فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۰، جلد ۸، شماره ۳، تابستان ۹۴، صفحه ۱ تا ۱۰

# مطالعه عملکرد فیزیولوژیک پپتیدهای ضد انجماد جداسازی شده ازحلزون دریایی *Peronia peronii*

محمد امیر بی تعب[۱]، **جمیله پازوکی**[۲]، سید امید رعنایی سیادت[۳]
۱–دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.ایران.
۲–دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران. ایران. **pazooki2001@yahoo.com**
۳–دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران. ایران.
**تاریخ دریافت:۹۳/٤/۲۸ تاریخ پذیرش:۹٤/۵/۲۵**

## چکیده

**مقدمه و هدف: مطالعه حاضر بر روی حلزون دریایی*Peronia peronii*، که جزو حلزون های 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 می باشد.**

**روش کار: نمونه برداری در بهار ۱۳۹۱ از سواحل جنوبی جزیره قشم انجام و نمونه ها 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 نیتروژن مایع هموژن شد. پس از استخراج عصاره پروتئینی و عبور آن از فیلتر ۱۰ 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 ٤۱/۲–، ذوب ۲۳/۵– و جوش ۸٤/٤ درجه سانتی گراد می باشد. این نتایج با نمونه کنترل که سرم آلبومین گاوی بود، اختلاف زیادی داشت.**

**نتیجه‌گیری: به نظر می رسد حضور این دسته پپتیدها در گونه ای که پراکنش جهانی دارد به افزایش تحمل جانور در فصل زمستان کمک به سزایی می کند.**

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

## مقدمه

حلزون های خلیج فارس و دریای عمان از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته اند. در این بین حلزون با نام علمی*Peronia peronii* (*Onchdium peronii*)(۷)، متعلق به شاخه Mollusca، رده Gastropoda، زیر رده Heterobranchia، بالا راسته Pulmonata، راسته Systellommatophora و خانواده Onchidiidae به دلیل این که فاقد صدف می-باشد و در هنگام جزر خارج از آب و در معرض وزش باد قرار می‌گیرد، در مطالعه حاضر دارای جذابیت است. گونه های مختلف این خانواده در بیشتر مناطق دنیا به جز قطب شمال و جنوب یافت می شوند(۱۴، ۱۳). جمعیت های زیادی از آن‌ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام و دریای مدیترانه وجود دارد(۲۵). اغلب در نواحی بین جزر و مدی سواحل صخره ای، ماسه ای و گلی(در معرض بادهای زمستانی) زندگی می کنند(۱) و جزء حلزون های 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

نر بوده و با افزایش اندازه رفتارهای جنس ماده نیز در آن ظاهر می شود و در تمام دوره زندگی این حالت در آن‌ها باقی می ماند(۲). 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 ترشحی حاوی موادی با طعم غیر مطبوع است که مانع شکار شدن آن‌ها توسط سایر موجودات می‌گردد(۱۸). این مواد از سلول های تخصص یافته موجود در پوست به نام غدد رپوگناتوریال(Repugnatorial) ترشح می شوند که به غدد دفاعی نیز مشهور می باشند(۱۹). این مواد حاوی ایزومرهای پلی پروپیونات(Polypropionate) و مواد اسیدی هستند که نقش دفاعی و بد مزه شدن موجود را دارند(۸). گونه *P.peronii* نیز دارای غدد رپوگناتوریال است که تاکنون ترکیبی به نام peroniatriol I از آن استخراج و شناسایی شده است. این ترکیب دارای $LC_{50}$ در حدود ۵/۵ 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(۱۴). از طرفی پپتیدها و پروتئین های موجود در بخش های مختلف بدن موجودات نیز دارای نقش یا نقش‌های 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 پپتید ها با خاصیت ضد میکروبی اشاره کرد که در بسیاری از موجودات از جمله بی مهرگان گزارش شده است(۱۰). دما فاکتوری مهم برای زندگی و بقای 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: ۱) جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ درون و خارج سلول‌های بدن، که به آن عدم تحمل سرما( freezing intolerance) می گویند که برای آن به مناطق عمیق تر آب می روند(۳). ۲) بروز واکنش های بیوشمیایی و فیزیولوژیکی مناسب پس از تشکیل کریستال های یخ، که به آن مقاومت سرمایی(freezing tolerance) می-گویند. ۳) 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(۱۵). 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(۲۶، ۹). وظیفه پروتئین های ضد انجماد جلوگیری و کنترل رشد کریستال های یخ تا یک نقطه معین است، که از منجمد شدن جلوگیری می‌کنند. مکانیسم دقیق عملکرد پروتئین های ضد انجماد کاملاً مشخص نشده است. قابل قبول ترین مکانیسم پیشنهاد شده توسط Cheng(۲۰۰۳) مطرح شد که در آن پروتئین های ضد انجماد از طریق پیوندهای هیدروژنی به یخ متصل می شوند(۶). 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

شوند این ساختار حالت استوانه‌ای و هرمی ایجاد کرده و از رشد کریستال های یخ جلوگیری می کند. تاکنون ۸ نوع گلیکوپروتئین ضد انجماد از خانواده روغن ماهیان قطب شمال(دامنه‌ی وزن مولکولی ۳۴-۲/۶ کیلو دالتون) و ۴ نوع پروتئین ضد انجمادی در ماهیان، ۱ نوع در حشرات و ۱ نوع در گیاهان شناسایی شده است(جدول ۱)(۲۲، ۱۱، ۹).

**جدول ۱- انواع پروتئین های ضد انجمادی(۲۲، ۱۱، ۹).**

| پروتئین ضد انجمادی | وزن مولکولی دالتون(Da) | گونه ها |
|---|---|---|
| **نوع I-ماهی** | ۳۳۰۰-۴۵۰۰ | *Righteye flounder* ،Sculpins و *Winter flounder* |
| **نوع II-ماهی** | ۱۱۰۰۰-۲۴۰۰۰ | *Sea raven* ،*Rainbow smelt* و *Atlantic herring* |
| **نوع III-ماهی** | ۶۵۰۰ | Eel pounts مانند *Macrozoarces americanus* |
| **نوع IV-ماهی** | ۱۲۰۰۰ | Longhorn sculpin *Myosocephalus octodecimspinosis* |
| **نوع گیاهی** | ۱۶۰۰۰-۳۵۰۰۰ | *Winter rye* |
| **نوع حشره** | - | *Spruce budworm* ,*Choristoneura fumiferana* ،Dendroides canadensis، *Mealworm bettle* |

با وجود ساختارهای مشابه، همه پروتئین های ضد انجماد یک وظیفه مشابه را انجام می دهند، این پروتئین‌ها کریستال های یخ را تشخیص داده، به آن ها متصل شده و مانع از رشد کریستال های یخ در محدوده دمایی زیر صفر، جایی که موجود در آنجا زندگی می‌کند، می شود. پروتئین های ضد انجماد اسمولالیته مایعات داخلی موجود را افزایش داده و هم‌چنین اثر خود را روی دمای انجماد نشان می دهند. لذا استرس دمایی میزان دمایی است که این پروتئین‌ها می توانند نقطه انجماد مایعات بدن را کاهش دهند. به طور معمول این میزان محدوده ای بین ۰/۷۵ تا ۱/۴ درجه سانتی-گراد است که از انجماد بدن در دمای زیر صفر (۱/۷۵- تا ۲/۴- درجه سانتی‌گراد) و یا حتی پایین تر جلوگیری می‌کند(۶). تاکنون مطالعه ای 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 درحلزون دریایی *P. peronii*، در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان می باشد.

## مواد و روش ها

### مکان و زمان نمونه برداری

نمونه برداری از مناطق صخره ای بین جذر و مدی سواحل جنوبی جزیره قشم، اسکله روستای سلخ(۱۰/۴۹ ′۴۳ °۵۵ شرقی و ۵۸/۹۵ ″۴۰ ′۲۶ °شمالی) در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۱ 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 نمونه ها ایجاد و کلیه امعاء و احشاء حیوان خارج گردید(۱۷)، 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 ۹۵ به ۵ در دمای ۴

درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت مخلوط و یکنواخت شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ 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 فالکون ۱۰ kD (Amicon ultra, Merck Millipore) عبور داده شد، سپس مایع حاصل از فیلتراسیون لیفولیزه و نمونه خشک به‌دست 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 ۰/۲۲ میکرون، بر روی ستونC۱۸(اندازه ستون ۲۵۰×۴/۶ میلی متر، سایز ذرات ۵ میکرومتر و سایز منافذ ۳۰۰ آنگستروم) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) فاز-معکوس مدل Knauer(Germany) تزریق شد(۱۲). برای جداسازی، از آب حاوی ۰/۰۵٪ تری فلورواستیک اسید و استونیتریل حاوی ۰/۰۵٪ تری فلورواستیک اسید با تعیین برنامه شیب(۰-۲۰٪ حلال استونیتریل) درمدت ۵۰ دقیقه با سرعتی معادل ۱ میلی لیتر بر دقیقه استفاده گردید. مایع خارج شده از ستون، با طول موج ۲۸۰ نانومتر پایش و مورد ارزیابی قرار گرفت(۱۷، ۱۶).

**تعیین غلظت پروتئین**

برای اندازه گیری پروتئین کل در محلول از روش رنگ سنجی Bradford assay یا Dye binding method (1967) استفاده شد(۴).

**الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید**

برای مشاهده مخلوط پروتئینی در این مطالعه از ژل الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) با غلظت گرادیان ۵ تا ۲۵ درصد استفاده گردید. از آن‌جایی که پپتیدهای کمتر از ۱۵ کیلودالتون به راحتی در این طول ژل حرکت می‌کنند، باند کاملاً مشخص برای این دسته از 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 ۱۰۰ ولت انجام پذیرفت.

**بررسی خصوصیت ضد انجمادی**

پس از جداسازی اجزاء مختلف حاصل از عصاره پوست و عضله(مخلوط پروتئینی زیر ۱۰ کیلودالتون) با استفاده از دستگاه HPLC، مشاهده شد که فرکشن شماره ۱ در مقایسه با سایر فرکشن ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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: به‌دست آوردن دمایی که در آن اولین بلور ایجاد می شود(کاهش دما تا ۱۰۰- درجه سانتی‌گراد) و ران دوم: به‌دست آوردن دمایی که در آن فرآیند ذوب در اولین بلور ایجاد می شود. سرعت کاهش و افزایش دما ۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تنظیم و برای مقایسه نتایج از سرم آلبومین گاوی(BSA) خالص با غلظت یکسان استفاده شد. نتایج به‌دست آمده در نرم افزار STAR- ۸/۰۱ به صورت نمودار ترسیم شد.

## نتایج

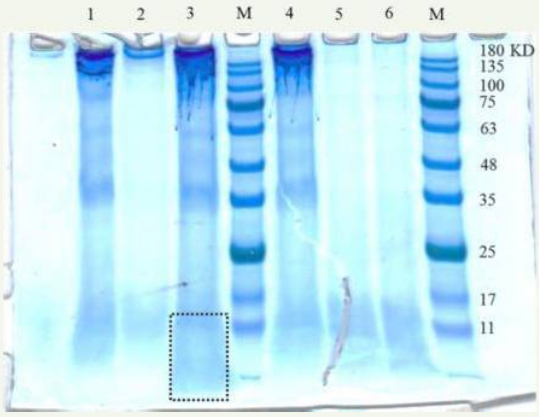
**خصوصیات محیط پیرامون**

میزان شوری آب‌های پیرامون در زمان نمونه برداری ۳۸ قسمت در هزار و دمای هوا و آب نیز ۲۷ درجه سانتی‌گراد به‌دست 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 ۱ حلزون مورد مطالعه را نشان می دهد.

**شکل ۱- گونه *Peronia peronii* نمونه برداری شده**

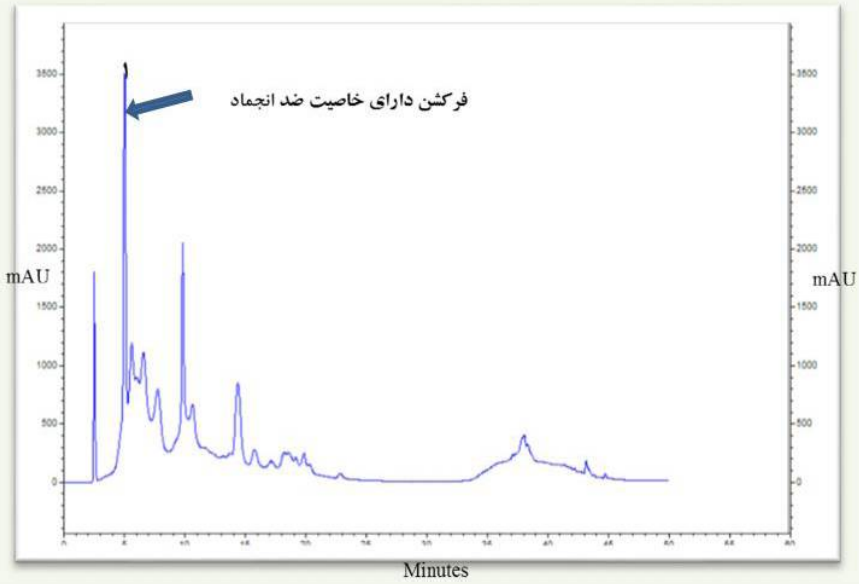
**خالص سازی اجزاء عصاره**

همان طور که در شکل ۲ دیده می شود چاهک-های شماره ۱ تا ۶ 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 ۱۵ کیلودالتون می باشد. کروماتوگرام مربوط به جداسازی اجزاء پروتئینی عصاره پوست وعضله پس از فیلتراسیون(وزن مولکولی زیر ۱۰ kD) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس(RP-HPLC) و ستون غیر قطبیC۱۸ در نمودار۱ آورده شده است. هر یک از پیک ها در فالکون های مجزا جداسازی و مورد آزمون قرار گرفت.




**شکل ۲- ژل الکتروفورز از عصاره استخراج شده**

ناحیه مشخص شده هاله پروتئینی کمتر از ۱۵ کیلودالتون است، چاهک های ۶-۱ مربوط به رقت های مختلف از عصاره (زیاد تا کم) می باشد و چاهک **M** نشان دهنده مارکر مولکولی است.




**نمودار۱-کروماتوگرام مربوط به اجزاء جداسازی شده از عصاره پروتئینی کوچک تر از ۱۰ کیلو دالتون،**
شماره یک نشان دهنده پیک محتوی پپتیدهای ضد انجماد می باشد.

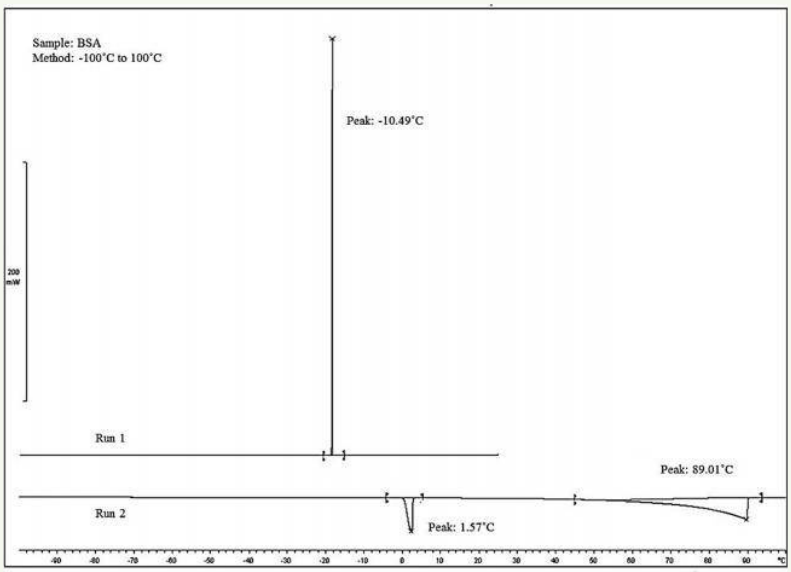
**خصوصیات پروتئین های ضد انجمادی**

به منظور مقایسه خصوصیات پپتیدهای استخراج شده با محلول پروتئینی از محلول با غلظت مشابه BSA(سرم آلبومین گاوی) استفاده شد. در نمودار۲، نمودار نقطه انجماد، ذوب و جوش سرم آلبومین گاوی مشاهده می شود که به ترتیب ۱۰/۴۹- °C، ۱/۵۷ °C و ۸۹/۰۱ °C ثبت شد. در نمودار۳ این مقادیر برای فرکشن شماره ۱(نمودار۱) نشان داده شده است. با توجه به وجود ۳ پیک برای نقطه انجماد(۳۳/۷۲- °C، ۴۳/۸۱- °C و ۴۶/۱۱- °C) می توان هر یک از پیک ها را به یک نوع پپتید نسبت داد به عبارت دیگر می‌توان گفت در فرکشن شماره ۱ حداقل سه نوع پپتید با نقطه انجماد متفاوت وجود دارد. برای دمای ذوب دو پیک شامل ۲۶/۵۱- °C و ۱۹/۶۵- °C و برای دمای جوش یک پیک بزرگ(۸۴/۴۰ °C) که مقطع آن محدوده دمایی وسیعی را اشغال کرده است، به‌دست آمد.

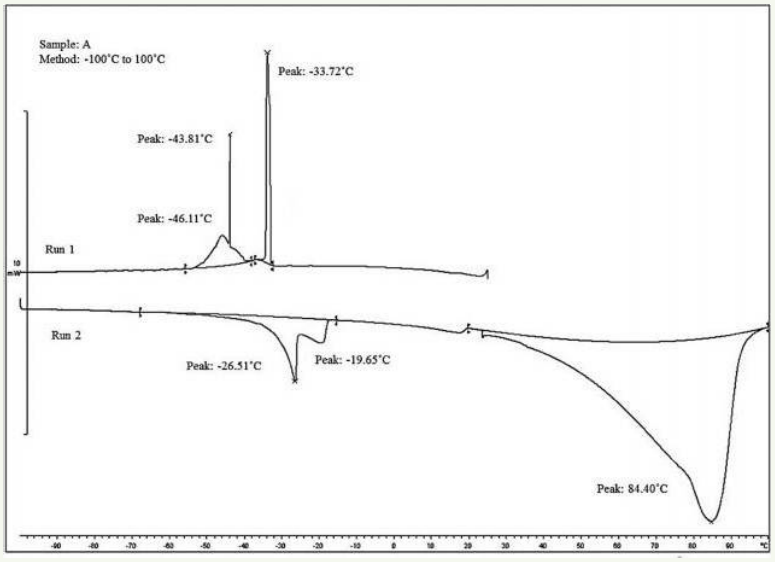
## بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، پپتید های ضد انجماد حلزون دریایی *P.peronii* در سواحل ایرانی برای نخستین بار مورد بررسی قرار گرفته است. هرچند تاکنون بیش از ۵۰ 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 پپتید های ضد انجماد شده، بر روی ماهیان انجام گرفته است. در مطالعه‌ای 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 americanus*، *Pleuronectes quadrituberculatus* و *Myoxocephalus scorpius*) پپتیدهای ضد انجماد استخراج و خصوصیات فیزیکی این پپتیدها با یک دیگر مقایسه گردید. همچنین برخی گونه های ماهی ساکن قطب جنوب توسط Wohrmann و در سال ۱۹۹۶ از نظر وجود پپتید ها و

گلیکوپپتیدهای ضد انجماد مورد مطالعه قرار گرفت(۲۴).




**نمودار۲-نقطه انجماد، ذوب و جوش سرم آلبومین گاوی(BSA) با غلظت مشابه به عنوان کنترل.**




**نمودار۳- بررسی نقطه انجماد، ذوب و جوش فرکشن شماره ۱.**

نتایج نشان داد که این دسته از پپتید ها 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 ساختار آن‌ها از طریق شبیه سازی می پردازند. از آن جمله می توان به Sivakumar و همکاران اشاره کرد که در سال ۲۰۰۷ به شبیه سازی هفده پپتید(استخراجی از بانک‌های اطلاعاتی) پرداخته و نقش گروه‌های عاملی و برخی اسیدهای آمینه را مورد بحث قرار داده

است(۲۰). از طرفی Sonnichsen و همکاران در سال ۱۹۹۶ به مطالعه نقش گروه های آب گریز پپتید بر میزان سطح انرژی واکنش های درونی بین آب و یخ پرداختند(۲۱). این در حالی است که Cheng در سال ۱۹۹۸ به بررسی و بحث در زمینه پپتیدها و پروتئین‌های ضد انجماد پرداخت و اهمیت ساختار پروتئین ها را در عملکرد بیان نمود(۵). لذا می توان پس از شناسایی پپتید حاصل از این مطالعه به بررسی ساختار آن نیز پرداخت. در سال ۲۰۰۲ تحقیق بر روی عصاره استخراجی از *Homaxinella balfourensis* توسط Wilkins و همکاران نشان داد که این اسفنج دارای پپتیدهای ضد انجماد می باشد(۲۳). لازم به ذکر است تخلیص این پپتیدها با استفاده از RF-HPLC صورت پذیرفته و هم‌چنین حضور هم‌زمان 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 ۲۰۰۸ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که پپتیدها و پروتئین های ضد انجماد تنها در موجودات قطبی وجود ندارد و جانوارن 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 ۱ نتایج مطالعات Ewart و همکاران، ۱۹۹۹؛ Harding و همکاران، ۱۹۹۹؛ Venketesh و Dayananda، ۲۰۰۸ را نشان می دهد(۲۲، ۹). 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 ۲۰ کیلو دالتون دارند. هم چنین تعدادی پپتید ضد انجماد نیز توسط دانشمندان مختلف از برخی گیاهان استخراج و معرفی 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(۱۴). نتایج نمودار۳ نشان داد، فرکشن شماره ۱(نمودار۱) 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 ۱۰ کیلودالتون) هستند. این در حالی است که مطابق جدول ۱ پروتئین های ضد انجمادی نوع I و III که از ماهیان جداسازی شده نیز وزن مولکولی کمتر از ۶/۵ دالتون دارند. نکته دیگر این که اغلب پپتید و پروتئین های ضد انجمادی دارای خصوصیت آب دوستی بوده (۲۳) و همان طور که مشخص است فرکشن شماره یک طی مراحل کروماتوگرافی دارای بیشترین خاصیت آب دوستی نسبت به بقیه فرکشن ها می باشد(به‌دلیل 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 زمستان‌ها در معرض هوای سرد(تا صفر درجه www.emecs.or.jp) و بادهای ساحلی قرار می گیرد، وجود چنین ترکیب پروتئینی مزیت مهم برای حفظ بقای آن محسوب می‌گردد. از طرفی به نظر می رسد به‌دلیل پراکنش بسیار وسیع این دسته نرم تنان حتی در مناطق سردسیری کره زمین(به‌جز 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، انسان توانسته از آن ها در صنایع مختلف از جمله کشاورزی، دارویی و خوراکی استفاده های زیادی به عمل آورد و هر روز شناسایی و استفاده از آن ها وسعت بیشتری می یابد.

## منابع


۱-انصاری، ز.، سیف آبادی، ج.، عوفی، ف. ۱۳۹۱. تنوع گونه ای ناحیه جذر و مدی ساحل جنوبی جزیره قشم بر اساس بیوتپ های غالب، نشریه محیط زیست طبیعی. مجله منابع طبیعی ایران. دوره۶۵. شماره ۱. ص ۱۳ الی ۲۹.

**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.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). ZurKenntniss der Oncidiiden. Ein Beitragzurgeographischen Verbreitung, Phylogenie und Systematikdieser Tiere. I. Teil. Untersuchungneuen Materials und Revision der Familie. Zoologische Jahrbücher. Systematik Ökologie und Geographie der Tiere, 55; 29–118.

**13.**Hoffmann, K. (1929). ZurKenntniss der Oncidiiden. Ein Beitragzur geographis chenVerbreitung, Phylogenie und Systematik dieser Tiere. II. Teil. Phylogenie und Verbreitung .Zoologi sche 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 pulmonatemollusc *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.