مقدمه

عقرب‌های خانواده بوتیده با داشتن بیش از ده گونه و یک زیرگونه از فراوانترین عقرب‌های استان خوزستان می‌باشند که عقرب *مزوبوتوس اپئوس* از این خانواده جز فراوان‌ترین عقرب‌های این استان محسوب می‌شود (Navidpour et al., 2008). سمیت‌زائی این عقرب روی پستانداران مربوط به حضور پلی پپتیدهایی است که روی کانال‌های یونی موجود در غشاهای تحریک‌پذیر سلول‌های عصبی اثر می‌گذارند. این توکسین‌ها که بعضاً خاصیت ضد میکروبی هم دارند، در همولنف و غده زهر این عقرب یافت می‌گردند (Cociancich et al., 1993، Yibao et al., 2009، Ehret-Sabatier et al., 1996).

تاکنون پانزده ژن کد کننده آلفاتوکسین‌های جدا شده از غده سم عقربی به نام *بوتوس مارتنزی کراش* (*Buthus martensii Krash*) از خانواده بوتیده شناسایی شده است. برای مثال، توالی cDNA کد کننده یک نوروتوکسین تحریکی اختصاصی حشرات موجود در غده سم این عقرب تکثیر داده شده است (Goudet et al., 2002، Xu et al., 2005). در یک مطالعه دیگر روی همین عقرب ژن کد کننده پپتید ضد صرع کلون و تعیین توالی شد و توالی اسیدآمینه این نروتوکسین گزارش گردید. BmKb1 و BmKn2 نیز از دیگر ترکیبات ضد میکروبی هستند که از غده زهر عقرب *بوتوس مارتنزی کراش* استخراج

[۱] استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۲] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
E-mail: jolodara@scu.ac.ir (نویسنده مسئول)

شده‌اند (Wang et al., 2001). به منظور جدا سازی این پلی‌پپتیدها، سم عقرب‌های گونه دیگر مانند *آندروکتونوس استرالیس* که عمدتاً در آفریقای جنوبی زیست می‌کند نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. cDNAهای کد شده برای سه ایزومر آلفاتوکسین به نام‌های AaHI، AaII و AaIII از این عقرب شناسایی گردیده است (Pierre et al., 1989). پاندینین ۱ و ۲ پپتیدهای هستند که از عقرب *پاندینوس امپراتور* (*Pandinus imperator*) افریقایی استخراج شده‌اند که فعالیت ضد میکروبی بالایی علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان داده‌اند در حالی که فعالیت ضد میکروبی ضعیف‌تری در برابر باکتری‌های گرم منفی دارند (Corzo et al., 2001). IsCT پپتید ضد میکروبی دیگری است که از غده زهر عقرب *اپیستاکانتوس ماداگاسکاریانسیس* (*Opisthacanthus madagascariensis*) به دست آمده است. این ترکیب فعالیت سایتولیتیک قوی علیه سلول‌های پستانداران و باکتری‌ها نشان داده است (Lee et al., 2004). اپیستوپورین ۱ و ۲ پپتیدهای ضد میکروبی هستند که از عقرب آفریقایی *اپیستوفتالموس کارینـاتوس* (*Opistophtalmus carinatus*) استخراج شده‌اند و فعالیت ضد میکروبی بالایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده‌اند. لیزوزیم C که از غده زهر عقرب *اسکورپیوس جانکی* (*Scorpiops jendeki*) استخراج شده است پروتئین ضد میکروبی دیگری است که در دفاع غیر اختصاصی بسیاری از موجودات نقش دارد، ولی نقش آن در بدن عقرب هنوز مشخص نشده است (Yibao et al., 2009). در ادامه این مطالعات، یک پپتید ضد میکروبی ۴۲ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی ۴۴۳۶ دالتون است از غده زهر عقرب مکزیکی *هادروروس ازتوکوس* (*Hadrurus aztecus*) جدا شده است (Torres Larios et al., 2000). اسکورپین نیز یک پپتید ضد میکروب و ضد مالاریا است که از عقرب *پاندینوس امپراتور* جدا شده است (Condea et al., 2000).

هدف از این پژوهش، تکثیر، توالی‌یابی و شناسایی ملکولی یک پپتیدتوکسین از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* ایران است که دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه و استخراج RNA

تعداد ده نمونه عقرب متعلق به گونه *مزوبوتوس اپئوس* از استان خوزستان جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه رفرانس عقرب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز در اکواریوم نگهداری شدند. پس از شناسایی گونه عقرب، محل نمونه‌گیری به خوبی توسط الکل ضدعفونی شد و سپس غدد زهر آن با استفاده از قیچی استریل جدا شده و در محلول RNALater (کیاژن، آلمان) به منظور استخراج RNA تام نگهداری شد. در این پژوهش، استخراج RNA با استفاده از محلول RNX (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده از روش اسپکتروفوتومتری استفاده گردید.

ساخت cDNA

به ۳ میکروگرم از RNA کل استخراج شده، ۱ میکروگرم از آغازگر اصلاح شده الیگو (dT) اضافه شد و پس از آن نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ منتقل گردید. در مرحله بعد ۴ میکرو لیتر بافر 5x، ۰/۸ میکرولیتر dNTPs (حاوی ۲۵ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید تری‌فسفات)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Ribolock RNase inhibitor (۴۰ واحد در میکرولیتر) اضافه گردید و سپس با آب مقطر حجم آن به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد به هر نمونه ۱ میکرولیتر از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) افزوده شد و در نهایت نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲

درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن محصول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد.

RT-PCR

به منظور طراحی آغازگرها، توالی‌های مربوط به این ژن از عقرب‌های بوتوس مارتنزی (*Buthus martensii*) (AF156173) از بانک ژن بین المللی NCBI استخراج و سپس با مقایسه توالی‌های محافظت شده آغازگرها طراحی گردیدند. به منظور تسهیل در امر همسانه‌سازی آینده جایگاه برش دو آنزیم BamHI و HindIII به ترتیب در ابتدای آغازگرهای F و R به ترتیب، تعبیه شدند. به انتهای ′5 آغازگرها، یک توالی سه نوکلئوتیدی CGC به منظور افزایش امکان هضم آنزیمی نیز افزوده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش PCR برای هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که حاوی ۳ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ µM از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱/۵ mM کلرید منیزیم (سیناژن، ایران)، ۰/۲۵mM dNTP، 1x بافر PCR (سیناژن، ایران) و ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase (سیناژن، ایران) بود. واکنش با استفاده از دستگاه TECHNE (Touchgene Gradient) انجام گردید و برنامه حرارتی بهینه در نهایت به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (۳۲ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مقاله

نام آغازگرها	توالی آغازگرها
الیگو(dT)	5′-CGCTCTAGAGCTCGAGTCACT(17) Xbal Xhol
الیگو(dT)-R	5′-CCCAGATCTCGAGCTCAGTG-3′
F	5′-CGCGGATCCATGCAAAGGAATCTGGTCGT BamHI
R	5′-CGCAAGCTTGTAAAAGCCCATGGGAATGC HindIII

الکتروفوروز ژل آگارز

به منظور بررسی محصول واکنش PCR و اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری 6x مخلوط گردید و به چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ ساخته شده از بافر TAE و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید بارگذاری گردید. پس از قرار دادن ژل در تانک الکتروفورز با شدت ۵ ولت به ازاء هر سانتی‌متر طول ژل به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک از آن عکسبرداری صورت گرفت. به منظور تخلیص محصول RT-PCR از روی ژل آگارز از کیت استخراج ژل (ویوانتیس، مالزی) استفاده شد. مراحل تخلیص مطابق بروشور شرکت سازنده انجام گرفت.

توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها

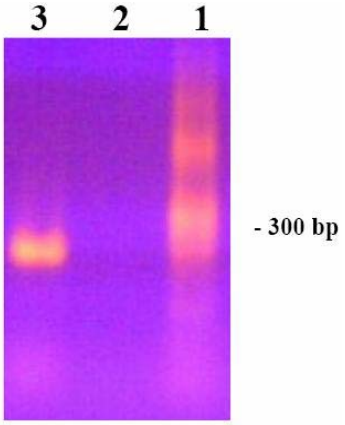
برای طراحی آغازگرها و تائید آنها از از نظر عدم داشتن توالی‌های مکمل و نزدیک بودن دمای ذوب از نرم‌افزار Primo Pro 3.4، www.changbioscience.com/primo/primo.html استفاده گردید. با استفاده پایگاه اینترنتی ExPASy وجود پپتید راهنما در توالی به دست آمده مورد بررسی

قرارگرفت. با استفاده از همین پایگاه وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای این پلی‌پپتید محاسبه شد. درخت فیلوژنیک بر اساس توالی این ژن با استفاده از نرم‌افزار موجود در پایگاه اینترنتی www.phylogeny.fr ترسیم گردید. برای تعیین ساختمان ملکولی ژن مورد بررسی از نرم‌افزار جستجوی CDD (ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd) استفاده شد. با استفاده از برنامه CLUSTAL_W عمل همترازی انجام و ویرایش گردید.

نتایج

تکثیر و توالی‌یابی ژن MeBTX

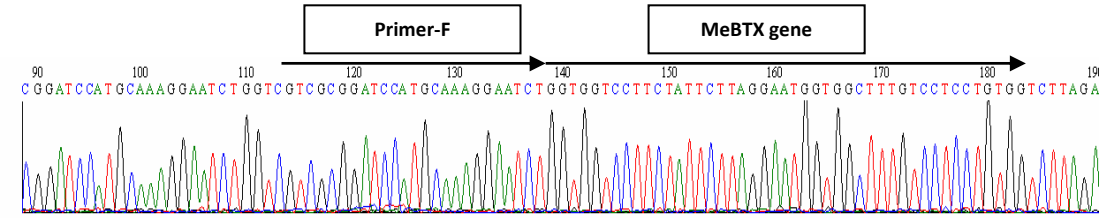
برای اندازه‌گیری غلظت RNA استخراج شده از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. میزان جذب نوری به دست آمده در مورد نمونه‌های *مزوبوتوس اپئوس* ۰/۰۳۶ مشاهده شد، بنابراین میزان غلظت RNA در آن ۱۴۴۰ نانوگرم در هر میکرولیتر محاسبه گردید. در ادامه تیتراسیون غلظت‌های مختلف کلرید منیزیم و پرایمرها، غلظت بهینه برای کلرید منیزیم ۲ میلی‌مولار و برای هر کدام از پرایمرها ۰/۴ پیکومول در میکرولیتر به دست آمد. همان طور که در تصویر ۱ نشان داده شده است واکنش PCR اول با استفاده از آغازگر R–الیگو (dT) و F سبب تکثیر قطعه‌ای مشخص با طول ۲۷۳ نوکلئوتید شده است. در این PCR علاوه بر باند مورد نظر، در ناحیه بالا و پایین قطعه تکثیر شده، اسمیر مشاهده می‌شود. لذا به منظور تکثیر اختصاصی‌تر ژن مورد نظر و در نتیجه کاهش اسمیر دیده شده در محصول PCR اول، Semi-Nested RT-PCR با یک دهم رقت از محصول PCR اول به عنوان رونوشت و با استفاده از آغازگرهای F و R انجام شد. همان طور که در این تصویر مشاهده می‌شود، واکنش PCR دوم سبب تکثیر محصول اختصاصی و بدون اسمیر قطعه مربوطه شده است. در تصویر ۱، باند مورد نظر بدون اسمیر و یا باند غیر اختصاصی مشاهده می‌شود. محصول PCR دوم از روی ژل خالص‌سازی شده و مستقیماً مورد توالی‌یابی قرار گرفت. به منظور اطمینان از صحت انجام پروسه تخلیص محصول PCR و حصول باند واضح، محصول PCR تخلیص شده الکتروفورز شد.



تصویر ۱: الکتروفورز محصول واکنش PCR اول و دوم برای تکثیر MeBTX از عقرب** مزوبوتوس اپئوس **استان خوزستان روی ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه. مارکر ۱۰۰bp در منتهی الیه سمت راست ژل ، ستون ۱ و ۳ محصول به دست آمده از PCR اول و دوم. ستون ۲ کنترل منفی

به منظور ارزیابی پروتئین کد شونده توسط قطعه نوکلئوتیدی توالی‌یابی شده (تصویر ۲ الف)، نتیجه حاصل از توالی‌یابی توسط برنامه ترجمه پایگاه اینترنتی ExPASy به توالی اسید آمینه تبدیل شد (تصویر ۲ ب). با توجه به این تصویر، ژن مورد نظر عقرب مزوبوتوس اپئوس از ۹۱ اسید آمینه تشکیل شده است. این پلی‌پپتید که دارای وزن مولکولی برابر ۱۰/۲۰۷ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک برابر با ۹/۰۶ می‌باشد، MeBTX نامیده شد.

الف)



ب)

1 10 20
M Q R N L V V L L F L G M V A L S S C G
21 30 40
L R E K H I Q K L V K Y A V P E G T L R
41 50 60
T I L Q T A V H K L S K T Q F G C P A Y
61 70 80
Q G Y C D D H C Q D I K K Q E G F C H G
81 90
F K C K C G I P M G F

تصویر ۲: توالی ژن MeBTX از عقرب** مزوبوتوس اپئوس. **الف) در این تصویر توالی نوکلئوتیدی ژن MeBTX برگرفته از فایل اصلی توالی یابی نشان داده شده است. ب) توالی اسید آمینه‌ای MeBTX به همراه پپتید راهنما و دومین "Arthropod defensin" نشان داده شده است. پپتید راهنما به رنگ خاکستری مشخص است و در زیر توالی دومین[1] مربوطه نیز خط کشیده شده است.

شناسایی پپتید راهنما و دومین MeBTX

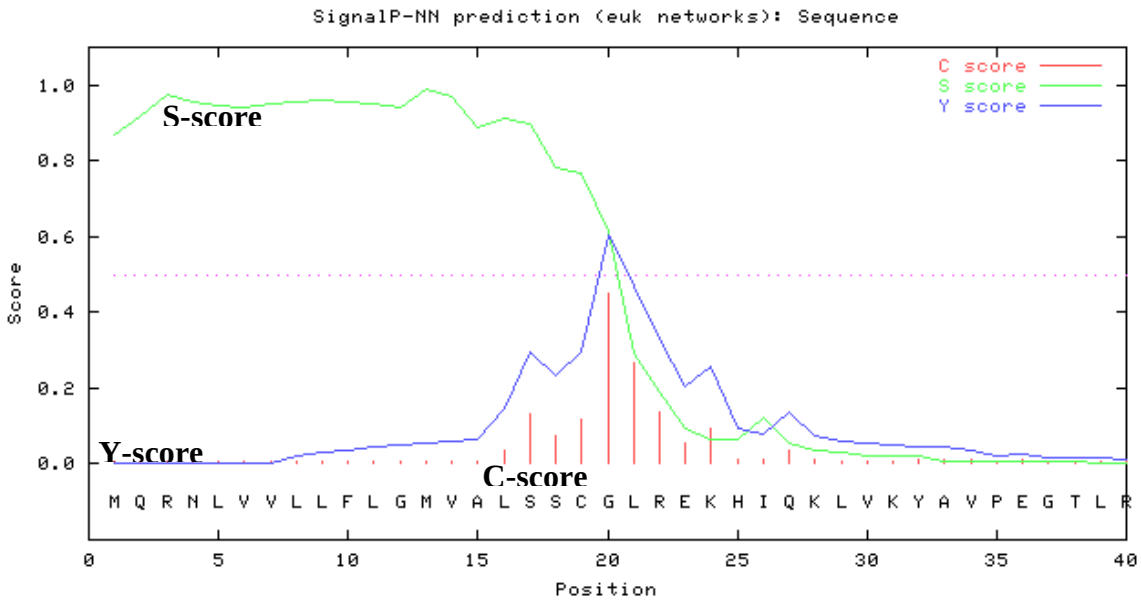
توالی به دست آمده، از نظر وجود پپتید راهنما مورد بررسی قرارگرفت. با توجه به تصویر ۳ مشخص شد که این ژن با ارزش ۰/۷۶۶ دارای یک پپتید راهنما با طول ۲۲ اسید آمینه است. همان طور که در این تصویر ۵ مشاهده می‌شود، پپتید راهنما با اسید آمینه متیونین (اسیدآمینه شماره ۱) آغاز می‌شود و به اسیدآمینه سیستئن (اسیدآمینه شماره ۱۹) ختم می‌شود.

بر اساس داده‌ها، مشخص شد که ژن MeBTX در ناحیه بین اسید آمینه ۸۵-۵۵ حاوی یک دومین بنام "Arthropod defensin" است. این دومین که حاوی ۶ سیستئین به صورت تشکیل ۳ باند دای سولفیدی می‌باشد به خانواده‌ای از پپتیدهای ضد باکتریایی که عمدتاً روی میکروب‌های گرم مثبت موثرند، تعلق دارد. این ناحیه از اسیدآمینه ۵۵ (فنیل آلانین F) ژن مورد نظر آغاز و به اسیدآمینه ۸۴ (سیستئن C) ختم می‌شود. در تصویر ۲، این ناحیه با خطی که در زیر آن رسم گردیده است، مشخص شده است.

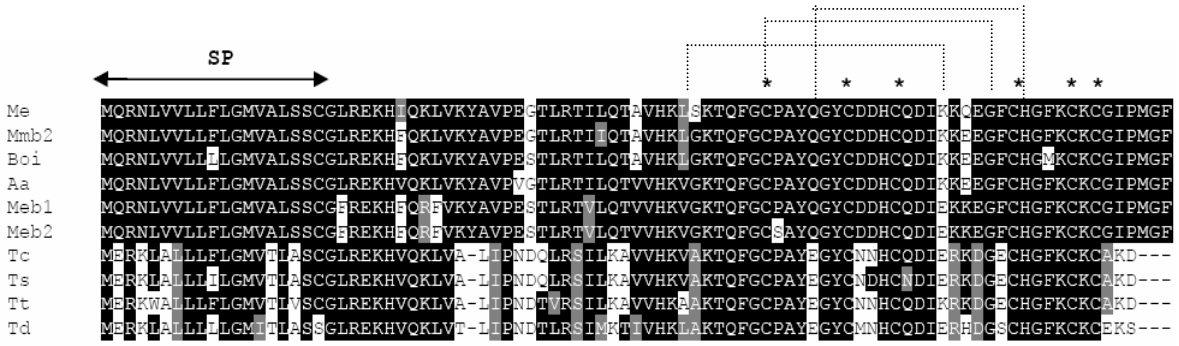
همترازی و رسم درخت فیلوژنیک بر اساس توالی MeBTX

بر اساس تصویر ۴ همترازی توالی اسید آمینه‌ای به دست آمده نشان داد که پپتید توکسین عقرب *مزوبوتوس اپئوس* خوزستان با بتا پپتید نروتوکسین مهار کننده کانال‌های پتاسیمی جدا شده از عقرب *مزوبوتوس مارتنزی* در ۱۰۰ درصد طول، ۹۶ درصد و با مشابه این ژن از عقرب *Tityus costatus* در ۹۴ درصد طول، ۶۷ درصد مشابهت دارد. میزان مشابهت قطعه توالی‌یابی شده با هالوتایپ‌های مختلف این ژن در عقرب *Mesobuthus eupeuss* مدیترانه‌ای متفاوت است. بیشترین شباهت در مورد هر دو عقرب به ترتیب، ۸۸ و ۸۷ درصد در ۱۰۰ درصد طول است. به این ترتیب می‌توان چنین نتیجه گرفت که این توالی، یک بتا پپتید نروتوکسین جدید از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* استان خوزستان است.

1- Domain



*تصویر ۳: بررسی وجود پپتید راهنمای ژن کد کننده پپتید توکسین **MeBTX** از عقرب مزوبوتوس اپئوس استان خوزستان. در این تصویر محل برش پپتید راهنما با توجه به ۳ پارامتر c-score، s-score و y-score، با احتمال ۰/۷۷۶ بین اسید آمینه ۱۹ و ۲۰ (SSC-GL) تعیین شده است.*

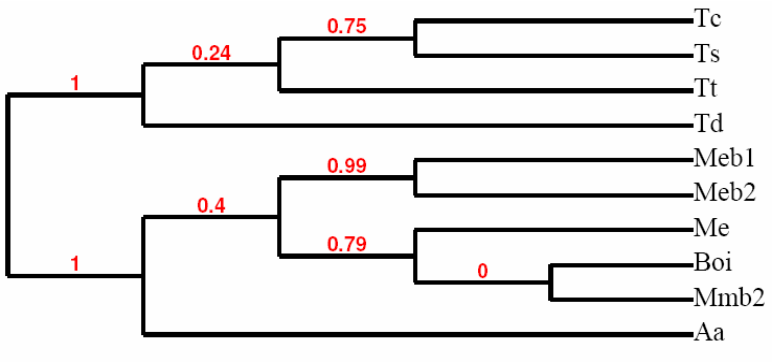


*تصویر ۴: مقایسه توالی آمینواسیدی ژن **MeBTX** عقرب مزوبوتوس اپئوس استان خوزستان با ژن‌های مشابه از عقرب‌های دیگر. اسیدآمینه‌های کاملاً مشابه با رنگ تیره نشان داده شده‌اند. اسیدآمینه‌هایی که همولوگ یکدیگرند با رنگ خاکستری نشان داده شده‌اند. اسیدآمینه‌های سیستئن تشکیل دهنده دای سولفید باندها با * و نحوه اتصال آنها با نقطه چین نشان داده شده‌اند و محدوده پپتید راهنما با خط دو سرنیزه‌ای علامت‌گذاری گردیده است. ژن‌ها مربوط به عقرب‌های به شرح زیر می‌باشند:*

Me: *M. eupeus* (استان خوزستان) ; Mmb2: M. martensii (Q9N661); Boi: *Buthus occitanus israelis* (B8XH40); Aa: *Androctonus australis* (P69939);
Meb1:*M. eupeus* (مدیترانه شرقی) (A9XE60); Tc: *Tityus costatus* (Q5G8A6); Ts: *Tityus serrulatus* (P69940); Tt: *Tityus trivittatus* (Q0GY46); Td: *Tityus discrepans* (Q0GY44)

بر اساس توالی‌های مورد استفاده در تصویر ۴، درخت فیلوژنیک بر اساس توالی اسید آمینه‌ای پپتید توکسین به دست آمده از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* استان خوزستان ترسیم گردید (تصویر ۵). همان طور که در این تصویر مشاهده می‌شود، توالی‌های موجود علی‌رغم تشابه اولیه آنها در سطح اسید آمینه، به دو دسته کاملاً مجزا قابل

تقسیم هستند. همان طور که انتظار می‌رفت Meb1 و Meb2 مربوط به *مزوبوتوس اپئوس* مدیترانه‌ای در یک دسته قرار می‌گیرند. در حالی که ژن MeBTX *مزوبوتوس اپئوس* ایران با ژن‌های مشابه‌ای به نام‌های Boi, Mb2 و Aa جدا شده به ترتیب از *M. Martensii*، *Buthus occitanus Israeli* و *Androctonus australis* قرابت دارد و دسته دوم را تشکیل می‌دهند.



تصویر ۵: درخت فیلوژنیک ژن MeBTX (Me) و توالی‌های مشابه از دیگر عقرب‌ها. فیلوژنی بر اساس همترازی توالی‌هایی که قبلاً در تصویر ۴ آورده شده است رسم گردید. اعداد در بالای خط‌ها نشان دهنده ارتباط فی میابین گروه‌ها است.

بحث

مطالعاتی که تاکنون روی پلی‌پپتیدهای زهر عقرب خانواده بوتیده انجام شده است، بیشتر مربوط به جداسازی نروتوکسین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی بوده است که مستقیماً از غده زهر عقرب‌ها جداسازی و ویژگی‌های آنها تعیین شده است. علاوه بر پلی‌پپتیدها، فعالیت پروتئولیتیک برخی از آنزیم‌های استخراج شده از غده زهر چندین گونه عقرب نیز با این روش مورد مطالعه قرار گرفته است، ولی اطلاعات ژنتیکی در مورد تعیین توالی این نروتوکسین‌ها در بانک بین المللی ژن اندک است. در این راستا، گرچه در خصوص گونه‌هایی از عقرب خانواده بوتیده در دنیا مطالعاتی صورت گرفته است، ولی در خصوص گونه‌های بومی عقرب‌های این خانواده در ایران، تقریباً هیچ اطلاعات ژنتیکی در بانک بین المللی ژن موجود نیست.

همترازی توالی ژن MeBTX با عقرب‌های دیگر

توالی اسید آمینه‌ای این ژن از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* مورد بررسی در این پژوهش با توالی ژن‌های مشابه از عقرب‌هایی از جنس مزوبوتوس مدیرانه شرقی، *آندرکتنوس و تیتیوس* (Tityus) مقایسه شد (تصویر ۵). همان طور که در این تصویر مشاهده می‌شود، تشابه توالی این ژن از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* استان خوزستان با ژن‌های مشابه از عقرب‌هایی از جنس مزوبوتوس مدیرانه شرقی، آندرکتنوس بسیار بالاست و تفاوت‌های اندکی (در حدود ۵-۳ اسیدآمینه) دیده می‌شود، در حالی که این تشابه توالی در مقایسه عقرب‌های جنس تیتیوس در حد متوسط است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که توالی این ژن در جنس‌های مختلف عقرب در طی تکامل محافظت شده است.

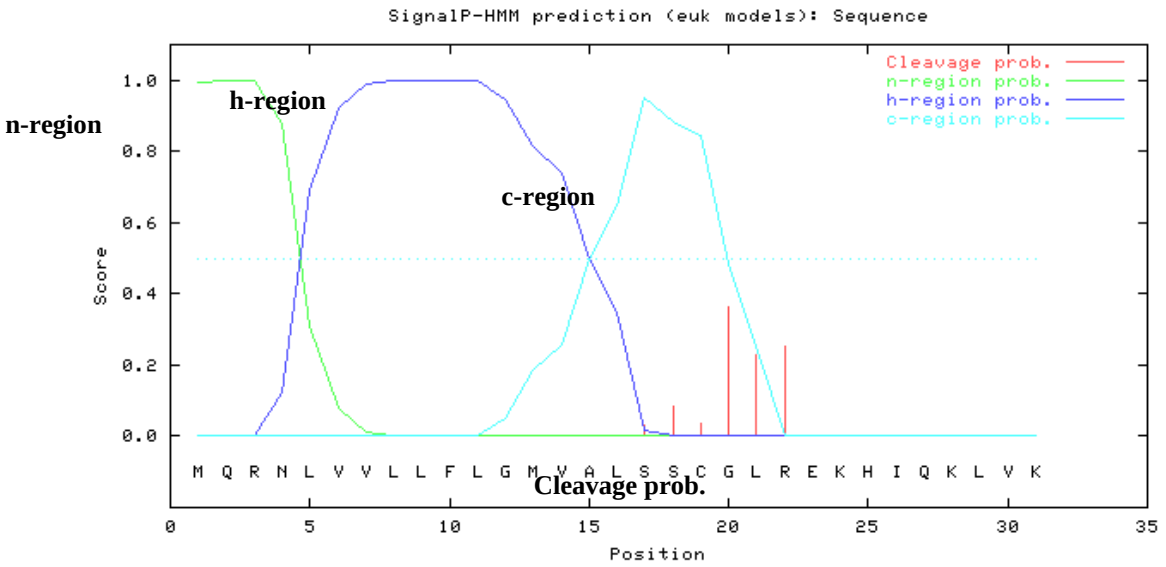
همان طور که در تصویر ۵ مشاهده می‌شود، این ژن دارای ۶ اسیدآمینه سیستئین (C) محافظت شده است که در ساختار دوم این پپتید ۳ باند دی سولفید تشکیل می‌دهند (Harwig et al., 1995). این در حالی است که این ساختمان در موجودات دیگری به غیر از عقرب، نظیر کنه‌های درماسنتور (Dermacentor) (AAO23571)، ایکسودس (XP_002399439) و پشه آنوفل Anopheles

(AAC47326)، مگس سیمیولیوم (Simulium) (ACZ28238)، اسپودپترا (Spodoptera) (ACZ28238)، مانودوکا (Manduca) (AAB31190)، بومبایکس Bombyx (NP_001037448)، اورنیتودوروس (Ornithodoros) (AAL17868) و دروزوفیلا Drosophila (ABK57077) به صورت ۸ سیستئین محافظت شده دیده می‌شود. لذا، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این پپتید در عقرب‌ها برخلاف اورگانیزم‌های دیگر به جای ۴ پیوند دی‌سولفیدی، ۳ پیوند تشکیل می‌دهد.

پلی‌پپتید ترشحی MeBTX

تمام پروتئین‌های ترشحی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها دارای بخشی به نام پپتید راهنما هستند. طول و توالی آمینواسیدی پپتیدهای راهنما براساس نوع پروتئین و همین طور نوع ارگانیزم متفاوت است (Nielsen et al., 1997). هنگام ساخت یک پروتئین ترشحی، مدتی پس از آغاز ساخت پپتید راهنما روی یک ریبوزوم، رشته پروتئین در حال ساخت وارد لومن شبکه اندوپلاسمی می‌شود و طویل شدن پروتئین ادامه می یابد. سپس پپتید راهنما از طریق کانال‌هایی وارد غشای سلولی می‌شود. در این حالت سر انتهایی N پپتید راهنما در ناحیه سیتوزولی و سر انتهایی C آن درون لومن شبکه اندوپلاسمی قرار می‌گیرد. در نهایت نیز، پپتید راهنما توسط آنزیم سیگنال پپتیداز بریده می‌شود و پروتئین بالغ به خارج از سلول ترشح می‌شود (Nothwehrs and Gordon, 1989). همان طور که در تصویر ۳ و۶ مشاهده می‌شود جایگاه برش این پپتید راهنما توسط سیگنال پپتیداز بین اسیدآمینه نوزدهم و بیستم قرار دارد. پپتیدهای راهنما در سر انتهایی N دارای اسید آمینه‌هایی با بار مثبت هستند. بعد از آن اسید آمینه‌های هیدروفوب قرار دارد که به نظر می‌رسد هنگام ورود به غشای دو لایه، کنفورماسیون آلفا- هلیکس به خود می‌گیرند. در سر انتهایی C پپتید راهنما نیز اسید آمینه‌های شکننده هلیکس مانند پرولین و گلایسین قرار دارند. با آنالیز پپتید راهنمای پروتئین‌های ترشحی ۳ ناحیه قابل مشاهده است: ناحیه مربوط به سر انتهایی N (ناحیه n)، ناحیه شامل اسید آمینه‌های هیدروفوب (ناحیه h) و ناحیه مربوط به سر انتهایی C (ناحیه c). در تصویر ۶ نواحی مربوط به n، h و c مربوط به پپتید راهنمای بتا پپتید توکسین عقرب مزوبوتوس اپیوس استان خوزستان مشخص شده است. در این تصویر مشخص می‌شود که از اسید آمینه اول (متیونین M) تا اسید آمینه پنجم (فنیل آلانین F) جز ناحیه n ، از اسید آمینه ششم (سرین S) تا اسید آمینه هفدهم (ایزولوسین I) جز ناحیه h و از اسید آمینه هیجدهم (گلوتامیک اسید E) تا اسید آمینه بیست و دوم (گلیسین G) جز ناحیه c می‌باشد. حال با توجه به اینکه s-score احتمال حضور هر اسیدآمینه در ناحیه پپتید راهنما است، می‌توان گفت که آمینه اسیدهایی که جزیی از پپتید راهنما هستند s-score بالاتری دارند. از محلی که s-score ناگهان افت می‌کند توالی آمینواسیدی پروتئین بالغ آغاز می‌شود. c-score که احتمال برش پپتید راهنما توسط سیگنال پپتیداز در هر اسیدآمینه را نشان می‌دهد، می‌توان محل برش پپتید راهنما توسط سیگنال پپتیداز را یافت. بنابراین، اولین اسید آمینه پروتئین بالغ بیشترین c-score را دارد. از آنجائی که y-score نیز ترکیبی از s-score و c-score است، در نتیجه این فاکتور بهتر از c-score به تنهایی محل برش را نشان می‌دهد. همان طور که در تصویر ۳ و ۶ مشاهده می‌شود این جایگاه برش بعد از اسید آمینه بیستم یعنی بین اسید آمینه‌های سیستئن (C) و گلایسین (G) قرار دارد. به این ترتیب اولین اسید آمینه پروتئین بالغ ژن مورد نظر در سر انتهایی N، اسید آمینه گلایسین است. لذا پروتئین بالغ این ژن با اسید آمینه گلایسین آغاز و به اسید آمینه فنیل آلانین ختم می‌شود. بر اساس توضیحات فوق می‌توان چنین نتیجه گرفت که بتا پپتید نروتوکسین عقرب *مزوبوتوس اپیوس* خوزستان به علت داشتن پپتید راهنما یک پروتئین ترشحی است.

الف)



ب)

M Q R N L	V V L L F L G M V A	L S S C

تصویر ۶: نمای اسید آمینه‌ای (الف) و گرافیکی (ب) پپتید راهنما ژن MeBTX** مزوبوتوس اپئوس **استان خوزستان به همراه ۳ ناحیه n ، h و c نشان داده شده است. در تصویر ب محل برش توسط آنزیم سیگنال پپتیداز علامت‌گذاری گردیده است. نواحی n ، h و c پپتید راهنمای ژن مورد نظر در عقرب** مزوبوتوس اپئوس **بر روی تصویر نشان داده شده‌اند.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تامین هزینه‌های طرح شماره ۱۱۶ که از محل اعتبارات واحد پژوهشی دانشگاه تامین شده است، تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع

Cociancich S., Goyffon M., Bontems F., Bulet P., Bouet F. Menez A., et al. (1993). Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. Biochemistry and Biophysical Research Communi Cations, 194: 17-22.

Condea R., Zamudioa F.Z., Rodriguezb M.H. and Possania L.D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. 471: 165-168.

Corzo G., Escoubas P., Villegas E., Barnham K.J., Weilan H.E., Norton R.S., et al. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochemistry Journal, 359: 35-45.

Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffmann J.A., Dorsselaer A.V., et al. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. Journal Biology Chemistry, 271: 29537-544.

Goudet C., Chi C.W. and Tytgat J. (2002). An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicology, 40: 1239-58.

Harwig S.S., Swiderek K.M., Lee T.D. and Lehrer R.I. (1995). Determination of disulphide bridges in PG-2, an antimicrobial peptide from porcine leukocytes. Journal of Peptide Science, 1: 207-215.

Lee K., Shin S.Y., Kim K., Lim S.S., Hahm K.S. and Kim Y. (2004). Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. Biochemical and Biophysical Research Communications, 323: 712-719.

Navidpour S., Kovarík F., Soleglad M.E. and Fet V. (2008). Scorpions of Iran (Arachnida, Scorpiones) Part I. Khoozestan Province. Euscorpius, 65: 1-6.

Nielsen H., Engelbrech J., Brunak S. and Heijne G.V. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering, 10: 1-6.

Nothwehrs S.F. and Gordon J. (1989). Eukaryotic signal peptide structure/ function relationship. The Journal of Biology Chemistry, 264: 3979-87.

Pierre E., Bougis S., Rochate H. and Smith L. (1989). Precursors of *Androctonus australis* Scorpion Neurotoxins, structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. The Journal of Biological Chemistry, 264: 19259-265.

Torres Larios A., Gurrola G.B., Zamudio F.Z. and Possani L.D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. European Journal of Biochemistry, 267: 5023-31.

Wang C.G., He X.L., Shao F., Liu W., Ling M.H., Wang D.C., et al. (2001). Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from scorpion *Buthus martensi* Karsch. European Journal of Biochemistry, 268: 2480-85.

Xu X.L., Cao Z., Sheng J., Wu W.L., Luo F., Sha Y.G., et al. (2005). Genomic sequence analysis and organization of BmKαTx11 and BmKαTx15 from *Buthus martensii* Kirsch: Molecular evolution of α-toxin genes. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38: 386-390.

Yibao M., Ruiming Z., Yawen H., Songryong L., Jun L., Yingliang W., et al. (2009). Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. BMC Genomics, 10: 1-15.