

بررسی جایگاه کروموزومی *HindIII* Satellite DNA در تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* و تاس‌ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* با شیوه دو رگه‌گیری فلورسان درجا (FISH)

محمدرضا نوروزفشخامی^{۱*}، بهرام کاظمی^۲، لیلا عزیززاده پرمهر^۳، حامد وزیری نسب^۴،
محمد پور کاظمی^۵، مهتاب یارمحمدی^۱، محمد حسن زاده صابر^۶

تاریخ دریافت: تیر ۹۶

تاریخ پذیرش: آذر ۹۶

چکیده

در این پژوهش یک DNA ماهواره‌ای (۱۶۸bp) از خانواده *HindIII* Satellite DNA، از تاس‌ماهی روسی جدا و به عنوان پروب برای انجام دو رگه‌گیری فلورسان درجا (FISH) با کروموزوم‌های تاس‌ماهی ایرانی و تاس‌ماهی روسی استفاده شد. پس از تهیه گسترش‌های کروموزومی مناسب با روش کشت لکوسیت‌های خون و نشاندار کردن پروب با رنگ Spectrum Orange (Orange-dUTP) به روش Nick Translation، دو رگه‌گیری پروب با کروموزوم‌ها بر روی لام انجام شد. در گسترش‌های کروموزومی بررسی شده نقاط دو رگه (نقاط رنگی) به وضوح قابل رویت بود. با شمارش نقاط رنگی تولید شده در ۱۲ گسترش کروموزومی متعلق به سه عدد ماهی از هر گونه، میانگین تعداد نقاط رنگی موجود در گسترش‌های کروموزومی تاس‌ماهی ایرانی و تاس‌ماهی روسی به ترتیب 67 ± 3 و 68 ± 4 تعیین شد. در مطالعه حاضر تعیین دقیق نوع کروموزوم‌ها و محل قرارگرفتن *HindIII* SatDNA بر روی کروموزوم‌ها احتمالاً به علت وجود میکروکروموزوم‌ها و ناهمگن بودن شکل و اندازه نقاط رنگی تولید شده، غیرممکن بود.

واژگان کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، تاس‌ماهی روسی، *HindIII* SatDNA، FISH

- ۱- استادیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
- ۲- استاد گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
- ۵- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تهران، ایران.
- ۶- مربی موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: Nowruzfashkhami@yahoo.com

مقدمه

آسان تر از توالی‌های تک‌نسخه‌ای قابل رؤیت هستند (Philips and Reed, 1996). از کاربردهای این تکنیک در ماهیان می‌توان پی‌بردن به وجود ژن‌های ریبوزومی^۳ (Fontana et al., 1999; Tagliavini et al., 1999; Chicca et al., 2002) و ژن‌های چند نسخه‌ای مربوط به هیستون‌های چند گونه از ماهیان اشاره کرد (De La Herran et al., 2001; Robles et al., 2004) که اطلاعات جدیدی را درباره تکامل آن‌ها فراهم کرد.

شناسایی و مکان‌یابی توالی‌های خاص از جمله DNA ماهواره‌ای (SatDNA) بر روی کروموزوم‌های متافازی تعدادی از ماهیان (Garrido-Ramos et al., 1997; Lanfredi et al., 2001; Chicca et al., 2002) نیز از دیگر کاربردهای روش مذکور است. توالی‌های تکراری از سانترومرها، تلومرها (Chicca et al., 2002; Fontana et al., 2004; Fontana et al., 2008) و کروموزوم‌های جنسی گونه‌های مختلف ماهیان جدا شدند و از برخی از آن‌ها به عنوان پروب‌های کروموزومی، گونه‌ای و جنسی در ماهیان استفاده شد (Philips and Reed, 1996). پروب‌های تلومری و سانترومری برای

استفاده از مواد فلئورسنت، آنزیم‌های اختصاصی و دستگاه ترموسایکلر (PCR) امکان تکثیر و نشاندار کردن توالی‌های مختلف نوکلئوتیدی با مواد فلئورسنت را مهیا ساخت و منجر به پیدایش روش دو رگه‌گیری درجا فلورسان (FISH) شد. استفاده از میکروسکوپ‌های ویژه نیز امکان مشاهده توالی‌های نوکلئوتیدی نشاندار شده با مواد فلئورسنت (پروپ) را بر روی کروموزوم‌های متافازی و سلول‌های اینترفازی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) فراهم کرد (et Leitch al., 1994). تکنیک FISH به بشر اجازه داد تا بتواند یافته‌های مولکولی خود را درباره DNA و کروموزوم‌ها با هم تلفیق کند. به عبارتی دیگر، باعث تلفیق دانستنی‌های ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک و به وجود آمدن سیتوژنتیک مولکولی شد. با استفاده از تکنیک FISH می‌توان جایگاه و فراوانی یک توالی ویژه را بر روی DNA یا RNA مشخص کرد که این امر به نوبه خود می‌تواند برای بررسی وجود یا عدم وجود ژن مورد نظر در یک سلول کاربرد داشته باشد. با استفاده از این روش، توالی‌های تکراری

3- rDNAs
4- Satellite DNA

1- Polymerase Chain Reaction
2- Fluorescent In Situ Hybridization

روسی، تعیین تعداد و مکان این توالی بر روی کروموزوم‌های ماهیان مذکور و مقایسه آن‌ها با هم، انجام شد تا علاوه بر کاربردی کردن روش FISH برای پژوهش‌های آبزیان کشور، امکان اثبات استقلال گونه‌ای تاس‌ماهی ایرانی از تاس‌ماهی روسی با استفاده از این روش و توالی مذکور نیز بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی *HindIII* SatDNA از ژنوم (تهیه پروب)

به منظور جداسازی *HindIII* SatDNA از ژنوم تاس‌ماهی روسی، آغازگرها با توجه به توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاس‌ماهی روسی که در NCBI با کد AJ286592 به ثبت رسیده بود، با استفاده از برنامه Oligo 5 طراحی شدند و توسط شرکت فرایند دانش آراین با توالی رفت (F): 5'-CTTTTTCAAACCTTTCGGGGC-3' و توالی برگشت (R): 5'-CTTACAGATTTCGTTCTGTC-3' ساخته شدند. سپس DNA ژنومی از باله دمی

بررسی نو ترکیبی‌های کروموزومی بین‌گونه‌ای نیز استفاده شده‌اند. این پروب‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای ژنومی برای شناسایی والدین دو رگه‌های حاصل از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای نیز مورد استفاده قرار گیرند (Fontana, 2002).

با وجود این که در حال حاضر تاس‌ماهی ایرانی توسط CITES به عنوان یک گونه مستقل در نظر گرفته شده است اما بنا به نظر بسیاری از پژوهشگران تاس‌ماهی ایرانی زیرگونه تاس‌ماهی روسی است (Birstein and DeSalle, 1998; Birstein et al., 2000; Birstein and Doukakis, 2001; Muge et al., 2008; Ruban et al., 2008). نظر به این که انجام پژوهش‌های گوناگون برای اثبات استقلال گونه‌ای تاس‌ماهی ایرانی می‌تواند تلاش مثبتی در این ارتباط باشد و با توجه به کاربردهای مختلف روش FISH در زمینه‌های مختلف پژوهش آبزیان، این مطالعه به منظور بررسی وجود یک قطعه DNA ماهواره‌ای به نام *HindIII* SatelliteDNA، خاص جنس *Acipenser* (Fontana, 2002)، بر روی کروموزوم‌های تاس‌ماهی ایرانی و تاس‌ماهی

2- National Center for Biotechnology Information
3- Forward
4- Reverse

1- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

۲٪ و رنگ آمیزی ژل به دست آمده با اتیدیوم برومید بررسی شد. پس از اطمینان از تولید محصول PCR و مشاهده باند اختصاصی *HindIII* SatDNA بر روی ژل آگارز، با توجه به این که به منظور تثبیت توالی به دست آمده، کلونینگ آن لازم بود، از این رو قطعه DNA موجود در ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen, Cat. No. 28704) DNA QIAquick Gel Extraction Kit (آلمان) از آن استخراج شد. پس از آن، اتصال قطعه SatDNA جدا شده به پلاسمید PTZ57R/T با استفاده از کیت InsTAclone PCR Cloning Kit (Cat. No. K1213)، Fermentas (آمریکا) و طبق دستور عمل کیت مذکور انجام شد. سپس به منظور ازدیاد پلاسمید نو ترکیب تولید شده، پلاسمید مذکور با استفاده از کیت InsTAclone TM (Cat. No. K 1213، Fermentas، آمریکا) و طبق روش کار ذکر شده در کیت، درون باکتری *E. coli* (سویه DH5 α) جای داده شد (ترانسفورماسیون). سپس غربالگری باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب با استفاده از محیط کشت آگار حاوی Xgal-IPTG انجام

تاس ماهی روسی به روش فنل- کلروفرم (Hillis and Moritz, 1990) تعدیل شده برای تاس ماهیان (Pourkazemi, 1996) استخراج شد و توالی *HindIII* SatDNA با استفاده از آغازگرهای تهیه شده به روش PCR تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵U/ μ L)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم) و آب مقطر، با حجم نهایی ۵۰ μ L بود. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی^۱ اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، متعاقب آن ۳۰ مرحله واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال^۲ آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط^۳ DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود و یک مرحله بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

3- Extension
4- Transformation

1- Denaturation
2- Ligation

SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی روسی با استفاده از کیت Nick Translation (Vysis, Cat. No. 32-801300، آمریکا) با رنگ (Orange-dUTP) Spectrum Orange به روش Nick Translation و طبق دستورالعمل ذکر شده در کیت مذکور نشاندار شد. سپس به پروب نشاندار شده مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول دو رگه گیری حاوی فراماید ۷۰٪ حل شده در SSC (۲x) با pH ۷/۵ اضافه شد.

تهیه گسترش کروموزومی

گسترش‌های کروموزومی تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مورد آزمایش با روش کشت لکوسیت (Nowruzfashkhami et al, 2000) تهیه شد. برای افزایش میزان تقسیمات سلولی لکوسیت‌های کشت داده شده، ماده فیتوهاگلوتینین^۲ (PHA) به عنوان ماده میتوزن^۳ (محرك تقسیمات میتوزی) به محیط کشت اضافه شد. در این پژوهش از ۰/۳ میلی لیتر فیتوهاگلوتینین نوع M (Gibco، بریتانیا) استفاده شد. لام‌های گسترش کروموزومی تهیه شده با استفاده از

گرفت و کلنی‌های سفید رنگ انتخاب شدند. از باکتری‌های سفید رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب، استخراج پلاسمید، برش پلاسمید نوترکیب ساخته شده با آنزیم *HindIII*، سپس PCR و الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ انجام شد. پس از مشاهده باند تقریباً ۱۷۰ bp در ژل، کشت انبوه باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین انجام گرفت و پلاسمید با استفاده از کیت QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN، آلمان) استخراج و تعیین توالی شد. مقایسه توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی روسی در مطالعه حاضر، با توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی روسی (De La Herran et al., 2001) و *HindIII* SatDNA جدا شده از تاس ماهی ایرانی (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۳۹۳) نیز با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Mega4 انجام شد.

نشاندار کردن پروب

3- Mitogen
4- PHA-M

1- Saline Sodium Citrate
2- Phytohaemagglutinin

میکروسکوپ فازکنتراست (Nikon، ژاپن) بررسی شدند و محل گسترش‌های کروموزومی مناسب بر روی لام‌ها علامت‌گذاری شد.

دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با کروموزوم‌های موجود بر روی لام

برای دو رگه‌گیری مناسب پروب نشاندار شده با کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش و اجتناب از دو رگه‌گیری ناخواسته پروب با مواد پروتئینی که ممکن است به طور اتفاقی در روی لام وجود داشته باشد، لام‌های علامت‌گذاری شده ابتدا به مدت ۵ دقیقه در تریپسین ۰/۰۵ درصد (حل شده در اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال) ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به ترتیب به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS ۱۰^x (۲x، ۷ pH) ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دوباره به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS قرار داده شدند. بعد از این مرحله لام‌ها با قرار گرفتن در اتانول ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد هر یک به مدت ۲ دقیقه در دمای آزمایشگاه آب‌گیری شدند. پس از خشک شدن لام‌ها، ۱۰ میکرولیتر محلول دو رگه‌گیری حاوی پروب نشاندار شده بر روی نقاط از پیش تعیین شده بر روی لام ریخته شد، سپس یک لامل با

۲۲×۲۲mm^۲ بر روی آن قرار داده شد و به منظور جلوگیری از تبخیر محلول دو رگه‌گیری حاوی پروب، دور تا دور لامل با چسب مایع مسدود شد. پس از آن لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پروب و کروموزوم‌ها واسرشته‌سازی شوند. سپس لام‌های مذکور تا صبح روز بعد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با کروموزوم‌ها انجام شود. پس از گذشت ۱۶ ساعت، صبح روز بعد چسب دور لامل پاک شد، لامل از روی لام برداشته شد و لام به مدت ۲ دقیقه در SSC (۰/۴x) ۷۳ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه نیز در مخلوط SSC (۲x) و Tween 20 (۰/۰۵) درصد در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از خشک شدن لام‌ها، برای قابل رویت شدن پروب‌های دو رگه‌گیری شده با کروموزوم‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ DAPI^۲ و ماده تثبیت‌کننده رنگ مذکور بر روی لام ریخته شد. لام‌ها پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنس (Cytovision Nikon، Eclips 800، ژاپن) مجهز به فیلترهای مناسب، بررسی و نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با

2- 4,6-Diamino-2-Phenylindole

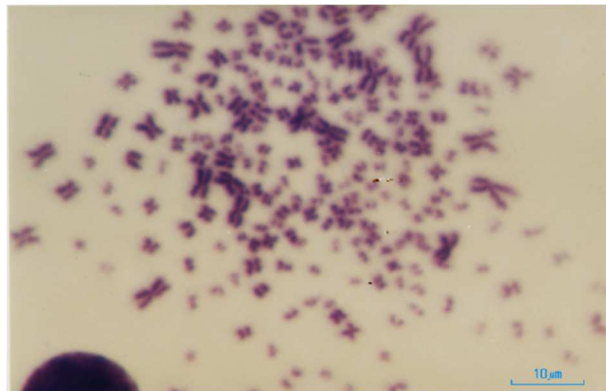
1- Phosphate Buffered Salt solution

کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش در گسترش‌های کروموزومی متعلق به هر یک از ماهیان مورد آزمایش، بررسی شدند.

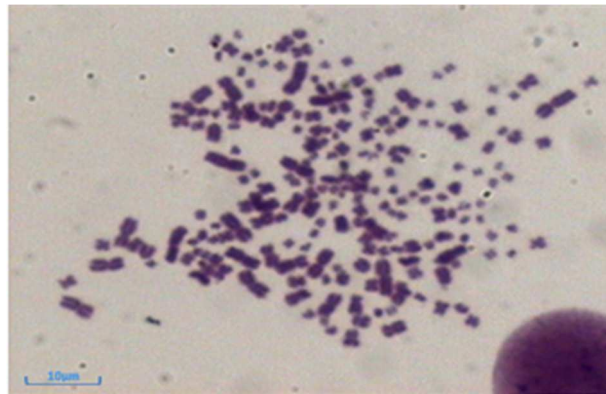
نتایج

در لام‌های گسترش کروموزومی تهیه شده از تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تعداد زیادی کروموزوم مشاهده شد که کیفیت آن‌ها در گسترش‌های کروموزومی تهیه شده برای

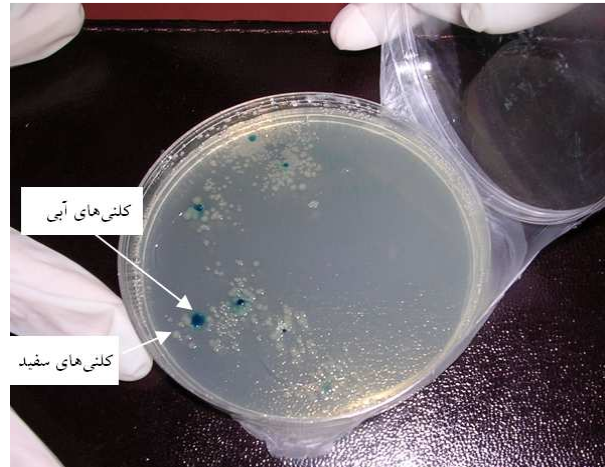
انجام آزمایش‌های FISH مناسب بود (شکل‌های ۱ و ۲). DNA استخراج شده از ماهیان مورد آزمایش نیز دارای کیفیت مناسب بود. همچنین پس از بررسی پلیت‌ها و ژل‌های حاصل از PCR، نتایج حاکی از انجام کلونینگ مثبت SatDNA مذکور در بیشتر کلنی‌ها بود (شکل‌های ۳ و ۴).



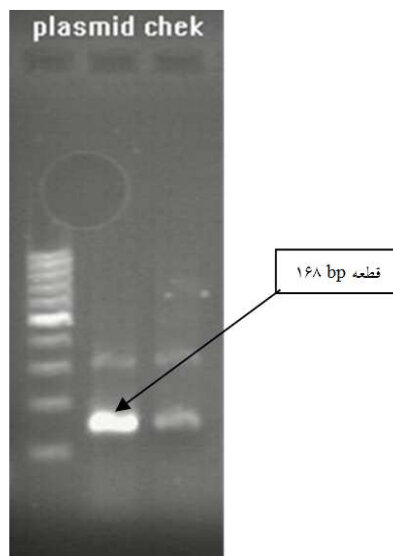
شکل ۱: گسترش کروموزومی تاس ماهی روسی



شکل ۲: گسترش کروموزومی تاس ماهی ایرانی



شکل ۳: باکتری های تکثیر شده بر روی محیط کشت (نقاط آبی نمایانگر باکتری های فاقد قطعه ۱۶۸bp و نقاط سفید نمایانگر باکتری حاوی قطعه مذکور است).



شکل ۴: الکتروفورز محصول PCR مربوط به پلاسمید نو ترکیب حاوی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاس ماهی روسی بر روی ژل آگارز ۲٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

SatDNA به دست آمده از ژنوم تاس ماهی روسی در این مطالعه (پروپ) دارای ۱۶۸ جفت باز (۱۶۸bp) بود (جدول ۱). مقایسه توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی روسی در مطالعه حاضر (A.g₂)، با توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی ایرانی (A.p) (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۹۹۳) دارای ۸۱٪ تشابه بود (جدول ۳).
 Herran و همکارانش (۲۰۰۱) دارای ۸۸٪ تشابه بود (جدول ۲). *SatDNA* استخراج شده از تاس ماهی روسی در مطالعه حاضر (A.g₂) با توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از تاس ماهی ایرانی (A.p) (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۹۹۳) دارای ۸۱٪ تشابه بود (جدول ۳).
 ژنوم تاس ماهی روسی (A.g₁) توسط De La

جدول ۱: توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاس ماهی روسی

CTTACCGATT	CGGTCCTGTC	AAGAAAACAC	ATTTTTTTGA	TCTCAGAACT
۱	CCAAATTTTA			
۶۱	GCTTCCCCTT	TTTTTGAAAA	AGGGGGCTGG	TCGGGTCCTG
۱۲۱	AATAATTTTG			
	GCCAATTTTA	TTTTTTCGGA	ACTTCAATGC	CCCCAGCTTT
				TGAAAAAG

جدول ۲: مقایسه توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاس ماهی روسی در مطالعه حاضر (A.g₂) با توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاس ماهی روسی توسط De La Herran و همکاران (۲۰۰۱) (A.g₁)

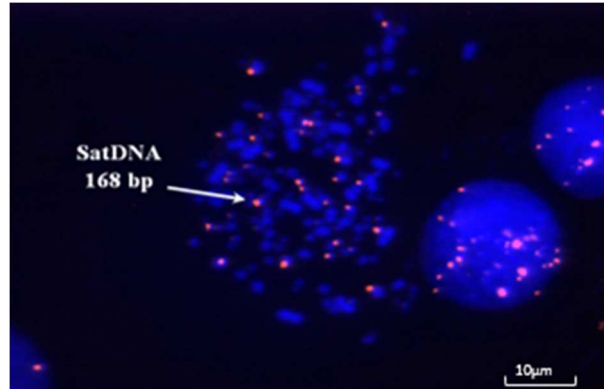
A.g ₁	1	CTTTTTCAAAGCTCGGGGCATTGAAATTATGAAAAAATAAAATGGCCAAAATTATTAT	60
A.g ₂	168	CTTTTTCAAAGCTCGGGGCATTGAAAGTCCGAAAAAATAAAATGGCCAAAATTATTAT	109
A.g ₁	61	TTTTT-GACAGGACCGGACCAGACCA-TTTTTCAAAAAGGGGGATGTCTAAATTTTGGT	118
A.g ₂	108	TTTTTTGTCAGGACCCGACCAGCCCCCTTTTTCAAAAAGGGGAAG-CTAAAATTTGG-	51
A.g ₁	119	AGTTCTGAAGATCAAAAATGTGTTTCTTGACAGGAACGAACCTGTAAG	169
A.g ₂	50	AGTTCTGA-GATCAAAAATGTGTTTCTTGACAGGACCGAATCGGTAAG	1

جدول ۳: مقایسه توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از ژنوم تاس ماهی روسی در مطالعه حاضر (A.g₂) و تاس ماهی ایرانی توسط نوروزفشخامی و همکاران (۱۹۹۳) (A.p)

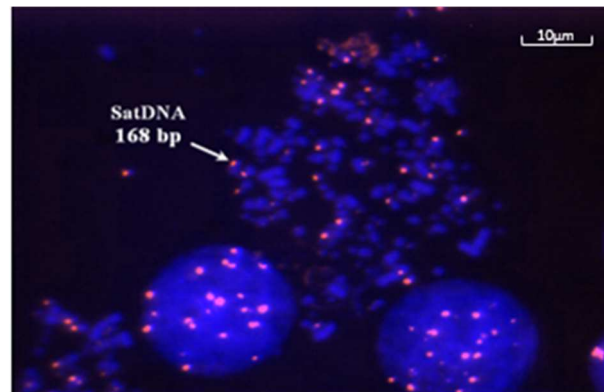
A.g ₂	1	AAAAGCTCGGGGCATTGAAATTAGAAATTAGGAAAAATAAAATTTCTCCAAAATT-TAAT	59
A.p	161	AAAAGCTGGGGGCATTGAAGTTCC-----GAAAAATAAAATTGGCCAAAATTATAT	109
A.g ₂	60	ttttttGACAGGACCGGACCCGTCCTTTTCAAAAAGGGGGATGTCTAAATTTGGGGA	119
A.p	108	TTTTTTTGCAGGACCGACCCAGCCCTTTTCAAAAAGGGGAAG-CTAAAATTTGGA	50
A.g ₂	120	GTTTCGGAAGACCAAAAAATTTGTGTTTTCTTGACAGGAACGAA	161
A.p	49	GTTCTG-AGATCAAAAAATGTGTTTTCTTGACAGGACCGAA	9

۱۲ عدد گسترش کروموزومی متعلق به ۳ قطعه تاس ماهی روسی، میانگین تعداد نقاط رنگی شمارش شده 4 ± 68 عدد بود. بیشتر نقاط رنگی بر روی کروموزومهای متوسط و کوچک وجود داشتند و در تعدادی از کروموزومها دو نقطه رنگی مشاهده شد. اگرچه تعیین دقیق تعداد و محل قرار گرفتن نقاط رنگی بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش امکانپذیر نبود، اما اغلب نقاط مذکور بین سانترومر و تلومر کروموزومها وجود داشت.

بررسی لامها با میکروسکوپ فلئورسنس حاکی از وجود نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری *HindIII* SatDNA مذکور با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش بود (شکل‌های ۵ و ۶). در نتیجه شمارش تعداد نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با کروموزومها در ۱۲ عدد گسترش کروموزومی متعلق به ۳ قطعه تاس ماهی ایرانی، میانگین تعداد نقاط رنگی شمارش شده 3 ± 67 عدد بود. همچنین در نتیجه شمارش تعداد نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با کروموزومها در



شکل ۵: نقاط صورتی رنگ نمایانگر *HindIII* SatDNA هیبرید شده با کروموزوم‌های تاس ماهی روسی هستند.



شکل ۶: نقاط صورتی رنگ نمایانگر *HindIII* SatDNA هیبرید شده با کروموزوم‌های تاس ماهی ایرانی هستند.

بحث

مذکور در محیط کشت، موثرترین مقدار برای موفقیت آمیز بودن کشت لکوسیت‌های ماهیان مورد آزمایش بود. Van Eenennaam و همکاران (۱۹۹۸) استفاده از ۲۰۰ μg/mL ماده PHA-W را برای کشت لکوسیت‌های تاس ماهی

طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه ماده PHA-M دارای اثر میتوزنی مناسبی بر لکوسیت‌های کشت داده شده ماهیان مورد آزمایش بود. همچنین استفاده از ۰/۴ mL ماده

سفید *Acipenser transmontanus* توصیه کردند. نوروزفشخامی و خسروشاهی (۱۳۷۴) استفاده از $10 \mu\text{g/mL}$ ماده PHA-P را برای کشت لکوسیت‌های فیل‌ماهی *Huso huso* و ماهی ازون‌برون *Acipenser stellatus* و همچنین Nowruzfashkhami و همکاران (۲۰۰۰) استفاده همین مقدار از ماده مذکور را برای کشت لکوسیت‌های تاس‌ماهی ایرانی توصیه کردند. Fujiwara و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند. استفاده از $18 \mu\text{g/mL}$ ماده PHA-W یا $1/5 \mu\text{g/mL}$ ماده PHA-P در محیط کشت، باعث القای بیشترین تقسیمات میتوزی در لکوسیت‌های کشت داده شده تاس‌ماهی و ماهی بسترا^۱ می‌شود. Nowruzfashkhami و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند استفاده از $40 \mu\text{g/mL}$ ماده PHA-P در محیط کشت بیشترین شاخص میتوزی را در لکوسیت‌های کشت داده شده ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* در پی داشت. پروب استفاده شده در این مطالعه، یک DNA ماهواره‌ای با ۱۶۸ جفت باز (۱۶۸bp) بود که از ژنوم تاس‌ماهیان روسی مورد آزمایش، استخراج شد. این DNA ماهواره‌ای اولین بار

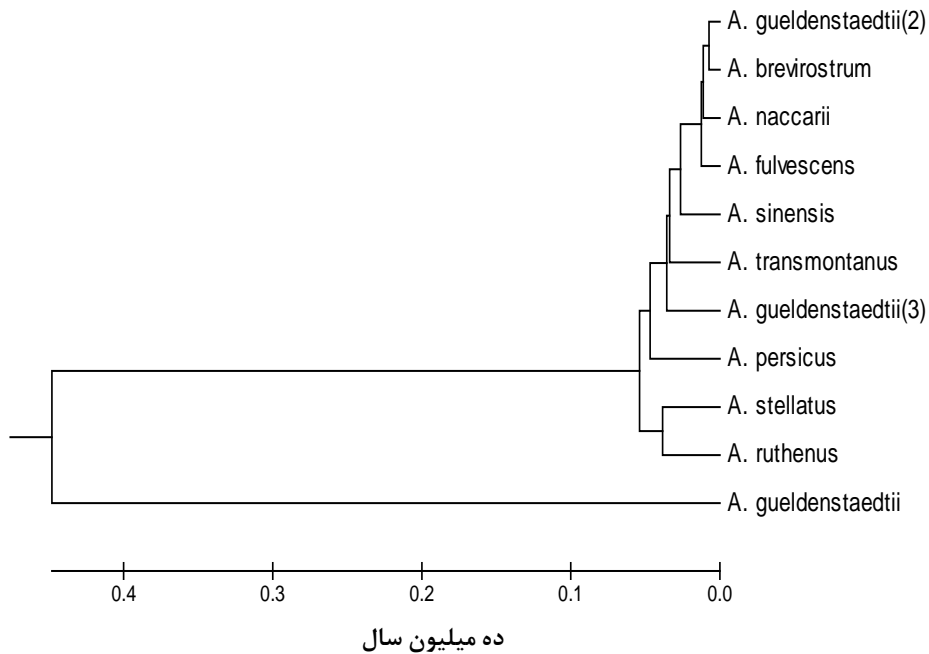
توسط Garrido-Ramos و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از آنزیم *HindIII* از ژنوم تاس‌ماهی آدریاتیک *Acipenser naccarii* جدا شد که دارای ۱۷۰ جفت باز (۱۷۰bp) بود. این توالی بعدها از ژنوم تعدادی از گونه‌های جنس *Acipenser* از جمله ماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus*، تاس‌ماهی سیبری *Acipenser baerii*، تاس‌ماهی روسی و تاس‌ماهی سفید (De La Herran et al., 2001)، ماهی ازون‌برون، تاس‌ماهی چینی *Acipenser sinensis*، تاس‌ماهی پوزه کوتاه *Acipenser brevirostrum* و تاس‌ماهی دریاچه‌ای *Acipenser fulvescens* (Robles et al., 2004) نیز جدا شد.

توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاس‌ماهی روسی توسط De La Herran و همکاران (۲۰۰۱) 169 bp ، 170 bp و 171 bp گزارش شد. مقایسه توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاس‌ماهی روسی در مطالعه حاضر با توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاس‌ماهی ایرانی (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۳۹۳) و تاس‌ماهی روسی (De La

1- Bester: *Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂

مطالعه حاضر، میانگین تعداد نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب نشاندار شده با کروموزوم ها 68 ± 4 عدد تعیین شد. با بررسی گسترش-های کروموزومی متعلق به تاس‌ماهی روسی توسط Lanfredi و همکاران (۲۰۰۱) تعداد نقاط مذکور 80 ± 4 عدد و توسط Fontana و همکاران (۲۰۰۸)، ۴۹ عدد مشخص شد. همچنین تعداد نقاط

Herran et al., 2001) بیانگر آن است که تاس‌ماهی روسی و تاس‌ماهی ایرانی بررسی شده در مطالعه حاضر، تقریباً ۵۰۰ هزار سال و تاس‌ماهی روسی بررسی شده در مطالعه حاضر و تاس‌ماهی بررسی شده توسط De La Herran و همکاران (۲۰۰۱) بیش از ۵۰ هزار سال از نظر تکاملی با هم فاصله دارند (شکل ۷). با بررسی گسترش‌های کروموزومی تاس‌ماهی روسی در



شکل ۷: درخت فیلوژنی چندگونه از تاس‌ماهیان از جمله تاس‌ماهی روسی مورد بررسی در این مطالعه با تاس‌ماهی روسی بررسی شده توسط De La Herran و همکاران (۲۰۰۱) و تاس‌ماهی ایرانی بررسی شده توسط نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۳).

PCR و دو رگه‌گیری آن با کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش، به منظور قابل رویت شدن پروب‌های نشاندار از روش ایمنوشیمیایی استفاده کردند. یعنی ابتدا ماده Anti-Digoxigenin که آنتی‌بادی ماده Digoxigenin است به نمونه افزوده شد و پس از رنگ‌آمیزی ثانویه لام با ماده PI^۱ نقاط دو رگه‌گیری پروب‌ها با کروموزوم‌ها قابل رویت شد (Lanfredi et al., 2001).

مشخص شدن نوع کروموزوم‌ها و محل دقیق نقاط رنگی (پروب) بر روی تمامی کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش میسر نشد که از دلایل آن می‌توان بزرگ و ناهمگن بودن نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب با کروموزوم‌ها، کوچک بودن اندازه کروموزوم‌ها و وجود میکروکروموزوم‌ها را مطرح کرد. Lanfredi و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی خود در مورد تاس‌ماهی روسی صرفاً به تعداد و اندازه کروموزوم‌های حاوی *HindIII* SatDNA اشاره کردند. Fontana و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود درباره تاس‌ماهی پوزه کوتاه فقط به تعداد کروموزوم‌هایی که دارای جایگاه *HindIII* SatDNA مورد نظر بودند اشاره کردند. این پژوهشگران ناهمگن بودن

مذکور در گسترش‌های کروموزومی بررسی شده تاس‌ماهی پوزه کوتاه ۱۴ عدد (Fontana et al., 2008) و تاس‌ماهی دریاچه‌ای ۴۸ عدد (Fontana et al., 2004) عدد بود. بررسی گسترش‌های کروموزومی ماهی ازون‌برون نیز حاکی از وجود ۱۰ عدد نقطه رنگی بر روی کروموزوم‌های (کوچک و متوسط) این ماهی بود (Chicca et al., 2002). اختلاف تعداد نقاط رنگی مشاهده شده بر روی کروموزوم‌های تاس‌ماهی روسی در مطالعه حاضر با نتایج کسب شده توسط Lanfredi و همکاران (۲۰۰۱) شاید به علت متفاوت بودن روش کار در این دو مطالعه باشد. در مطالعه حاضر ابتدا پروب مورد نظر با ماده Spectrum Orange (Orange-dUTP) به روش Nick Translation نشاندار شد، سپس با کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش دو رگه‌گیری شد و به منظور قابل رویت شدن نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری پروب با کروموزوم‌های ماهیان مورد آزمایش، لام مستقیماً با ماده DAPI رنگ‌آمیزی شد. اما Lanfredi و همکاران (۲۰۰۱) پس از نشاندار کردن پروب مورد استفاده با ماده Digoxigenin به روش

^۱ Propidium Iodide

استفاده از SatDNA مذکور و روش FISH برای اثبات تفکیک گونه‌ای تاس ماهی ایرانی از تاس ماهی روسی روش مناسبی نیست. همچنین شاید به توان نتیجه گرفت که با توجه به وجود تعداد زیادی میکروکروموزوم در تاس ماهیان، روش FISH صرفاً برای بررسی وجود و یا عدم وجود توالی خاص در کروموزومها، تعیین تعداد توالی‌های تکراری در کروموزومهای تاس ماهیان و تعیین جایگاه توالی مورد نظر در ماکروکروموزومها می‌تواند مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند از جمله آقایان دکتر حمید گورابی رئیس محترم و دکتر عبدالحسین شاهرودی معاون محترم پژوهشی پژوهشگاه رویان تشکر و قدردانی می‌گردد.

شکل و اندازه نقاط رنگی مستقر بر روی کروموزومها را از دلایل مشکل بودن تعیین مکان دقیق استقرار پروب مورد استفاده بر روی کروموزومهای ماهی مذکور عنوان کردند (Fontana et al., 2008). همچنین و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعات خود در ارتباط با بررسی *HindIII* SatDNA در تاس ماهی دریایچه‌ای تنها به ذکر تعداد نقاط رنگی مشاهده شده بر روی کروموزومهای این ماهی بسنده کردند.

با وجود تفاوت مشاهده شده در تعداد نقاط رنگی حاصل از دو رگه‌گیری *HindIII* SatDNA با کروموزومهای تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی، با توجه به عدم امکان تشخیص دقیق نوع کروموزومها و محل قرار گرفتن توالی مذکور بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد

منابع

- نوروزفشخامی م.ر. و خسروشاهی م. ۱۳۷۴. مطالعه کروموزومی ماهیان خاویاری از طریق کشت گلبول‌های سفید خون. مجله علمی شیلات ایران، ۱(۲): ۶۳-۷۱.
- نوروزفشخامی م.ر.، عزیززاده پرمهر ل.، chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. Applied Ichthyology, 18: 298-300.
- De La Herran R., Fontana F., Lanfredi M., Congiu L., Leis M., Rossi R., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M. and Garrido-Ramos M.A. 2001.** Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. Molecular Biology and Evolution, 18(3): 432-436.
- Fontana F. 2002.** A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. Journal of Applied Ichthyology, 18: 226-233.
- Fontana F., Bruch R.M., Binkowski F.P., Lanfredi M., Chicca M., Beltrami N. and Congiu L. 2004.** Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque 1817) by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. Genome, (47): 742-746.
- Fontana F., Congiu L., Mudrak V.A., Quattro G.M., Smith**
- محجویی ف.، پورکاظمی م.، کاظمی ب.، حسن‌زاده صابر م. و یارمحمدی م. ۱۳۹۳. جداسازی *HindIII* SatDNA در تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* مجله ژنتیک نوین، ۹(۱): ۱۲۶-۱۲۱.
- Birstein V.J. and DeSalle R. 1998.** Molecular phylogeny of Acipenserinae. Molecular Phylogenetics and Evolution, (9): 141-145.
- Birstein V.J. and Doukakis P. 2001.** Molecular Identification of Sturgeon Species: Science, bureaucracy, and the impact of environmental agreements. P: 47-63. In Riede K. (Ed.). New Perspectives for Monitoring for Migratory Animals- Improving Knowledge for Conservation. Landwirtschaftsverlag GmbH, Germany.
- Birstein V.J., Doukakis P. and DeSalle R. 2000.** Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and evolutionary implications. Conservation Genetics, (1): 81-88.
- Chicca M., Suci R., Ene C., Lanfredi M., Congiu L., Leis M., Tagliavini R., Rossi R. and Fontana F. 2002.** Karyotype characterization of stellate sturgeon, *Acipenser stellatus* by

- T.I.G., Ware K. and Dorshov S.I. 2008.** Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon. *Genome*, (51): 113–119.
- Fontana F., Lanfredi M., Chicca M., Congiu L., Tagliavini J. and Rossi R. 1999.** Fluorescent in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes: Acipenseriformes). *Genome*, 42: 1008–1012.
- Fontana F., Lanfredi M., Kirschbaum F., Garrido-Ramos M.A., Robles F., Folani A. and Congiu L. 2008.** Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser sturio* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genetica*, 132: 281–286.
- Fujiwara A., Nishida-Umehara C., Sakamoto T., Okamoto N., Nakayama I. and Abe S. 2001.** Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica*, 111: 77–89.
- Garrido-Ramos M.A., Sorrigueuer M.C. and De La Herran R. 1997.** Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir River. *Marine Biology*, 129: 33–29.
- Hillis D.M. and Moritz C. 1990.** *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA. 588P.
- Lanfredi M., Congiu L., Garrido-Ramos M.A., De La Herran R., Leis M., Chicca M., Rossi R., Tagliavini J., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M. and Fontana F. 2001.** Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research*, (9): 47–52.
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D. and Leitch I.J. 1994.** *In Situ Hybridization, A Practical Guide*. RMS. Microscopy Handbooks 27. BIOS Scientific Publishers, United Kingdom. 118P.
- Mugue N.S., Barmintseva A.E., Rastorguev S.M., Mugue V.N. and Barmintsev V.A. 2008.** Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Russian Journal of Genetics Genetika*, 44(7): 913–920.
- Nowruzfashkhami M.R., Pourkazemi M. and Baradarannoveiri S. 2000.** Chromosome study of Persian sturgeon. *Acipenser persicus* B. *Cytologia*, (65): 197–202.
- Nowruzfashkhami M.R., Safaiian S., Bahmani M. and Chubian F. 2006.** Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* in the south Caspian Sea using leukocyte culture. *Journal of Applied Ichthyology*, (22): 97–98.

- Philips R.B. and Reed K.M. 1996.** Application of fluorescent in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: A review. *Aquaculture*, (140): 197–216.
- Pourkazemi M. 1996.** Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences, University of Wales, UK. 260P.
- Robles F., De La Herran R., Ludwig A., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M. and Garrido-Ramos M.A. 2004.** Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene*, 338(1): 133–142.
- Ruban G.I., Kholodova M.V., Kalmykov V.A. and Sorokin P.A. 2008.** Morphological and molecular genetic study of the Persian sturgeon *Acipenser persicus* Borodin (Acipenseridae). *Ichthyology*, 48(10): 891–903.
- Tagliavini J., Williot P., Congiu L., Chicca M., Lanfredi M., Rossi R. and Fontana F. 1999.** Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. *Heredity*, (83): 520–525.
- Van Eenennaam A.L., Murray J.D. and Medrano J.F. 1998.** Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. *Genome*, (41): 266–271.



Chromosomal location of HindIII Satellite DNA in *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* by using of fluorescent in situ hybridization (FISH)

Mohammad Reza Nowruzfashkhami¹, Bahram Kazemi²,
Leila Azizadeh Pormehr³, Hamed Wazeeri-Nasab⁴, Mohammad Pourkazemi⁵,
Mahtab Yarmohammadi¹, Mohammad Hassanzadeh Saber⁶

Received: July 2017

Accepted: December 2017

Abstract

In this study, a HindIII Satellite DNA (168bp) was isolated from Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* and was used as a probe for fluorescent in situ hybridization (FISH) with the chromosomes of Persian sturgeon and Russian sturgeon. After obtaining suitable chromosomal preparations from the fishes through leukocyte culture and labeling the probe with Spectrum orange (Orange-dUTP) through Nick translation method, the probe was hybridized with chromosomes of the fishes on the microscopic slide. In the studied chromosomal preparations, the hybridization colored signals were clearly visible. Counting the produced signals in twelve chromosomal preparations of three fishes from each species showed that the mean number of the signals in the chromosomal preparations of the Persian sturgeon and Russian sturgeon were 67 ± 3 and 68 ± 4 respectively. In this study, accurate kind determining of chromosomes and HindIII SatDNA site on the chromosomes were impossible due to the presence of microchromosomes and heterogeneity of shapes and sizes of colored signals.

Key words: *Acipenser persicus*, *Acipenser gueldenstaedtii*, FISH, HindIII SatDNA.

1- Assistant Professor in Genetic and Biotechnology Department, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2- Professor in Biotechnology Department, Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran.

3- Ph.D. Student in Biochemistry, Biochemistry Department, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- M.Sc. in Cell and Molecular Biology, Royan Institute, Tehran, Iran.

5- Professor in Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

6- Scientific Member in Genetic and Biotechnology Department, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: Nowruzfashkhami@yahoo.com

