

(مقاله پژوهشی)

تهیه cDNA از mRNA زن OD1 استخراج شده از بافت غده زهری عقرب ایرانی (*Odonthobuthus doriae*) دوریه

محمد علیمرادی^۱، امیر جلالی^{۱*}، حمید گله‌داری^۲، فرزانه شاهین^۳، ودیعه بیگی خوزانی^۱

چکیده

زمینه و هدف: در اکثر نقاط ایران، به‌ویژه مناطق مرکزی، جنوب و شمال شرقی، عقرب‌زدگی یک مشکل بهداشتی جدی محسوب می‌شود. بیشتر این گزش‌ها، ناشی از عقرب‌های خانواده بوتیده (*Buthidae Family*) می‌باشد. زهر عقرب دارای ترکیبات فعال بیولوژیک مختلف از جمله سموم عصبی (نروتوکسین) می‌باشد که هر کدام توسط ژن مخصوص به خود کد می‌شوند. هدف از انجام این پژوهش تکثیر cDNA کد کننده یک نروتوکسین شبه آلفا به نام OD1 از غده زهر عقرب ایرانی ادونتوبوتوس دوریه (*Odonthobuthus doriae*) می‌باشد.

روش بررسی: نمونه های عقرب از آزمایشگاه رفرانس عقرب مؤسسه رازی کرج تهیه و شناسایی شدند. با استفاده از کیت استخراج RNA، مجموع RNA از غده زهری عقرب استخراج شد. پس از این مرحله، ساخت cDNA از RNA استخراجی انجام شد. به منظور تکثیر cDNA کد کننده نروتوکسین، آغازگرهای مناسب طراحی و تهیه شد. پس از بهینه سازی شرایط PCR، و با استفاده از تکنیک نسخه برداری معکوس (RT-PCR)، قطعه cDNA کد کننده سم عصبی OD1 با ۶۴ اسید آمینه تکثیر شد.

یافته‌ها: با استفاده از کیت‌های استخراج و تکنیک RT-PCR، قطعه cDNA از غده زهر عقرب ادونتوبوتوس دوریه تکثیر یافت. cDNA به دست آمده جهت انجام کلونینگ بعدی در نظر گرفته شد. باند مورد نظر مربوط به ژن OD1 با طول ۱۹۵ bp بر روی ژل آگارز شناسایی شد. این باند شامل ۲۶۴ base pair کد کننده سم عصبی OD1 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: ترتیب اسید آمینه قابل پیش بینی این سم شامل ۸۸ اسید آمینه می‌باشد که شامل یک سیگنال پپتید با ۲۴ اسید آمینه و سم OD1 کامل با ۶۴ اسید آمینه می‌باشد.

کلیدواژگان: ادونتوبوتوس دوریه، نروتوکسین، cDNA، تکنیک RT-PCR.

۱- استادیار گروه فارماکولوژی و

سم شناسی.

۲- استادیار گروه ژنتیک.

۳- دانشجوی دکترای ژنتیک.

۱- گروه فارماکولوژی و سم شناسی،

دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات سم

شناسی، دانشگاه جندی شاپور اهواز،

ایران.

۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، ایران.

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسؤول:

امیر جلالی، گروه بیوشیمی، دانشکده

پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-

شاپور اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۶۱۱۳۷۳۸۳۷۸

Email: amjalali@hotmail.com

مقدمه

شدن فرایند غیر فعال‌سازی و افزایش میانگین Open-state کانال Nav1.7 شود. به همین دلیل این سم از معدود سموم طبیعی مؤثر بر روی این کانال است که دارای اثرات اختصاصی بر روی درد مزمن، و دردهای التهابی و همچنین شرایط پاتولوژیک مانند سرطان پروستات می‌باشد. افزایش ورود یون سدیم توسط OD1 می‌تواند منجر به دیپلاریزاسیون غشاء (In vivo) کانال-های Nav 1.7 در حالت غیر فعال و از دست رفتن تحریک‌پذیری الکتریکی نورون‌های ادراک‌کننده درد (Nociceptor) و احساس بی‌دردی (Neurologic) می‌شود (۲، ۴، ۵). با توجه به اینکه OD1 یک پروب فارماکولوژیک و فیزیولوژیک اختصاصی مؤثر شناخته شده بر روی کانال‌های خاص خصوصاً سدیمی پستانداران Nav1.7 و حشرات PARA/TIPE است (۲، ۵) و همچنین بسیاری از اعمال بدن توسط کانال‌های سدیمی میانجی‌گری می‌شود (۶)، اهمیت دسترسی به مقادیر مناسب این سم برای ادامه بررسی‌ها معلوم می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از جداسازی mRNA بیان‌کننده OD1 از غده سمی و تکثیر cDNA سنتز شده آن، به کمک RT-PCR و آغازگرهای دژنره مراحل آغازین و مهم بیان آزمایشگاهی (In vitro expression) سم پروتئینی OD1، انجام شود.

روش بررسی

نمونه‌های عقرب ادنتوبوتوس دوریه از بخش جانوران سمی مؤسسه رازی کرج تهیه شد. غدد زهری عقرب‌ها با استفاده از پنس و قیچی استریل، جدا شده و جهت فریز کردن و آسان‌تر شدن عمل له کردن، در نیتروژن مایع قرار داده شد، سپس با استفاده از هاون و دسته‌هاون له شد. در این پژوهش، استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA EXTRACTION KIT

عقرب‌ها (Scorpions) که در رده عنکبوتیان و متعلق به شاخه بندپایان (Arthropoda) هستند، از ابتدایی‌ترین جانوران موجود در جهان با بیش از ۱۵۰۰ جنس مختلف هستند. این راسته متشکل از ۹ خانواده مهم و از پراکندگی جهانی بالایی برخوردارند (۱). بوتیده (Buthidae)، مهم‌ترین تیره‌های سمی و مهم در علم پزشکی (در حدود ۵۰۰ جنس) در این خانواده قرار دارند. این خانواده شامل تقریباً نیمی از گونه‌های شناخته‌شده عقرب (در حدود شش صد گونه) می‌باشد. از این تیره، گونه ادونتوبوتوس (Odonthobuthus) و زیرگونه دوریه (O.doriae) که در مناطق مرکزی، جنوب و شمال شرقی ایران وجود دارند، از نظر پزشکی حائز اهمیت می‌باشد. گزش متعاقب عقرب ادونتوبوتوس دوریه دارای اثرات مشخص بر عضلات اسکلتی، درد در محل گزش، ادم وسیع، التهاب و نکروز در محل گزش، گیجی و هذیان، تعریق، خواب آلودگی، اختلال تنفسی، تغییر فشار خون و در برخی موارد نیز موجب مرگ مخصوصاً در اطفال می‌شود (۲).

OD1 اولین سم شبه آلفا جدا شده از زهر عقرب ایرانی، مؤثر بر روی کانال‌های سدیم وابسته به ولتاژ (VGSCS) پستانداران و حشرات می‌باشد. میزان بازیافت این سم از زهر در حدود تنها ۲ درصد می‌باشد.

با استفاده از تکنیک ولتاژ-کلامپ دوالکترودی، اثرات این سم که بر روی سه کانال سدیمی (NAV 1 β / 1.2، β 1 / 5.1 NAV PARA/TIPE) بیان شده بر روی اووسیت قورباغه (Xenopus laevis oocytes) مطالعه شد، توانست فرایند غیر فعال-سازی کانال حشره PARA/TIPE را به میزان زیادی مهار نماید (EC50= 80 \pm 14 nM). در حالی که بر روی کانال سدیمی Nav1.5 تنها در غلظت‌های میکرومولار مؤثر بود و بر روی کانال سدیمی مغزی Nav 1.2 تأثیری نداشت (۲، ۳). در مطالعه‌های دیگر، مشخص شد که این سم می‌تواند باعث آهسته و طولانی

OD1-VR: 5-
AYTTNCCNGGDATNCGDATNGGN-3
Y=CT, N= ACGT Y, H= ACT , D=
ACT
Transilluminator RT-PCR به کمک دستگاه
Uvi tek (انگلیس) و با استفاده از برنامه جدول ۳ انجام
شد.
قطعه ژنی تکثیر یافته به طول ۱۹۵ bp با ژل آگارز
۱/۵ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (Ethidium
bromide) مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

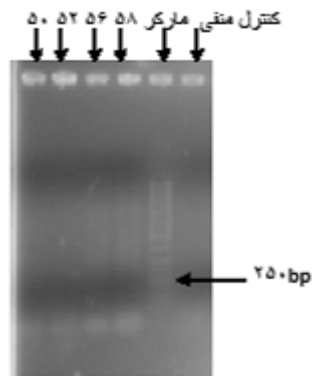
یافته‌ها

نتیجه‌ای که از گرادیان دمایی PCR حاصل شد مطابق شکل ۱ در دو دمای ۵۶ و ۵۸ درجه فقط اسمیر مشاهده شد. به منظور اصلاح و بهینه‌سازی PCR از همین محصولات به عنوان Template استفاده شد و مجدداً PCR گذاشته شد (۱۴). شرایط گرادیان دمایی مورد استفاده جهت بهینه‌سازی PCR برای تکثیر ژن OD1 مطابق شرایط مندرج در جدول ۴ اجرا شد و طبق شکل ۲ در دو دمای ۵۶ و ۵۸ درجه علاوه بر باند مورد نظر چندین باند کاذب دیگر نیز مشاهده شد. به همین منظور باند مورد نظر از روی ژل الکتروفورز برش داده و از ژل خالص‌سازی شد و سپس مجدداً با این محصولات تخلیص شده PCR انجام شد و نتیجه‌ی نهایی شکل ۳ به دست آمد. البته همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، ابتدا محصول تخلیص شده به نسبت ۱:۱۰ و ۱:۵ با آب مقطر استریل رقیق و سپس در PCR استفاده شد، اما چون محصول PCR باند ضعیفی داد، مجدداً و بدون رقیق کردن با حجم‌های ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ میکرولیتر از محصول تخلیص شده PCR تکرار شد و طبق شکل ۳ مشاهده شد که باندها به تدریج پررنگ‌تر و قوی‌تر شده، به طوری که در حجم ۶ میکرو لیتر باند کاملاً مطلوبی به دست آمد.

(QIAGEN) صورت گرفت (فهرست مواد موجود در کیت استخراج Total RNA در جدول ۱ آمده است). تمامی مراحل استخراج RNA بر روی یخ انجام شد. الگوی RNA می‌تواند به عنوان هدف در تکنیک RT-PCR به کار گرفته شود، به شرطی که RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به cDNA تبدیل شود.

تبدیل Total RNA به cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA(QIAGEN) صورت گرفت (فهرست مواد موجود در کیت استخراج CDNA در جدول ۲ آمده است). جهت تکثیر cDNA به دست آمده، باید آغازگر مناسب طراحی شود، که برای این منظور ابتدا توالی‌های مربوط به ژن‌های کد کننده نرو توکسین‌های مشابه آنچه قبلاً در عقرب‌های این خانواده شناسایی شده و در بانک ژن (NCBI) موجود است، با استفاده از نرم-افزار Blast:homology search با یکدیگر مقایسه شدند (۷، ۸). پس از بررسی‌های متعدد، بیشترین تشابه در مورد ژن‌های کد کننده نروتوکسین‌های متعلق به عقرب‌های آندروکتونوس استرالیس و مزوبوتوس مارتیزی مشاهده شد (۹-۱۱). برای طراحی آغازگرها از توالی‌های یکسان و حفظ شده در نواحی مشابه که در ابتدا و انتها به ترتیب حاوی کدون شروع (ATG) و کدون خاتمه (TGA) بودند، استفاده شد. همچنین در ادامه، تشابه توالی اسید آمینه‌های نروتوکسین‌های این گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Blast-primer Design بررسی و مقایسه شد و نواحی مشابه، مجدداً برای طراحی توالی آغازگرها مورد استفاده قرار داده شد (۱۲). در نهایت آغازگرها به صورت پرایمرهای دژنره طراحی شدند. ترادف پرایمرهای به کار گرفته شده به شرح ذیل می‌باشد (نوکلئوتیدهای دژنره به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند):

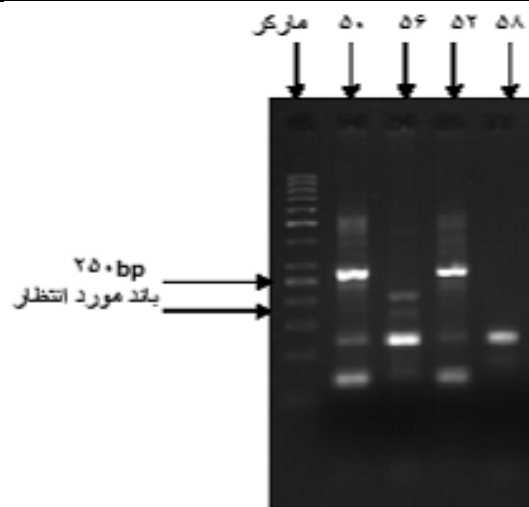
OD1-VF: 5-
TNCNGAYGCNTAYATHGCNGAYG
AY-3



شکل 1: الکتروفورز گرادیان دمایی PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد

با شرایط زیر:

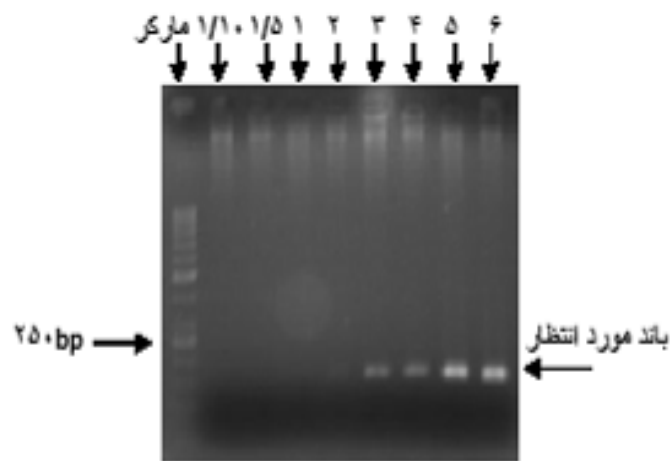
تعداد چرخه	مدت زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱ چرخه	۳ دقیقه	۹۴ درجه
	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه
۳۵ چرخه	۱ دقیقه	۵۰، ۵۲، ۵۶، ۵۸ درجه
	۱ دقیقه	۷۲ درجه
۱ چرخه	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه



شکل 2: RePCR محصولات حاصل از گرادیان دمایی PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد

با شرایط زیر:

تعداد چرخه	مدت زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱ چرخه	۳ دقیقه	۹۴ درجه
	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه
۳۵ چرخه	۱ دقیقه	۵۰، ۵۲، ۵۶، ۵۸ درجه
	۱ دقیقه	۷۲ درجه
۱ چرخه	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه



شکل 3: RePCR با محصولات تخلیص شده PCR قبل بر روی ژل آگارز 1/5 درصد

با شرایط زیر:

تعداد چرخه	مدت زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱ چرخه	۳ دقیقه	۹۴ درجه
۵ چرخه	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه
	۱ دقیقه	۵۰ درجه
	۱ دقیقه	۷۲ درجه
۳۵ چرخه	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه
	۱ دقیقه	۶۰ درجه
	۱ دقیقه	۷۲ درجه
۱ چرخه	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه

جدول 1: فهرست مواد موجود در کیت استخراج RNA

Number of preps	50	250
RNeasy Mini Spin Columns (pink)	50	250
Collection Tubes(1.5ml)	50	250
Collection Tubes(2ml)	50	250
Buffer RLT	45ml	220ml
Buffer RW1	45ml	220ml
Buffer RPE (concentrate)	11ml	55ml
RNase-Free Water	10ml	50ml

جدول 2: مواد موجود در کیت استخراج CDNA

Number of reaction	50 200
Seniscript Reverse Transcriptase	50reaction 200reaction
Buffer RT,10X	150µl 4×150µl
dNTP Mix,5 Mm each	100µl 4×100µl
RNase-Free Water	1.1ml 4×1.1µl

بحث

توسط دیگر محققان نیز می‌تواند گواهی بر این امر باشد. نیک‌خواه و همکارانش (۲۰۰۶) ژن کدکننده یک نوروکسین به نام *Bsaul1* را با استفاده از روش RT-PCR از عقرب هوتنتوتا سالسی (*Hotentuta salcyi*) تکثیر کردند. قطعه cDNA تکثیر یافته توسط این محققان، 240 bp طول داشت (۱۰). قطعه cDNA تکثیر یافته توسط وانگ و همکارانش (۲۰۰۱) نیز 200 bp بود، که یک نوروکسین ضد صرع جدا شده از سم عقرب بوتوس مارتنزی کراش (*Buthotus martensi krasch*) به نام *BmK AEP* را کد می‌کند (۱۱). علاوه بر این موارد، با توجه به اینکه آلفاتوکسین‌های جدا شده از زهر عقرب بوتوس مارتنزی کراش، پلی‌پپتیدهایی با ۶۴-۶۶ توالی اسید آمینه هستند (۱۲)، cDNAهای کدکننده این نوروکسین‌ها در حدود 192-198 bp طول دارند. همچنین چهار بتاتوکسین جدا شده از سم این عقرب، پلی‌پپتیدهایی با طول ۶۹-۷۲ توالی اسید آمینه هستند، که cDNAهایی با طول حدود 207-216 bp خواهند داشت. زیونگ و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ توالی ۲۶۴ جفت بازی cDNA یک نوروکسین تحریکی اختصاصی حشرات را از همین عقرب شناسایی کردند (۱۳).

با توجه به اینکه cDNAهای مربوط به نوروکسین‌های شناسایی شده در این مطالعات همگی در محدوده ۱۹۲ تا ۲۶۴ جفت باز بوده‌اند، صحت نتیجه

عقرب ایرانی ادونتوبوتوس دوریه (*O.doriae*) متعلق به جنس بوتوس (*Buthus*) با دو زیرگونه دوریه (*Doriae*) و ادونتوروس (*Odonthurus*) و متعلق به خانواده خطرناک عقرب‌ها یعنی بوتیده (*Buthidae*) است (۴). اولین سم جداسازی شده از این عقرب OD1 نامگذاری شد. مشخصات و خصوصیات این سم در بانک اطلاعاتی Swiss prot با کد P8464 ثبت شد (۶). سم OD1 دارای ۶۵ اسید آمینه است و جزو سموم شبه‌آلفا عقرب است. این سم دارای اثر مهاری بر روی کانال قلبی پستانداران (*Nav1.5*) و همچنین کانال سدیم حشرات (*para/tipE*) است (۴، ۵). تعداد ۱۹۵ bp الیگونوکلئوتید برای سنتز DNA کدکننده OD1 استفاده شد. طراحی این الیگونوکلئوتیدها بر اساس ترتیب اسید آمینه OD1 انجام شد (۹). این ترتیب نوکلئوتید با استفاده از برنامه Blast:homology search و نرم‌افزار Blast-primer Design انجام شد. توالی‌های نوکلئوتید بر اساس کدون ترجیحی برای بیان در وکتور *E.coli* انتخاب شدند (۹).

در این پژوهش، با توجه به اینکه قطعه cDNA تکثیر یافته، در محدوده مورد انتظار (bp 195) قرار گرفته بود و از آنجا که این نتیجه با تکرار واکنش، مجدداً به خوبی قابل مشاهده بود، چنین به نظر می‌رسد که قطعه تکثیر یافته، همان cDNA کدکننده نوروکسین هدف در غده زهر عقرب ادونتوبوتوس دوریه باشد. نتایج به دست آمده

نوکلئوتیدی آن امکان‌پذیر خواهد بود و به دنبال آن نیز امکان تشخیص نوع نوروٹوکسین کدشونده توسط این cDNA میسر خواهد شد.

قدردانی

نتایج این مقاله از یک پایان نامه دکترای حرفه ای داروسازی استخراج شده است. هزینه انجام این مطالعه از طرف معاونت پژوهشی تامین و در مرکز تحقیقات سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور انجام شد. در اینجا بایستی از مسئولین محترم معاونت پژوهشی، گروه محترم ژنتیک دانشگاه چمران، پرسنل زحمتکش دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات سم شناسی دانشگاه جندی شاپور قدردانی و سپاسگزاری شود.

حاصل از پژوهش حاضر، که تکثیر cDNA یک نوروٹوکسین با طول پیش‌بینی شده 195 bp بود، دور از انتظار نبوده است.

همچنین بنابر مطالعات مبس (۲۰۰۲) و گودت و همکاران (۲۰۰۲)، آلفا توکسین‌ها بیشتر در گونه‌های عقرب‌های Old world (از قبیل آندروکتونوس) و بتا توکسین‌ها بیشتر در گونه‌های عقرب‌های New world (از قبیل سترورویئیدس) یافت می‌شوند (۱۵)، و با توجه به اینکه قطعه تکثیر یافته در پژوهش حاضر از سم عقرب ادونتوبوتوس دوریه جداسازی شده است، امکان اینکه نوروٹوکسین کد شونده، توسط این cDNA، یک آلفاتوکسین باشد، بیشتر است (۱۶). با این وجود، تأیید قطعی اینکه آیا cDNA تکثیر یافته همان cDNA مورد انتظار در این پژوهش است، تنها با تعیین توالی

منابع

- 1-MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 1998;280(5360):106-9.
- 2-Jalali, A., Bosmans, F., Cuypers, E., Amininasab, M., Clynen, E., Zaremirakabadi, A., Sarbolouki, M. N., Schoofs, L, Vatanpour H, Tytgat, J. OD1, the first toxin isolated from the venom of the scorpion *Odonthobuthus doriae* active on voltage-gated Na⁺ channels. *FEBS Lett.* 2005. 579, 4181-4186.
- 3-Latifi M, Tabatabai, M. Immunological studies on Iranian scorpion venom and antiserum. *Toxicon* 1979. 17: 617-621.
- 4-Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26(1):13-25.
- 5-Abdel-Mottaleb Y, Clynen E, Jalali A, Bosmans F, Vatanpour H, Schoofs L, et al. The first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *FEBS Lett* 2006;580(26):6254-8.
- 6-Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 1999. 264: 287-300.
- 7-Nikkhah M, Manesh HN, Taghdir M, Talebzadeh M, Zadeh MS, Schaller J, et al. cDNA cloning, sequence analysis and molecular modeling of a new peptide from the scorpion *Buthus saulcyi* venom. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(3):284-91.
- 8-Wang CG, He XL, Shao F, Liu W, Ling MH, Wang DC, et al. Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Eur J Biochem* 2001;268(8):2480-5.
- 9-Xiong YM, ling MH, Wang DC, Chi CW. The CDNA and genomic DNA sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 1997;35(7):1025-31.
- 10-Xiong YM, Ling MH, Lan ZD, Wang DC, Chi CW. The cDNA Sequence of an excitatory insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 1999;37(2):335-41.
- 11-Mebs D. Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologist and toxinologist, physicians and pharmacists. Stuttgart: Medpharm; 2002. p. 172-8.
- 12-Simard JM, Watt DD. Venoms and Toxins. *Biology of scorpions* 1989;10:414-44.
- 13-Denac H, Mevissen M, Scholtysik G. Structure, function and Pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362(6):453-79.
- 14-West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾- Channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(22):10910-4.
- 15-Proteins that Interact with sodium channel. *Toxicon*, 29:1051-1084. B. (1998). An excitatory scorpion toxin with a distinctive Feature: an additional Alph helix at the C terminus and its implications for interaction with insect Sodium channels. *Structure*, 6; 1095-1103.
- 16-Pashkov, V. S., Maiorov, V. N., Bystrov, V. F., Hoang, A. N., Volkova, T.M. and Grishin, E. V. (1998). Solution spatial structure of long neurotoxin M9 from the Scorpion *Buthus* by 1H-NMR spectroscopy. *Biochemistry and biophysics*, 31: 121-131.

mRNA Extraction from Venom Glands of Iranian Scorpion *Odonthobuthus Doriae*, cDNA Synthesis and Perform PCR from OD1 by Means of Degenerative Primers

Mohamad Alimoradi¹, Amir Jalali^{1*}, Hamid Galeh dari², Farzaneh Shahin³, Vadie beygi Khozani¹

1-Assistant Professor of Pharmacology and Toxicology.

2-Assistant Professor of Genetic.

3-Student PhD Genetic.

1-Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Toxicology Research Center, Ahvaz, Iran.

2-Department of Genetic, School of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

3- Department of Genetic, School of Basic Science, Department of Genetic, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding author:

Dr Amir Jalali, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Toxicology Research Center, Ahvaz, Iran.

Tel: +986113738378

Email: amjalali@hotmail.com

Abstract

Background and Objective: Scorpion sting is a serious public health problem in different parts of Iran. The majority of the scorpion sting cases are due to *Buthidae* family. Scorpion toxin consists of different biologic active components which are encoded by individual gene. The aim of this study was to amplify of cDNA encoding a α -like neurotoxin, named OD1 from the venom gland of Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*.

Materials and Methods: the identified *Odonthobuthus doriae* scorpions were prepared from the Razi vaccine and serum research institute that located in Hesarak, Karaj. The total mRNA was prepared and purified from the venom gland by using RNA extraction kit. The cDNA library was then constructed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

Results: After optimizing PCR conditions, a cDNA encoding α -like neurotoxin, named as OD1, was selectively amplified by PCR. Using degenerate and appropriate primers, an open reading frame of 264 base pair encoding the mature toxin with 64 residues was amplified from a cDNA library of *Odonthobuthus doriae* venom gland.

Conclusion: The predicted amino acid sequence consist of 88 amino acid residues including a putative signal peptide of 24 residues and a mature toxin of 64 residues.

Keywords: Scorpion stings, cDNA, PCR, *Odonthobuthus doriae*.

► Please cite this paper as:

mRNA Extraction from Venom Glands of Iranian Scorpion *Odonthobuthus Doriae*, cDNA Synthesis and Perform PCR from OD1 by Means of Degenerative Primers. Alimoradi M, Jalali A, Galehdari H, Shahin F, Beygi Khozani V. *Jundishapur Sci Med J* 2013;12(1):33-40

Received: Oct 21, 2012

Revised: Sep 2, 2012

Accepted: Oct 24, 2012