جداسازی و شناسائی پروتئین ضدیخ از سن معمولی گندم

Archive of SID

Eurygaster integriceps Put. (Het. Scutelleridae)

Purification and Characterization of Antifreeze Protein from Sunn Pest *Eurygaster integriceps* Put.

احمد بغدادی، عذرا ربانی چادگانی، غلامعباس عبداللهی، سعید محرمی پور

گروه حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۸۰، تاریخ پذیرش: دی‌ماه ۱۳۸۰)

چکیده

پروتئینی با فعالیت ضد یخی از حشره کامل سن معمولی گندم (*Eurygaster integriceps*) جمع‌آوری و در زمستان استخراج و شناسائی گردید. پروتئین ضد یخ با استفاده از اتانل ۵۰ درصد از سن گندم جداسازی و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونیDEAE سفادکس و ژل فیلتراسیون G-100 تخلیص گردید. نوع و درجه خلوص پروتئین‌ها با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE تعیین شد. پروتئین استخراج شده دارای وزن ملکولی حدود ۱۹ kDa و خاصیت ضد یخی با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر، C° ٤/٤٠ تخمین زده شد. این پروتئین در نمونه‌های تابستان سن معمولی گندم وجود ندارد. لذا با توجه به وجود پروتئین ضد یخ در سن گندم احتمالاً این ترکیب نقش حیاتی در زنده ماندن حشره در فصل زمستان می‌تواند داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سن معمولی گندم، پروتئین ضد یخ، جداسازی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حشرات زمستان‌گذران برای مقابله با سرمای زمستان از ترکیبات مختلفی استفاده می‌کنند. این ترکیبات عبارتند از: لیپو پروتیئن‌ها و پروتئین‌های هسته یخ (Ice Nucleating Proteins and Lipoproteins)، ترکیباتی که بطور اتفاقی بعنوان هسته یخ عمل می‌کنند (Incidental Heterogeneous Nucleators)، باکتری‌های هسته یخ، ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی کم (مانند گلیسرول) و پروتئین‌های ضد یخ (Lee, 1990). حشرات زمستان‌گذران بر اساس توانایی زنده ماندن در برابر یخ‌زدن آب بدن به دو دسته تقسیم می‌شوند سری اول گونه‌های حساس به یخ‌زدگی می‌باشند که با یخ زدن آب بافت‌ها و اعضاء بدن از بین می‌روند، سری دوم گونه‌هایی که یخ‌زدگی را تحمل می‌کنند(Lee, 1991).

بطورکلی اکثر حشرات با یخ زدن آب بدن از بین می‌روند، لذا برای این گروه از حشرات جلوگیری از یخ‌زدگی بسیارحیاتی است (Danks, 1978). حشرات فوق با افزایش ظرفیت سرد شدن از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در برابر سرما مقاومت می‌کنند. در حشرات متحمل به یخ زدگی، کریستال‌ها یخ در دماهای حدود $-8^{\circ}C$ تا -10 بصورت خارج سلولی تشکیل شده و داخل سلول از طریق مکانیسم‌های مختلف از یخ‌زدگی در امان می‌ماند (Lee, 1991). در این حالت، حشره انرژی کمتری را برای مقابله با فصل سرما مصرف می‌کند (Leather, *et al.*, 1995). با توجه به شرایط، تعدادی از گونه‌ها می‌توانند از هر دو استراتژی برای مقاومت در برابر سرما استفاده کنند (Fields and McNeil, 1986; Jonstone and Lee, 1990). نحوه استفاده از ترکیبات فوق بستگی به استراتژی مورد استفاده توسط حشره برای مقاومت در برابر سرما دارد (Lee, 1990). پروتئین‌های ضد یخ از حشرات زمستان‌گذران، ماهی‌ها، حلزون‌ها و گیاهان جداسازی و شناسایی شده‌اند (Duman, 1977 a & b; Patterson and Duman, 1978; Patterson, *et al.*, 1981; Tomchaney, *et al.*, 1982; Devrice, 1986; Graham, *et al.*, 1997). محلول‌های حاوی پروتئین‌های ضد یخ بدون تغییر در نقطه ذوب، نقطه یخ‌زدگی را در روشی که وابسته به غلظت نیست (Non-Collegative) پائین می‌برند. این ترکیبات با چسبیدن به سطح کریستال‌های یخ از رشد آن جلوگیری می‌کنند (Hew and Yang, 1992). پروتئین‌های ضد یخ با کاهش نقطه یخ‌زدگی، افزایش ظرفیت سرد شدن و نیز مهار کریستاله شدن مجدد (Recrystallization) و احتمالاً با

www.SID.ir

Archive of SID

پایدار کردن حالت سردشدن فوق‌العاده (Supercooling) حشرات را از سرما حفظ می‌کنند. پروتئین‌های ضد یخ حشرات بر اساس وجود و عدم وجود اسید آمینه سیستئین به دو گروه تقسیم می‌شوند (Duman, *et al.*, 1991). مقدار سیستئین در پروتئین‌های ضد یخ حاوی این اسید آمینه از ۳ مول درصد در یک پروتئین ضد یخ شناخته شده از *Tenebrio molitor* تا ۲۸ مول درصد در دیگر پروتئین ضد یخ این حشره متفاوت است (Schneppenheim and Theede, 1980). همچنین پروتئین‌های ضد یخ حشرات دارای مقدار قابل توجهی اسیدآمینه‌های آب دوست (هیدروفیل) نسبت به پروتئین‌های ضد یخ ماهی‌ها هستند. در این میان پروتئین ضد یخ *Oncopletus fasciatus* با ۳۰/۵ مول درصد سرین یک نمونه منحصر به فرد است (Patterson, *et al.*, 1981). امروزه با اینکه مطالعات وسیعی در زمینه‌های گوناگون سن گندم انجام شده (Shinyaeva, 1980 ; Brown, 1962; Radjabi, 1993, 2000 ; Sadikova, *et al.*, 1986; Staddon, *et al.*, 1994). اما در مورد وجود و یا عدم وجود پروتئین ضدیخ در این حشره مطالعاتی انجام نگرفته است. با توجه به اینکه در بسیاری از مناطق کشور سن گندم زمستان را در ارتفاعات که معمولاً سردتر از دشت می‌باشد می‌گذراند، لذا بررسی عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت به سرما ضروری بنظر می‌رسد. به همین خاطر در این تحقیق پروتئین‌های سن گندم در محدوده زمانی تابستان و زمستان جداسازی و از نظر فعالیت ضد یخی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی

۱- نمونه برداری

حشرات کامل سن گندم از ارتفاع ۲۳۰۰ متر (از سطح دریا) از کوهستان‌های آتشگاه واقع در شمال کرج طی تابستان (مرداد) و زمستان (دی‌ماه) ۱۳۷۸ جمع‌آوری شد. بدین منظور حشرات کامل از زیر بوته‌های مختلف مخصوصاً گونه‌های (*Astragalus* spp.) بطور تصادفی جمع‌آوری و بلافاصله بعد از انتقال به آزمایشگاه در ازت مایع نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۲- ا ندازه گیری دما

میزان دمای روزانه طی ماه‌های آخر پائیز و زمستان ۱۳۷۸ با قرار دادن دستگاه ثبات دما و رطوبت در زیر یک بوته گون در ارتفاع ۲۳۰۰ متری(محل جمع‌آوری نمونه) ثبت می‌شد.

۳ - استخراج پروتئین ضد یخ

از روش Tomchaney, *et al.* (1982) جهت استخراج پروتئین ضد یخ استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از حشرات کامل سن گندم جمع‌آوری شده طی زمستان و تابستان بطور جداگانه به مدت دو دقیقه با ۲۵۰ میلی لیتر اتانل ۵۰ درصد در دمای ٤°C با استفاده از هموژنایزر مدل MSE با سرعت متوسط هموژنیزه شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Clin-Cool) سانتریفوژ گردید. محلول رویی جمع‌آوری و رسوب برای بار دوم و سوم با حل در ۱۵۰ میلی لیتر اتانل ۵۰ درصد مانند قبل هموژن و سپس سانتریفوژ شد. در نهایت محلول‌های رویی حاصله با هم مخلوط و با استفاده از کیسه‌های دیالیز با اندازه ۱۲۰۰۰ دالتون به مدت یک شب در دمای ٤ °C در مقابل آب مقطر دیالیز شدند. نمونه‌های داخل کیسه و محلول پیرامونی با استفاده از دستگاه فریزدر ایر خشک و پروتئین‌های حاصله در دو قسمت در مقدار مناسب آب مقطر با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر حل و خاصیت ضد یخی اندازه گیری شد.

۳-۱- جداسازی پروتئین‌های استخراج شده

جهت تفکیک اجزاء پروتئینی مذکور از روش کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion-Exchange) استفاده گردید. بدین نحو که محلول پیرامونی خشک شده نمونه‌های زمستانه (دارای خاصیت ضد یخی) و تابستانه با حل در بافر ۵۰ میلی مولار تریس اسیدی (pH=8) روی ستون DEAE سفادکس G25 با اندازه ۲۵×۲۵۰mm کروماتوگرافی گردید. اجزاء حاصله با سرعت ۰/٦ میلی لیتر در دقیقه با حجم ۳ میلی لیتر بوسیله فراکشن کالکتور جمع‌آوری شد. از گرادیان نمک طعام از صفر تا ۰/۵ مولار در بافر تریس ۵۰ میلی مولار جهت گسستن و پائین آوردن نمونه استفاده شد. میزان جذب اجزاء حاصله در طول موج ۲۳۰ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر (مدل Shimadzu uv-260) خوانده شد (بطور کلی پروتئین‌های ضد یخ دارای

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر بسیار کمی‌اسیدهای آمینه آروماتیکی هستند ویا فاقد آنها می‌باشند). اجزائی کـه پیک‌هـا را بوجود آوردند بوسیله دستگاه فریزردرایر تغلیظ و با اسـتفاده از کیسـه‌های دیـالیز بـا انـدازه ۳۵۰۰ دالتون برای جذب نمک به مدت یک شب دیالیز شدند و مجدداً خشک گردیـد. اجـزاء حاصله در آب مقطر حل و در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیـتر خـاصیت ضـد یخـی انـدازه گرفته شد.

۳-۲- تخلیص جدایه پروتئینی IV

۵ میلی گرم از جدایه IV حا صل از ستون DEAE سفادکس نمونـه زمسـتان در بـافر ۰/۱ مولار تریس حاوی ۰/۱ مول نمـک طعـام حـل و بـا اسـتفاده از سـتون سـفادکس G-100 (۲۰× ۹۲۰ mm) کروماتوگرافی گردید. ستون با سـرعت ٦ میلـی لیـتر در سـاعت شسـته شـد. اجزاء حاصله با حجم ۵ میلی لیـتر جمـع‌آوری و جـذب آنـها در ناحیـه ۲۳۰ نـانومتر خوانـده شد.جدایه حاصله جمع‌آوری و بعد از خشک کردن، جهت حـذف نمـک بـر علیـه آب مقطـر دیالیز و مجدداً خشک گردیدوخاصیت ضد یخی با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلـی لیـتر انـدازه گیری شد.

٤- تعیین نقطه یخ زدگی و نقطه ذوب

برای اندازه گیری خاصیت ضد یخی (Thermal hysteresis، نقطـه ذوب منـهای نقطـه یخ زدگی) پروتئین‌های سن گندم، از روش تغییر یافته دورایس استفاده شـد (Devries, 1986). برای اندازه گیری نقطه ذوب ۵ میکرولیـتر از محلـول حـاوی پروتئیـن داخـل لولـه موئیـن۱۰ میکرولیتر وارد شد، سپس لوله موئین داخل ظرف حاوی اتانل سرد شده قرار گرفت تـا نمونـه کاملاً یخزد. لوله موئین داخل محفظه شیشـه‌ای کـه در آن اتیلـن گلیکـول سـرد شـده بوسـیله دستگاه Thermostaltic (مدل Multitemp II, LKB221) در جریـان بـود قـرار گرفـت (در ضمـن تغییرات وضعیت نمونه بوسیله بینوکولر ZEISS نیز بررسی می‌شد). دما طوری تنظیـم گردیـد که در هر دقیقه ۰/۰۲ درجه سانتیگراد افزایش می‌یافت. دمایی که در آن آخریـن کریسـتال یـخ محو می‌شد، بعنوان نقطه ذوب ثبت گردید. در آزمایش دیگر انتهای لوله موئین حاوی پروتئیـن در اتانل سرد شده وارد، بعد از ایجاد تکه کوچکی یخ، در محفظه شیشه‌ای گذاشته شد. دمـای

www.SID.ir

Archive of SID

محفظه شیشه‌ای در هر دقیقه ۰/۰۵ درجه سانتیگراد کاهش می‌یافت دمایی که یخ تشکیل شد بعنوان نقطه یخ زدگی پروتئین تعیین گردید.

۵- تعیین وزن مولکولی پروتئین ضد یخ

از روش الکترفورز Lammeli (1970) بر روی ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) استفاده شد. ژل از دو قسمت جدا کننده (Separating gel) با غلظت ۱۵ در صد آکریل آمید و ژل توده کننده (Stacking gel) با غلظت ٤ در صد آکریل آمید تشکیل شده است. ژل جدا کننده حاوی ۱۵ در صد آکریل آمید، ۰/۰۳۷٦ مولار تریس بازی (pH =۸/۸)، یک درصد SDS و ۰/۰۲۵درصد TEMED است. ترکیبات مزبور با هم مخلوط سپس pH در ۸/۸ تنظیم شد، سپس آمونیوم پرسولفات با غلظت ۰/۱ درصد به محلول اضافه و برای پلی‌مریزه شدن وارد صفحات شیشه‌ای گردید. ژل با اندازه Cm ۷×۷ و قطر ۱/۵ تا ۲ میلی متر بدست آمد. ژل توده کننده دارای ٤ درصد آکریل آمید، ۰/۱۲۵ مولار تریس بازی (pH=6.8) و ۰/۱ در صد SDS است. ژل جدا کننده نیز با اضافه کردن آمونیوم پرسولفات ۰/۱ در صد پلی‌مریزه گردید.

بافر الکترود حاوی ۰/۰۲۵ مولار تریس بازی، ۰/۱۹۲ مولار گلایسین، ۰/۱ در صد SDS می‌باشد که حجم نهایی محلول توسط آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و pH آن در ۸/۳ تنظیم گردید.

پروتئین ضد یخ با تری کلرواسید استیک ۱۰ درصد رسوب داده شد. برای الکتروفورز مقدار معینی از نمونه‌های پروتئین در مقدار مشخصی بافر حاوی ۰/٦۲۵ مولار تریس اسیدی، ۱۰ در صد گلیسرول، ۲ در صد SDS ، ۵ در صد مرکاپتوتانول، ۰/۰۰۱ در صد برموفنل بلو با pH =٦/۸ حل شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و شدت جریان متغیر به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت انجام شد. پس از گذشت زمان لازم ژل از بین صفحات شیشه‌ای خارج گردید.

ژل با کوماسی بریلیانت بلو R_{250}، یک گرم در لیتر، متانل ۵۰ درصد و اسید استیک ۷ درصد رنگ آمیزی شد. برای رنگ بری از محلول ۱۰ درصد متانل و ۱۰ درصد اسید استیک

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد. از ژل‌های رنگ آمیزی شده عکس تهیه گردید. همچنین از پروتئین‌های شناساگر برای تعیین وزن مولکولی استفاده گردید.

٦- سنجش پروتئین

برای سنجش مقادیر کمی پروتئین‌های استخراج شده از روش تغییر یافته لوری (Hartrley, 1970) استفاده گردید. ابتدا محلول‌های A، B، C لوری بصورت زیر تهیه گردید

محلول A: ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات همراه با۱۰۰ گرم کربنات سدیم در ۵۰۰ میلی لیتر هیدورکسید - سدیم یک نرمال حل شده سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

محلول B : ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات با ۱ گرم سولفات مس آبدار در ۹۰ میلی‌لیترآب حل شده و به آن ۱۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال اضافه گردید.

محلولC: یک حجم از معرف Folin and Ciocalteu's و ۱۵ حجم آب مقطر مخلوط گردید (این محلول روزانه تهیه و استفاده شد).

در ادامه پروتئین سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albomin) بعنوان استاندارد با غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. سپس غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱،۰/۳، ۰/۵، و۰/۷میلی گرم درمیلی لیتر ازپروتئین BSA با آب مقطر به حجم یک میلی لیتر رسانده شد . از نمونه در مراحل مختلف استخراج (بعد از دیالیز اول وپیک‌های مختلف DEAE) با غلظت نا معینی برداشته و به حجم یک میلی لیتر رسید. آب مقطر بعنوان شاهد با حجم یک میلی لیتر انتخاب شد، مراحل بعدی بصورت زیر انجام گرفت:

به هر کدام از نمونه‌ها و نیز آب مقطر، ۰/۹ میلی لیتر از محلول A اضافه و با ورتکس مخلوط گردید. سپس در حمام آب گرم ۵۰°C بمدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از آن دمای نمونه‌ها به دمای اتاق رسانده شد و به هر لوله ۰/۱۵ میلی لیتر از محلول B اضافه شده و بعد از مخلوط شدن بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به هر لوله سریعاً ۳ میلی لیترمحلول C اضافه و بمدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰°C گذاشته شد بعد دمای نمونه‌ها به دمای اتاق رسانده شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول

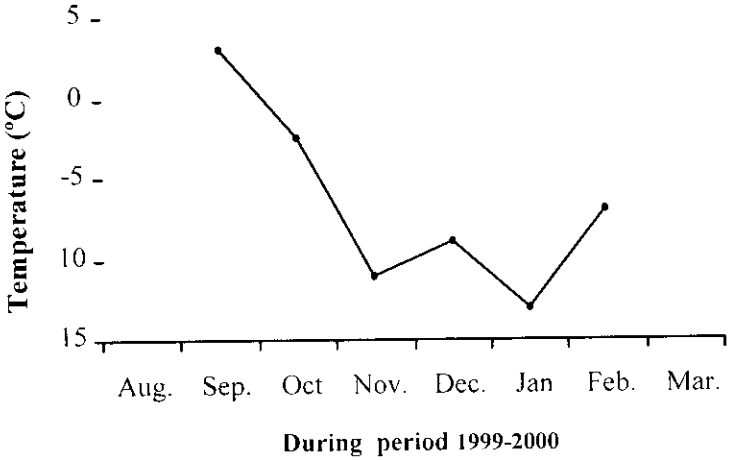
www.SID.ir

Archive of SID

موج ٦٥٠ نانو متر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردیـد. بـا توجـه بـه جـذب نمونـه‌ها، غلظت آنها از روی منحنی استاندارد تعیین گردید.

نتیجه و بحث

حداقل دمای محیط از آبان تا اسفند ۱۳۷۸ در (شکل ۱) نشان داده شده اسـت. دمـای محیط طی این مدت به اندازه‌ای سرد بوده تا در صورت تولید پروتئیـن ضـد یـخ توسـط سـن گندم آن را القاء نماید. حداقل دمای مشاهده شده ۱۳ °C – در دی مـاه بـوده اسـت و میـانگین رطوبت نسبی حدود ۵۰ درصد و نسبتاً ثابت بود.



شکل ۱، حداقل دمای محیط در ارتفاع ۲۳۰۰ متر آتشگاه -کرج از شهریور تا اسفند ۱۳۷۸.

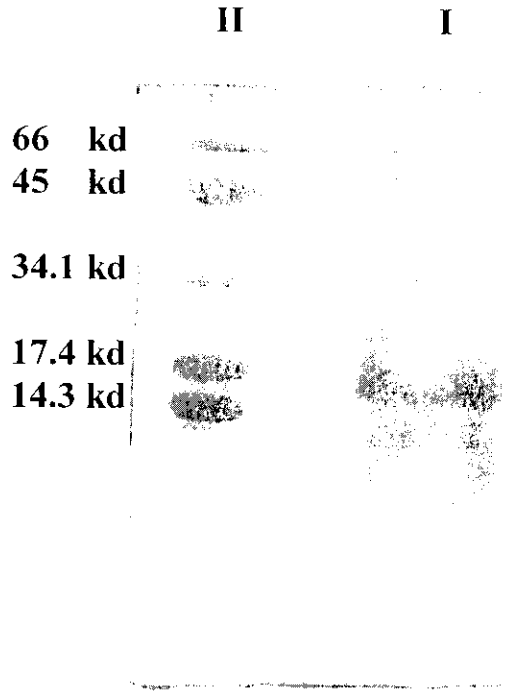
Fig. 1, Minimum temperature of natural conditions in altitude of 2300 m Atashgah Karaj-Iran, in 1999-2000.

پروتئین‌های سن گندم محلول در اتانل ۵۰ درصد با استفاده از روش اسـتخراج تهیـه و خاصیت ضد یخی نمونه ناخالص اندازه‌گیری گردید. با توجه به اینکه نمونـه پـیرامونی دیـالیز

www.SID.ir

Archive of SID

شده دارای خاصیت ضد یخی بود، نمونه به وسیله دستگاه فریزر درایر خشک گردید و ژل SDS-PAGA تهیه شد. چنانکه در (شکل ۲) دیده می‌شود این قسمت دارای پروتئین‌های متعددی است. مقدار پروتئین در این مرحله بر اساس روش سنجش پروتئین



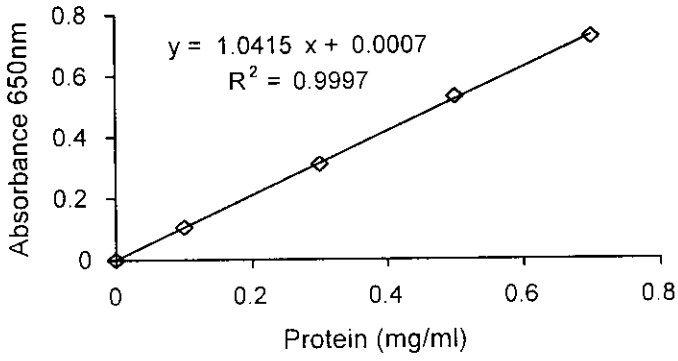
شکل ۲، طرح الکتروفورزی پروتئین‌های محلول پیرامونی حاصل از دیالیز (I) و پروتئین‌های استاندار وزن مولکولی (II).

Fig. 2, Electrophoretical profile of dialysate proteins (I) and standard molecular weight proteins (II).

لوری ۳۰۰ میلی گرم بدست آمد (شکل ۳). لذا برای خالص سازی بعد از حل کردن نمونه در بافر تریس ۵۰ میلی مولار روی ستون DEAE سفادکس کروماتوگرافی شد (شکل ٤). کروماتوگرام چهار پیک را نشان داد که به ترتیب IV-I نام‌گذاری شدند. نمونه‌های پیک IV-I

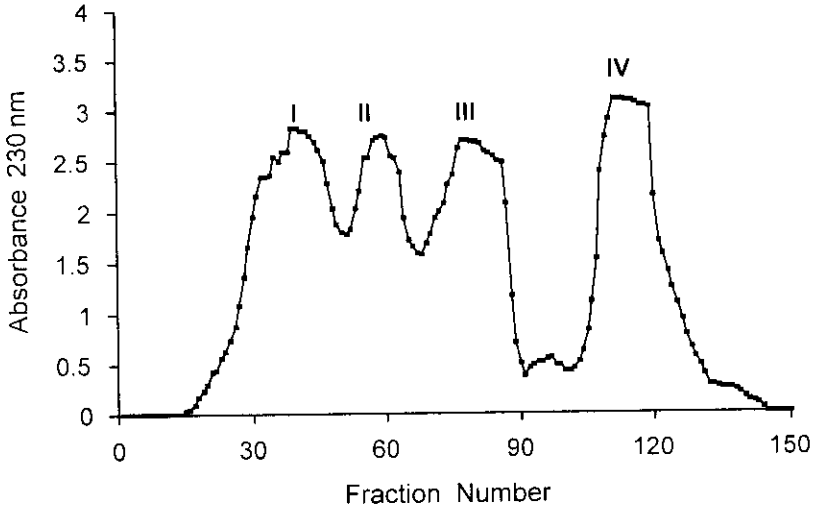
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳، منحنی استاندارد پروتئین سرم آلبومین گاوی با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی گرم در میلی‌لیتر برای سنجش پروتئین‌های محلول پیرامونی حاصل از دیالیز و پروتئین ضد یخ سن گندم.

Fig. 3. Standard protein curve of Bovine Serum Albumin (BSA) prepared in 0.05, 0.3, 0.5 and 0.7 mg/ml to measure Dialysate proteins and antifreeze protein of Sunn pest.



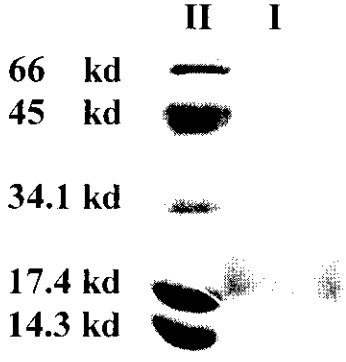
شکل ٤، کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی DEAE سفادکس، ۳۰۰میلی‌گرم پروتئین استخراج شده با اتانل از نمونه‌های سن گندم جمع‌آوری شده در فصل زمستان ۱۳۷۸. فقط جدایه IV دارای خاصیت ضد یخی می‌باشد.

Fig. 4. Chromatogram obtained when 300 mg of the ethanol fraction was chromatographed on DEAE Sephadex column (20×250 mm) in 0.05 M tris buffer (pH 8.0), in winter 2000. Peak IV contains thermal hysteresis activity.

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری و پس از خشک کردن و حل نمودن در آب با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر، فعالیت ضد یخی اندازه‌گیری گردید. بررسی فعالیت نشان داد که از بین چهار پیک، فعالیت ضدیخی فقط در پیک شماره IV مشاهده می‌شود که به میزان $^{\circ}C$ ۳/۸ بود. در مقایسه، بقیه پیک‌ها فاقد فعالیت ضد یخی بودند. مقدار پروتئین جدایه دارای خاصیت ضد یخی بر اساس روش سنجش پروتئین لوری ۵ میلی گرم بدست آمد (شکل ۳). کروماتوگرام مشاهده شده برای نمونه سن گندم از نظر تعداد جدایه تقریباً مشابه کروماتوگرام ارائه شده برای *Tenebrio molitor* می‌باشد(Tomchaney, *et al.*, 1982; Schneppenheim and Theede, 1980) فعالیت ضد یخی مشاهده شده در سایر حشرات به طور میانگین $^{\circ}C$ ۳-۵ گزارش شده است (Duman, *et al.*, 1991). که در مقایسه با پروتئین‌های ضد یخ ماهی‌ها با حدود $^{\circ}C$ ۲/۲ ،خاصیت ضد یخی بیشتر است (Devries, 1971). به طوری که ملاحظه می‌شود فعالیت ضد یخی پروتئین ضد یخ در سن گندم نیز در محدوده فوق قرار می‌گیرد. جهت تعیین میزان خلوص و نوع پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. طرح الکتروفورزی در (شکل ۵) نشان داده شده است. جهت تعیین وزن مولکولی از شناساگر وزن

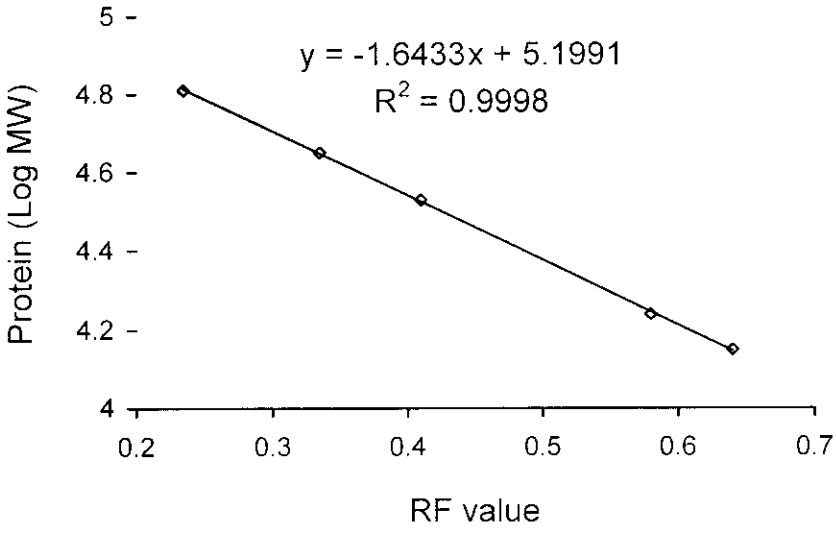


شکل ۵، طرح الکتروفورزی پروتئین ضد یخ (I) و پروتئین‌های استاندار وزن مولکولی (II)

Fig. 5. Electrophoretical profile of antifreeze protein (I) and standard molecular weight proteins (II)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦، مقادیر RF محاسبه شده برای پروتئین‌های استاندارد بـه منظـور تعییـن وزن مولکولـی پروتئین ضد یخ سن گندم

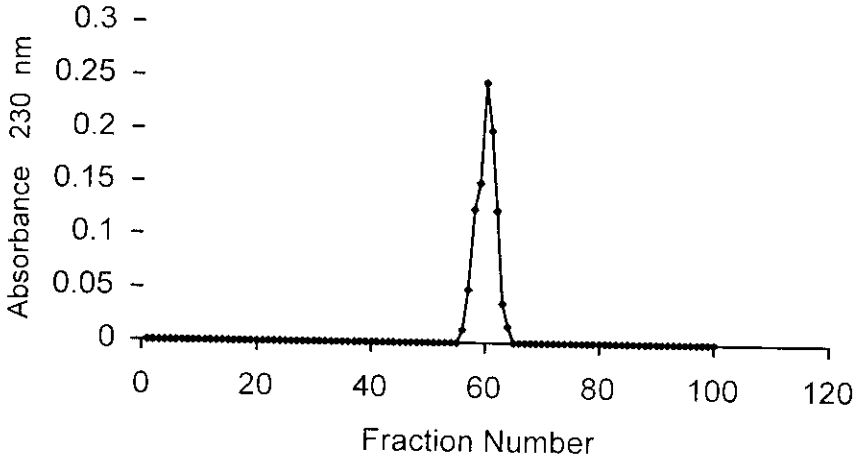
Fig. 6. RF values of standard proteins to determine molecular weight of antifreeze protein of sunn pest.

مولکولی kDa ٦٦-١٤ استفاده و بصورتی که در (شکل ٦) مشاهده می‌شود پروتئین مورد نظـر وزن مولکولی حدود kDa ١٩ را نشان داد. جهت اطمینان ازخالص بودن نمونه پیـک IV بـر روی ستون ژل فیلتراسیون سفادکس با خصوصیاتی کـه در بخـش روش‌هـا بـدان اشـاره شـد کروماتوگرافی گردید. بطوری که در (شکل ٧) مشاهده می‌شود پروتئین فقط یک پیک را نشـان می‌دهد که فعالیت ضد یخی حدود °C ٤/٤ را داشت.

جـهت مقایسـه پروتئین‌هـای سـن گنـدم در دوره تابسـتان نـیز در شـرایط مشـابه پروتئین‌های محلول در اتانل از سن گندم جداسازی و به وسـیله سـتون DEAE سـفادکس بـه اجزاء مربوطه تفکیک شدند. (شکل ٨) طرح کروماتوگرام نمونـه تابسـتان را نشـان می‌دهـد. همانطور که مشهود است در این حالت سه پیک اصلی I - III وجود دارد و پیک IV کامـلاً

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷، کروماتوگرام بدست آمده زمانیکه ۵ میلی‌گرم از پیک IV کروماتوگرام DEAE سفادکس (شکل ۲)، روی ستون ژل فیلتراسیون G-100 (۲×۹۲ سانتی متر) در تریس ۰/۱ مولار (pH=8) با ۰/۱ مولار نمک طعام گذاشته شد.

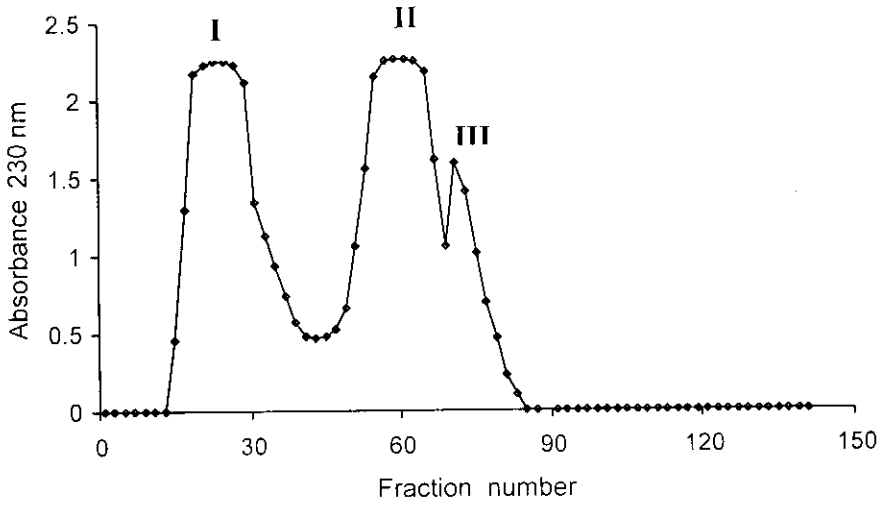
Fig. 7. Chromatogram obtained when 5 mg from peak IV of the previous DEAE Sephadex (Fig. 4) was chromatographed on Sephadex G-100 column (2×92 cm) in 0.1 M tris buffer (pH 8.0) containing 0.1 M Nacl.

غایب است. اندازه‌گیری فعالیت ضد یخی مطابق آنچه برای نمونه‌های زمستان ذکر شد، هیچ یک از نمونه‌های پیک‌های I تا III فعالیت ضد یخی از خود نشان ندادند.

تاکنون پروتئین‌های ضد یخ از گروه‌های مختلف حشرات که به راسته‌های متفاوت تعلق دارند شناسایی شدند (Duman, *et al.*, 1991). از راسته ناجوبالان (Heteroptera) فقط از *O. fasciatus* یک پروتئین ضد یخ شناسایی شده است (Patterson, *et al.*, 1981). با توجه به استراتژی مقاومت به سرما در سن گندم، نقش پروتئین ضد یخ شناسایی شده حیاتی می‌باشد. یعنی در حالت یخ زده با مهار کریستالـه شدن مجدد و نیز حفظ داخل سلول از مرگ حشره

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸، کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی DEAE سفادکس، ۳۰۰میلی گرم پروتئین استخراج اتانلی نمونه‌های سن گندم جمع‌آوری شده در فصل تابستان ۱۳۷۸.

Fig. 8, Chromatogram obtained when 300 mg of the ethanol fraction was chromatographed on DEAE Sephadex column (25×250 mm) in 0.05 M tris buffer (pH 8.0). None of peak contains thermal hysteresis activity.

جلوگیری کرده و در حالت خشک نیز با افزایش ظرفیت سرد شدن حشره را از سرمای زمستان در امان نگه می‌دارد. از طرف دیگر عدم وجود این ترکیب در تابستان و وجود آن در زمستان و نیز میزان خاصیت ضد یخ نسبتاً بالا (٤/٤° C) در زنده ماندن حشره بسیار مؤثر است. این که این پروتئین چه خصوصیاتی دارد. خصوصیات بیوشیمیایی آن چیست و یا اینکه درکدام بخش از بدن حشره وجود دارد وسایر سؤالات مربوط به آن مواردی هستند که در دست انجام بوده و روشن شدن نقش این پروتئین در تحولات فیزیولوژیکی بدن حشره می‌تواند اطلاعات مفیدی را به دست دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

از همکاری‌های بی‌دریغ آقای مهندس علی محمدی‌پور در جمع‌آوری سن گندم از ارتفاعات آتشگاه کرج تشکر و قدردانی می‌گردد.

نشانی نگارندگان: مهندس احمد بغدادی، گروه حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، صندوق پستی ۱۱-۱٤۱۱۵، دکتر عذرا ربانی چادگانی، مرکز تحقیقات بیوشیمی‌و بیوفیزیک دانشگاه تهران، دکتر غلامعباس عبداللهی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران، دکتر سعید محرمی‌پور، گروه حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱٤۱۱۵.

www.SID.ir