Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۳، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۰/ ۳۶-۲۷

مقاله پژوهشی

تعیین توالی و بررسی مقایسه ایی– بیوانفورماتیکی ژن کد کننده پپتید شبه کلروتوکسین از عقرب زرد ایرانی (*Mesobuthus eupeus*)

شیدا ایلخانی زاده[۱]، دکتر هدا آیت*[۱]، دکتر علی محمد احدی[۱]، دکتر خداداد پیرعلی[۲]

[۱] گروه ژنتیک - دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲] گروه دامپزشکی-دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۸ اصلاح نهایی: ۹۰/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **در سال های اخیر نوروتوکسین های عقرب از لحاظ خواص دارویی و اثرات فیزیولوژیک مورد مطالعات زیادی قرار گرفته اند. یکی از این توکسین ها که توجه زیادی را به خود جلب کرده است، کلروتوکسین می باشد که هم اکنون در درمان سرطان های مغز مورد استفاده قرار می گیرد. این مطالعه با هدف تعیین توالی و بررسی مقایسه یی بیوانفورماتیکی cDNA کد کننده پپتید شبه کلروتوکسین از عقرب زرد ایرانی انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی نمونه های عقرب زرد ایرانی (*Mesobuthus eupeus*) جمع آوری و پس از جدا سازی غدد سم ساز، RNA کامل آن استخراج شد. با استفاده از Reverse transctiption polymerase chain reation (RT-PCR) توالی های Complementary DNA (cDNA) ساخته شد و سپس با پرایمرهای اختصاصی نواحی محافظت شده سموم شبه کلروتوکسین، توالی کد کننده یک پپتید سمی مشابه کلروتوکسین از *Mesobuthus eupeus* جداسازی و شناسایی شد و Mesobuthus eupeus Iranian Chlorotoxin (MeICT) نام گرفت. جهت بررسی های قرابتی با کمک سرور CustalW، توالی به دست آمده با توالی سموم مشابه در گونه های دیگر عقرب مقایسه شد.**

یافته ها: **توالی ۱۰۲ نوکلئوتیدی MeICT تشابه ۸۸٪ با کلروتوکسین به دست آمده از *Leiurus quinguestriatus* نشان داد. MeICT اولین گزارش از توالی کد کننده این سم از این گونه عقرب در ایران و جهان می باشد.**

نتیجه گیری: **بررسی های همولوژی بین توالی DNA سموم شبه کلروتوکسین از عقرب های مختلف، تفاوت های متعددی نشان داد که می تواند خاص گونه ایرانی این عقرب باشد. همچنین تشابه زیاد با کلروتوکسین احتمال استفاده درمانی از MeICT را به عنوان داروی ضد سرطان گلیوما مطرح می کند.**

واژه های کلیدی: پپتید مشابه کلروتوکسین عقرب زرد ایرانی، کلروتوکسین، عقرب زرد ایرانی.

مقدمه:

اگرچه بیش از ۴۰۰ میلیون سال از تکامل عقرب می گذرد، فنوتیپ آن در گذر زمان تغییرات کمی کرده است. با وجود این شکل ثابت، عقرب ها قلمرو گسترده یی را در کره زمین از آفریقا تا آسیا، استرالیا و آمریکا به خود اختصاص داده اند. دلیل اصلی این سازش پذیری عظیم، داشتن ابزار سمی کاملاً اختصاصی است که متشکل از یک جفت غدد زهری متصل به نیش برای تزریق سم است. عقرب ها از لحاظ فیلوژنتیکی و بر اساس تفاوت های مورفولوژیکی به ۱۴ خانواده تقسیم می شوند، که در بین آنها Buthidae به عنوان بزرگترین و مهمترین خانواده شناخته می شود. این خانواده شاخص، توجه علمی زیادی را به خود جلب کرده است و تاکنون مطالعات گسترده یی روی آن صورت گرفته است (۱).

* ***نویسنده مسئول:*** شهرکرد- دانشگاه شهرکرد- دانشکده علوم پایه- گروه ژنتیک- تلفن: ۰۹۱۲۲۲۵۸۲۱۱، E-mail:ayat-h@sci.sku.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

عقـرب هـای ایـران بـه انـواع Buthidae و Scorpionidae بـا ۱۶ جـنس و ۲۵ گونـه تقـسیم بنـدی می شوند. در این بین *Mesobuthus eupeus* گسترده ترین گونه ایرانی است (۲،۳). این گونه فراوانی بـالایی داشـته و در حال حاضر در شرق ترکیه، قفقاز، جنـوب روسـیه، خاور میانه، آسیای مرکـزی، جنـوب مغولـستان و شـمال چین وجود دارند. تنوع بالای مورفولـوژیکی ایـن گونـه باعث چنین پراکندگی گسترده ای شـده اسـت. تـاکنون ۲۱ زیرگونه از *Mesobuthus eupeus* یافت شـده اسـت که ۱۵ زیر گـــونه آنهـا، از نـــواحی مختلـف ایـــران جمع آوری شده اند (۶-۴).

مطالعـــات نشان داده است که هر گونـه عقـرب می تواند تا بیش از ۱۰۰ پپتید مختلف با دامنه وزنـی بـین ۹۰۰۰-۱۰۰۰ دالتـــون داشـــته باشـــد (۷). خـــانواده Buthidae در مقایسه با دیگر خانواده های عقـرب منبـع زهـری بـسیار متنـوعی دارد. بـه عـلاوه در ایـن خـانواده تفاوت چشمگیری را می توان در ترکیب سم گونه های یـک جـنس و حتـی زیرگونـه هـا دیـد. مطالعـات نـشان می دهد که در حـدود ۱۵۰/۰۰۰ پلـی پپتیـد مختلـف در بین ۱۵۰۰ گونه عقرب در جهان وجود دارد. با این حـال فقط تعداد کمی از آنها یعنی حدود ۴۰۰ پلی پپتید از ۳۰ گونه مختلف عقرب جدا و بررسی شده است (۸). با این حساب پپتیدهای زیادی در زهـر عقـرب هـا بـه صـورت گنجینه هایی بزرگ منتـظر اکتشاف هستند. پپتیـد هـای سمی خانواده Buthidae نقش مهمی در مطالعـه سیـستم های زیستی و توسعه داروها بازی کرده اند. مطالعـه ایـن پپتیدها برای بررسی خواص کانال های یونی و تحقیقات نوروبیولوژی بسیار مفیدند. در دهه های اخیـر پپتیـدهای دارویی زیادی از زهر عقـرب تخلـیص شـده اسـت (۹). سـم Buthidae اصـولاً شـامل ۴ خـانواده مختلـف از نوروتوکـسین هـای کوچـک اسـت کـه بـه صـورت اختصاصی کانال های یـونی شـامل کانـال هـای سـدیم، کانال های پتاسیم، کانال های کلر و کانال هـای کلـسیم را هدف می گیرد و از این رو برای موجـودات مختلـف سمی هستند (۱۰). در این بین، سموم موثر بر کانال هـای کلر نسبت به بقیه سموم کمتر مطالعه شده اند. گزارش های کمـی از سـاختمان ژنـی ایـن سـموم و نیـز عملکردهـای فیزیولوژیک و دارویی آنها در دست است. کانال های کلر در همـه غـشاهای سـلولی وجـود دارنـد و در بـسیاری از مسیرهای فیزیولوژیک ماننـد حجـم و pH سـلول، پتانـسیل استراحت غـشا و تولیـد سـیگنال هـای بیوالکتریـک نقـش حیاتی دارند (۱۱). DeBin و همکاران یـک نوروتوکـسین جدیـد بـا زنجیـره کوتـاه دارای ۳۶ اسـید آمینـه و وزن مولکـولی ۴ kD بـه نـام کلروتوکـسین (CTX) از زهـــر *عقرب Leiurus quinquestriatus* متعلق بـه خـانواده ی Buthidae جـدا کردنـد. مطالعـات نـشان داد ایـن سـم می تواند کانـال هـای کوچـک یـون کلـر را مهـار کنـد (۱۲). کانـال هـای کلـر ماننـد بـسیاری از پـروتئین هـای غشـــایی در انواع مختلـف سـرطان هـا بـه خـصوص در سـلول هـای گولیومـای سـرطانی افـزایش بیـان دارنـد. کلروتوکسین می تواند با قـدرت بـالا بـه ایـن کانـال هـا متصل شده و مانع عملکـرد آن هـا شـود. از ایـن رو ایـن توکسین به عنوان یک عامل موثر در درمـان تومورهـای مغزی، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اسـت (۱۳). بـا وجود اهمیت فوق العاده، این سـم تـا کنـون در گنجینـه سمی گونه های مختلف عقرب های ایرانی مورد مطالعـه قرار نگرفته اسـت و مطالعـه حاضـر اولـین مـورد از نـوع خود می باشد.

در ایـن مطالعـه ژن کـد کننـده پپتیـد مـشابه کلروتوکسین از گونه *Mesobuthus eupeus* جدا سازی شد و توالی نوکلئوتیدی آن مورد بررسـی قـرار گرفـت. هـدف مـا در ایـن مطالعـه بـه دسـت آوردن تـوالی ژنـی کدکننده این سم، مقایسه آن با توالی هـای مـشابه یافـت شده و بررسی تفاوت ها و تشابه های احتمالی آن، بـرای مطالعات بعـدی سـاختمانی و عملکـردی پپتیـد آن بـوده است تا در آینده برای توسعه طراحی دارو استفاده شود.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی:

جمع آوری عقرب: نمونه های عقرب زنده پس از جمع آوری از بیابان های اطراف شهرکرد و بررسی مورفولوژیکی دقیق توسط متخصص مربوطه، به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۷۰°C- قرار گرفت تا برای استخراج RNA استفاده شود.

استخراج RNA: کلیه مراحل استخراج مطابق دستورالعمل شرکت فرمنتاز برای استفاده از تریزول انجام گرفت که مختصراً به شرح زیر است. برای استخراج RNA سه بند انتهایی تلسون عقرب فریز شده، را جدا کرده و در یک پلیت شیشه ای حدود ۱ میلی لیتر تریزول (Trizol، شرکت فرمنتاز) جهت لیز به آن اضافه شد، پس از هموژنیزه کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط (۳۰°C - ۱۵) قرار گرفت. بافت لیز شده به یک ویال ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم جهت رسوبدهی پروتئین ها به آن اضافه شد و سپس ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعدی ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور g ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴°C انجام شد. پس از سانتریفوژ، فاز رویی به یک ویال جدید منتقل شد و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل جهت رسوبدهی RNA کامل به آن افزوده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و در پی آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. سپس با ۱ میلی لیتر اتانل ۷۵ درصد با شرایط سانتریفیوژ در دور g ۷۵۰۰ و در دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه شستشو انجام شد. پس از تخلیه اتانل از رسوب، RNA در ۳۰ میکرولیتر آب حاوی DEPC (Diethylpyrocarbonate) حل شد. RNA استخراج شده از نظر کیفیت در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بررسی کیفی و کمی نیز از لحاظ مقدار RNA و حضور ناخالصی ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

ساخت cDNA: جهت ساخت cDNA در یک ویال PCR، به میزان ۰/۵ میکروگرم از RNA، ۰/۴ پیکومول از OligodT و در نهایت آب مجاور شده با DEPC تا حجم نهایی ۱۱ میکرولیتر اضافه شد. مجموعه حاصل به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت تا لوپ های RNA باز شوند. ویال سریع روی یخ قرار داده شد و ۱ میکرولیتر RNasine، ۴ میکرولیتر بافر ۵X و ۲ میکرولیتر از dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار اضافه شد. سپس مواد ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت و سپس ۲ میکرولیتر از آنزیم Mulv RTase (تهیه شده از شرکت سیناژن) به آن اضافه شد. در پایان حجم نهایی مواد برابر ۲۰ میکرولیتر بود که یک ساعت در ۳۷°C برای فعالیت آنزیم و ۱۰ دقیقه در ۷۰°C برای غیر فعال کردن آنزیم قرار گرفت.

طراحی پرایمر: برای طراحی پرایمرها از توالی احتمالی کلروتوکسین و توالی های مشابه آن که از گونه های مختلف عقرب در سایت پایگاه دادهء NCBI موجود بود، استفاده شد. با توجه به وجود توالی های حفاظت شده ثابت در نواحی خاص پپتیدهای مشابه کلروتوکسین نظیر نواحی ابتدایی و انتهایی ژن، از این توالی ها برای طراحی پرایمر استفاده شد.

پرایمر رفت:(5′-ATGTATATGCCTGGCTTTACGACCG-3′)

و پرایمر برگشت:(5′-ACGGCACAGACATCGTGAGCG -3′)

جهت سنتز به شرکت ژن فن آوران سفارش داده شد.

تکثیر ژن با PCR: برای انجام واکنش PCR از روش Hot start در دستگاه ترمال سایکلر مدل ASTEC، PC818 ژاپن استفاده شد. از ۳۵ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال، ۴۹°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۲۰ میلی مولار به میزان ۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۰/۴ پیکومول)، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار به مقدار ۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومولار)، بافر ۱۰X مقدار ۵ میکرولیتر، آنزیم Super Taq polymerase (شرکت فرمنتاز) برابر ۱ واحد (۰/۱۵ میکرولیتر)،

www.SID.ir

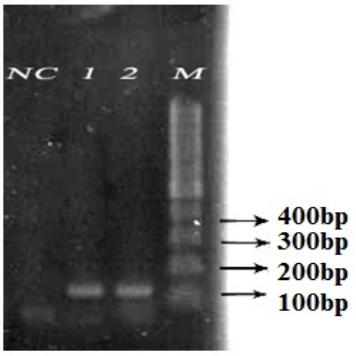
Archive of SID

MgCl2 برابر ۱/۵ میکرولیتر (غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار)، cDNA الگو برابر ۲ میکرولیتر و باقیمانده آب استریل تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR، کیفیت محصول بر روی ژل آگارز غلظت ۱ درصد بررسی شد. قطعه ی حاصل از واکنش PCR به همراه پرایمر رفت و برگشت جهت تعیین توالی توسط دستگاه ABI Sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید.

یافته ها:

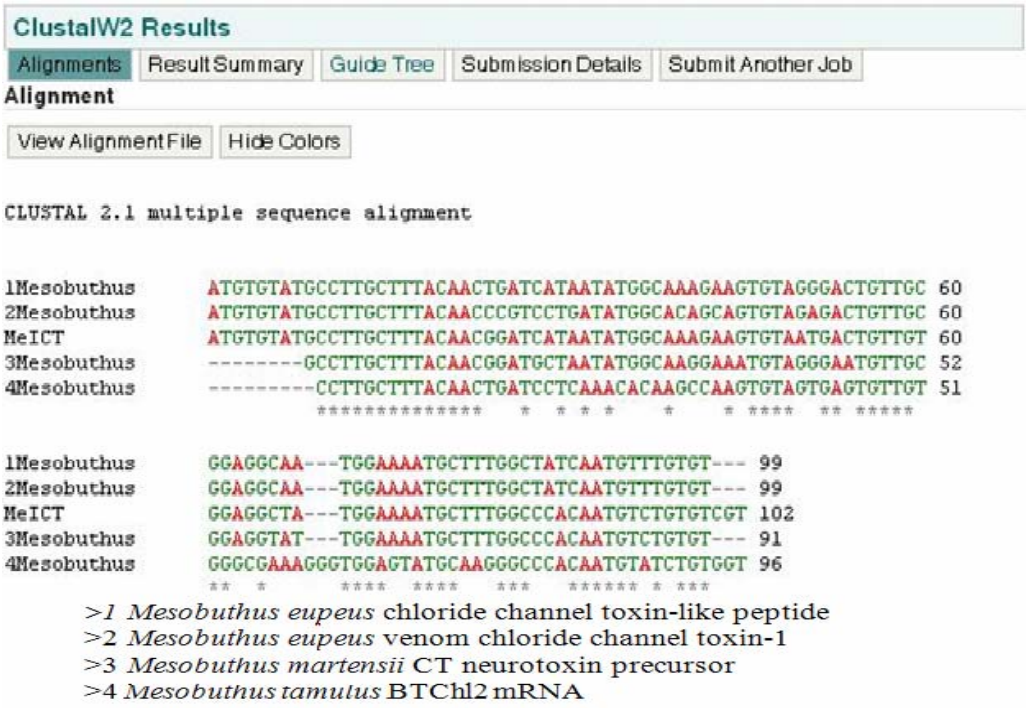
واکنش PCR برای تکثیر قطعه کلروتوکسین: پس از انجام RT-PCR و ساخت cDNA، واکنش PCR برای تکثیر ژن کلروتوکسین با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده انجام شد. نتیجه واکنش PCR بر روی ژل الکتروفورز بررسی شد که باندی کمی بالاتر از اندازه ۱۰۰bp یعنی در حدود اندازه ژن کلروتوکسین مشخص شد (تصویر شماره ۱).

نتیجه تعیین توالی: پس از تکثیر قطعه، اقدام به تعیین توالی آن شد و در بانک ژنی NCBI با شماره HQ853233 ثبت شد. سپس توالی حاصل با توالی های گزارش شده مشابه مقایسه شد و درصد تشابه و تفاوت آن با گونه های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره های ۱و ۲).



تصویر شماره ۱: تکثیر ژن مشابه کلروتوکسین از مخزن cDNA بر ژل آگارز ۱٪

M: مارکر SMO243 ۱۰۰ جفت بازی. لاین ۱و ۲ باندهای قطعه تکثیر شده، NC: کنترل منفی.


ClustalW2 Results

Alignments | Result Summary | Guide Tree | Submission Details | Submit Another Job

Alignment

View Alignment File | Hide Colors

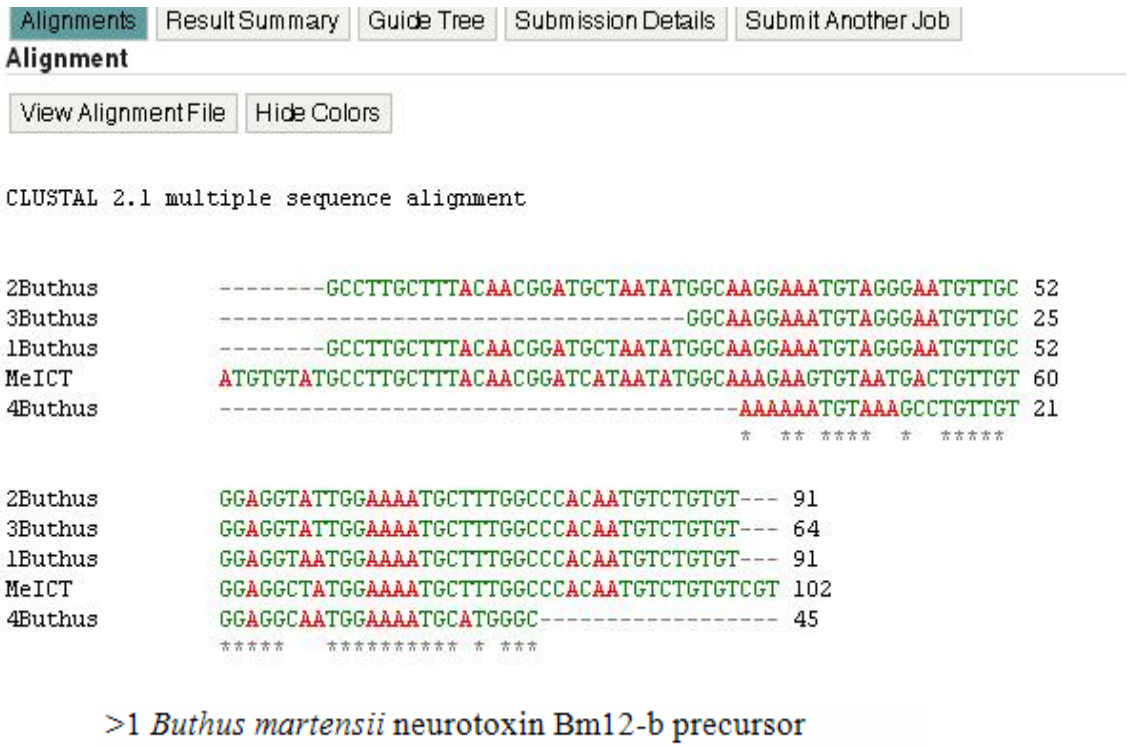
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

1Mesobuthus     ATGTGTATGCCTTGCTTTACAACTGATCATAATATGGCAAAGAAGTGTAGGGACTGTTGC 60
2Mesobuthus     ATGTGTATGCCTTGCTTTACAACCCGTCCTGATATGGCACAGCAGTGTAGAGACTGTTGC 60
MeICT           ATGTGTATGCCTTGCTTTACAACGGATCATAATATGGCAAAGAAGTGTAATGACTGTTGT 60
3Mesobuthus     --------GCCTTGCTTTACAACGGATGCTAATATGGCAAGGAAATGTAGGGAATGTTGC 52
4Mesobuthus     ---------CCTTGCTTTACAACTGATCCTCAAACACAAGCCAAGTGTAGTGAGTGTTGT 51
                         **************   * * * *    *    * ****  ** *****

1Mesobuthus     GGAGGCAA---TGGAAAATGCTTTGGCTATCAATGTTTGTGT--- 99
2Mesobuthus     GGAGGCAA---TGGAAAATGCTTTGGCTATCAATGTTTGTGT--- 99
MeICT           GGAGGCTA---TGGAAAATGCTTTGGCCCACAATGTCTGTGTCGT 102
3Mesobuthus     GGAGGTAT---TGGAAAATGCTTTGGCCCACAATGTCTGTGT--- 91
4Mesobuthus     GGGCGAAAGGGTGGAGTATGCAAGGGCCCACAATGTATCTGTGGT 96
                **  *      ****  ****   ***   ****** * ***
```

>1 *Mesobuthus eupeus* chloride channel toxin-like peptide
>2 *Mesobuthus eupeus* venom chloride channel toxin-1
>3 *Mesobuthus martensii* CT neurotoxin precursor
>4 *Mesobuthus tamulus* BTChl2 mRNA

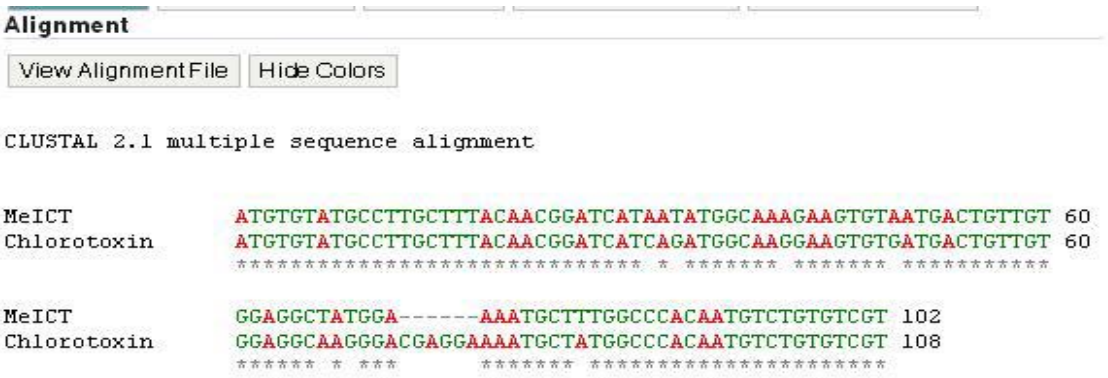
تصویر شماره ۲: بررسی مقایسه ای توالی MeICT با توالی های گزارش شده مشابه در گونه های مختلف مزوبوتو

www.SID.ir

Archive of SID



الف



ب

تصویر شماره ۳: الف) بررسی تشابه توالی ژن کد کننده سم MeICT با دیگر جنس ها و خانوادهای عقرب، ب) مقایسه بین توالی ۱۰۲ نوکلئوتیدی ژن MeICT با توالی ۱۰۸ نوکلئوتیدی ژن کاروتوکسین تشابه ۸۸٪ توالی ها

بیشترین میزان تشابه MeICT با توالی کد گذار پپتید مشابه سم کانال کلر از عقرب *Mesobethus eupeus* بومی چین که در سال ۲۰۰۹ گزارش شده (شماره GU187951.1 ثبت شده در بانک ژنی)، به دست آمد. در مقایسه بین اولین نوکلئوتید MeICT تا نوکلئوتید ۹۹ آن حدود ۹۱ درصد شباهت با این سم دیده شد، البته به استثنای ۳ نوکلئوتید انتهایی آن که در نوع چینی متفاوت بود. تشابه ۸۵ درصد تا نوکلئوتید ۹۹ ژن با نوعی دیگر از *Mesobethus eupeus* چینی و تشابه ۹۰ درصد تنها بین نوکلئوتیدهای ۹۹-۹ از MeICT با سم گونه *Mesobethus martensii* (شماره دسترسی در بانک

www.SID.ir

Archive of SID

ژنی NCBI:AF135821.1) دیده می شود. کمترین تشابه در این جنس با *Mesobuthus tamulus* (عقرب سرخ هندی) (شماره دسترسی در بانک ژنی NCBI: AF481881.1) دیده شد. در مجموع بررسی تشابه پپتیدهای ضد کانال های یون کلر در این جنس ۵۳ درصد (یعنی ۵۵ از ۱۰۲ نوکلئوتید) شباهت در مقایسه توالی MeICT با بقیه پپتیدهای مشابه این جنس دیده می شود (تصویر شماره ۲).

مقایسه با انواع دیگر جنس های عقرب خانواده Buthidae نشان داد که بیشترین تشابه بعد از Mesobethus با جنس Buthus وجود دارد. به طوری که تشابه ۹۰ درصد بین نوکلئوتیدهای ۹۹-۹ و ۸۸ درصد بین توالی نوکلئوتیدهای ۹۹-۳۶ با سم سویه های مختلف *Buthus martensii* (شماره دسترسی در بانک ژنی NCBI:AF419252.1, AF159976.1) و نیز تشابه ۸۵ درصد بین توالی نوکلئوتیدهای ۸۴-۴۰ با سم Buthus occitanus (شماره دسترسی در بانک ژنی NCBI: FJ360812.1)دیده شد. که کمترین تشابه بررسی شده بود. در بررسی کلی تشابه پپتیدهای سمی مشابه در این جنس با توالی MeICT تنها در دو پنجم میانی ژن ۷۱ درصد (یعنی ۳۲ از ۴۵ نوکلئوتید) شباهت در مقایسه با بقیه پپتیدهای مشابه این جنس دیده می شود (تصویر شماره ۳). مشابهتی بین توالی سم MeICT با دیگر جنس ها و خانواده های عقرب دیده نشد. بین توالی ۱۰۲ نوکلئوتیدی ژن MeICT با توالی ۱۰۸ نوکلئوتیدی ژن کلروتوکسین تشابه ۸۸ درصد توالی ها مشخص شد (تصویر شماره ۳).

بحث:

تشخیص ساختارهای مولکولی سموم جدید و تعیین نقاط هدف عملکرد و خواص فیزیولوژیک آنها توجه زیادی را در میدان های تحقیقاتی علوم پزشکی مانند سرم سازی، داروسازی، فارماکوژنومیک و همچنین تجارت به خود جلب کرده است. با این وجود تاکنون عمده مطالعات روی بعضی جنس های خاص در این خانواده مثل Androctonus، Buthus و Parabuthus متمرکز بوده است. در این بین جنس ها و گونه های دیگر علیرغم وجود ترکیبات بسیار ارزشمند در سم خود کمتر دیده شده اند. *Mesobuthus eupeus* متعلق به جنس Mesobuthus از خانواده Buthidae از گسترده ترین خانواده عقرب های ایران است. استخراج RNA از غدد سم ساز واقع در انتهای تلسون این عقرب صورت گرفت. در عین حال پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن مشابه کلروتوکسین از بررسی انواع توالی های مختلف در دسترس از پپتیدهای مشابه این ژن در گونه های مختلف عقرب حاصل شد و موفقیت ما در سنتز cDNA و تکثیر ژن مورد نظر نشاندهنده مسیر صحیح مطالعه در طراحی پرایمرهایی است که برای توالی هدف آنها اطلاعات مستقیمی در دسترس نبود و نتیجه تعیین توالی نیز موید این مسئله است. در واقع به دلیل ساختار سوم خاص این پپتیدها بعضی نواحی آنها دارای توالی های مشابه و حفاظت شده در بین گونه های مختلف هستند که از این توالی های مشابه، توالی ابتدا و انتهای ناحیه کدگذار برای طراحی مشخص شد. پس از انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر، توالی DNA بدست آمده که کدکننده پپتید مشابه با کلروتوکسین بود و توسط گروه به اختصار MeICT نامیده شد، مشخص گردید. طول DNA این پپتید برابر با ۱۰۲ نوکلئوتید بود که با توالی های موجود و گزارش شده از ژن پپتیدهای مشابه کلروتوکسین در بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) مقایسه شد. در این مقایسه تفاوت ها و تشابه های مختلفی بین توالی MeICT با توالی DNA کد کننده پپتیدهای مشابه کلروتوکسین حاصل از عقرب های گوناگون به دست آمد.

بیشترین میزان تشابه MeICT با توالی کد گذار پپتید مشابه سم کانال کلر از عقرب *Mesobethus eupeus* بومی چین که در سال ۲۰۰۹ گزارش شده (شماره GU187951.1 ثبت شده در بانک

www.SID.ir

Archive of SID

ژنی)، به دست آمد و کمترین تشابه در این جنس با *Mesobuthus tamulus* (حاوی عقرب سرخ هندی) دیده شد. در مجموع بررسی تشابه پپتیدهای ضد کانال های یون کلر در این جنس ۵۳ درصد (یعنی ۵۵ از ۱۰۲ نوکلئوتید) شباهت در مقایسه توالی MeICT با بقیه پپتیدهای مشابه این جنس دیده شد. این تفاوت در توالی یک سم خاص که در اعضا یک جنس دیده می شود خود می تواند روشی برای تقسیم کردن گونه های عقرب جنس خاص به انواع نزدیک تر و دور از هم باشد. به خصوص در مواردی که بررسی های مورفولوژیک و ظاهری نتواند به طور موثری تشخیص دهنده دوری و نزدیکی گونه های مختلف یک جنس باشد. به علاوه همانطور که دیده شد در بین اعضا یک گونه هم تفاوت در توالی ژن سم وجود دارد (مثل *Mesobethus eupeus* چینی) که می تواند برای تقسیم بندی سویه ها و زیرگونه های مختلف یک گونه در کشورهای مختلف و حتی در یک کشور استفاده شود. اگر چه *Mesobethus eupeus* گونه اصلی عقرب ایرانی است ولی با توجه به شرایط جغرافیایی و اقلیمی در مناطق مختلف کشور می توان انتظار وجود تفاوت در سموم آن را در محل های مختلف داشت. با توجه به اینکه عقرب های مورد بررسی در این مطالعه تنها بومی کوه های اطراف شهرکرد بودند، جای تعجب نیست اگر تفاوتی در سم کد شده مورد نظر با سم انواع بومی محل های گرم و یا مرطوب دیده شود.

مقایسه با انواع دیگر جنس های عقرب خانواده Buthidae نشان داد که بیشترین تشابه بعد از Mesobethus با جنس Buthus دیده شد. مشابهتی بین توالی سم MeICT با دیگر جنس ها و خانواده های عقرب دیده نشد.

اگرچه تاکنون توالی نوکلئوتیدی از ژن کلروتوکسین حاصل از *Leiurus quinquestriatus* گزارش نشده است و تنها توالی پروتئین آن موجود می باشد، با این حال با توجه به توالی پپتیدی آن و با در نظر گرفتن کدون های اسیدآمینه ارجح مورد استفاده در حشرات توالی کلروتوکسین پیش بینی و با ژن MeICT مقایسه شد. در نتیجه مقایسه بین توالی ۱۰۲ نوکلئوتیدی ژن MeICT با توالی ۱۰۸ نوکلئوتیدی ژن کلروتوکسین تشابه ۸۸ درصد توالی ها مشخص شد.

به نظر می رسد که به جز حذف ۶ نوکلئوتید پشت سر هم در ناحیه یک سوم انتهایی ژن MeICT، بقیه تفاوت ها با ژن کلروتوکسین از جهش های جایگزینی نوکلئوتیدها در ۷ ناحیه مختلف حاصل شده است. تغییر این نوکلئوتیدها در ترجمه منجر به تغییر اسید آمینه و توالی پروتئینی خواهد شد. در بررسی های مقایسه یی دیگری که بین توالی cDNA از MeICT با کلروتوکسین و دیگر ژن های مشابه انجام شد نتایجی حاصل شد که در زیر به اختصار می آید. بدیهی است که هر کدام از این نتایج برای مطالعات مختلفی قابل استفاده است. در بررسی پپتیدهای مشابه کلروتوکسین به دست آمده از *M.eupeus* با کل توالی کلروتوکسین ۷۳ درصد (۷۹ نوکلئوتید از ۱۰۸ نوکلئوتید) و با MeICT ۷۷ درصد (۷۹ از ۱۰۲ نوکلئوتید) تشابه به دست آمد. اما در مقایسه پپتیدهای مشابه کلروتوکسین با هم در بین دو جنس بوتوس و مزوبوتوس درصد تشابه کمتر و به ۶۱ درصد (۶۶ از ۱۰۸ نوکلئوتید) با کلروتوکسین و ۶۵ درصد (۶۶ از ۱۰۲ نوکلئوتید) با MeICT رسید. در بررسی بین همه پپتیدهای ضد کانال های کلر از این دو جنس تنها ۴۸ درصد شباهت در دو پنجم ژن (۲۳ از ۴۸ نوکلئوتید) با کلروتوکسین و ۵۴ درصد شباهت (۲۳ نوکلئوتید از ۴۲) به دست آمد. علت تفاوت تشابهات بین کلروتوکسین و MeICT وجود ۶ نوکلئوتید اضافه در توالی نوکلئوتیدهای ۷۸ -۷۲ از کلروتوکسین است که در هیچ یک از اعضا دیگر این خانواده در هر دو جنس و نه در MeICT دیده نمی شود. با توجه به این نتایج به نظر می رسد که درصد تشابه کلروتوکسین با MeICT بیشترین می باشد و پس از آن با انواع خانواده *M.eupeus* تشابه بیشتری دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشابهات بیشتر بعدی با *M.martensii* و *B.martensii* می باشد و در آخر مشابهت کمتر با پپتیدهای از *M.tamulus* و *B.occitanus* وجود دارد. این یافته ها می تواند مسیر دستیابی به داروی زیستی مناسبی را هموار سازد. در مطالعات گذشته توسط Ullrich و همکاران مشخص شد که در سلول های گلیوما بیان بالایی از کانال های کلر وجود دارد که در سلول های نرمال بافت مغز وجود ندارند (۱۷). همچنین در همان مطالعه گزارش شد که کلروتوکسین می تواند به طور انتخابی به این کانال های یونی کلر متصل شود. Soroceanuو همکاران نشان دادند که CTX با قدرت بالایی به تومورهای سیستم عصبی مرکزی مثل گلیوما و تومورهای Neuroectodermal متصل می شود و اثرات ممانعتی بر رشد و متاستاز سلول های سرطانی دارد (۱۹،۱۸). امروزه از این پپتید که با ید رادیو اکتیو (I131) نشان دار شده، برای تصویر برداری های کلینیکی و رادیو تراپی گلیومای بدخیم در انسان استفاده می شود (۲۰). با توجه به اهمیت کلروتوکسین در درمان و تشخیص تومورهای مغزی و با توجه به شباهت ۸۸ درصد بین توالی کد کننده این سم با پپتید MeICT امید است که پس از بررسی عملکردی بتوان از آن در مسیر مداوای بیماران استفاده کرد.

نتیجه گیری:

بررسی های همولوژی بین توالی DNA سموم شبه کلروتوکسین از عقرب های مختلف، تفاوت های متعددی نشان داد که می تواند خاص گونه ایرانی این عقرب باشد. همچنین تشابه زیاد با کلروتوکسین احتمال استفاده درمانی از MeICT را به عنوان داروی ضد سرطان گلیوما مطرح می کند.

تشکر و قدردانی:

از دانشگاه شهرکرد بخاطر حمایت مالی این پژوهش قدردانی نموده و همچنین از همکاری پژوهشکده زیست فنآوری تشکر می شود.

منابع:

1. Michael ES, Victor F. High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). Euscorpius. 2003; 11: 1-175.

2. Ozkan O, Carhan A. The neutralizing capacity of androctonus crassicauda antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. Toxicon. 2008; 52(2): 375-9.

3. Dehghani R, Djadid ND, Shahbazzadeh D, Bigdelli S. Introducing compsobuthus matthiesseni scorpion as one of the major stinging scorpions in Khuzestan, Iran. Toxicon. 2009; 54(3): 272-5.

4. Shirmardi P, Gandomkar M, Shamsaei M, Mirakabadi A, Maragheh M, Shafiei M, et al. [Preparation and biodistribution study of a 99mTc-Labeled toxic fraction of Iranian *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. Iran J Nucl Med. 2010; 18(1): 37-44.]Persian

5. Bigdeli S, Akbari A, Ahari H. Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzestan province, Iran. Toxicon. 2009; 53(4): 454-9.

6. Miershamsi O, Elahi G. Proceedings of the third international barcod of life conference. 2009 Nov; Mexico City.

7. Rates B, Ferraz KK, Borges MH, Richardson M, De Lima ME, Pimenta AM. Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. Toxicon. 2008; 52(5): 611-18.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Tan PT, Veeramani A, Srinivasan KN, Ranganathan S, Brusic V. SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins. Toxicon. 2006; 47(3): 356-63.

9. Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2(10): 790-802.

10. Karallieddel L. Animal toxins. Br J Anaes. 1995; 74(3): 319-27.

11. Tomas J, Stein JV, Fweinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride Channels. Physiol Rev. 2002; 82(2): 503-68.

12. DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. Am J Physiol. 1993; 264(2 pt 1): C361-9.

13. Lyons S, Oneal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal. GLIA. 2002; 39(2): 162-73.

14. Oukkache N, Rosso JP, Alami M, Ghalim N, Saile R, Hassar M, et al. New analysis of the toxic compounds from the androctonus mauretanicus mauretanicus scorpion venom. Toxicon. 2008; 51(5): 835-52.

15. Remijsen Q, Verdonck F, Willems J. Parabutoporin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: much more than an antibiotic. Toxicon. 2010; 55(2-3): 180-5.

16. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion buthus martensi Karsch. Toxicon. 2002; 40(9): 1239-58.

17. Ullrich N, Gillespie G, Sontheimer H. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. Neuroreport. 1996; 7(5): 1020-24.

18. Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain. Cancer Res. 1998; 58(21): 4871-79.

19. Bogin O. Venum peptides and their mimetics as potential drugs. Modulator. 2005; 19(9): 14-20.

20. Hockaday D, Shen S, Fiveash J, Raubitschek A, Colcher D, Mamelak N. Imaging glioma extent with 131I-TM-60. J Nucl Med. 2005; 46(4): 580-6.

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2011 Dec, Jan; 13(5): 27-36.
Archive of SID
Original article

Sequencing and comparative-bioinformatic analysis of chlorotoxin-like peptide from Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*

Ilkhanizade Sh (MSc)[1], Ayat H (PhD)*[1], Ahadi AM (PhD)[1], Pirali Kh (PhD)[2]
[1]Genetics Dept., Shahrekord University, Shahrekord, Iran, [2]Veterinary Dept, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
Received: 17/Feb/2011 Revised: 7/Apr/2011 Accepted: 26/May/2011

Background and aims: Scorpion neurotoxins have been widely studied in recent years, including investigations into their physiological functions and pharmaceutical properties. Chlorotoxin is one of the most attended toxins that are used in brain cancer therapy at now. The aim of this study was to evaluate the sequencing and comparative – bioinformatic analysis of DNA coding chlorotoxin like peptide from Iranian scorpion *mesobuthus eupeus.*
Methods: In this descriptive study Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus* samples were isolated and the total RNA was extracted form venom glands. cDNA was synthesized by RT-PCR and then the sequence encoding a venom peptide with homology to chlorotoxin (named MeICT for *Mesobuthus eupeus* Iranian Chlorotoxin) was isolated and identified with specific primers for conserved sequences of chlorotoxin like toxins.
Results: The sequence of MeICT was 102 nucleotides long and it was similar (88% identities) to that of chlorotoxin isolated from Leiurus quinguestriatus. The sequence identified in this study was compared with other similar venom sequences from other species of scorpion by CustalW server.
Conclusion: Homologies analysis showed multiple differences in sequences that can be specific for Iranian subspecies of this scorpion. Furthermore, because of much similarity with chlorotoxin, MeICT may be used as therapeutic agent in glioma cancer.

Keywords: **Chlorotoxin, cDNA, Iranian Scorpion, *Mesobuthus eupeus*, MeICT.**

Cite this article as: Ilkhanizade Sh, Ayat H, Ahadi AM, Pirali Kh. [Sequencing and comparative-bioinformatic analysis of chlorotoxin-like peptide from the Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*. J Sharekord Univ Med Sci. 2011 Dec, Jan; 13(5): 27-36.]Persian

[*]**Corresponding author:**
Genetics Dept., Basic Sciences faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Tel: 0098-09122258211, E-mail:ayat-h@sci.sku.ac.ir

www.SID.ir