

بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد  
*Eurygaster integriceps* Put. (Het. Scutelleridae)

Purification and Characterization of Antifreeze Protein from Sunn Pest

*Eurygaster integriceps* Put.

احمد بغدادی، عذرا ربانی چادگانی، غلامعباس عبداللہی، 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: دی ماه ۱۳۸۰)

### چکیده

پروتئینی با فعالیت ضد یخی از حشره کامل سن معمولی گندم (*Eurygaster integriceps*) جمع‌آوری و در زمستان استخراج و شناسایی گردید. پروتئین ضد یخ با استفاده از اتانل ۵۰ درصد از سن گندم جداسازی و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE 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،  $4/4^{\circ}C$  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

## مقدمه

حشرات زمستان‌گذران برای مقابله با سرمای زمستان از ترکیبات مختلفی استفاده می‌کنند. این ترکیبات عبارتند از: لیپو پروتئین‌ها 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).

بطور کلی اکثر حشرات با یخ زدن آب بدن از بین می‌روند، لذا برای این گروه از حشرات جلوگیری از یخ‌زدگی بسیار حیاتی 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 یخ‌زدگی، کریستال‌ها یخ در دماهای حدود  $0^{\circ}\text{C}$  تا  $-10^{\circ}\text{C}$  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

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 اسید آمینه‌های آب دوست (هیدروفیل) نسبت به پروتئین‌های ضد یخ ماهی‌ها هستند. در این میان پروتئین ضد یخ *Oncopeltus 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) اما در مورد وجود و یا عدم وجود پروتئین ضد یخ 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 می‌گذرانند، 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 آتشفشان 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.

## ۲-۱ اندازه 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 ۴°C با استفاده از همورژنایزر مدل MSE با سرعت متوسط همورژنیزه 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 همورژن 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 ۴°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 ۰/۶ 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

مقادیر بسیار کمی اسیدهای آمینه آروماتیکی هستند و یا فاقد آنها می‌باشند). اجزائی که بیک‌ها را بوجود آوردند بوسیله دستگاه فریزردرایر تغلیظ و با استفاده از کیسه‌های دیالیز با اندازه ۳۵۰۰ دالتون برای جذب نمک به مدت یک شب دیالیز شدند و مجدداً خشک گردیدند. اجزاء حاصله در آب مقطر حل و در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر خاصیت ضد یخی اندازه گرفته شد.

### ۳-۲- تخلیص جدایه پروتئینی IV

۵ میلی گرم از جدایه IV حاصل از ستون DEAE سفادکس نمونه زمستان در بافر ۰/۱ مولار تریس حاوی ۰/۱ مول نمک طعام حل و با استفاده از ستون سفادکس G-100 (۲۰ × ۹۲۰ mm) کروماتوگرافی گردید. ستون با سرعت ۶ میلی لیتر در ساعت شسته شد. اجزاء حاصله با حجم ۵ میلی لیتر جمع‌آوری و جذب آنها در ناحیه ۲۳۰ نانومتر خوانده شد. جدایه حاصله جمع‌آوری و بعد از خشک کردن، جهت حذف نمک بر علیه آب مقطر دیالیز و مجدداً خشک گردید و خاصیت ضد یخی با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد.

### ۴- تعیین نقطه یخ زدگی و نقطه ذوب

برای اندازه گیری خاصیت ضد یخی (Thermal hysteresis)، نقطه ذوب منهای نقطه یخ زدگی) پروتئین‌های سن گندم، از روش تغییر یافته دورایس استفاده شد (Devries, 1986). برای اندازه گیری نقطه ذوب ۵ میکرولیتر از محلول حاوی پروتئین داخل لوله موئین ۱۰ میکرولیتر وارد شد، سپس لوله موئین داخل ظرف حاوی اتانل سرد شده قرار گرفت تا نمونه کاملاً یخ‌زد. لوله موئین داخل محفظه شیشه‌ای که در آن اتیلن گلیکول سرد شده بوسیله دستگاه Thermostatic (مدل Multitemp II, LKB221) در جریان بود قرار گرفت (در ضمن تغییرات وضعیت نمونه بوسیله بینوکولر ZEISS نیز بررسی می‌شد). دما طوری تنظیم گردید که در هر دقیقه ۰/۰۲ درجه سانتیگراد افزایش می‌یافت. دمایی که در آن آخرین کریستال یخ محو می‌شد، بعنوان نقطه ذوب ثبت گردید. در آزمایش دیگر انتهای لوله موئین حاوی پروتئین در اتانل سرد شده وارد، بعد از ایجاد تکه کوچکی یخ، در محفظه شیشه‌ای گذاشته شد. دمای

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 الکتروفورز (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 ۴ در صد آکریل آمید تشکیل شده است. ژل جدا کننده حاوی ۱۵ در صد آکریل آمید، ۰/۰۳۷۶ مولار تریس بازی (pH=۸/۸)، یک درصد SDS و ۰/۰۲۵ درصد 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 ۷×۷ Cm و قطر ۱/۵ تا ۲ میلی متر بدست آمد. ژل توده کننده دارای ۴ درصد آکریل آمید، ۰/۱۲۵ مولار تریس بازی (pH=6.8) و ۰/۱ درصد SDS است. ژل جدا کننده نیز با اضافه کردن آمونیوم پرسولفات ۰/۱ درصد پلی‌مریزه گردید.

بافر الکتروود حاوی ۰/۰۲۵ مولار تریس بازی، ۰/۱۹۲ مولار گلايسين، ۰/۱ درصد 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 ۰/۶۲۵ مولار تریس اسیدی، ۱۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد SDS، ۵ درصد مرکاپتوتانول، ۰/۰۰۱ درصد برموفنیل بلو با pH=۶/۸ 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<sub>250</sub>، 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

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

#### ۶- سنجش پروتئین

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

**محلول A:** ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات همراه با ۱۰۰ گرم کربنات سدیم در ۵۰۰ میلی لیتر هیدروکسید - سدیم یک نرمال حل شده سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

**محلول B:** ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات با ۱ گرم سولفات مس آبدار در ۹۰ میلی لیتر آب حل شده و به آن ۱۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال اضافه گردید.  
**محلول C:** یک حجم از معرف Folin and Ciocalteu's و ۱۵ حجم آب مقطر مخلوط گردید (این محلول روزانه تهیه و استفاده شد).

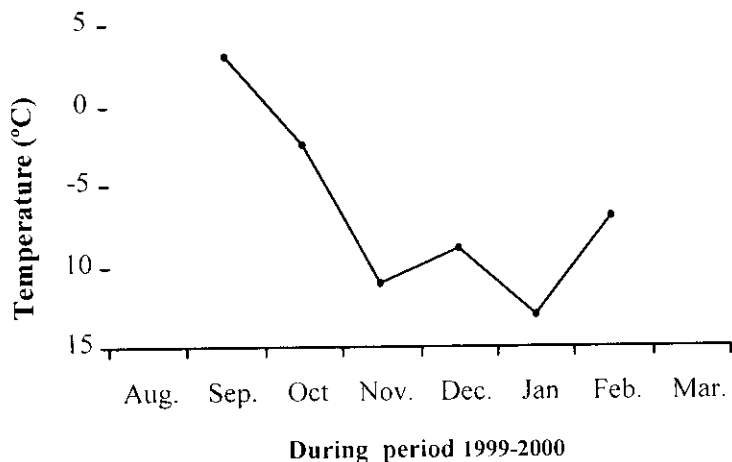
در ادامه پروتئین سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin) بعنوان استاندارد با غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. سپس غلظت‌های ۰/۵، ۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۷ میلی گرم در میلی لیتر از پروتئین BSA با آب مقطر به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. از نمونه در مراحل مختلف استخراج (بعد از دیالیز اول و بیک‌های مختلف DEAE) با غلظت نامعینی 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 لیتر محلول 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

موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردید. با توجه به جذب نمونه‌ها، 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 است. دمای محیط طی این مدت به اندازه‌ای سرد بوده تا در صورت تولید پروتئین ضد یخ توسط سن گندم آن را القاء نماید. حداقل دمای مشاهده شده  $13^{\circ}\text{C}$  - در دی ماه بوده است و میانگین رطوبت نسبی حدود ۵۰ درصد و نسبتاً ثابت بود.

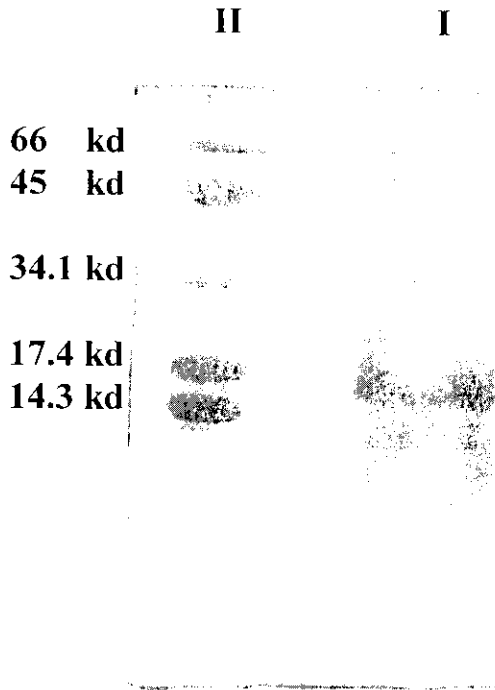


شکل ۱، حداقل دمای محیط در ارتفاع ۲۳۰۰ متر آتشفشان - کرج از شهریور تا اسفند ۱۳۷۸.  
Fig. 1, Minimum temperature of natural conditions in altitude of 2300 m Atashgah Karaj- Iran, in 1999-2000.

پروتئین‌های سن گندم محلول در اتانل ۵۰ درصد با استفاده از روش استخراج تهیه و خاصیت ضد یخی نمونه ناخالص اندازه‌گیری گردید. با توجه به اینکه نمونه پیرامونی دیالیز



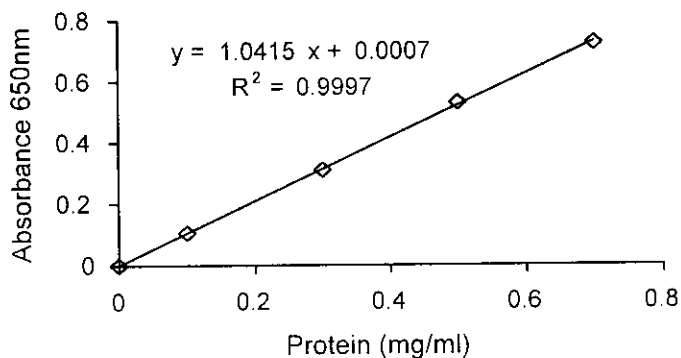
شده دارای خاصیت ضد یخی بود، نمونه به وسیله دستگاه فریزر درایر خشک گردید و ژل SDS-PAGE تهیه شد. چنانکه در (شکل ۲) دیده می‌شود این قسمت دارای پروتئین‌های متعددی است. مقدار پروتئین در این مرحله بر اساس روش سنجش پروتئین



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

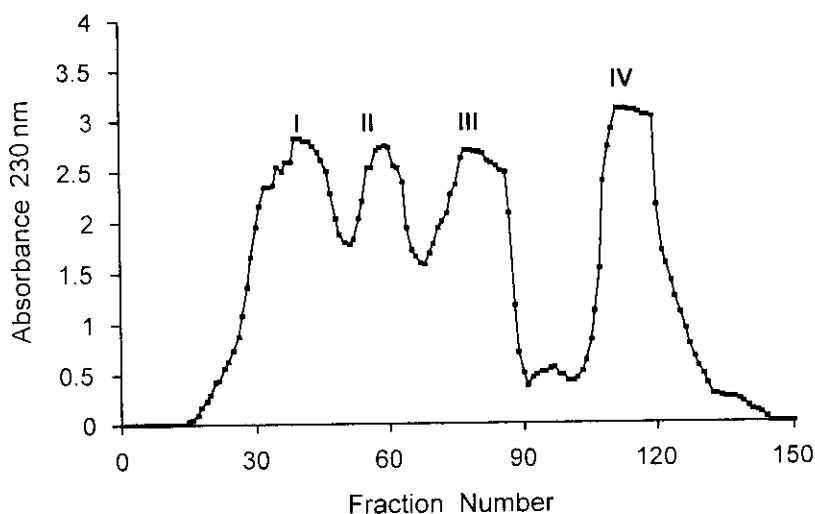
Fig. 2, Electrophoretical profile of dialysate proteins (I) and standard molecular weight proteins (II).

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 ۴). کروماتوگرام چهار پیک را نشان داد که به ترتیب IV-I نام‌گذاری شدند. نمونه‌های پیک IV-I



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

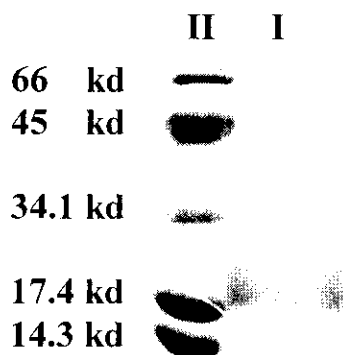
Fig. 3. Standard protein curve of Bovine Serum Albumin (BSA) prepared in 0.05, 0.3, 0.5 and 0.7 mg/ml to measure Dialysate proteins and antifreeze protein of Sunn pest.



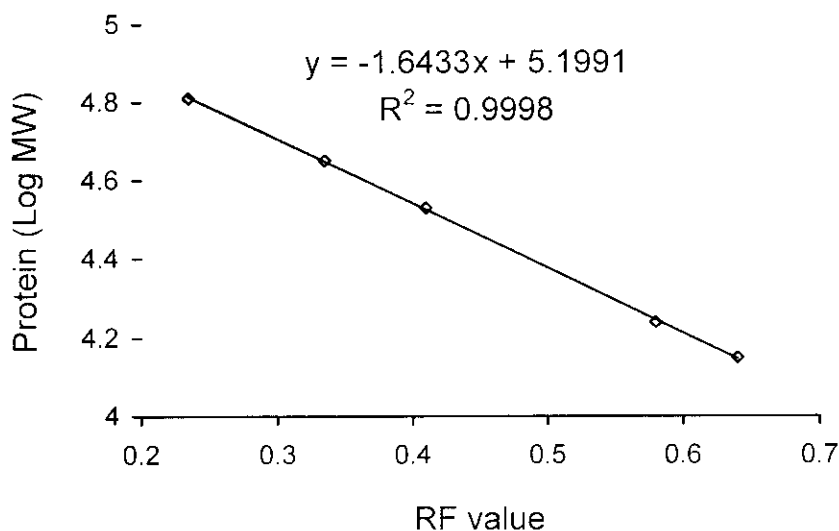
شکل ۴، کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی DEAE سفادکس، ۳۰۰ میلی گرم پروتئین استخراج شده با اتانل از نمونه‌های سن گندم جمع‌آوری شده در فصل زمستان ۱۳۷۸. فقط جدایه IV دارای خاصیت ضد یخی می‌باشد.

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.

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 ضد یخی فقط در پیک شماره IV مشاهده می‌شود که به میزان  $3/8^{\circ}\text{C}$  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  $3-5^{\circ}\text{C}$  گزارش شده است (Duman, et al., 1991). که در مقایسه با پروتئین‌های ضد یخ ماهی‌ها با حدود  $2/2^{\circ}\text{C}$ ، 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 استاندارد وزن مولکولی (II)  
 Fig. 5. Electrophoretical profile of antifreeze protein (I) and standard molecular weight proteins (II)

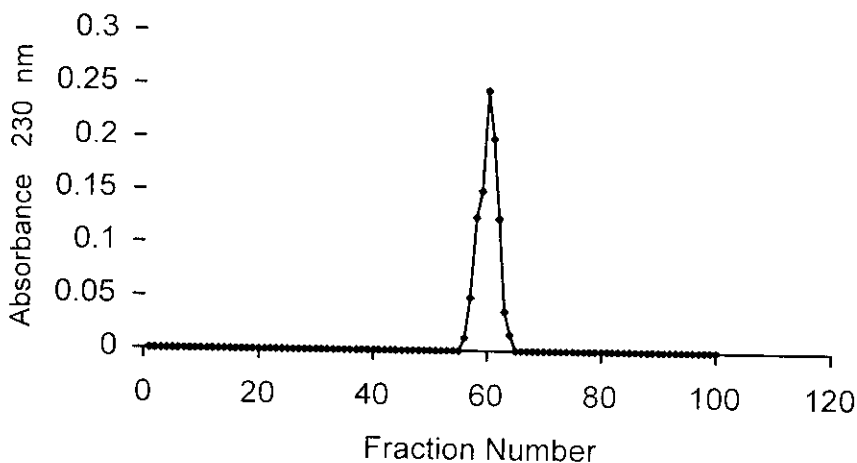


شکل ۶، مقادیر RF محاسبه شده برای پروتئین‌های استاندارد به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین ضد یخ سن گندم

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

مولکولی ۱۴-۶۶ kDa استفاده و بصورتی که در (شکل ۶) مشاهده می‌شود پروتئین مورد نظر وزن مولکولی حدود ۱۹ kDa را نشان داد. جهت اطمینان از خلوص بودن نمونه پیک IV بر روی ستون ژل فیلتراسیون سفادکس با خصوصیتی که در بخش روش‌ها بدان اشاره شد کروماتوگرافی گردید. بطوری که در (شکل ۷) مشاهده می‌شود پروتئین فقط یک پیک را نشان می‌دهد که فعالیت ضد یخی حدود  $4/4^{\circ}\text{C}$  را داشت.

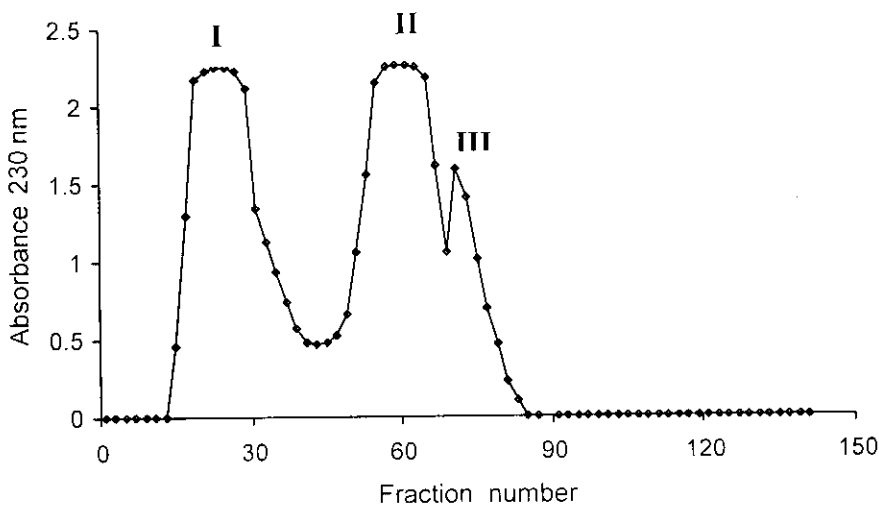
جهت مقایسه پروتئین‌های سن گندم در دوره تابستان نیز در شرایط مشابه پروتئین‌های محلول در اتانل از سن گندم جداسازی و به وسیله ستون DEAE سفادکس به اجزاء مربوطه تفکیک شدند. (شکل ۸) طرح کروماتوگرام نمونه تابستان را نشان می‌دهد. همانطور که مشهود است در این حالت سه پیک اصلی I - III وجود دارد و پیک IV کاملاً



شکل ۷، کروماتوگرام بدست آمده زمانیکه ۵ میلی گرم از پیک IV کروماتوگرام DEAE سفادکس (شکل ۲)، روی ستون ژل فیلتراسیون G-100 (۹۲×۲ سانتی متر) در تریس ۱/۱ مولار (pH=8) با ۱/۱ 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. اندازه گیری فعالیت ضد یخی مطابق آنچه برای نمونه های زمستان ذکر شد، هیچ یک از نمونه های پیک های I تا III فعالیت ضد یخی از خود نشان ندادند. تاکنون پروتئین های ضد یخ از گروه های مختلف حشرات که به راسته های 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 می باشد. یعنی در حالت یخ زده با مهار کریستاله شدن مجدد و نیز حفظ داخل سلول از مرگ حشره



شکل ۸، کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی DEAE سفادکس، ۳۰۰ میلی 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 کسرده 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 (C) (۴/۴) در زنده ماندن حشره بسیار مؤثر است. این که این پروتئین چه خصوصیتی دارد. خصوصیات بیوشیمیایی آن چیست و یا اینکه در کدام بخش از بدن حشره وجود دارد و سایر 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.

## سپاسگزاری

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

---

نشانی نگارندگان: مهندس احمد بغدادی، گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، صندوق پستی ۱۱-۱۴۱۱۵، دکتر عزرا ربیانی چادگانی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، دکتر غلامعباس عبداللهی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران، دکتر سعید محرمی‌پور، گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، صندوق پستی ۱۱-۱۴۱۱۵.