

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه شاهرود

دانشکده علوم پایه

رساله دکتری

مطالعه ساختار و عملکرد فتوپروتئین Mnemiopsin از گونه *Mnemiopsis leidyi*

از:

محمودرضا آقامعالی

استاد راهنما:

دکتر ریحانه سریری

(اردیبهشت 1390)

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی
(گرایش بیوشیمی)

مطالعه ساختار و عملکرد فتوپروتئین **Mnemiopsin** از گونه *Mnemiopsis leidyi*

از :
محمودرضا آقامعالی

استاد راهنما :
دکتر ریحانه سریری

اساتید مشاور :
دکتر رضا حسن ساجدی
دکتر مجید تقدیر

(اردیبهشت 1390)

تقدیم به :

همسر صبور و فداکارم

و

دو فرزند عزیزمان شایان و اشکان

که وجودشان گرمی بخش زندگی ما بوده و خواهد بود

و تقدیم به:

همه کسانی که دوستشان داریم.

تقدیر و تشکر:

خداوند مهربان را شاکرم که مرا نیرو بخشید تا نگارش رساله پیش رو را به اتمام برسانم. اکنون که قریب به چهار سال و اندی از تحصیلم می گذرد، بر خود لازم می دانم کمال تقدیر و تشکر خود را نثار کسانی کنم که در این مسیر پر فراز و نشیب لحظه ای از راهنمایی، پشتیبانی و تشویق من دریغ نکردند.

از استاد راهنمای فرهیخته و بزرگواریم خانم پروفسور ریحانه سریری و اساتید مشاور گرانقدرم آقایان دکتر رضا حسن ساجدی و دکتر مجید تقدیر که تمام روزهایی که تحت نظارت این بزرگواران مشغول به کار بودم سرشار از آموختن توامان علم و اخلاق بود، نهایت تشکر را دارم. در پرتو روحیه پر از امید این اساتید بزرگواری بود که تمام دلسردی ها رنگ می باخت و در سایه وجود خستگی ناپذیرشان، پرسش های گاه و بی گاهم پاسخ می یافت. آموختن نحوه انجام یک کار تحقیقاتی مؤثر در کنار لذت بردن از کار گروهی بدون شناخت این بزرگواران امکان پذیر نبود و بی شک این آموخته ها در زندگی نیز بسیار به کارم خواهد آمد.

از اساتید داور بزرگواریم جناب آقای دکتر سامان حسینخانی، سرکار خانم دکتر صالحی و آقای دکتر صادق حسن نیا که زحمت داوری پایان نامه را تقبل کردند و همچنین آقای دکتر کوروش رادمقدم نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشکده کمال تشکر را دارم.

از مسئولین محترم دانشگاه گیلان و دانشکده علوم پایه، در راس آن استاد عزیزم آقای دکتر نادر شعبانی پور ریاست محترم دانشکده که امکان ادامه تحصیل را برایم میسر کردند نهایت تشکر را دارم.

از برادر بزرگواریم جناب آقای دکتر وهب جعفریان که در طول مدت تحصیل همیشه و همه وقت یار و یاور من بودند صمیمانه تشکر می کنم.

از اساتید محترم گروه زیست شناسی آقایان: دکتر سعیدی، دکتر مشایخی، دکتر اصغری، دکتر افشار محمدیان، دکتر وزیری، دکتر نورسته نیا، دکتر حیدری، دکتر عجمیان، دکتر نیک پی، دکتر مهدی پور، خانم دکتر سرمد، مهندس رسا و سایر اعضا محترم هیئت علمی گروه تشکر می نمایم.

از برادران بزرگواریم آقایان مهندس گلچین، مهندس روضاتی و مهندس علوی که همیشه مشوق و راهنمای من بودند کمال تشکر را دارم.

از مسئولین محترم اداره بنادر و کشتیرانی بتدر انزلی بخصوص کاپیتان حسین حسین نیا راقب فرمانده شناور اورانوس که در تمام مراحل نمونه برداری کمک شایان توجهی به من کردند تشکر و قدردانی می نمایم.

از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی، خانم ها هادوی، شایگان و امیدی تشکر و قدردانی می نمایم.

از تمام دانشجویان عزیز و بزرگواریم آزمایشگاه بیوشیمی: خانمها ملا کریمی، شاهنگیان، پیروزنیا، مهدوی، گلعلی زاده، مصدق، اسدی، زمانی، نصرالهی، شیرزاد، حیدری، جهانی، ترحمی، ناسوتی، شاه محمدی و آقایان: راستی، غفوری، طاهری، رحمانی، محسنی و سایر دوستان که همچون خواهران و برادران مهربان همیشه یار و یاور من بودند کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم و برای تک تک این عزیزان آرزوی موفقیت می نمایم.

صفحه	عنوان
ذ	چکیده فارسی
ر	چکیده انگلیسی
2	فصل اول : مقدمه و تئوری
3	1-1- شاخه شانه داران (Ctenophora)
4	2-1- شانه دار دریای خزر
4	3-1- جایگاه سیستماتیک شانه دار دریای خزر
5	4-1- زیست شناسی شانه دار دریای خزر
5	4-1-1- پراکنش و ورود شانه دار (<i>Mnemiopsis leidyi</i>) به دریای خزر
6	4-1-2- ترکیبات بیوشیمیایی بدن <i>Mnemiopsis leidyi</i>
7	4-1-3- ارتباط با عوامل غیرزیستی محیط
7	4-1-4- نحوه مهاجرت
8	4-1-5- تولید مثل
8	4-1-6- ترمیم
10	4-1-7- زیست تابی
10	5-1- بیولومینسانس
12	5-1-1- دلایل استفاده موجودات از پدیده بیولومینسانس
12	5-1-2- کاربردهای بیولومینسانس
12	5-1-2-1- کاربرد در پزشکی
12	5-1-2-2- کاربردهای اقتصادی
13	6-1- سیستم Bioluminescence کرم شب تاب
13	6-1-1- معرفی جانور
14	6-1-2- لوسیفیرین کرم شب تاب
14	6-1-3- ساختار لوسیفراز
15	6-1-4- مکانیسم Bioluminescence در firefly
16	6-1-5- کاربردهای سیستم Bioluminescence کرم شب تاب
16	6-1-5-1- اندازه گیری ATP
17	6-1-5-2- اندازه گیری باکتریها و سلول
17	6-1-5-3- اندازه گیری آنزیمها
17	6-1-5-4- استفاده از لوسیفراز firefly در تکنیک Pyrosequencing
18	6-1-5-5- پیشرفتهای جدید

19	7-1 - فتوپروتئین
23	1-7-1- فتوپروتئین های شعاعیان
23	2-7-1 - فتوپروتئین های coelenterate
23	3-7-1 - فتوپروتئین های Ctenophore
25	8-1 - ساختار کلی فتوپروتئین ها
31	1-8-1- واکنش لومینسانس در فتوپروتئینهای وابسته به کلسیم
32	9-1- برخی از کاربردهای فتوپروتئین
32	1-9-1 - Immunoassay
33	2-9-1- آنالیز سلولی
33	3-9-1- سایر کاربردها
35	10-1- در این تحقیق
37	فصل دوم: مواد و روش ها
38	1-2- تجهیزات مورد استفاده
38	2-2- مواد شیمیایی مورد استفاده
38	3-2- آنزیم ها و پلاسمیدهای مورد استفاده
39	4-2- بافرها و محلولهای مورد استفاده
39	1-4-2- بافرهای الکتروفورز DNA (آگارز)
39	2-4-2- بافرهای الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE)
40	5-2- میکروارگانسیم ها
40	6-2- محیط های کشت باکتریایی
41	7-2- روش های الکتروفورزی
41	1-7-2- SDS-PAGE :
41	1-1-7-2- تهیه محلول های رنگ آمیزی کوماسی بلو
41	2-1-7-2- انجام رنگ آمیزی کوماسی بلو
42	2-7-2- الکتروفورز ژل آگارز
42	8-2- سنجش غلظت پروتئین
43	9-2- مطالعات دورنگ نمایی دورانی
43	10-2- استخراج RNA کل
44	1-10-2- تهیه کتابخانه cDNA
44	11-2- طراحی پرایمر برای ژن نمیوپسین و انجام PCR
45	12-2- واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) جهت تکثیر ژن نمیوپسین
45	13-2- استخراج DNA از ژل آگارز
45	14-2- کلونینگ ژن نمیوپسین در میزبان پروکاریوتی اول

46	15-2- استخراج وکتور
46	16-2- تعیین توالی نوکلئوتیدی
46	17-2- عدد دسترسی توالی نوکلئوتیدی
46	18-2- روش های مربوط به آنالیز توالی
47	19-2- کلونینگ ژن نمیوپسین درون وکتور بیانی
47	1-19-2 هضم آنزیمی وکتور pET-28a و ژن نمیوپسین
47	2-19-2 استخراج قطعات هضم شده از ژل آگارز
48	3-19-2 جاگذاری ژن درون وکتور (Ligation) و انتقال به میزبان بیانی (Transformation)
49	4-19-2 استخراج حامل و تعیین توالی نوکلئوتیدی
49	20-2- بیان نمیوپسین
50	1-20-2 تهیه محتوای سلولی از باکتری ها
50	2-20-2- تخلیص پروتئین نو ترکیب
51	3-20-2 تهیه semi-synthetic mnemiopsin
51	4-20-2 اثر غلظت های مختلف کلسیم روی فعالیت بیولومینسانس
51	5-20-2 تعیین pH بهینه
51	21-2- روشهای محاسباتی
51	1-21-2 مدل سازی مقایسه ای
51	2-21-2 انتخاب الگو
52	3-21-2 شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD)
53	1-3-21-2 روش محاسبه
54	2-3-21-2 پایداری شبیه سازی
54	22-2- بررسی هیدروپاتی نمیوپسین و سایر فتوپروتئینها
55	فصل سوم: نتایج
56	1-3- نمونه برداری نمیوپسیس لیدی
56	2-3- استخراج RNA کل و تهیه کتابخانه cDNA
58	3-3- T/A کلونینگ cDNA تکثیر شده
62	4-3- کلونینگ ژن نمیوپسین در وکتور بیانی
63	5-3- بیان پروتئین نمیوپسین
64	6-3- تخلیص پروتئین نو ترکیب
65	7-3- تعیین pH ایتیم نمیوپسین
66	8-3- تعیین میزان حساسیت به کلسیم نمیوپسین
66	9-3- مطالعات دو رنگ نمایی دورانی (CD)
67	10-3- آنالیز توالی

68	1-10-3 رسم درخت فیلوژنتیکی
68	2-10-3 مدل سازی مقایسه ای
70	3-10-3 بررسی و تست صحت (اعتبار) مدل
71	11-3- بهینه سازی ساختار مدل با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی
71	1-11-3- پایداری شبیه سازی دینامیک مولکولی
73	2-11-3- نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی
73	12-3- مقایسه ساختار فتوپروتئین ها
75	1-12-3 مقایسه RMSD نمپوسین با سایر فتوپروتئینها
75	2-12-3 لوپها
77	3-12-3 حفره اتصال کلترازین
83	فصل چهارم : بحث
94	منابع

5	جدول 1-1- رده بندی شانه دار دریای خزر (<i>Mnemiopsis leidyi</i>)
7	جدول 2-1- بررسی ترکیبات بیوشیمیایی <i>Mnemiopsis leidyi</i>
22	جدول 3-1- فتوپروتئین هایی که تاکنون جداسازی و تخلیص شده اند
42	جدول 1-2- تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول
45	جدول 2-2- مشخصات مربوط به پرایمرهای طراحی شده جهت کلونینگ ژن نمیوپسین
45	جدول 3-2- مشخصات مربوط به مراحل مختلف جهت PCR ژن نمیوپسین
67	جدول 1-3- محتوای ساختارهای دوم نمیوپسین بر اساس طیف CD
71	جدول 2-3- بررسی صحت اعتبار مدل نمیوپسین ساخته شده
73	جدول 3-3- مقایسه محتوای ساختارهای دوم حاصل از طیف CD نمیوپسین
75	جدول 4-3- مقایسه RMSD نمیوپسین و سایر فتوپروتئینها
77	جدول 5-3- مقایسه پیوندهای هیدروژنی در فتوپروتئینهای مختلف.
79	جدول 6-3- مقایسه اسیدهای آمینه متصل به کلترازین در نمیوپسین و ابلین

- 3 شکل 1-1- نمای شماتیک یک شانه دار بالغ از جنس *Pleurobrachia*
- 6 شکل 2-1- پراکنش نمپوسیس در سالهای مختلف در نقاط مختلف دریای خزر
- 9 شکل 3-1- نیمه ای از یک *Mnemiopsis leidyi* بالغ و ب ، نیمه لارو *cydippid* را نشان می دهد
- 10 شکل 4-1- نمپوسیس لیدی، شانه های تولید نور کاملا واضح و مشخص هستند
- 11 شکل 5-1- لوسیفرین های مختلف شناخته شده در موجودات
- 13 شکل 6-1- تابش نور توسط حیوانات اهلی
- 13 شکل 7-1- کرم شبتاب
- 14 شکل 8-1- فرمول شیمیایی لوسیفرین کرم شبتاب
- 16 شکل 9-1- مکانیسم عمل آنزیم لوسیفراز *beetle*
- 20 شکل 10-1- برخی از موجودات دارای فتوپروتئین
- 25 شکل 11-1 ساختار سه بعدی فتوپروتئین هایی که ساختمان کریستالی آنها تاکنون شناخته شده اند
- 26 شکل 12-1- تطابق توالی های آمینواسیدی فتوپروتئین های Ca^{2+} -regulated
- 27 شکل 13-1- کنفورماسیونهای مختلف ابلین
- 28 شکل 14-1- ساختمان پروتئین ابلین و اسیدهای آمینه اطراف حفره
- 30 شکل 15-1- ساختار کریستالی ابلین
- 32 شکل 16-1- مکانیسم پیشنهاد شده برای شروع و ادامه واکنش بیولومینسانس در اکورین
- 57 شکل 3-1- آنالیز RNA ی کل استخراج شده از نمپوسیس لیدی با استفاده از ژل آگارز 1.0%
- 57 شکل 3-2- آنالیز محصول RT-PCR روی ژل آگارز 1% 1-2 DNA ladder - محصول RT-PCR
- 58 شکل 3-3- محصول RT-PCR استخراج شده از ژل در کنار DNA ladder
- 59 شکل 4-3- نقشه وکتور pTZ57R/T شامل ژن مقاومت به آمپی سیلین
- 59 شکل 5-3- Colony PCR مربوط به سلول های ترانسفورم شده و مارکر وزن مولکولی (M)
- 60 شکل 6-3- مارکر وزن مولکولی (1)، استخراج پلاسمید نو ترکیب (2)، هضم دوگانه پلاسمید نو ترکیب (3)
- 61 شکل 3-7- توالی نوکلئوتیدی cDNA کد کننده نمپوسین و ردیف پروتئینی پیش بینی شده
- 61 شکل 3-8- تطابق آمینواسیدی مربوط به نمپوسین از نمپوسیس لیدی با فتوپروتئینهای سایر کتوفور ها
- 62 شکل 3-9- نقشه وکتور pET 28-a
- 63 شکل 3-10- مراحل مربوط به کلونینگ ژن نمپوسین درون وکتور بیانی
- 64 شکل 3-11- مراحل مربوط به بیان ژن نمپوسین در میزبان پروکاریوتی
- 65 شکل 3-12- آنالیز پروتئین نمپوسین خالص شده
- 65 شکل 3-13- پروفایل pH نمپوسین در محدوده 7/5 الی 10
- 66 شکل 3-14- رابطه میان غلظت کلسیم و شدت نور (فعالیت نسبی) نمپوسین
- 66 شکل 3-15- طیف CD مربوط به نمپوسین تخلیص شده
- 67 شکل 3-16- تطبیق توالی های (multiple sequence alignment) فتوپروتئینهای دو گروه کتوفور و کلنترات
- 68 شکل 3-17- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی آمینواسیدی برای نمپوسین

69	شکل 3-18- فایل Alignment استفاده شده جهت ساختن مدل نمیوپسین
70	شکل 3-19- نمایش مدل پیشگویی شده نمیوپسین
72	شکل 3-20- طیف مربوط به تغییرات انرژی کل سیستم در طول 100 ps
72	شکل 3-21- طیف مربوط به تغییرات RMSD در طول 10 ns زمان شبیه سازی
74	شکل 3-22- مقایسه ساختار سوم فتوپروتئینها
76	شکل 3-23- مقایسه توالی لوپ های فتوپروتئین های کتوفورها و کلترات ها
76	شکل 3-24- مدل سطحی (Surface representation) برای مقایسه توزیع بار لوپ های I, II و III
77	شکل 3-25- انطباق ساختارهای نواحی لوپ فتوپروتئین ها
78	شکل 3-26- مقایسه اسیدهای آمینه آروماتیک ناحیه حفره اتصال کلترازین
80	شکل 3-27- الگوی پروفایل هیدروپاتی فتوپروتئینهای مختلف
81	شکل 3-28- مقایسه پروفایل هیدروپاتی ابلین و برووین

Mnemiopsis leidyi از گونه **Mnemiopsis** و عملکرد فتوپروتئین
محمودرضا آقامعالی

cdNA نمیوپسین (فتوپروتئین وابسته به کلسیم) از یک شانه دار تولید کننده نور بنام نمیوپسین لیدی کلون، بیان، تخلیص، تعیین توالی و تعیین هویت شد. این **cdNA** از 621 جفت باز تشکیل شده است که یک پروتئین 206 اسید آمینه ای را کد می نماید. **cdNA** ی کد کننده نمیوپسین از نمیوپسین لیدی در *E. coli* بیان و سپس تخلیص شد که یک باند منفرد را با وزن مولکولی 27 کیلو دالتون روی ژل **SDS-PAGE** نشان داد. بعد از آماده سازی نمیوپسین **semi-synthetic** با استفاده از کلترازین و **EDTA** در حضور CaCl_2 از خود فعالیت لومینسانس نشان داد. مقایسه دو گروه معروف فتوپروتئین های وابسته به کلسیم یعنی کلتراتها و کتنوفورها تشابه بالایی در ساختار سوم آنها بدون توجه به تشابه پایین توالی میان آنها نشان داد. این فتوپروتئینها با تشابه پایین توالی می توانند نقش مهمی در درک اساس ساختاری فعالیت بیولومینسانس داشته باشند. سکانس آمینو اسیدی حاصل از ژن نمیوپسین حدود 90 درصد تشابه با فتوپروتئین های کتنوفوری و 51 درصد با فتوپروتئین های کلتراتی نشان داد. آنالیز توالی و ساختار افزایش تعداد بارهای منفی لوپهایی که کلسیم به آنها متصل می شوند را در کتنوفورها به نسبت کلتراتها نشان داد که منتج به حساسیت بیشتر و بالا برای اتصال به کلسیم می باشد. بعلاوه مقایسه آمینو اسیدهای درگیر در جایگاه اتصال سوبسترا نشان داد که حفره اتصال فتوپروتئینهای کتنوفوری حاوی تعداد کمی از اسیدهای آمینه حلقوی (آروماتیک) می باشد. این مشاهدات می تواند مارا به کاهش میانکنشهای **stacking** میان سوبسترا و پروتئین و بدنبال آن اهمیت اثرات پایداری کلترازین در حفره هدایت نماید. پروفایل هیدروپاتی برای رزیدوهای حفره الگوی متفاوتی را در این دوگروه نشان داد. تفاوت اسیدهای آمینه در جایگاه اتصال سوبسترا و محیط اطرافش سبب الگوی متفاوت شبکه پیوند هیدروژنی در ناحیه مربوطه در کتنوفورها در مقایسه با کلتراتها می شود. مقایسه ساختاری این دو گروه با تشابه توالی پایین و تشابه ساختمان سوم بالا می تواند یک دیدگاه جدیدی را در مکانیسم تابش نور در این فتو پروتئینها ایجاد می نماید.

کلید واژه: نمیوپسین لیدی، نمیوپسین، بیولومینسانس، فتوپروتئین وابسته به کلسیم، کتنوفور،

Abstract

Structural and functional study of mnemiopsin photoprotein from *Mnemiopsis leidyi*

Mahmoud Reza Aghamaali

The cDNA of mnemiopsin (calcium-regulated photoprotein) from luminous ctenophore *Mnemiopsis Leidyi* was cloned, expressed, purified, sequenced and characterized. The cDNA was 621 base pairs in length, coding a 206 residues protein. The cDNA encoding mnemiopsin of *M. Leidyi* was expressed in *Escherichia coli* and purified, which showed a single band with an apparent molecular weight of ~ 27 kDa by SDS-PAGE. After preparation of semi-synthetic mnemiopsin by using coelenterazine and EDTA, it showed luminescence activity in the presence of CaCl_2 . Comparison of the two most famous groups of calcium-regulated photoproteins, coelenterate and ctenophore photoproteins, showed an interestingly high degree of structural similarity regardless of their low sequence identity. These photoproteins with low sequence identity can play an important role in understanding the structural basis of bioluminescence activity. The deduced amino acid sequence of mnemiopsin gene showed 90% and 51% similarity to ctenophore and coelenterate photoproteins, respectively. Structural comparison and sequence analysis showed an increase in the number of negative charges of calcium-binding loops in ctenophore compared to coelenterate photoproteins, resulting in their higher sensitivity for calcium binding. Besides, comparison of amino acid residues involved in substrate binding site showed that binding pocket of ctenophore photoproteins contains less content of aromatic residues than coelenterates. This observation can lead to a decline in the number of stacking interactions made between substrate and protein, followed by important effects on stabilizing of coelenterazine in the cavity. The hydropathy profiles for cavity residues showed a different pattern in these two groups. Amino acid differences in the substrate binding site and its surrounding area makes different pattern of hydrogen bond network in relevant region in ctenophore compared to coelenterate photoproteins. Structural comparison of these photoprotein groups, with low sequence identity and high structural similarity, can present a new insight into the mechanism of light emission in these photoproteins.

Key words: *M. leidyi*, Mnemiopsin, Ca^{2+} dependent photoprotein, ctenophore

فصل اول

مقدمه و تئوری

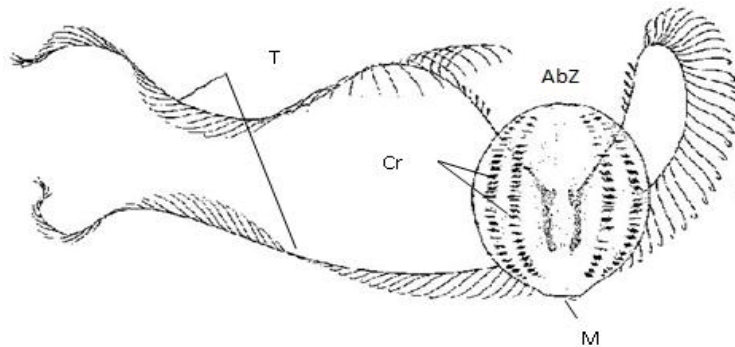
فصل اول : مقدمه و تئوری

در دهه پایانی قرن بیستم دریای سیاه تجربه بسیار تلخ زیست محیطی را متحمل شد که در تاریخ محیط زیست این دریا بی سابقه بوده است. گونه مهاجم شانه دار با نام علمی *Mnemiopsis leidyi* که از طریق آب توازن کشتی وارد این دریا گردید در زمان بسیار کوتاهی آنچنان ضربه مهلکی بر جامعه پلانکتون و آبزیان آب وارد ساخت که حتی در صورت کنترل و مهار آن نیز به زمان زیادی به منظور بازسازی مجدد آن نیاز است. اگر چه در زمان ورود این آبرزی مهاجم به دریای سیاه سازمانهای تخصصی بین المللی (GESAMP, 1997) هشدارهای لازم مبنی بر احتمال ورود این گونه به سایر اکوسیستم های آبی و حساس جهان از جمله دریای خزر را داده بودند، متأسفانه این مهمان ناخوانده از سال 1997 وارد دریای خزر گردید. جالب اینکه علیرغم تجربه زیاد کشورهای حاشیه دریای خزر به ویژه روسیه در دریای سیاه و آگاهی از خطرات آن متوجه حضور این گونه نشدند (اسماعیل ساری و همکاران، 1380).

سابقه آشنائی با جنس *Mnemiopsis* به سال 1825 میلادی و معرفی گونه *Mnemia schwieggeri* توسط *Eschscholts* باز می گردد. *Mnemiopsis leidyi* برای اولین بار در سال 1965 میلادی به وسیله *Alexander Agassiz* (1860) توصیف شد ([کاتالوگ موزه جانورشناسی مقایسه ای، جلد دوم *Acalephae* آمریکای شمالی، صفحات 20-23] 1965). مطالعه گونه *Mnemiopsis leidyi* در کشورهای حوزه دریاهای سیاه و خزر از هنگام ایراد صدمات اقتصادی به صنعت شیلات این کشورها یعنی دهه 1980 میلادی جدیت بیشتری یافت. در زمینه مطالعات دقیق جانورشناسی و بوم شناسی، دانشمندان روسی از جمله *T. A. Shiganova*، *V. F. Zaitsev* و *V. E. Zaika* پیش قدم بوده اند. مطالعات جامع *Shiganova* بیشتر معطوف به اکولوژی این جانور و تحقیقات دو دانشمند دیگر درباره مورفولوژی، تولید مثل، و رژیم تخم ریزی آن در برابر تغییرات دما و دوره تابش نور بوده است (توتونی و همکاران، 1383). از آنجاییکه یکی از ویژگی های این موجود زیست تابی می باشد و تاکنون این خصیصه مورد بررسی قرار نگرفته لذا در این تحقیق برای اولین بار ژن کد کننده فتوپروتئین موجود در آن موسوم به نمیوپسین، از نظر بیوشیمیایی مطالعه گردید.

1-1- شاخه‌ شانه داران (Ctenophora)

شانه داران نام متداول شاخه جانوری Ctenophora می باشد. به دلایل مختلف، از جمله شفافیت بدن، اعضای شاخه شانه داران مورد توجه زیست شناسان و به خصوص رویان شناسان تکوینی واقع شده است [Gilbert & Raonio, 1997]. شانه داران به اسامی عام گوناگونی معروفند. مانند : "زله شانه دار" (*M. gardeni Mnemiopsis mccradyi*) و (*M. leidy*)، "انگور دریایی" یا "گردوی دریایی" (*Pleurobrachia*) و "کمر بند ونوس" (*Cestum veneris*).
 نوار شانه ها واضحترین بخش بدن شانه داران است. هر شانه که به شکل شانه ی تثبیت موی بانوان می باشد، از به هم پیوستن مژک های غول پیکر به وجود آمده است. از به دنبال هم قرار گرفتن شانه ها، نواری از شانه به وجود می آید. شانه داران در پیرامون بدن و در جهت دهانی - مقابل دهانی ، هشت نوار شانه دارند. در نگاه اول، همین نوارهای شانه بیشترین توجه را به خود جلب می کنند. شانه ها هماهنگ با یکدیگر به ضربان می پردازند و جانور را در راستای عمود بر سطح افق در آب جابجا می کنند. بعضی از گونه ها با تکان دادن ناگهانی لوب های بدن، یا با حرکات موجی شکل بدن جابجا می شوند. بعضی از شانه داران دارای دو عدد تانتاکول بلند هستند (Gilbert & Raonio, 1997).



شکل 1-1- نمای شماتیک یک شانه دار بالغ از جنس *Pleurobrachia*

AbZ: ناحیه مقابل دهانی، Cr: دو نوار شانه، M: دهان، T: تانتاکول (بازو) ها.

شانه داران دارای شباهت های ظاهری فراوانی با کیسه تنان (Cnidarians) هستند. اما برخلاف آنها کیسه ی گزنده (nematocyst) ندارند. در عوض، شانه داران به منظور صید طعمه سلول های چسبناکی به نام Colloblast دارند. تعداد اندکی از گونه ها نظیر اعضای خانواده Beroidae، به منظور تکه کردن صید، مژک های خاصی به نام Macrotilia در دهان خود دارند (Pechenik, 2000). شانه داران برخلاف کیسه تنان در ناحیه مقابل دهانی (aboral) بدن خود، یک جفت

منفذ دفعی دارند که گاهی توسط بعضی از دانشمندان، با روزنهٔ مخرجی جانوران دارای تقارن دوطرفی (کرم ها، حلزون ها، ماهی ها، و انسان ها) همولوگ در نظر گرفته می شود.

با این که بیشتر شانه داران در زندگی حالت سرگردان و پلانکتونی دارند، یک گروه از آن ها اعضای راستهٔ (Platyctenida) کفزی اند و می توانند در کف دریا بخزند. بیشتر این قبیل گونه ها بر روی سطوح جانوران دیگر نظیر اسفنج ها و کیسه تنان کفزی زندگی می کنند. بسیاری از شانه داران، مانند سایر موجودات پلانکتونی خاصیت زیست تابی داشته و از خود نور ساطع می کنند.

مانند بسیاری از کیسه تنان پلاژیک، بیشترین مادهٔ تشکیل دهندهٔ بدن شانه داران آب می باشد و بنابراین، احتمال باقی ماندن فسیل از بدن آن ها بسیار کم است (Pechenik, 2000).

1-2- شانه دار دریای خزر (*Mnemiopsis leidyi*)

Mnemiopsis اسم جنسی است بر گرفته از نام *Mnemia* که توسط Eschscholtz (1825) برای *Mnemia* *schwieggeri* انتخاب شده بود (Μνέμια در یونانی یعنی موهوم یا خیالی) و به وسیلهٔ Louis Agassiz (1860) برای گونهٔ جدید یعنی *Mnemiopsis gardeni* برگزیده شد (تاریخ طبیعی آمریکا، جلد سوم، صفحات 269 تا 290، شکل های 95 و 96). *Mnemiopsis leidyi* برای اولین بار به وسیلهٔ Alexander Agassiz (1865) توصیف شد (کاتالوگ موزهٔ جانورشناسی مقایسه ای، جلد دوم Acalephae آمریکای شمالی، صفحات 20 – 23).

1-3- جایگاه سیستماتیک شانه دار دریای خزر (*Mnemiopsis leidyi*, Agassiz 1865)

Mnemiopsis leidyi متعلق به شاخهٔ شانه داران (Ctenophora) است و در ردهٔ Tentaculata گروه بندی می شود. رده بندی این شانه دار در جدول ذیل آمده است (اسماعیلی ساری و همکاران، 1380):

جدول 1-1- رده بندی شانه دار دریای خزر (*Mnemiopsis leidy*)

Phylum	Class	Sub-Class	Order	Family	Genus	Species
Ctenophora	Tentaculata	Cyclocoela	Lobata	Bolinopsidae	Mnemiopsis	<i>Mnemiopsis leidy</i>

1-4-1- زیست شناسی شانه دار دریای خزر (*Mnemiopsis leidy*, Agassiz 1865)

1-4-1-1- پراکنش و ورود شانه دار (*Mnemiopsis leidy*) به دریای خزر

زیستگاه اصلی این شانه دار مصب های نواحی معتدله تا تحت حاره سواحل اقیانوس اطلس در آمریکای شمالی و جنوبی است. این گونه احتمالاً به وسیله آب توازن کشتی های نفت کش روسی که به بنادر سواحل شرقی ایالات متحده آمریکا رفت و آمد می کرده اند، به دریای سیاه انتقال یافته است. پس از ورود به دریای سیاه در اوایل دهه 80 میلادی و پراکنش گسترده در این دریا، احتمالاً بار دیگر به وسیله نفت کش های دریایی و از طریق کانال ولگا - دون، به دریا های آزوف، مرمرة، مدیترانه شرقی و سرانجام خزر انتقال یافته است (Shiganova, 2002). برای اولین بار نوامبر سال 1999 در دو ایستگاه در اعماق 29-30 متری و حرارت 16.5-19.5 درجه سانتی گراد و شوری ppt 11/76 - 13/07 توسط دانشمندان در ناحیه روسیه دریای خزر این گونه گزارش شد (Shiganova et al., 2001).

سه گونه از جنس نمیوپسیس شناخته شده است که عبارتند از: *M. leidy*، *M. gardeni*، *M. mccradyi* و برخی از دانشمندان عقیده دارند که دو گونه دیگر وجود ندارند و مشابه گونه نمیوپسیس لیدی هستند.

این ماکروزئوپلانکتون دریا های آزاد، مناطق ساحلی و لایه های سطحی را به عنوان زیستگاه انتخاب می کند. البته بعضی نمونه های درشت در لایه های پایینتر و حتی در نزدیکی بستر نواحی ساحلی در تمام نقاط خزر مشاهده می شوند (Shiganova, 2002). نتایج جمعیت شناسی نمیوپسین در سال 2001 نشان داده است که منطقه اصلی پراکنش نمیوپسیس بخش جنوبی دریای خزر می باشد (شکل 1-2) که در این ناحیه زمستان گذرانی کرده و سپس در بهار به سمت شمال دریای خزر مهاجرت می کند. ابتدا در نواحی میانی دریای خزر ظاهر شده و سپس بسمت شمال حرکت می نماید ولی مناطق زندگی آن شوری کمتر از 4 ppt نیست (Shiganova, T. et al., 2001). مقایسه درصد همآوری در شرایط طبیعی نشان می دهد که آبی با

شوری 10 گرم بر لیتر مناسبترین آب برای تولید مثل شانه دار دریای خزر است. همچنین این درجه شوری برای فعالیت شانه دار مناسب است چون شکارچیان این شانه دار در آبی با این مقدار شوری قادر به فعالیت نیستند (توتونی و همکاران، 1383).



شکل 2-1- پراکنش نمپوپسیس در سالهای مختلف در نقاط مختلف دریای خزر.

1-4-2- ترکیبات بیوشیمیایی بدن *Mnemiopsis leidy*

مهمترین آنها پروتئین، سپس چربی و NPS (Ninhydrin-Positive Substance) می باشد. کربوهیدرات ها مقادیر جزئی را تشکیل می دهند. نیتروژن 0/715 و میزان کربن 4/57 درصد ماده ی خشک به دست آمده است. در مجموع میزان مواد آلی در هر گرم شانه دار دریای خزر 84/47 میلی گرم بدست آمد (جدول 2-1) (یوسفیان، 1381).