

مکان‌یابی رونوشت ژن *Vasa* در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) با شیوه دورگه‌سازی در محل (In Situ Hybridization)

سمانه پورسعید^۱، محمد رضا کلباسی^{۲*}، سیده نفیسه حسنی^۳، گورو یوشیزاکی^۴، حسین بهاروند^۵

تاریخ دریافت: مرداد ۹۶

تاریخ پذیرش: مهر ۹۶

چکیده

دورگه‌سازی در محل، ابزار قدرتمندی در مکان‌یابی توالی خاصی از اسیدهای نوکلئیک در جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف راه‌اندازی این شیوه، با استفاده از نشانگر *Vasa* در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) انجام شد. برای انجام این مطالعه، ریبوپروب نشاندار شده با دیگوکسی ژنین (Dig) از پلازمید pGEM-T حامل DNA مکمل ژن *Vasa* ماهی آزاد دریای خزر، تولید شد. نشاندار کردن RNA طی واکنش رونویسی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از Dig Labeling Mix انجام شد. برای دورگه‌سازی در محل بر روی بافت، ابتدا بافت بیضه بعد از جداسازی از ماهی آزاد نابالغ، تحت تثبیت و آب‌گیری بافتی قرار گرفت. پس از آب‌دهی مجدد و تیمار با پروتئیناز K، لام‌ها با بافر دورگه‌سازی، حاوی ریبوپروب آنتی‌سنس *Vasa* انکوبه شدند. پس از شستشو با محلول SSC و انکوباسیون با آنتی‌بادی علیه دیگوکسی ژنین برای ۱۶ ساعت، آشکارسازی با NBT/BCIP انجام شد. نتایج به دست آمده از این پژوهش با استفاده از ریبوپروب آنتی‌سنس *Vasa* نشان داد که همه سلول‌های زایا (از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزوآ) این ژن را به خوبی بیان کردند، اما شدت بیان آن در رده‌های مختلف سلول‌های زایای گونه مورد مطالعه، متفاوت بود. بنابراین در این مطالعه، ژن *Vasa* به عنوان نشانگر اختصاصی برای سلول‌های زایا در این ماهی و شیوه دورگه‌سازی در محل به عنوان یک عامل کاوشگر، به منظور بررسی مکان رونوشت ژن‌ها در بافت بیضه ماهی آزاد، معرفی شد. این یافته می‌تواند کمک شایانی در شناخت بیشتر ما از چگونگی تشکیل سلول‌های زایا و تکوین آن‌ها در این گونه ارزشمند دریای خزر داشته باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های زایا، هیپریداسیون در محل، *Vasa*، *Salmo caspius*

- ۱- دکتری تکثیر و پرورش آریان، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
 - ۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
 - ۳- استادیار گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
 - ۴- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم دریایی و تکنولوژی توکیو، توکیو، ژاپن.
 - ۵- استاد گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
- * نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

سلول‌ها در شرایط *in vivo* و *in vitro* می‌کند. همچنین استفاده از نشانگرها در ردیابی سلول‌های زایا بعد از پیوند که به منظور حفظ ذخایر گونه‌های در معرض تهدید انجام می‌شود، بسیار موثر است (Okutsu et al., 2007; Higuchi et al., 2011; Boonanuntasarn et al., 2016).

در ماهیان استخوانی نشانگرهایی برای سلول‌های بنیادی پرتوان، سلول‌های زایای بدوی، سلول‌های توسعه یافته مانند اسپرماتوگونی‌ها/اووگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها/اووسیت‌ها و اسپرماتیدها معرفی شده است (اسماعیلی و همکاران ۱۳۹۴؛ Xu et al., 2008؛ Yano et al., 2005). یکی از نشانگرهای اختصاصی سلول‌های زایا، ژن *Vasa* است. ژن *Vasa* کد کننده یک RNA-هلیکاز از پروتئین‌های خانواده جعبه DEAD است که به طور اختصاصی در دودمان سلول‌های زایا بیان می‌شود (Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000; Cao et al., 2012). اگرچه هنوز عملکرد محصول ژن *Vasa* به طور کامل شناخته نشده است، اما به نظر می‌رسد این ژن نقش مهمی در رشد و تکوین سلول‌های زایا ایفا می‌کند. مطالعه انجام شده بر دروزوفیلا (*Drosophila melanogaster*)

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) یکی از زیرگونه‌های قزل‌آلای قهوه‌ای است که در سال‌های اخیر جمعیت آن به واسطه تخریب محیط زیست و صید بی‌رویه، دستخوش کاهش قابل ملاحظه‌ای شده است، این ماهی را در فهرست گونه‌های در معرض تهدید قرار داده است. این گونه بومی به دلیل داشتن بیشترین وزن، طول و نرخ رشد در بین سایر قزل‌آلای قهوه‌ای، از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای در صنعت آبی‌پروری برخوردار است (Jalali and Mojazi Amiri, 2009; Kalbassi et al., 2012). با وجود اهمیت اکولوژیک و آبی‌پروری این گونه، اغلب مطالعات در مورد زیست‌شناسی تولیدمثل ماهی آزاد دریای خزر به بررسی تغییرات هورمونی و بیوشیمیایی خون در طی فرآیندهای اسپرماتوژنز و اووژنز محدود شده است (Hajirezaee et al., 2012). در حالی که یک مرحله کلیدی در مطالعه زیست‌شناسی تولیدمثل، بررسی بیان ژن‌ها و تعیین نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی انواع سلول‌های زایا است. معرفی نشانگرهای مولکولی برای شناسایی سلول‌های زایا همراه با حفظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی کمک زیادی به شناخت، جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها از سایر

تعیین موقعیت و ردیابی ترادف‌های خاصی از mRNA در جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها محسوب می‌شود (Looi and Cheah, 1992; Lecuyer et al., 2008; Irving, 2009). این روش در پژوهش‌های پایه‌ای و کاربردی بسیار مورد توجه قرار گرفته است؛ زیرا برخلاف روش‌های مولکولی اشاره شده، در این روش، ظاهر بافت و سلول‌های هدف حفظ می‌شود و امکان رویت بیان ژن هدف را در سلول و بافت فراهم می‌کند (Raap et al., 1994). اساس این روش مبتنی بر تشکیل پیوند هیدروژنی بین پروب‌های نوکلئیک اسید با توالی DNA یا RNA مکمل آن در درون سلول یا بافت هدف است. پروب‌ها با مواد رادیواکتیو و یا غیررادیواکتیو مانند دیگوکسی ژنین نشاندار می‌شوند. سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌ها ضد این نشانگر در سلول یا بافت ردیابی می‌شوند (Lecuyer et al., 2008). تکنیک ISH در مطالعات سلولی و تکوینی به منظور شناسایی سلول‌هایی که هنوز تمایز ریخت‌شناسی نشان ندادند کاربرد وسیعی دارد؛ زیرا با استفاده از این روش، امکان مشاهده محل بیان mRNA در

نشان داد که ماده‌های جهش یافته فاقد ژن *Vasa* قادر نبودند جنین‌های زایا به وجود بیاورند (Hay et al., 1988). همچنین مکان‌یابی رونوشت ژن *Vasa* که منحصرًا در سلول‌های زایای ماهی گورخری (*Danio rerio*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) بیان می‌شود، موید اهمیت این ژن در تکوین سلول‌های جنسی است (Yoon et al., 1997; Yoshizaki et al., 2000; Nagasawa et al., 2013). بنابراین، به کارگیری روش مناسب برای تعیین الگوی فضایی بیان این ژن می‌تواند کمک شایانی در شناسایی سلول‌های زایا و همچنین تعیین عملکرد آن در طی تکوین گناد داشته باشد. روش‌های مختلفی برای بررسی بیان ژن‌ها در سطح RNA وجود دارد. از جمله روش‌های ارزیابی بیان ژن، استفاده از روش‌های RT-PCR، qRT-PCR^۲ و لکه‌گذاری نورترن^۳ است. این روش‌ها وابسته به استخراج RNA از سلول‌ها و بافت‌ها هستند و امکان مشاهده بیان ژن‌ها را در بافت نمی‌دهد. در مقابل، دوره‌سازی در محل (In Situ Hybridization; ISH) به عنوان یک عامل کاوشگر، ابزار قدرتمندی برای

-
- 1- Real-Time Polymerase Chain Reaction
 - 2- Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
 - 3- Northern Blot

بنیادی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) منتقل شدند. از یک مخزن پلاستیکی با ظرفیت ۱۲۰ لیتر با هوادهی دائم برای نگهداری ماهیان استفاده شد. در طی این دوره دمای آب به طور پیوسته ۸ درجه سانتی‌گراد بود. ماهیان تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ماهیان در طول نگهداری یک نوبت در روز با استفاده از غذای تجاری بیومار به صورت دستی غذادهی شدند. ۴۸ ساعت قبل از بیهوش کردن غذادهی به ماهیان قطع شد.

از پنج ماهی نابالغ با میانگین وزنی $10/2 \pm 1/9$ (میانگین \pm انحراف از معیار) گرم و طولی $10/4 \pm 0/7$ سانتی‌متر برای انجام این مطالعه استفاده شد. شاخص‌های وزنی و طولی به ترتیب با دقت $0/001$ گرم و 1 میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. میانگین شاخص گنادی ماهیان مذکور $0/3 \pm 0/1$ درصد بود.

مراحل دو رگه‌سازی در محل (ISH)

تهیه cDNA الگو

از پلازمید pGEM-T (Promega، آمریکا) که DNA مکمل^۱ *Vasa* ماهی آزاد (۱۶۳۱ جفت باز) در آن کلون شده بود به عنوان الگو

سلول، بافت و یا کل بدن فراهم می‌شود (Looi and Cheah, 1992; Lecuyer et al., 2008; Irving, 2009). به کارگیری ISH برای پژوهشگران این امکان را نیز فراهم می‌سازد که اثر عوامل مختلف درونی و بیرونی، تاثیر افزایش بیان برخی ژن‌ها و یا حذف عملکردی آن‌ها را در میزان و نحوه بیان ژن‌های دیگر بر روی سلول هدف مورد بررسی قرار دهند (Wunderlich et al., 2014).

تا کنون مطالعه‌ای در باره به کارگیری روشی برای مکان‌یابی نشانگرهای اختصاصی سلول‌های زایا با حفظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی بر روی ماهیان در ایران انجام نشده است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف راه‌اندازی تکنیک ISH به منظور مکان‌یابی رونوشت *Vasa* به عنوان یک نشانگر مولکولی احتمالی، بر روی بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر انجام گرفت.

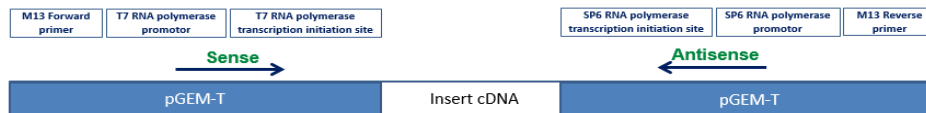
مواد و روش‌ها

گونه مورد مطالعه

ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) مورد استفاده در این مطالعه از مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر (کلاردشت، مازندران، ایران) تهیه و به پژوهشکده سلول‌های

برای تهیه RNAهای سنس^۱ و آنتی‌سنس^۲ استفاده شد. قطعه DNA مکمل مذکور بین دو پروموتور SP6 و T7 وارد شده بود و نواحی اتصال آغازگرهای M13 در بالادست و پایین دست پروموتورها قرار داشتند (شکل ۱).
 خطی‌سازی از طریق PCR با استفاده از آغازگرهای M13 (جدول ۱) انجام شد. واکنش PCR شامل cDNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم، بافر PCR با غلظت ۱X، dNTP با غلظت ۲۰۰ μM، MgCl₂ با غلظت ۱۰mM، آنزیم Taq Polymerase با غلظت ۱U، آغازگرها با غلظت ۵pmol بود که با آب دوبار تقطیر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. چرخه

حرارتی PCR در ۳۵ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول خطی شده PCR با استفاده از کیت تخلیص PCR (QIA Quick PCR Purification، QIAGEN، آلمان) طبق دستور العمل تخلیص شد. به منظور حذف ناخالصی‌ها و افزایش غلظت محصول PCR از روش رسوب‌دهی^۳ استفاده شد. بدین منظور به محصول PCR استات سدیم و اتانول مطلق سرد اضافه شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای



شکل ۱: نقشه پلازمید *pGEM-T/Vasa*

جدول ۱: توالی آغازگرهای M13

توالی	آغازگر M13
F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	در بالادست T7
R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	در پایین دست SP6

- 1- Sense
- 2- Anti-sense
- 3- Precipitation

پلیمراز (T7 RNA Polymerase) برای تولید رشته سنس و SP6 RNA Polymerase برای تولید رشته آنتی-سنس) با غلظت ۳۰U (Promega، آمریکا) و آب فاقد RNase با حجم نهایی ۴۰ μL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس واکنش به مدت ۱۵ دقیقه با DNase برای حذف DNA از ریوپروب ادامه یافت. به منظور حذف ناخالصی‌ها از روش رسوب‌دهی استفاده شد. بدین منظور ۴۰ μL استات آمونیوم ۷/۵M، ۱ μL گلیکوژن و ۳۰۰ μL اتانول مطلق به محصول *in vitro* Transcription اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رسوب‌دهی ریوپروب با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از رسوب‌دهی، پلیت ریوپروب با ۵۰۰ μL اتانول ۷۵٪ شسته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ریوپروب مستخرج با آب فاقد RNase در حجم ۲۰ میکرولیتر حل شد. کمیت و کیفیت محصول به ترتیب با استفاده از اسپکتوفتومتر و ژل آگارز ۱٪ بررسی

۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رسوب cDNA با استفاده از سانتریفیوژ (Sigma، آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از فاز مایع جدا شد. سپس شستشوی پلیت cDNA توسط ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد سرد و سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس پلیت خشک شده در حجم ۲۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase حل شد. کمیت و کیفیت محصول به ترتیب با استفاده از اسپکتوفتومتر (WPA، Biochrom، انگلستان) و ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. اندازه محصول با نشانگر 1Kb Thermo GeneRuler DNA Ladder (Fisher Scientific، آمریکا) تخمین زده شد.

تهیه و سنتز پروب RNA با بهره‌گیری از تکنیک رونویسی در شرایط آزمایشگاهی

تولید ریوپروب در شرایط آزمایشگاهی^۱، در حضور cDNA با غلظت ۱ μg همراه با بافر رونویسی با غلظت ۱X (Promega، آمریکا)، Dig Labeling Mix با غلظت ۱X (Roche، آلمان)، RNasin در حجم ۱ μL، DTT در غلظت ۱۰mM (Promega، آمریکا)، آنزیم

1- In Vitro Transcription

لامها در محلول پروتئیناز K (Sigma-) ۱Kb Plus DNA Ladder تخمین زده شد. Aldrich، آمریکا) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای حذف پروتئیناز K، محلول تریس-گلیسین اضافه شد و پس از چند بار شستشو در محلول پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً تثبیت شد. در نهایت بعد از دو بار شستشو، لامها به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بافر دورگه‌سازی (Formamide) ۵۰ درصد، ۱X^۲ SSC، دکستران سولفات ۵ درصد، دنهاردت^۳ ۱ درصد، tRNA ۲۵۰ μg/mL و آب فاقد RNase شدند.

مرحله دورگه‌سازی

در مرحله دورگه‌سازی^۴ برای دورگه‌سازی ریبوپروب (آنتی‌سنس) مکمل با mRNA بافت بیضه، لامها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در محلول دورگه‌سازی تازه حاوی ریبوپروب *Vasa* نشاندار شده با دیگوکسی ژنین با غلظت ۵ng/μL انکوبه شدند. به منظور بررسی اختصاصی بودن ریبوپروب به برخی از لامها پروب (سنس) غیرمکمل با

شد. اندازه محصول با نشانگر 1Kb Plus DNA Ladder تخمین زده شد.

آماده‌سازی گناد برای ISH

جداسازی، تثبیت و آب‌گیری بافت بیضه برای نمونه‌برداری از گناد، ابتدا ماهیان با دوز بالای روغن گل میخک کشته شدند. سپس بافت بیضه برای انجام مطالعات ISH به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (۷۵٪ اسید پیکریک، ۲۰٪ فرمالین و ۵٪ اسید استیک) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. نمونه‌های بافت پس از تثبیت شدن از مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، پارافینه شدن و قالب‌گیری عبور داده شدند. سپس از بافت‌های قالب‌گیری شده مقاطع بافتی ۵ میکرونی توسط میکروتوم (HM 325، Thermo Scientific، آمریکا) تهیه شد.

مرحله پیش از دورگه‌سازی

در مرحله پیش از دورگه‌سازی^۱ برای حذف پارافین از مقاطع، لامها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول زایلن و سپس در درجات نزولی اتانول (۱۰۰، ۹۶ و ۷۰ درصد) قرار گرفتند. به منظور افزایش نفوذپذیری پروب به mRNA هدف،

- 1- Prehybridization
- 2- Saline-Sodium Citrate (SSC)
- 3- Denhardt
- 4- Hybridization

انکوبه شدند. بعد از آن محلول $^3\text{NBT/BCIP}$ (Roche, آلمان) حل شده در بافر شناساگر با غلظت $20\ \mu\text{g/mL}$ اضافه شد. سپس نمونه‌های بافت به مدت ۶ ساعت تا ظهور رنگ آبی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus, BX51, ژاپن) بررسی شدند. پس از مشاهده سیگنال (ظهور رنگ آبی) برای جلوگیری از بروز پس زمینه، لام‌ها دو بار با بافر TBST شستشو داده شدند و به محلول TBST تازه منتقل و تا زمان تصویربرداری در آن محلول نگهداری شدند. به منظور ردیابی رونوشت Vasa در سلول‌های بافت بیضه، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۲۰۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. تصویربرداری از لام‌ها توسط دوربین دیجیتال (Olympus, DP70, ژاپن) متصل به میکروسکوپ انجام گرفت.

نتایج

به منظور سنتز و تولید ریبوپروپ ابتدا طی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای M13، cDNA ژن Vasa ماهی آزاد دریای خزر کلون شده در پلازمید pGEM-T خطی و تکثیر شد. الگوی الکتروفوروز محصول PCR بعد از تخلیص

رونوشت Vasa اضافه شد. گروهی از لام‌ها با محلول دورگه‌سازی فاقد ریبوپروپ انکوبه شدند (شاهد منفی).

مرحله پس از دورگه‌سازی

در مرحله پس از دورگه‌سازی^۱ برای حذف محلول دورگه‌سازی حاوی ریبوپروپ شستشو با SSC (۲X) دو بار و هر بار ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس در معرض RNase A با غلظت $10\ \mu\text{g/mL}$ قرار گرفتند. مجدداً شستشو با SSC ۲X، SSC ۱X و TBST (۱M Tris، ۵M NaCl و Tween) انجام شد. بعد از انکوبه کردن، لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با بافر بلاک کننده^۲ حاوی ۲٪ سرم گوسفندی، در معرض آنتی‌بادی Anti-digoxigenin (با رقت ۱:۱۰۰۰) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

ردیابی و مشاهده سیگنال

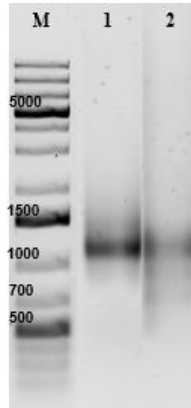
پس از حذف آنتی‌بادی، لام‌ها دو بار هر بار ۵ دقیقه با TBST شسته شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با بافر شناساگر حاوی Tris (۱M)، pH ۹/۵، NaCl (۵M) و MgCl_2 (۱M)

1- Post-hybridization

2- Blocking Buffer

3- Nitroblue Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate

M13. M: مارکر DNA با اندازه ۱Kb. ستون ۱: cDNA ژن *Vasa* ماهی آزاد دریای خزر بعد از تخلیص و رسوب‌دهی.

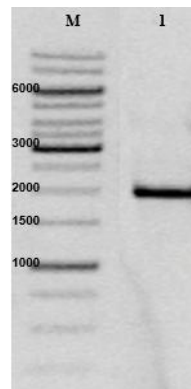


شکل ۳: تایید تولید ریبوپروپ سنس و آنتی‌سنس *Vasa* از طریق واکنش رونویسی در شرایط آزمایشگاهی. M: مارکر DNA با اندازه ۱Kb Plus. ستون ۱: ریبوپروپ آنتی‌سنس. ستون ۲: ریبوپروپ سنس.

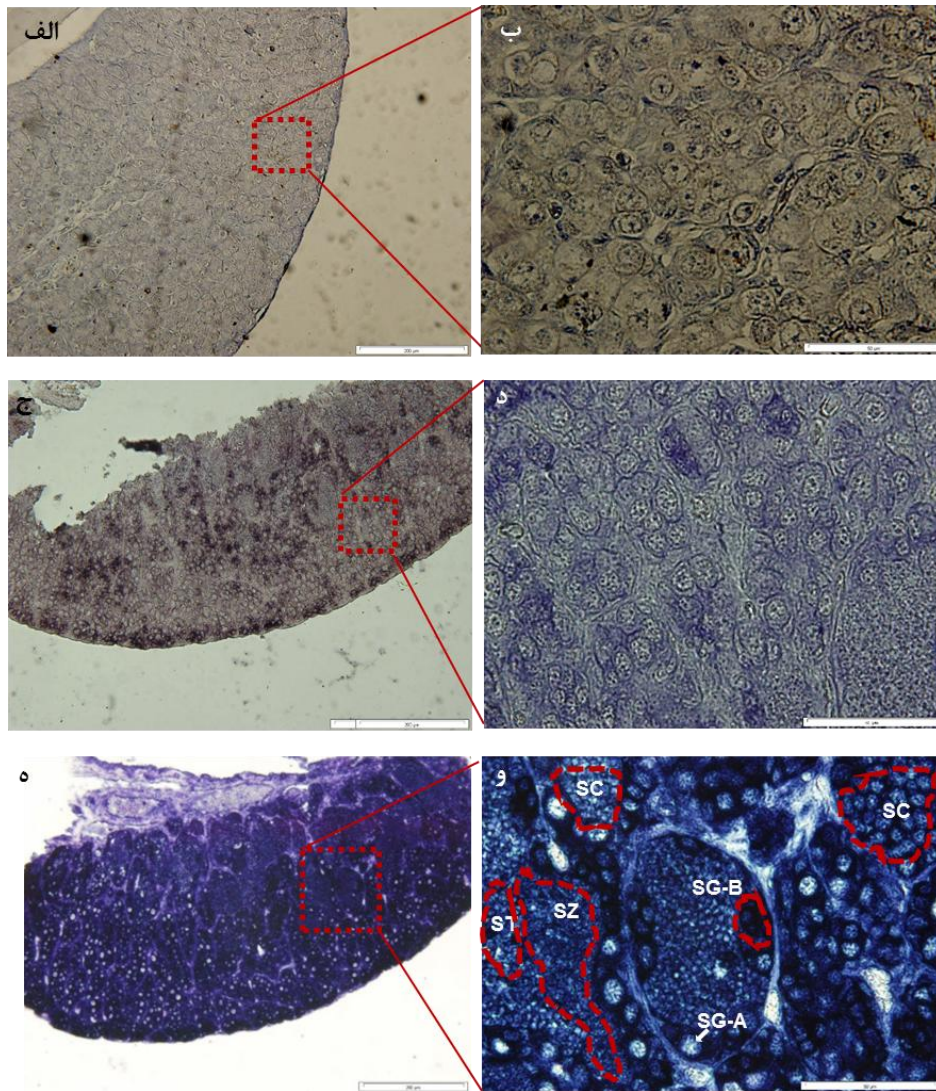
به منظور شناسایی این که رونوشت *Vasa* در کدام گروه از سلول‌ها زایا بیان شده است، مطالعه ISH روی مقاطع بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر انجام شد. نتایج حاصل از ISH نشان داد که در گروه شاهد منفی که به آن‌ها ریبوپروپ افزوده نشده بود هیچ گونه سیگنالی مشاهده نشد (شکل ۴- الف و ب). همچنین افزودن ریبوپروپ سنس نشاندار شده با دیگوکسی ژنین، بیانی را در سلول‌های زایا نشان

و رسوب‌دهی بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۲ نشان داده شده است. یک باند حدود ۱۸۰۰ جفت نوکلئوتید روی ژل مشاهده شد. قابل ذکر است نواحی اتصال آغازگرهای M13 در بالادست و پایین‌دست پروموتورهای SP6 و T7 قرار داشتند.

رونویسی محصول PCR از طریق تکنیک رونویسی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از آنزیم RNA T7 پلیمرز و RNA SP6 پلیمرز انجام شد. از آنجایی که پروموتور T7 در جهت توالی *Vasa* قرار گرفته بود با استفاده از آنزیم RNA T7 پلیمرز رشته سنس (مکمل) تولید شد در حالی که با به کارگیری آنزیم SP6 RNA پلیمرز رشته آنتی‌سنس (ضدمکمل) تولید شد (شکل ۳).



شکل ۲: تایید حضور cDNA ژن *Vasa* بعد از خطی شدن پلازمید pGEM-T/*Vasa* با آغازگرهای



شکل ۴: استفاده از تکنیک دورگه‌سازی در محل برای ارزیابی بیان رونوشت ژن *Vasa* در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر. الف و ب) عدم بیان رونوشت ژن *Vasa* در گروه شاهد. ج و د) عدم بیان رونوشت ژن *Vasa* در استفاده از پروب سنس نشاندار شده با دیگوکسی ژنین. ه و و) بیان رونوشت ژن *Vasa* در استفاده از پروب آنتی‌سنس نشاندار شده با دیگوکسی ژنین. SG-A: اسپرما توگونی نوع A، SG-B: اسپرما توگونی نوع B، SC: اسپرما توسیت، ST: اسپرما تید، SZ: اسپرما تو زو آ، بزرگنمایی تصاویر «الف، ج و ه» $\times 200$ ، و تصاویر «ب، د و و» $\times 100$. مقیاس تصاویر «الف، ج و ه» $200 \mu\text{m}$ میکرومتر و تصویر «ب، د و و» $50 \mu\text{m}$ میکرومتر.

زمانی- مکانی بیان ژن در سلول یا بافت فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر مکان‌یابی رونوشت *Vasa* در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از این تکنیک بررسی شد. *Vasa* یک پروتئین سیتوپلاسمی و محصول ژن *Vasa* است که به طور اختصاصی در سلول‌های زایا بیان می‌شود (Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000; Cao et al., 2012). مطالعات انجام شده توسط RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Vasa* بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور *Ctenopharyngodon idella*، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، ماهی آزاد اطلس (*Paralichthys olivaceus*) موید این امر است که ژن *Vasa* به طور اختصاصی در گناد بیان می‌شود (Yoshizaki et al., 2000; Li et al., 2010; Blazquez et al., 2011; Nagasawa et al., 2014; Wu et al., 2013). عملکرد دقیق این ژن هنوز مشخص نشده است اما عنوان می‌شود که در تشکیل سلول‌های زایا بدوی، مهاجرت این سلول‌ها به ستیغ تناسلی^۱ و تکوین آن‌ها نقش داشته باشد (Hay et al., 1988; Yoshizaki et al., 2005; Xu et al., 2005). بررسی ISH

نداد (شکل ۴- ج و د). درحالی که با افزودن ریبوپروب آنتی‌سنس به لام‌ها بیان ژن *Vasa* مشاهده شد (شکل ۴- ه و و). بیان ژن *Vasa* در سلول‌های زایا با تولید رنگ آبی قابل تشخیص و شدت رنگ آبی بیانگر شدت بیان ژن بود. این ژن در تمام سلول‌های زایا بیان داشت با این حال شدت بیان آن در سلول‌های زایای ابتدایی (سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B) به مراتب بیشتر از سلول‌هایی اسپرماتید و اسپرم بود (شکل ۴- د).

بحث

دورگه‌سازی در محل (ISH)، روشی دقیق برای تعیین موقعیت و ردیابی بیان رونوشت ژن‌ها در سلول‌ها و بافت‌ها است که کاربرد بسیار وسیعی در زمینه‌های مختلف از جمله سیتوژنتیک، جنین‌شناسی، پاتولوژی، بررسی بیان ژن‌ها و مطالعات تکوینی دارد (Looi and Cheah, 1992; Irving, 2009). در این روش یک mRNA آنتی‌سنس نشاندار به عنوان پروب با mRNA مکمل خود در بافت هدف هیبرید می‌شود (Lecuyer et al., 2008). بنابراین استفاده از این تکنیک درک بهتری را از الگوی

حالی که اسپرمتاید و اسپرم هیچ گونه سیگنالی نشان نداند (Xu et al., 2005). سیگنال ضعیف در سلول‌های اسپرمتاید و اسپرم حاکی از آن است که ژن *Vasa* در سلول‌های هاپلوئید بیان کمی دارد.

یکی از نکات مورد توجه برای تایید صحت نتایج به دست آمده از روش ISH استفاده از پروب سنس به عنوان شاهد در کنار پروب آنتی‌سنس است (Lee and Schedl, 2006). رعایت این امر به ویژه در مواردی حائز اهمیت است که میزان بیان رونوشت در بافت بسیار کم باشد که ضمن مقایسه با گروه سنس، می‌توان مدت زمان آشکارسازی و یا غلظت ریبوپروب را در گروه آنتی‌سنس تنظیم کرد. به طور کلی در مقایسه با گروه آنتی‌سنس، هیچ سیگنالی در استفاده از پروب سنس مشاهده نمی‌شود و یا این که سیگنال ضعیفی ایجاد می‌شود. در مطالعه حاضر سیگنال بسیار ضعیفی در گروه سنس ایجاد شد. از این رو، می‌توان از اختصاصی بودن سیگنال مشاهده شده در گروه آنتی‌سنس اطمینان حاصل کرد.

قابل ذکر است که یکی از مشکلات استفاده از ریبوپروب‌ها اتصالات غیراختصاصی آن‌ها به اجزای بافت است که منجر به تشکیل پس‌زمینه می‌شود بنابراین تیمار پیش و پس از دورگه‌سازی

در مطالعه حاضر نشان داد که رونوشت *Vasa* در سلول‌های زایای بافت بیضه ماهی آزاد نیز بیان می‌شود. بیان ژن *Vasa* در سلول‌های زایای بافت بیضه با تولید رنگ آبی قابل تشخیص بود که نشان دهنده اتصال ریبوپروب نشاندار شده با دیگوکسی ژنین به رونوشت این ژن در سلول‌های بافت بیضه است. این نتیجه با مطالعه ISH انجام شده بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، کاراس طلائی (*Carassius auratus gibelio*) و هامور مخطط (*Epinephelus fuscoguttatus*) مطابقت دارد (Yoshizaki et al., 2000; Xu et al., 2005; Boonanuntasarn et al., 2016). مطالعه ISH حاضر نشان داد که رونوشت *Vasa* در سلول‌های اسپرماتوگونی بیان بیشتری داشت. در حالی که بیان در سلول‌های اسپرمتاید و اسپرم به شدت کاهش یافت. Boonanuntasarn و همکاران (۲۰۱۶) با مطالعه ISH بر روی هامور مخطط نیز بیان کردند که بیشترین سیگنال در اسپرماتوگونی‌ها مشاهده شد و میزان بیان در اسپرماتوزا به شدت کاهش یافت. مطالعه دیگر بر روی کاراس طلائی نشان داد که شدت سیگنال دورگه‌سازی از اسپرماتوسیت اولیه تا اسپرماتوزا یک روند نزولی داشت. به طوری که بیشترین سیگنال در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه مشاهده شد در

ماهیان بالغ قابل بررسی شود و همچنین پژوهشگران قادر خواهند بود اثر افزایشی و یا حذف ژن‌های دیگر را در میزان و نحوه بیان ژن مذکور مورد مطالعه قرار دهند. از این رو، این یافته می‌تواند کمک شایانی در بررسی چگونگی تشکیل سلول‌های زایا و تکوین آن‌ها در این گونه ارزشمند دریای خزر داشته باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود با توجه به پیشرفت سریع علم بیوتکنولوژی و ابداع روش‌های نوین مانند qRT-PCR و NGS^۱، تکنیک‌های مورد اشاره در بررسی ژن‌های نشانگر مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و دانشگاه تربیت مدرس در قالب طرح تحقیقاتی مصوب انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر را به عمل می‌آورند. نویسندگان همچنین مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانم پروفسور Le Gac به خاطر همکاری‌های علمی ابراز می‌کنند.

مانند انکوبه کردن با بافر دورگه‌سازی و RNase برای کاهش این عوامل الزامی است (Looi and Cheah, 1992; Kumar, 2010; Draper, 2017). همچنین ممکن است mRNA مورد نظر در سلول یا بافت غلظت پایینی داشته باشد و یا در زمان تشبیت در اثر ارتباط با پروتئین‌ها مخفی شده باشد، از این رو برای به دست آوردن بالاترین سطح وضوح باید به نفوذپذیر کردن سلول، نوع پروب و غلظت مناسب آن، دما و مدت زمان انکوباسیون و روش نشاندار کردن آن توجه داشت (Looi and Cheah, 1992; Lee and Schedl, 2006; Draper, 2017).

به طور کلی نتایج مطالعه ISH با استفاده از ریبوپروب *Vasa* ماهی آزاد دریای خزر نشان داد که ژن *Vasa* به عنوان نشانگر اختصاصی برای سلول‌های زایا در این ماهی و شیوه دورگه‌سازی در محل به عنوان یک عامل کاوشگر به منظور بررسی مکان و شدت بیان رونوشت ژن‌ها با حفظ ظاهر سلول‌ها در بافت بیضه ماهی آزاد قابل معرفی است. بنابراین استفاده از این روش این امکان را فراهم می‌کند که اثر عوامل بیرونی و درونی بر روی بیان این ژن در مرحله جنینی و

منابع

- گورخری (*Danio rerio*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۳(۱): ۹۳-۱۱۱.
- Blazquez M., Gonzalez A., Mylonas C.C. and Piferrer F. 2011.** Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2): 322-333.
- Boonanuntasarn S., Bunlipatanon P., Ichida K., Yoohat K., Mengyu O., Detsathit S., Yazawa R. and Yoshizaki G. 2016.** Characterization of a vasa homolog in the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) and its expression in gonad and germ cells during larval development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(6): 1621-1636.
- Cao M., Yang Y., Xu H., Duan J., Cheng N., Wang J., Hu W. and Zhao H. 2012.** Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 162(3): 163-170.
- Draper B.W. 2017.** Identification of germ-line stem cells in zebrafish. P: 103-113. In: Buszczak M. (Ed.).
- اسماعیلی ا.ح.، کلباسی م.ر.، بهاروند ح.، حسنی س.ن. ۱۳۹۴. مطالعه بیان ژنهای پرتوانی در مراحل مختلف تکوین جنینی ماهی
- Methods in Molecular Biology*. Springer Science-Business Media, USA.
- Hajirezaee S., Mojazi Amiri B., Mehrpoosh M., Jafaryan H., Mirrasuli E. and Golpour A. 2012.** Gonadal development and associated changes in gonadosomatic index and sex steroids during the reproductive cycle of cultured male and female Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Journal of Applied Animal Research*, 40(2): 154-162.
- Hay B., Jan L.Y. and Jan Y.N. 1988.** A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicase. *Cell*, 55(4): 577-587.
- Higuchi K., Takeuchi Y., Miwa M., Yamamoto Y., Tsunemoto K. and Yoshizaki G. 2011.** Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fisheries Science*, 77(1): 69-77.
- Irving C. 2009.** In-situ hybridization and immunohistochemistry in

- whole embryos. P: 687–695. In: Sharpe P. and Mason I. (Eds.). *Molecular Embryology: Methods and Protocols*. Humana Press Inc., USA.
- Jalali M.A. and Mojazi Amiri B. 2009.** Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: Salmonidae). *Environmental Biology of Fishes*, 86(3): 375–376.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E. and Salari-Joo H. 2012.** A review on aquaculture development in Iran. *Journal of Ecopersia*, 1(2): 159–178.
- Kumar A. 2010.** In situ hybridization. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1(2): 418–430.
- Lecuyer E., Parthasarathy N. and Krause H.M. 2008.** Fluorescent in situ hybridization protocols in drosophila embryos and tissues. P: 289–302. In: Dahmann C. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., USA.
- Lee M.H. and Schedl T. 2006.** RNA *in situ* hybridization of dissected gonads. P: 1–7. In: Hobert O. (Ed.). *Worm Book*. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Li C.J., Liu L., Chen X.H., Zhang T., Gan F. and Cheng B.L. 2010.** Identification of a vasa homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 157(2): 159–166.
- Looi L.M. and Cheah P.L. 1992.** In situ hybridisation: Principles and applications. *The Malaysian Journal of Pathology*, 14(2): 69–76.
- Nagasawa K., Fernandes J., Yoshizaki G., Miwa M. and Babiak I. 2013.** Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of vasa, dead end, and lymphocyte antigen 75 genes. *Molecular Reproduction and Development*, 80(2): 118–131.
- Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y. and Yoshizaki G. 2007.** Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317(5844): 1517–1517.
- Raap A.K., Rijke F.M.V. and Dirks R.W. 1994.** mRNA in situ hybridization to in vitro cultured cells. P: 293–300. In: Pollard J.W. and Walker J.M. (Eds.). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc, USA.
- Shinomiya A., Tanaka M., Kobayashi T., Nagahama Y. and Hamaguchi S. 2000.** The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth and Differentiation*, 42(4): 317–326.

- Wu X., Wang Z., Jiang J., Gao J., Wang J., Zhou X. and Zhang Q. 2014.** Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 167: 41–50.
- Wunderlich Z., Bragdon M.D. and DePace A.H. 2014.** Comparing mRNA levels using in situ hybridization of a target gene and co-stain. *Methods*, 68(1): 233–241.
- Xu H., Gui J. and Hong Y. 2005.** Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics*, 233(3): 872–882.
- Yano A., Suzuki K. and Yoshizaki G. 2008.** Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biology of Reproduction*, 78(1): 151–158.
- Yoon C., Kawakami K. and Hopkins N. 1997.** Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 124(16): 3157–3166.
- Yoshizaki G., Sakatani S., Tominaga H. and Takeuchi T. 2000.** Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Molecular Reproduction and Development*, 55(4): 364–371.



Research Paper

Localization of *Vasa* mRNA in testicular tissue of Caspian trout (*Salmo caspius*) using *in situ* hybridization

Samaneh Poursaeid¹, Mohammad Reza Kalbassi^{2*}, Seyedeh Nafiseh Hassani³,
Goro Yoshizaki⁴, Hossein Baharvand⁵

Received: August 2017

Accepted: October 2017

Abstract

In situ hybridization is a powerful tool to localize a specific sequence of nucleic acids in heterogeneous cell population. Therefore, the aim of this study was to apply this technique for localization of *Vasa* mRNA expression in testicular tissue of Caspian trout (*Salmo caspius*). In this study, a digoxigenin-labeled RNA probe was synthesized using the plasmid pGEM-T carrying a Caspian trout *Vasa* cDNA fragment as a template. The RNA labeling was performed through in vitro transcription reaction with DIG labeling mix. For in situ hybridization of tissue sections, Caspian trout testes were fixed and dehydrated. After rehydration and treatment with proteinase K, sections were incubated with hybridization buffer containing *Vasa* antisense riboprobe for 16h. After washing with SSC solution and incubation with anti-Dig-digoxigenin Antibody, the sections were treated with NBT/BCIP. The results of in situ hybridization using a *Vasa* antisense riboprobe showed that all developmental stages of male germ cells (spermatogonial stem cells to spermatozoa) expressed this gene, but the expression level was different among germ cells. Therefore, *Vasa* gene is introduced as a specific marker to identify germ cells and in situ hybridization can be used as a technique to evaluate the localization and expression level of gene mRNA in testicular tissue. These findings may provide important information to help understand the formation and development of germ cells in this valuable species of Caspian Sea.

Key words: *Germ Cells, In Situ Hybridization, Vasa, Salmo caspius.*

1- PhD in Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

4- Professor in Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.

5- Professor in Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir

