

افزوده سازی و شناسایی مولکولی توالی cDNA کد کننده یک پپتید توکسین از غده زهر عقرب *Mesobuthus eupeus* در استان خوزستان

فاطمه حسینی نیا^{۱*} محمدتقی بیگی نصیری^۱ عباس جلودار^۲ هدایت اله روشنفکر^۱

(۱) گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، خوزستان- ایران
(۲) گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و مولکولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، خوزستان- ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: زهر عقرب *Mesobuthus eupeus* شامل پپتید توکسین‌هایی است که برخی از آن‌ها در عملکرد کانال‌های پتاسیمی دخالت دارند. این نقش می‌تواند تأثیر مهمی در مطالعات فارماکولوژی و فیزیولوژی این کانال‌ها ایفا کند. **هدف:** با توجه به نبود اطلاعات کافی از بیولوژی مولکولی پپتیدهای زهر عقرب ایرانی، هدف کلی ما در این پژوهش افزوده سازی و آنالیز توالی cDNA کد کننده یک پپتید توکسین از غده زهر عقرب *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان می‌باشد. **روش کار:** به منظور ساخت cDNA، مجموع کل RNA از غده زهر عقرب *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان جداسازی شد و به کمک آن ساخت cDNA صورت گرفت. در ادامه با بکارگیری تکنیک Semi-Nested RT-PCR افزوده سازی cDNA هدف انجام گرفت و قطعه نوکلئوتیدی ۲۲۷ bp توالی یابی شد. **نتایج:** این قطعه شامل یک توالی کد کننده پپتید توکسین به اندازه ۱۷۴ نوکلئوتید است که پروتئینی را به میزان ۵۷ اسید آمینه، وزن مولکولی ۶/۴۳۴ KD و نقطه ایزوالکتریک ۵/۱۲ را کد می‌کند. آنالیز توالی اسید آمینه‌ای این پروتئین، پپتید راهنما، پیش پروتئین و پروتئین بالغی بطول بترتیب ۱۹، ۴ و ۳۴ اسید آمینه را مشخص می‌کند. با همترازی این پپتید توکسین با دامین‌های مربوط به توکسین دیگر عقرب‌ها، معلوم شد که این پپتید به سوپر فامیلی توکسین-۶ تعلق دارد. **نتیجه گیری نهایی:** با توجه به بیشترین شباهت این پپتید توکسین با آلفانوروتوکسین-۱ *Mesobuthus eupeus* آسیایی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این توکسین احیاناً عضو دیگری از آلفانوتوکسین‌هاست که متعلق به عقرب *Mesobuthus eupeus* بومی استان خوزستان است.

واژه‌های کلیدی: آلفانوتوکسین، کانال‌های پتاسیمی، *Mesobuthus eupeus*، عقرب، زهر

مقدمه

زهر عقرب‌ها به انواع سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک تقسیم می‌شوند. نوروتوکسین‌ها بر روی کانال‌های یونی موجود در غشاهای تحریک پذیر سلول‌های عصبی اثر می‌گذارند (۸). سمیت‌زائی زهر این عقرب روی پستانداران مربوط به حضور پلی‌پپتیدهایی است که روی کانال‌های یونی موجود در غشاهای تحریک پذیر سلول‌های عصبی اثر می‌گذارند. این توکسین‌ها که بعضاً خاصیت ضد میکروبی هم دارند، در همولف و غده زهر این عقرب یافت می‌گردند (۱۴، ۱۳).

مواد و روش کار

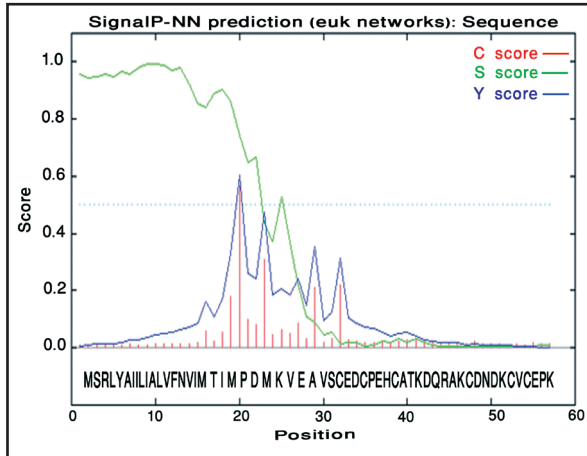
نمونه گیری: این پژوهش در آزمایشگاه مولکولی دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. تعداد ده نمونه عقرب مورد استفاده در این پژوهش متعلق به گونه *Mesobuthus eupeus* بودند که از مناطق مختلف استان خوزستان جمع‌آوری شده بود و در آزمایشگاه فرانس عقرب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی اهواز در آکواریوم نگهداری می‌شدند. محل نمونه گیری به خوبی توسط الکل ضد عفونی شد و سپس غده زهر (Telson) آن‌ها با استفاده از قیچی استریل، جدا شده و در محلول RNA Later (کیازن، آلمان) به منظور استخراج مجموع کل RNA نگهداری شد.

مراحل استخراج RNA: استخراج RNA، از ۶۰ mg بافت Telson با

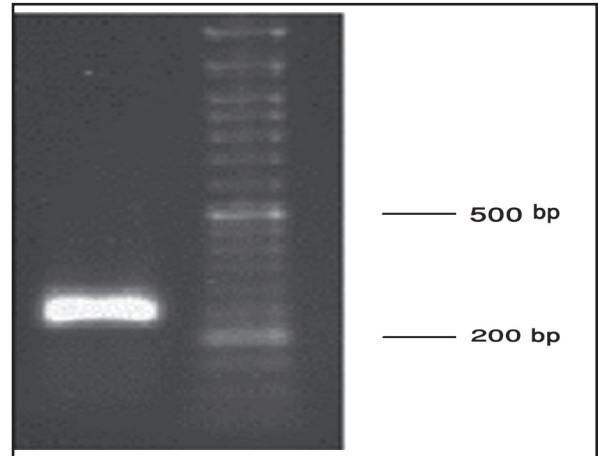
عقرب‌ها بندپایان شکارچی هستند که در شاخه بندپایان، رده عنکبوتیان و راسته عقرب‌ها قرار می‌گیرند (۱). بر اساس آخرین مطالعات، بیش از ۶۰ گونه مختلف عقرب در سه خانواده از عقرب‌ها شامل خانواده‌های Hemiscorpidae و Buthidae، Scorpaenidae در ایران یافت شده است که با توجه به شرایط اقلیمی استان‌های جنوبی کشور، پراکندگی آن عمدتاً در استان‌های کرمان، سیستان و بلوچستان و بویژه خوزستان مشاهده می‌شود (۵). Buthidae به عنوان بزرگ‌ترین و مهم‌ترین خانواده شناخته می‌شود (۴).

عقرب *Mesobuthus eupeus* متعلق به خانواده Buthidae می‌باشد. این عقرب یکی از فراوان‌ترین عقرب‌ها در استان خوزستان است و مسئول حدود ۴۵٪ عقرب زدگی‌ها در این استان است (۲). زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس، الیگوپپتیدها، نوکلئوتیدها، آمینواسیدها و ترکیبات آلی دیگر و نیز از آنزیم‌هایی همچون فسفولیپاز، هیالورونیداز و مولکول‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین مثل سروتونین، هیستامین، مهارکننده‌های پروتئاز و آزادکننده‌های هیستامین تشکیل شده است (۳). پروتئین‌های زهر شامل پپتیدهای تک رشته‌ای ۶۰-۷۰ اسید آمینه‌ای است که عموماً با چهار پل دی سولفیدی محکم شده است. پلی پپتیدهای نوروتوکسینی از ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در زهر عقرب هستند. (۹) توکسین‌های موجود در

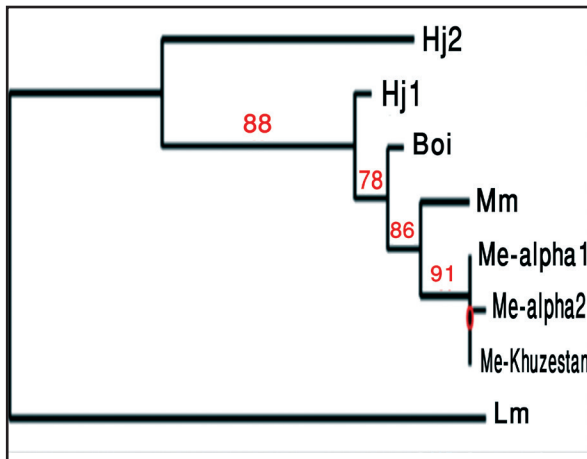




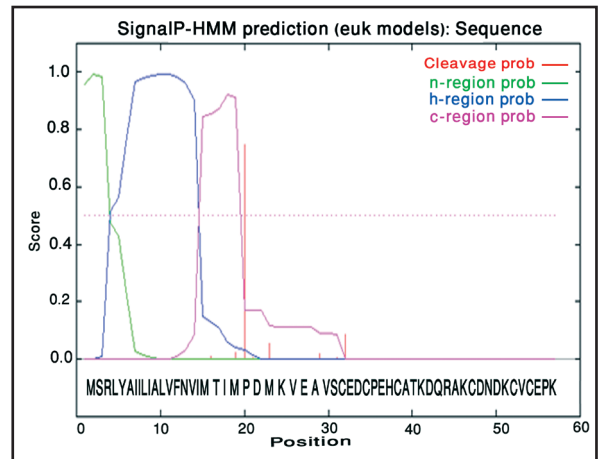
تصویر ۲. نمودار گرافیکی بررسی وجود پپتید راهنما با توجه به سه پارامتر C-score، S-score و Y-score.



تصویر ۱. الکتروفورز محصول واکنش PCR: ستون سمت راست مارکر ۵۰ bp، ستون سمت چپ محصول بدست آمده از PCR.



تصویر ۴. درخت فیلوژنیک پپتید عقرب *eupeus Mesobuthus* با دیگر گونه‌های عقرب.



تصویر ۳. بررسی سه پارامتر n-region probability، h-region probability و c-region probability.

طول ۳۴ اسیدآمینه است. اسیدآمینه متیونین در موقعیت ۲۴ نشان دهنده اولین اسیدآمینه پروتئین بالغ است. ضمناً، مشخص شد که این ژن در ناحیه بین اسیدآمینه ۲۹ تا ۵۶ حاوی دامینی به نام سوپرفامیلی توکسین-۶ است. این دامین اولین بار از خانواده BmP۰۲/BmTXKS۱ کشف شد که از زهر عقرب *Buthus martensii* Karsch جدا شده است. این دامین حاوی ۶ سیستمین بصورت تشکیل ۳ باند دی‌سولفیدی می‌باشد.

در تصویر ۳ سه پارامتر n-region probability، h-region probability و c-region probability توضیح داده شده‌اند. n-region prob برای هر اسیدآمینه احتمال حضور آن اسیدآمینه در ناحیه n پپتید راهنما است. اسیدآمینه‌هایی که مربوط به ناحیه n هستند عدد مربوط به n-region آن‌ها عددی غیر از صفر است. h-region prob برای هر اسیدآمینه احتمال حضور آن اسیدآمینه در ناحیه h پپتید راهنما و c-region prob برای هر اسیدآمینه احتمال حضور آن اسیدآمینه در ناحیه c پپتید راهنما است. اسیدآمینه‌های مربوط به ناحیه h عدد prob h-region آن‌ها و اسیدآمینه‌های مربوط به ناحیه c عدد c-region

صورت گرفت، مشخص کرد که میزان ۱۰۰ ng از رونوشت در ترکیب واکنش PCR مناسب‌ترین غلظت است. در ادامه تیتراسیون غلظت‌های مختلف کلرید منیزیم و پرایمرها، غلظت بهینه برای کلرید منیزیم ۲mM و برای هر کدام از پرایمرها ۰/۴ μl×pmol بدست آمد. همانگونه که در تصویر ۱ نشان داده شده است قطعه ژن هدف بوسیله تکنیک RT-PCR افزوده سازی شد. این قطعه نوکلئوتیدی افزوده سازی شده توالی یابی گردید که اندازه آن ۲۲۷ نوکلئوتید تعیین شد.

شناسایی پپتید راهنما و دامین: به منظور ارزیابی پروتئین کدشونده توسط قطعه نوکلئوتیدی توالی یابی شده با پرایمر رفت و برگشت نتیجه حاصل از توالی یابی توسط برنامه ترجمه پایگاه اینترنتی Expasy به توالی اسید آمینه تبدیل شد. این توالی، کدکننده پپتید توکسینی به میزان ۵۷ اسیدآمینه وزن مولکولی ۶/۴۳۴ KD و نقطه ایزوالکتریک ۵/۱۲ می‌باشد. توالی اسیدآمینه‌ای این پروتئین، از نظر وجود پپتید راهنما مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود این پپتید دارای یک پپتید راهنما با طول ۱۹ اسیدآمینه، پیش پپتید ۴ اسیدآمینه و پپتید بالغ به



جدول ۲. نتیجه همترازی توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده پپتید توکسین *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان.

Accession	Description	Total score	Query Cover	E value	Max ident
EF۴۴۲۰۶۰/۱	<i>Mesobuthus eupeus</i> venom K-toxin (TXKalpha ¹) mRNA.	۳۸۳	%۹۸	۱۰ ^{-۳۰} e	%۹۸
EF۴۴۵۰۸۵/۱	<i>Mesobuthus eupeus</i> venom K-channel toxin (TXKalpha ^۲) mRNA.	۳۷۲	%۹۶	۱۰ ^{-۷۰} e	%۹۷
AF۱۵۳۶۹۴/۱	<i>Mesobuthus martensii</i> putative apamin-Sensitive potassium channel inhibitor Precursor (Kkδ) mRNA.	۳۳۷	%۱۰۰	۸۹ ^{-۳۰} e	%۹۳
AF۱۱۴۰۲۴/۱	<i>Mesobuthus martensii</i> neurotoxin P-۱ (P-۱) mRNA	۳۲۹	%۹۸	۸۷ ^{-۴۰} e	%۹۳
FJ۳۶۰۸۲۰/۱	<i>Buthus occitanus israelis</i> putative Potassium channel toxin Tx۲۰۳ mRNA	۲۶۳	%۹۸	۶۷ ^{-۴۰} e	%۸۸
AF۰۹۵۷۸۱/۱	<i>Buthus martensii</i> toxin BmP-۱ Precursor (BmP-۱) gene	۱۳۰	%۳۶	۲۷ ^{-۵۰} e	%۹۵

نتیجه گرفت که توالی اسیدآمینه‌ای پپتید توکسین عقرب *Mesobuthus eupeus* خوزستان بیشترین شباهت را با توکسین‌های مشابه از عقرب *Mesobuthus eupeus* آسیایی و کمترین شباهت را با توکسین *Lychas mucronatus* دارد.

بر اساس توالی‌های مورد استفاده در همترازی، درخت فیلوژنیک پپتید توکسین به دست آمده از عقرب *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان با استفاده از نرم افزار آنالین ذکر شده ترسیم گردید. همانطور که انتظار می‌رفت Me-alpha^۱ و Me-alpha^۲ مربوط به *Mesobuthus eupeus* آسیایی قرابت بسیار بالایی با پپتید توکسین *Mesobuthus eupeus* بومی خوزستان دارد و در یک دسته قرار می‌گیرند. در حالیکه پپتید مربوط به *Mesobuthus martensii* نزدیک به آن‌ها ولی در دسته دیگر قرار می‌گیرد (تصویر ۴).

بحث

تمام پروتئین‌های ترش‌چی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها دارای بخشی به نام پپتید راهنما هستند. طول و توالی اسیدآمینه‌ای پپتیدهای راهنما بر اساس نوع پروتئین و همین‌طور نوع ارگانسیم متفاوت است (۷). هنگام ساخت یک پروتئین ترش‌چی، مدتی پس از آغاز ساخت پپتید راهنما روی یک ریبوزوم، رشته پروتئین در حال ساخت وارد لومن شبکه آندوپلاسمی می‌شود و طویل شدن پروتئین ادامه می‌یابد. سپس پپتید راهنما از طریق کانال‌هایی وارد غشای سلولی می‌شود. در این حالت سر N-ترمینال پپتید راهنما در ناحیه سیتوزولی و سر C-ترمینال آن درون لومن شبکه آندوپلاسمی است. سپس پپتید راهنما توسط آنزیم سیگنال پپتیداز بریده می‌شود و پروتئین بالغ به خارج از سلول ترشح می‌شود (۱۱). در پژوهش حاضر با توجه به داشتن پپتید راهنما می‌توان چنین استنباط کرد که پپتید توکسین جدا شده از عقرب *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان یک پروتئین ترش‌چی است. همانطور که در تصویر ۶ با ستاره مشخص شده است این پپتید توکسین به همراه پپتید توکسین‌های مشابه در عقرب‌های دیگر دارای ۶ اسیدآمینه سیستئین محافظت شده است که

آن‌ها عددی غیر از صفر است. به این ترتیب می‌توان اسیدآمینه‌های هریک از سه ناحیه h، n و c را تشخیص داد. خط قرمز رنگ که با نام cleavage prob مشخص شده است محل جدا شدن پپتید راهنما توسط آنزیم سیگنال پپتیداز را نشان می‌دهد. در مورد پژوهش حاضر جایگاه برش پپتید راهنمای توکسین عقرب *Mesobuthus eupeus* خوزستان توسط سیگنال پپتیداز بین اسیدآمینه نوزده تریونین (I) و اسید آمینه بیست و یک ایزولوسین (I) قرار دارد.

بر این اساس توالی اسیدآمینه‌ای پپتیدهای راهنما را به ۳ ناحیه تقسیم می‌کنند: ناحیه مربوط به N-ترمینال (ناحیه n)، ناحیه شامل اسیدآمینه‌های هیدروفوب (ناحیه h) و ناحیه مربوط به C-ترمینال (ناحیه c) (۶). پپتیدراهنما در انتهای N-ترمینال خود اسیدآمینه‌های با بار مثبت دارند. بعد از آن اسیدآمینه‌های هیدروفوب قرار دارد که به نظر می‌رسد هنگام ورود به غشای دو لایه، کنفورماسیون مارپیچی آلفا به خود می‌گیرند. همترازی و رسم درخت فیلوژنیک: با توجه به نتایج همترازی اسیدآمینه‌ای پپتید توکسین عقرب *Mesobuthus eupeus* خوزستان با آلفانوروتوکسین ۱- و آلفانوروتوکسین ۲- از *Mesobuthus eupeus* آسیایی در ۱۰۰٪ همپوشانی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸٪ شباهت دارد. این پپتید توکسین با پپتید نوروتوکسین عقرب‌های دیگر مثل *Mesobuthus martensii* در ۸۹٪ و با توکسین مسدودکننده کانال پتاسیمی از *Buthus occitanus israelis* در ۹۱٪ همپوشانی ۹۶٪ شباهت نشان می‌دهد. این پپتید توکسین با گاما-توکسین از عقرب *Hottentotta judaicus* در ۱۰۰٪ همپوشانی به میزان ۸۲٪ شباهت دارد. پپتید توکسین عقرب *Mesobuthus eupeus* خوزستان با آلفانوروتوکسین ۲- از عقرب *Mesobuthus eupeus* آسیایی فقط در یک اسیدآمینه تفاوت دارند که اسید آمینه آرژنین (شماره ۵۱) جانشین لیزین شده است، این در حالی است که این پپتید با توکسین جدا شده از *Mesobuthus martensii* در شش اسیدآمینه تفاوت دارد. این تفاوت‌ها عبارتند از اسیدآمینه‌های ایزولوسین (شماره ۲۱)، آلانین (شماره ۲۹)، تریونین (شماره ۳۰)، گلوتامین (شماره ۴۱)، آسپاراژین (شماره ۴۲)، آلانین (شماره ۴۳) که بترتیب جانشین متیونین، والین، سرین، لیزین، آسپارتیک اسید و گلوتامین شده‌اند. می‌توان چنین



References

1. Benton, T. G. (1991) The life History of *Euscorpis Flavicaudis* (Scorpions, chacidæ). *J Arachnol.* 19: 105-110
2. Farzan pie, R. (1987) *Scorpion Identify.* (1st ed.) Center Publish University. Iran, Tehran.
3. Gwee, M.C., Nirthanan, S., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Cheah, L.S. (2002) Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiology.* 9: 795-801
4. Michael, E.S., Victor, F. (2003) High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpions: Orthosterni). *Euscorpis.* 11: 1-175.
5. Navidpour, Sh., Kovarik, F., Solegland, M.E. Fet, V. (2008) Scorpions of Iran (Arachnida, Scorpions). Part 1: khoozestan province. *Euscorpis.* 65: 1- 41.
6. Nielsen, H., Brunak, S., Heijne, G. (1999) Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.* 12: 3-9.
7. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
8. Nikkiah, M., Naderi-Manesh, H., Taghdir, M., Talebzadeh, M., Sadeghi-Zadeh, M., Schaller, J., Sarbolouki, M. (2006) Cloning, Sequence Analysis and Molecular Modeling of a New Peptide from the Scorpion *Buthotus saulcyi* Venom. *J Biochem Mol Biol.* 39: 284-291.
9. Possani, L.D., Becerril, B., Delepierrre., Tytgat, J. (1999) Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem.* 264: 287-300.
10. Saucedo, A.L., Flores-Solis, D., Rodriguez, D.L. V., Hernandez-Lopez, R. (2012) Structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *J Biol Chem.* 287: 12321-12330.
11. Steven, F.N., Jeffrey I.G. (1989) Eukaryotic signal peptide structure/ function relationships. *J Biol Chem.* 264: 3979-3987.
12. Wang, W.X., Wang, Y.P. Deng, X.J., Dang, X.L., Tian, J.H., Yi, H.Y., Li, Y.F. (2009) Molecular and functional characterization of a c-type lyso-

در ساختار سوم این پروتئین ۳ باند دی سولفید تشکیل می دهد که با اینکار استقرار پروتئین را در فضای سه بعدی میسر می سازد. (۱۰). شایان ذکر است که در توالی اسید آمینه ای این پپتید توکسین در ارگانسیم های دیگری بجز عقرب ها به تعداد ۸ سیستمین بصورت محافظت شده دیده می شود (۱۲). بنابراین پپتید توکسین عقرب *Mesobuthus eupeus* استان خوزستان مشابه توکسین سایر عقرب ها، برخلاف ارگانسیم های دیگر به جای ۴ پیوند دی سولفید، ۳ پیوند دی سولفیدی دارند.

تفاوت توالی پپتید توکسین *Mesobuthus eupeus* بومی خوزستان با توالی آلفانورو توکسین *Mesobuthus eupeus* آسیایی فقط در جایگزینی اسید آمینه لیزین با آرژنین در اسید آمینه ۵۱ است، که این دو اسید آمینه گرچه با هم تفاوت دارند ولی همولوگ یکدیگرند. نکته دیگر شباهت ۱۰۰٪ این پپتید توکسین با آلفانورو توکسین-۱ جدا شده از *Mesobuthus eupeus* آسیایی می باشد. بدین معنی، که هر چند این دو پپتید توکسین در ۱۰۰٪ توالی اسید آمینه ای با هم مشابه هستند ولی در مقایسه توالی نوکلئوتیدی این دو ژن، میزان تشابه ۹۸٪ می باشد (جدول ۲) که بنظر می رسد این تفاوت به خاطر وجود کدون های چندگانه برای رمز یک اسید آمینه است.

نتیجه گیری نهایی: بنابراین گرچه همگی این نورو توکسین ها مهار کننده کانال های پتاسیمی هستند و دامین محافظت شده متعلق به سوپر فامیلی "Toxin"-۶ را دارا می باشند، ولی با توجه به وجود تفاوت ناچیز در توالی نوکلئوتیدی (تشابه ۹۸٪)، می توان چنین نتیجه گیری کرد که این ژن احتمالاً عضو دیگری از آلفانورو توکسین عقرب آسیایی است که متعلق به عقرب *eupeus Mesobuthus* خوزستان می باشد.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از مدیریت محترم آزمایشگاه رفرانس عقرب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی اهواز جناب آقای مهندس تقوی مقدم و کارشناس آن مرکز جناب آقای بیات زاده که در اجرای این پژوهش همکاری داشته اند کمال تشکر و قدر دانی می گردد.

- zyme from the Asian corn born, *ostriniafurnacalis*. *J Insect Sci.* 9: 17
13. Yibao, M., Ruiming, Z., Yawen, H., Songryong, L., Jun, W. (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
 14. Zhu, S., Gao, B., Tytgat, J. (2005) Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSab superfamily. *Cell Mol Life Sci.* 62: 2257-69.



Amplification and Molecular Identification of cDNA sequence coding for a peptide toxin from the venomous gland of the Khuzestan province scorpion *Mesobuthus eupeus*

Hassani Niya, F.^{1*}, Taghi Beigi Nassiri, M.¹, Jolodar, A.², Roshanfekar, H.¹

¹Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Food Industry, Agriculture and Natural Resources University of Ramin Khuzestan, Khuzestan- Iran

²Department of Basic Sciences, Biochemistry and Molecular Biology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran

(Received 17 March 2016, Accepted 1 May 2016)

Abstract:

BACKGROUND: The *Mesobuthus eupeus* scorpion venoms are known to contain α -toxin peptides, many of which interfere with K⁺ ion channel function. These toxin peptides have important value in the pharmacology and physiology studies of specific K⁺ channel of cells. **OBJECTIVES:** Given the lack of information of the molecular biology of peptides in the toxin of Iranian scorpions, the aim of this study is Amplification and Analyses of cDNA sequence coding for a peptide toxin from the venomous gland of the Khuzestan province scorpion *Mesobuthus eupeus*. **METHODS:** Total RNA was extracted from the venom glands of scorpion *Mesobuthus eupeus* collected from Khuzestan province of Iran and then cDNA was synthesized with the modified oligo (dT) primer. By applying the Semi-nested RT-PCR using homologous primers, the fragments of 227 bp were amplified and sequenced. **RESULTS:** The full-length sequence of coding region was 174 bp which contained an open reading frame of 57 amino acids with a predicted molecular mass of 6.434 KDa and theoretical pI of 5.12. It contains a signal peptide of 19, propeptide of 4 and a mature peptide of 34 amino acids. For comparison of this peptide with the similar sequences registered in NCBI database, BLAST program was used. This protein with homology to the "Scorpion toxin-like domain" belongs to the Toxin-6 super family. **CONCLUSIONS:** Multiple alignment of the putative amino acid sequence of this gene exhibited the highest sequence identity with lesser Asian scorpion *M. eupeus* venom potassium channel α -toxin-1. This high sequence similarity indicates that this gene is a member of α -toxin from the Iranian *Mesobuthus eupeus*.

Keyword: α -toxin, K⁺ channel, *Mesobuthus eupeus*, venom, scorpion

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Optimal heat and time table in first and second PCR reaction.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product. right column, 50 bp DNA marker and left column, PCR product.

Figure 2. Analytic graph of existence of signal peptide according to 3 parameters C-score, S-score, Y-score.

Figure 3. Analyze of 3 parameter probability n-region, h-region probability, c-region probability.

Figure 4. Phylogenetic analysis of peptide toxin belong to *Mesobuthus eupeus* scorpion with other scorpion species.

Table 2. Multiple alignment of nucleotide sequence of coding region relating to *mesobuthus eupeus* toxin peptide in khuzestan province.

*Corresponding author's email: Fhassaniniya@yahoo.com, Tel: 071-53722916, Fax: 071-53720066

