جداسازی اندام تولید سم و روش استخراج و شناسایی کونوتوکسین‌ها در حلزون مخروطی *Conus terebra thomasi*

پروا دهقانی[۱]، صابر خدابنده[۲*]، ایرج نبی‌پور[۳]

۱- دانش آموخته گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: parva.pinctada@gmail.com

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترنیکی: surp78@gmail.com

۳-استاد مرکز تحقیقات علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، پست الکترونیکی: inabipour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۵ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۳، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

حلزون‌های مخروطی (*Conus*) گروهی از نرم‌تنان دریایی هستند که به‌منظور اهداف متفاوت، ترکیبات سمی (کونوتوکسین‌ها) را تولید می‌کنند. در مطالعات متعددی خواص دارویی کونوتوکسین‌ها و وجود ترکیبات سمی متفاوت در بخش‌های مختلف اندام مولد سم در گونه‌های مختلف بررسی شده است. شناخت ساده‌ترین و مناسب‌ترین روش برای جداسازی اندام تولید سم و استخراج کونوتوکسین‌ها ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور تعدادی گونه‌ی *Conus terebra thomasi* از سواحل بخش‌های شمالی جزیره‌ی لارک (خلیج فارس) جمع‌آوری و صدف نمونه‌ها بوسیله‌ی گیره‌ی آهنی به آرامی شکسته شد. بعد از خارج سازی حیوان از صدف، خارج سازی دستگاه مولد سم با ایجاد یک برش کوچک در منطقه‌ی پشتی عضله‌ی پا انجام شد. دستگاه مولد سم با دقت به ۳ بخش حباب سم، بخش ابتدایی مجرا و بخش انتهایی مجرای سم تقسیم و فریزدرای شدند. عصاره‌گیری با ۳ حلال مختلف (استون خالص، مخلوط استون خالص- متانول ۲۰٪ و بافر فسفات نمکی) انجام و میزان پروتئین کل با روش برادفورد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل در دو عصاره‌ی استونی و استونی متانولی بسیار کم و در حلال بافر فسفاتی قابل ملاحظه (حباب سم: ۳۸/۷۹، بخش ابتدایی مجرا: ۵۲/۴ و بخش انتهایی مجرا: ۴۶/۰۱ میلی‌گرم/گرم بافت خشک) است. با استفاده از روش الکتروفورز عمودی کونوپپتیدهای مختلفی در بخش‌های مختلف دستگاه مولد سم مشاهده شد. همچنین بین حلال‌های بررسی شده، بافر فسفات نمکی مناسب معرفی می‌شود که علاوه بر بالا بودن کونوپپتیدهای استخراجی، احتمال آسیب دیدگی آنها از بین رفته و مناسب برای بررسی خواص زیست فعالی آنها خواهد بود.

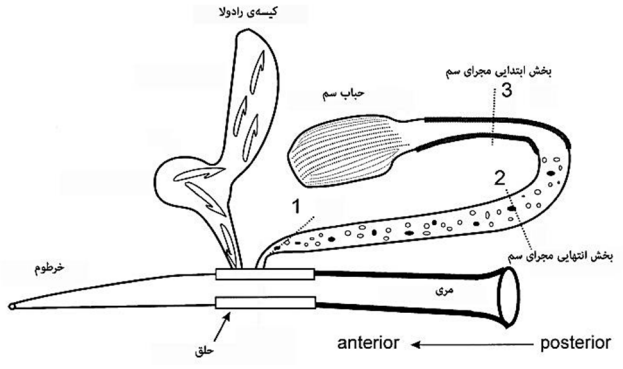
کلمات کلیدی: *کونوس، کونوتوکسین، دستگاه مولد سم، تشریح، خلیج فارس.*

۱. مقدمه

در بین نرم‌تنان سمی، حلزون‌های مخروطی (جنس *Conus*) با تقریبا ۷۰۰ گونه (Olivera, 2006) بزرگترین جنس جانوران سمی از نظر تعداد گونه هستند (Bernaldez et al., 2011) که بر اساس نوع رژیم غذایی به ۳ دسته تقسیم می‌شوند: حلزون‌های ماهی‌خوار، نرم‌تن‌خوار و کرم‌خوار (Olivera, 1997). حلزون‌های مخروطی از ترکیبات سمی (کونوتوکسین‌ها) به‌منظور اهداف مختلفی همچون تغذیه، دفاع و رقابت استفاده می‌کنند (Braga et al, 2005). طبق مطالعات انجام شده، خواص دارویی فراوانی برای کونوتوکسین‌ها گزارش شده است و به‌دلیل اثرگذاری کونوتوکسین‌ها بر کانال‌های یونی (K^+، Na^+ و Ca^{2+}) و گیرنده‌های غشایی (nAChR)[1] در سامانه انتقال پیام عصبی (Liu et al., 2009)، این سموم دارای خواص درمانی در بیماری‌های عصبی- حرکتی هستند (Jha et al., 2004).

دستگاه مولد سم در کونوس‌ها زائده‌ای از دستگاه گوارش است که شامل سم تولید شده و مکانیسم تحویل سم است. کونوتوکسین‌ها در لوله‌ی پیچ‌خورده‌ای به نام مجرای سم[2] (شامل بخش ابتدایی و انتهایی) تولید و به ساختار حباب مانندی منتهی می‌شوند که به آن حباب سم[3] اطلاق می‌گردد. بخش‌های دیگر دستگاه مولد سم خرطوم[4]، حلق، کیسه‌ی رادولایی و دندان‌ها است (Olivera, 2002) (شکل ۱). در حین شکار، خرطوم که به دندان نیزه مانند مسلح است ناگهان خارج می‌شود و شکار را اسیر کرده و سم خود را یک‌باره از طریق دندان توخالی کیتینی به طعمه تزریق می‌کند (Wang et al., 2004).

با توجه به اهمیت بالای کونوپپتیدها در تحقیقات عصب شناسی و پزشکی، تا کنون مطالعات گسترده‌ای بر روی ساختار (Olivera and Cruz, 2001)، طبقه‌بندی این ترکیبات و همچنین نحوه‌ی عملکرد آن‌ها بر سلول‌های هدف صورت نگرفته است (McItosh et al., 1999; Olivera et al., 1999) و مراحل ابتدایی این تحقیقات مربوط به شناسایی یک روش مناسب تشریح دستگاه مولد سم و استخراج کونوتوکسین‌ها است (Cruz et al., 1976).



شکل ۱: تصویر نمایشی از دستگاه مولد سم در حلزون‌های مخروطی (*Conus*) (Marshall et al., 2002)

تا کنون ۲ روش اصلی برای تشریح و آماده‌سازی ترکیبات پپتیدی از دستگاه مولد سم معرفی شده که در روش اول عصاره‌ی پپتیدی از تاثیر حلال مناسب بر دستگاه مولد سم یا پودر خشک آن تهیه می‌شود (Cruz et al., 2006)، در حالی‌که عصاره در روش دوم پس از تحریک حلزون و جمع‌آوری سم تزریق شده و سپس ترکیب سم با حلال مناسب آماده می‌گردد (Biass et al., 2009).

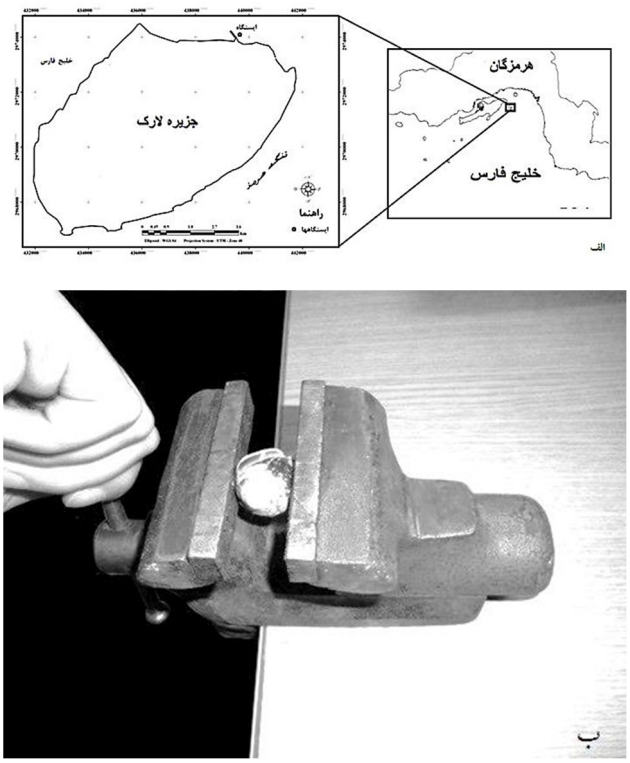
همچنین حلال‌ها و روش‌های استخراجی متفاوتی به‌منظور استخراج کونوپپتیدها معرفی شده است که انتخاب هر روش به هدف استخراج بستگی دارد (Cruz et al., 1976, 2006; Luna-Ramírez et al., 2007; Garrett et al., 2005). در تحقیقات انجام شده معمولا از گونه‌ها و نمونه‌های بزرگتر (بالای ۶ سانتی‌متر) استفاده شده است. علی‌رغم وجود گونه‌های متعددی از کونوس‌ها در خلیج‌فارس (وزیری‌زاده، ۱۳۹۱)، مطالعاتی روی کونوتوکسین‌ها انجام نشده است. البته از یک سو، شرایط ویژه و منحصر به‌فرد این محیط آبی که امکان حضور پروتئین‌ها و پپتیدهای مختلف در این گونه‌ها را می‌تواند سبب شود، انجام مطالعه روی این جانوران را ضروری می‌سازد. در حالی که از سوی دیگر، کوچک بودن گونه‌های موجود در خلیج فارس که احتمالاً دلیل آن شرایط بوم‌شناختی خاص این محیط همچون شوری و دمای بالا است، اتخاذ روش‌های مختلف و مناسب را برای مطالعه ضروری می‌سازد.

۲. مواد و روش‌ها

به‌منظور تعیین بهترین زمان نمونه‌برداری و برداشت نمونه‌های کافی، نمونه‌برداری در ۳ نوبت در ماه‌های بهمن ۱۳۹۰،

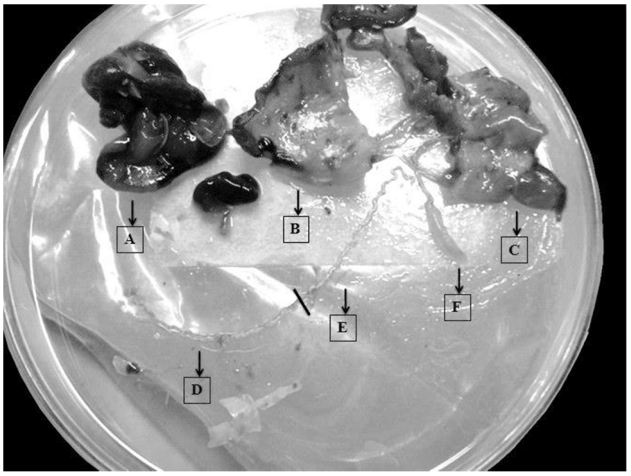
[1] Nicotinic acetylcholine receptor
[2] Venom duct
[3] Venom bulb
[4] Proboscis

اردیبهشت و تیر ۱۳۹۱ و در بخش جزر و مدی سواحل شمالی جزیره‌ی لارک انجام شد (شکل ۲ الف). با توجه به سمی بودن حلزون‌های مخروطی و احتمال نیش زدن، هر نمونه به‌وسیله‌ی پنس از ساحل جمع‌آوری و به‌سرعت به ظروف نگهداری منتقل شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، با جلبک مرطوب به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. به‌منظور تشریح، نمونه‌ها از فریزر خارج و صدف سخت حلزون‌ها به‌وسیله‌ی گیره شکسته شده (شکل ۲ ب) و قطعات صدف به آرامی و با یک پنس استریل از بدن حلزون جدا گردیدند.



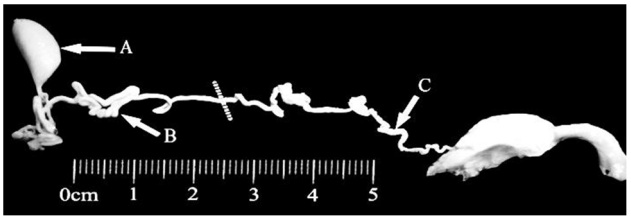
شکل ۲: الف) محل نمونه‌برداری در بخش شمالی جزیره‌ی لارک، ب) شکستن صدف‌ها با استفاده از گیره

سپس بدن حلزون‌ها را بر روی سینی تشریح، پهن کرده و با اسکالپل استریل یک برش عمودی ۳ میلی‌متری در ناحیه‌ی عقبی (Posterior) عضله‌ی پا ایجاد شد. دستگاه مولد سم شیری رنگ بین عضله‌ی پا و دستگاه گوارش قرار گرفته و از یک سمت به مری حیوان متصل شده است. سپس دستگاه مولد سم، به آرامی از بدن جاندار خارج گشت و اتصال مجرا با دستگاه گوارش قطع شد. تمام مراحل تشریح و آماده‌سازی بافت‌ها بر روی حمام یخ و در دمای ۴°C صورت گرفت (شکل ۳).



شکل ۳: بخش‌های مختلف بدن حلزون مخروطی پس از شکستن صدف و بیرون کشیدن دستگاه مولد سم. A) محتویات روده، B) عضله‌ی پا، C) احشاء، D) بخش انتهایی مجرای سم، E) بخش ابتدایی مجرای سم و F) حباب سم

دستگاه مولد سم به آرامی به ۳ بخش حباب سم، بخش ابتدایی مجرا (از محل اتصال مجرا به حباب سم تا وسط مجرا) و بخش انتهایی مجرای سم (از وسط مجرا تا محل اتصال به دستگاه گوارش) تقسیم و هر نمونه در گروه‌های ۱۰ تایی و به‌صورت جداگانه در دستگاه فریز درایر (OPERON-FDU7012) خشک شد (شکل ۴).



شکل ۴: دستگاه مولد سم حلزون مخروطی گونه‌ی *C. terebra thomasi* A) حباب سم، B) بخش ابتدایی مجرای سم، C) بخش انتهایی مجرای سم.

نمونه‌های فریزدرای شده با هموژنایزر دستی کاملا آسیاب گشته و پودر خشک حاصل توزین گشت (حباب سم ۰/۰۲۹، بخش ابتدایی مجرا ۰/۰۰۵ و بخش انتهایی مجرا ۰/۰۰۷ گرم). ۳ نوع عصاره از این پودر خشک تهیه گردید: ابتدا به هر نمونه ۱/۵ ml استون خالص (Sharlu) اضافه و این مخلوط به آرامی هموژنه شد و پس از نگهداری به‌مدت یک شب در یخچال، عصاره سانتریفیوژ (Hettich- Universal320R) شد (۱۰۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه)، سپس محلول بالایی جدا و به فریزر منتقل شد. این مرحله بار دیگر با استون خالص تکرار شد و پس از سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) محلول بالایی جدا و

به محلول قبلی اضافه شد. مرحله‌ی آخر با ml ۳ متانول ۲۰٪ (Sharlu) تکرار شد. بعد از انجام این مرحله، ۲ عصاره‌ی استونی و متانولی به‌دست آمد. سپس عصاره‌ی استونی به دو بخش مساوی تقسیم گشته، نیمی از آن به فریزر منتقل و نیمه‌ی دیگر با عصاره‌ی متانولی مخلوط شد و بنابراین در این فرآیند دو عصاره‌ی استونی خالص و استونی – متانولی تهیه شد. سومین عصاره از هموژنه کردن ml ۱ محلول بافر فسفات نمکی (pH=7) با پودر خشک و سانتریفیوژ عصاره‌ی حاصل (۱۵۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه) و جداسازی محلول بالایی پس از گذشت یک شب حاصل گردید (Kobayashi et al., 1983). تمام مراحل آزمایش در دمای ۴°C انجام شد و عصاره‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C– نگهداری شدند.

میزان پروتئین کل هر عصاره با روش سنجش پروتئین کل برادفورد (Kobayashi et al., 1983; Bradford, 1976) اندازه‌گیری و ترسیم نمودار استاندارد با استفاده از محلول آلبومین سرم گاوی (Merck) در ۶ غلظت مختلف (۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ µg/ml) انجام شد. µl ۲۰ از هر عصاره با µl ۱۰۰۰ مخلوط و جذب نوری نمونه‌ها در nm ۵۹۵ اندازه‌گیری شد. نمودار استاندارد نیز با نرم‌افزار Microsoft excel 2007 رسم گردید.

جداسازی و تعیین وزن مولکولی پپتیدهای استخراجی با روش الکتروفورز SDS-PAGE صورت گرفت (Laemmli, 1970; Moller et al., 2013) (تانک الکتروفورز عمودی اختریان). عصاره‌ها به ژل ۱۲٪ پلی‌اکریل‌آمید منتقل شدند و برای تعیین وزن مولکولی پپتیدها از استاندارد پروتئینی رنگ‌آمیزی شده (۱۷۰ kDa –۱۰، سیناژن) استفاده گردید. قبل از تزریق ابتدا نمونه‌ها با بافر نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰°C (Memmert–Mb301) جوشانده شدند. ژل‌ها در مرحله‌ی آخر با رنگ کوماسی بلو G-250 (Merck) رنگ‌آمیزی گردیدند.

۳. نتایج

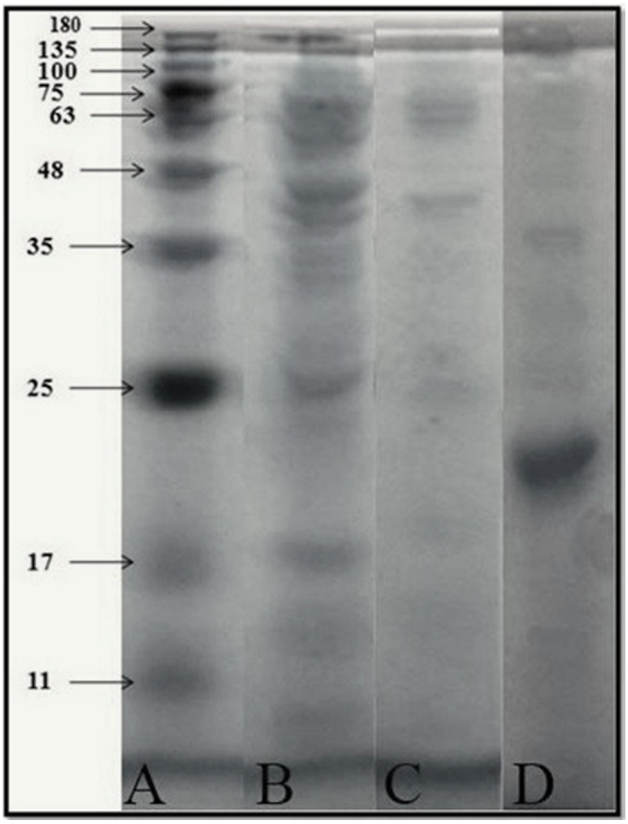
مشاهدات انجام شده در ۳ نوبت نمونه‌برداری مشخص شد که مناسب‌ترین زمان برای دست‌یابی به نمونه‌ها در نواحی جزر و مدی، اردیبهشت ماه و بهترین سواحل، سواحل ماسه‌ای بخش شمال شرقی جزیره‌ی لارک بود. نمونه‌ها در این نواحی تا نیمه‌ی بدن در ماسه فرو رفته و به راحتی قابل مشاهده بودند (سایز صدف نمونه‌ها در محدوده‌ی ۵/۵–۵ سانتی‌متر بود). لازم به ذکر است که مشاهدات و اطلاعات داده شده‌ی مربوط به تعداد نمونه‌ها در ۳ نوبت نمونه‌برداری کاملا بصری بوده و اطلاعات آماری دقیقی در دست نیست. این اطلاعات صرفا به‌منظور راهنمایی پژوهشگران فعال در زمینه‌ی مطالعه‌ی کونوتوکسین‌های خلیج فارس ارائه شده است.

پس از اضافه کردن معرف به رقت‌های مختلف عصاره‌های استونی و استونی– متانولی هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد و بنابراین نتایج میزان پروتئین کل در این دو عصاره غیرقابل قبول بود، اما در مورد عصاره‌ی به‌دست آمده با حلال بافر فسفات نمکی تغییر رنگ مشاهده شد. پس از رسم نمودار استاندارد، غلظت پروتئین کل بخش‌های مختلف دستگاه مولد سم محاسبه شد (حباب سم: ۳۸/۷۹، بخش ابتدایی مجرا: ۵۲/۴ و بخش انتهایی مجرا: ۴۶/۰۱ میلی‌گرم/گرم بافت خشک).

پس از رنگ‌آمیزی در ژل‌هایی که به آن‌ها عصاره‌های استونی و استونی – متانولی تزریق شده بود هیچ باندی مشاهده نشد، اما باندهای مشخصی در عصاره‌های بافر فسفات نمکی مشاهده شد. عصاره‌ی حباب سم در مجموع ۱۶ باند مشخص، ۷ باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۱۸۰، ۱۳۵، ۱۰۰، ۷۵، ۳۵، ۲۵ و ۱۷ کیلودالتون و ۹ باند در مناطق بین باندهای شاهد نشان دادند. بخش ابتدایی مجرا ۹ باند مشخص، ۵ باند با وزن تقریبی ۱۳۵، ۱۰۰، ۷۵، ۶۳ و ۲۵ کیلودالتون و ۴ باند در مناطق بین باندهای شاهد نشان داد و در عصاره‌ی بخش انتهایی نیز ۹ باند مشخص، ۵ باند با وزن مولکولی تقریبی ۱۰۰، ۶۳، ۴۸، ۱۷ و ۱۱ کیلودالتون و ۴ باند در مناطق بین باندهای شاهد مشخص شد (شکل ۵). بیشترین دانسیته‌ی مشاهده شده مربوط به باند پپتیدی با وزن تقریبی ۲۵ کیلودالتون در بخش انتهایی مجرای سم مشاهده گردید.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه تاکنون گزارشی در مورد ترکیبات پپتیدی استخراج شده از گونه‌ی *Conus terebra thomasi* منتشر نشده است، نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات مشابهی که بر روی گونه‌های دیگر حلزون‌های مخروطی صورت گرفته مقایسه می‌گردد.



شکل ۵: ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ رنگ‌آمیزی شده از عصاره‌ی بافر فسفات نمکی دستگاه مولد سم در گونه *C. terebra thomasi*، A) نوار استاندارد و وزن تقریبی باندهای شاهد بر حسب کیلودالتون، B) حباب سم با ۱۶ باند مشخص، ۷ باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۱۸۰، ۱۳۵، ۱۰۰، ۷۵، ۳۵، ۲۵ و ۱۷ کیلودالتون و ۹ باند در مناطق بین باندهای شاهد، C) بخش ابتدایی مجرای سم (از محل اتصال به حباب سم تا وسط مجرای سم) با ۵ باند با وزن تقریبی ۱۳۵، ۱۰۰، ۷۵، ۶۳ و ۲۵ کیلودالتون و ۴ باند در مناطق بین باندهای شاهد، D) بخش انتهایی مجرای سم (از وسط مجرا تا محل اتصال به حلق) با ۹ باند مشخص، ۵ باند با وزن مولکولی تقریبی ۱۰۰، ۶۳، ۴۸، ۱۷ و ۱۱ کیلودالتون و ۴ باند در مناطق بین باندهای شاهد

قبل از استخراج کونوپپتیدها، مسئله‌ی مهم نحوه‌ی بیرون کشیدن حلزون از صدف و خارج کردن دستگاه مولد سم بود. بهترین روش برای بیرون کشیدن حلزون با کمترین آسیب وارده، استفاده از گیره است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. استخراج ترکیبات پپتیدی از دستگاه مولد سم روشی معمول در تحقیقات است (Cruz et al., 1978; Olivera and Cruz, 2001)، به ویژه در مطالعاتی که به تفاوت کونوپپتیدها در بخش‌های ابتدایی و انتهایی مجرای سم و بررسی فرآیند بلوغ آن‌ها در طول مجرا می‌پردازند. علاوه بر این روش دیگری برای استخراج کونوپپتیدها وجود دارد و آن تحریک حلزون برای شکار و جمع‌آوری سم تزریق شده است (Hopkins et al., 1995)، که معمولا در مطالعات مربوط به شناخت آنزیم‌های دخیل در فرآیند بلوغ کونوتوکسین‌ها در هنگام تحریک جانور، به مقایسه‌ی سم استخراج شده در این روش و عصاره‌ی به‌دست آمده از دستگاه مولد سم پرداخته می‌شود (Biass et al., 2009). بنابراین در صورتی که هدف از مطالعه بررسی بلوغ کونوپپتیدها در طول مجرای تولید سم باشد، روش استخراج از دستگاه مولد سم روش مناسبی است. البته در صورتی که امکان دسترسی به نمونه‌هایی با سایز بزرگتر و تعداد بیشتر باشد، تقسیم مجرا به قطعات بیشتر در مقایسه‌ها، نتایج دقیق‌تری را نشان خواهد داد.

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی حلزون‌های مخروطی مشخص شده که سم تولید شده در این حلزون‌ها متشکل از ترکیبات پروتئینی و پپتیدی هستند (Aneiros and Garateix, 2004; Olivera, 2006; Olivera et al., 1985)، بنابراین در این تحقیق از روش‌های مربوط به استخراج ترکیبات پپتیدی استفاده گردید. با توجه به این که مقادیر پروتئین اندازه‌گیری شده‌ی عصاره‌های استونی و متانولی در روش برادفورد بسیار کم و نزدیک به صفر بود، بنابراین عصاره‌گیری با حلال‌های استون و متانول روش مناسبی برای استخراج ترکیبات پپتیدی از دستگاه مولد سم تشخیص داده نشد. احتمالا چنین نتیجه‌ای به‌دلیل میزان بسیار پائین پروتئین استخراجی از بافت‌ها تا حدی است که اندازه‌گیری آن با روش برادفورد امکان‌پذیر نیست. نتایج الکتروفورز SDS-PAGE نیز نشان‌دهنده‌ی میزان بسیار کم پروتئین در عصاره‌های استونی و استونی – متانولی بوده و میزان بالای ترکیبات پپتیدی در عصاره‌ی بافر فسفات نمکی را تایید کردند. بنابراین به‌طور خلاصه نتایج حاصل از سنجش پروتئین کل نشان داد که بافر فسفات نمکی حلال مناسبی برای جداسازی پروتئین کل از اندام سم است و در واقع بیشترین میزان پروتئین استخراج شده از دستگاه مولد سم در این روش مشاهده شد. انتخاب این روش بر اساس تحقیقات Kobayashi و همکاران (۱۹۸۳) در مورد استخراج سم Tessulatoxin از گونه *C. tessulatus* بود. آن‌ها در تحقیقات خود اعلام کردند استفاده از این بافر باعث استخراج ترکیبات پپتیدی به‌صورت فعال خواهد شد، البته با توجه به مطالعات انجام گرفته، روش‌های مختلفی برای استخراج کونوپپتیدها وجود دارد که انتخاب هر روش به هدف استخراج، امکانات آزمایشگاهی و کسب نتایج قابل قبول بستگی دارد (Cruz et al., 1976, 2006; Garrett et al., 2005; Luna-Ramirez et al., 2007). باندهای پپتیدی متعدد

به‌دست آمده از روش الکتروفورز نیز نشان دهنده‌ی وجود ترکیبات پپتیدی در عصاره‌های بخش‌های مختلف دستگاه مولد سم بوده که این نتایج با تحقیقی که توسط Bulaj و همکاران (۲۰۰۳) روی گونه *C. textile* انجام شد و نشان داد که باندهای بخش ابتدایی یا در بخش انتهایی مشاهده نمی‌شوند یا دانسیته‌ی آن‌ها کاهش می‌یابد، مطابقت دارد. همچنین مشابه با باند پپتیدی اصلی (~25kDa) مشاهده شده در بخش انتهایی مجرا، در تحقیق انجام شده توسط Bulaj و همکاران (۲۰۰۳) نیز یک باند پپتیدی با وزن مولکولی تقریبی ۵۵ کیلودالتون، بیشترین دانسیته را نشان داد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین روش در تشریح نمونه جدا کردن دستگاه مولد سم از بافت‌های اطراف آن و تقسیم کردن دستگاه حداقل به ۳ بخش حباب سم، بخش ابتدایی و بخش انتهایی مجرا است و همچنین از میان روش‌های مختلف بهترین روش عصاره‌گیری استفاده از بافر فسفات نمکی است.

منابع

وزیری‌زاده، ا.؛ محمدی، م.؛ فخری، م.ع.، ۱۳۹۱. ارزیابی بوم شناختی جوامع نرم‌تن در سواحل صخره‌ای استان بوشهر. نشریه اقیانوس-شناسی. سال سوم. شماره ۹. صفحات ۶۱-۵۵.

Aneiros, A.; Garateix, A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. Journal of Chromatography B, 803: 41-53.

Bernaldez, J.; López, O.; Licea, A.; Salceda, E.; Arellano, R.O.; Vega, R; Soto, E., 2011. Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca^{2+} channels. Toxicon, 57: 60-67.

Biass, D.; Dutertre, S.; Gerbault, A.; Menon, J.L.; Offord, R.; Favreau, P.; Stocklin, R., 2009. Comparative proteomic study of the venom of piscivorous cone snail *Conus consors*. Journal of Proteomics, 72: 210-218.

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: 248-254.

Braga, M.C.V.; Konno, K.; Portaro, F.C.; Freitas, J.C.; Yamane, T.; Olivera, B.M.; Pimenta, D.C., 2005. Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. Toxicon, 45:113-22.

Bulaj, G.; Buszek, O.; Goodsell, I.; Jimenez, E.C.; Kranski, J.; Nielsen, J.S.; Garrett, J.E.; Olivera, B.M., 2003. Efficient oxidative folding of conotoxins and the radiation of venomous cone snails. PNAS, 100: 14562-14568.

Cruz, A.J.; Maillo, M.; Lo´pez-Vera, E.; Falco´n, A.; Heimer, E.P.; Olivera, B.M.; Aguilar M.B., 2006. Amino acid sequence and biological activity of a γ-conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. Peptides, 27: 506-511.

Cruz, L.J.; Corpuz, G.; Olivera, B.M., 1976. A preliminary study of *Conus* venom protein. The Veliger, 18(3): 302-308.

Cruz, L.J.; Gray, E.R.; Olivera, B.M., 1978. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, 190(2): 539-548.

Garrett, J.E.; Buczek, O.; Watkins, M.; Olivera, B.M.; Bulaj, G., 2005. Biochemical and gene expression analyses of conotoxins in *Conus textile* venom ducts. Biochemical and Biophysical Research Communivations, 328: 362-367.

Hopkins, C.; Grilley, M.; Miller, C.; Shon, K.; Cruz, L.J.; Gray, W.R.; Dykert, J.; Rivier, J.; Yoshikami, D.; Olivera B.M., 1995. A new family of *Conus* peptides targeted to the Nicotinic Acetylcholine receptor. Journal of Biological Chemistry, 270(38): 22361-22367.

Jha, R.K.; Zi-rong, X., 2004. Biomedical Compounds

analysis of proteases in the injected and dissected venom of cone snail species. Toxicon, 65: 59-67.

Olivera, B.M., 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. Molecular biology of cell, 8: 2101-2109.

Olivera, B.M., 2002. *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. Annual Review of Ecology and Systematics, 33: 25-47.

Olivera, B.M., 2006. *Conus* peptides: Biodiversity–based discovery and exogenomics. Journal of Biological Chemistry, 281(42): 31173- 31177.

Olivera, B.M.; Cruz, L.J., 2001. Conotoxins, in retrospect. Toxicon, 39: 7-14.

Olivera, B.M.; Cruz, L.J.; Yoshikami, D., 1999. Effects of *Conus* peptides on the behavior of mice. Current Opinion in Neurobiology, 9(6):772-777.

Olivera, B.M.; Gray, W.R.; Zeikus, R.; McIntosh, J.M.; Varga, J.; Rivier, J.; Santos, V.D.; Cruz, L.J., 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. Science, 230(4732): 1338-1343.

Wang, C.Z.; Chi, C.W., 2004. *Conus* peptides- a rich pharmaceutical treasure. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 36(11): 713-723.

from Marine organisms. Marine Drugs, 2(3): 123-146.

Kobayashi, J., Nakamura, H., Hirata, Y.; Ohizumi, Y., 1983. Tessulatoxin, the vasoactive protein from the venom of the marine snail *Conus tessulatus*. Comparative, 74(3): 381-384.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 193: 680-685.

Liu, Z.; Xu, N.; Hu, J.; Zhao, C.; Yu, Z.; Dai, Q., 2009. Identification of novel I-superfamily conopeptides from several clades of *Conus* species found in the South China Sea. Peptides, 30(10): 1782-1787.

Luna-Ramírez, K.S.; Aguilar, M.B.; Falcón, A.; Cotera, P.H.; Olivera, B.M.; Maillo, M., 2007. An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. Peptides, 28: 24-30.

Marshall, J.; Kelley, W.P.; Rubakhin, S.S.; Bingham, J.P.; Sweedler, J.V., 2002. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. Biology Bulletin, 203: 27-41.

McIntosh, J.M.; Santos, A.D.; Olivera, B.M., 1999. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Annual Review of Biochemistry, 68: 59-88.

Moller, C.; Vanderweit, N.; Mari, F., 2013. Comparative