(مقالهٔ پژوهشی)

تهیه cDNA از mRNA ژن OD1 استخراج‌شده از بافت غدهٔ زهری عقرب ایرانی ادونتوبوتوس دوریه (*Odonthobuthus doriae*)

محمد علیمرادی[۱]، امیر جلالی[۱]*، حمید گله‌داری[۲]، فرزانه شاهین[۳]، ودیعه بیگی خوزانی[۱]

۱- استادیار گروه 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.

* نویسندهٔ مسؤول؛
امیر جلالی، گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۶۱۱۳۷۳۸۳۷۸
Email: *amjalali@hotmail.com*

چکیده

زمینه و هدف: در اکثر نقاط ایران، به‌ویژه مناطق مرکزی، جنوب و شمال شرقی، عقرب‌زدگی یک مشکل بهداشتی جدی محسوب می‌شود. بیشتر این گزش ها، 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 کنندهٔ یک نروتوکسین شبه آلفا به نام OD1 از غدهٔ زهر عقرب ایرانی ادونتوبوتوس دوریه (*Odonthobuthus doriae*) می‌باشد.

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

یافته‌ها: با استفاده از کیت‌های استخراج و تکنیک RT-PCR، قطعهٔ cDNA از غدهٔ زهر عقرب ادونتوبوتوس دوریه تکثیر یافت. cDNA به‌دست 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 می باشد..

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

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

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۶/۱۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/۷/۳۰

مقدمه

عقرب‌ها (Scorpions) که در ردهٔ عنکبوتیان و متعلق به شاخهٔ بندپایان (Arthropoda) هستند، از ابتدایی‌ترین جانوران موجود در جهان با بیش از ۱۵۰۰ جنس مختلف هستند. این راسته متشکل از ۹ خانوادهٔ 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 شناخته‌شدهٔ عقرب (در حدود شش‌صد گونه) می‌باشد. از این تیره، گونهٔ ادونتوبوتئوس (Odonthobuthus) و زیرگونهٔ.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 1β /1.2 ،β1 /5.1 NAV ،PARA/TIPE) بیان شده بر روی اووسیت قورباغه (Xenopus laevis oocytes) مطالعه شد، توانست فرایند غیر فعال-سازی کانال حشرهٔ PARA/TIPE را به میزان زیادی مهار نماید (EC50= 80 ±14 nM). در حالی‌که 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 مطالعه‌ای دیگر، مشخص شد که این سم می‌تواند باعث آهسته و طولانی 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 دپلاریزاسیون غشاء (In vivo) کانال-های Nav 1.7 در حالت غیر فعال و از دست رفتن تحریک‌پذیری الکتریکی نورون‌های ادراک‌کنندهٔ درد (Nociceptor) و احساس بی‌دردی (Neuroligic) 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 ادامهٔ بررسی‌ها معلوم می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از جداسازی mRNA بیان‌کنندهٔ OD1 از غدهٔ 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 دستهٔ هاون له شد.

در این پژوهش، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج Total RNA EXTRACTION KIT

(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 RNAی استخراج شده با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به cDNA تبدیل شود.

تبدیل Total RNA به cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA(QIQGEN) صورت گرفت (فهرست مواد موجود در کیت استخراج CDNA در جدول ۲ آمده است). جهت تکثیر cDNA به‌دست آمده، باید آغازگر مناسب طراحی شود، که برای این منظور ابتدا توالی‌های مربوط به ژن‌های کد کنندهٔ 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 کنندهٔ نوروتوکسین‌های متعلق به عقرب‌های آندروکتونوس استرالیس و مزوبوتوس مارتنزی 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 اسیدآمینه‌های نوروتوکسین‌های 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 به‌کارگرفته شده به شرح ذیل می‌باشد (نوکلئوتیدهای دژنره به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند):

OD1-VF: 5-
TNCGNGAYGCNTAYATHGCNGAYG
AY-3

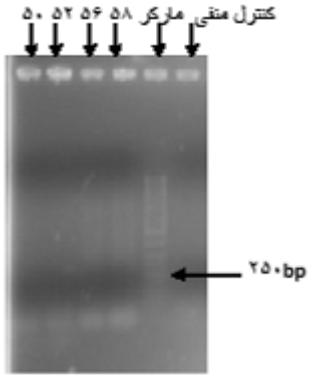
OD1-VR: 5-
AYTTNCCNGGDATNCGDATNGGN-3
Y=CT, N= ACGT Y, H= ACT , D=
ACT

RT-PCR به کمک دستگاه Transilluminator (Uvi tek انگلیس) و با استفاده از برنامهٔ جدول ۳ انجام شد.

قطعهٔ ژنی تکثیر یافته به طول ۱۹۵ bp با ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

یافته‌ها

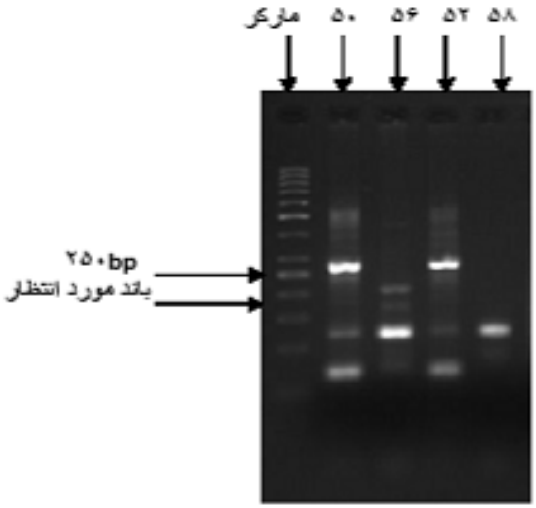
نتیجه‌ای که از گرادیان دمایی PCR حاصل شد مطابق شکل ۱ در دو دمای ۵۶ و۵۸ درجه فقط اسمیر مشاهده شد. به منظور اصلاح و بهینه‌سازی PCR از همین محصولات به عنوان Template استفاده شد و مجدداً PCR گذاشته شد (۱۴). شرایط گرادیان دمایی مورد استفاده جهت بهینه‌سازی PCR برای تکثیر ژن OD1 مطابق شرایط مندرج در جدول ۴ اجرا شد و طبق شکل ۲ در دو دمای ۵۶ و۵۸ 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 تخلیص‌شده PCR انجام شد و نتیجه‌ی نهایی شکل ۳ به دست آمد.. البته همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، ابتدا محصول تخلیص‌شده 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 ۱و۲و۳و۴و۵ و۶ 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.



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

با شرایط زیر:

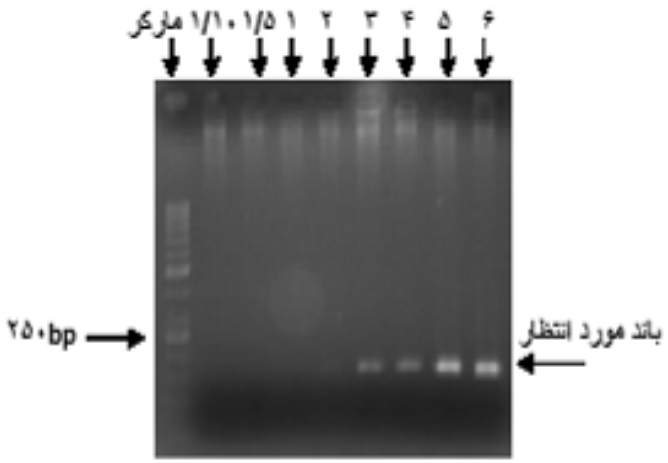
دما (درجهٔ سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد چرخه
۹٤ درجه	۳ دقیقه	۱ چرخه
۹٤ درجه	۳۰ ثانیه	
۵۸،۵٦،۵۲،۵۰،درجه	۱دقیقه	
۷۲ درجه	۱ دقیقه	۳۵ چرخه
۷۲ درجه	۱۰ دقیقه	۱ چرخه



شکل2: RePCR محصولات حاصل از گرادیان دمایی PCR بر روری ژل آگارز 1/5 درصد

با شرایط زیر:

دما (درجهٔ سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد چرخه
۹٤ درجه	۳ دقیقه	۱ چرخه
۹٤ درجه	۳۰ ثانیه	
۵۸،۵٦،۵۲،۵۰،درجه	۱دقیقه	
۷۲ درجه	۱ دقیقه	۳۵ چرخه
۷۲ درجه	۱۰ دقیقه	۱ چرخه



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

با شرایط زیر:

دما (درجهٔ سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد چرخه
۹٤ درجه	۳ دقیقه	۱چرخه
۹٤ درجه	۳۰ ثانیه	۵ چرخه
۵۰ درجه	۱ دقیقه	
۷۲ درجه	۱دقیقه	
۹٤ درجه	۳۰ ثانیه	۳۵ چرخه
٦۰ درجه	۱ دقیقه	
۷۲ درجه	۱دقیقه	
۷۲ درجه	۱۰ دقیقه	۱ چرخه

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

عقرب ایرانی ادونتوبوتوس دوریه (O.doriae) متعلق به جنس بوتوس (Buthus) با دو زیرگونهٔ دوریه (Doriae) و ادونتوروس (Odonthurus) و متعلق به خانواده خطرناک عقرب‌ها یعنی بوتیده (Buthidae) است (۴). اولین سم جداسازی‌شده 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 bp۱۹۵ الیگونوکلئوتید برای سنتز DNA کدکنندهٔ OD1 استفاده شد. طراحی این الیگو نوکلئوتیدها بر اساس ترتیب اسید آمینه OD1 انجام شد (۹). این ترتیب نوکلئوتید با استفاده از برنامهٔ 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 قطعهٔ cDNA تکثیر یافته، در محدودهٔ مورد انتظار (bp 195) قرارگرفته بود و از آنجا که این نتیجه با تکرار واکنش، مجدداً به خوبی قابل مشاهده بود، چنین به نظر می‌رسد که قطعهٔ تکثیر یافته، همان cDNA کدکنندهٔ نوروتوکسین هدف در غدهٔ زهر عقرب ادونتوبوتوس دوریه باشد. نتایج به‌دست آمده توسط دیگر محققان نیز می‌تواند گواهی بر این امر باشد. نیک‌خواه و همکارانش (۲۰۰۶) ژن کدکنندهٔ یک نوروتوکسین به نام Bsaul1 را با استفاده از روش RT-PCR از عقرب هوتنتوتا سالسئی (Hotentuta salcyi) تکثیر کردند. قطعهٔ cDNA تکثیر یافته توسط این محققان، 240 bp طول داشت (۱۰) . قطعهٔ cDNA تکثیر یافته توسط وانگ و همکارانش (۲۰۰۱) نیز bp200 بود، که یک نوروتوکسین 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 کارش، پلی‌پپتیدهایی با ۶۶-۶۴ توالی اسید آمینه هستند (۱۲)، cDNAهای کدکنندهٔ این نوروتوکسین‌ها در حدود bp 198-192 طول دارند. همچنین چهار بتاتوکسین جداشده از سم این عقرب، پلی‌پپتیدهایی با طول ۷۲-۶۹ توالی اسیدآمینه هستند، که cDNAهایی با طول حدود bp 216-207 خواهند داشت. زیونگ و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ توالی ۲۶۴ جفت بازی cDNA یک نوروتوکسین تحریکی اختصاصی حشرات را از همین عقرب شناسایی کردند (۱۳).

با توجه به اینکه cDNAهای مربوط به نوروتوکسین‌های شناسایی شده در این مطالعات همگی در محدودهٔ ۱۹۲تا ۲۶۴ جفت باز بوده‌اند، صحت نتیجهٔ

حاصل از پژوهش حاضر، که تکثیر cDNA یک نوروتوکسین با طول پیش‌بینی‌شدهٔ 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 سنتروروئیدس) یافت می شوند (۱۵)، و با توجه به اینکه قطعهٔ تکثیر یافته در پژوهش حاضر از سم عقرب ادونتوبوتوس دوریه جداسازی شده است، امکان اینکه نوروتوکسین 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 نوکلئوتیدی آن امکان‌پذیر خواهد بود و به دنبال آن نیز امکان تشخیص نوع نوروتوکسین کدشونده توسط این cDNA میسر خواهد شد.

قدردانی

نتائج 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 زحتمکش دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات سم شناسی دانشگاه جندی شاپور قدردانی و سپاسگزاری شود.

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 Buthotus 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 scorpiom Buthus martenci 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 kirsch. 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 martensi 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 ex citatory scorpion toxin with a distinctive Feature: an additional Alph helix at the C terminus andits implications for int eraction 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. Biophysiology and chemistry, 31: 121-131.

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

Mohamad Alimoradi[1], Amir Jalali[1]*, Hamid Galeh dari[2], Farzaneh Shahin[3], Vadie beygi Khozani[1]

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
Emailamjalali@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 Perfom 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**