

## بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های طحال، پانکراس، کلیه قدامی و کبد در ماهیان مولد قره‌برون (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) با روش Real Time PCR کمی

محمدرضا بیواره<sup>۱\*</sup>، حسنا قلی‌پور کنعانی<sup>۲</sup>، بلال صادقی<sup>۳</sup>، حجت‌الله جعفریان<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: خرداد ۹۷

تاریخ پذیرش: مهر ۹۷

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های کبد، طحال، پانکراس و کلیه قدامی ماهیان مولد قره‌برون (*Acipenser persicus*) با استفاده از روش Real time PCR انجام شد. بدین منظور، پس از عملیات تکثیر، از ۱۶ قطعه ماهی مولد (۸ قطعه ماهی ماده و ۸ قطعه ماهی نر) نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها درون ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، فرآیند Real Time PCR به منظور تجزیه و تحلیل و مقایسه میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C انجام شد. نتایج این پژوهش به عنوان اولین مطالعه انجام شده بر روی این گونه، نشان داد که ژن لیزوزیم نوع C در هر چهار بافت مورد مطالعه بیان داشت و میزان بیان آن بین بافت‌های مختلف از اختلافی معنی‌دار برخوردار بود ( $P < 0/01$ ). بالاترین سطح بیان mRNA در بافت طحال و کمترین میزان بیان آن در بافت پانکراس مشاهده شد. بیان ژن لیزوزیم نوع C بین جنسیت‌های مختلف نیز دارای اختلافی معنی‌دار بود ( $P < 0/01$ ). بر این اساس، میزان بیان این ژن در جنس نر بالاتر بود. در مجموع، این چنین به نظر می‌رسد که میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌ها و جنسیت‌های مختلف ماهیان مولد قره‌برون می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار داشته باشد که بررسی اثرات احتمالی هر یک از آنها نیازمند انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشتری در این زمینه است.

### واژگان کلیدی: بیان ژن، آنزیم لیزوزیم، Real Time PCR، *Acipenser persicus*.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۳- استادیار گروه بهداشت عمومی و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [mohamadrezabivareh@yahoo.com](mailto:mohamadrezabivareh@yahoo.com)

## مقدمه

برخلاف مهره‌داران رده‌های بالا، ماهیان از مرحله جنینی به بعد در تعامل با طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا قرار دارند (Saurabh and Sahoo, 2008; Uribe et al., 2011; Rajabzadeh et al., 2012). این موجودات برای زنده ماندن همانند سایر جانوران از سازوکارهای ایمنولوژیکی مختلفی برای دفاع در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا بهره می‌گیرند (Soltani and Pourgholam, 2007). یکی از این سازوکارها که به عنوان نخستین خط دفاعی سیستم ایمنی فعالیت می‌کند، ایمنی غیراختصاصی مایعات بدن است که شامل پروتئازها، لیزین‌ها، آگلوتینین، پرسپیپتین‌ها، ایکونوزوئیدها، پروتئین‌های فاز حاد، ترانس فرین‌های موجود در ترشحات موکوسی و لیزوزیم است (Uribe et al., 2011). لیزوزیم در ماهیان آنزیمی با خواص ضدباکتریایی است که به وسیله گرانول‌های گلبول‌های سفید (بیشتر توسط نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها و به شکل کمتری توسط ماکروفاژها) و بافت‌ها و اندام‌های غنی از گلبول سفید مانند کلیه، طحال، آبشش و دستگاه گوارش ترشح می‌شود (Gholipour Kanani et al., 2011). این آنزیم دارای فعالیت‌های گسترده‌تری نسبت به لیزوزیم پستانداران است و اغلب به عنوان یکی از شاخص‌های عملکردی مهم در سیستم ایمنی غیراختصاصی با اثرات باکتریولیتیکی<sup>۱</sup> استفاده می‌شود (Saurabh and Sahoo, 2008; Larsen et al., 2009; Gholipour Kanani et al., 2011). بیان ژن‌های لیزوزیم نوع C و g در آبزیان در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است (Hikima et al., 2003; Fernandez-Trujillo et al., 2008; Kaizu et al., 2011; Gao et al., 2012; Fu et al., 2013; Hinds Vaughan and Smith, 2013; Wang et al., 2013; Mai et al., 2014). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که بیان ژن‌های لیزوزیم پس از مواجهه با عفونت‌های باکتریایی به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابند. بر این اساس پیشنهاد شده است که لیزوزیم‌ها دارای نقش مهمی در سیستم دفاعی آبزیان هستند (Ye et al., 2010). به عنوان مثال وقتی ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) در معرض عامل باکتریایی *Edwardsiella tarda* قرار گرفت، سطح mRNA ژن لیزوزیم نوع C در

برخلاف مهره‌داران رده‌های بالا، ماهیان از مرحله جنینی به بعد در تعامل با طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا قرار دارند (Saurabh and Sahoo, 2008; Uribe et al., 2011; Rajabzadeh et al., 2012). این موجودات برای زنده ماندن همانند سایر جانوران از سازوکارهای ایمنولوژیکی مختلفی برای دفاع در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا بهره می‌گیرند (Soltani and Pourgholam, 2007). یکی از این سازوکارها که به عنوان نخستین خط دفاعی سیستم ایمنی فعالیت می‌کند، ایمنی غیراختصاصی مایعات بدن است که شامل پروتئازها، لیزین‌ها، آگلوتینین، پرسپیپتین‌ها، ایکونوزوئیدها، پروتئین‌های فاز حاد، ترانس فرین‌های موجود در ترشحات موکوسی و لیزوزیم است (Uribe et al., 2011). لیزوزیم در ماهیان آنزیمی با خواص ضدباکتریایی است که به وسیله گرانول‌های گلبول‌های سفید (بیشتر توسط نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها و به شکل کمتری توسط ماکروفاژها) و بافت‌ها و اندام‌های غنی از گلبول سفید مانند کلیه، طحال، آبشش و دستگاه گوارش ترشح می‌شود (Gholipour Kanani et al., 2011). این آنزیم دارای فعالیت‌های گسترده‌تری نسبت به لیزوزیم پستانداران است و اغلب به عنوان یکی از شاخص‌های عملکردی مهم در سیستم ایمنی غیراختصاصی با اثرات باکتریولیتیکی<sup>۱</sup> استفاده می‌شود (Saurabh and Sahoo, 2008; Larsen et al., 2009; Gholipour Kanani et al., 2011). بیان ژن‌های لیزوزیم نوع C و g در آبزیان در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است (Hikima et al., 2003; Fernandez-Trujillo et al., 2008; Kaizu et al., 2011; Gao et al., 2012; Fu et al., 2013; Hinds Vaughan and Smith, 2013; Wang et al., 2013; Mai et al., 2014). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که بیان ژن‌های لیزوزیم پس از مواجهه با عفونت‌های باکتریایی به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابند. بر این اساس پیشنهاد شده است که لیزوزیم‌ها دارای نقش مهمی در سیستم دفاعی آبزیان هستند (Ye et al., 2010). به عنوان مثال وقتی ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) در معرض عامل باکتریایی *Edwardsiella tarda* قرار گرفت، سطح mRNA ژن لیزوزیم نوع C در

1- Bacteriolytic

بافت‌های کلیه قدامی، طحال و تخمدان (Hikima et al., 1997) و لیزوزیم نوع g در بافت‌های روده، قلب و خون به شکل معنی‌داری افزایش یافت (Hikima et al., 2001). در مطالعه‌ای دیگر Gao و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی بیان ژن لیزوزیم در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis aureus*)، سه ژن کدگذاری شده از نوع C شامل C-1، C-2 و C-3 را شناسایی کردند. در مطالعه Fernandez-Trujillo و همکاران (۲۰۰۸)، بررسی الگوی بیان ژن لیزوزیم نوع C در ماهی کفشک (*Solea Senegalensis*)، بالاترین میزان بیان را در بافت‌های پوست و آبشش و کمترین میزان بیان را در بافت روده نشان داد. این پژوهشگران دلیل اصلی بالاتر بودن میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های مورد نظر را آسیب‌پذیری بیشتر این دو بافت در برابر عفونت‌های باکتریایی عنوان کردند (Fernandez-Trujillo et al., 2008). Ye و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی بیان ژن لیزوزیم در ماهی‌های شناسایی ژن‌های کدگذاری شده لیزوزیم در بافت‌های کبد، طحال، کلیه، کلیه قدامی، آبشش، روده، پوست، قلب، مغز، عضله و خون گزارش دادند که ژن مورد نظر در تمامی بافت‌ها بیان داشت.

در مطالعه مذکور بالاترین میزان بیان در هر دو نوع لیزوزیم‌های شناسایی شده در بافت‌های کلیه و کلیه قدامی گزارش شد (Ye et al., 2010).

ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی هستند که از نظر تنوع زیستی و ذخیره ژنتیکی جزو معدود فسیل‌های زنده محسوب می‌شوند که از میلیون‌ها سال پیش تا به امروز همچنان به صورت دست‌نخورده به زندگی خود ادامه داده‌اند و از لحاظ اقتصادی قابل توجه هستند (Hamlin, 2005; Pourkazemi, 2006).

طبق گزارش Pourkazemi (۲۰۰۶) بیش از ۸۰٪ ذخایر تاس‌ماهیان دریای خزر را گونه قره‌برون تشکیل می‌دهد. این گونه دارای دو نژاد بهاره و پاییزه است و بیشترین فراوانی را در قسمت جنوبی دریای خزر دارد (Afraei et al., 2006; Kottelat and Freyhof, 2007).

در حال حاضر بر اساس گزارش‌های IUCN<sup>۱</sup> این گونه در لیست قرمز و در طبقه گونه‌های در معرض خطر بحرانی<sup>۲</sup> قرار دارد (IUCN, 2012).

1- International Union for Conservation of Nature  
2- Critically Endangered

در ماهیان قره‌برون جهت کمک به توسعه موثر در جلوگیری از بروز بیماری‌های مختلف و اهمیت آنزیم لیزوزیم به عنوان یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی، در مطالعه حاضر پس از جداسازی cDNA<sup>۱</sup> میزان بیان ژن آنزیم لیزوزیم نوع C در چهار بافت کبد، طحال، پانکراس و کلیه قدامی ماهیان مولد قره‌برون در شرایط معمولی بررسی شد و میزان بیان آن در جنسیت‌های مختلف نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### محل و شرایط نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از بافت‌های مورد نظر برای انجام این پژوهش در اسفندماه سال ۱۳۹۲ در زمان تکثیر مصنوعی ماهیان قره‌برون (*Acipenser persicus*) پس از انجام عملیات تخم‌کشی و اسپرم‌گیری در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید رجانی (واقع در ۴۵ کیلومتری شمال شرقی شهرستان گرگان) انجام شد. نمونه‌های مورد نظر از چهار بافت کبد، طحال، پانکراس و کلیه قدامی ۱۶ قطعه ماهی مولد شامل ۸ قطعه مولد ماده با میانگین وزنی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

با توجه به کاهش ذخایر و رو به نابودی قرار گرفتن ماهیان خاویاری و ارزش اقتصادی بالای آن‌ها در بازار تجارت جهانی، این ماهیان باید هدف بسیاری از برنامه‌های بررسی جمعیت و حفظ ذخایر قرار گیرند (Ludwig, 2006). در زمینه بررسی‌های جمعیتی و شناخت و حفظ ذخایر ژنی، مطالعات زیادی روی این گونه‌ها انجام شده است (خوش‌خلق و همکاران، ۱۳۸۶؛ یارمحمدی و همکاران، ۱۳۸۹؛ پورکاظمی و همکاران، ۱۳۹۰؛ چکمه‌دوز قاسمی و همکاران، ۱۳۹۰؛ عزیززاده و همکاران، ۱۳۹۰ الف، ب؛ سلمرودی و همکاران، ۱۳۹۱؛ عبدالله‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

باوجود تمامی تلاش‌ها در جهت شناخت و بازسازی ذخایر معمولاً این ماهیان در ردیف ماهیان در معرض خطر انقراض معرفی می‌شوند (Billard and Lecointre, 2001).

ماهی قره‌برون در بین گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری به عنوان تنها گونه بومی کشور ایران در آب‌های دریای خزر شناخته می‌شود. این گونه در طول دوره زندگی همواره توسط انواع مختلف عوامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی مورد تهدید قرار می‌گیرد. به منظور درک بهتر مکانیسم پاسخ ایمنی ذاتی

این شرایط واکنش تا ۲ میکروگرم DNA ژنومی را حذف خواهد کرد. با اضافه کردن EDTA با غلظت نهایی ۵mM به هر ویال حاوی نمونه، ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا DNase غیرفعال شد. نمونه‌ها برای سنتز cDNA بلافاصله روی یخ منتقل شدند و تا زمان ساخت cDNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از عملیات استخراج، کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه طیف‌سنج نانودراپ (Nano ND-1000 Spectrophotometer, Drop Technologies, آمریکا) با اندازه‌گیری نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ( $OD_{260/280}$ ) و ۲۳۰ به ۲۶۰ نانومتر ( $OD_{230/260}$ ) مورد ارزیابی قرار گرفت و نمونه‌هایی که نسبت جذب آن‌ها بین ۱/۷-۱/۹ بود، برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

#### سنتز و بررسی cDNA

نسخه‌برداری معکوس و ساخت رشته اول cDNA از RNA کل با کیت تجاری RevertAid M-MuLVReverse Transcriptase (سینا ژن، ایران) که دارای

۲۵۷۰±۵۴۶/۷۹ گرم و میانگین طولی ۱۷۱/۶±۸/۲۳ سانتی‌متر و ۸ قطعه مولد نر با میانگین وزنی ۱۹۲۰±۳۲۴/۱۶ گرم و میانگین طولی ۱۵۹/۲±۷/۵۴ سانتی‌متر تهیه شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون تانک ازت مایع (۱۸۰°C-) به آزمایشگاه مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک مولکولی منتقل شد. پس از استخراج RNA، نمونه‌های به دست آمده تا شروع آزمایش‌های مولکولی در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

#### ارزیابی‌های بیان ژن

##### استخراج RNA

استخراج RNA کل از نمونه‌های مورد نظر بر اساس دستور العمل کیت استخراج InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Stratec, آلمان) انجام شد. بلافاصله بعد از استخراج، به منظور حذف هر گونه آلودگی احتمالی DNA، از کیت DNase I (Thermo Fisher Scientific, آمریکا) با اضافه کردن ۱ میکرولیتر از بافر DNase I (2U/μL) به حدود ۱۰ میکروگرم نمونه RNA مطابق دستور العمل پیشنهادی شرکت سازنده در یک واکنش ۵۰ میکرولیتری اقدام شد. محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تحت

سانتی‌گراد انکوبه شد. در خاتمه به منظور غیرفعال کردن واکنش، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و محلول توسط سانتریفیوژ آرام لوله‌های میکروتیوب جمع‌آوری شد. نمونه‌های cDNA سنتز شده تا شروع آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### بهبودسازی شرایط Real Time PCR کیفی برای تکثیر ژن

بعد از استخراج RNA و ارزیابی کیفی آن به منظور تایید این که آیا سلول‌های استخراج شده از RNA قادر به بیان ژن لیزوزیم نوع C هستند یا خیر، از روش Real Time PCR کیفی استفاده شد. برای این کار مخلوطی از مستر میکس با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. این مخلوط شامل ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۳ میکرولیتر مجموع آغازگرهای پسر و پیشرو، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (سینا ژن، ایران) و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار یونیزه شده بود. پس از آماده‌سازی مواد برای انجام Real Time PCR. تنظیمات دستگاه

آغازگرهای هم‌زمر تصادفی بود، انجام شد. ترکیبات لازم برای سنتز cDNA با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکروگرم RNA تیمار شده با DNase I، یک میکرولیتر Oligo d(T)18 (۴۰ میکرومولار) و یک میکرولیتر dNTPs Mix (۱۰ میلی‌مولار) بود. در نهایت به هر میکروتیوب حاوی نمونه تا حدی آب فاقد نوکلئاز<sup>۱</sup> اضافه شد که به حجم ۱۰ میکرو لیتر رسید. مخلوط به دست آمده پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، سریعاً به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت و به آرامی اسپین شد. به مخلوط cDNA ۲ میکرولیتر (۱۰X) بافر M-MuLV، ۰/۵ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (۲۰U) و ۰/۵ میکرولیتر M-MuLV Reverse Transcriptase اضافه شد. با افزودن آب فاقد نوکلئاز حجم هر میکروتیوب به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. مقدار ۱۰ میکرو لیتر نیز از مخلوط سنتز cDNA به هر میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب‌ها برای مدت زمان ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (D-7200 Tuttlingen, Hettich, آلمان) شدند. مخلوط ساخته شده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه

1- Nuclease-free Water

علت داشتن تغییرات کمتر در دستگاه Real Time PCR و مقایسه تطبیقی توالی‌های متفاوت و BLAST کردن آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI، به عنوان بهترین ژن مرجع برای آزمایش در نظر گرفته شد که عدد ثبات آن در مطالعات پیشین (Akbarzadeh et al., 2011) در ماهی قره‌برون ۰/۱۲۹ تعیین شد. توالی، طول و شرایط آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است.

تعیین کمیت نسبی در Real Time PCR با اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسانس که در نتیجه اتصال غیراختصاصی رنگ سایبر گرین ایجاد می‌شود، با استفاده از دستگاه Real Time PCR (ABI 7300 Sequence Detection System Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد (Vandesompele et al., 2002).

اجزای واکنش Real Time PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبر گرین<sup>۲</sup> (ABI، آمریکا)، ۰/۳ میکرولیتر آغازگر، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA و ۷/۷ میکرولیتر آب مقطر دینونیزه بود.

ترموسایکلر (Eppendorf، TC-341، آلمان) شامل ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی به مدت ۳۰ ثانیه، در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و مرحله بازآرایی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

#### انجام Real Time PCR

آغازگرهایی که برای بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع C استفاده شد شامل آغازگرهایی برای انجام Real Time PCR به عنوان ژن اصلی و سه ژن مرجع با پتانسیل‌های مختلف ( $\beta$ -actin، RPL6 و GAPDH) به عنوان ژن‌های کنترل کننده داخلی بودند. این آغازگرها مطابق با توالی‌های در دسترس در بانک‌های ژن و رعایت شرایط استاندارد با استفاده از بسته نرم‌افزاری (V.5) Primer Primer، نرم‌افزار BLAST و پایگاه‌های داده‌ای NCBI و RT Primer Data Base و یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها و اطمینان از ساختمان فضایی آن‌ها تهیه شدند. تولید آغازگرها توسط شرکت Bioner (کره جنوبی) صورت گرفت. در این آزمایش ژن  $\beta$ -actin در مقایسه با دو ژن مرجع دیگر به

2- Master Mix SYBER Green

1- Ribosomal Protein L6

برای اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تعداد ۴۰ چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و تعداد یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی آغازگرها بود. در مرحله رسم منحنی ذوب نیز ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی، یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال، ۱۵ ثانیه برای واسرشته‌سازی مجدد و ۱۵ ثانیه برای اتصال مجدد بود.

پروتکل دمایی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real Time PCR یکسان در نظر گرفته شد که به شرح زیر بود. یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای برای فعال‌سازی اولیه آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌های دمایی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر بود که در ۴۵ سیکل تکرار شد. ۴۰ چرخه برای دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تعداد ۴۰ چرخه

جدول ۱: مشخصات توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در بررسی بیان لیزوزیم نوع C در ماهیان مولد قره‌برون (*Acipenser persicus*)

ژن	توالی آغازگر ( 3' → 5' )	طول قطعه (pb)	دمای اتصال (C°)
<b>C-type</b>	F: ACCACAGTCACCAACCATAACCGA R: CCCTAACGACACGTTTGGCACAAT	۱۷۷	۶۳
<b>C-type</b>	F: GTGTAAAGAGGGTTGTGAG R: AGATAGACGTGGAGGAGC	۱۵۰	۶۴
<b>C-type</b>	F: CAACTGACTACGGCATCTTC R: TCACTGACCGCTGCAACTGA	۱۰۰*	۶۳
<b>RPL6</b>	F: GTGGTCAAACCTCCGCAAGA R: GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۱۴۹	۶۲
<b>β-actin</b>	F: AGACCTTCAACACTCCTGCCATGT R: TGGATCTGGCTGGCAGAGATTTGA	۲۰۰*	۶۲
<b>GAPDH</b>	F: GTCTACATGTTCAAGTATGACTC R: AGC GCC GGC ATC AAA GA	۷۷۰	۶۲



\*: جفت آغازگرهایی که برای انجام Real Time PCR انتخاب شدند با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real Time PCR، داده‌های خام به صورت  $Ct^1$  از دستگاه استخراج شد. تجزیه و تحلیل  $Ct$  های به دست آمده با استفاده از بسته نرم‌افزاری (v.1.4)  $\Delta C_T$  (Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری مربوط به بیان نسبی ژن لیروزیم نوع C پس از محاسبه  $\Delta C_T$  ژن در هر نمونه از افتراق  $Ct$  ژن مربوطه و  $Ct$  ژن  $\beta$ -actin به عنوان ژن مرجع محاسبه شد. داده‌های جمع‌آوری شده نیز پس از تایید نرمال بودن از طریق انجام آزمون کولموگروف-اسمیرنوف با استفاده از رویه T-test در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (v.16) صورت گرفت، رسم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد.

## نتایج

در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی  $cDNA$  های تولید شده نشان داد

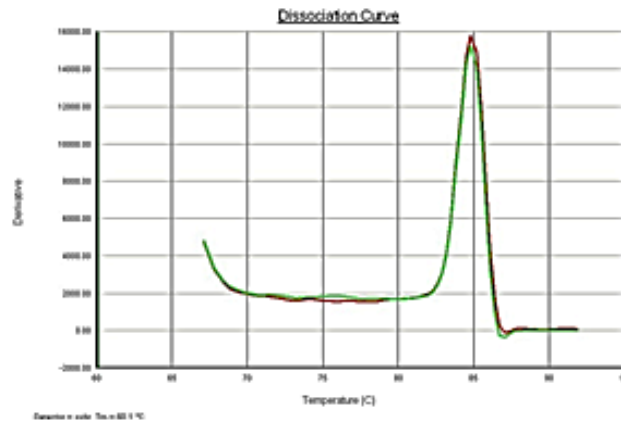
تکثیر دیده می‌شود (شکل ۲) تکثیر ژن‌های لیروزیم نوع C و  $\beta$ -actin با استفاده از روش

- 1- Threshold Cycle
- 2- Sequence Detection Systems

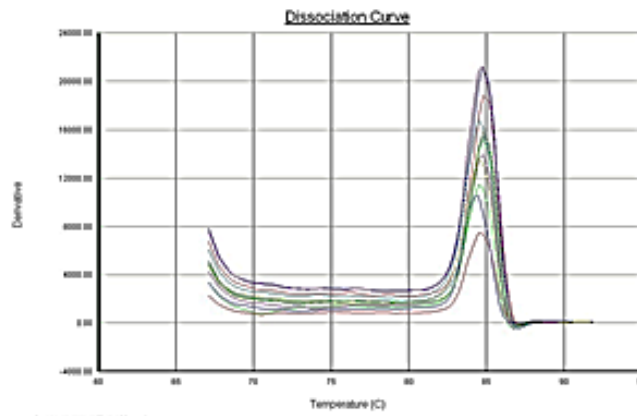
که  $cDNA$  ها از کمیت و کیفیت مناسبی برای انجام واکنش Real Time PCR برخوردار بودند. به سبب اختصاصی نبودن رنگ فلورسانس SYBR Green، برای اطمینان از تولید قطعات اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه و دوتایی آغازگر در محصولات Real Time PCR منحنی ذوب رسم شد (شکل ۱). همان طور که در شکل ۱ نیز مشاهده می‌شود، در این نمودار هیچ پیک اضافه کوچک‌تری قبل از پیک محصولات و یا بعد از آن (نشان دهنده وجود آغازگر دایمر) وجود ندارد. این موضوع نشان دهنده آن است که آغازگرها تقابلی باهم ندارند. بنابراین با توجه به منحنی ذوب ترسیم شده برای هر سه آغازگر مورد استفاده در این پژوهش، می‌توان گفت آغازگرها به صورت کاملاً اختصاصی عمل کرده، یک نمونه منفرد از  $cDNA$  را تکثیر کردند (شکل ۱). پس از بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها و بهینه‌سازی غلظت آغازگرها و سایر اجزای واکنش نسبت به تکثیر قطعات اختصاصی ژن مورد نظر اقدام شد. بر این اساس همان طور که در منحنی تکثیر دیده می‌شود (شکل ۲) تکثیر ژن‌های لیروزیم نوع C و  $\beta$ -actin با استفاده از روش

Real Time PCR به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچ‌گونه مداخله‌ای صورت گرفت، به طوری که میزان فلورسانت ساطع شده با افزایش مقادیر محصولات طی چرخه‌های واکنش PCR افزایش یافت. محور عمودی PCR چرخه‌های واکنش بر اساس شدت نور فلورسانس نشر شده از رنگ گزارش‌گر و محور افقی بر اساس تعداد چرخه‌های واکنش است (شکل ۲).

(الف)



(ب)



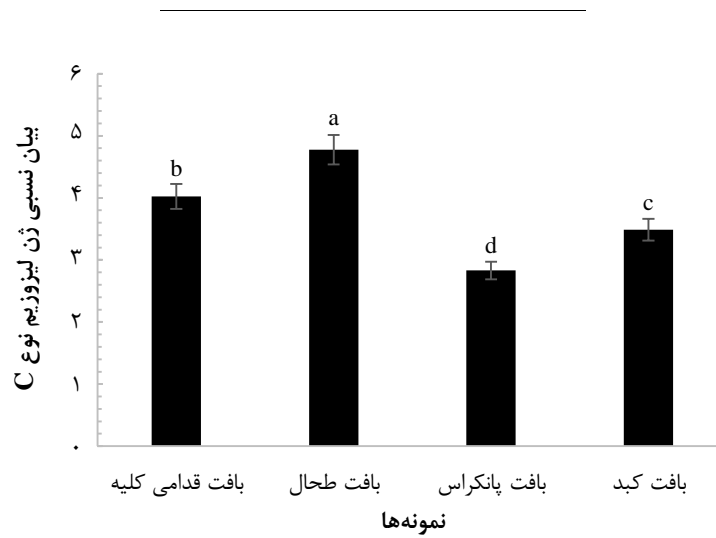
شکل ۱: منحنی ذوب Real Time PCR برای همه نمونه‌ها که در آن سیگنال فلورسانس (محور Y) در مقابل درجه حرارت (محور X) رسم شده‌اند. همه نمونه‌های زیستی با ژن مرجع و ژن اصلی و با سه تکرار آزمایشی اندازه‌گیری شد. الف) آغازگرهای  $\beta$ -actin ب) ژن لیزوزیم نوع C.



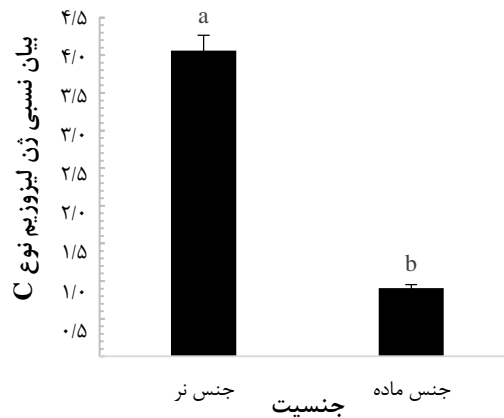
شکل ۲: منحنی‌های تکثیر ژن لیزوزیم نوع C جدا شده از بافت‌های مختلف ماهی مولد قره‌برون (*Acipenser persicus*) در رقت‌های متوالی در آزمایش Real Time PCR.

بررسی میزان بیان mRNA ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های مختلف ماهیان مولد قره‌برون نشان داد ارتباط معنی‌داری بین بیان  $\Delta\Delta Ct$  نمونه‌ها در سطح معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) در تمام بافت‌های تحت بررسی وجود داشت. بر اساس نتایج به دست آمده، بالاترین میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت طحال و کمترین میزان بیان آن در بافت پانکراس مشاهده شد ( $P < 0.01$ ; شکل ۳).

معنی‌داری تفاوت  $\Delta\Delta Ct$  نمونه‌ها در جنس‌های نر و ماده ماهیان مولد قره‌برون با استفاده از رویه T-test در سطح ۹۹٪ ( $P < 0.01$ ) نشان داد که بین میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های جنس نر و ماده تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۴). به طوری که بر اساس نتایج به دست آمده میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های جنس نر در مقایسه با جنس ماده به طور محسوسی بالاتر بود.



شکل ۳: بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های مختلف ماهیان مولد قره‌برون (*Acipenser persicus*) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۴: مقایسه میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در مجموع اندام‌های ماهیان مولد قره‌برون (*Acipenser persicus*) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

مطالعه بیان mRNA ژن‌های وابسته به سیستم ایمنی ذاتی با روش‌هایی مثل Real Time PCR اطلاعات دقیقی را از تکوین سیستم ایمنی ارائه می‌دهند. از این روش برای ارائه اطلاعات کمی از چگونگی روش‌های درمانی و اثر شرایط بر بیان ژن‌های انتخاب شده مورد استفاده قرار می‌گیرد (نقوی و همکاران، ۱۳۹۲).

در طول سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی جهت توصیف ژن‌های وابسته به سیستم ایمنی ذاتی مانند کیموکاین (Bao et al., 2006; Peatman and Liu, 2007) پپتیدهای ضد میکروبی (Xu et al., 2005; Wang et al., 2006) پذیرنده‌های عوامل بیماری‌زای اختصاصی (Niu et al., 2011) و سایر ژن‌های مرتبط انجام شده است (Bao et al., 2006; Liao et al., 2009; Niu et al., 2011; Zhou et al., 2012).

بیان ژن لیزوزیم نوع C و g تا به امروز در ۱۳ گونه از ماهیان گزارش شده است (Fernandez-Trujillo et al., 2008). برای مثال مشخص شده است که ژن لیزوزیم نوع C در ماهی کفشک *Paralichthys olivaceus*

عمدتاً در بافت‌های قدامی و خلفی کلیه، طحال، مغز و تخمدان بیان می‌شود (Hikima et al., 1997). در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) سنتز cDNA لیزوزیم نوع C، بالاترین میزان بیان را در بافت کلیه قدامی نشان داد (Wen and Irwin, 1999). مطابق با نتایج Cecchini و همکاران (۲۰۱۳)، بیان ژن لیزوزیم نوع C در ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) از تخم‌های بارور نشده (UFEs)<sup>۱</sup> به بعد تا مرحله بلوغ مشاهده شد. نتایج مشابهی در بافت عضله، تخمدان، قلب، مغز، آبشش، بیضه، جگر، روده، طحال، پوست، قسمت‌های قدامی و خلفی کلیه و خون جمع‌آوری شده از ماهیان بالغ نیز گزارش شد. بر اساس نتایج به دست آمده، این پژوهشگران پیشنهاد دادند که با توجه به بیان ژن لیزوزیم نوع C از مرحله UFEs به بعد، این موضوع ممکن است نشان دهنده همان چیزی باشد که از آن به عنوان سیستم ایمنی مادرانه یاد می‌شود (Cecchini et al., 2013). در حالی که بیان این ژن در ماهی گورخری (*Danio rerio*) تا ۲۴ ساعت پس از لقاح تاخیر داشت (Liu and Wen,

1- Unfertilized Eggs

مقابل بیماری‌های باکتریایی باشد (Fu et al., 2013). در همین راستا برای درک بیشتر نقش آنزیم لیزوزیم نوع C در سیستم ایمنی ذاتی ماهیان مولد قره‌برون تصمیم گرفته شد تا با کمک روش Real Time PCR کمی تشخیص بیان mRNA این آنزیم در چهار بافت کلیه قدامی، کبد، طحال و پانکراس به عنوان اولین مطالعه انجام شده روی این گونه، مورد بررسی قرار گیرد. یافته‌های به دست آمده نشان داد که ژن لیزوزیم نوع C در تمام بافت‌های تحت بررسی بیان داشت و میزان بیان آن در هر چهار بافت در مقایسه با یکدیگر دارای اختلافی معنی‌دار بود، به طوری که بالاترین میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت طحال و کمترین میزان بیان آن در بافت پانکراس ثبت شد. نتایج حاضر با نتایج به دست آمده از ماهیان گورخری (Liu and Wen, 2002)، تیلاپیا (Gao et al., 2012)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Dautigny et al., 1991) و باس دریایی (Fu et al., 2013) مطابقت داشت. در مطالعه Gao و همکاران (۲۰۱۲)، اندازه‌گیری میزان بیان انواع مختلف وارسته‌های ژن لیزوزیم نوع C در ماهی تیلاپیا نشان داد بیشترین میزان بیان mRNA این ژن‌ها در دو بافت کبد و عضله بود. ضمن آن که لیزوزیم نوع C1 در

2002). در مطالعه‌های دیگر، Fu و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی کلون‌سازی لیزوزیم‌های نوع C و g در لاروهای ۹۰ روزه ماهی سیم آسیایی (*Lates calcarifer*) گزارش دادند که هر دو نوع لیزوزیم در تمام بافت‌های تحت بررسی (مغز، طحال، کلیه، آبشش، چشم، روده، ماهیچه، قلب و کبد) بیان داشت و بیشترین میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های کبد، روده، طحال و کلیه و لیزوزیم نوع g در بافت روده و به شکل ضعیف‌تر در بافت ماهیچه مشاهده شد. همچنین آن‌ها گزارش دادند که هر دو نوع این لیزوزیم‌ها در این‌گونه در بافت‌های کلیه، کبد و طحال در پاسخ به مواجهه با عامل بیماری‌زای *Vibrio harveyi* بالاتر از حد معمول رونویسی شد و بیان ژن لیزوزیم نوع C در مقایسه با نوع g در بافت‌های کلیه و طحال بسیار قوی‌تر بود. این پژوهشگران این‌طور نتیجه‌گیری کردند که ژن لیزوزیم‌های نوع C و g نقش مهمی را در مقاومت لاروهای ماهی سیم دریایی نسبت به عوامل بیماری‌زای باکتریایی ایفا می‌کند و نشانگرهای SNP<sup>۱</sup> در ژن‌های مرتبط با مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی ممکن است انتخاب تسهیل شده این‌گونه در

1- Single Nucleotide Polymorphism

موضوع ممکن است به دلیل عملکردهای مختلف لیزوزیم در بافت‌های مختلف باشد. در ماهی بریل (*Scophthalmus rhombus*) که در طبیعت از میسیدها<sup>۱</sup> و ماهیان استخوانی تغذیه می‌کند، لیزوزیم نوع C ممکن است دارای فعالیت‌های گوارشی باشد، زیرا بیشترین میزان بیان این ژن در این ماهی به طور عمده در بافت‌های کبد و معده اندازه‌گیری شد (Jimenez-Cantizano et al., 2008). در حالی که در سایر ماهیان شناخته شده با توجه به بیان بالای ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های مرتبط با ایمنی ممکن است عملکرد اصلی این ژن دفاع در نظر گرفته شود. به عنوان مثال، لیزوزیم نوع C در بافت‌های کبد و کلیه قدامی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، رده میلوئید در ماهی گورخری، به طور گسترده در بافت‌های قدامی و کلیه خلفی، طحال، مغز و تخمدان ماهی فلاندر ژاپنی و بیان بالایی در بافت کلیه قدامی در ماهی کپور علفخوار داشت (Dautigny et al., 1991; Hikima et al., 1997; Liu and Wen, 2002; Ye et al., 2010).

Kaizu و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی عملکرد لیزوزیم نوع C در میگوهای

بافت روده نیز بیان قابل توجهی داشت. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد کمترین میزان بیان mRNA ژن لیزوزیم نوع C1 در بافت معده و ژن‌های C2 و C3 در بافت روده رخ داد (Gao et al., 2012). با توجه به این که بافت طحال به عنوان یکی از اندام‌های مهم به منظور عملکردهای ایمنی در ماهیان شناخته شده است، این اطلاعات نشان می‌دهد که ژن لیزوزیم نوع C در ماهی قره‌برون نیز ممکن است نقش مهمی را در مقاومت در برابر بیماری داشته باشد. در طول روند تکاملی لیزوزیم‌ها، عملکردهای متفاوتی از دفاع تا هضم برای این آنزیم طی پژوهش‌های مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال در نشخوارکنندگان، از بین ۱۰ نوع mRNA لیزوزیم نوع C، ۴ نوع آن مربوط به معده بودند و به طور عمده در عملیات هضم ایفای نقش می‌کردند (Irwin, 1996). الگوهای بیان ژن لیزوزیم در بافت‌های مختلف متفاوت است و در آبزیان به نظر می‌رسد در تمام بافت‌ها بیان داشته باشد (Irwin and Wilson, 1989; Irwin, 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2008; Jimenez-Cantizano et al., 2008; Ye et al., 2010)، اما سطح بیان آن در بافت‌های مختلف آبزیان متفاوت است که این

تکثیر و سایر فعالیت‌های مرتبط با آن و زمان تکثیر ماهی قره‌برون، میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C را می‌توان به هر یک از موارد بالا ارجاع داد که بررسی آن‌ها نیاز به انجام مطالعات بیشتر در این زمینه دارد. در تایید توضیحات ذکر شده Swain و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهی روهو (*Labeo rohita*) در فصول مختلف سال شاهد پایین‌ترین میزان لیزوزیم در فصل زمستان بودند. Ghafoori و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی تغییرات لیزوزیم در سرم و موکوس جنس‌های نر و ماده ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) در طول دوره تکثیر گزارش دادند که عوامل مختلفی مانند دمای آب، بلوغ جنسی و مهاجرت‌های تولیدمثلی تماماً می‌توانند بر تغییر میزان لیزوزیم موثر باشند. آن‌ها میزان لیزوزیم را در جنس ماده بالاتر از جنس نر گزارش دادند و این طور نتیجه گرفتند که دلیل کاهش سطح لیزوزیم در دمای پایین، کاهش نرخ متابولیک و کاهش عوامل میکروبی محیط بود (Ghafoori et al., 2014).

بررسی میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در جنس‌های مختلف ماهیان مولد قره‌برون پرورشی در مطالعه حاضر نشان داد میزان بیان

*Marsupenaeus japonicus* (خانواده Penaeidae) گزارش دادند که عدم وجود این آنزیم در این میگوها باعث افزایش باکتری‌های بیماری‌زا در همولنف و در نتیجه افزایش تلفات شد. Ye و همکاران (۲۰۱۰) نیز این چنین گزارش دادند که در ماهی آمور ممکن است لیزوزیم نوع C به عنوان مولکول اصلی در دفاع از بدن در شرایط طبیعی فعالیت داشته باشد. در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۳)، بالاترین میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در گربه‌ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) در بافت‌های کلیه، کلیه قدامی، کبد، طحال ثبت شد که با نوع عملکردهای این بافت‌ها در سیستم ایمنی مطابقت داشت (Wang et al., 2013). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر را می‌توان به عوامل درونی مرتبط با گونه نیز نسبت داد (Burton and Murray, 1979; Etim et al., 1999).

با توجه به موارد ذکر شده و نتایج پژوهش‌های Liu و Wen (۲۰۰۲) که لیزوزیم نوع C را به عنوان عامل اصلی جهت دفاع تحت شرایط طبیعی معرفی کرده‌اند و استرس‌های به وجود آمده تحت شرایط خاص مانند حمل و نقل، کاهش سطح آب در حوضچه‌های پرورش ماهیان خاویاری در فصل



اروپایی (*Perca fluviatilis*) مشاهده کردند در طول فصل تخم‌ریزی سطح این آنزیم در جنس ماده به شکل معناداری بالاتر از جنس نر بود. در حالی که بررسی این شاخص در فصول مختلف در مورد ماهی لامپساکر (*Cyclopterus lumpus*) نشان داد سطح این آنزیم وابسته به فصل است و فعالیت آن در نرها همواره بیشتر از جنس ماده است (Fletcher et al., 1977).

در مجموع، اندازه‌گیری بیان ژن لیزوزیم نوع C در بافت‌های کلیه قدامی، کبد، طحال و پانکراس در مولدین ماهی قره‌برون در مطالعه حاضر نشان داد میزان بیان mRNAهای این ژن در تمامی بافت‌های تحت بررسی در مقایسه با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌داری بود و بالاترین سطح بیان آن در بافت طحال ثبت شد. با توجه به نقش بافت طحال در ایمنی بدن، یکی از دلایل احتمالی بالاتر بودن میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در ماهیان تحت بررسی، می‌تواند مبتلا بودن ماهیان به انواع عفونت‌های باکتریایی باشد. همچنین با مقایسه میزان بیان ژن لیزوزیم نوع C در جنسیت‌های مختلف ماهی قره‌برون نیز این نتیجه‌گیری حاصل شد که میزان بیان این ژن در ماهیان جنس نر به شکل محسوس و معنی‌داری بالاتر

این ژن در بافت‌های جنس نر در مقایسه با جنس ماده به طور معنی‌داری در سطح بالاتری قرار داشت. تا به امروز مکانیسم دقیق اثر جنسیت بر میزان بیان این ژن در آبزیان به طور کامل شناسایی نشده است، اما Grinde و همکاران (۱۹۸۸) با بررسی میزان لیزوزیم در بافت قدامی و خلفی کلیه در ۱۲ گونه از ماهیان و همچنین بررسی اثرات ژنتیکی بر تنوع لیزوزیم سرم خون مولدین در هر گروه از ماهیان (۳ مولد نر و ۵ مولد ماده) گزارش دادند در بین تمام گونه‌های تحت بررسی، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای بالاترین میزان لیزوزیم بود و میزان فعالیت این آنزیم در بافت کلیه نیز بیشتر از بافت خون گزارش شد. در حالی که هیچ گونه تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در جنس‌های مختلف این گونه مشاهده نشد. بررسی نتایج به صورت درون‌گونه‌ای نیز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دهنده وجود تاثیرات ژنتیکی بر سطوح لیزوزیم بوده است. همچنین آن‌ها گزارش دادند که هیچ گونه همبستگی معنی‌داری بین وزن و میزان فعالیت این آنزیم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود نداشت (Grinde et al., 1988). Wang و همکاران (۲۰۰۳) نیز با سنجش سطح لیزوزیم در ماهی سوف

از جنس ماده بود. نتایج حاضر می‌تواند سرنخ‌های جدیدی را در مورد مکانیزم‌های مولکولی که پاسخ ایمنی ذاتی را در ماهیان تنظیم می‌کنند، ارائه دهد. با این وجود، برای ابراز نظر قطعی در این زمینه با توجه به گسترش کاربردهای بیوتکنولوژی در صنعت آبی‌پروری و کسب دانش عمیق‌تر در خصوص تمام ویژگی‌های لیزوزیم نوع C در گونه‌های مختلف ماهیان، به ویژه ماهیان خاویاری که دارای ارزش اقتصادی بالایی نیز هستند، پیشنهاد می‌شود با بررسی ساختار ژنومی لیزوزیم نوع C، الگوهای بیان کامل این آنزیم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا و یا نقش نسبی آن در مقایسه با سایر ایمنوپروتئین‌های پاسخ ایمنی ذاتی مورد بررسی قرار گیرد.

## منابع

- پورکاظمی م.، عزیززاده م.، یارمحمدی م. و حسن‌زاده صابر م. ۱۳۹۰. بررسی امکان تفکیک ژنتیکی گونه تاس‌ماهی ایرانی از تاس‌ماهی روسی به روش AFLP. هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران. ص ۵.
- چکمه‌دوز قاسمی ف.، پورکاظمی م.، توکلی م.، یارمحمدی م.، حسن‌زاده م.، برادران نویری ش. و بهمنش ش. ۱۳۹۰. کاربرد مارکرهای میکروستلایت جهت شناسایی جمعیت‌های تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) سواحل جنوبی دریای خزر. دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان. ص: ۳۰۱-۲۹۰.
- خوش‌خلق م.ر.، پورکاظمی م. و رضوانی س. ۱۳۸۶. بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاس‌ماهی روسی (*A. gueldenstadtii*) شمال خزر (رودخانه ولگا) و خزر جنوبی (آب‌های ایران و ترکمنستان) با استفاده از روش میکروستلایت. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶(۴): ۸۰-۶۹.
- سلمرودی م.، پورکاظمی م.، خوش‌خلق م.ر. و عزیززاده ل. ۱۳۹۱. جداسازی و شناسایی توالی کامل ژن سنتز کننده هورمون رشد در تاس‌ماهی ایرانی دریای خزر. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، مرکز همایش‌های بین‌المللی دانشگاه شهید بهشتی، تهران. ص ۶.
- عبدالله‌نژاد ز.، پورکاظمی م.، خوش‌خلق م.ر.، یارمحمدی م. و یوسفی ا. ۱۳۹۱. بررسی بیان ژن هورمون رشد در تخم لقاح نیافته تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*). اولین کنفرانس ملی راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار در بخش‌های کشاورزی، منابع طبیعی و محیط‌زیست، انجمن ژنتیک ایران، تهران. ص ۵.
- عزیززاده ل.، پورکاظمی م.، صنعتی م.ح. و عصفوری ر. ۱۳۹۰ الف. بررسی امکان شناسایی کلونینگ و بیان ژن هورمون رشد فیل‌ماهی در *E. coli*. هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران. ص ۵.
- عزیززاده ل.، پورکاظمی م.، یارمحمدی م. و نوروزفشخامی م. ۱۳۹۰ ب. cDNA کلونینگ و بررسی فیلوژنتیک هورمون رشد فیل‌ماهی (*Huso huso*). اولین همایش ملی آبزی‌پروری ایران، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، بندر انزلی. ۱۵۲ ص.
- نقوی م.ر.، قره‌ریاضی ب. و حسینی سالکده ق. ۱۳۹۲. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۴۰ ص.

- تاس ماهی ایرانی با استفاده از cDNA-RFLP.  
مجله ژنتیک نوین، ۵(۲): ۷۵-۸۲.
- Afraei M.A., Safari R. and Salmani A. 2006.** Distribution and density of juvenile *Acipenser persicus* at the lower 10 meter depth of the southern Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1): 108–110.
- Akbarzadeh A., Farahmand H., Mahjoubi F., Nematollahi M.A., Leskinen P., Rytönen K. and Nikinmaa M. 2011.** The transcription of L-gulonolactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbic acid, during development of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 158: 282–288.
- Bao B., Peatman E., Peng X., Baoprasertkul P., Wang G. and Liu Z. 2006.** Characterization of 23 CC chemokine genes and analysis of their expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 783–796.
- Billard R. and Lecointre G. 2001.** Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 355–392.
- Burton C.B. and Murray S.A. 1979.** Effect of density on gold fish blood- I Haematology. *پورکاظمی م.، حسنزاده صابر م.، چکمه‌دوز ف. و عزیززاده ل. ۱۳۸۹.* بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت در *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 62: 555–558.
- Cecchini S., Paciolla M., Biffali E., Borra M., Ursini M.V. and Lioi M.B. 2013.** Ontogenetic profile of innate immune related genes and their tissue specific expression in brown trout, *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758). *Fish and Shellfish Immunology*, 35: 988–992.
- Dautigny A., Prager E.M., Pham-Dinh D., Jolles J., Pakdel F., Grinde B. and Jolles P. 1991.** cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2): 187–198.
- Etim L., Ekanem S.B. and Utim A. 1999.** Haematological profiles of two species of catfish, *Chrysichthys nigrodigitatus* and *Chrysichthys furcatus* from the Great Kwa River, Nig. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 5: 1–8.
- Fernandez-Trujillo M.A., Porta J., Manchado M., Borrego J.J., Alvarez M.C. and Bejar J. 2008.** C-lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish and*

- Shellfish Immunology, 25(5): 697–700.
- Fletcher T.C., White A. and Baldo B.A. 1977.** C-reactive protein- like precipitin and lysozyme in lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. Comparative Biochemistry and Physiology, 57: 353–357.
- Fu G.H., Bai Z.Y., Xia J.H., Liu F., Liu P. and Yue G.H. 2013.** Analysis of two lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in Asian sea bass. PLoS ONE 8(11): 1–12 (e-79743).
- Gao F.Y., Qu L., Yu S.G., Ye X., Tian Y.Y., Zhang L., Bai J.J. and Lu M. 2012.** Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. Fish and Shellfish Immunology, 32(5): 779–788.
- Ghafoori Z., Heidari B., Farzadfar F. and Aghamaali M.R. 2014.** Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) during reproductive period. Fish and Shellfish Immunology, 37: 139–146.
- Gholipour Kanani H., Mirzargar S. S., Soltani M., Ahmadi A., Abrishamifar A., Bahonar A. and Yousefi P. 2011.** Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(3): 393–402.
- Grinde B., Lie O., Poppe T. and Salte R. 1988.** Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture, 68: 299–304.
- Hamlin H.J. 2005.** Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture, 253: 688–693.
- Hikima J., Hirono I. and Aoki T. 1997.** Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Molecular Marine Biology and Biotechnology, 6(4): 339–344.
- Hikima J., Hirono I. and Aoki T. 2003.** The lysozyme gene in fish. P: 301–309. In: Shimizu N., Aoki T., Hirono I. and Takashima F. (Eds.). Aquatic Genomics. Springer, Tokyo.
- Hikima J., Minagawa S., Hirono I. and Aoki T. 2001.** Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. Biochimica et Biophysica Acta, 1520(1): 35–44.
- Hinds Vaughan N. and L. Smith S. 2013.** Isolation and characterization

- of a c-type lysozyme from the nurse shark. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6): 1824–1828.
- Irwin D.M. 1996.** Molecular evolution of ruminant lysozymes. *EXS*, 75: 347–361.
- Irwin D.M. 2004.** Evolution of cow nonstomach lysozyme genes. *Genome*, 47: 1082–1090.
- Irwin D.M. and Wilson A.C. 1989.** Multiple cDNA sequences and the evolution of bovine stomach lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 264(19): 11387–11393.
- IUCN. 2012.** IUCN Red List Categories and Criteria. Gland and Cambridge, Switzerland. 32P.
- Jimenez-Cantizano R.M., Infante C., Martin-Antonio B., Ponce M., Hachero I., Navas J.I. and Manchado M. 2008.** Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1-2): 57–65.
- Kaizu A., Fagutao F.F., Kondo H., Aoki T. and Hirono I. 2011.** Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (52): 44344–44349.
- Kottelat M. and Freyhof J. 2007.** Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat, Switzerland. 646P.
- Larsen A.N., Solstad T., Svineng G., Seppola M. and Jorgensen T.O. 2009.** Molecular characterisation of a goose-type lysozyme gene in Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 26(1): 122–132.
- Liao Z.Y., Chen X.L. and Wu M.J. 2009.** Molecular cloning and functional analysis of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) growth hormone receptor. *Science in China Series C*, 52(10): 911–921.
- Liu F. and Wen Z.L. 2002.** Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebra fish. *Mechanisms of Development*, 113: 69–72.
- Ludwig A. 2006.** A sturgeon view on conservation genetics. *European Journal of Wildlife Research*, 52: 3–8.
- Mai W., Liu P., Chen H. and Zhou Y. 2014.** Cloning and immune characterization of the c-type lysozyme gene in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1): 305–314.
- Niu D., Peatman E., Liu H., Lu J., Kucuktas H., Liu S., Sun F., Zhang H., Feng T., Zhou Z., Terhune J., Waldbieser G., Li J. and Liu Z. 2011.** Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) genes in catfish play a novel role

- in innate immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(5): 568–579.
- Peatman E. and Liu Z. 2007.** Evolution of CC chemokines in teleost fish: A case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics*, 59: 613–623.
- Pourkazemi M. 2006.** Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past present and future. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1): 12–16.
- Rajabzadeh E., Asadi F., Jolodar A., Seyfi M.R., Shapouri A., Soltani M. and Eslami M. 2012.** Molecular cloning and expression of g-type lysozyme from the skin mucus of common carp (*Cyprinus carpio*) and its lytic activity. *Advanced Studies in Biology*, 4(9): 419–435.
- Saurabh S. and Sahoo P.K. 2008.** Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 29: 223–239.
- Soltani M. and Pourgholam R. 2007.** Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *Journal of Veterinary Research*, 62(2): 49–52.
- Swain P., Dash S. and Sahoo P.K. 2007.** Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 38–43.
- Uribe B., Folch H., Enriquez R. and Moran G. 2011.** Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinarni Medicina*, 56(10): 486–503.
- Vandesompele J., De Paepe A. and Speleman F. 2002.** Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, 303(1): 95–98.
- Wang N., Migaud L., Acerete L., Gardeur N.J., Tort L. and Fontaine P. 2003.** Mortality in non-specific immune response of Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, during the spawning season. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 523–524.
- Wang Q., Wang Y., Xu P. and Liu Z. 2006.** NK-lysin of channel catfish: Gene triplication, sequence variation, and expression analysis. *Molecular Immunology*, 43: 1676–1686.
- Wang R., Feng J., Li C., Liu S., Zhang Y. and Liu Z.H. 2013.** Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(1): 136–145.

- Wen Y. and Irwin D.M. 1999.** Mosaic evolution of ruminant stomach lysozyme genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 474–482.
- Xu P., Bao B., He Q., Peatman E., He C. and Liu Z. 2005.** Characterization and expression analysis of bactericidal permeability-increasing protein (BPI) antimicrobial peptide gene from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29: 865–878.
- Ye X., Zhang L.L., Tian Y.Y., Tan A.P., Bai J.J., Li S.J. 2010.** Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(5): 501–509.
- Zhou Z., Liu H., Liu S., Sun F., Peatman E., Kucuktas H., Kaltenboeck L., Feng T., Zhang H., Niu D., Lu J., Waldbieser G. and Liu Z. 2012.** Alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): molecular characterization, mapping and expression analysis of factors Bf/C2 and Df. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 186–195.





Research Paper

**Investigation of gene expression of C-type lysozyme from spleen, pancreas, anterior kidney and liver tissues in adult Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) by using the quantitative real-time PCR Method**

Mohammadreza Bivareh<sup>1\*</sup>, Hosna Gholipour Kannani<sup>2</sup>, Balal Sadeghi<sup>3</sup>,  
Hojatollah Jafaryan<sup>4</sup>

Received: June 2018

Accepted: October 2018

**Abstract**

This study aimed to evaluate C-type lysozyme gene expression in the liver, spleen, pancreas and head kidney of breeding *Acipenser persicus* based on gender with real-time PCR method. For this purpose, sampling of liver, spleen, pancreas and head kidney was done after artificial breeding from 16 fish including 8 males and 8 females. The tissues were transported to the laboratory in liquid nitrogen. After RNA extraction and cDNA synthesis, quantitative real-time PCR was done to examine the relevant gene expression in different tissues. The finding as the first record in this species showed that the C-type lysozyme gene was expressed in all investigated tissues and the expression rate between different tissues had a significant difference ( $P < 0.01$ ). The highest and lowest expression level of mRNA was observed in spleen and pancreas tissues, respectively. The expression of this gene in different gender of these species showed a significant difference ( $P < 0.01$ ). So, the expression rate of the C-type lysozyme gene in male tissues was significantly higher than females. Generally, according to the results, it can be stated that the expression rate of the C-type lysozyme gene in different tissues and genders of breeding *A. persicus* can be influenced by different factors whose potential effects may require further laboratory studies on this filed.

**Key words:** *Gene Expression, Enzyme Lysozyme, Real-Time PCR, Acipenser persicus.*

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

3- Assistant Professor in Food Hygiene and Public Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

4- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

\*Corresponding Author: [mohamadrezabivareh@yahoo.com](mailto:mohamadrezabivareh@yahoo.com)