مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره اول، پیاپی بیست و یکم، تابستان ۱۳۹۶ (۲۳-۱۳)

بیان پروتئین شوک حرارتی Hsp70 تحت استرس دمایی در پونتوگاماروس دریای خزر (*Pontogammarus maeoticus*, Sowinsky 1894)

نسرین بازدیدوحدتی[1*]، کتایون کریم زاده[2]، عسگر زحمتکش[3]، فاطمه بازدیدوحدتی[4]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۳. استادیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان مرکز آموزش عالی علمی کاربردی علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان رشت، ایران

٤. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۲۷– تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/٥/۲۹)

چکیده

پروتئین‌های شوک حرارتی جزء خانواده بزرگی از پروتئین‌های وابسته به تنش و قابل القاء با استرس می‌باشد و موجودات زنده را از نوسانات موقتی شرایط زیست‌محیطی حفاظت می نمایند و سبب پایداری سایر پروتئین‌ها در موجود زنده می‌گردند. پونتوگاماروس دریای خزر (*Pontogammarus maeoticus*) از فراوان‌ترین آمفی پودهای سواحل جنوبی دریای خزر است. در این تحقیق، حضور پروتئین‌های شوک حرارتی در پونتوگاماروس دریای خزر در دو جنس نر و ماده در شرایط آزمایشگاهی در سطوح دمایی (۲۰، ۲۵، ۳۰) درجه سانتی‌گراد بررسی شده است. نمونه‌برداری از سواحل حسن رود استان گیلان انجام شد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش استاندارد برادفورد و آزمون الایزا صورت پذیرفت و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن استفاده شد. نتایج نشان داد که به موازات افزایش درجه حرارت، میزان پروتئین و جذب الایزا افزایش یافته است، به‌طوری‌که بیشترین میزان جذب الایزا در تیمار حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ٤ ساعت مشاهده شد. همچنین افزایش درجه حرارت بین ٥ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از حد اپتیمم منجر به ستنز پروتئین Hsp70 با وزن مولکولی ٦٦/٥ و ۹۰کیلو دالتون در هر دو جنس نر و ماده پونتوگاماروس گردید. به‌عبارتی نتایج این مطالعه بیانگر این است که با افزایش درجه حرارت میزان Hsp70 افزایش می یابد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، Hsp70، پونتوگاماروس، دریای خزر، دما.

The expression of heat shock protein (Hsp70) in *Pontogammarus* Caspian Sea under heat stress (*Pontogammarus maeoticus*, Sowinsky 1894)

Nasrin Bazdidvahdati[1], Katayoun Karimzadeh[2], Asgar Zahmatkesh[3], Fatemeh Bazdidvahdati[4]

1. Former M. Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Aquaculture, MirzaKoochak Khan Higher Education Center for Fishery Science and Technology, Rasht, Iran
4. Former M. Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Dec. 18, 2015 - Accepted: Aug. 20, 2017)

Abstract

Heat shock proteins belong to a big family of proteins which are heat-tension dependent and are inductable by heat-stress. They can save the living organisms against suddenly fluctuation of environmental conditions and cause the stability of other protein. *Pontogammarus maeoticus* is one of the most abundant amphipods at the south of Caspian Sea coast. In this study the presence of heat shock proteins in *Pontogammarus* (male and female species) by treating at laboratory conditions and levels of temperature (20, 25 and 30 ^{o}C) was investigated. Samplings were carried out at coast of Hassan Rood (guilan province). The levels of proteins were determined by Bradford and ELISA methods. Statical analyses of data were carried out by one-way ANOVA and Duncan test. The results showed that by temperature increasing, the levels of Heat- shock proteins and absorbtion of ELISA were increased and the highest absorbance was observed in treating at 30 ^{o}C after four hours. Increasing the treating temperature between 5 until 10 ^{o}C more than the optimal value causes the more synthesis of heat shock protein 70 with molecular weights of 66.5 and 90 KD both in male and female species of *Pontogammarus*. In other words the results of this study express that by increasing the temperature the level of heat shock protein 70 will be increasing.

Keywords: Caspian Sea, heat shock protein, Hsp70, *Pontogammarus*, temperature.

* نویسندهٔ مسئول: نسرین بازدید وحدتی E-mail: nasrin.vahdati1@yahoo.com

مقدمه

جنس پونتوگاماروس متعلق به رده مالاکوستراکا، راسته دوجورپایان و تیره گاماریده (Malacostraca; Amphipoda; Gamaridae) است (Chace *et al*., 1965; Fitzpatrick, 1983). این جنس اولین بار توسط Sowinsky (1904)، معرفی شد البته این محقق هیچ نامی از گونه‌های این جنس ذکر ننموده است تا اینکه Carau *et al*. (1995) به گونه *Pontogammarus maeoticus* اشاره نمودند.

P. maeoticus از فراوان‌ترین دوجورپایان سواحل جنوبی دریای خزر است و بررسی‌های انجام شده نشان داد که تقریباً در تمام آب‌های مناطق ساحل جنوبی دریای خزر، غیر از خلیج گرگان و گمیشان گونه *P. maeoticus* غالب بوده و تراکم آن در بسیاری از نقاط در حد ۱۰۰ درصد و در بسیاری از نقاط دیگر هم بیش از ۹۸٪ گزارش شده است (Mirzajani *et al*., 2005).

تمامی موجودات زنده، حیوانات، گیاهان یا میکروب‌ها به افزایش درجه حرارت به‌عنوان استرس، عکس‌العمل نشان می‌دهند. در رویارویی با استرس و حفظ هموستاز سلولی، مسیرهای درونی متعددی درگیر می‌باشند. یکی از مشخص‌ترین پاسخ‌های سلولی به استرس ، تولید یک گروه از پروتئین‌ها است که معروف به پروتئین شوک حرارتی هستند. پروتئین‌های شوک حرارتی در سلولهای نرمال وجود داشته و از ایجاد ساختمان فضایی نادرست که در اثر چین خوردن غلط پروتئین ایجاد می‌شود جلوگیری می‌کند ولی در اثر استرس‌های بیولوژیک افزایش یافته و در حفاظت سلول در برابر استرس مفید است (Gharibdoost *et al*., 2007). بعبارتی هدف از تولید این پروتئین‌ها برگرداندن هموستاز، ترمیم و حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های بیشتر است (Edit *et al*., 2009). پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsp)، خانواده‌ای از پروتئین‌های پایدار سلولی و یکی از عناصر اصلی سیستم حفاظتی موجودات زنده در برابر استرس هستند که وقتی شرایط محیطی تغییر می‌یابد آنها را قادر به بقا می‌سازد. به‌عبارتی به‌عنوان مهره‌های کلیدی هستند که امکان افزایش مقاومت موجود زنده به رنج وسیعی از استرس‌های محیطی را می‌دهند (Kultz, 2003). بسیاری از پروتئین‌های شوک حرارتی به‌طور مداوم بیان می‌شود و برخی با افزایش استرس، افزایش می‌یابند یا به‌عبارتی قابل القا با استرس هستند (Kline & Morimoto, 1997; Whitley, 1999).

پروتئین‌های شوک حرارتی گروهی از پروتئین‌های هومولوگ است که توسط یک خانواده مولتی ژن کد می‌شود و براساس اندازه و عملکرد به پنج گروه تقسیم می‌شود که عبارتند از: Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp27 و Hsp100. خانواده Hsp70 حساس‌ترین گروه این پروتئین‌ها به دما بوده و محافظت‌شده‌ترین ساختار را دارا هستند Hsp70 پروتئین‌هایی هستند که به ATP باند می‌شوند و در۸۰–۶۰ درصد سلول‌های یوکاریوتیک یافت شده‌اند و هم برای عملکرد و هم برای بقای سلول بعد از استرس‌ها، حیاتی و مهم می‌باشند (Kregel, 2002). Hsp70 یک پروتئین قابل القا توسط استرس است و نقش محافظتی در برابر استرس‌های اکسیداتیو بازی می‌کند (Irelan *et al*., 2007). به‌طوری‌که در زمان فقدان استرس، پروتئین‌های Hsp70 در حدود ۱٪ کل پروتئین‌های سلول و در زمان بروز استرس حدود ۲۰٪ کل پروتئین‌های سلول یوکاریوتی را شامل می‌شود (Norbakhsh & Rezaei, 2012).

اخیراً مطالعات گسترده‌ای بر روی بیان ژن و نیز شناسایی این دسته از پروتئین‌ها در موجودات آبزی و همچنین بر روی سه خانواده از این پروتئین‌ها (Hsp90، Hsp70، Hsp60) در ماهیان انجام گرفته است (Iwama *et al*., 1998). در دریای خزر تاکنون مطالعاتی در مورد پونتوگاماروس صورت گرفته است که از جمله آنها می‌توان به مطالعات انجام‌شده توسط Zahmatkesh (1992)، Yavari *et al*. (2010)،

Gholipour *et al.* (2011) و Azadkar & Langroudi Shabanipour (2014) اشاره کرد. همچنین مطالعات گسترده ای در جهان بر روی بیان ژن و نیز شناسایی پروتئین‌های شوک حرارتی در آمفی‌پودها توسط محققین مختلفی از جمله: Bedulina *et al.* (2010)، Nokanova & Iwama (2002)، Shatilina *et al.* (2010) و Shatilina *et al.* (2011) انجام شده است. اما تا به امروز مطالعاتی، بر روی شناسایی این دسته از پروتئین‌ها در پونتوگاماروس دریای خزر انجام نگرفته است. همچنین *P. maeoticus* جانوری خونسرد می‌باشد، لذا افت و خیز دمایی می‌تواند تأثیر بسزایی بر فرایندهای حیاتی بدن آن داشته باشد، لذا در این تحقیق سعی شده است تا شناسایی پروتئین شوک حرارتی Hsp70 در جنس‌های نر و ماده گونه پونتوگاماروس دریای خزر و تأثیر فاکتور درجه حرارت بر میزان القاء این پروتئین مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام آزمایش، نمونه‌های پونتوگاماروس از سواحل جنوبی دریای خزر، شهرستان حسن رود جمع‌آوری شدند.

در این تحقیق، نمونه‌های پونتوگاماروس از رسوبات ساحلی در ناحیه‌ای که در معرض امواج دریا قرار داشت توسط الک‌های ۰/۵ میلی‌متری با دست جمع‌آوری گردیدند. پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز آموزش علوم شیلاتی میرزا کوچک خان گیلان، نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی ۲۰ لیتری مجهز به هوادهی و حاوی آب دریا قرار داده شدند. جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه و کاهش استرس‌های وارده، پونتوگاماروس‌ها به‌مدت یک هفته در همان شرایط نگهداری شدند. در طول مدت نگهداری پونتوگاماروس‌ها در آزمایشگاه به منظور فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب و ممانعت از تلفات آنها، مراقبت‌های روزانه نظیر اندازه‌گیری درجه حرارت، pH، اکسیژن آب و همچنین تعویض آب و غذادهی پونتوگاماروس‌ها با مخمر و غذای ماهی انجام گرفت. پس از گذشت ۲ هفته از نگهداری پونتوگاماروس‌ها، ۴۵۰ عدد از جنس‌های نر و ماده در زیر لوپ از هم جدا شدند. جنس‌های ماده از طریق مشاهده فرورفتگی c شکل در ناحیه پشتی جانور بین بند ۵ و ۶، وجود صفحات نگهدارنده تخم، کوتاه‌تر بودن تارچه‌ها روی شاخک دوم از نرها جدا شدند و جنس‌های نر از طریق گناتوپود دوم بزرگ و مشخص قابل شناسایی بودند (Zahmatkesh, 1992). سپس جانوران به ظروف مجزا حاوی آب دریا با شوری طبیعی ۱۰ گرم در لیتر و مقدار کمی رسوب انتقال داده شدند.

جهت ارزیابی اثر دما، ابتدا آب دریا با دمای متفاوت شامل دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد آماده‌سازی شد. با توجه به سه سطح دمایی مورد استفاده در آزمایش از ۹ عدد ظروف پلاستیکی ۲ لیتری، در قالب ۳ تیمار (جنس‌های نر و ماده هر کدام به‌طور مجزا) و ۳ تکرار آماده شد و به هر یک از آنها ۵۰۰ میلی‌لیتر آب شور (۱۰، ۱۵، ۲۰) گرم در لیتر و رسوب تمیز اضافه گردید. گاماروس‌ها به تفکیک نر و ماده به تعداد ۲۵ عدد در هر ظرف پلاستیکی در تیمارهای مختلف دمایی قرار داده شدند. سپس بشرهای حاوی نمونه گاماروس (هر ۳ عدد بشر مربوط به هر تیمار حرارتی) در یک آکواریوم دارای بخاری الکتریکی و درجه حرارت مورد نظر قرار داده شدند و به مدت ۴ ساعت نگهداری گردیدند (شکل ۱). در طول دوره آزمایش از هر تیمار در زمان‌های مختلف ۰/۵، ۲، ۴ ساعت از تمام گاماروس‌هایی که بعد از استرس دمایی زنده ماندند، نمونه‌گیری انجام گرفت. سپس نمونه‌ها را داخل کیسه‌های پلاستیکی گذاشته و به فریز ۴۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان انجام آنالیز آزمایشگاهی در آنجا نگهداری شدند.

جهت سنجش میزان پروتئین، گاماروس‌های مورد آزمایش را از فریزر خارج کرده و عملیات هموژن و یکنواخت‌سازی بافت منجمد شده در بافر Tris-HCL با pH برابر ۷/۶ در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد انجام

پذیرفت. عصاره به‌دست آمده با سرعت (rpm) ۷۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی با دقت برداشته شده به میکروتیوب دیگری انتقال داده و به مدت ۵ دقیقه به روش قبلی مجدداً سانتریفیوژ و عصاره‌های تهیه شده، جهت انجام آزمایش سنجش پروتئین کل استفاده شدند. سنجش پروتئین کل، برطبق روش Bradford (1976) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. بدین منظور، حجم‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آلبومین گاوی در لوله‌های آزمایش ریخته شد و حجم هر یک از لوله‌ها با بافر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده نیز در لوله‌های آزمایش دیگری ریخته شد (در صورت لزوم رقیق شدند). ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به هر لوله اضافه گردیده محتویات لوله‌ها ۲ دقیقه با ورتکس مخلوط شد. سپس جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌های مجهول محاسبه شده و لوله فاقد پروتئین (لوله صفر) به‌عنوان لوله شاهد (بلانک) در نظر گرفته شد. همچنین برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات) استفاده شد. SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۲درصد و ژل متراکم‌کننده ۵ درصد به روش لاملی با بعضی تغییرات انجام گرفت (Laemmli, 1970).

شکل ۱. ظروف نگهداری نمونه گاماروس تحت استرس دمایی

سپس سنجش سطح پروتئین شوک حرارتی Hsp70 با روش الایزا توسط کیت اختصاصی شرکت Sigma ساخت کشور آلمان انجام گرفت. بدین منظور فراکسیون میتوکندیایی به‌عنوان آنتی‌ژن در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین (PBS) تهیه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنتی‌ژن در هر چاهک ریخته شد و میکروپلیت‌ها یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، محلول آنتی‌ژن تخلیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات نمکی حاوی توین ۰/۵درصد PBS–T یا محلول BSA ۲ درصد (سرم آلبومین گاوی) در هر چاهک ریخته شد و میکروپلیت‌های حاوی توین به‌مدت ۱۰ دقیقه و میکروپلیت‌های حاوی BSA به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس ۴ بار با (PBS–T) مورد شستشو قرار گرفتند. به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر مونوکلنال آنتی‌بادی ضد شوک حرارتی اولیه یا IgU خرگوشی در بافر PBS–T اضافه کرده و سپس یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار گرفتند. بعد از ۵ بار شستشو با PBS–T، ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه در PBS–T در هر چاهک ریخته شد و میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار گرفت. بعد از ۶ بار شستشو با PBS-T، ۱۰۰ میکرولیتر محلول تترامیل بنزیدین و آب اکسیژنه به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه، واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف و میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد (Karimzadeh *et al*., 2007).در این تحقیق کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد، در اولین مرحله، نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگن بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. سپس آنالیزهای آماری مربوطه از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار

Spss (version 18) انجام گرفت. در همه آزمون‌های آماری سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

نتایج

به منظور بررسی تأثیر دمای محیط بر میزان پروتئین شوک حرارتی در جنس‌های نر و ماده پونتوگاماروس، برخی از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب به تفکیک در مخازن نگهداری جنس نر و ماده در طی آزمایش مورد سنجش قرار گرفته است از آن جمله:

درجه حرارت

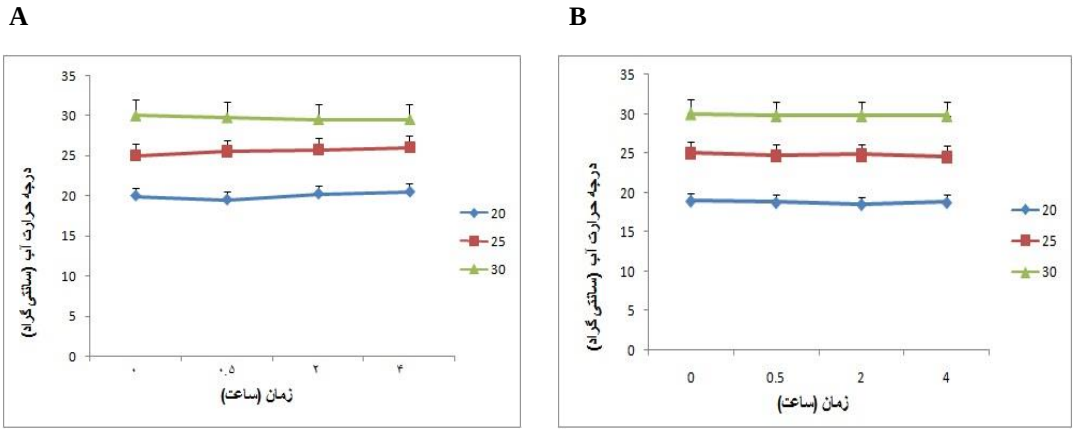
براساس نتایج به‌دست آمده میانگین درجه حرارت آب در تیمارهای مختلف در جنس نر به‌ترتیب ۰/۴± ۱۹/۷، ۰/۲±۲۵/۲ و ۰/۱± ۳۰/۷ و در جنس ماده به‌ترتیب ۰/۴±۱۹/۷، ۰/۳±۲۵/۱ و ۰/۲±۳۰/۰ است. همچنین بین میانگین میزان درجه حرارت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در هر ۲ جنس نر و ماده مورد آزمایش، میزان تغییرات درجه آب در طی زمان‌های مختلف بسیار ناچیز بوده و به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری از این لحاظ مشاهده نگردید (p>۰/۰۵) (شکل۱).

اکسیژن محلول

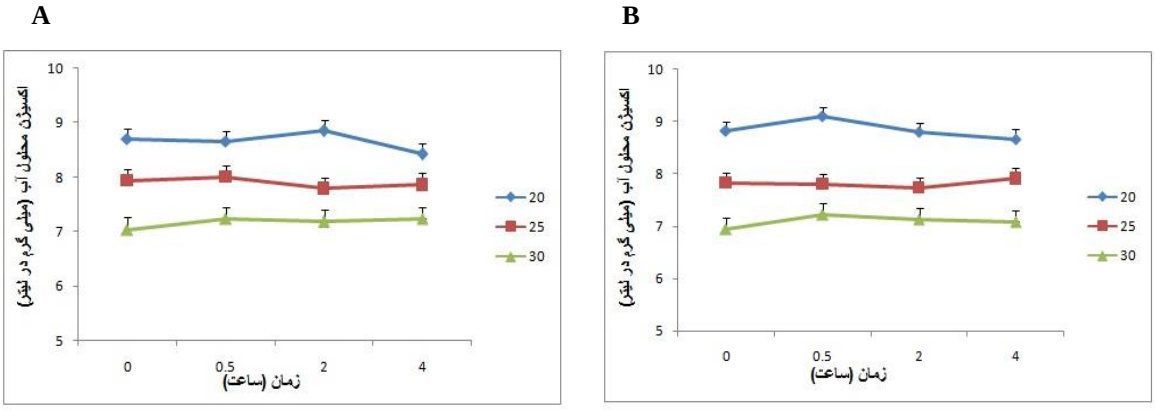
میزان اکسیژن محلول آب، در ۲ جنس نر و ماده مورد آزمایش، در تیمارهای حرارتی مختلف تغییرات اندکی را نشان داد (شکل ۳). به طوری که کمترین میزان اکسیژن محلول آب در تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد در جنس نر (۰/۱۴±۷/۰۴) و در جنس ماده (۰/۱۷± ۶/۹۵) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۲۰ درجه سانتی‌گراد در جنس نر (۰/۴۳± ۸/۷۵) و در جنس ماده (۰/۳۳± ۹/۰۰) مشاهده شد.

شوری آب

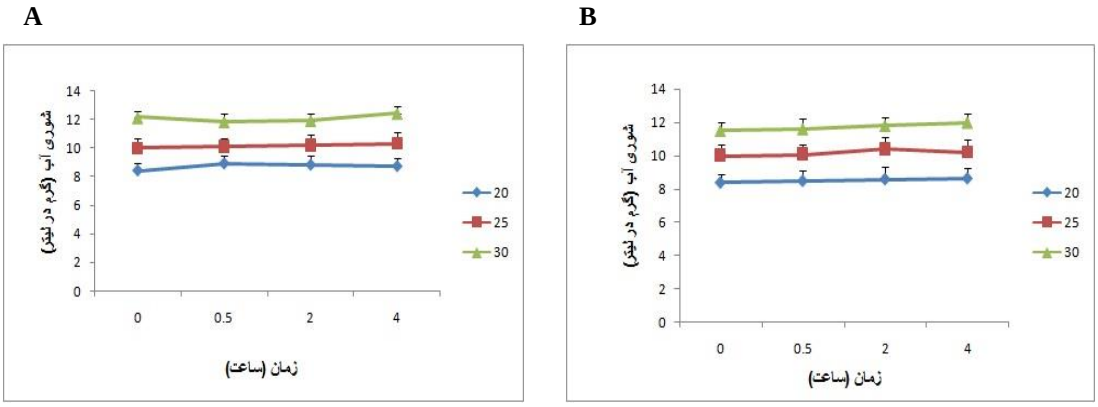
تغییرات میزان شوری آب درظروف حاوی گاماروس‌ها کاملاً عکس تغییرات میزان اکسیژن محلول است (شکل ۴). به طوری‌که کمترین میزان شوری آب در تیمار ۲۰ درجه سانتی‌گراد در جنس نر (۰/۱۲± ۸/۵) و در جنس ماده (۰/۰۷± ۸/۲) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد در جنس نر (۰/۱۷± ۱۲/۴) و در جنس ماده (۰/۰۳±۱۲/۰۱) مشاهده شد. همچنین در میزان شوری آب در مراحل زمانی مختلف تفاوت چندانی به چشم نخورد.



شکل ۲. تغییرات زمانی دمای آب در ظروف نگهداری گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در تیمارهای حرارتی مختلف، A= جنس نر، B= جنس ماده.



شکل ۳. تغییرات زمانی اکسیژن محلول آب در ظروف نگهداری گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در تیمارهای حرارتی مختلف، A= جنس نر، B= جنس ماده.



شکل ٤. تغییرات زمانی میزان شوری آب در ظروف نگهداری گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در تیمارهای حرارتی مختلف، A= جنس نر، B= جنس ماده.

پروتئین بدن

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در هر ۲ جنس نر و ماده مورد آزمایش، مقدار پروتئین کل بدن با گذشت زمان تغییر چشمگیری در تیمارهای حرارتی متفاوت نشان نداده است، همچنین بین میانگین میزان پروتئین در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است ($p>0/05$). روند تغییرات در نمونه‌های نر و ماده مشابه بوده و مقدار پروتئین بدن در همه نمونه‌های آزمایش شده با بالا رفتن درجه حرارت افزایش پیدا کرده است، به‌طوری‌که کمترین میزان پروتئین در جنس نر و ماده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب (۱۴/۵±۰/۵) و (۱۲/۱±۰/۴) بیشترین مقدار آن در جنس نر و ماده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب (۱۸/۲±۰/۶) و (۱۵/۸± ۰/۷) می‌باشد.

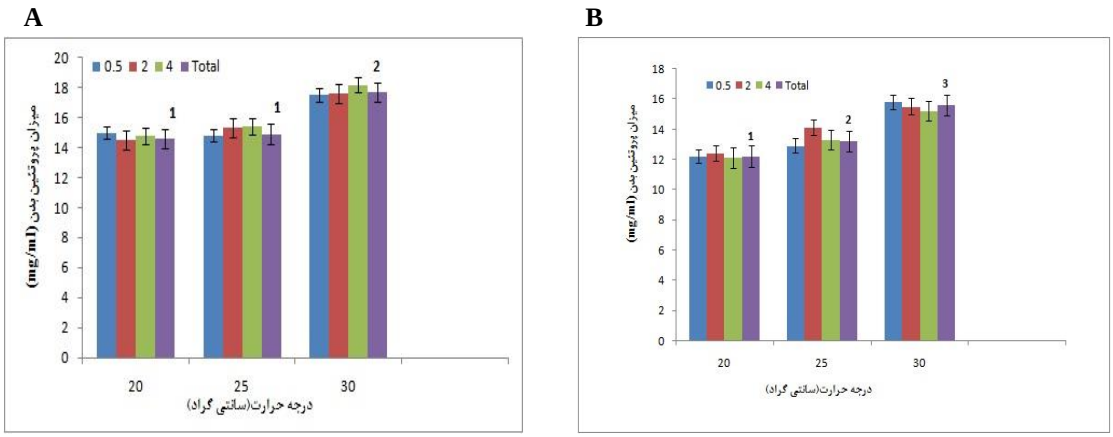
جذب الایزا

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، روند تغییرات در نمونه‌های نر وماده مشابه بوده، به‌طوری‌که میزان جذب الایزا در جنس نرو ماده، در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد، در طی زمان‌های مختلف دستخوش تغییر نگردید ولی در تیمار ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقدار این شاخص به موازات افزایش زمان، نوسان پیدا کرد. همچنین در تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد تغییرات بیشتری در میزان جذب الایزا مشاهده شده است. به طوری‌که نیم ساعت پس از قرار دادن گاماروس‌های نر و ماده در این دما، میزان جذب الایزا به‌ترتیب (Au/ml) ۰/۱ ±۰/۰۱ و (Au/ml) ۰/۱۹ ±۰/۰۶ و پس از گذشت ۲ ساعت از زمان آزمایش مقدار جذب آن به‌ترتیب (Au/ml) ۱/۲ ±۰/۰۳ و (Au/ml) ۱/۱۷ ±۰/۰۴

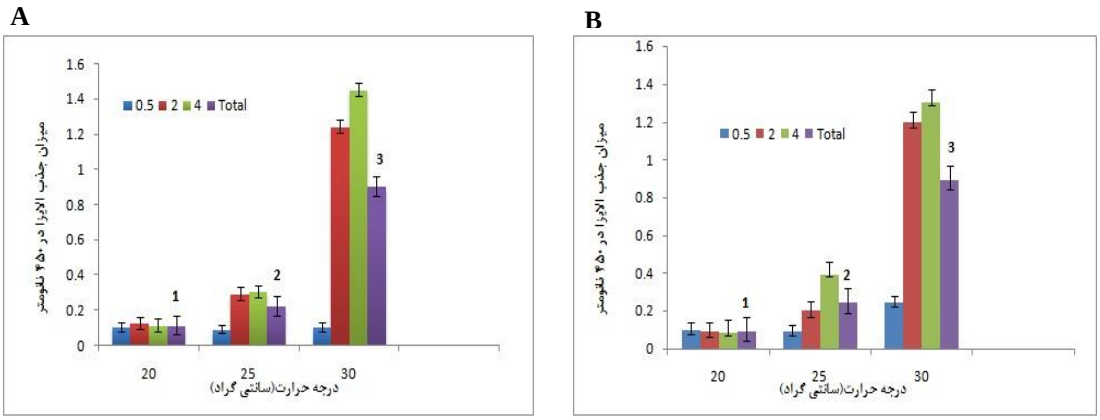
است. همچنین در گاماروس‌های نر و ماده پس از گذشت ۴ ساعت از زمان آزمایش مقدار آن به‌ترتیب (Au/ml) ۱/۴۶ ±۰/۱۱ و (Au/ml) ۱/۲۹ ±۰/۰۹ مشاهده شد. به‌عبارتی به موازات افزایش درجه حرارت و زمان، میزان جذب الایزا به نحو چشمگیری افزایش یافت. بدین صورت که میزان کل جذب الایزا در تیمار دمایی ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد درجنس نر به‌ترتیب (Au/ml) ۰/۱۱ ±۰/۰۲، (Au/ml) ۰/۲۳ ±۰/۱۲ و (Au/ml) ۰/۹۵ ±۰/۶۴ و در جنس ماده به‌ترتیب (Au/ml) ۰/۰۹ ±۰/۰۵، (Au/ml) ۰/۲۴ ±۰/۱۱ و (Au/ml) ۰/۸۹ ±۰/۶۱است.

اثر درجه حرارت بر روی محتوای Hsp70

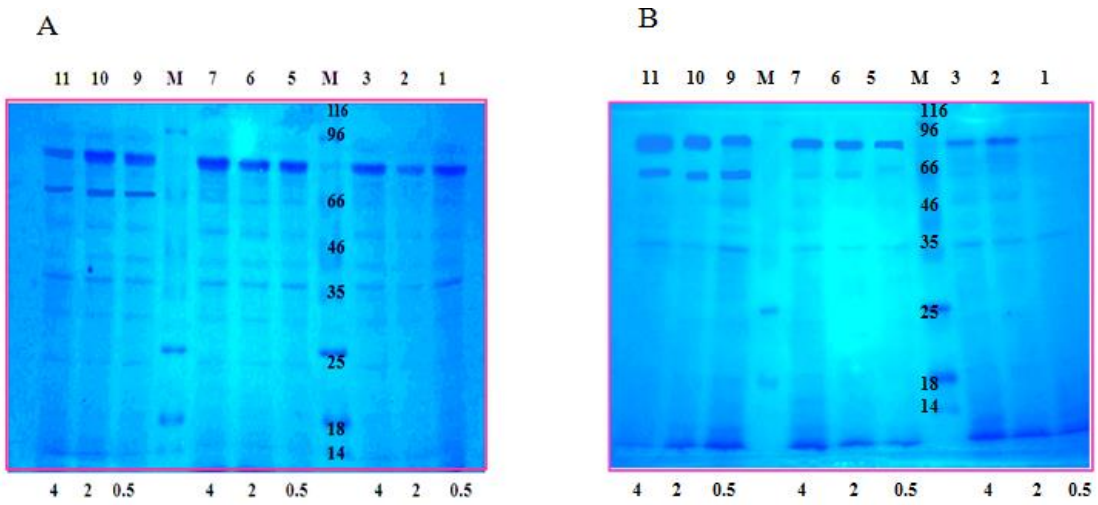
شکل ۷ سنتز ساختاری پروتئین‌های کل بدن گاماروس را نشان می‌دهد. در این مطالعه گاماروس‌های نر و ماده بدون استرس دمایی به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در نمونه‌های کنترل در محدوده ۶۶/۵ کیلو دالتون باندی مشاهده می‌شود که Hsp70 می‌باشد که در حالت طبیعی (کنترل)، مقدار آنها کم بوده، ولی در گاماروس‌های شوک حرارتی دیده شده، مقدار تولید آنها افزایش قابل چشمگیری داشته است. همانطور که مشاهده می‌شود علاوه بر حضور باند در محدود ۶۶/۵ کیلو دالتون، حضور باندهای قوی نیز با وزن مولکولی ۹۰ کیلو دالتون مشخص می‌باشد. به طوری‌که با افزایش درجه حرارت پس از سپری شدن زمان‌های ۲ و ۴ ساعت، میزان این باند بیشتر شده است.



شکل ۵. تغییرات مقدار پروتئین کل بدن در جنس گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در درجه حرارت‌های مختلف. A= جنس نر، B= جنس ماده (اعداد متفاوت نماینده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها درتیمارهای مختلف می‌باشد.)



شکل ٦. اندازه گیری میزان پروتئین شوک حرارتی در گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) و میزان جذب الایزا در درجه حرارت‌های مختلف A= جنس نر، B= جنس ماده. رقت کونژوکه ۳۰۰۰ و رقت مونوکلنال آنتی‌بادی ۳۰۰ می‌باشد (اعداد متفاوت نماینده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها درتیمارهای مختلف می‌باشد).



شکل ۷. تفکیک پروتئین‌های کل بدن گاماروس با استفاده از SDS-PAGE، A= جنس نر، B= جنس ماده (شوک حرارتی ^{0C} ۲۵ (۵، ۶ و ۷)، شوک حرارتی ^{0C} ۳۰ (۱۰و۹)، کنترل (۱،۲،۳). ستون M مارکرها به‌ترتیب از بالا به پایین با اوزان ۱۱۶، ۹۶، ۶۶، ۴۶، ۳۵، ۲۵،۱۸، ۱۴ کیلو دالتون را نشان می‌دهد.)

بحث و نتیجه گیری

امروزه موجودات زنده در معرض تنش‌های جهانی و محلی قرار دارند که می‌توان به آلاینده‌های زیست محیطی و تغییرات درجه حرارت اشاره کرد (Morimatoo, 1998). در معرض قرارگیری موجودات زنده با این عوامل استرس‌زا منجر به تغییر در بیوشیمی و فیزیولوژی موجود زنده می‌گردد. افزایش درجه حرارت به‌صورت حاد که به آن پروتئین شوک حرارتی نیز گفته می‌شود منجر به تغییرات بسیاری در بدن موجودات می‌گردد. درجه حرارت مهمترین فاکتور مؤثر در پراکنش زیستی– جغرافیایی آبزیان می‌باشد، و از آنجایی که وضعیت فیزیولوژیک آبزیان بستگی به درجه حرارت محیط دارد، تغییرات روزانه و فصلی دردرجه حرارت برروی زندگی آبزیان تأثیر می‌گذارد (Basu *et al.*, 2003). با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، یک رابطه معکوسی میان درجه حرارت آب با اشباعیت اکسیژن در آب مشاهده شده است. مشابه با این نتایج توسط Lazur (2007) گزارش شده است.

تغییر میزان پروتئین برای درک تأثیر تنش بر روی پروتئولیز و سنتز پروتئین مهم است (Santos & Caldeira, 1999). با توجه به نتایج این تحقیق، افزایش درجه حرارت سبب افزایش میزان پروتئین کل بدن نمونه‌های پونتوگاماروس می گردد. نظیر همین نتایج در مطالعه ای که بر روی خرچنگ *Portunus pelagicus* انجام گرفت گزارش شده است به‌طوری‌که میزان پروتئین کل و گلوکز در همولنف این موجود، با افزایش درجه حرارت، افزایش یافت (Sugumar & Vasu, 2013).

شوک حرارتی منجر به بروز تغییر ناگهانی در سلول‌ها و بافت‌های موجود زنده به درجه حرارت می‌گردد (البته تغییر درجه حرارت بایستی زیر حد کشنده باشد)، همچنین شرایط پر استرس، بیان ژن‌های Hsps (پروتئین‌های شوک حرارتی) به‌ویژه Hsp70 (پروتئین شوک حرارتی ۷۰) را در سطح سلول فعال می‌کنند (Ackerman & Iwama, 2001). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در الگوی الکتروفورز پونتوگاماروس‌ها در پاسخ به شوک حرارتی، پروتئین‌های زیادی با وزن‌های مولکولی متفاوت دیده می‌شوند که برخی از این پروتئین‌ها از نظر موقعیت و تراکم باند مشابه به همدیگر هستند، اما باندهای پروتئینی با محدوده وزنی ۶۶/۵ و ۹۰ کیلو دالتون از تراکم و شدت بیشتری برخوردارند. همچنین در

پونتوگاماروس‌ها سنتز ساختاری Hsp70 وجود دارد که پس از در معرض قرار گیری حرارت، میزان این پروتئین‌ها زیاد می‌شود. الگوی پروتئینی در این گونه (جنس نر و ماده) با سایر آبزیان و حتی پستاندران تشابه زیادی دارد. Shatilina *et al*. (2010) پس از شوک حرارتی در دمای ^{o}C ۳۰ در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱ و ۳ ساعت، پروتئینی در محدوده وزنی ۶۶/۲ کیلودالتون درآمفی‌پود *Gammarus lacostris* گزارش کردند و تراکم این باند در گونه های مورد شوک، نسبت به نمونه‌های تیمار نشده قابل توجه بوده است، همچنین میزان Hsp70 پس از ۳ ساعت شوک افزایش یافته ولی ماکزیمم افزایش سنتز در ۲۴ ساعت گزارش گردیده است. همچنین طبق بررسی‌های صورت گرفته بر روی آمفی‌پود *Eulimnogammarus cyaneus*، سنتز Hsp70 را گزارش کردند که پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای ۲۵، افزایش تدریجی میزان Hsp70 در محدوده وزنی ۶۶/۲ کیلودالتون مشاهده گردید.

تفاوت در پاسخ شوک حرارتی در بین گونه‌های مختلف معمولاً وابسته به طیف متفاوت حرارتی قابل تحمل در گونه‌ها می‌باشد (Nakano & Iwama, 2002).

طی مطالعه‌ای Shatilina *et al*. (2011) گزارش کردند که نقش پروتئین‌های شوک حرارتی، در تحمل حرارتی آمفی‌پودهای آب شیرین در زیستگاه‌های مختلف متفاوت می‌باشد که این تفاوت در میزان بیان پروتئین شوک حرارتی آشکار می‌گردد. به‌طوری‌که گونه‌های مقاوم و حساس الگوهای متفاوت از میزان القا این پروتئین نشان می‌دهند و با آزمون تعیین دز کشندگی حرارتی، میزان مقاومت ناجور پایان مشخص می‌گردد. تغییرات فصول و نیز نسل‌ها، ممکن است در میزان تحمل حرارتی آمفی‌پودا مؤثر بوده باشند در گونه‌های مقاوم به حرارت در مقایسه با گونه‌های حساس به حرارت، حتی در شرایط کنترل، یعنی در غیاب استرس دمایی، حفظ سطوح بالاتر Hspها انتظار می‌رود. این پدیده تنها در Hsp70 و به‌طور ویژه در گونه مقاوم به حرارت *Gammarus fasciatus* مشاهده شده بود. این یافته‌ها، این نتیجه را که سطح پایه Hsp70 یک پیش سازگاری با نوسانات محیطی رانشان می‌دهد، پشتیبانی می‌کند.

همچنین دراین تحقیق طبق بررسی‌های صورت گرفته بر روی گونه مقاوم به حرارت *P. maeoticus*، افزایش میزان Hsp70 زمانی که درجه حرارت افزایش یافت، مشاهده گردید که با نتایج حاصل از بررسی‌های دیگر مطابقت داشت (Berger & Elmet, 2007; Miller & Lennan, 1988).

پروتیئن‌های Hsp تا حدودی از عملکرد سلول در برابر نوسانات شرایط زیست‌محیطی حفاظت می‌کنند. در این راستا Hsp70 نسبت به خانواده Hsp کارآیی بیشتری در فعالیت به‌عنوان چاپرول مولکولی ارائه می‌کند. در این تحقیق حضور پروتئین Hsp70 در پونتوگاماروس به کمک آزمون شوک حرارتی مشاهده شد و طبق یافته‌های تحقیق می‌توان اظهار داشت افزایش درجه حرارت بین ۵ تا ۱۰ درجه بالاتر از اپتیمم درجه حرارت، منجر به سنتز پروتئین Hsp70 در هر دو جنس نر و ماده در پونتوگاماروس‌ها گردید. و پیشنهاد می‌گردد که در آینده آزمایش‌های طویل مدت در خصوص شوک حرارتی و سایر استرس‌های زیست‌محیطی از قبیل شوری در سنین و جنسیت و مراحل مختلف زندگی پنتوگاماروس انجام گیرد که در این خصوص مشخصات بیان Hsp در آمفی‌پود پنتوگاماروس یک وابستگی پیچیده به فاکتورهای فیزیولوژیک همانند فاکتورهای محیطی را آشکار می‌سازد که هنوز نیاز به مطالعه مفصل‌تری در مورد این پدیده است.

سپاسگزاری

از همکاری آقای دکتر علی اکبر (استاد دانشگاه گیلان) و کلیه اساتید و همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Ackerman, P. A.; Iwama, G. K.; (2001). Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. J. Aquat. Anim. Health.; 13; 173-180.

Azadkar Langroudi, Y.; Shabanipour, N.; (2014). Study on Gammarus species of the Caspian Sea (*Pontogammarus maeoticus*) using SEM images of mouthparts. Aquat. Physiol. Biotech.; 1(2); 81-93.

Basu ,N.; Todgham, A.E.; Ackerman, P.A.; Bibeau, M.R.; Nakano, K.; Schulte, P.M.; Iwama, GK.; (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. Gene; 295; 173-183.

BeduLina, D.S.; Zimmer, M.; Timofeyev, M.A.; (2010). Sub-Littoral and supra-Littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.; 155; 413-418.

Berger, M.S.; Emlet, R.B.; (2007). Heat-Shock Response of the Upper Intertidal Barnacle Balanus glandula: Thermal Stress and Acclimation. Biol. Bull.; 212; 232-241.

Bradford, M.M.; (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein-day binding. Annu. Biochem.; 72; 248-54.

Carau, S.; Dobreanu, E.; Manolache, C.; (1955). Amphipoda forme salmastre Side apadulce. Fauna Republ. Pop. Romine.; 4(4); 1-409.

Chace, F.A.; McKin, J.G.; Hubricht, L.; Banner, A.H.; Hobbs, H.H.; (1965). Malacostraca. In: Edmonson WT. (editor). Freshwater Biology. USA: John Wiley and Sons, Inc.; 1250.

Edit, M.P.; Megan, S.; Aadil Anand, N.; Kovin, C.; Jo-Ann, P.; (2009). The Effects of a Natural Anti-Inflammatory product on systemic. Markers of Inflammation following Downhill Rinning. Med. Sci. Sports. Exerc.; 41; 278-29.

Fitzpatrick, J.r.; Josef, F.; (1983). How to know the fresh water crustaceans: McGrow- Hill Higher Education VSA; 227.

Gharibdoost, F.; Samadi, F.; Taghipoor, R.; Akbarian, M.; Shahram, F.; Nadji, A.; Jamshidi, A.R.; Davatchi, F.; (2007). Heat shock protein 70 level of synovial fluid in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis: a comparative study. Tehran. Univ. Med. J.; 65(7); 28-31.

Gholipour, E.; Fathpour, H.; Mirzajani, A.R.; (2011). Seasonal changes in population of the amphipod *Gammarus aequicauda* in Miankaleh gulf-Iran. Iran. J. Biol .; 24(4); 558-565.

Ireland, H.E.; Leoni, F.; Altaie, O.; Bireh, C.S.; Colemon, R.c.; Williames, J.H.H. (2007). Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. Methods; 43; 176-183.

Iwama, G.K.; Thomas, P.T.; Forsyth, R.B.; Vijayan, M.M.; (1998). Heat shock protein expression in fish. Rev. Fish. Biol. Fish.; 8; 35-56.

Karimzadeh, K.; Mostafaei, A.; Esmaili Sari ,A.; Pourkazemi, M.; Zahmatkesh, A.; (2007). Induction and Purification of Cytochrome P4501A1 from ß-naphthoflavon- treated Beluga, Huso huso. J. Appl. Ichthyol.; 22; 221-225.

Kline, M.P.; Morimoto, R.I.; (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. Mol. Cell. Biol.; 17; 2107-2115.

Kregel, K.C.; (2002). Heat shock proteins Modifying Factors in physiological stress responses and acquired Thermo tolerance. J. Appl. Physiol.; 92; 2177-2186.

Kultz, D.; (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. J. Exp. Biol.; 206; 3119-3124.

Laemmli, U.K.; (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly

of the head of bacteriophage T4. Nature.; 227; 680-685.

Lazur, A.; (2007). JIFSAN Good Aquaculture Practices Manual. Section 6– Grow out Pond and Water Quality Management. Joint Institute for food safety and applied nutrition. University of Maryland; 12; 1-18.

Miller, D.; Lazu McLennan, A.G.; (1988). The heat shock response of the cryptobiotic brine shrimp *Artemia*. I. A comparison of the thermotolerance of cysts and larvae. J. Therm. Biol.; 13; 119-123.

Mirzajani ,A.; Kiabi, B.; Nezami, S.H.A.; (2005). Some ecological indices of the Caspian sea Amphipoda at different depths in Guilan offshore. Iran. J. Fish. Sci.; 5; 49-62.

Morimoto, R.I.; (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. Genes. Dev.; 12; 3788-3796.

Nakano, K.; Iwama, G.; (2002). The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderia* relationship of Hsp 70 and thermal tolerance. Comp. Biochem. Physiol.; 152(4); 433-43.

Norbakhsh, F.; Rezaei, S.; (2012). Heat shock protein: Tehran, Andisheh sara: 119.

Santos, C.V.; (1999). Caldeira G. Comparative responses of Helianthus annuus plants and calli exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic adjustment in intact plants and calli. J. Plant. Physiol.; 155; 769-777.

Shatilina, Z.H.M.; Pobezhimova, T.P.; Grabelnykh, O.I.; Bedulina, D.S.; Protopopva, M.V.; Pavlichenko, V.; Timofeev, M.A.; (2010). Heat shock proteins in the Mechanisms of stress Adaptation in Baikal Amphiphods and palearctic Gammaruse Lacustris sars. I. Hsp70 Family. Contem. Probl. Ecol.; 3(1); 41-49.

Shatilina, Z.H.M.; Riss, H.W.; Protopopova, M.V.; Trippe, M.; Meyer, E.I.; Pavlichenko, V.V.; Bedulina, D.S.; Axenov-Gribanov, D.V.; Timofeyev, M.A.; (2011). The role the heat shock proteins (Hsp70 and sHsp) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats. Therm. Biol.; 36; 142-149.

Sowinsky, V.K.; Vvedenie, V.; (1904). izuchenie fauny Ponto-Kaspiisko-Aralyskago Morskogo Basseina, razematrivaemoiego tochki erienija eamoetoja telynoi zoo geograficheskoi provinchie. Zapiski Kievskago Obshchestva Estestvoispytatelei; 18; 1-497. (in Russian)

Sugumar, V.; Vasu, P.; (2013). Effect of Temperature on the Biochemical constituents of the Blue Swimmer Crab Portunus pelagicus. World. Appl. Sci. J.; 28(3); 382-391.

Whitley, D.; Gold berg, SP.; Jordan, W.D.; (1999). Heat shock proteins a review of the molecular chaperones. J. Vasc. Surg.; 29; 248-251.

Yavari, L.; Shabanipour, N.; Heidari, B.; (2010). Assessing the optimum temperature for survival, growth and reproduction of adult Caspian Sea *Pontogammarus maeoticus.* Iran. J. Fish. Sci.; 19(3); 141-150.

Zahmatkesh, A.; (1992). Investigation Gammaridae Family Caspian Sea. Iran. J. Fish. Sci.; 4; 1-10.