بررسی ساختار و عملکرد هموگلوبین دو گونه از ماهیان خاویاری قره‌برون (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (Acipencer stellatus)

- **شهره آریائی نژاد:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، صندوق‌پستی: ۷۷۵- ۱٤٥۱٥
- **شهلا جمیلی*:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، صندوق‌پستی: ۷۷۵- ۱٤٥۱٥
- **مهران حبیبی رضایی:** گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، صندوق‌پستی: ٦٤٥٥- ۱٤۱٥٥
- **محمدرضا فاطمی:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، صندوق‌پستی: ۷۷۵- ۱٤٥۱٥

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۲

چکیده

تنوع هموگلوبین به‌عنوان یک شاخص مهم در ماهی‌ها، این جانوران را قادر می‌سازد تا خود را با شرایط مختلف و متغیر محیطی سازگار کنند. در پژوهش جاری خواص ساختاری و عملکردی هموگلوبین دو گونه از ماهیان خانواده‌ی تاسماهیان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) و قره‌برون (*Acipenser persicus*) ساکن در بخش جنوبی دریاچه‌ی خزر مورد مطالعه قرار گرفته است. پس از جدا سازی و خالص‌سازی هموگلوبین خون این ماهیان، با استفاده از روش‌های الکتروفورز ژل SDS، الکتروفورز طبیعی، و الکتروفورز کانونی تنوع هموگلوبین در این ماهیان تأیید شد. با استفاده از کروماتوگرافی به‌روش تعویض یونی روی ستون CM-cellulose یک هموگلوبین غالب خالص‌سازی گردید و صحت خلوص توسط روش‌های الکتروفورز کانونی و الکتروفورز ژل SDS تأیید گردید. مطالعات طیفی با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس برای مقایسه آب‌گریزی سطح هموگلوبین‌ها و به‌وسیله دورنگ نمائی دورانی (CD) برای مقایسه‌ای زیر ساختارهای مارپیچ آلفا از ساختمان دوم زنجیره‌های گلوبین صورت گرفت. هم‌چنین از طیف سنجی مرئی- فرابنفش (UV-Vis) برای اندازه‌گیری تمایل هموگلوبین‌ها به اکسیژن در حضور سدیم دیتیونیت استفاده شد. هم‌چنین روند واسرشته شدن گرمائی هموگلوبین‌ها با استفاده از روش کالری‌متری روبشی افتراقی (DSC) مورد بررسی قرار گرفت مجموعه‌ی نتایج حاصل از آزمایشات و تحلیل‌های فوق، در این تحقیق موید این فرضیه بود که می‌توان ارتباطی معنی‌دار بین توانائی ورود ماهی به اعماق بیش‌تر، فشار جزئی اکسیژن در اعماق مختلف و تفاوت‌های ساختاری هموگلوبین‌ها از نظر فشردگی ساختار، تمایل هموگلوبین به اکسیژن، میزان آب‌گریزی سطح هموگلوبین، میزان درصد مارپیچ آلفا و پایداری حرارتی آن‌ها برقرار نمود.

کلمات کلیدی: ماهیان خاویاری (ازون‌برون *Acipenser stellatus* و قره‌برون *Acipenser persicus*)، آب‌گریزی، مارپیچ آلفا، تمایل به اکسیژن، کالری‌متری روبشی افتراقی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول : shahlajamili45@yahoo.com

مقدمه

ماهیان خاویاری که از با ارزش‌ترین ماهیان تجاری جهان می‌باشند، بیش‌تر از ۳۱۰ میلیون سال است که با سازگاری با محل زیست‌شان توانسته‌اند نسل خود را حفظ نمایند و امروزه به‌عنوان فسیل‌های زنده شناخته می‌شوند. خانواده تاسماهیان (Acipenseridae) از سلسله جانوران(Animalia)، شاخه مهره‌داران (Chordata)، رده ماهیان باله شعاعی (Actinopterygii)، راسته تاسماهی شکلان (Acipenseriformes) می‌باشد. افراد این خانواده دارای نوعی علایم ساده و بعضی خصایص قدیمی در ساختار تشریحی خود هستند. در گذشته این ماهیان در نیمکره شمالی زمین پراکندگی بیش‌تری داشتند ولی به‌علت از بین رفتن زیستگاه و تغییرات اکولوژیک محیط‌زیست، صید بی‌رویه و غیره امروزه محدود به دریاچه خزر، آزوف، اورال و دریای سیاه می‌باشند. هر چند به‌طور محدود و پراکنده در اروپا و آمریکا نیز گونه‌هایی از آن‌ها یافت می‌شود. در این میان دریاچه خزر و مخصوصاً سواحل جنوبی آن، به لحاظ موقعیت ممتاز خود زیستگاه اصلی تاسماهیان به‌شمار می‌رود، به طوری‌که ۹۰ درصد صید جهانی ماهیان خاویاری در این دریا صورت می‌گیرد. نظر به اهمیت جایگاه این ماهیان برای کشور، مطالعات جامع بر روی ساختار و عملکرد هموگلوبین دو گونه از با ارزش‌ترین این ماهیان، یعنی قره‌برون و اوزون‌برون به‌عنوان موضوع این تحقیق انتخاب شده است. خون ماهی مانند مهره‌داران دیگر و بسیاری از بی‌مهرگان از گلبول‌های خونی تشکیل شده است که در پلاسما به‌صورت معلق هستند و در سراسر بافت‌های بدن گردش می‌کنند. اجزای سلولی خون، گلبول‌های قرمز یا اریتروسیت‌ها[۱] و گلبول‌های سفید یا لوکوسیت‌ها[۲] هستند. گلبول‌های قرمز ماهیان مانند سایر مهره‌داران غیرپستاندار، هسته‌دار و معمولاً بیضی شکل و فقط در تعداد محدودی از گونه‌ها تقریباً کروی دیده می‌شود و فراوان‌ترین سلول‌ها در خون ماهی هستند. این سلول‌ها حاوی هموگلوبین هستند و وظیفه اصلی آن‌ها حمل اکسیژن از آبشش به بافت‌هاست(۱). تنها مهره‌دارانی که فاقد هموگلوبین و گلبول قرمز می‌باشند لاروهای مارماهیان و معدودی دیگر از ماهی‌های قطب جنوب از خانواده Chaenichthyidae می‌باشند. گلبول قرمز مهره‌داران حاوی هموگلوبین است که یک رنگدانهٔ تنفسی است که به‌طور گسترده قدرت اتصال اکسیژن به خون را افزایش می‌دهد و این ترکیب به ترتیب در فرم‌های مونومریک، دیمریک، و تترامریک از یک، دو، و چهار گلوبین تشکیل شده است که هریک از آن‌ها پروتئینی فاقد رنگ و در برگیرنده‌ی ماده‌ای به‌نام هِم می‌باشد. توانایی متابولیسم هوازی در بدن جانوران توسط هموگلوبین ایجاد می‌شود. هموگلوبین، اکسیژن حل شده را حمل و ورود آن را به بافت‌ها تسهیل می‌کند و به‌عنوان پذیرنده‌ی الکترون در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا در بدن موجودات ایفای نقش می‌کند (۲). این پروتئین از دو جنبه‌ی ساختار و عملکرد مورد مطالعه قرار گرفته است. عملکرد هموگلوبین با توجه به برآورده کردن نیازهای متابولیسم جانور با توجه به تغییرات شرایط محیط زیست آن‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۳). در بین مهره‌داران، ماهی‌ها بیش‌ترین تطابق را با شرایط در رده‌بندی تکاملی ایجاد کرده‌اند و این ویژگی مهم سبب شده که آن‌ها با تغییرات شرایط محیط‌زیست مثل دما، فشار، شوری و میزان اکسیژن تطبیق پذیری بیش‌تری نسبت به سایر موجودات داشته باشند و اغلب دارای چند هموگلوبین می‌باشد (۴-۹). از نظر تنوع[۳] هموگلوبین بیش‌ترین تنوع نسبت به سایر موجودات در ماهیان دیده می‌شود (۲). ماهی‌ها برای حفظ بقاء مجبور هستند با تغییر شرایط محیط، تغییرات میزان اکسیژن را تحمل کنند و آناتومی، فیزیولوژی و تغییرات بیوشیمیایی داخل بدن آن‌ها به این تطابق با تغییرات محیطی کمک می‌کند. هموگلوبین ماهی‌ها در انطباق با این شرایط اهمیت ویژه‌ای دارند (۱۰). هموگلوبین یک پروتئین گلبولار[۴]، دارای ساختار چهارم که از زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تشکیل شده است، می‌باشد. این زنجیره‌ها گلوبین نام دارند و هر کدام دارای یک گروه پروستتیک[۵] به‌نام هِم می‌باشد که در تمام ماهی‌ها مشخصات یکسانی دارند. به‌عبارت دیگر گلوبین‌ها از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر و حتی در بین هم‌خانواده‌ها متفاوت هستند. در مهره‌داران مولکول هموگلوبین از چهار زنجیره گلوبین تشکیل شده است که ایجاد یک تترامر پایدار می‌کند. بیش‌تر ماهی‌ها مانند پستانداران دارای هموگلوبین تترامر هستند با این تفاوت که ممکن است زنجیره‌ها دو بدو مشابه و یا هر چهار زنجیره‌ی پلی‌پپتید متفاوت باشند (۵، ۱۱-۱۴).

[۱] erythrocytes
[۲] Leucocytes
[۳] Multiplicity
[4] Globular
[5] Prosthetic

با انجام این تحقیق گامی در جهت شناخت ساختار و عملکرد هموگلوبین دو گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر قره‌برون و ازون‌برون انجام گرفت. نتیجه این تحقیق منجر به این فرضیه بود که می‌توان ارتباطی معنی‌دار بین توانائی ورود ماهی به اعماق مختلف، فشار جزئی اکسیژن در اعماق مختلف و تفاوت‌های ساختاری هموگلوبین‌ها از نظر فشردگی ساختار، تمایل به اکسیژن، میزان آب‌گریزی سطح هموگلوبین، میزان درصد مارپیچ آلفا و پایداری حرارتی آن‌ها برقرار نمود.

مواد و روش‌ها:

تهیه نمونه خون و استخراج هموگلوبین

با هماهنگی‌های لازم از طرف موسسه تحقیقات شیلات تهران با اداره کل شیلات استان گیلان، و مراجعه به مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قرون در بخش مرکزی تالش و انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری شهید دادمان عملیات خون‌گیری از ماهیان خاویاری مورد نظر در دفعات مختلف انجام گرفت. به لحاظ شرایط سنی عمل خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان نابالغ سه ساله انجام گرفت. برای استخراج هموگلوبین از خون، ۹ میلی‌لیتر از خون ماهی آغشته به هپارین به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. در این مرحله سرم خون در فاز رویی قرار گرفت که با سر ریز کردن، مایع رویی خارج گردید. مرحله بعد افزایش ۱۰ حجم محلول سالین ۰/۹ ٪ (کلریدسدیم) به نمونه حاصله و ۱۵ دقیقه با دور۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی خارج شد. به رسوب حاصل ۵ حجم بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۴ اضافه شد و بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ و سپس مایع رویی خارج گردید. در ادامه به‌منظور لیز کردن گلبول‌های قرمز به اندازه ۹ برابر حجم رسوب آب دو بار تقطیر سرد افزوده شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۸۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاوی هموگلوبین و رسوب حاصله جداره سلول‌ها بود. محلول بالایی را جدا کرده و سپس نمک سولفات آمونیوم ۲۰٪ اضافه شد و ۱۵ دقیقه در حالت ایستا قرار گرفت و سپس سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انجام گرفت. محلول بالایی هموگلوبین می‌باشد که به‌منظور جداسازی 2,3-DPG از هموگلوبین مطابق روش Benesch و همکاران (۱۵) با بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۴ به‌مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت ۳ بار دیالیز گردید. غلظت هموگلوبین با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از ضریب جذب میلی مولاری1-mM-1 cm ۱۳/۵ بر پایه مونومر در طول موج ۵۴۱ نانومتر برای اکسی هموگلوبین اندازه گیری شد (۱۶, ۱۷).

مطالعات الکتروفورز

پس از استخراج و جداسازی هموگلوبین‌ها از خون، به منظور تعیین درصد خلوص آن‌ها از الکتروفورز ژل SDS [1] استفاده شد. تفکیک باندهای پروتئینی برروی ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید بر اساس جرم مولکولی پروتئین‌ها و نتیجه اثر غربال‌کنندگی ژل پلی‌اکریل‌آمید است. این روش به‌طور معمول برای بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین جرم مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها به‌کار می‌رود. مسافت طی شده توسط پروتئین‌ها در پایان الکتروفورز با وزن مولکولی آن‌ها تناسب دارد (۱۸). الکتروفورز طبیعی [2] هم بر اساس بار و هم بر اساس وزن طبیعی پروتئین‌ها، آن‌ها را از هم جدا می‌کند. به‌منظور مطالعه میزان تغییر ساختار پروتئین ابتدا محلول هموگلوبین را با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شد. روش انجام آزمایش همانند روش الکتروفورزSDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۵٪ صورت گرفت و مراحل انجام آزمایش کاملاً مشابه الکتروفورز SDS-PAGE می‌باشد با این تفاوت که در ژل طبیعی به‌جای استفاده از هر گونه مواد واسرشته کننده با همان نسبت از آب دو بار تقطیر استفاده می‌گردد (۱۹). برای تأیید خلوص هموگلوبین‌های به‌دست آمده از طریق ستون کروماتوگرافی CM-سلولز، از روش دقیق و حساس الکتروفورز کانونی [3] استفاده شد. در این روش پروتئین‌ها بر اساس pH ایزوالکتریک خود جدا می‌شوند. این روش از درجه تفکیک بالایی برخوردار است. با توجه به تأثیر pH محیط در میزان یونیزه شدن گروه‌های اسیدی و بازی، هر پروتئین دارای یک نقطه ایزوالکتریک (Ip [4]) منحصر به خود است. جداسازی در این روش با اعمال اختلاف پتانسیل در عرض ژلی که شامل گرادیان pH است انجام می‌شود. در این آزمایش پروتئین بر روی نوارهایی با شیب تثبیت شده pH ۵ که در محدوده pH ۳ ۳ تا ۱۰ با اندازه نوار ۱۸ سانتی‌متر بود، مورد مقایسه قرار گرفت.

[1] Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAG)
[2] Native gel electrophoresis
[3] IsoElectric Focusing (IEF)
[4] Isoelectric point
[5] Immobilized pH Gradient (IPG)

مطالعات کروماتوگرافی به روش تعویض یونی[1]

کروماتوگرافی به روش تعویض یونی یکی از تکنیک‌های مهم در جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها محسوب می‌شود. در این تحقیق برای جداسازی هموگلوبین‌های دو گونه مورد مطالعه از کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. از یک تعویض کننده کاتیونی به‌نام CM-سلولز به‌عنوان بستر ستون کروماتوگرافی و تغییرات pH اساس جداسازی انتخاب گردید. عمل شستشو با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و از pH ۶ و با حجم ۳ برابر ظرفیت ستون[2] آغاز شد و با روند افزایشی ۰/۲ تا pH ۸/۵ که کل هموگلوبین‌ها از ستون خارج می‌شد، ادامه می‌یافت. خروجی ستون در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش جذب تک‌تک ویال‌ها اندازه‌گیری شد و کروماتوگرام مربوط به هر نمونه رسم گردید.

مطالعات طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش[3]

مطالعات طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش به‌منظور بررسی تغییرات در طیف جذبی هموگلوبین استفاده شد. دستگاه طیف سنج نوری شیمادزو۴ مدل UV۳۱۰۰ مجهز به کامپیوتر جهت امور طیف‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت. محدوده روبش[5] طیف ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بود. دستگاه در ابتدا توسط بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ تنظیم شد. هم‌چنین به‌منظور تعیین غلظت (c) هموگلوبین از رابطه بیر لامبرت $A= \varepsilon cd$ استفاده شد که A جذب در طول موج ۵۴۱ نانومتر، ε ضریب جذب مولی برای اکسی هموگلوبین در طول موج ۵۴۱ نانومتر برابر ۱۳/۵ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر بود (که این ضرایب جذب به‌ازای یک واحد هِم محاسبه شده است) و d طول مسیر عبور نور که ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود.

طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)[6]

دورنگ نمایی دورانی یک روش فیزیکی بسیار حساس برای مطالعه ساختار و بررسی تغییرات ساختاری مولکول‌های زیستی است که برهم‌کنش متفاوت برخی ماکرومولکول‌ها را با نور قطبیده دایره‌ای چپ گرد و راست گرد اندازه‌گیری می‌کند. طیف دورنگ نمایی دورانی محدوده فرابنفش دور برای بررسی تغییرات ساختار دوم و طیف دورنگ نمایی دورانی محدوده فرابنفش نزدیک، مربوط به سهم زنجیره‌های جانبی آروماتیک و پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین است (۲۰, ۲۱). طیف دورنگ نمایی دورانی در ناحیه ماوراء بنفش دور (محدوده روبش طیف بین ۱۹۰ و۲۶۰ نانومتر)، با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر Jasco مدل J-810 با استفاده از کووت کوارتز با قطر ۱ میلی‌متر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. غلظت پروتئین حدود ۰/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ تنظیم گردید. ساختار دوم پروتئین با استفاده از نرم افزار CDNN version 2.1 محاسبه شد.

مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس[7]

این طیف‌سنجی اطلاعاتی درباره آرایش فضایی، جایگاه پیوندی، برهم‌کنش حلال، فواصل بین مولکولی را در اختیار می‌گذارد. در این تحقیق به‌منظور بررسی آب‌گریزی سطحی هموگلوبین‌ها بر اساس تغییرات میزان شدت فلورسانس استفاده شد. طیف نشری پروتئین‌ها با استفاده از دستگاه طیف نورسنج فلورسانس Varian مدل Carry Ecips با طول موج ثابت بر انگیختگی ۲۸۵ نانومتر و مابین طول موج‌های ۲۹۰-۴۰۰ نانومتر و با فواصل طول موجی ۰/۹ نانومتر ثبت شده است. غلظت پروتئین حدود ۲/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ تنظیم گردید. اندازه‌گیری شدت فلورسانس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته است.

روش اندازه‌گیری درصد اشباع هموگلوبین

میزان تمایل هموگلوبین به اکسیژن بر اساس اختلاف در خصوصیات طیف جذبی دو تا رنگیزه اکسی هموگلوبین و دِاکسی هموگلوبین با استفاده از روش Tietz اندازه‌گیری شد(۲۲). سدیم دی تیونیت (Na2S2O4) یک عامل کاهنده قوی است که اکسی هموگلوبین را به دی‌اکسی هموگلوبین تبدیل می‌کند (۲۳، ۲۵). درصد اشباع به‌روش اسپکتروفتومتری با استفاده از فرمول زیر انجام می‌شود:

معادله (۱)
$$S_{O_2}(\%) = K_4\left(\frac{A_{577}}{A_{548}}\right) - K_5$$

غلظت هموگلوبین حدود ۲/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ تنظیم گردید. محلول هموگلوبین که برای مدت کافی جهت اشباع از اکسیژن

[1] Ion-exchange chromatography
[2] Bed volume
[3] UV-Visible spectroscopy
[4] Shimadzu
[5] Scan
[6] Circular dichroism
[7] Spectrofluorimeter

در تماس با هوا بوده و به حالت تعادل رسیده است را انتخاب و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جذب آن را با دستگاه طیف سنج نوری شیمادزو مدل UV ۳۱۰۰ مجهز به کامپیوتر در ۵۴۸ نانومتر قرائت گردید که به آن A548(0) گفته شد. هم‌چنین جذب ۵۷۷ نانومتر قرائت گردید و آن هم A577(0) گفته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دی تیونیت سدیم در بافر فسفات با غلظت ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ (برای تهیه محلول ابتدا بافر فسفات به مدت کافی بدون گاز[1] می‌شود) به این نمونه اضافه شد تا کاملاً به دِاکسی تبدیل شود. جذب نمونه حاصل در ۵۴۸ و ۵۷۷ نانومتر قرائت گردید و آن‌ها به‌ترتیب A548(r) و A577(r) نامیده شدند. با استفاده از اعداد بدست آمده نسبت‌های R0 و Rr به‌ترتیب زیر محاسبه شد:

$$R_o = \frac{A_{548(o)}}{A_{577(o)}}$$ معادله (۲)

$$R_r = \frac{A_{548(r)}}{A_{577(r)}}$$ معادله (۳)

سپس با استفاده از روابط زیر ضرایب مورد نظر محاسبه گردید

$$K_4 = \frac{100}{(R_o - R_r)}$$ معادله (۴)

$$K_5 = \frac{100\,R_r}{(R_o - R_r)}$$ معادله (۵)

مجدداً محلول هموگلوبین با غلظت ۲/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات ۱۰میلی‌مولار با pH ۷/۳ که برای مدت کافی جهت اشباع از اکسیژن در تماس با هوا بوده و به حالت تعادل رسیده را درون کووت دستگاه ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جذب آن را با اضافه کردن هر بار ۵ میکرولیتر از محلول سدیم دی تیونیت مذکور تیتر کرده و در طول موج‌های ۵۴۸ و ۵۷۷ نانومتر قرائت گردید. در پایان تغییرات درصد اشباع نسبت به غلظت سدیم دی تیونیت رسم کرده و منحنی اشباع هموگلوبین به‌دست آمد. $(SDT)_{50}$ آن غلظتی از (SDT) است که حدود ۵۰٪ از هموگلوبین اشباع شده است که این نقطه معادل P_{50} در منحنی تفکیک اکسیژن در هموگلوبین می‌باشد (۲۶). در این روش از غلظت سدیم دی تیویت مصرفی به‌جای فشار جزئی اکسیژن استفاده شد.

مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی[2]

یکی از روش‌های سنجش در این زمینه استفاده از کالری‌متری روبشی افتراقی (DSC) می‌باشد. پارامتر اندازه‌گیری شده، ظرفیت گرمایی ویژه محلول پروتئین در فشار ثابت Cp است. مفهوم Cp میزان گرمای جذب شده توسط یک پروتئین برای تبدیل شکل طبیعی به شکل باز شده آن است. فرم باز شده نسبت به حالت طبیعی دارای ظرفیت گرمایی بیش‌تری است. اختلاف ظرفیت گرمایی این دو حالت ΔCp گویای ظرفیت گرمایی شکل باز شده است. اگر چه خصوصیات ترمودینامیکی پروتئین‌ها بسیار متفاوتند، ویژگی‌های ترمودینامیکی پروتئین‌های کوچک دارای شباهت‌هایی هستند که بدین ترتیب می‌توان مجموعه‌ای از قوانین عمومی را در این ارتباط ذکر کرد. ΔCp گویای هیدروفوبیسیته در پروتئین‌هاست، از این رو هر چه ΔCp پروتئین‌ها بیش‌تر باشد هایدروفوبیسیته‌ی پروتئین بیش‌تر می‌گردد(۱).

در این آزمایش از دستگاه کالری‌متری روبشی افتراقی با مدل Calorimetry Sciences Corporation , CSC 6100 N-DSC II استفاده شد. محدوده دمایی به‌کار رفته در این آزمایش ۸۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. در این آزمایش غلظت هموگلوبین در تمام نمونه‌ها ۲/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۳ مورد آزمایش قرار گرفت و سرعت افزایش دمایی دستگاه، ۲ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تنظیم شد. دمای ماگزیمم پیک به‌عنوان T_m گزارش شد.

نتایج

استخراج و خالص‌سازی هموگلوبین‌ها و ارائه روش‌هایی برای اثبات تخلیص هموگلوبین غالب

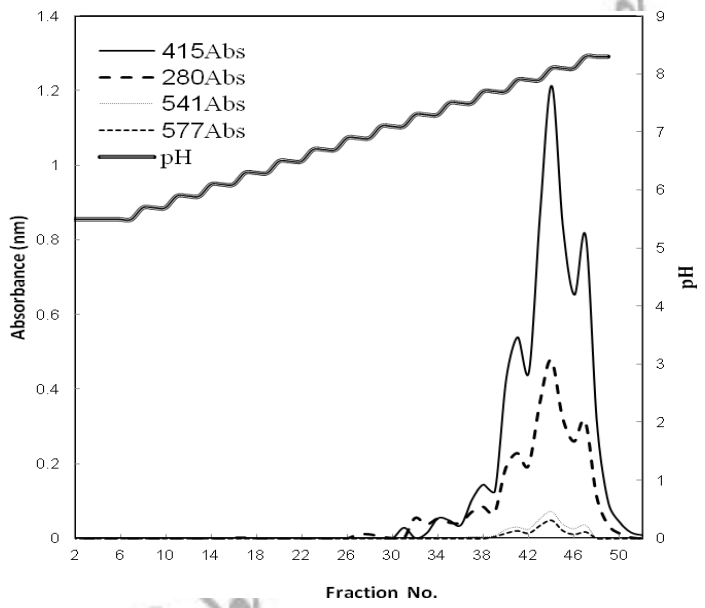
پس از استخراج هموگلوبین خون دو ماهی قره‌برون و ازون‌برون، هموگلوبین‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و با استفاده ازستون کروماتوگرافی CM-سلولز، و شستشو با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار در محدوده‌ی pH از ۵/۵ تا ۸/۵، این هموگلوبین‌ها خالص‌سازی شدند. با توجه به شکل ۱ و ۲ کروماتوگرام حاصل از این کروماتوگرافی تعویض یونی برای هموگلوبین‌های دو ماهی رسم شد. در خون هر دو ماهی سه

[1] Degas

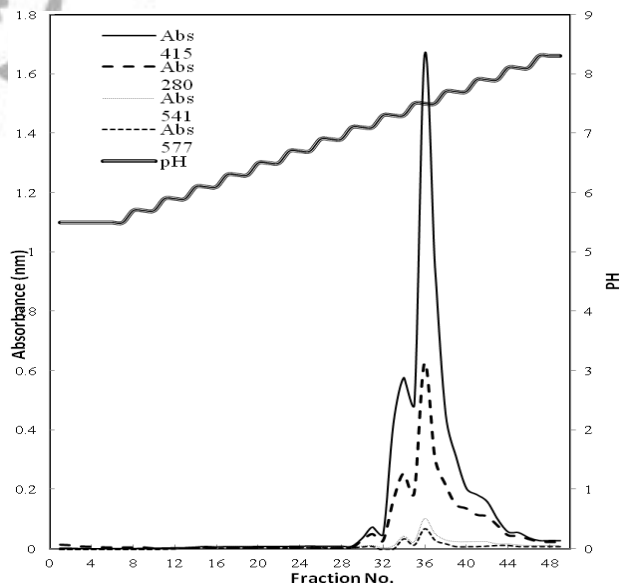
[2] Differential Scanning Calorimery (DSC)

نوع هموگلوبین وجود دارد که یکی از آن‌ها در دوگونه غالب می‌باشد. هموگلوبین‌ها در ماهی ازون‌برون در pHهای ۷/۱، ۷/۳، ۷/۵ و در ماهی قره‌برون در در pHهای ۷/۷، ۸، ۸/۳ از ستون کروماتوگرافیCM-سلولز تخلیص گردید. در ماهی قره‌برون هموگلوبین غالب در pH ۸ در حالی که در ماهی ازون‌برون هموگلوبین غالب در pH ۷/۳ از ستون کروماتوگرافی جدا شد.

در طی فرآیند تخلیص هموگلوبین‌ها دمای ستون کروماتوگرافی ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. در طول ثبت جذب هموگلوبین به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش دمای آزمایشگاه ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط استاندارد آزمایش محیّا بود. با فرض این‌که هموگلوبین غالب بیش‌ترین نقش را در تنفس ایفا می‌کند، بقیه مراحل آزمایش بر روی هموگلوبین غالب در هر جنس و گونه انجام شد.

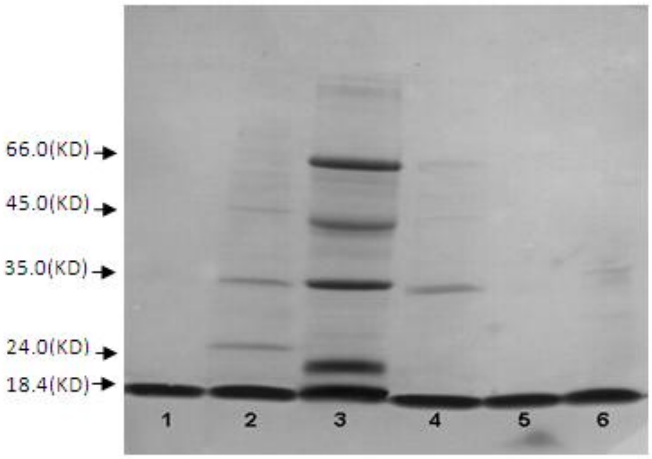


شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از خالص‌سازی هموگلوبین‌های ماهی قره‌برون

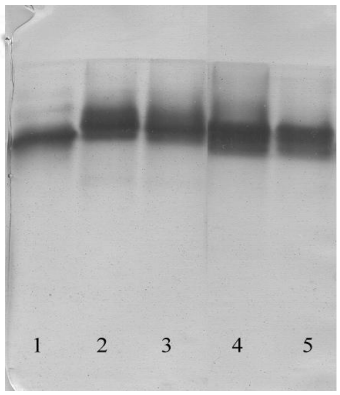


شکل۲: کروماتوگرام حاصل از خالص‌سازی هموگلوبین‌های ماهی ازون‌برون

برای تأیید خلوص هموگلوبین‌های به‌دست آمده توسط فرآیند فوق، از روش‌های الکتروفورز (Native-PAGE و SDS-PAGE) و روش ایزوالکتریک فوکوسینگ استفاده شد. در روش الکتروفورز کانونی، نقطه ایزوالکتریک هموگلوبین غالب در هر دو گونه تخمین زده شد. با این فرض که هموگلوبین غالب نقش اصلی را در تنفس ایفا می‌کند، ادامه‌ی تحقیق بر روی هموگلوبین غالب در هر گونه انجام گرفت. شکل ۳ الکتروفورز SDS-PAGE را برای دو نمونه هموگلوبین دو ماهی قبل از عملیات تخلیص و بعد از تخلیص برای هموگلوبین‌های خالص و در شکل ۴ همان نمونه‌ها را با الکتروفورز Native-PAGE نشان داده شده است. هم‌چنین در شکل ۵ نقطه ایزوالکتریک دو هموگلوبین غالب برای دو نمونه ماهی مشخص شده است.

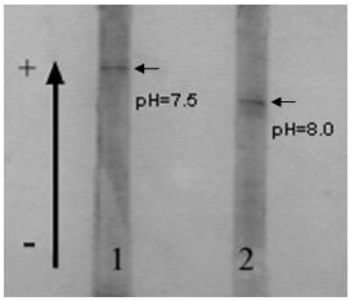


شکل ۳: الکتروفورز SDS-PAGE بر روی هموگلوبین‌ها. هموگلوبین‌های استخراج شده از خون قبل از عملیات خالص‌سازی: ۲) ماهی ازون‌برون، ۳) مارکر، ۴) ماهی قره‌برون، ۶) انسان. هموگلوبین خالص‌سازی شده توسط ستون کروماتوگرافی در دو ماهی: ۱) ماهی ازون‌برون ۵) ماهی قره‌برون



شکل۴: الکتروفورز NATIVE -PAGE بر روی هموگلوبین‌ها. هموگلوبین‌های استخراج شده از خون قبل از عملیات خالص‌سازی:۱) انسان ۲) ماهی ازون‌برون، ۴) ماهی قره‌برون. هموگلوبین خالص‌سازی شده توسط ستون

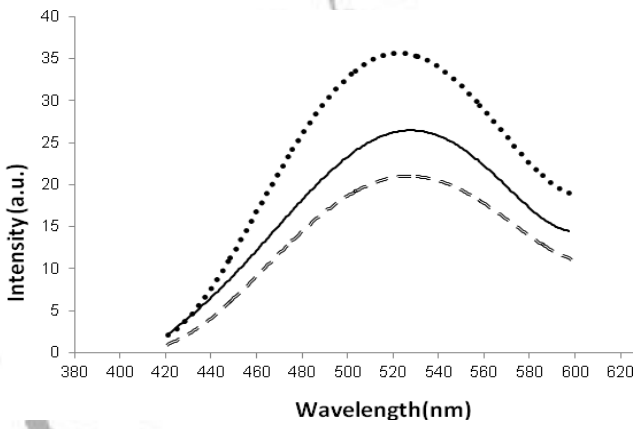
کروماتوگرافی در دو ماهی: ۳) ماهی ازون‌برون ۵) ماهی قره‌برون



شکل ۵: تائید خلوص هموگلوبین دو ماهی پس از عملیات کروماتوگرافی به‌وسیله روش الکتروفورز کانونی با استفاده از نوارهایی با شیب تثبیت شده pH (۱۰-۳) و تعیین نقطه ایزوالکتریک Ip در آن‌ها: ۱) ازون‌برون ۲) قره برون

مطالعات فلورسانس انجام شده بر روی هموگلوبین‌ها

در این تحقیق به‌منظور بررسی خواص آب‌گریزی سطحی (Hydrophobicity) هموگلوبین‌ها، از فلورسانس استفاده گردید. به این ترتیب که هر چه میزان شدت فلورسانس بیش‌تر باشد، هموگلوبین از آب‌گریزی بیش‌تری برخوردار است. طیف نشری کمپلکس ANS– هموگلوبین مطابق شکل۶ در ۲۵ درجه سانتی‌گراد بین طول موج‌های ۶۵۰-۳۶۶ نانومتر و طول موج برانگیختگی ۳۵۵ نانومتر ثبت شد. اتصال ANS به وصله‌های (Patches) آشکار شده آب‌گریز در سطح پروتئین با افزایش قابل ملاحظه‌ای در فلورسانس آن همراه می‌شود (۲۸). شدت فلورسانس در هموگلوبین انسان بیش‌تر از هموگلوبین دو ماهی می‌باشد. این نتیجه بیان می‌کند که سطح هموگلوبین انسان از دو ماهی آب‌گریزتر می‌باشد و هم‌چنین مطابق نمودار، سطح هموگلوبین ماهی قره‌برون آب‌گریزتر تر از ماهی ازون‌برون است.



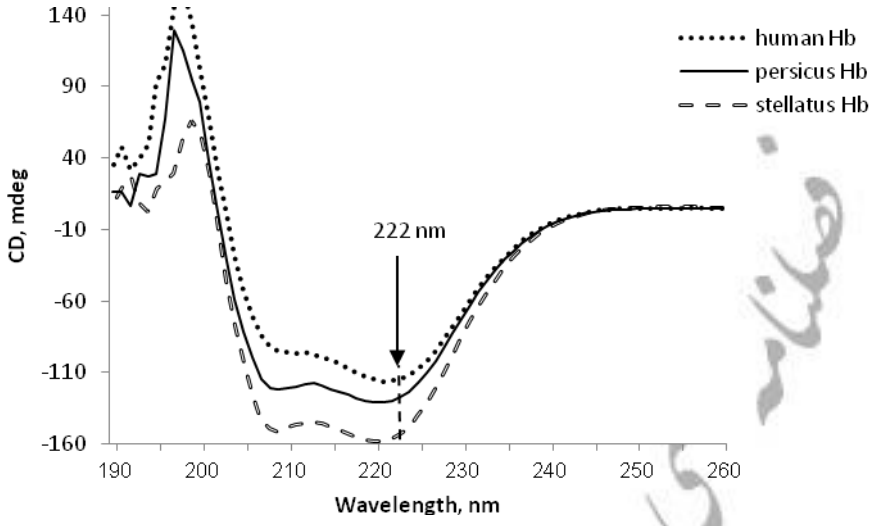
شکل ۶: نمودار طیف فلورسانس اتصال ANS به هموگلوبین غالب ماهی ازون‌برون، قره‌برون و انسان. در این شکل، غلظت هموگلوبین‌ها درحدود ۲/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با PH ۷/۳ و در شرایط استاندارد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شده است.

مطالعات دورنگ نمایی دورانی بر روی هموگلوبین‌ها

مقایسه طیف CD مربوط به هموگلوبین انسان وهموگلوبین دو ماهی نشان می‌دهد که در ساختار دوم هموگلوبین‌ها میزان مارپیچ آلفا در دو ماهی بیش‌تر از انسان می‌باشد و هم‌چنین میزان مارپیچ آلفا در ماهی ازون‌برون بیش‌تر از ماهی قره‌برون است. در شکل ۷ تفاوت طیف CD در ۲۲۲ نانومتر برای انسان و ماهی قره‌برون ۱۳/۶۴ mdeg[1] و این اختلاف برای دو ماهی ازون‌برون و قره‌برون ۲۶/۷۸ mdeg می‌باشد. با مقایسه درصد مارپیچ آلفا و با توجه به طیف CD، مشاهده می‌شود که میزان

[1] millidegree

مارپیچ آلفا درماهی قره‌برون نسبت به انسان ۱٪ بیش‌تر و در ماهی ازون‌برون نسبت به قره‌برون ۲٪ بیش‌تر می‌باشد.



شکل ۷: نمودار طیف CD مربوط به هموگلوبین‌ها. غلظت هموگلوبین‌ها درحدود ۰/۲۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با PH ۷/۳ و در شرایط استاندارد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

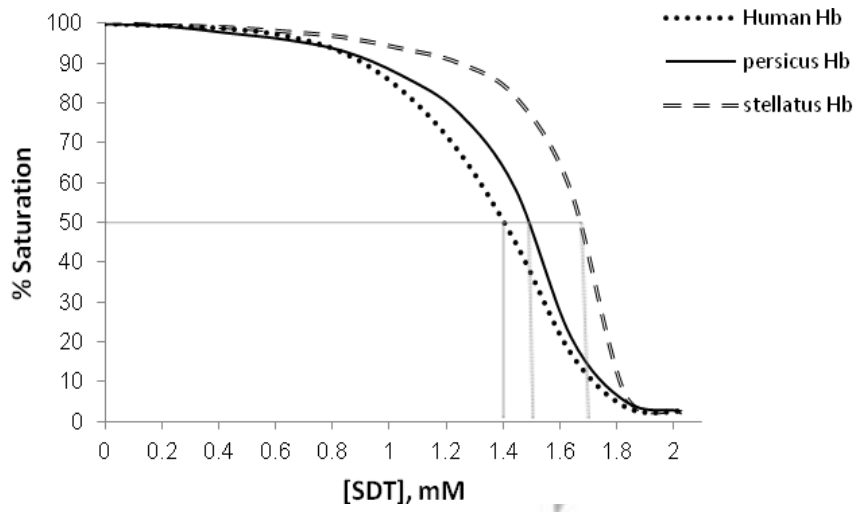
روش اندازه‌گیری منحنی اشباع هموگلوبین‌ها با استفاده از دی‌تیونیت

دی تیونیت سدیم ($Na_2S_2O_4$) می‌تواند به سرعت با اکسیژن مولکولی و با نسبت یک به یک ترکیب می‌شود:

$$Na_2S_2O_4 + O_2 + 2H_2O \leftrightarrow 2NaHSO_3 + H_2O$$

دی‌تیونیت سدیم با اکسیژن متصل به هموگلوبین و هم‌چنین با اکسیژن محلول واکنش می‌دهد. لذا در عمل باید تمام نمونه‌ها در شرایط یکسانی قرار داده شوند تا میزان اکسیژن محلول آن‌ها یکسان گردد. در این روش برای رسم منحنی تفکیک اکسیژن به جای فشار جزئی اکسیژن از غلظت دی‌تیونیت سدیم مصرفی استفاده می‌شود. از روی این منحنی مقدار دقیق $[SDT]_{50}$ که پارامتر مشابه P_{50} است استخراج می‌شود. در شکل ۸ نمودار منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین‌ها به اکسیژن مشاهده می‌شود. با مقایسه نمودار حاصله تمایل هموگلوبین ماهی ازون‌برون به اکسیژن بیش‌تر از هموگلوبین ماهی قره‌برون، و هموگلوبین ماهی قره‌برون بیش‌تر از هموگلوبین انسان می‌باشد. علّت اصلی اختلاف تمایل هموگلوبین به اکسیژن در سه نمونه هموگلوبین مربوط به تفاوت خواص آب‌گریزی سطح هموگلوبین‌ها می‌باشد. در این محاسبه نشان داده می‌شود که تمایل هموگلوبین انسان به اکسیژن نسبت به دو ماهی کم‌تر است و هموگلوبین ماهی قره‌برون که توانایی رفتن به عمق کم‌تر را دارد، در مقایسه با ماهی ازون‌برون اکسیژن افینیته کم‌تری دارد.

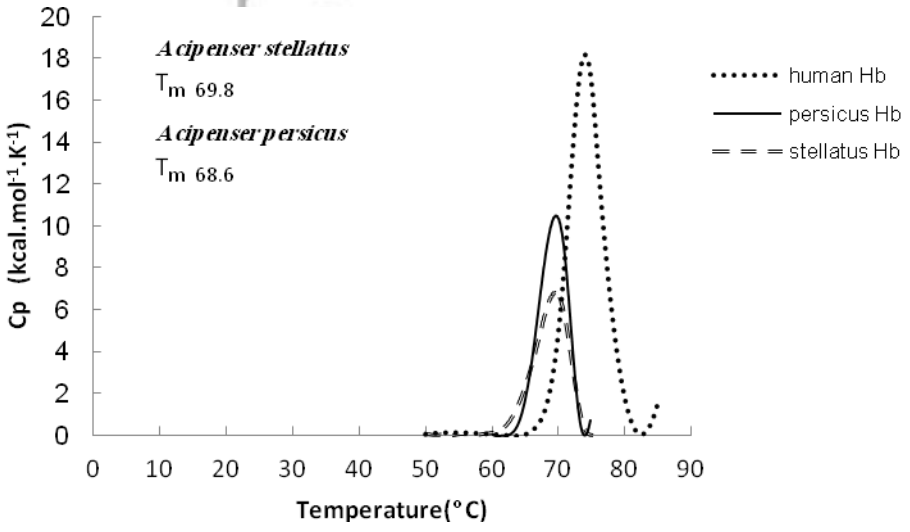
.



شکل ۸: منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین‌ها به اکسیژن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. میزان SDT_{50} برای هموگلوبین انسان، ماهی قره‌برون و ماهی ازون‌برون به‌ترتیب برابر ۱/۴۰، ۱/۵۰ و ۱/۶۷ میلی‌مولار می‌باشد

مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی (DSC)

شکل ۹ واسرشته شدن حرارتی دو هموگلوبین، ظرفیت گرمایی Cp اندازه‌گیری شده و T_m را در هر هموگلوبین نشان می‌دهد. در این نمودار نشان داده شده است که گرمای لازم برای بازشدگی (Unfolding) دو هموگلوبین با هم متفاوت است. هموگلوبین ماهی ازون‌برون برای بازشدگی گرمای بیش‌تری نسبت به هموگلوبین ماهی قره‌برون لازم دارد.



شکل ۹: ترموگرام DSC واسرشتگی حرارتی هموگلوبین را نشان می‌دهد

بحث

تنوع هموگلوبین در ماهیان به همراه اختلاف‌های فیزیولوژیکی بدن آن‌ها سبب می‌شود آن‌ها در محدوده‌ی وسیعی از تغییرات شرایط محیطی بتوانند به حیات خود ادامه دهند. پس از جداسازی هموگلوبین از خون ماهیان قره‌برون و ازون‌برون و اثبات وجود پدیده‌ی چند هموگلوبینی در آن‌ها به روش‌های مختلف الکتروفورز، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی بر روی هموگلوبین این دو ماهی انجام گرفت. درهر کدام از این دو گونه یک هموگلوبین غالب وجود داشت. با استفاده ازنتایج حاصله از طیف‌سنجی فلورسانس و طیف‌سنجی دو رنگ نمایی دورانی و منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین به اکسیژن بر روی هموگلوبین انسان و هموگلوبین غالب دو گونه ماهی مورد مطالعه، ارتباط منطقی بین تمایل هموگلوبین به اکسیژن و فشار جزئی اکسیژن در دو عمق مختلف دریا به‌دست آمد.

با توجه به این موضوع که ساختار و عملکرد هموگلوبین در حمل و نقل اکسیژن بسیار مهم می‌باشد، مطمئناً هموگلوبین ماهیان در اعماق مختلف ساختارهای متفاوتی را دارا می‌باشند. در ضمن تمایل هموگلوبین به اکسیژن ماهی‌ها به عوامل دیگری چون شوری، pH، دما، و مانند آن نیز وابسته می‌باشد. در این تحقیق با توجه به این‌که شرایط اکولوژیک محیط‌زیست این ماهیان یکسان می‌باشد و از نظر فیزیولوژی هم این دو ماهی مشابه هستند، توانایی حرکت به اعماق مختلف که در ژن این ماهیان تعریف شده، می‌تواند وجه تمایز آن‌ها باشد.

با توجه به این‌که ماهیان مورد مطالعه جایگاه ویژه‌ای در نگرش تاریخی به طبقه‌بندی و تکامل ماهیان دارند مطالعه‌ی هموگلوبین آن‌ها از این وجه نیز حائز اهمیت می‌باشد (۲۹) . از نظر تکاملی به تاسماهیان فسیل زنده می‌گویند و قدمت آن‌ها به دوره تریاس و کرتاسه بر می‌گردد (۳۰). علت این‌که هنوز این ماهیان در جهان یافت می‌شوند، این‌گونه تفسیر می‌شود که آن‌ها محدوده وسیعی از تغییرات اکولوژیکی را تحمل می‌کنند و به‌علت اندازه بزرگ آن‌ها شکارچیان طبیعی برای آن‌ها کم می‌باشند. هم‌چنین آن‌ها بسترخوار می‌باشند و مقدار کافی غذا در دسترس آن‌ها وجود دارد (۳۱, ۳۲). در این تحقیق هموگلوبین انسان به‌عنوان مرجعی برای هموگلوبین در سطح تراز دریا و دو ماهی قره‌برون و ازون‌برون که توانایی حرکت دراعماق ۵۰ و ۱۵۰متری را دارند (۲، ۳) و از نظر شرایط زیست محیطی و فیزیولوژی یکسان هستند، به‌عنوان مرجعی برای بیان اختلاف عمق در نظر گرفته شدند. در بخش نتایج نشان داده شد که تمایل هموگلوبین به اکسیژن در ماهی ازون‌برون از ماهی قره‌برون، و ماهی قره‌برون از انسان بیش‌تر می‌باشد. با نتایج فلورسانس تأیید گردید که از لحاظ آب‌گریزی سطح هموگلوبین، آب‌گریزی هموگلوبین انسان از ماهی قره‌برون، و ماهی قره‌برون از ماهی ازون‌برون بیش‌تر می‌باشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که روند تغییرات ظرفیت گرمایی (Cp) در پروتئین‌ها با میزان آب‌گریزی سطح رابطه‌ی خطی دارد (۳۴, ۳۵). این موضوع در این تحقیق نیز کاملاً تایید گردید. به نظر می‌رسد که ساختار هموگلوبین با توجه به شرایط محیط زیست و میزان فشار جزئی اکسیژن و مقدار تمایل مورد نیاز توسط طبیعت بهینه شده است. این درحالی است که در مهره‌دارانی که دارای تنوع هموگلوبینی کم‌تری می‌باشند، مانند انسان، تغییر در شرایط طبیعی زندگی می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های خطرناکی مانند بیماری‌های گریبان‌گیر غواصانی که به اعماق زیاد می‌روند[1] (۳۶) شود. مستقل از این واقعیت که هوا از ۲۱٪ اکسیژن، ۷۸٪ نیتروژن، و ۱٪ سایر گازها تشکیل یافته است، مطابق قانون دالتون[2]، فشار جزئی نسبی اکسیژن در هر ارتفاعی ۲۱٪ کل فشار را تشکیل می‌دهد (۳۷). در کنار تاثیرات انکارناپذیر ویژگی‌های فیزیولوژیکی، ساختار هموگلوبین نقشی حیاتی در تطابق موجود با شرایط محیطی دارد. در خصوص بیماری‌های مرتبط با اعماق زیاد در غواصی، تاثیر افزایش فشار جزئی اکسیژن قابل توجه است. با افزایش عمق و افزایش فشار جزئی مطلق[3] اکسیژن، مقدار اکسیژن در محلول و در بدن افزایش می‌یابد و به پیگمنت‌های حامل اکسیژن متصل می‌گردد. بنابراین در یک فشار جزئی مشخص اکسیژن، هموگلوبین در خون سرخرگی به‌شکل مجازی با اکسیژن اشباع می‌گردد و پس از آن افزایش فشار جزئی اکسیژن، تاثیر کمی بر افزایش مقدار اکسیژن پیوند یافته با هموگلوبین دارد (۳۷). در آزمایشات انجام شده در این تحقیق، نتایج نشان دادند که تمایل هموگلوبین به اکسیژن با افزایش عمق و در نتیجه افزایش فشار جزئی اکسیژن، افزایش می‌یابد. در مطالعات انجام گرفته بر روی

[1] Oxygen toxicity
[2] Dalton's law
[3] Partial absolute pressure

ارتباط عمق و فشار جزئی اکسیژن نشان داده شده است که با افزایش عمق فشار جزئی اکسیژن افزایش می‌یابد (۳۷). پس فشار جزئی اکسیژن در عمقی که ماهی ازون‌برون توانایی عزیمت با آن‌جا را دارد بیش‌تر از ماهی قره‌برون و بیش‌تر از سطح زمین برای انسان می‌باشد. هرچه هموگلوبین در عمق بیش‌تری بتواند باشد میزان فشردگی، پایداری حرارتی، تمایل هموگلوبین به اکسیژن، میزان درصد مارپیچ آلفا در آن بیش‌تر و برعکس میزان آب‌گریزی سطح هموگلوبین کم‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا تشکر و قدردانی خود را بابت راهنمایی‌های ارزشمند و نقش هدایتگر استاد گرانقدر جناب آقای پروفسور موسوی موحدی، استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران ابراز نمایند.

منابع

۱. **موحدی، ع.ا.م.، چمنی، ج.خ.، ۱۳۸۳.** پروتئین ساختار و عملکرد. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۰۶ صفحه.

۲. **نادری جلودار، م. و عبدلی، ا.، ۱۳۸۳.** اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۸۰ صفحه.

۳. **بهمنی، م.، ۱۳۸۵.** خاویار ایران. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، موج سبز، ۱۲۰ صفحه.

4. **Tocidlowski, M.E.; Lewbart, G.A. and Stoskopf, M.K., 1997.** Hematologic study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). Veterinary Clinical Pathology. Vol. 26, No. 3. pp.19-125.
5. **Giardina, B.; Mosca, D. and De Rosa, M.C., 2004.** The Bohr Effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. Acta physiologica scandinavica. Vol. 182, No. 3, pp.229-244.
6. **Riggs, A., 1976.** Factors in the evolution of hemoglobin function. Vol. 35, No. 10, pp. 115-2118.
7. **Fourie, F.R. and Van Vuren, J.H.J., 1976**. A seasonal study on the hemoglobins of carp (*Cyprinus carpio*) and yellowfish (*Barbus holubi*) in South Africa. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 55, No. 4, pp.523-525.
8. **Ronald, A.P. and Tsuyuki, H., 1971.** The subunit structures and the molecular basis of the multiple hemoglobins of two species of trout, *Salmo gairdneri* and *S. clarki clarki*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 39, No. 2, pp.195-198.
9. **Houston, A.H. and Cyr, D., 1974.** Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of experimental biology. Vol. 61, No. 2, pp.455.
10. **Fyhn, U.E.H. and Sullivan, B., 1974.** Hemoglobin polymorphism in fishes. I. Complex phenotypic patterns in the toadfish, Opsanus tau. Biochemical Genetics. Vol. **11, No.** 5, pp.373-385.
11. **Houston, A.H.; Mearow, K.M. and Smeda, J.S., 1976**. Further observations upon the hemoglobin systems of thermally-acclimated freshwater teleosts: Pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*), white sucker (*Catostomus commersoni*), carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and carp-goldfish hybrids. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. Vol. 54, No. 2, pp. 267-273.
12. **Giles, M.A. and Vanstone, W.E., 1976.** Ontogenetic variation in the multiple hemoglobins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and effect of environmental factors on their expression. Journal of the Fisheries Board of Canada. Vol. 33, No. 5, pp.1144-1149.
13. **Landini, G.F.; Schwantes, A.R. and Schwantes, M.L.B., 2002**. Astyanax scabripinnis (Pisces: Characidae) hemoglobins: structure and function. Brazilian Journal of Biology. Vol. 62, No. 4A, pp.595-599.
14. **Gillen, R.G. and Riggs, A., 1973.** Structure and function of the isolated hemoglobins of the American eel, *Anguilla rostrata*. Journal of Biological Chemistry. Vol. 248, No. 6, pp.1961-1969.
15. **Powers, D.A., 1980**, Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. American Zoologist. 20:139-162.
16. **Edelstein, S.J.; McEwen, B. and Gibson, Q.H., 1976**. Subunit dissociation in fish hemoglobins. Journal of Biological Chemistry. Vol. 251, No. 23, pp.7632.
17. **Weber, R.E.; Sullivan, B.; Bonaventura, J. and Bonaventura, C., 1976.** The hemoglobin

27. **Weiland, T.R.; Kundu, S.; Trent Iii, J.T.; Hoy, J.A. and Hargrove, M.S., 2004.** Bis-histidyl hexacoordination in hemoglobins facilitates heme reduction kinetics. American Chemical Society. Vol. 126, No. 38, pp. 11930-11935.
28. **Stevens, J.; Uchida, T.; Daltrop, O. and Ferguson, S., 2005**. Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome c biogenesis. Biochemical Society Transactions. 33:792-795.
29. **Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005**. Lehninger Principles of Biochemistry. In.: New York, Worth Publishers.
30. **De, S. and Girigoswami, A., 2006.** A fluorimetric and circular dichroism study of hemoglobin-effect of pH and anionic amphiphiles. Journal of colloid and interface science. Vol. 296, No. 1, pp.324-331.
31. **Bemis, W.; Findeis, E. and Grande, L., 2002.** An overview of Acipenseriformes. Sturgeon Biodiversity and Conservation. pp.25-71.
32. J**ensen, F.B.; Fago, A. and Weber, R.E., 1998.** Hemoglobin Structure and Function. Fish physiology. 17:1-40.
33. **Krieger, J. and Fuerst, P.A., 2002.** Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. Molecular biology and evolution. Vol. 19, No. 6, pp.891.
34. **Gardiner, B.G., 1984**. Sturgeons as living fossils. In.Vol.148,Springer–Verlag,New York.
35. **Baldwin, R.L., 1986.** Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 83, No. 21, pp.8069.
36. **Moosavi-Movahedi, A.A.; Chamani, J.; Goto, Y. and Hakimelahi, G.H., 2003**. Formation of the molten globule-like state of cytochrome c induced by n-alkyl sulfates at low concentrations. Journal of biochemistry. Vol. 133, No. 1, pp.93.
37. **Layon, A.J. and Modell, J.H., 2009.** Drowning: update 2009. Anesthesiology. Vol. 110, No. 6, pp.1390.
38. **Wilmshurst, P., 1998.** Diving and oxygen. BMJ. 317:996-999.

system of the primitive fish, Amia calva: isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure. Vol. 434, No. 1, pp.18-31.
18. **Benesch, R.E.; Benesch, R. and Yung, S., 1973**. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. Analytical biochemistry. Vol. 55, No. 1, pp.245-248.
19. **Laterreur, J. and English, A.M., 2007**. Hemoglobin S-nitrosation on oxygenation of nitrite/deoxyhemoglobin incubations is attenuated by methemoglobin. Journal of inorganic biochemistry. Vol. 101, No. 11-12, pp.1827-1835.
20. **Romeo, A.A.; Capobianco, J.A. and Ann, M., 2003**. Superoxide dismutase targets NO from GSNO to Cysβ93 of oxyhemoglobin in concentrated but not dilute solutions of the protein. Journal of the American Chemical Society. Vol. 125, No. 47, pp.14370-14378.
21. **Kim, D.H.; Kim, J.H.; Seo, J.H.; Lee, J.W.; Lim, S.Y.; Lee, H.J. and Byun, M.W., 2005**. Polymerization of SDS-PAGE gel by gamma irradiation and its use for characterization by electrophoresis of a protein. Radiation Physics and Chemistry. Vol. 74, No. 5, pp.395-398.
22. B**ollag, D.M. and Edelstein, S.J., 1991**. Immunoblotting. Protein Method, Wiley-Liss, New York. pp.181–211.
23. S**ugita, Y.; Nagai, M. and Yoneyama, Y., 1971**. Circular dichroism of hemoglobin in relation to the structure surrounding the heme. Journal of Biological Chemistry. Vol. 246, No. 2, pp.383-388.
24. **Li, R.; Nagai, Y. and Nagai, M., 2000**. Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: near- and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin. Journal of inorganic biochemistry. Vol. 82, No. 1-4, pp.93-101.
25. **Tietz, N.W. and Andresen, B.D., 1986.** Textbook of clinical chemistry. Philadelphia, WB Saunders Co. 42:1701–1703.
26. **Salhany, J.M., 2008.** Kinetics of Reaction of Nitrite with Deoxy Hemoglobin after Rapid Deoxygenation or Predeoxygenation by Dithionite Measured in Solution and Bound to the Cytoplasmic Domain of Band 3 (SLC4A1). Biochemistry. Vol. 47, No. 22, pp.6059-6072.

Comparative structural and functional studies of Sturgeon Hemoglobin (*Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*)

- **Shohreh Aryaeinezhad:** Department of Marine Biology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran
- **Shahla Jamili*:** Department of Marine Biology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran
- **Mehran Habibi Rezaei:** Department of Biology, Pardis of Science, Tehran, P.O.Box: 14155-6455, Tehran, Iran
- **Mohammad Reza Fatemi:** Department of Marine Biology, Islamic Azad University, Science and Research, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran

Received: November 2012 Accepted: March 2013

Keywords: Oxygen affinity, Environmental oxygen partial pressure, Spectroscopy, Thermal denaturation, *Acipenser persicus, Acipenser stellatus*.

Abstract:

Hemoglobin (Hb) variability is a commonly used index of phylogenetic differentiation and molecular adaptation in fish enabling them to adapt to different ecological conditions. In this study, the characteristics of Hbs from two Sturgeon species of the Southern Caspian Sea Basin were investigated. After extraction and separation of hemoglobin from whole blood, the polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), cellulose acetate electrophoresis, and isoelectric focusing (IEF) were used to confirm Hb variabilities in these fishes. We showed that although both species have variable Hbs with different isoelectric points, their dominant Hbs can be identified. Ion exchange on CM-cellulose chromatography was used for purification of the dominant Hbs from these fishes. The accuracy of the methods was confirmed by IEF and SDSPAGE. Spectral studies using fluorescence spectrophotometery indicated that although the Hbs from these fishes had similar properties. A comparative study of Hbs alpha-helix secondary substructures was performed by circular dichroism spectropolarimetry (CD) analysis. The thermal denaturation properties of the Hbs were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) .UV–vis spectrophotometery was also utilized to measure oxygen affinity of Hbs by sodium dithionite. Oxygen affinities of these Hbs were compared using Hb–oxygen dissociation curves. Together, these results demonstrate a significant relationship between oxygen affinity, hydrophobicity, themostability and alpha-helix secondary substructures of fish hemoglobins and environmental partial pressure of oxygen.

*Corresponding author's email: shahlajamili45@yahoo.com