

مطالعه عملکرد فیزیولوژیک پپتیدهای ضد انجماد جداسازی شده

از حلزون دریایی *Peronia peronii*

محمد امیر بی‌تعب¹، جمیله پازوکی²، سید امید رعنائی سیادت³

1-دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

2-دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. pazooki2001@yahoo.com

3-دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: 93/4/28 تاریخ پذیرش: 94/5/25

چکیده

مقدمه و هدف: مطالعه حاضر بر روی حلزون دریایی *Peronia peronii* که جزو حلزون‌های واقعی (*Real slugs*) و فاقد صدف بوده انجام شده است. هدف از این تحقیق بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی این موجود از جمله مقاومت در برابر سرما می‌باشد.

روش کار: نمونه برداری در بهار 1391 از سواحل جنوبی جزیره قشم انجام و نمونه‌ها به منظور استخراج پپتیدها با کمترین تغییر از حالت طبیعی به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از جدا کردن امعاء و احشاء، بافت پوست و عضله حیوان در حضور نیترژن مایع هموژن شد. پس از استخراج عصاره پروتئینی و عبور آن از فیلتر 10 کیلو دالتونی، از کروماتوگرافی مایع-فاز معکوس RP-HPLC به منظور تخلیص پپتیدها استفاده شد.

یافته‌ها: در بین اجزاء جدا شده، یکی از فرکشن‌ها دارای خصوصیات ضد انجماد بود. نتایج نشان داد این جزء دارای نقطه انجماد $-41/2$ ، ذوب $-23/5$ و جوش $84/4$ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این نتایج با نمونه کنترل که سرم آلبومین گاوی بود، اختلاف زیادی داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد حضور این دسته پپتیدها در گونه‌ای که پراکنش جهانی دارد به افزایش تحمل جانور در فصل زمستان کمک به سزایی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *Peronia peronii*، حلزون دریایی، پپتیدهای ضد انجماد، RP-HPLC، خلیج فارس.

مقدمه

دنیا به جز قطب شمال و جنوب یافت می‌شوند (14)، جمعیت‌های زیادی از آن‌ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام و دریای مدیترانه وجود دارد (25). اغلب در نواحی بین جزر و مدی سواحل صخره‌ای، ماسه‌ای و گلی (در معرض بادهای زمستانی) زندگی می‌کنند (1) و جزء حلزون‌های واقعی (*true slug*) هستند که پوسته آهکی (*shell*) ندارند. حالت هرمافرودیت پروتو آندروس (*Protandrous hermaphrodite*) بدین معنا است که پس از بلوغ ابتدا بیشتر افراد دارای رفتار جنس

حلزون‌های خلیج فارس و دریای عمان از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در این بین حلزون با نام علمی *Peronia peronii* (*Onchidium peronii*) (7)، متعلق به شاخه *Mollusca* رده *Gastropoda*، زیر رده *Heterobranchia*، بالا رده *Pulmonata*، راسته *Systellommatophora* و خانواده *Onchidiidae* به دلیل این که فاقد صدف می‌باشد و در هنگام جزر خارج از آب و در معرض وزش باد قرار می‌گیرد، در مطالعه حاضر دارای جذابیت است. گونه‌های مختلف این خانواده در بیشتر مناطق

موجودات است. وقتی آب، که بخش اعظم بدن موجود را تشکیل می دهد، در معرض یخ زدن قرار گیرد، موجود زنده با شرایط ویژه ای روبه رو می شود. گونه های خونسرد که بیشتر تحت تاثیر دمای محیطی پایین قرار می گیرند از سه استراتژی مهم برای حفاظت از آسیب های ناشی از دمای پایین بهره می برند: (1) جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ درون و خارج سلول های بدن، که به آن عدم تحمل سرما (*freezing intolerance*) می گویند که برای آن به مناطق عمیق تر آب می روند (3). (2) بروز واکنش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مناسب پس از تشکیل کریستال های یخ، که به آن مقاومت سرمایی (*freezing tolerance*) می گویند. (3) کشف پروتئین های ضد انجمادی (*antifreeze proteins*)، زمانی آغاز شد که دانشمندان به این نکته توجه کردند که ماهیان قطب علی رغم دمای زیر صفر قادر به ادامه حیات هستند پس می بایست علاوه بر املاح، ترکیب دیگری در خون خود داشته باشند که از یخ زدن بدن آن ها جلوگیری کند (15). مطالعات بیشتر در این زمینه، وجود برخی پروتئین ها در خون ماهیان مناطق سرد که از یخ زدن مایعات بدن جلوگیری می کرد را اثبات کرد (26، 9). وظیفه پروتئین های ضد انجماد جلوگیری و کنترل رشد کریستال های یخ تا یک نقطه معین است، که از منجمد شدن جلوگیری می کنند. مکانیسم دقیق عملکرد پروتئین های ضد انجماد کاملاً مشخص نشده است. قابل قبول ترین مکانیسم پیشنهاد شده توسط Cheng (2003) مطرح شد که در آن پروتئین های ضد انجماد از طریق پیوندهای هیدروژنی به یخ متصل می شوند (6). هنگامی که آب منجمد می شود یک مولکول آب با ایجاد پیوندهای هیدروژنی با سه مولکول آب تشکیل ساختار شش وجهی می دهند. اما هنگامی که پروتئین ها به مولکول های آب متصل می

نر بوده و با افزایش اندازه رفتارهای جنس ماده نیز در آن ظاهر می شود و در تمام دوره زندگی این حالت در آن ها باقی می ماند (2). فقدان پوسته آهکی، جانور را در معرض شکارچیان و انواع استرس های محیطی از جمله خشک شدن سطح، جذب گرمای زیاد از نور خورشید و بالا رفتن دمای بدن، کاهش دمای بدن در زمستان، حمله انواع عوامل بیماری زا و غیره قرار می دهد. اما تولید موکوس موجب شده است این جاندار مقاومت قابل توجهی را در برابر این عوامل استرس زا نشان دهد. این موکوس ترشحاتی حاوی موادی با طعم غیر مطبوع است که مانع شکار شدن آن ها توسط سایر موجودات می گردد (18). این مواد از سلول های تخصص یافته موجود در پوست به نام غدد رپوگناتوریل (*Repugnatorial*) ترشح می شوند که به غدد دفاعی نیز مشهور می باشند (19). این مواد حاوی ایزومرهای پلی پروپیونات (*Polypropionate*) و مواد اسیدی هستند که نقش دفاعی و بد مزه شدن موجود را دارند (8). گونه *P. peronii* نیز دارای غدد رپوگناتوریل است که تاکنون ترکیبی به نام *I peroniatriol* از آن استخراج و شناسایی شده است. این ترکیب دارای LC_{50} در حدود 5/5 میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. با این وجود، این گونه توسط برخی افراد محلی پس از کندن پوست که حاوی غدد است، به عنوان غذا مصرف می گردد (14). از طرفی پپتیدها و پروتئین های موجود در بخش های مختلف بدن موجودات نیز دارای نقش یا نقش های خاص و منحصر به فرد می باشند. این بیومولکول ها از توالی زنجیر مانند اسیدهای آمینه تشکیل شده اند که با پیوندهای پپتیدی به یک دیگر متصل شده اند. از این دسته می توان به پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی اشاره کرد که در بسیاری از موجودات از جمله بی مهرگان گزارش شده است (10). دما فاکتوری مهم برای زندگی و بقای

دالتون) و 4 نوع پروتئین ضد انجمادی در ماهیان، 1 نوع در حشرات و 1 نوع در گیاهان شناسایی شده است (جدول 1) (22، 11، 9).

شوند این ساختار حالت استوانه‌ای و هرمی ایجاد کرده و از رشد کریستال‌های یخ جلوگیری می‌کند. تاکنون 8 نوع گلیکوپروتئین ضد انجماد از خانواده روغن ماهیان قطب شمال (دامنه‌ی وزن مولکولی 2/6-34 کیلو

جدول 1- انواع پروتئین‌های ضد انجمادی (22، 11، 9).

گونه‌ها	وزن مولکولی دالتون (Da)	پروتئین ضد انجمادی
<i>Righteye flounder, Sculpins و Winter flounder</i>	3300-4500	نوع I- ماهی
<i>Sea raven, Rainbow smelt و Atlantic herring</i>	11000-24000	نوع II- ماهی
<i>Eel pouts</i> مانند <i>Macrozoarces americanus</i>	6500	نوع III- ماهی
<i>Longhorn sculpin Myosocephalus octodecimspinosus</i>	12000	نوع IV- ماهی
<i>Winter rye</i>	16000-35000	نوع گیاهی
<i>Spruce budworm, Choristoneura fumiferana, Dendroides canadensis و Mealworm beetle</i>	-	نوع حشره

مواد و روش‌ها

مکان و زمان نمونه برداری

نمونه برداری از مناطق صخره‌ای بین جذر و مدی سواحل جنوبی جزیره قشم، اسکله روستای سلخ (10/49 55° 43 شرقی و 26° 40 58/95 شمالی) در اردیبهشت ماه سال 1391 انجام پذیرفت.

پارامترهای محیطی

برخی پارامترهای محیطی از جمله دمای هوا، دما و شوری آب با استفاده از دماسنج و شوری سنج و هم-چنین با کمک آمار ایستگاه هواشناسی قشم و چابهار مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج عصاره

ابتدا با استفاده از اسکالپل برشی طولی در سطح پشتی نمونه‌ها ایجاد و کلیه امعاء و احشاء حیوان خارج گردید (17)، سپس پوست و عضلات را داخل هاونگ قرار داده و نیتروژن مایع روی آن ریخته و به سرعت له گردید. پودر حاصل با استفاده از دستگاه هموژنایزر و محلول آب و استیک اسید به نسبت 95 به 5 در دمای 4

با وجود ساختارهای مشابه، همه پروتئین‌های ضد انجماد یک وظیفه مشابه را انجام می‌دهند، این پروتئین‌ها کریستال‌های یخ را تشخیص داده، به آن‌ها متصل شده و مانع از رشد کریستال‌های یخ در محدوده دمایی زیر صفر، جایی که موجود در آن‌جا زندگی می‌کند، می‌شود. پروتئین‌های ضد انجماد اسمولالیتت مایعات داخلی موجود را افزایش داده و هم‌چنین اثر خود را روی دمای انجماد نشان می‌دهند. لذا استرس دمایی میزان دمایی است که این پروتئین‌ها می‌توانند نقطه انجماد مایعات بدن را کاهش دهند. به طور معمول این میزان محدوده‌ای بین 0/75 تا 1/4 درجه سانتی-گراد است که از انجماد بدن در دمای زیر صفر (1/75- تا 2/4- درجه سانتی‌گراد) و یا حتی پایین‌تر جلوگیری می‌کند (6). تاکنون مطالعه‌ای بر روی فیزیولوژی گونه *P. peronii* در سواحل جنوبی ایران انجام نشده است لذا هدف از این تحقیق، مطالعه پپتیدهای ضد انجماد و نقش فیزیولوژیکی آن در حلزون دریایی *P. peronii*، در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد.

پپتیدها تشکیل نمی شود و اغلب پس از رنگ آمیزی به صورت هاله پروتئینی (*smear*) دیده می شوند. این آزمایش توسط دستگاه *Bio rad* و با ولتاژ 100 ولت انجام پذیرفت.

بررسی خصوصیت ضد انجمادی

پس از جداسازی اجزاء مختلف حاصل از عصاره پوست و عضله (مخلوط پروتئینی زیر 10 کیلوالتون) با استفاده از دستگاه *HPLC*، مشاهده شد که فرکشن شماره 1 در مقایسه با سایر فرکشن ها در دمای 20- درجه سانتی گراد کاملاً منجمد نمی شود. لذا برای تعیین نقطه ذوب و انجماد این جزء از دستگاه *DSC* (*differential scanning calorimetry*) (*Mettler-Toledo DSC-822, Columbus, OH*) استفاده شد. به منظور کالیبره کردن دستگاه از ترکیب استاندارد *Indium* استفاده شد. روش آن شامل ران اول: به دست آوردن دمایی که در آن اولین بلور ایجاد می شود (کاهش دما تا 100- درجه سانتی گراد) و ران دوم: به دست آوردن دمایی که در آن فرآیند ذوب در اولین بلور ایجاد می شود. سرعت کاهش و افزایش دما 1 درجه سانتی گراد در دقیقه تنظیم و برای مقایسه نتایج از سرم آلبومین گاوی (*BSA*) خالص با غلظت یکسان استفاده شد. نتایج به دست آمده در نرم افزار *STAR- 8/01* به صورت نمودار ترسیم شد.

نتایج

خصوصیات محیط پیرامون

میزان شوری آب های پیرامون در زمان نمونه برداری 38 قسمت در هزار و دمای هوا و آب نیز 27 درجه سانتی گراد به دست آمد. با توجه به آمار هواشناسی ایستگاه قشم، از نظر امواج و وضعیت آب و هوایی طی روزهای نمونه برداری می توان به عدم وجود موج های زیاد، عدم کدورت آب و نبود طوفان طی یک هفته قبل از نمونه برداری اشاره کرد. شکل 1 حلزون مورد مطالعه را نشان می دهد.

درجه سانتی گراد به مدت 2 ساعت مخلوط و یکنواخت شد. مخلوط به دست آمده به مدت 30 دقیقه با دور *g* 1000 سانتریفیوژ و مایع رویی برای تخلیص پروتئین های موجود در آن مورد استفاده قرار گرفت.

تخلیص پروتئین

ابتدا مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ از فیلتر فالكون *10 kD* (*Amicon ultra, Merck Millipore*) عبور داده شد، سپس مایع حاصل از فیلتراسیون لیفولیزه و نمونه خشک به دست آمده برای ادامه مطالعه نگهداری و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تخلیص بیشتر پس از حل کردن پودر خشک شده در آب مقطر و عبور از فیلتر 0/22 میکرون، بر روی ستون *C18* (اندازه ستون $4/6 \times 250$ میلی متر، سایز ذرات 5 میکرومتر و سایز منافذ 300 آنگستروم) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (*HPLC*) فاز -معکوس مدل (*Knauer*) (*Germany*) تزریق شد (12). برای جداسازی، از آب حاوی 0/05% تری فلوروآستیک اسید و استونیتریل حاوی 0/05% تری فلوروآستیک اسید با تعیین برنامه شیب (0-20% حلال استونیتریل) در مدت 50 دقیقه با سرعتی معادل 1 میلی لیتر بر دقیقه استفاده گردید. مایع خارج شده از ستون، با طول موج 280 نانومتر پایش و مورد ارزیابی قرار گرفت (16، 17).

تعیین غلظت پروتئین

برای اندازه گیری پروتئین کل در محلول از روش رنگ سنجی *Bradford assay* یا *Dye binding method* (1967) استفاده شد (4).

الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید

برای مشاهده مخلوط پروتئینی در این مطالعه از ژل الکتروفورز عمودی (*SDS-PAGE*) با غلظت گرادیان 5 تا 25 درصد استفاده گردید. از آنجایی که پپتیدهای کمتر از 15 کیلوالتون به راحتی در این طول ژل حرکت می کنند، باند کاملاً مشخص برای این دسته از

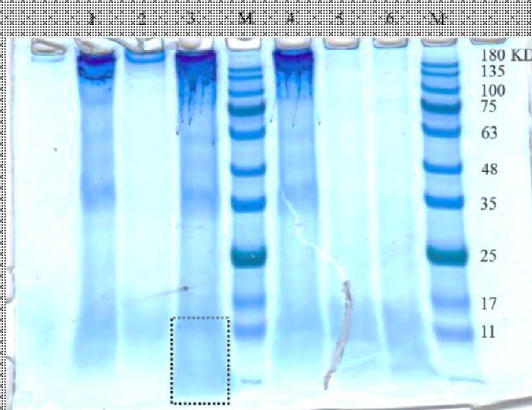


شکل 1- گونه *Peronia peronii* نمونه برداری شده

خالص سازی اجزاء عصاره

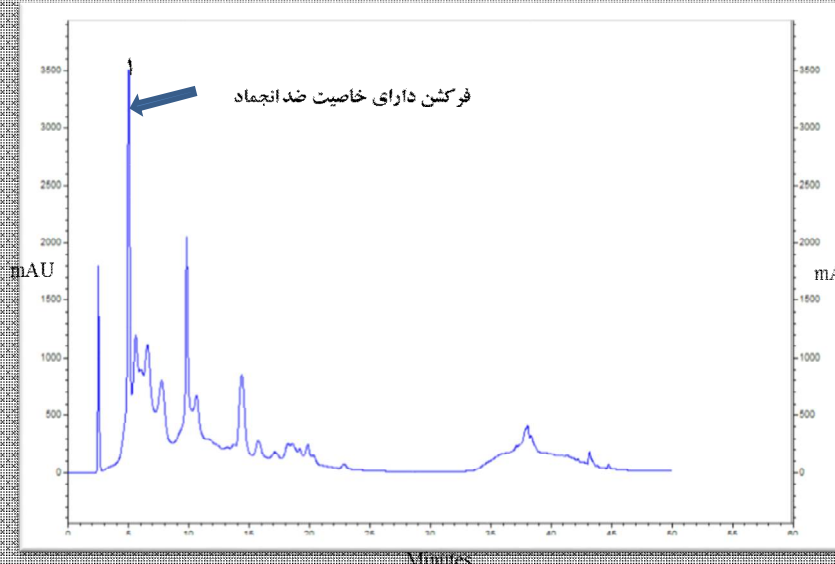
همان طور که در شکل 2 دیده می شود چاهک- های شماره 1 تا 6 مربوط به غلظت های مختلف عصاره پروتئینی استخراج شده می باشد و در چاهک های *M* از مارکر مولکولی به منظور نشان دادن حدود وزنی استفاده شده است. ناحیه مشخص شده در قسمت پایینی چاهک شماره سه مربوط به پپتیدهای با وزن مولکولی پایین تر از 15 کیلوالتون می باشد. کروماتوگرام

مربوط به جداسازی اجزاء پروتئینی عصاره پوست و عضله پس از فیلتراسیون (وزن مولکولی زیر 10 kD) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) و ستون غیر قطبی C18 در نمودار 1 آورده شده است. هر یک از پیک ها در فاکتور های مجزا جداسازی و مورد آزمون قرار گرفت.



شکل 2- ژل الکتروفورز از عصاره استخراج شده

ناحیه مشخص شده هاله پروتئینی کمتر از 15 کیلوالتون است. چاهک های 1-6 مربوط به رقت های مختلف از عصاره (زیاد تا کم) می باشد و چاهک *M* نشان دهنده مارکر مولکولی است.



نمودار 1- کروماتوگرام مربوط به اجزاء جداسازی شده از عصاره پروتئینی کوچک تر از 10 کیلو دالتون، شماره یک نشان دهنده پیک محوری پپتیدهای ضد انجماد می باشد.

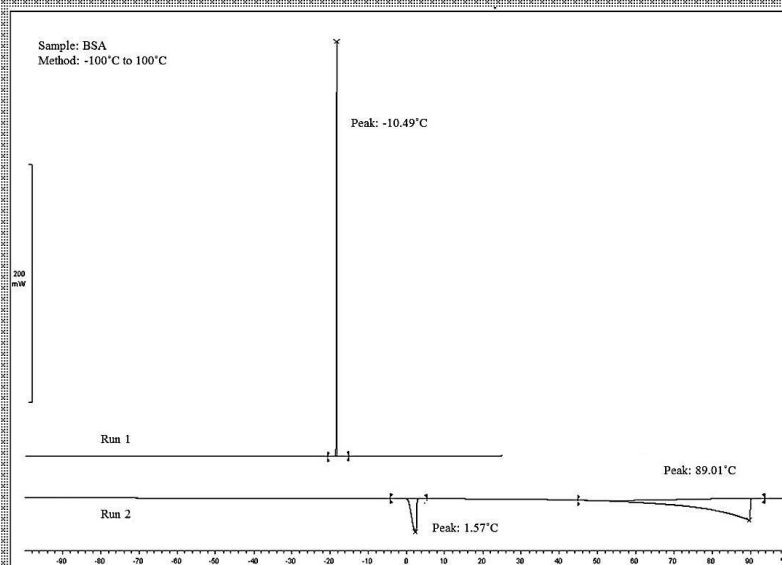
مورد بررسی قرار گرفته است. هرچند تاکنون بیش از 50 پپتید یا پروتئین ضد انجماد از جانوران پرسلولی در پایگاه اطلاعاتی *NCBI* به ثبت رسیده است، اما هیچ مطالعه ای در این خصوص بر روی نرم تنان یافت نشد که خود نشان دهنده جدید بودن نتایج و زمینه کاری مناسب در تحقیقات آینده می باشد. بیشتر تحقیقات انجام شده که منجر به شناسایی پپتیدهای ضد انجماد شده، بر روی ماهیان انجام گرفته است. در مطالعه ای که در آمریکا توسط *King* و همکاران انجام پذیرفت طی دو مرحله خالص سازی ژل کروماتوگرافی و *RF-HPLC* از سرم خون سه گونه ماهی (*Pseudo Pleuronectes pleuronectes americanus* (*Myoxocephalus scorpius* و *quadrituberculatus*) پپتیدهای ضد انجماد استخراج و خصوصیات فیزیکی این پپتیدها با یک دیگر مقایسه گردید. هم چنین برخی گونه های ماهی ساکن قطب جنوب توسط *Wohrmann* و در سال 1996 از نظر وجود پپتیدها و گلیکوپپتیدهای ضد انجماد مورد مطالعه قرار گرفت (24).

خصوصیات پروتئین های ضد انجمادی

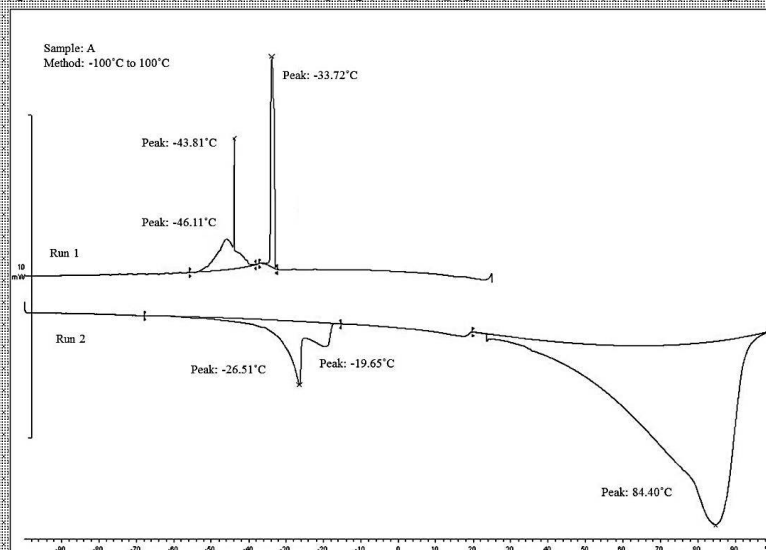
به منظور مقایسه خصوصیات پپتیدهای استخراج شده با محلول پروتئینی از محلول با غلظت مشابه *BSA* (سرم آلبومین گاوی) استفاده شد. در نمودار 2، نمودار نقطه انجماد، ذوب و جوش سرم آلبومین گاوی مشاهده می شود که به ترتیب $10/49^{\circ}\text{C}$ ، $1/57^{\circ}\text{C}$ و $89/01^{\circ}\text{C}$ ثبت شد. در نمودار 3 این مقادیر برای فرکشن شماره 1 (نمودار 1) نشان داده شده است. با توجه به وجود 3 پیک برای نقطه انجماد ($33/72^{\circ}\text{C}$ ، $43/81^{\circ}\text{C}$ و $46/11^{\circ}\text{C}$) می توان هر یک از پیک ها را به یک نوع پپتید نسبت داد به عبارت دیگر می توان گفت در فرکشن شماره 1 حداقل سه نوع پپتید با نقطه انجماد متفاوت وجود دارد. برای دمای ذوب دو پیک شامل $26/51^{\circ}\text{C}$ و $19/65^{\circ}\text{C}$ و برای دمای جوش یک پیک بزرگ ($84/40^{\circ}\text{C}$) که مقطع آن محدوده دمایی وسیعی را اشغال کرده است، به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، پپتیدهای ضد انجماد حلزون دریایی *P. peronii* در سواحل ایرانی برای نخستین بار



نمودار 2- نقطه انجماد، ذوب و جوش سرم آلبومین گاوی (BSA) با غلظت مشابه به عنوان کنترل



نمودار 3- بررسی نقطه انجماد، ذوب و جوش فرکشن شماره 1.

ساختار آن‌ها از طریق شبیه سازی می پردازند. از آن جمله می توان به Sivakumar و همکاران اشاره کرد که در سال 2007 به شبیه سازی هفده پپتید (استخراجی از بانک‌های اطلاعاتی) پرداخته و نقش گروه‌های عاملی و برخی اسیدهای آمینه را مورد بحث قرار داده است (20). از طرفی Sonnichsen و همکاران در سال 1996 به مطالعه نقش گروه های آب گریز پپتید بر

نتایج نشان داد که این دسته از پپتیدها در بیشتر گونه های مورد مطالعه حضور دارند و نحوه عملکرد آن‌ها با غلظت این پپتیدها ارتباط مستقیم دارد. لازم به ذکر است در بین گونه های این تحقیق بیشترین حد این پپتیدها در *Trematomus pennellii* و کمترین میزان آن در *Neopagetopsis ionah* مشاهده گردید. برخی مطالعات در خصوص پپتیدهای ضد انجماد به بررسی

گردیده است. این دسته بیومولکول ها باعث جلوگیری از ایجاد و یا رشد بلورهای یخ در بدن موجود و دیگر مایعات بدن آن می شود. عملکرد آن ها اغلب به نحوی است که بر روی سطح اولین بلورهای ایجاد شده که بسیار کوچک می باشند جذب شده و از رشد این بلورها جلوگیری می نماید (14). نتایج نمودار 3 نشان داد، فرکشن شماره 1 (نمودار 1) که احتمالاً مخلوطی از سه پپتید مختلف با شاخص آب دوستی یکسان و دارای خصوصیات ضد انجمادی می باشد. نکته اول این است که پپتیدهای این فرکشن دارای وزن مولکولی پایین (کمتر از 10 کیلوالتون) هستند. این در حالی است که مطابق جدول 1 پروتئین های ضد انجمادی نوع I و III که از ماهیان جداسازی شده نیز وزن مولکولی کمتر از 6/5 دالتون دارند. نکته دیگر این که اغلب پپتید و پروتئین های ضد انجمادی دارای خصوصیت آب دوستی بوده (23) و همان طور که مشخص است فرکشن شماره یک طی مراحل کروماتوگرافی دارای بیشترین خاصیت آب دوستی نسبت به بقیه فرکشن ها می باشد (به دلیل خروج زود هنگام) چرا که طبق برنامه HPLC با گذر زمان مقداری استونیتریل به آب اضافه می گردد و باعث افزایش خصوصیت غیر قطبی می شود. بنابراین با توجه به شرایط زندگی این حلزون دریایی در خلیج فارس، در زمستان ها در معرض هوای سرد (تا صفر درجه سانتیگراد) و بادهای ساحلی قرار می گیرد، وجود چنین ترکیب پروتئینی مزیت مهم برای حفظ بقای آن محسوب می گردد. از طرفی به نظر می رسد به دلیل پراکنش بسیار وسیع این دسته نرم تنان حتی در مناطق سردسیری کره زمین (به جز قطبین)، تکامل عامل اصلی تولید این پپتیدها و سازگاری موجود با این شرایط شده است. هم چنین گذشته از کاربرد زیستی پروتئین ها و پپتیدهای ضد انجماد برای خود موجود،

میزان سطح انرژی واکنش های درونی بین آب و یخ پرداختند (21). این در حالی است که Cheng در سال 1998 به بررسی و بحث در زمینه پپتیدها و پروتئین های ضد انجماد پرداخت و اهمیت ساختار پروتئین ها را در عملکرد بیان نمود (5). لذا می توان پس از شناسایی پپتید حاصل از این مطالعه به بررسی ساختار آن نیز پرداخت. در سال 2002 تحقیق بر روی عصاره استخراجی از *Homaxinella balfourensis* توسط Wilkins و همکاران نشان داد که این اسفنج دارای پپتیدهای ضد انجماد می باشد (23). لازم به ذکر است تخلیص این پپتیدها با استفاده از RF-HPLC صورت پذیرفته و هم چنین حضور هم زمان چند پپتید از دیگر یافته های این پژوهش بوده که در مطالعه حاضر نیز این چنین می باشد. برخی ماهیان خوراکی ژاپنی نیز توسط Nishimiya و همکاران در سال 2008 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که پپتیدها و پروتئین های ضد انجماد تنها در موجودات قطبی وجود ندارد و جانوران مناطق دیگر نیز می توانند آن ها را تولید نمایند. از طرفی عنوان نمودند از آن جایی که اغلب نمونه های مطالعه شده به طور هم زمان دارای چند پپتید بوده اند، عملکرد هم زمان این پپتیدها بسیار موثرتر از عملکرد هر یک از آن ها به تنهایی بوده است. جدول 1 نتایج مطالعات Ewart و همکاران، 1999؛ Harding و همکاران، 1999؛ Venketesh و Dayananda، 2008 را نشان می دهد (22، 9). این دانشمندان پپتیدهایی را در موجودات مختلف شناسایی و آن ها را بر اساس ساختار، عملکرد و وزن مولکولی دسته بندی نموده اند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مقایسه وزن مولکولی آن با این جدول به نظر می رسد پپتیدهای ضد انجماد اغلب کوچک و وزن مولکولی کمتر از 20 کیلو دالتون دارند. هم چنین تعدادی پپتید ضد انجماد نیز توسط دانشمندان مختلف از برخی گیاهان استخراج و معرفی

عمل آورد و هر روز شناسایی و استفاده از آن ها وسعت بیشتری می یابد.

انسان توانسته از آن ها در صنایع مختلف از جمله کشاورزی، دارویی و خوراکی استفاده های زیادی به

منابع

- 1-انصاری، ز.، سیف آبادی، ج.، عوفی، ف. 1391. تنوع گونه ای ناحیه جذر و مدی ساحل جنوبی جزیره قشم بر اساس بیوتپ های غالب، نشریه محیط زیست طبیعی. مجله منابع طبیعی ایران. دوره 65. شماره 1. ص 13 الی 29.
- 2.Adiyodi, K. G., Adiyod, R. G. (1988). *Reproductive Biology of Invertebrates, Accessory Sex Glands*. John Wiley & Sons, Science - 542 pages.
- 3.Block, W. (1991). *To freeze or not to freeze: invertebrate survival of sub-zero temperatures*. *Functional Ecology*, 5(2); 284-290.
- 4.Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. *Annu. Rev. Biochem*, 72; 248-254.
- 5.Cheng, C.H.C. (1998). *Evolution of the diverse antifreeze proteins*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8; 715-720.
- 6.Cheng, C.H.C. (2003). *Freezing avoidance in polar fishes*. in "encyclopedia of life support systems (EOLSS) - theme 6.73 extremophiles" (Ed. C. Gerday), *Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, UK*.
- 7.Cuvier, G. (1804). *Memoire sur les genre Onchidium*. *Ann. Mus. Natl Hist. Nat. Paris*, 5 ; 38.
- 8.Darias, J., Cueto, M., Díaz-Marrero, A.R. (2006). *The chemistry of marine pulmonate gastropods*. In: Cimino, G., Gavagnin, M. (Eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Subseries Marine Molecular Biotechnology: Molluscs*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 105-131.
- 9.Biskupiak, J.E. (1985) *Bioactive metabolites from marine organisms*. Ph.D.: *Medical Chemistry, The University of Utah, United States*. 158p.
- 9.Ewart, K. V., Lin, Q., Hew, C. L. (1999). *Structure, function and evolution of antifreeze protein*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 55; 2.
- 10.Falkenberg, S.S., Mikalsen, S.O., Joensen, H., Stagsted, J., Nielsen, H.H. (2014). *Extraction and characterization of candidate bioactive compounds in different tissues from*
- salmon (*Salmosalar*), *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7 (4); 11-25.
- 11.Harding, M. M., Ward, L. G., Haymet, A. D. J. (1999). *Type I 'antifreeze' proteins: Structureactivity studies and mechanisms of ice growth inhibition*. *Eur. J. Biochem*, 264; 653-665.
- 12.Hoffmann, K. (1928). *Zur Kenntniss der Oncidiiden. Ein Beitrag zur geographischen Verbreitung, Phylogenie und Systematik dieser Tiere. I. Teil. Untersuchung neuer Materials und Revision der Familie*. *Zoologische Jahrbücher. Systematik Ökologie und Geographie der Tiere*, 55; 29-118.
- 13.Hoffmann, K. (1929). *Zur Kenntniss der Oncidiiden. Ein Beitrag zur geographischen Verbreitung, Phylogenie und Systematik dieser Tiere. II. Teil. Phylogenie und Verbreitung*. *Zoologische Jahrbücher, Systematik Ökologie und Geographie der Tiere*, 57; 253-302.
- 14.Inada, T. (2003). *Substitutes for antifreeze proteins: potential applications in ice slurry systems*. *Journal of Solution Chemistry*, 32(10); 931.
- 15.Knight, C.A., Cheng, C.C., Devries A.L. (1991). *Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes*. *Biophysical journal*, 59; 409-418.
- 16.Lee, I.H., Lee, Y.S., Kim, C.H., Kim, C.R., Hong, T., Menzel, L. (2001). *Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, Halocynthia aurantium*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527; 141-148.
- 17.Lehrer, R.I., Lee, I.H., Menzel, L., Waring, A., Zhao, C.Q. (2001). *Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of Styela clava*. *Adv Exp Med Biol*, 484; 71-76.
- 18.McFarlane, I.D. (1979). *Behaviour and ecology of the inter-tidal pulmonate mollusc Onchidium peronii, in Kuwait*. *Kuwait journal of science*.
- 19.Pinchuck, S.C., Hodgson, A.H. (2010). *The ultrastructure and histology of the perinotal epidermis and defensive glands of two species*

- of *Onchidella* (Gastropoda: Pulmonata). *Tissue and Cell*, 19(2); 110-115.
20. Sivakumar, K., Balaji, S., Radhakrishnan, G. (2007). In silico characterization of antifreeze proteins using computational tools and servers. *Journal of Chemical Sciences*, 119(5); 571-579.
21. Sonnichsen, F.D., Deluca, C.I., Davies, P.L., Sykes, B.D. (1996). Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction. *Structure*, 4; 1325-1337.
22. Venketesh, S., Dayananda, C. (2008). Properties, potential and prospects of antifreeze proteins. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28; 57-82.
23. Wilkins, S.P., Blum, A.J., Burkepile, D.E., Rutland, T.J., Wierzbicki A., Kelly, M., Hamann, M.T. (2002). Isolation of an antifreeze peptide from the Antarctic sponge *Homaxinella balfourensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59; 2010-2015.
24. Wohrmann, A.P.A. (1996). Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fish species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 130; 47-59.
25. Wu, W.J., Shen, B., Chen, C., Shen, H.D., Wei, L.L., Wang, L., Li, K. (2010). Preliminary classification and phylogenetic relationship among onchidiidae in China inferred from 18S rRNA partial sequence. *Zoological Research*, 31; 381-386.
26. Yeh, Y., Feeney, R. E. (1996). Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. *Chemical Reviews*, 96; 2.



Archive of SID