دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۵، صفحه ۴۹۱ – ۴۸۱ (آذر و دی ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017; 20(5): 481-491

تخلیص پروتئین چسبنده fp-2 صدف دریایی بیسال‌دار (*Modiolus sp. PG*) از منشاء ساحل شمالی خلیج‌فارس

صبا حسینی (MSc)[۱]، حسین ذوالقرنین (PhD)[۱*]، افشار بارگاهی (PhD)[۲]، هدی خالدی (PhD)[۱]، نگین سلامات (PhD)[۱]، بیتا ارچنگی (PhD)[۱]

[۱] گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
[۲] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۹- پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۳۰)

چکیده

زمینه: دو کفه‌ای‌های ماسل، پروتئین‌های چسبناکی تولید نموده که امکان اتصال موجود به سطوح در محیط‌های آبی را فراهم می‌کنند. خواص ویژه نظیر چسبندگی، مقاومت و سازگاری زیستی، کاربرد این پروتئین‌ها را در مهندسی پزشکی و دندان‌پزشکی و ساخت چسب‌های بیولوژیک مطرح نموده است.

مواد و روش‌ها: با توجه به شاخص‌های مورفولوژیکی و توالی ژن COI دوکفه‌ای ماسل (*Modiolus sp. PG*) از منشاء خلیج‌فارس نمونه‌گیری شد. به منظور تأئید حضور غده‌های پلی‌فنلی مولد مواد پروتئین چسبنده، از بافت پای صدف مقاطع بافتی تهیه شد. سپس پروتئین fp-2 توسط روش‌های کروماتوگرافی تعویض یون با گرادیان نمک و pH و همچنین کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون خالص‌سازی گردید. جهت اثبات وجود پروتئین‌ها در هر فراکشن از تست Arnow و رنگ‌آمیزی اختصاصی NBT استفاده گردید. جهت تشخیص خلوص پروتئین در هر مرحله از تخلیص از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. پیک‌های کروماتوگرام دارای پاسخ مثبت نسبت به NBT پس از تغلیظ و الکتروفورز (به روش اسید- اوره) آنگاه به کاغذ نیتروسلولز بلات و توسط رنگ‌آمیزی NBT تأیید گردید.

یافته‌ها: مشخصات گونه‌شناسی و ریخت‌شناسی صدف بررسی و با کلیدهای شناسایی FAO و کتاب نرم‌تنان سواحل خلیج‌فارس ایران تطبیق گردید. نمونه مورد مطالعه متعلق به خانواده Mytilidae و از جنس Modiolus بود. توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی حاصل به ترتیب با شماره‌های AB972412.1 و BAP16437.1 در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. همچنین وزن مولکولی پروتئین fp-2 تقریباً معادل ۴۵ کیلو دالتون بود.

نتیجه‌گیری: این تحقیق منجر به شناسایی مورفولوژیکی و ژنتیکی صدف دوکفه‌ای خلیج فارس (Modiolus sp. PG) و تخلیص پروتئین چسبنده fp-2 گردید.

واژگان کلیدی: پروتئین چسبنده، پروتئین fp-2، ژن COI، صدف *Modiolus sp. PG*

[*] خرمشهر، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
Email: Zolgharnine@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

مقدمه

چسبندگی بیولوژیکی پدیده‌ای است که در بسیاری از جانداران دیده می‌شود. مثال‌هایی از موجوداتی که این مواد چسبنده را تولید می‌کنند باکتری‌ها (۱)، عنکبوتیان (۲)، کرم‌های حلقوی دریازی (۳)، خیارهای دریایی (۴)، کشتی چسب‌ها (۵) و صدف‌ها هستند. تشابه پلیمرهای طبیعی با ماکرومولکول‌های سازنده ماتریکس خارج سلولی بیانگر قابلیت ذاتی برخی از این بیوپلیمرها برای میانکنش با سلول‌ها و بیومولکول‌های موجود در بافت‌های میزبان بوده که در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی کمتر سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند (۶).

در میان ده‌ها هزار بیوپلیمر موجود در طبیعت، پروتئین‌ها به لحاظ بیوشیمیایی موادی بسیار پیچیده و ویژه‌تر هستند (۷). دسته‌ای از آنها دارای خاصیت چسبندگی طبیعی بوده که مدت‌هاست محققین در این زمینه تمرکز داشته‌اند. موجودات دریایی از جمله صدف‌ها و کشتی‌چسب‌ها مقادیر قابل توجهی چسب مقاوم به آب تولید می‌کنند. از آنجا که این مواد برای درمان در محیط‌های مرطوب بسیار کاربرد دارند لذا در سنتز بسیاری از مواد مورد استفاده در مهندسی پزشکی و دندانپزشکی مفید هستند. صدف‌ها پروتئین‌های پلی‌فنل چسبنده و اختصاصی را می‌سازند که در اتصال جانور به سطوح نقشی مهم و کلیدی ایفا می‌کنند. این پروتئین در غده فنل[1] در اندامی به نام پا ساخته شده شده و بصورت ساختاری رشته مانند قرار می‌گیرد (۸ و ۹).

وجه مشترک تمام پروتئین‌های چسبنده صدفی ، وجود اسیدآمینه ۴،۳ –دی‌هیدروکسی فنیل آلانین[2] یا به اختصار دوپا[3] می‌باشد. دوپا عنصری کلیدی در جذب شیمیایی جاندار به سطوح زیر آب است (۱۴–۱۰). این چسب‌های طبیعی هنگام عمل در زیر آب که محیطی متلاطم و با طیف گسترده‌ای از نوسانات رطوبتی، دمایی و شوری و همراه با تنش‌های مکانیکی جزر و مدی و جریانات آبی است، ویژگی‌های برجسته و منحصر بفردی از خود نشان می‌دهند (۱۵). این ویژگی‌های قابل توجه سبب جذابیت آنها در تولید چسب‌های بیولوژیک گردیده است.

از پروتئین‌های چسبنده صدف[4] یا MAPs در کشت سلول (۱۶) و به عنوان حامل‌های داروئی ریز کپسوله[5] شده با خاصیت خود اتصالی[6] در زمینه بیوتکنولوژی پزشکی و صنعتی، مهندسی بافت و زیست پزشکی استفاده می‌شود (۱۷). همچنین در ساخت توری‌های آغشته به چسب برای بستن زخم به جای روش‌های سنتی بخیه، گیره و بست[7] و میخ[8] از مشتقات MAPs استفاده می‌شود (۱۸).

هر بیسال از تعدادی رشته [9] تشکیل شده است. در انتهای هر رشته، یک پلاک چسبنده حاوی مواد چسبنده ضد آب وجود دارد که به پلاک امکان می‌دهد به سطوح سخت در محیط آبی متصل گردد (۱۹). به‌طور کلی هر بیسال شامل ۲۵ تا ۳۰ پروتئین مختلف است. حدود هفت تا از این پروتئین‌ها در پلاک حضور داشته ولی

[1] Phenol gland
[2] 3,4-dihydroxy-L-alanin
[3] DOPA
[4] Mussel Adhesive Proteins
[5] Micro-encapsulation
[6] Self-adhesion
[7] Staples
[8] Task
[9] Thread

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

فقط شش تای آنها مختص پلاک‌های چسبنده هستند (۸). اینها پروتئین‌های پایی[10] یا به اختصار fp بوده که همان شش پروتئین چسبنده صدفی (MAPs) هستند و به نام‌های fp1-6 معروف‌اند (۲۰).

ماسل‌ها عضو راسته‌ای بسیار بزرگ از جانوران به نام نرم‌تنان بوده که پس از بندپایان دومین گروه جانوری بزرگ را تشکیل می‌دهند. این راسته بالغ بر ۷۵۰۰۰ گونه داشته که ماسل‌ها عضو خانواده دوکفه‌ای‌ها هستند (۲۱). دو کفه‌ای‌های جنس Modiolus با نام عمومی ماسل اسبی شناخته می‌شوند. تغذیه آنها شامل باکتری‌ها، فیتوپلانکتون، ذرات غذایی معلق و ذرات آلی محلول می‌باشد. این موجودات در سواحل صخره‌ای و گاهی ماسه‌ای نواحی بین جزر و مدی، جایی که به شدت در معرض امواج پر قدرت قرار دارد، زندگی می‌کنند. اندام پا ماسل را قادر می‌سازد تا توسط رشته‌های بیسال به سطوح سخت بچسبد (۲۲).

لذا از آنجا که تاکنون در زمینه استخراج، تعیین توالی و شناسایی پروتئین‌های چسبنده صدف بیسال در ایران مطالعه‌ای صورت نگرفته و با توجه به عدم وجود اطلاعات پایه و اولیه در این زمینه ما را برآن داشت تا به بررسی این پروتئین‌ها در گونه جدیدی از این جنس که در سواحل خلیج‌فارس یافت شده بپردازیم. لذا که از این تحقیق جداسازی و شناسایی پروتئین چسبنده نوع fp-2 از بافت پای صدف دریایی بیسال‌دار *Modiolus sp. PG* می‌باشد

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری صدف در مرداد ماه ۱۳۹۴ در سواحل جزر و مدی شیب دراز (E" ۰ ۲۱ ۵۶، N"۰ ۵۱ ۲۶) در جزیره قشم با انجام غواصی و در عمق ۳ متری انجام شد. نمونه‌ها در تانک ازت به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر منتقل گردید و تا زمان تشریح، نمونه‌ها در فریزر ۸۰- نگهداری شد. از روش شناسایی مورفولوژیکی و ژنتیکی جهت مشخص نمودن جنس و گونه مورد مطالعه استفاده گردید سپس جهت مشاهده غده پلی‌فنلی از بافت پای صدف مقاطع بافتی تهیه شد و جهت رنگ‌آمیزی از رنگ‌های هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد. به منظور استخراج پروتئین پس از تشریح (شکل ۱) اندام پا جدا و بلافاصله در بافر استخراج کننده سرد (استیک اسید ۵ درصد) قرار گرفت. تمامی مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بر روی یخ انجام شد.



شکل ۱) تشریح و جداسازی اندام پای صدف

مقدار ۵ گرم از بافت پا در ۴۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۵ درصد و PMSF[11] یک میلی‌مولار به مدت ۱۲۰ ثانیه در دستگاه اولتراسونیک به‌منظور متلاشی ساختن سلول‌ها قرار داده شد و پس از آن نمونه به مدت دو دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر (UltraTurrax IKA ،T25) هموژن گردید. سپس در ۱۲۰۰۰×RPM به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی جدا و توسط اسید پرکلریک ۷۰ درصد اسیدی گردید. سپس به‌مدت ۳۰

[10] Foot protein
[11] phenylmethylsulfonyl fluoride،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

دقیقه بهم زده شده و در پایان این مرحله نمونه‌ها با دور RPM× ۱۲۰۰۰ به مدت یک ساعت مجدداً سانتریفیوژ شد. محلول رویی با کیسه دیالیز با قطر منفذ ۲۰۰۰ دالتون در حضور اسید استیک ۵ درصد دیالیز شد و سپس برای تغلیظ نمونه‌ها از فریز درایر استفاده گردید (۲۳). جهت تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد (۲۴)، جهت تأیید خلوص پروتئین استخراج شده از روش SDS-PAGE (۲۵) و همچنین جهت تأیید وجود پروتئین fp-2 از تست تشخیصی Arnow (۲۶) و رنگ‌آمیزی NBT (۲۷) استفاده گردید. آنگاه پس از اطمینان از حضور پروتئین fp-2 از روش‌های کروماتوگرافی به شرح ذیل جهت خالص‌سازی بیشتر استفاده گردید.

جهت کروماتوگرافی تعویض یونی بروش شیب pH از ستون کروماتوگرافی (۱/۶×۱۵ سانتی‌متر و رزین متیل سفادکس G-50) با استفاده از گرادیان کاهنده pH (از ۹ تا ۴) در بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، استفاده گردید. همچنین جهت کروماتوگرافی تعویض یون با شیب نمک نیز از ستون با مشخصات قبلی ولی از گرادیان فزاینده - ناپیوسته نمک NaCl با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱، و ۱/۵ مولار استفاده گردید.

جهت کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نیز از ستون کروماتوگرافی (XK16, GE HealthCare) به ابعاد ۱/۶×۷۰ سانتی‌متر و ژل سفادکس G-75 در بافر اسید استیک ۵ درصد و TFA ۰/۱ درصد استفاده شد.

هموژنای سلولی حاصل از استخراج پس از فیلتر نمودن بر ستون فوق برده شده و فراکشن‌های ۳ میلی‌لیتری، توسط فرکشن کالکتور (مدل Foxy-R1) جمع‌آوری گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی کروماتوگرام مربوطه رسم گردید. سپس فراکشن‌های منطبق بر پیک‌های مربوطه انتخاب و پس از دیالیز توسط اولترافیتراسیون (Viva Spin- 20) با قطر منفذ ۵۰۰۰ دالتون تغلیظ گردید (۲۸ و ۲۹). در نهایت جهت اثبات وجود پروتئین‌های پلی‌فنلی در فراکشن‌های به دست آمده از روش دات بلات (۳۰) استفاده گردید.

سپس فراکشن‌های حاوی پروتئین fp جمع‌آوری شده از کروماتوگرام فوق ابتدا بروش Urea-PAGE الکتروفورز و سپس توسط دستگاه الکتروبلات نوع Semi-dry بلات گردید (۳۰). جهت مشاهده باندهای پروتئینی انتقالی به کاغذ نیترو سلولز از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی اینگونه پروتئین‌ها یعنی روش NBT استفاده شد.

یافته‌ها

عمدتاً طبقه‌بندی تاکسونومیکی صدف‌های مایتیلید بر اساس ویژگی‌های ظاهری پوسته صدف در نمونه بالغ صورت می‌گیرد (۳۱). لذا جهت گونه‌شناسی صدف، خصوصیات ریخت‌شناسی مربوطه از جمله رنگ، اندازه، شکل صدف و غیره ثبت شده و سپس مشخصات مذکور با کلیدهای شناسایی FAO و کتاب نرم‌تنان سواحل خلیج‌فارس ایران از تجلی‌پور تطبیق داده شد که نمونه مورد مطالعه جزو خانواده Mytilidae و از جنس Modiolus بود (شکل ۲).



شکل ۲) صدف دریایی بیسال‌دار (*Modiolus sp. PG*)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

پس از استخراج DNA و انجام PCR نمونه‌ها تعیین توالی شد. توالی نوکلئوتیدی و پروتئین حاصل از آن به صورت توالی‌های جدیدی به ترتیب با شماره‌های AB972412.1 و BAP16437.1 در بانک اطلاعات NCBI ثبت و این گونه صدف با نام *Modiolus sp. PG* و جنس Modiolus طبقه‌بندی گردید.

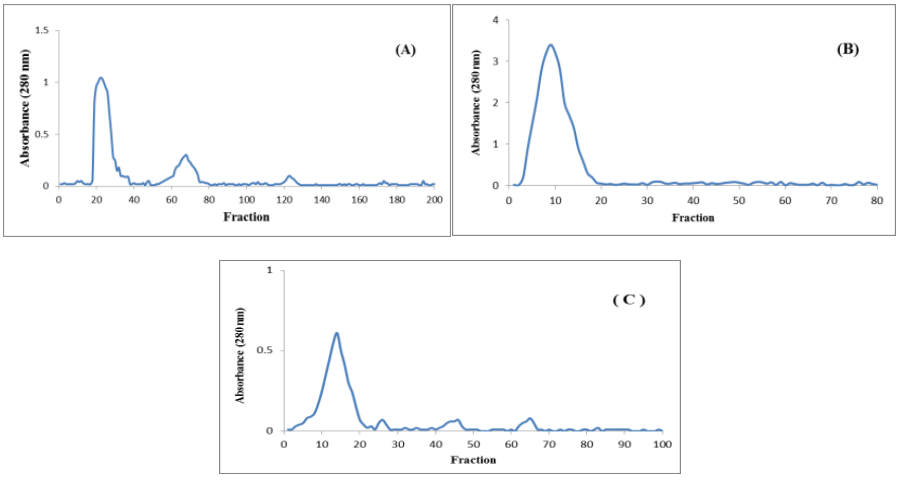
جهت تشخیص غدد پلی‌فنلی بافتی پس از مراحل تثبیت و رنگ‌آمیزی بافت پای صدف دریایی، مقاطع بافتی تهیه شده و تصویربرداری شد که تصاویر مبنی بر حضور غده فنلی در نمونه‌های بافتی در شکل ۳ آمده است.

پس از انجام مراحل استخراج هموژنای پروتئینی به‌دست آمده بروش برادفورد تعیین غلظت و سپس الکتروفورز SDS-PAGE گردید. برای شناسایی و تأیید وجود پروتئین‌های پلی‌فنلی در ژل از تست Arnow استفاده شد.



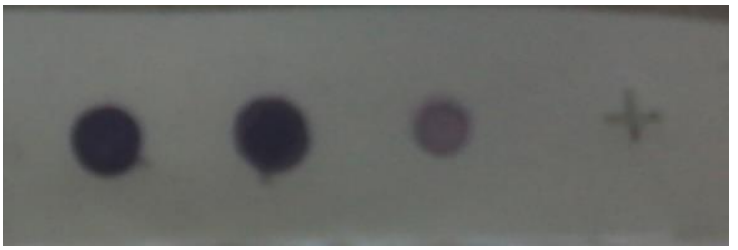
شکل ۳) مقطع بافت پا و غده پلی‌فنلی صدف *Modiolus sp. PG* رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین – ائوزین

سپس جهت خالص‌سازی پروتئین از کروماتوگرافی تعویض یونی با گرادیان pH و همچنین از کروماتوگرافی در حضور گرادیان غلظت فزاینده و ناپیوسته NaCl و سپس کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون استفاده شد (گراف‌های A, B, C از شکل ۴). آنگاه فراکشن‌های به‌دست آمده تغلیظ و تعیین غلظت و سپس بلات گردید (شکل ۵).



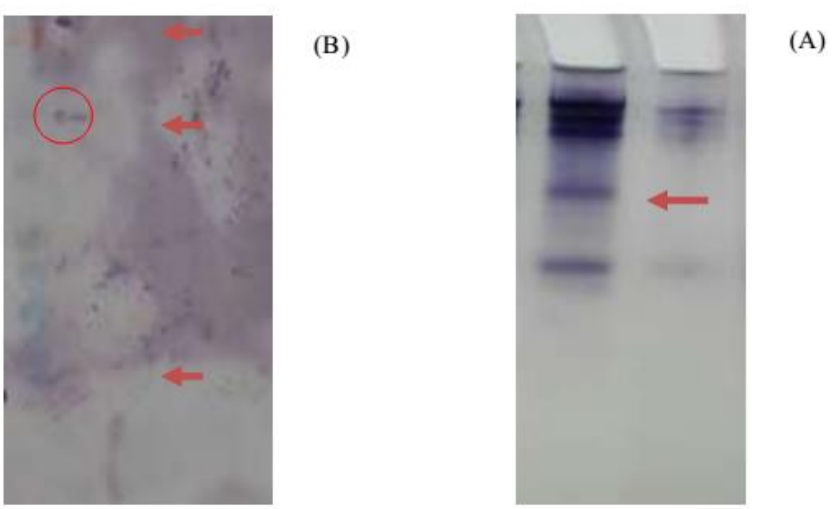
شکل ۴) (A) کروماتوگرام ژل فیلتراسیون (B) کروماتوگرام تعویض یونی با شیب pH و (C) کروماتوگرام تعویض یونی با شیب NaCl

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]



شکل ۵) دات بلات پروتئین‌های پلی‌فنلی رنگ‌آمیزی شده توسط NBT

پس از انجام الکتروفورز Urea-PAGE پروتئین‌ها الکتروبلات گردید و سپس به‌روش رنگ‌آمیزی اختصاصی NBT رنگ‌آمیزی شد. از طرفی خود ژل Urea-PAGE نیز مستقیماً رنگ‌آمیزی گردید (شکل ۶). فقط پروتئین‌های پلی‌فنلی با NBT رنگ‌آمیزی گردید. چون وزن مولکولی پروتئین fp-2 در صدف M. edulis معادل ۴۵ کیلو دالتون قبلاً گزارش شده بود (۳۲) لذا با توجه به وزن مولکولی گزارش شده و موقعیت پروتئین fp-2 در سایر جنس‌ها در اینجا باند مشخص شده حاوی پروتئین fp-2 بود.



شکل ۶) (A) الکتروفورز پروتئین‌های پلی‌فنلی به‌روش Urea-PAGE و (B) الکتروبلات پروتئین‌های پلی‌فنلی

بحث

تحقیقات انجام شده در زمینه استخراج، تعیین توالی و شناسایی پروتئین‌های چسبنده صدف بیسال عمدتاً گونه‌های خوراکی جنس Mytilus را در بر می‌گیرد که به وفور در اروپا و سایر نقاط پرورش داده می‌شوند. با این حال تحقیق و بررسی در مورد سایر گونه‌های خانواده Mytilidae می‌تواند به گسترش دامنه تحقیقات در زمینه جانداران مولد چسب‌های بیولوژیکی کمک نماید. لذا در مطالعه حاضر این پروتئین‌ها از بافت پا از صدف بیسال خالص‌سازی و مورد شناسایی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از شناسایی‌های مورفولوژی و مولکولی گونه صدف مورد مطالعه ما در جنس Modiolus قرار گرفت. در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن COI از صدف به عنوان توالی جدید بوده و با کدهای AB972412.1 و BAP16437.1 به‌ترتیب در بانک

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

اطلاعاتی NCBI ثبت گردید.

در روش‌های مختلف جداسازی پروتئین‌ها نوع بافر لیزکننده و نوع پروتئین هدف بسیار حائز اهمیت است. در اینجا نیز جهت استخراج پروتئین‌های مورد نظر چون دارای مقادیر بالایی از اسیدآمینه‌های قلیایی به ویژه DOPA می‌باشند به همین دلیل محیط اسیدی بهترین شرایط برای استخراج این نوع پروتئین‌ها از بافت پا می‌باشد (۳۳).

قبلاً جهت استخراج پروتئین‌های مذکور زائو و ویت (Zhao & waite) (۲۸، ۲۹ و ۳۴)، ویت (۳۳)، کان (Kan) و همکاران (۳۵)، دانر (Danner) و همکاران (۲۳) از روش استخراج سه مرحله‌ای استفاده کردند. در این روش پروتئین‌های چسبنده از یکدیگر به‌صورت سه دسته تفکیک شد بگونه‌ای که محلول S1 حاوی پروتئین‌های پلی‌فنلی نوع ۱، ۲ و ۶ بود. محلول S2 حاوی پروتئین پلی‌فنلی نوع ۳ و محلول S3 حاوی پروتئین پلی‌فنلی نوع ۵ بود. در پژوهش حاضر نیز از روش فوق با اندکی تغییرات استفاده شد. مزیت انتخاب روش مذکور این بود که تا حدودی باعث تفکیک پروتئین‌های پلی‌فنلی از یکدیگر شده و در نتیجه از میانکنش‌های این پروتئین‌ها با یکدیگر که خالص‌سازی را مشکل می‌کرد تا حدودی کاسته گردید. از آنجا که ۲۵ درصد وزن خشک هر پلاک را پروتئین fp-2 تشکیل می‌دهد لذا این فراوان‌ترین پروتئین چسبنده موجود در هر پلاک است. این پروتئین ۴۵ کیلو دالتون وزن دارد (۳۶). در این پژوهش چون هدف اصلی جدا سازی پروتئین نوع fp-2 بود. بدین منظور از روش استخراج چند مرحله‌ای که جهت استخراج کل اینگونه پروتئین به‌کار می‌رفت تا فقط مرحله اول جهت صرفه جویی انجام پذیرفت. زیرا محلول رویی مرحله اول (S1) حاوی پروتئین‌های پلی‌فنلی نوع ۱، ۲ و ۶ می‌باشد و پروتئین مورد نظر ما (fp-2) در این مرحله اولیه استخراج گردید.

تست Arnow جهت تشخیص پروتئین‌های کینونی نظیر دوپا (۳، ۴- Dihydroxyphenylalanine) به‌کار می‌رود. رزپکی (Rzepecki) و همکاران (۳۷) و همچنین چویی (Choi) و همکاران (۳۸) جهت شناسایی این پروتئین‌ها از این تست استفاده کردند. نتایج رنگ‌آمیزی در این پژوهش با نتایج آنها تشابه داشت. زیرا رنگ‌آمیزی NBT جهت تشخیص کیفی پروتئین‌های کینونی بگونه ای ختصاصی بوده که سایر پروتئین‌ها با این روش رنگ نمی‌گیرند (۲۷). حساسیت این تست در حد نیم میکروگرم DOPA در میلی‌لیتر است (۲۶). زائو و ویت (۲۹ و ۳۴)، ویت (۳۳) دانر و همکاران (۲۳) چویی و همکاران (۳۸) از این روش برای شناسایی این پروتئین‌ها استفاده کردند که نتایج مطالعه ما با نتایج پژوهش آنها همخوانی داشت.

در هنگام خالص‌سازی بروش کروماتوگرافی تعویض یونی با شیب pH و شیب نمک پروتئین‌ها با یکدیگر برهمکنش و رسوب داده و بیشتر پروتئین‌ها در یک پیک خارج شدند که مانع از جداسازی آنها با این روش گردید و این مشکل با گزارش حاصل از پژوهش چویی و همکاران مشابه بود (۳۸). آنها مشکلات ناشی از خالص‌سازی پروتئین cofp-151 را بدلیل خاصیت چسبندگی پروتئین‌ها به یکدیکر دانستند. یعنی به علت اینکه cofp-151 اتصال قوی با یکدیگر ولی اتصال ضعیف با رزین و بستر ستون برقرار می‌کرد فرایند خالص‌سازی پروتئین cofp-151 تحت شرایط نرمال با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون موفقیت‌آمیز نبود. در اینگونه موارد خالص‌سازی پروتئین‌های چسبنده صدف با ستون ژل فیلتراسیون سفادکس محصول بهتری داده و اگر از بافر شستشو دهنده برای خروج پروتئین‌ها

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

با pH پایین (۴-۲) و دترجنت کاتیونی استفاده گردد بازده محصول افزایش بیشتری می‌یابد (۱۹). لذا در این تحقیق حاضر از ستون سفادکس G-75 استفاده شد و برای شستن ستون از استیک اسید ۵ درصد و TFA (تری فلورواستیک اسید) استفاده شد که pH آن معادل ۲/۷ بود. در اینجا هدف از استفاده از این بافر جهت جلوگیری از اتصال پروتئین‌ها به یکدیگر بود. زیرا پروتئین‌ها در این pH خاصیت چسبندگی خود را از دست داده که نهایتاً در اینجا پروتئین‌ها در سه پیک در کروماتوگرام از یکدیگر جدا گردید. در اینجا بر اساس نتایج به‌دست آمده از دات بلات و رنگ‌آمیزی NBT حضور این پروتئین‌ها در پیک‌های کروماتوگرام اثبات گردید. البته وجود پروتئین‌های پلی‌فنلی در هر سه پیک قابل انتظار بود زیرا در عصاره خام سه نوع از این پروتئین‌ها (fp1، fp2 و fp6) وجود دارد که هریک دامنه وزن مولکولی کاملاً متفاوتی داشت.

البته با این هدف زائو و ویت (۲۹ و ۲۸ و ۳۴)، ویت (Waite)(۳۳) کان (Kan) و همکاران (۳۵) دنر (Danner) و همکاران (۲۳) برای خالص‌سازی برخی از پروتئین‌های پلی‌فنل قبلاً از روش کروماتوگرافی HPLC به کمک ستون Shodex استفاده کردند. با توجه به اینکه از جنس Modiolus برای اولین بار این پروتئین‌ها استخراج شده است لذا برای پی بردن به موقعیت این پروتئین‌ها پس از الکتروفورز نوع Urea-PAGE از روش الکتروبلات و رنگ‌آمیزی NBT جهت شناسایی استفاده شد.

سوچانک (Suchanek) نشان داد که با وجود همولوژی پروتئینی، قدرت چسبندگی صدف M. californianus به سطح بستر به دلیل متلاطم‌تر بودن شرایط زیستی، چهار برابر بیش از صدف *M. edulis* است (۳۹). لذا احتمال می‌گردد که در سایر اعضای خانواده Mytilidae از جمله صدف مورد مطالعه ما نیز استحکام و چسبندگی متفاوت و بهتری نسبت به گونه‌های رایج وجود داشته باشد. با توجه به تفاوت ژنتیکی دو جنس Mytilus و Modiolus و همچنین فاصله جغرافیایی گونه مورد مطالعه ما با گونه‌های مذکور، می‌توان انتظار داشت که پروتئین‌های چسبنده صدف حاصل از گونه مورد ما از نوعی باشد که دارای اختلاف توالی ژنتیکی با سایر توالی‌های ثبت شده باشد. تعداد پروتئین‌های fp2 ثبت شده در بانک‌های پروتئینی NCBI و UniPort بسیار محدود است. به‌طور کلی در بانک UniPort تعداد ۶۸ پروتئین چسبنده با منشاء صدف‌ها ثبت شده که چهار کد مربوط به پروتئین fp2 از گونه‌های *M. edulis* و *M. galloprovincialis* بوده که همگی این صدف‌ها از جنس Mytilus می باشند.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر منجر به شناسایی مورفولوژیکی و ژنتیکی گونه دوکفه‌ای (Modiolus sp. PG) مولد پروتئین‌های چسبنده از منشاء آب‌های خلیج‌فارس و تخلیص پروتئین fp-2 از آن گردید.

سپاس و قدردانی

مطالعه حاصل از پروژه تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر بوده که با همکاری علمی و فنی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دریایی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام پذیرفت. از همکاران آزمایشگاهی و تیم غواصی جهت مساعدت و ارائه تسهیلات فنی و علمی مورد نیاز تشکر می‌گردد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

References :

1.Tsang PH, Li G, Brun YV, et al. Adhesion of single bacterial cell in micronewton range. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(15): 5764-8.
2.Vollrath F. Strength and structure of spiders' silks. J Biotechnol 2000; 74(2): 67-83.
3.Stewart RJ, Weaver JC, Morse DE, et al. The tube cement of Pharamatopoma californica: a solid foam. J Exp Biol 2004; 207(Pt 26): 4727-34.
4.DeMoor S, Waite JH, Jangoux M, et al. Characterization of the adhesive from cuvierian tubules of the sea cucumber holothuria forskali (echinodermata, holothuroidea). Mar Biotechnol (NY) 2003; 5(1): 45-57.
5.Kamino K, Inoue K, Maruyama T, et al. Barnacles cement proteins. Importance of disulfide bonds in their insolubility. J Biol Chem 2000; 275(35): 27360-5.
6.Silva SS, Mano JF, Reis RL. Potential applications of natural origin polymer-based systems in soft tissue regeneration. Crit Rev Biotechnol 2010; 30(3):200-21.
7.Heim M, Römer L, Scheibel T. Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins. Chem Soc Rev 2010; 39(1): 156-64.
8.Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, et al. Mussel-inspired adhesives and coatings. Annu Rev Mater Res 2011; 41: 99-132.
9.Strausberg RL, Link RP. Protein-based medical adhesives. Trends Biotechnol 1990; 8(2): 53-7.
10.Cranford SW, Tarakanova A, Pugno NM, et al. Nonlinear material behaviour of spider silk yields robust webs. Nature 2012; 482(7383): 72-6.
11.Qin Z, Cranford S, Ackbarow T, et al. Robustness-strength performance of hierarchical alpha-helical protein filaments. Int J Appl Mech 2009; 1(1): 85-112.
12.Sen D, Buehler MJ. Structural hierarchies define toughness and defect-tolerance despite simple and mechanically inferior brittle building blocks. Sci Rep 2011; 1: 35.
13.Waite JH. The DOPA ephemera: a recurrent motif in invertebrates. Biol Bull 1992; 183(1): 178-84.
14.Qin Z, Buehler MJ. Impact tolerance in mussel thread networks by heterogeneous material distribution. Nat Commun 2013; 4: 2187.
15.Deming TJ. Mussel byssus and biomolecular materials. Curr Opin Chem Biol 1999; 3(1): 100-5.
16.Hwang DS, Gim Y, Yoo HJ, et al. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. Biomaterials 2007; 28(24): 3560-8.
17.Lim S, Choi YS, Kang DG, et al. The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins. Biomaterials 2010; 31(13): 3715-22.
18.Murphy JL, Vollenweider L, Xu F, et al. Adhesive performance of biomimetic adhesive-coated biologic scaffolds. Biomacromolecules 2010; 11(11): 2976-84.
19.Waite JH. Evidence for a repeating 3, 4-dihydroxyphenylalanin-contaning and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel Mytilus edulis. J Biol Chem 1983; 258(5): 2911-5.
20.Silverman HG, Roberto FF. Understanding marine mussel adhesion. Mar Biotechnol (NY) 2007; 9(6): 661-81.
21.Lawlor EP. Discover Nature at the Seashore: Things to know and things to do. Mechanicsburg, Pennsylvania: Stackpole Book; 1992.
22.Ragnarsson SA, Burgos JM. Separating the effects of a habitat modifier, *Modiolus modiolus* and substrate properties on the associated megafauna. Journal of Sea Research 2012; 72: 55–63.
23.Danner EW, Kan Y, Hammer MU, et al. Adhesion of mussel foot protein Mefp-5 to mica: an underwater superglue. Biochemistry 2012; 51(33): 6511–8.
24.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
25.Ninan L, Monahan J, Storshine RL, et al. Adhesive strength of marine mussel extracts of porcine skin. Biomaterial 2003; 24(22): 4091-9.
26.Arnow LE. Colorimetric determination of the components of 3, 4 dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. J Biol Chem 1937; 118(2): 531-7.
27.Paz MA, Flückiger R, Boak A, et al. Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. J Biol Chem 1991; 266(2): 689-92.
28.Zhao H, Waite JH. Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of Mytilus californianus. J Biol Chem 2006; 281(36): 26150-8.
29.Zhao H, Waite JH. Proteins in load-bearing junctions: The histidine-rich metal-binding protein of mussel byssal. Biochemistry 2006; 45(47):14223-31.
30.Walker JM. p The Protein Protocols Handbook. Humana Press, a Part of Springer Science. 1985.
31.Brazee, SL, Carrington E, Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. Biological Bulletin. 2006; 211, 263–274
32.Hwang DS, Sim SB, Cha HJ. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. Biomaterials 2007; 28(28):4039–46.
33.Waite JH, Qin X. Polyphosphoprotein from the adhesive pads of Mytilus edulis. Biochemistry 2001; 40(9): 2887-93.
34.Zhao H, Waite JH. Coating proteins: structures and cross-linking in fp-1 from the green shell mussel Perna canaliculus. Biochemistry 2005; 44(48): 15915-23.
35.Kan Y, Danner EW, Israelachvili JN, et al. Boronate complex formation with dopa containing mussel adhesive protein retards pH-induced oxidation and enables adhesion to mica. PLoS One 2014; 9(10): e108869.
36.Inoue K, Takeuchi Y, Miki D, et al. Mussel adhesive plaque protein is a member of epidermal growth factor like gene family. J Biol Chem 1995; 270(12): 6698-701.
37.Rzepecki LM, Waite JH. The byssus of the zebra mussel, Dreissena polymorpha II: Structure and polymorphism of byssal polyphenolic protein families. Mol Mar Biol Biotechnol 1993; 2(5): 267-79.
38.Choi YS, Yang YJ, Yang B, et al. In vivo modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in Escherichia Coli. Microb Cell Fact 2012; 11: 139.
39.Suchanek TH. The ecology of Mytilus edulis L. in exposed rocky intertidal communities. J Exp Mar Bio Ecol 1978; 31(1): 105-20.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

Iran South Med J 2017; 20(5): 481-491

Original Article

Purification of Bysal Mussel (*Modiolus sp. PG*) Adhesive Protein fp-2 from Northern Seashore of Persian Gulf

S. Hosseini (MSc)[1], H. Zolgharnine (PhD)[1*], A. Bargahi (PhD)[2], H. Khaledi (PhD)[1], N. Salamat (PhD)[1], B. Archangi (PhD)[1]

[1] Department of Marine Biology, School of Marine Science and Ocean, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 29 Dec 2016 Accepted 19 Apr 2017)

Abstract

Background: Mussel bivalves produce and secrete adhesive proteins which facilitate the adherence to surfaces in the aquatic environments. Specific properties of these proteins such as adhesion, resistance and biocompatibility have introduced their application in biomedical engineering, dental, and production of biological adhesives.

Materials and Methods: The species of dwarves from the Persian Gulf were sampled based on the morphologic indexes and COI gene sequence. To identify the polyphenol glands, which produce the adhesive proteins, tissue sections were prepared from the mussel's foot. Then, the mussel fp-2 protein was purified by the ion-exchange chromatography using salt and pH gradients and, the gel filtration chromatography. To confirm the presence of proteins in each fraction the Arnow test and NBT staining were used. For detection of the protein homogeneity, in each purification stage, the SDS-PAGE electrophoresis was used. The NBT positive chromatogram peaks, after concentration and electrophoresis by Acid-Urea method, were blotted on nitrocellulose and detected by NBT test.

Results: The specie morphology and taxonomy were recorded and matched to the FAO criteria and, "The Mollusks of Persian Gulf", the Persian reference book. It belonged to the Mytilidae family and Modiolus genus. The DNA and protein sequences were recorded in NCBI data bank as AB972412.1 and BAP16437.1 respectively. Also, the molecular weight of the purified fp-2 protein was about 45 KD.

Conclusion: This research was led to the morphologic and genetic identification of Modiolus sp. PG from the Persian Gulf along with the purification of the fp-2 adhesive protein.

Key words: Adhessive protein, COI gene, Extraction, fp-2 protein, *Modiolus sp*. PG

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Hosseini S, Zolgharnine H, Bargahi A, Khaledi H, Salamat N, Archangi B. Purification of Bysal Mussel (Modiolus sp. PG) Adhesive Protein fp-2 from Nortern Seashore of Persian Gulf. Iran South Med J 2017; 20(5): 481-491

Copyright © 2017 Hosseini, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]Address for correspondence: Department of Marine Biology, School of Marine Science and Ocean, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Email: Zolgharnine@yahoo.com

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]