

شناسایی مولکولی پپتیدتوکسین MeBTX از غده زهری عقرب مزوبوتوس/پئوس 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

پلی پپتیدهای 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/پئوس (*Mesobuthus eupeus*) تکثیر و توالی نوکلئوتیدی آن مورد شناسایی مولکولی 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 پلی پپتید کد شده توسط این cDNA دارای یک پپتید راهنما می‌باشد که اسید آمینه گلايسين در وضعیت بیستمین اسید آمینه به عنوان شروع پلی پپتید بالغ محسوب می‌گردد. همترازی این پلی پپتید 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/پئوس ایران است که در مقایسه با توالی‌های مشابه از منشاء مشترکی سرچشمه گرفته‌اند.

کلمات کلیدی: cDNA، RT-PCR، توکسین، ضد باکتری، مزوبوتوس/پئوس، عقرب، ایران

مقدمه

تاکون 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 نروتوکسین تحریکی اختصاصی حشرات موجود در غده سم این عقرب تکثیر داده شده است (Xu, Goudet et al., 2002). در یک مطالعه دیگر روی همین عقرب ژن کد کننده پپتید ضد صرع کلون و تعیین توالی شد و توالی اسید آمینه این نروتوکسین گزارش گردید. BmKb1 و BmKn2 نیز از دیگر ترکیبات ضد میکروبی هستند که از غده زهر عقرب بوتوس مارتنزی کراش استخراج

عقرب‌های خانواده بوتیده با داشتن بیش از ده گونه و یک زیرگونه از فراوان‌ترین عقرب‌های استان خوزستان می‌باشند که عقرب مزوبوتوس/پئوس از این خانواده جز فراوان‌ترین عقرب‌های این استان محسوب می‌شود (Navidpour et al., 2008). سمیت‌زایی 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 همولف و غده زهر این عقرب یافت می‌گردند (Cociancich et al., 1993، Yibao et al., 2009، Ehret-Sabatier et al., 1996).

(نویسنده مسئول)

E-mail: jolodara@scu.ac.ir

^۱ استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۲ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

هدف از این پژوهش، تکثیر، توالی‌یابی و شناسایی مولکولی یک پیتیدوکسین از عقرب مزوبوتوس/پئوس 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/پئوس از استان خوزستان جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه فرانس 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 (کیژن، آلمان) به منظور استخراج RNA تام نگهداری شد. در این پژوهش، استخراج RNA با استفاده از محلول RNX (سینژن، 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 ۵x، ۰/۸ میکرو لیتر dNTPs (حاوی ۲۵ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید تری فسفات)، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم Ribolock RNase inhibitor (۴۰ واحد در میکرو لیتر) اضافه گردید و سپس با آب مقطر حجم آن به ۱۹ میکرو لیتر رسانده شد. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد به هر نمونه ۱ میکرو لیتر از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (۲۰۰ واحد در میکرو لیتر) افزوده شد و در نهایت نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲

شده‌اند (Wang et al., 2001). به منظور جدا سازی این پلی‌پیتیدها، سم عقرب‌های گونه دیگر مانند آندروکتونوس/سترالیس 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 پیتیدهای هستند که از عقرب پاندینوس/امپراتور (*Pandinus imperator*) آفریقایی 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 پیتید ضد میکروبی دیگری است که از غده زهر عقرب اپیستاکانتوس ماداگاسکارینسیس (*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 پیتیدهای ضد میکروبی هستند که از عقرب آفریقایی اپیستوفتالموس/کاریناتوس (*Opisthoptalmus 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 پیتید 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 پیتید ضد میکروب و ضد مالاریا است که از عقرب پاندینوس/امپراتور جدا شده است (Condea et al., 2000).

نشان داده شده است. واکنش PCR برای هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که حاوی ۳ میکرولیتر $eDNA$ ، $0.2 \mu M$ از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، $1/5 mM$ کلرید منیزیم (سیناژن، ایران)، $0.25 mM$ dNTP، $1 \times$ بافر PCR (سیناژن، ایران) و $1/5$ 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 سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه (۳۲ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از آن محصول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد 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

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مقاله

نام آغازگرها	توالی آغازگرها
الیگو (dT)	5'-CGCTCTAGAGCTCGAGTCACT(17) XbaI XhoI
الیگو-R (dT)	5'-CCCAGATCTCGAGCTCAGTG-3'
F	5'-CGCGGATCCATGCAAAGGAATCTGGTTCGT BamHI
R	5'-CGCAAGCTTGTAAAAGCCCATGGGAATGC HindIII

الکتروفوروز ژل آگارز

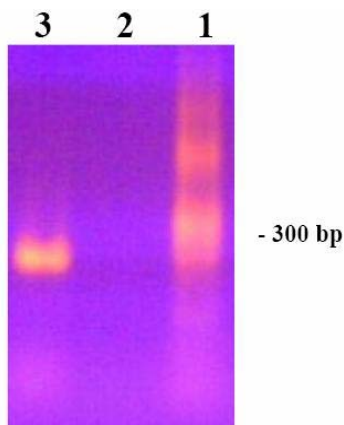
ژل (ویواتیس، مالزی) استفاده شد. مراحل تخلیص مطابق بروشور شرکت سازنده انجام گرفت.

توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها

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

به منظور بررسی محصول واکنش PCR و اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری ۶x 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 الکتروفوروز با شدت ۵ ولت به ازاء هر سانتی متر طول ژل به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفوروز شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داگ از آن عکسبرداری صورت گرفت. به منظور تخلیص محصول RT-PCR از روی ژل آگارز از کیت استخراج

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 مستقماً 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.

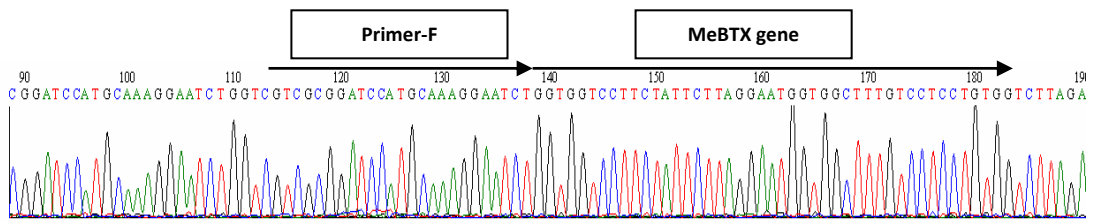
قرارگرفت. با استفاده از همین پایگاه وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای این پلی‌پپتید محاسبه شد. درخت فیلوژنیک بر اساس توالی این ژن با استفاده از نرم‌افزار موجود در پایگاه اینترنتی www.phylogeny.fr ترسیم گردید. برای تعیین ساختمان ملکولی ژن مورد بررسی از نرم‌افزار جـستجوی CDD (ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd) 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 اسپکتروفتومتری 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، RT-Semi-Nested 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

(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^۱ مربوطه نیز خط کشیده شده است.

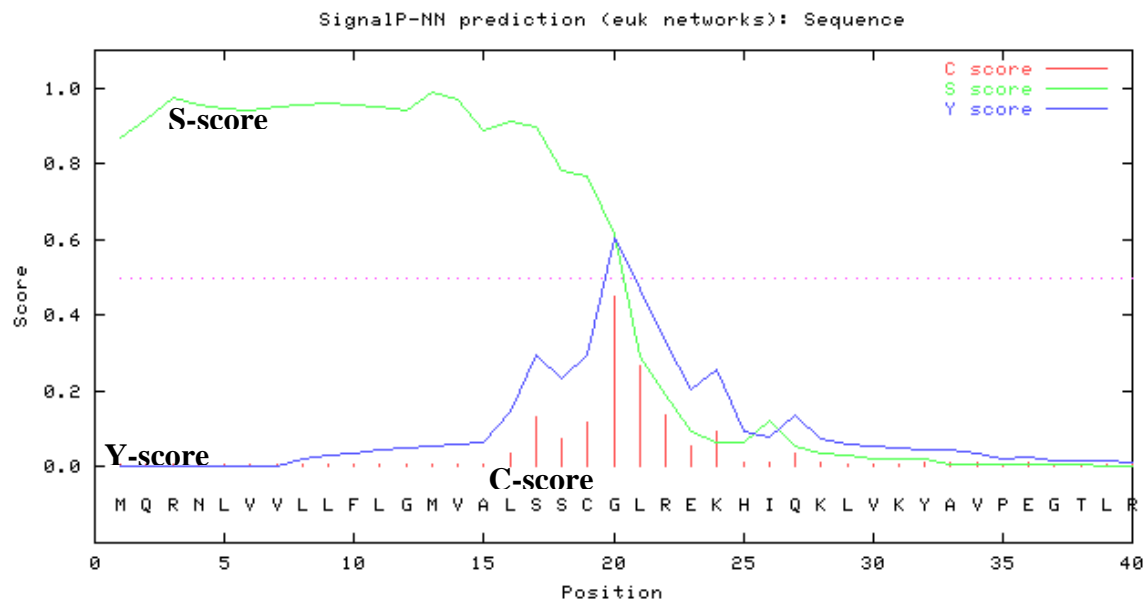
همترازی و رسم درخت فیلوژنیک بر اساس توالی MeBTX

بر اساس تصویر ۴ همترازی توالی اسید آمینه‌ای به دست آمده نشان داد که پپتید توکسین عقرب مزوبوتوس /پئوس 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 توالی یابی شده با هالوتایپ‌های مختلف این ژن در عقرب *Mesobuthus eupeus* 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 /پئوس استان خوزستان است.

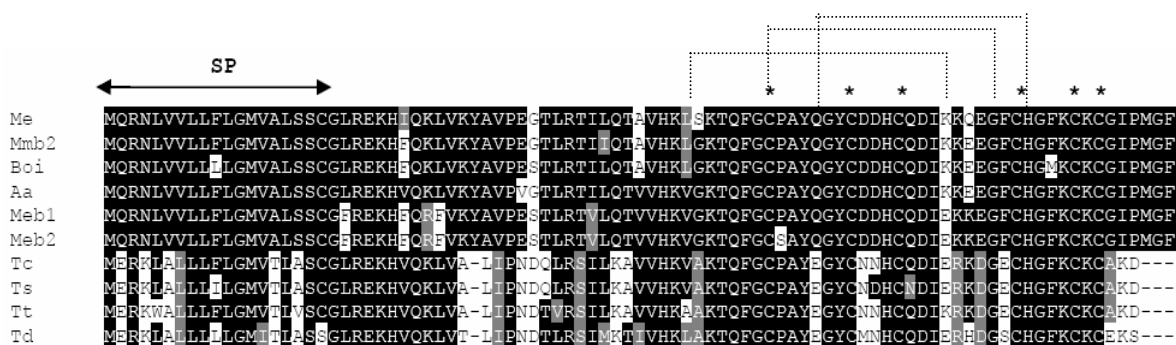
شناسایی پپتید راهنما و دومین MeBTX

توالی به دست آمده، از نظر وجود پپتید راهنما مورد بررسی قرار گرفت. 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 (اسید آمینه شماره ۱) آغاز می‌شود و به اسید آمینه سیستین (اسید آمینه شماره ۱۹) ختم می‌شود.

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



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 α -score و s-score، 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. اسید آمینه‌های کاملاً مشابه با رنگ تیره نشان داده شده‌اند. اسید آمینه‌هایی که همولوگ یکدیگرند با رنگ خاکستری نشان داده شده‌اند. اسید آمینه‌های سیستم‌های تشکیل دهنده دای سولفید باندها با * و نحوه اتصال آنها با نقطه چین نشان داده شده‌اند و محدوده پپتید راهنما با خط دو سر نیزه‌ای علامت‌گذاری گردیده است. ژن‌ها مربوط به عقرب‌های به شرح زیر می‌باشند:

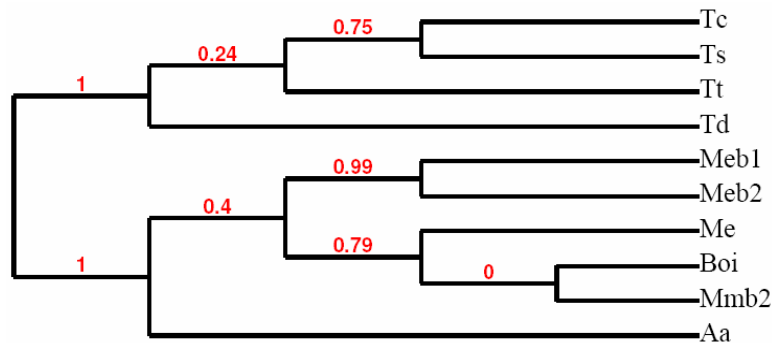
Me: *M. eupeus* (استان خوزستان); Mmb2: *M. martensii* (Q9N661); Boi: *Buthus occitanus israelis* (B8XH40); Aa: *Androctonus australis* (P69939); Meb1: *M. eupeus* (مدیترانه شرقی) (A9XE60); Tc: *Tityus costatus* (Q5G8A6); Ts: *Tityus serrulatus* (P69940); Tt: *Tityus trivittatus* (Q0GY46); Td: *Tityus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

ترسیم گردید (تصویر ۵). همان‌طور که در این تصویر مشاهده می‌شود، توالی‌های موجود علی‌رغم تشابه اولیه آنها در سطح اسید آمینه، به دو دسته کاملاً مجزا قابل

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

M. Martensii و *Boi*, *Mb2* جدا شده به ترتیب از *Androctonus australis* و *Buthus occitanus Israeli* قرابت دارد و دسته دوم را تشکیل می‌دهند.

تقسیم هستند. همان طور که انتظار می‌رفت *Meb1* و *Meb2* مربوط به مزوبوتوس/پئوس مدیترانه‌ای در یک دسته قرار می‌گیرند. در حالی که ژن *MeBTX* مزوبوتوس/پئوس ایران با ژن‌های مشابه‌ای به نام‌های



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 مابین گروه‌ها است.

بحث

مشابه از عقرب‌هایی از جنس مزوبوتوس مدیرانه شرقی، *آندرکتونوس* و *تیتیسوس* (*Tityus*) مقایسه شد (تصویر ۵). همان طور که در این تصویر مشاهده می‌شود، تشابه توالی این ژن از عقرب مزوبوتوس/پئوس استان خوزستان با ژن‌های مشابه از عقرب‌هایی از جنس مزوبوتوس مدیرانه شرقی، *آندرکتونوس* بسیار بالاست و تفاوت‌های اندکی (در حدود ۳-۵ اسیدآمین) دیده می‌شود، در حالی که این تشابه توالی در مقایسه عقرب‌های جنس *تیتیسوس* 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 اسیدآمین 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*)

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 بین‌المللی 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 بین‌المللی ژن موجود نیست.

همترازی توالی ژن *MeBTX* با عقرب‌های دیگر

توالی اسید آمینه‌ای این ژن از عقرب مزوبوتوس/پئوس مورد بررسی در این پژوهش با توالی ژن‌های

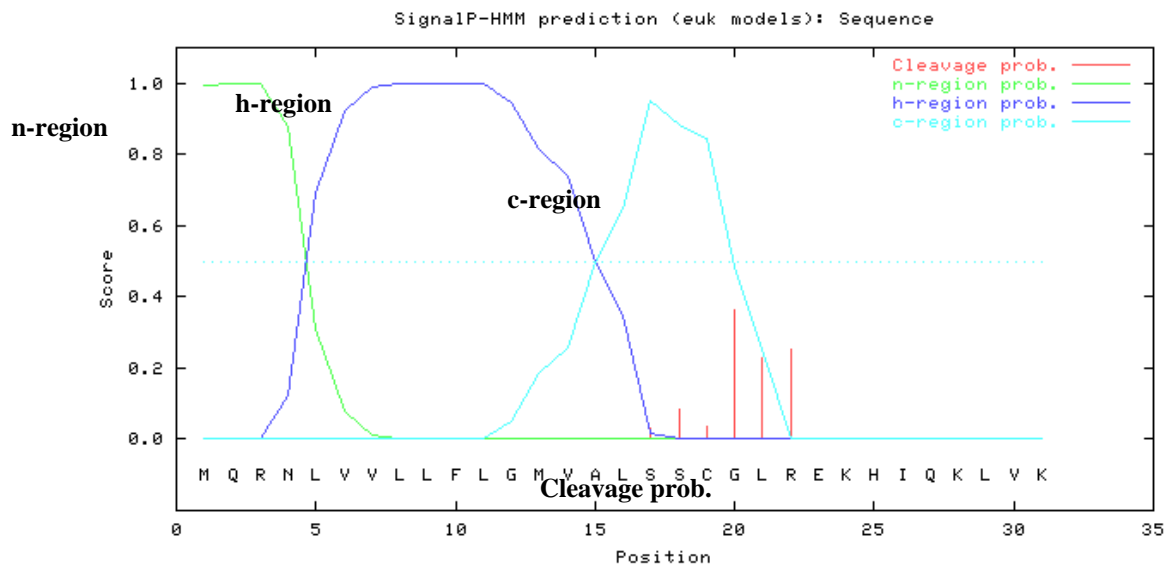
راهنمای پروتئین‌های ترش‌چی ۳ ناحیه قابل مشاهده است: ناحیه مربوط به سر انتهایی N (ناحیه n)، ناحیه شامل اسید آمینه‌های هیدروفوب (ناحیه h) و ناحیه مربوط به سر انتهایی C (ناحیه c). در تصویر ۶ نواحی مربوط به h, n و c مربوط به پپتید راهنمای بتا پپتید توکسین عقرب مزوبوتوس اپیوس استان خوزستان مشخص شده است. در این تصویر مشخص می‌شود که از اسید آمینه اول (متیونین M) تا اسید آمینه پنجم (فیل 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 (گلو تامیک اسید E) تا اسید آمینه بیست و دوم (گلیسین G) جز ناحیه c می‌باشد. حال با توجه به اینکه s-score احتمال حضور هر اسید آمینه در ناحیه پپتید راهنما است، می‌توان گفت که آمینه اسیدهایی که جزئی 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 اسید آمینه 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 سیستین (C) و گلیسین (G) قرار دارد. به این ترتیب اولین اسید آمینه پروتئین بالغ ژن مورد نظر در سر انتهایی N، اسید آمینه گلیسین است. لذا پروتئین بالغ این ژن با اسید آمینه گلیسین آغاز و به اسید آمینه فیل 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 ترش‌چی است.

(AAC47326)، مگس سیمولیوم (Simulium) (ACZ28238)، اسپودپترا (Spodoptera) (ACZ28238)، ماندوکا (Manduca) (AAB31190)، بومبایکس Bombyx (NP_001037448)، اورنیتیدودوروس (Ornithodoros) (AAL17868) و دروزوفیلا Drosophila (ABK57077) به صورت ۸ سیستین 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.

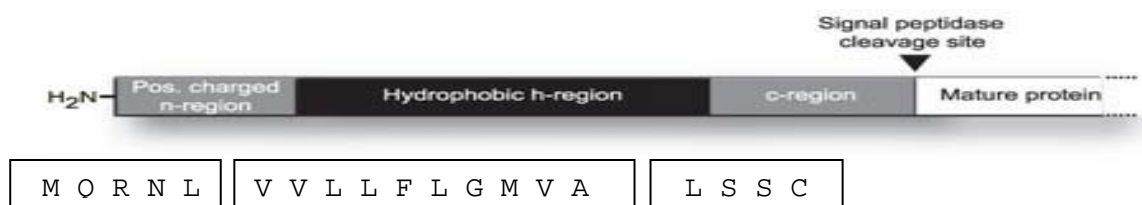
پلی پپتید ترش‌چی MeBTX

تمام پروتئین‌های ترش‌چی 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 ترش‌چی، 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 می‌یابد. 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 و ۶ مشاهده می‌شود جایگاه برش این پپتید راهنما توسط سیگنال پپتیداز بین اسید آمینه 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 گلیسین قرار دارند. با آنالیز پپتید

(الف)



(ب)



تصویر ۶: نمای اسید آمینه‌ای (الف) و گرافیکی (ب) پپتید راهنما ژن *MeBTX* مزوبوتوس اپتوس استان خوزستان به همراه ۳ ناحیه *n*، *h* و *c* نشان داده شده است. در تصویر ب محل برش توسط آنزیم سیگنال پپتیداز علامت گذاری گردیده است. نواحی *n*، *h* و *c* پپتید راهنمای ژن مورد نظر در عقرب مزوبوتوس اپتوس 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 Communications*, 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., Dorselaer 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., Kovarik 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 BmK α Tx11 and BmK α Tx15 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.