مقاله علمی –پژوهشی:

مطالعه چهار روش مختلف استخراج پروتئین از موکوس پوست گاو ماهی میمونی دریای خزر (*Neogobius fluviatilis* Pallas, 1814) به منظور غربالگری از طریق سنجش زیستی

محمد اخوان بهابادی*[۱،۲و۳]، حامد پاک نژاد[۲]، علی اکبر هدایتی[۲]، مهران حبیبی رضایی[۳]

*Akhavanm@ut.ac.ir

۱- مرکز تحقیقات ملی آبزیان آبهای شور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، یزد، ایران.

۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، ایران.

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

چکیده

استخراج پروتئین از موکوس پوست ماهی‌ها با هدف غربالگری مبتنی بر سنجش زیستی بسیار چالشی و متغیر است. در این مطالعه، چهار روش مختلف استخراج و تغلیظ پروتئین شامل استخراج فاز جامد (SPE)[۱]، استون[۲]، تری کلرو استیک اسید-استون[۳] و متانول[۴] هدف بررسی کارایی آنها در الترافیلتراسیون و گرفتن قله‌های (peaks) مناسب در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) جهت سنجش فعالیت زیستی مورد مقایسه قرار گرفتند. داده‌های ارائه شده نشان می‌دهد که روش استخراج فاز جامد نسبت به سه روش مورد آزمایش دیگر بر حسب کمیت (میزان پروتئین تام) و کیفیت (پروفایل پروتئینی مشاهده شده در SDS – PAGE) پروتئین‌های موکوس پوست گاو ماهی، برتری دارد. از سوی دیگر، به علت ماهیت هیدروفوبی موکوس اپیدرمی، سه روش استخراج با استون، متانول و تری کلرو استیک اسید/استون منجر به تجمع غیر قابل برگشت پروتئین‌ها گردید که الترافیلتراسیون، HPLC و به تبع آن سنجش فعالیت زیستی را غیر ممکن می‌سازد. در این مطالعه، بالاترین میزان پروتئین (۴,۶۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ($p<۰/۰۱$) و بهترین پروفایل پروتئینی (۱۳باند) مربوط به استخراج فاز جامد بود. همچنین این روش به طور همزمان منجر به استخراج، تغلیظ و تخلیص (پاکسازی) اولیه نمونه‌ها و در نتیجه، افزایش کارایی الترافیلتراسیون و HPLC می‌گردد. بنابراین، برای جداسازی پروتئین‌ها و پپتیدهای فعال از نمونه‌های پیچیده زیستی مختلف (موکوس پوست ماهیان)، مناسب است.

لغات کلیدی: پپتیدهای فعال زیستی، غربالگری مبتنی بر زیست سنجی، موکوس پوست ماهی، استخراج پروتئین

*نویسنده مسئول

[1] Solid-Phase Extraction (SPE)
[2] Acetone precipitation
[3] TCA-acetone precipitation
[4] Methanol precipitation

مقدمه

در سال‌های اخیر ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو، موضوع اصلی نگرانی در زمینه‌های پزشکی و سلامت عمومی بوده است. پپتیدهای زیست فعال، ملکول‌هایی کوتاه و عموماً دارای بار مثبت و آبگریز هستند که در طیف گسترده ای از اشکال زندگی، از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها مانند انسان یافت می‌شوند (Akhavan-Bahabadi, 2020). معرفی این دسته از پپتیدها، به جهت داشتن برخی مزایا از قبیل سمیت سلولی انتخابی بالا در برابر عوامل بیماری‌زا، حداقل سمیت سلولی برای سلول‌های پستانداران، ظرفیت کم برای ایجاد مقاومت ضد میکروبی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی میزبان، در رفع بعضی از نگرانی های جامعه بشری، بسیار نویدبخش بوده است.

گاوماهیان متنوع‌ترین خانواده ماهیان دریای خزر و جنس *Neogobius* یکی از فراوان‌ترین و گسترده‌ترین گاوماهیان محسوب می‌شود که از اهمیت اکولوژیک بالایی برخوردار است و نقش قابل‌توجهی در زنجیره غذایی آن ایفاء می‌کند (Stepanova, 2001). از سوی دیگر، پوست گاو ماهی میمونی با میزان فراوان عوامل بیماری‌زای شناخته می‌شود (Kvach, 2001). بنابراین، موکوس اپیدرمی عضو حیاتی سیستم ایمنی غیر اختصاصی و اولین سد دفاعی ماهی در نظر گرفته می‌شود که از طریق غدد مخاطی یا سلول‌های جامی شکل ترشح می شود و دربردارنده ترکیبات زیست فعالی است که علیه طیف متنوعی از عوامل بیماری‌زای مهاجم عمل می کنند و صنایع غذایی و دارویی می‌توانند آنها را مورد بهره‌برداری قرار دهند (Subramanian *et al.*, 2007; Masso-Silva and Diamond, 2014; Katzenback, 2015).

از سوی دیگر، کشف و شناسایی مولکول‌های زیست فعال از مخلوط‌های پیچیده، اغلب گامی مهم در زمینه‌های مختلف تحقیقات بیوشیمیایی و زیست پزشکی محسوب می‌شود. روش‌های مرسوم معمولاً بر خالص‌سازی مولکول‌های مورد نظر تکیه می‌کنند که با یک فعالیت یا یک عملکرد خاص (غربالگری مبتنی بر زیست سنجی)، هدایت شده و به دنبال آن تعیین ساختار، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و ارزیابی فعالیت زیستی انجام می‌شود (Bagdas *et al.*, 2016; Ma, 2020). در حال حاضر، فقدان ابزارهایی برای شناسایی مستقیم مولکول‌های زیست فعال از نمونه‌های بیولوژیک خام و پیچیده، چالشی بزرگ در کشف این مولکول‌هاست. ظهور رویکردهای متابومی و پروتئومی مبتنی بر کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی (LC-MS)[1]، شناسایی سریع و با کارایی بالا پروتئین‌ها و مولکول‌های زیست‌فعال کوچک از نمونه‌های پیچیده زیستی (عصاره یا کسرهای محصولات طبیعی، کافت یا تخریبات سلولی) را ممکن می‌سازد (Ma, 2020). به طور کلی، محدودیت‌های اصلی آنالیزهای مذکور (پروتئوم)، در ارتباط با ناهمگونی پروتئین‌ها و پپتیدها از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و تفاوت های بسیار در فراوانی آنهاست (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013). یک مسیر معمولی کار پروتئومیکس متشکل از استخراج پروتئین، جداسازی و تعیین مقدار کمی آن، شناسایی و آنالیز و تفسیر داده‌هاست (Carpentier *et al.*, 2008).

آماده سازی نمونه و استخراج پروتئین‌ها، نخستین و البته مهم‌ترین و بحرانی‌ترین مرحله در زمینه به‌دست آوردن وضوح با کیفیت بالا از پروتئین‌ها در تجزیه و تحلیل پروتئومیک است (Lilley *et al.*, 2002; Shaw and Riederer, 2003; Hirano *et al.*, 2006; Sheoran *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). طیف گسترده‌ای از ابزار استخراج و تفکیک برای پروتئین‌ها و پپتیدها، بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری (حلالیت، آب گریزی، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و ...)، در دسترس است. فن‌آوری‌های مختلف عموماً بر تخریب سلول، انحلال، رسوب و سیستم‌های غنی‌سازی به منظور به‌دست آوردن فرکشن پروتئین مورد نظر، متمرکز شده‌اند. حذف ترکیبات مداخله‌کننده که عمدتاً لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، ترکیبات فنلی، کربوهیدرات‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک و اکسیداتیو و رنگدانه‌ها هستند نیز از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار است (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013). بنابراین، پروتکل ایده‌آل استخراج پروتئین نه تنها باید مجموعه کامل پروتئین‌های موجود در یک نمونه را به صورت تجدیدپذیر، ضبط و حل نماید بلکه باید منجر به

[1] Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

کاهش آلاینده‌ها و تقلیل فرآیندهای پس از استخراج از قبیل تخریب و اصلاح پروتئین‌ها گردد. همچنین باید با روش‌های آنالیز پروتئین پایین‌دستی (کروماتوگرافی مایع، طیف‌سنجی جرمی و ارزیابی فعالیت زیستی) نیز سازگار باشد (Maldonado *et al.* 2008; Sheoran *et al.*, 2009; Zhen and Shi, 2011).

با توجه به تنوع و پیچیدگی پروتئین‌ها و تغییرات پس از ترجمه‌ای آنها، هیچ پروتکل استخراجی به‌تنهایی نمی‌تواند دربردارنده پروتئوم کامل برای همه انواع نمونه‌ها باشد و پروتکل انتخابی باید برای یک نمونه خاص و اهداف تحقیق، بهینه‌سازی شود (Maldonado *et al.*, 2008; Zhen and Shi, 2011). بنابراین، در این مطالعه چهار روش استخراج و تخلیص پروتئین (آماده‌سازی نمونه‌های پروتئینی) شامل استخراج فاز جامد، ترسیب به روش‌های استون، تری کلرو استیک اسید ـ استون و متانول جهت دستیابی به پروتکل ایده‌آل در مورد موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه موکوس پوست

تعداد ۵۰ عدد گاو ماهی میمونی دریای خزر سالم (دامنه وزنی ۲۰ـ۱۰ گرم) از محل قفس‌های ماهیان خاویاری شرکت مادر تخصصی ماهیان خاویاری واقع در آشوراده ـ بندر ترکمن (استان گلستان) به‌وسیله تور صید گردید. جمع‌آوری موکوس اپیدرمی در محل به روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییرات صورت پذیرفت (Subramanian *et al.*, 2007). به طور خلاصه، تعداد ۵ ماهی به داخل یک کیسه زیپ‌دار پلی‌اتیلنی حاوی ۵ میلی لیتر محلول نمکی ۱۰۰ میلی مولار منتقل و ماهی‌ها به آرامی به مدت ۲-۱ دقیقه به منظور جدا شدن موکوس اپیدرمی به جلو و عقب حرکت داده شدند. نمونه‌های موکوس با هم یکی شده و به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی و غیر فعال ساختن پروتئازها، بلافاصله با ازت مایع، منجمد و با تانک ازت به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی پروتئین دانشکده زیست شناسی (دانشگاه تهران) منتقل و تا انجام آزمایش‌های بعدی داخل فریزر منفی هفتاد درجه سیلسیوس نگهداری شدند. در این مطالعه، روش‌های استخراج و تغلیظ مذکور برای ۵ میلی‌لیتر موکوس اپیدرمی انجام شد.

استخراج با استون[1]

استخراج پروتئین‌های موکوس اپیدرمی به روش Wang و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات به شرح ذیل انجام شد (Wang *et al.*, 2006). ۲۰ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰ درصد (نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس در یک ظرف تیره) را به ۵ میلی‌لیتر از عصاره موکوس اپیدرمی اضافه شده و به‌خوبی ورتکس گردید. سپس لوله‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۲۰-درجه سیلسیوس انکوبه شدند (لوله‌ها را می‌توان تا یک هفته با حداقل تخریب پروتئین نگهداری کرد). در ادامه لوله‌های حاوی نمونه، در سرعت g ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 2-16KL) شد. مایع رویی به آرامی حذف گردید. سپس پلیت پروتئینی تشکیل شده با ۱۰ میلی لیتر استون سرد شستشو داده شد و به‌وسیله یک میله شیشه‌ای کاملاً شکسته گردید. این مراحل (سانتریفیوژ، حذف مایع رویی و شستشو با استون سرد)، سه مرتبه تکرار شد. در آخرین مرحله، اجازه داده شد، پلیت به مدت پنج دقیقه در هوای محیط خشک شود. پلیت حاصله برای آنالیزهای بعدی در بافر نمکی فسفات (PBS, pH 7.4) حل گردید (پلیت ها را می‌توان تا مرحله تعلیق مجدد در دمای ۸۰- درجه سیلسیوس منجمد نمود).

استخراج با تری کلرو استیک اسید ـ استون[2]

استخراج پروتئین‌های موکوس اپیدرمی به روش Gorg و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییرات به شرح ذیل انجام شد (Gorg *et al.*, 2000). ۱۵ میلی‌لیتر TCA ۱۳/۳ درصد (وزنی/حجمی) در استون سرد حاوی استوک ۰/۲ درصد DTT(وزنی/حجمی) به ۵ میلی‌لیتر حجم از نمونه موکوس اپیدرمی اضافه شد و به مدت یک ساعت و نیم یا یک شبانه‌روز در دمای ۲۰-درجه سیلسیوس انکوبه گردید(یک

[1] Acetone Precipitation
[2] TCA-acetone Precipitation

شبانه روز، محصول را افزایش می‌دهد اما اسید سیالیک می‌تواند به گلیکوپروتئین‌ها آسیب برساند). سپس لوله‌های حاوی نمونه در سرعت g ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 2-16KL) شد. مایع رویی به آرامی دور حذف گردید. سپس پلیت پروتئینی تشکیل شده با ۱۰ میلی‌لیتر استون سرد ۱۰۰٪ (۲۰- درجه سیلسیوس) حاوی استوک ۰/۲ درصد DTT (وزنی/حجمی) شستشو داده شد و به‌وسیله یک میله شیشه‌ای کاملاً شکسته گردید. سپس در یک دوره یک ساعته، لوله‌ها سه بار به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و در فریزر نگهداری شدند. دو مرتبه این مراحل (سانتریفیوژ، حذف مایع رویی و شستشو با استون سرد)، تکرار شد. در آخرین مرحله، اجازه داده شد، پلیت به مدت پنج دقیقه در هوای محیط خشک شود. پلیت حاصله برای آنالیزهای بعدی در بافر نمکی فسفات (PBS, pH 7.4) حل گردید (پلیت‌ها را می‌توان تا مرحله تعلیق مجدد در دمای ۸۰- درجه سیلسیوس منجمد نمود). شایان ذکر است، محلول تری کلرو استیک اسید ۱۳,۳ درصد (وزنی/حجمی) در استون و محلول استون ۱۰۰ درصد را در ظروف تیره و در ۲۰- درجه سیلسیوس ذخیره کرده و DTT (وزنی/حجمی) را درست قبل از استفاده (به صورت تازه) به هر دو محلول اضافه نمایید.

استخراج با متانول[1]

استخراج پروتئین‌های موکوس اپیدرمی به روش Wang و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات به شرح ذیل انجام شد (Wang *et al.*, 2006). ۵۰ حجم متانول ۸۰ درصد سرد را به ۵ میلی‌لیتر موکوس اضافه و ورتکس گردید. سپس نمونه به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس انکوبه شد. لوله‌های حاوی نمونه در سرعت g ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 2-16KL) شدند. لوله‌ها به محض توقف، از سانتریفیوژ خارج گردید و مایع رویی حذف و اجازه داده شد تا پلیت پروتئینی تشکیل شده، در دمای محیط به مدت ۵ـ۱۰ دقیقه خشک شود. در انتها نمونه‌ها مجدداً در بافر نمکی فسفات (PBS, pH 7.4) حل شدند.

استخراج فاز جامد (SPE)[2]

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تغلیظ محتوای پروتئینی و تخلیص اولیه در ستون‌های SPE به روش Park و همکاران (۱۹۹۸) با اندکی تغییرات انجام شد (Park *et al.*, 1998). موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریایی خزر در نسبت ۱:۴ (۵ میلی‌لیتر موکوس و ۲۰ میلی‌لیتر بافر استخراج) با بافر استخراج حاوی سدیم استات ۰/۲ مولار، تریتون ۱۰۰- X ۰,۲ درصد و فنیل متیل سولفونیل فلوراید یک میلی‌مولار با استفاده از یک همزن بلندر (Eberhard Bauer D-7300 Esslingen) همگن گردید و مخلوط حاصله به مدت یک شبانه‌روز در همزن مغناطیسی (Heidolph MR 3001k) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. به منظور حذف ذرات غیر محلول و جامد، مخلوط حاصله با g ۲۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سیلسیوس سانتریفیوژ (Sigma 2-16 KL) و مایع رویی جمع‌آوری گردید. پس از آن مایع رویی در معرض فاز معکوس قرار گرفت. در این مرحله از ستون‌های Sep-Pak C18 (Macherey–Nagel) که با ۸۰ درصد استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد (حجمی/ حجمی) تری‌فلورواستیک اسید (TFA) (بافر A) فعال و با ۰/۱ درصد TFA (حجمی/ حجمی) (بافر B) که برای حذف استونیتریل اضافی شسته شده بود، استفاده گردید. پس از بارگیری مایع رویی، ستون با ۲۰ میلی‌لیتر بافر B شسته شد. سپس پروتئین‌های به‌دام افتاده در آن با ۶ میلی‌لیتر بافر A از ستون شسته شدند. سپس شسته‌ها[3] یکی شده و به روش انجمادی خشک گردید. پودرهای حاصله در بافر نمکی فسفات (PBS, pH 7.4) حل گردید و در ادامه آزمون‌های مورد نظر انجام شد.

سنجش غلظت پروتئین تام

میزان پروتئین تام نمونه‌های موکوس اپیدرمی به روش‌های مختلف براساس دستور العمل استاندارد Bradford (۱۹۷۶)

[1] Methanol precipitation

[2] Solid-Phase Extraction (SPE)

[3] Eluates

با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین گردید.

بررسی پروفایل پروتینی نمونه‌ها

خلوص و وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-Tricine PAGE با ژل جداکننده ۱۶ درصد و ژل متراکم کننده ۱۰ و ۴ درصد تعیین شد (Schägger and von Jagow, 1987). وزن ملکولی نسبی باندها به‌وسیله لدر پروتئینی (سیناژن، ۲۵۰ ـ ۱۰ کیلو دالتون، Cat No. SL7001, PR901641) تخمین زده شد.

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

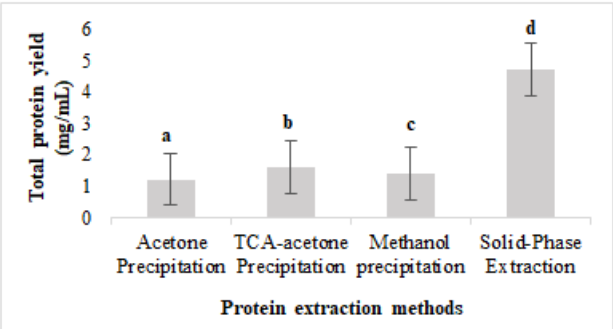
به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین میزان پروتئین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۱ درصد و نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2016 استفاده گردید.

نتایج

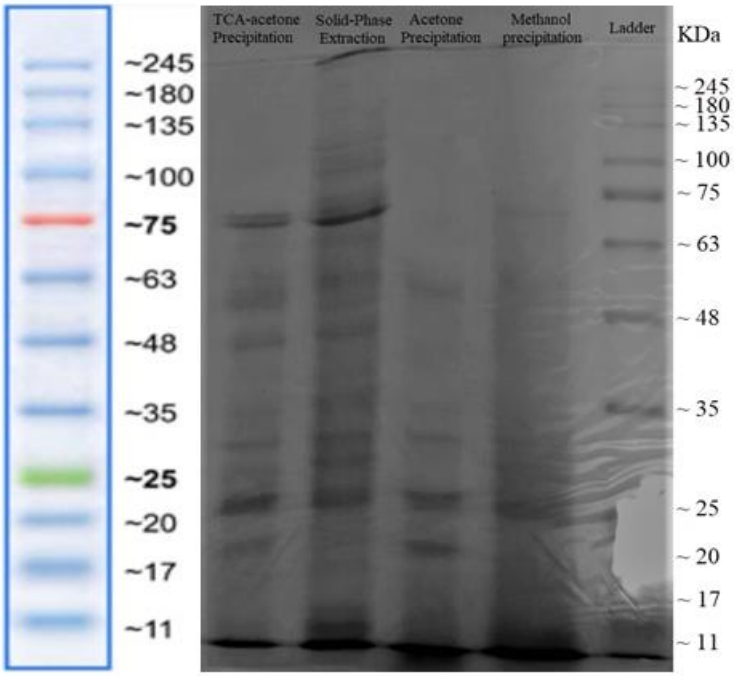
چهار روش برای استخراج و آماده سازی موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر از نظر بازده پروتئین (شکل ۱)، تعداد باندهای مورد مشاهده در SDS-PAGE، وضوح باندها و تکرارپذیری آنها (شکل ۲) مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از ANOVA یک طرفه برای چهار روش استخراج انجام شد. نتایج نشان داد که میزان پروتئین در روش SPE از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ($P<0.01$) با استخراج به روش‌های استون، TCA استون و متانول دارد (جدول ۱).

از سوی دیگر، نظر به این‌که بیشترین مشکلات مرتبط با جداسازی و انحلال پروتئین‌ها با استخراج هم‌زمان اجزاء غیر پروتئینی مرتبط است، تعداد باندهای مورد مشاهده در SDS-PAGE، وضوح باندها و تکرارپذیری آنها تا حد زیادی به نمونه و پروتکل استخراج بستگی دارد (Maldonado *et al.*, 2008; Martínez-Maqueda *et al.*, 2013). نتایج مربوط به پروفایل پروتئینی موکوس پوست گاو ماهی میمونی دریای خزر به روش‌های مختلف نشان داد که روش SPE منجر به مشاهده بیشترین باند قابل تخمین (۱۳باند پروتئینی) در دامنه وزنی ۱۲۰ ـ ۱۱ کیلودالتون (۱۲۰، ۱۰۰، ۶۷، ۶۵، ۵۵، ۵۰، ۴۵، ۳۵، ۳۳، ۲۵، ۲۰، ۱۷، ۱۱) نسبت به سایر روش‌ها گردید.

Extraction Method	Protein Concentration (mg/mL)
Acetone Precipitation	1.2 ± 0.2^{a}
TCA-acetone precipitation	1.6 ± 0.25^{b}
Methanol precipitation	1.4 ± 0.42^{c}
Solid-Phase Extraction	4.7 ± 0.1^{d}



شکل ۱: میزان غلظت پروتئین موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر استخراج شده به‌وسیله روش‌های مختلف
Figure 1: The protein concentration of Caspian monkey goby epidermal mucus extracted by different methods



شکل ۲. مقایسه پروفایل پروتئینی (Tricine SDS-PAGE) موکوس پوست گاو ماهی میمونی دریای خزر به روش های مختلف (ژل جداکننده ۱۶٪ و ژل متراکم کننده ۱۰ و ۴٪). شماره ۱: لدر پروتئینی (۲۵۰-۱۰ کیلو دالتون)، شماره ۲: روش ترسیب با متانول، شماره ۳: روش ترسیب با استون، شماره ۴: روش SPE، شماره ۵: روش ترسیب با تری کلرو استیک اسید ـ استون

Figure 2: The protein profile comparison (SDS-PAGE Tricine) of Caspian monkey goby epidermal mucus by different methods (16% separating gel and 10% and 4% thickening gel). 1: protein ladder (10-250 kDa), 2: Methanol Precipitation, 3: Acetone Precipitation, 4: SPE and 5: Trichloroacetic acid-acetone Precipitation.

جدول ۱. تعداد و محدوده پروفایل پروتئینی موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر به روش های مختلف

Table 1. The observed protein bands number and range of Caspian monkey goby epidermal mucus by different methods on SDS-PAGE

Extraction Method	The number of observed bands on SDS-PAGE	Protein profile range (KDa)	Observed bands on SDS-PAGE
Solid-Phase Extraction	13	11-120	11, 17, 20, 25, 33, 35, 45, 50, 55, 65, 67, 100, 120
TCA-acetone Precipitation	8	20-70	20, 35, 33, 45, 50, 55, 67, 70
Acetone Precipitation	4	20-55	20, 25, 33, 55
Methanol precipitation	2	25-70	25, 70
Ladder	12	11-245	11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245

بحث

نمونه‌های پروتئینی معمولاً حاوی موادی هستند که با روش‌های مورد استفاده پایین دستی تداخل دارند. چندین استراتژی به منظور حذف مواد نامطلوب از نمونه‌ها وجود دارد. یکی از مناسب‌ترین راهکارها، ترسیب پروتئین‌هاست (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2003; Antonioli *et al.*, 2009). این روش در مقایسه با روش‌های دیالیز یا فیلتراسیون ژل (ستون‌های نمک‌زدایی)، دارای یک مزیت است، زیرا به طور همزمان تغلیظ نمونه پروتئینی و تصفیه از مواد نامطلوب (نمک‌ها، مواد شوینده، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و ...) که ممکن است در تجزیه و تحلیل کلی دخالت

کنند، ممکن می‌سازد (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2003; Antonioli *et al.*, 2009; Zellner *et al.*, 2006).

رایج‌ترین روش مورد استفاده برای استخراج پروتئین‌ها، رسوب با استفاده از TCA/acetone بوده که برای بافت های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. pH بالا و بار منفی TCA و افزودن استون، یک دناتوراسیون فوری پروتئین همراه با رسوب را تحقق می‌بخشد. در نتیجه، به‌سرعت فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و سایر آنزیم‌های تغییردهنده[1] را متوقف می‌سازد. اما یکی از معایب رویکرد ترسیب به‌واسطه حلال‌های آلی از قبیل استون و TCA/acetone شامل امکان تغییر ماهیت[2] پروتئین‌هاست و انحلال مجدد پلیت‌های تشکیل‌شده، دشوار است (Nandakumar *et al.*, 2003; Martínez-Maqueda *et al.*, 2013). از سوی دیگر، روش‌های ترسیب یک مرحله‌ای، به‌تنهایی برای حذف انواع و غلظت‌های آلاینده‌های مداخله‌کننده، ممکن است کافی نباشد. در چنین مواردی استفاده از چندین مرحله رسوب، اجتناب‌ناپذیر است که ممکن است با حذف برخی نمونه‌های پروتئینی با هر چرخه رسوب همراه باشد (از دست دادن پروتئین‌ها در طول مراحل متعدد ترسیب) (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013).

فرایند استخراج الکلی یک بازیابی پروتئین با راندمان بالاست. الکل‌های آبی به طور گسترده در مقیاس تجاری برای حذف فنولیک‌ها، الیگوساکاریدها یا مهار کننده‌ها، از دانه‌ها و پودرهای بدون چربی، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Moure *et al.*, 2006). اما امکان انعقاد[3] ساختارهای پروتئینی به عنوان یک نتیجه استخراج به‌وسیله حلال‌های الکلی مطرح است و منجر به کاهش خواص عملکردی می‌گردد (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013).

مطالعات زیادی به منظور حذف همزمان ناخالصی‌ها و تغلیظ پروتئین‌ها، با موفقیت از روش استخراج فاز جامد (فاز معکوس) استفاده کرده‌اند (Cole *et al.*, 1997; Park *et al.*,1998; Fernandes *et al.*, 2002; Birkemo *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2004; Lüders *et al.*, 2005; Bergsson *et al.*, 2005; Subramanian *et al.*, 2009; Akhavan Bahabadi *et al.*, 2021). استفاده از این رویکرد منجر به تغلیظ بیش از ۱۰ برابری محتوای پروتئینی موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر شده بود (Akhavan Bahabadi *et al.*, 2021). استخراج فاز جامد یک تکنیک آماده‌سازی نمونه است که به طور معمول در آزمایشگاه‌های تحلیلی برای استخراج آنالیت‌ها از یک ماتریس پیچیده با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی آنها استفاده می‌شود. این تکنیک آماده‌سازی نمونه، استخراج، پاک‌سازی و تغلیظ آنالیت‌ها را قبل از تعیین کمیت آنها ممکن می‌سازد.

مبنای کار این روش، استفاده از اختلاف میل ترکیبی بین آنالیت و تداخل‌کننده‌های موجود در ماتریس مایع (معروف به فاز متحرک)، برای فاز جامد (جاذب) است (Harris, 2010). این قرابت اجازه می‌دهد تا آنالیت هدف از تداخل‌کننده‌ها جدا شود. تقسیم‌بندی SPE با فعل و انفعالات آنالیت، فاز جامد و حلال منتخب، تعیین می‌شود و با توجه به جاذب مورد استفاده، مواد شیمیایی مختلف، مکانیسم‌هایی مانند فعل و انفعالات واندروالس یا π-π و تبادل یونی ایفاء نقش می‌کنند (Rodríguez *et al.*, 2000).

استخراج فاز جامد از اکثر مشکلاتی که در استخراج مایع-مایع پیش می‌آید، جلوگیری می‌کند و پائین بودن بازیابی محصول را بهبود می‌بخشد. اولین کارتریج‌های یکبار مصرف SPE در ۱۹۷۸ و به دنبال آن، کارتریج های سرنگی در سال ۱۹۷۹ و در اوایل دهه ۱۹۸۰ پیش ستون‌ها معرفی شدند. اما در پرتو مزایای آن در استفاده از مقدار کم حلال، سرعت بالا (کمتر از ۳۰ دقیقه) و آسانی عمل، گزینش‌پذیری منعطف جاذب و توانایی محصول بالا، این تکنیک تبدیل به یک رویکرد رو به رشد گردیده است (Hennion, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000). این روش می‌تواند برای جداسازی آنالیت های مورد نظر از طیف گسترده‌ای از ماتریس‌های پیچیده مانند موکوس، ادرار، خون، نمونه‌های غذا، آب و ... مورد استفاده قرار گیرد (Akhavan Bahabadi *et al.*, 2021; Martínez-Maqueda *et al.*, 2013).

1- Modifying enzymes
2- Denaturation
3- Coagulation

بزرگترین مزیت SPE این است که می‌توان آن را با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در قالب آنلاین ترکیب کرد جایی‌که در آن امکان تزریق مستقیم عصاره "خام" به یک سیستم فراهم می‌شود (Stalikas, 2007). یکی دیگر از اصلی‌ترین مزایای SPE، تطبیق‌پذیری آن است. زیرا طیف گسترده ای از مواد با ویژگی‌های مختلف و انواع تعاملات با ترکیبات در دسترس است (Poole, 2020). از سوی دیگر، یک نقطه ضعف SPE به توسعه روش، از نظر انتخاب جاذب، حجم نمونه و انتخاب حلال برای محلول‌های پاکسازی و دفعی نسبت داده می‌شود. انتخاب جاذب یا فاز جامد برای همه فرآیندهای SPE حیاتی است. امروزه انواع مختلفی از جاذب‌ها برای بازیابی انتخابی و جداسازی کلاس‌های انتخابی از ترکیبات وجود دارد. هر چه جاذب انتخابی‌تر باشد، SPE حساس‌تر عمل خواهد کرد (Hennion, 1999). بیشترین جاذب مورد استفاده C18 پیوند شده به سیلیکا بر اساس برهمکنش‌های فاز معکوس است (Stalikas, 2007)، اما در سال‌های اخیر فازهای جدیدی (پلیمرهای پیوندی متقابل[1]، کربن‌های گرافیتی[2] و n- آلکیل سیلیکاها[3]) توسعه یافته است.

در حال حاضر، پلیمرهای چاپی مولکولی (MIP)[4] انتخابی‌ترین فازهای موجود هستند. چاپ مولکولی[5] فرآیندی است که در آن مونومرهای عملکردی منتخب اجازه می‌یابند که خودبه‌خود در اطراف یک مولکول الگو جمع شده و متعاقباً در حضور یک اتصال‌دهنده[6] پلیمریزه شوند. هنگامی که مولکول الگو از پلیمر حاصله استخراج می‌شود، یک حفره مکمل از نظر شکل و عملکرد در ماتریس وجود دارد که مولکول‌های یکسان یا نزدیک به الگو را به‌هم متصل می‌کند (El-Schich *et al.*, 2020). این فناوری امکان کاهش حضور تداخل‌کننده‌ها را در مرحله شستشو و به‌دست آوردن بازیابی‌های بالاتر در آنالیز کروماتوگرافی حتی در سطوح پایین، فراهم می‌کند. هزینه کم، آماده‌سازی سریع، پایداری و تکرارپذیری به عنوان مزایای MIPs ذکر شده است (El-Schich *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2006).

نتایج مربوط به پروفایل پروتئینی موکوس پوست گاو ماهی میمونی دریای خزر به روش‌های مختلف نشان داد که روش SPE منجر به مشاهده بیشترین باند قابل تخمین (۱۳ باند پروتئینی) در دامنه وزنی ۱۲۰-۱۱ کیلودالتون (۱۲۰، ۱۰۰، ۶۷، ۶۵، ۵۵، ۵۰، ۴۵، ۳۵، ۳۳، ۲۵، ۲۰، ۱۷، ۱۱) نسبت به سایر روش ها گردید (شکل ۲، جدول ۱).

Al-Rasheed و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی پروفایل پروتئینی موکوس سوف بالارونده (*Anabas testudineus*) ۱۳ باند پروتئینی را در دامنهی وزنی ۲۴۵ـ۱۱ کیلودالتون مشاهده کردند (Al-Rasheed *et al.*, 2018) که چهار باند (۱۱، ۱۷، ۶۷ و ۱۰۰) با باندهای مشاهده شده در مطالعه حاضر مشترک بود. Azadi (۲۰۱۶) نیز در بررسی پروفایل مجموعه پروتئینی موکوس قره برون (*Acipenser Persicus*) و چالباش (*Acipenser gueldenstaedtii*) ۱۴ باند پروتئینی را در دامنه ۶۵-۵ کیلو دالتون گزارش کردند (Azadi, 2016) که اشتراک ۶ باند ۱۱، ۱۷، ۲۵، ۳۵، ۵۰ و ۶۳ با باندهای مشاهده شده در این مطالعه محرز گردید. Khani (۲۰۱۹) در بررسی پروفایل پروتئینی موکوس قره برون ۹ باند پروتئینی قابل تخمین را در دامنه وزنی ۲۴۵ ـ ۷ کیلودالتون (۷، ۱۴، ۲۹، ۳۳، ۴۳، ۴۹، ۷۵، ۱۰۰، ۱۴۰) مشاهده کردند (Khani, 2019) که ۴ باند مشترک (۳۳، ۴۵، ۵۰ و ۱۰۰) با باندهای مشاهده شده در این مطالعه وجود دارد. همچنین Smith و همکاران (۲۰۰۰) در موکوس قزل‌آلای رنگین‌کمان، حداقل چهار پروتئین ضدمیکروبی را نشان دادند که دو تا از آنها لیزوزیم، یکی از آنها یک پروتئین مشابه لیزوزیم با نقطه ایزوالکتریک پایین‌تر و دیگری یک پپتید حدود ۳ کیلو دالتونی کاتیونی و به‌شدت هیدروفوب گزارش بود (Smith *et al.*, 2000) که باند مشترکی با باندهای موجود در این مطالعه مشاهده نشد.

مطالعات قبلی وجود پروتئازوم‌های زیرگروه آلفا و پروتئازها را به‌ترتیب در دامنه وزنی ۳۰ـ۲۵ کیلو دالتون گزارش دادند (Fagan *et al.*, 2003; Guardiola *et al.*, 2015). همچنین Ebran و همکاران (۱۹۹۹) نیز باندهای ۴۵ و ۶۷ کیلو دالتون مشاهده شده در موکوس را به‌ترتیب مربوط به

1- cross-linked polymers
2- graphitized carbons
3- n-alkylsilicas
4- Molecularly Imprinted Polymers (MIP)
5- Molecular imprinting
6- crosslinker

اوآلبومین و آلبومین دانسته‌اند (Ebran *et al*., 1999). لیزوزیم نیز یک آنزیم ضدباکتریایی با وزن تقریبی ۱۴/۴ کیلو دالتون است که در موکوس اپیدرمی اکثر ماهیان گزارش شده است (Ángeles Esteban, 2012).

براساس مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات مذکور فوق، می‌توان وجود باندهای ۲۵ و ۳۳ در مطالعه حاضر را به پروتئازوم‌های زیرگروه آلفا و پروتئازها و باندهای ۴۵ و ۶۷ را به‌ترتیب به اوآلبومین و آلبومین نسبت داد.

در این مطالعه، با مقایسه چهار روش مختلف استخراج و تغلیظ پروتئین بر حسب کمیت و کیفیت پروتئین‌ها و پپتیدهای موکوس اپیدرمی گاو ماهی میمونی دریای خزر، به‌واسطه فراهم نمودن بیشترین میزان پروتئین و تعداد باندهای قابل تخمین در SDS-PAGE و استخراج، تغلیظ و تخلیص (پاکسازی) همزمان نمونه‌ها، حذف مواد غیر پروتئینی مداخله‌کننده و سازگاری با آنالیزهای پایین‌دستی پروتئین، روش استخراج فاز جامد را به عنوان روشی ایده‌آل به منظور جداسازی پروتئین‌ها و پپتیدهای فعال از نمونه‌های پیچیده زیستی مختلف (موکوس اپیدرمی ماهیان)، معرفی گردید. همچنین مطالعه حاضر بر اهمیت فوق‌العاده آماده‌سازی نمونه و استخراج پروتئین‌ها در غربالگری مبتنی بر سنجش زیستی تاکید می‌کند.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌دانیم از سرکار خانم اشراقی مسئول آزمایشگاه PBRL دانشگاه تهران، مدیریت ماهیان خاویاری اداره کل شیلات استان گلستان به‌ویژه دکتر علی خوزین برای پشتیبانی بی‌دریغ از این پژوهش، تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

Akhavan Bahabadi, M., 2020. Fish-derived antimicrobial peptides (AMPs): promising and novel candidates as potential therapeutic molecules for the preventing and treatment of Covid-19. *Fourth International Fisheries and Aquatic Research Congress*, 18-20 November 2020. Tehran - Iran.

Akhavan-Bahabadi, M., 2020. Identification and purification of antibacterial peptides of epidermal mucus of *Neogobius fluviatilis pallasi*. PhD Dissertation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. [In Persian]

Akhavan-Bahabadi, M., Paknejad, H., Habibi-Rezaei, M. and Hedayati, A., 2020. Antioxidant peptidic components derived from epidermal mucus of *Neogobius fluviatilis pallasi*. *Fourth International Fisheries and Aquatic Research Congress*, 18-20 November 2020. Tehran - Iran.

Akhavan Bahabadi, M., Paknejad, H., Habibi Rezaei, M., Hedayati, A. and Moghimi, H., 2021. Screening of epidermal mucus from *Neogobius fluviatilis pallasi* for finding antimicrobial peptides. *Aquatics Physiology and Biotechnology*, 8(4):93-114. Doi:10.22124/JAPB.2021.15917. 1371. [In Persian].

Al-Rasheed, A., Handool, K.O., Garba, B., Noordin, M.M., Bejo, S.K., Kamal, F.M. and Daud, H.H.M., 2018. Crude extracts of epidermal mucus and epidermis of climbing perch *Anabas testudineus* and its antibacterial and hemolytic activities. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2):125-129. Doi:10.1016/j.ejar.2018.06.002.

Ángeles Esteban, M., 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *International scholarly research notices, 2012*. Doi:10.5402/2012/853470.

Antonioli, P., Bachi, A., Fasoli, E. and Righetti, P.G., 2009. Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(17): 3606-3612. Doi:10.1016/j.chroma.2008.11.053.

Azadi, H., 2016. Comparison of protein pattern and antibacterial activity of mucus in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). MSc Dissertation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. [In Persian]

Bagdas, D., Muldoon, P.P., AlSharari, S., Carroll, F.I., Negus, S.S. and Damaj, M.I., 2016. Expression and pharmacological modulation of visceral pain-induced conditioned place aversion in mice. *Neuropharmacology*, 102:236-243. Doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.024.

Bergsson, G., Agerberth, B., Jörnvall, H. and Gudmundsson, G.H., 2005. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *The FEBS Journal*, 272 (19): 4960-4969. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04906.x.

Birkemo, G.A., Lüders, T., Andersen, Ø., Nes, I.F. and Nissen-Meyer, J., 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1646(1-2): 207-215. Doi: 10.1016/S1570-9639(03)00018-9.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2): 248-254. Doi: 10.1006/abio.1976.9999.

Carpentier, S.C., Panis, B., Vertommen, A., Swennen, R., Sergeant, K., Renaut, J., Laukens, K., Witters, E., Samyn, B. and Devreese, B., 2008. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(4): 354-377. Doi:10.1002/mas.20170.

Cole, A.M., Weis, P. and Diamond, G., 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(18): 12008-12013. Doi: 10.1074/jbc.272.18.12008.

Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Saglio, P., Lemaître, C. and Molle, G., 1999. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 122(2):181-189. Doi:10.1016/s1095-6433(98)10165-4.

El-Schich, Z., Zhang, Y., Feith, M., Beyer, S., Sternbæk, L., Ohlsson, L., Stollenwerk, M. and Wingren, A.G., 2020. Molecularly imprinted polymers in biological applications. *Biotechniques*, 69(6):406-419. Doi:10.2144/btn-2020-0091.

Fagan, M.S., O'Byrne-Ring, N., Ryan, R., Cotter, D., Whelan, K. and Mac Evilly, U., 2003. A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during

smoltification. *Aquaculture*, 222(1-4):287-300. Doi:10.1016/S0044-8486(03)00128-5.

Fernandes, J.M., Kemp, G.D., Molle, M.G. and Smith, V.J., 2002. Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 368(2): 611-620. Doi: 10.1042/BJ20020980.

Fernandes, J.M., Molle, G., Kemp, G.D. and Smith, V.J., 2004. Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(2): 127-138. Doi: 10.1016/S0145-305X(03)00120-4.

Fernandes, J.M., Saint, N., Kemp, G.D. and Smith, V.J., 2003. Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Biochemical Journal*, 373(2): 621-628. Doi: 10.1042/BJ20030259.

Garcia-Rodriguez, S., Castilla, S.A., Machado, A. and Ayala, A., 2003. Comparison of methods for sample preparation of individual rat cerebrospinal fluid samples prior to two-dimensional polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Biotechnology Letters*, 25: 1899-1903. Doi:10.1023/bbile.0000003979.92664.11.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(6): 1037-1053. Doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037: AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V.

Guardiola, F.A., Dioguardi, M., Parisi, M.G., Trapani, M.R., Meseguer, J., Cuesta, A., Cammarata, M. and Ángeles Esteban, M.A., 2015. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1):112-123. Doi:10.1016/j.fsi.2015.02.010.

Harris, D.C., 2010. *Quantitative chemical analysis* (Ed.), 8th edn. New York, NY:W.H. Freeman and Company.

Hennion, M.C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2):3-54. Doi:10.1016/S0021-9673(99)00832.

Hirano, M., Rakwal, R., Shibato, J., Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Iwahashi, H. and Masuo, Y., 2006. New protein extraction/solubilization protocol for gel-based proteomics of rat (female) whole brain and brain regions. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 22(1):119-25.

Katzenback, B.A., 2015. Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts. *Biology*, *4*(4): 607-639. Doi: 10.3390/biology4040607.

Khani, F., 2019. Evaluation of antibacterial and cytotoxic properties of purified peptides of Giant sturgeon (*Huso huso*) epidermal

mucus. PhD Dissertation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. [In Persian]

Kvach, J.V., 2001. Ligula invasion of monkey goby (*Neogobius fluviatilis*) in some estuaries of north western Black Sea region. *Vestnik Zoologii*, 34(1):85-88.

Lilley, K.S., Razzaq, A. and Dupree, P., 2002. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(1):46-50. Doi:10.1016/s1367-5931(01)00275-7.

Lüders, T., Birkemo, G.A., Nissen-Meyer, J., Andersen, Ø. and Nes, I.F., 2005. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone h1 N-terminal Peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, *49*(6): 2399-2406. Doi: 10.1128/AAC.49.6.2399-2406.2005.

Ma, H., 2020. Bioactive Molecules Detection and Identification in Complex Biological Systems through Activity-Based Metabolomics and Proteomics. Dissertation, University of Oklahoma.

Maldonado, A.M., Echevarría-Zomeño, S., Jean-Baptiste, S., Hernández, M. and Jorrín-Novo, J.V., 2008. Evaluation of three different protocols of protein extraction for Arabidopsis thaliana leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 71(4):461-472. Doi:10.1016/j.jprot.2008.06. 012.

Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B. and Gómez-Ruiz, J.Á., 2013. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. *Proteomics in Foods: Principles and Applications*, 21-50. Doi:10.1007/978-1-4614-5626-1_2.

Masso-Silva, J.A. and Diamond, G., 2014. Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, *7*(3): 265-310. Doi:10.3390/ph7030265.

Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H. and Parajó, J.C., 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9):945-963. Doi: 10.1016/j.foodres.2006.07.002.

Nandakumar, M.P., Shen, J., Raman, B. and Marten, M.R., 2003. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2(1):89-93. Doi:10.1021/pr025541x.

Park, I.Y., Park, C.B., Kim, M.S. and Kim, S.C., 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, Parasilurus asotus. *FEBS Letters*, 437(3): 258-262. Doi: 10.1016/S0014-5793(98)01238-1.

Poole, C.F., 2020. Handbooks in Separation Science: Extraction: Solid-Phase Extraction, 1st ed. Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 740 P. Doi:10.1016/C2018-0-00617-9.

Qiao, F., Sun, H., Yan, H. and Row, K.H., 2006. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. *Chromatographia*, 64(11):625-634. Doi:10.1365/s10337-006-0097-2.

Rodrıguez, I., Llompart, M.P. and Cela, R., 2000. Solid-phase extraction of phenols. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2):291-304. Doi:10.1016/s0021-9673(00)00116-3.

Schägger, H. and Von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2): 368-379. Doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.

Shaw, M.M. and Riederer, B.M., 2003. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *PROTEOMICS: International Edition*, 3(8):1408-1417. Doi:10.1002/pmic.200300471.

Sheoran, I.S., Ross, A.R., Olson, D.J. and Sawhney, V.K., 2009. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science*, 176(1): 99-104. Doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.015.

Smith, V.J., Fernandes, J.M., Jones, S.J., Kemp, G.D. and Tatner, M.F., 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(3):243-260. Doi:10.1006/fsim.1999.0254.

Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18):3268-3295. Doi:10.1002/jssc.200700261.

Stepanova, T.G., 2001. Some feature of reproduction and growth of gobies in the northern Caspian. *Ecology of Young Fish and problem of Caspian Fish Reproduction*. *VNIRO Press*, 268-276.

Subramanian, S., MacKinnon, S.L. and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3): 256-263. Doi:10.1016/j.cbpb.2007.06.003.

Subramanian, S., Ross, N.W. and MacKinnon, S.L., 2009. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine biotechnology*, 11: 748-757. Doi: 10.1007/s10126-009-9189-y.

Wang, W., Vignani, R., Scali, M. and Cresti, M., 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13): 2782-2786. Doi:10.1002/elps.200500722.

Wang, N., Wu, X., Ku, L., Chen, Y. and Wang, W., 2016. Evaluation of three protein-extraction methods for proteome analysis of maize leaf midrib, a compound tissue rich in sclerenchyma cells. *Frontiers in Plant Science*, *7*:856. Doi:10.3389/fpls.2016.00856.

Zellner, M., Winkler, W., Hayden, H., Diestinger, M., Eliasen, M., Gesslbauer, B., Miller, I., Chang, M., Kungl, A., Roth, E. and Oehler, R., 2005. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, 26(12): 2481-2489. Doi:10.1002/elps.200410262.

Zhen, Y. and Shi, J., 2011. Evaluation of sample extraction methods for proteomic analysis of coniferous seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5):1623-1630. Doi:10.1007/s11738-010-0697-1.

Study of four protein-extraction methods of the Caspian monkey Goby (*Neogobius fluviatilis pallasi* Pallas, 1814) epidermal mucus for bioassay-guided screening

Akhavan-Bahabad M.[1,2,3*]; Paknejad H.[2]; Hedayati A.A.[2]; Habibi-Rezaei M.[3]

[*]Akhavanm@ut.ac.ir

1- National Research Center of Saline Waters Aquatics, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bafq, Yazd, Iran.
2- Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Fish epidermal mucus protein extraction for bioassay-guided screening is challenging and variable. In this study, four different protein extraction methods, including acetone, trichloroacetic acid (TCA)-acetone, methanol, and solid-phase extraction (SPE), were investigated to study their efficiency in ultrafiltration and to obtain the appropriate peaks in HPLC to measure biological activities. The presented data shows that the solid phase extraction method is better than the other three tested methods in quantity (total protein yield) and quality (protein profile observed in SDS-PAGE) of proteins and peptides from the epidermal mucus of Caspian monkey goby. On the other hand, due to the epidermal mucus hydrophobic nature, all three extraction methods including acetone, (TCA)-acetone and methanol led to the irreversible proteins aggregation, makes ultrafiltration, HPLC, and consequently bioactivity screening impossible. In this study, the highest amount of protein (4.676 µg/ml) ($P<0.01$) and the best protein profile (13 bands) were related to solid phase extraction. Also, this method simultaneously leads to the extraction, concentration, and initial purification of the samples and therefore improves the efficiency ultrafiltration and HPLC. Thus, we introduce this method for the isolation of active proteins and peptides from various complex biological samples, including fish epidermal mucus.

Keywords: Bioactive peptides, Bioassay-guided screening, Fish epidermal mucus, Protein extraction

[*]Corresponding author