علوم و فنون شیلات

فصلنامه علمی دوره ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۱۰ - ۱

تأثیر نونیل فنل بر تغییرات بیان ژن‌های ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت‌های کبد، طحال، آبشش و عضله تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

شیرین جمشیدی[۱]، محمدرضا کلباسی[۲]، مجید صادقی‌زاده[۳] و محمدعلی یزدانی ساداتی[٤]

۱- دانش آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤- استادیار، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری شهید دادمان، رشت، ایران

دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۲۲ پذیرش : ۱۳۹۲/۰۶/۱۲

* نویسنده مسئول مقاله: تلفن: ۰۱۲۲٦۲۵۳۱۰۱، E-mail: kalbassi_m@modares.ac.ir

چکیده:

تأثیر ماده شبه استروژنی نونیل فنل بر بیان ژن‌های ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت کبد، طحال، آبشش و عضله تاس ماهی ایرانی نوجوان بررسی شد. پس از تزریق داخل صفاقی ماهی با ۱۰۰ میلی‌گرم نونیل فنل، ۵ میلی‌گرم ۱۷ بتا استرادیول و۲ میلی‌لیتر ماده حامل روغن بادام زمینی به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی (به‌ترتیب به‌عنوان تیمار اصلی، کنترل مثبت و کنترل منفی)، RNA بافت‌های مورد مطالعه استخراج و به cDNA تبدیل، سپس واکنش RT-PCR برای هر بافت به‌طور جداگانه انجام شد. نتایج نشان داد که ویتلوژنین تنها در بافت کبد بیان شده، اما ژن زوناپلوسیدا ۳.۱ علاوه بر کبد، در بافت طحال در معرض نونیل فنل و هورمون ۱۷ بتااستراديول نیز واجد بیان بوده است. این در حالی است که برای ژن ویتلوژنین در بافت‌های طحال، آبشش و عضله و برای ژن زوناپلوسیدا ۳.۱ در بافت‌های آبشش و عضله هیچ‌گونه بیانی مشاهده نشد. میزان بیان ژن ویتلوژنین در تیمار با هورمون بتااستراديول درکبد ۲/٤۸± ۹/۹۵ و در تیمار نونیل فنل در کبد ۰/۳۵± ۲/۸۵ بود. میزان بیان ژن زوناپلوسیدا ۳.۱ در کبد برای تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم هورمون بتااستراديول درکبد ۲/۵۱±۹/۹۸ و در تیمار نونیل فنل در کبد ۰/۳۵±۳/۳۷ بود؛ میزان بیان ژن زوناپلوسیدا ۳.۱ در طحال ۰/۰۲۱± ۰/۲۵ بود ($p<0.05$). بنابراین، با توجه به تأثیر نونیل فنل بر تغییرات معنی‌دار بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌های کبد و طحال، می‌توان از این ژن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی در ردیابی تأثیرهای مواد شبه‌استروژنی در تاس‌ماهی ایرانی دریای خزر استفاده کرد.

کلید واژگان: ویتلوژنین، زونا پلوسیدا، نونیل فنل، بیان ژن، تاسماهی ایرانی

مقدمه

طی رشد فولیکول‌های تخمدان، تخمک‌ها با ماتریکس پروتئینی احاطه می‌شوند که به آن‌ها کوریون گفته می‌شود. این لایه از ۲ تا ٤ گلیکو پروتئین تشکیل شده است که پروتئین‌های زونا پلوسیدا نام دارند (Bork and Sander, 1992). پروتئین‌های زونا پلوسیدا نقش مهمی در لقاح دارند و مانع پدیده پلی اسپرمی می‌شوند. این پروتئین‌ها در پستانداران به‌عنوان شناساگر اسپرم عمل می‌کنند (Dean 2004; Hoodbhoy and Dean 2004). از لحاظ تنوع، حداقل شش نوع از این ژن در ماهیان گزارش شده است. زونا پلوسیدا ۳.۱ اولین بار در ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) شناسایی شده است (Murata و همکاران، ۱۹۹۵). این پروتئین در بسیاری از ماهیان از جمله کپور معمولی (Chang و همکاران، ۱۹۹٦)، قزل‌آلای رنگین کمان (Hyllner و همکاران، ۲۰۰۱) و ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sinensis*) گزارش شده است (Chung-ju و همکاران،۲۰۱۰). در ماهی خاویاری چینی مشخص شد که زیر خانواده زونا پلوسیدا ۳ دارای سه ایزوفرم می‌باشد که جایگاه تولید آنها اغلب کبد و به میزان بسیار کمی گناد و یا بافت‌های دیگر است.

ویتلوژنین (Vtg) نوعی فسفوگلیکوپروتئین سرمی در جانوران ماده است که در مهره‌داران تخم‌گذار در فرایند شکل‌گیری زرده تخمک، نقش اساسی دارد. ویتلوژنین پیش ماده پروتئین زرده تخمک، در پاسخ به تولید ۱۷ بتا استرادیول ترشح شده از لایه فولیکولی تخمدان در کبد تولید می‌شود (Hiramatsu and Hara, 1996; Silverstand and Haux ,1995; Wallace, 1985).

ویتلوژنین مولکولی بسیار سنگین (تقریباً با وزن مولکولی۲۵۰ تا ٦۰۰ کیلو دالتون) و کمپلکس کلسیمی ملحق شده با فسفوگلیکولیپید است. دسته‌بندی پروتئین فسفوگلیکوپروتئین از روی گروه‌های عملکردی شامل لیپیدها و کربوئیدرات انجام می‌شود که در استحکام مولکول نقش دارد (Silverstand and Haux, 1995; Kwon et al., 2001). از این‌رو امروزه به پروتئین‌های ویتلوژنین وزونا پلوسیدا به‌عنوان نشانگرهای زیستی ترکیبات استروژنی و شبه‌استروژنی در محیط‌های آبی توجه ویژه‌ای شده است. به‌صورت طبیعی این پروتئین‌ها فقط در سرم جانور ماده دیده می‌شود ولی جانور نر و نابالغ هم زمانی‌که با استروژن‌های خارجی و یا شبه‌استروژنی مواجه می‌شوند، این پروتئین‌ها را سنتز می‌کنند (Harries et al.1997; Hiramatsu et al., 2002; Sumpter, 1998).

با توجه به گزارش حضور نونیل فنل در دریای خزر به‌عنوان یکی از آلکیل فنل‌های رهاسازی شده در طبیعت (Mortazavi et al., 2011) و خاصیت استروژن‌زایی آن، احتمال تأثیر آن بر چرخه و بلوغ تولید مثلی این ماهی متصور است. از این‌رو این تحقیق تلاشی بر ارزیابی تأثیرهای نونیل فنل (به‌عنوان ترکیبی شبه استروژنی) بر اندام‌هایی نظیر کبد، آبشش، عضله و طحال و نقش آن‌ها در میزان بیان ژن‌های ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ به‌عنوان نشانگر زیستی ماده شبه استروژنی نونیل فنل در ماهی خاویاری دریای خزر است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این تحقیق سه تیمار متفاوت در تاسماهیان جوان ایرانی یک‌ساله نر و ماده در مرکز تحقیقات شهید دادمان گیلان انجام شد. بدین منظور هر تیمار روی ٦ ماهی۲۵۰ تا ٤۰۰ گرمی در تانک‌های ۵۰۰ لیتری جداگانه انجام شد. تیمارها به‌ترتیب عبارت است از: ۱- کنترل منفی شامل تزریق روغن بادام‌زمینی به‌عنوان ماده ناقل به میزان ۲ میلی‌لیتر بر

کیلوگرم وزن ماهی در هفته؛ ۲- کنترل مثبت شامل تزریق ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی هورمون ۱۷ بتا استرادیول به همراه ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن ماهی روغن بادام‌زمینی در هفته و ۳- تیمار اصلی شامل ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی نونیل فنل(Sigma Aldrich)به‌همراه ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن ماهی روغن بادام‌زمینی در هفته (Zhang et al., 2005).

تزریق‌ها در روز صفر، هفتم و چهاردهم پس از وزن کردن ماهی انجام شد و ۷۲ ساعت پس از تزریق آخر، بافت کبد، عضله، آبشش و طحال برای آزمایش‌های مولکولی برداشته و در نیتروژن مایع ذخیره‌سازی شد.

استخراج و ارزیابی RNA

استخراج RNA از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های فیکس شده کبد، آبشش، طحال و عضله نمونه‌های تیمار شده به‌وسیله کیت استخراج RNA شرکت (Roche, Germany) انجام شد. بافت پس از یخ‌زدایی داخل هاون کوبیده و بافر لیزکننده کیت روی آن ریخته شد. بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت Roche بدون هیچ تغییراتی انجام شد. در انتها بافر رقیق‌کننده حاوی RNA روی ژل برده شد تا کیفیت RNA سنجیده شود؛ سپس با دستگاه نانو دراپ کمیت آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. این کیت حاوی آنزیم DNase برای حذف DNA است. واکنشی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق (جدول ۱)، روی RNA استخراج شده قرار داده شد تا احتمال آلودگی با DNA کنترل شود.

واکنش Conventional-RT-PCR برای ژن‌های ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ و بررسی روی ژل آگارز ۲ درصد

مقدار یک میکروگرم از RNA استخراج شده به‌وسیله آنزیم نسخه‌بردار معکوس[1] شرکت(Roche, Germany)، طبق دستورالعمل آن شرکت به DNA تک رشته‌ای (cDNA) برای هر بافت به‌صورت جداگانه تبدیل شد.

آغازگرهای مورد استفاده برای ژن ویتلوژنین از مناطق مشابه mRNA بیان شده در ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontanus*) با شماره دستیابی بانک ژنی(U00455)، ماهی *Acanthogobius flaviamanus* با شماره دستیابی بانک ژنی(AB088473)، ماهی *Pimephales promelas* با شماره دستیابی بانک ژنی(AF130354)، ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) با شماره دستیابی بانک ژنی(AF414432)، ماهی گورخری (*Danio rerio*) با شماره دستیابی بانک ژنی (AF406784) که با نرم‌افزارBlast در بانک ژنی قسمت‌های مشابه آن‌ها مشخص شده بود، طراحی شدند.

آغازگرهای مورد استفاده برای ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ با استفاده از مناطق مشابه اسید آمینه‌ای تمامی ایزوفرم‌های ژن زونا پلوسیدا۳ تاس‌ماهی چینی یعنی فرم ۱،۲ و ۳ طراحی شد (دارای شماره دستیابی بانک ژنی FJ610233، FJ610234،HM06797 هستند). این طراحی به شکلی انجام شد که تنها ایزوفرم ۱ آن تکثیر شده و مابقی تکثیر نشدند. از ژن 18s rRNA نیز به‌عنوان کنترل داخلی و بررسی صحت انجام واکنش RT-PCR استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده و شماره بازیابی بانک ژنی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

واکنش اولیه با استفاده از RT-PCR برای این دو ژن در دستگاه ترموسایکلر Genius در واکنش‌های ۲۵ ماکرولیتری انجام پذیرفت. این واکنش شامل ۲.۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، dNTPs (۱۰ میلی مولار)، نیم میکرولیتر از هر کدام

[1] Reverse transcriptase

از آغازگرها (با غلظت۲۰ پیکو مول بـر میکرولیتـر)، Taq DNA پلـی مـراز بـه مقـدار ۰.۱۲۵ میکرولیتـر (بـا غلظت5unit/µl)،$MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) ۰.۷۵ میکرولیتـر، ۰.۵ میکرولیتر از DNA تک رشته‌ای ساخته شده در مرحله قبل و در نهایت رسـاندن بـه حجـم ۲۵ مـاکرولیتر بـا آب دیونیزه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر این دو ژن شامل واسرشته‌سازی اولیه (۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۵ دقیقـه)، ۳۵ سـیکل حرارتـی شـامل مرحلـه واسرشته‌سـازی (دمـای ۹٤ درجـه سـانتی‌گـراد ۳۰ ثانیـه)، مرحله الحاق (دمای٦۰ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه بـرای ژن ویتلوژنین و کنترل داخلـی 18s rRNA،۳۰ ثانیـه بـرای ژن زونا پلوسـیدا ۳.۱) و مرحلـه گسـترش (دمـای ۷۲ درجـه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه)، و بـالاخره مرحلـه گسـترش انتهـایی (دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه) بود.

واکنش زنجیره پلی مراز برای آزمودن تکثیر ژن کنتـرل داخلی برای صحت انجام واکنش RT-PCR، برای تمـامی نمونه‌های بافـت‌هـای مـورد مطالعـه انجـام شـد. در انتهـا محصـولات واکـنش PCR روی ژل ۲ درصـد الکتروفـورز شد. محصولات به‌دست آمده برای انـدام‌هـای متفـاوت در واکنش PCR روی ژل برده شد و وجود یـا نبـود بانـد در بافت مورد نظر بررسی شد.

واکنش کمی PCR (Real time PCR)

برای بررسی میزان بیان ژن‌های ویتلوژنین و مقایسـه آن‌هـا از روش کمیReal-time PCR استفاده شد. نمونـه‌هـا در پلیت‌های ۹٦ خانه‌ای آماده‌سازی شدند. در این واکـنش از فناوری رنگ فلورسـانس Syber Green اسـتفاده شـد. در هر واکنش مواد ذیل اضافه شـد: الگـو کـه شـامل cDNA حاصـل از مرحلـه سـاخت cDNA اسـت. ایـن الگـو بـه نسبت یک به ده به‌وسیله بـافر آنـزیم ترانسـکریپتاز رقیـق شد. آغازگرهای مستقیم و معکـوس هـر کـدام بـا غلظـت ۰/۲۵ ماکرومولاراستفاده شد. مخلـوط Premix Ex Syber Green به میـزان ۱۰µl، Rox reference dye بـه میـزانµl ۰/۵و مـابقی آب مقطراسـتریل تـا حجـم ۲۵ میکرولیتـر استفاده شد. برای هر سری واکنش دو سـری کنتـرل منفـی قرار داده شد: ۱- کنترل منفی اول کـه شـامل تمـام مـوارد بالا به غیر از الگو است. ۲- کنتـرل منفـی دوم کـه شـامل RNA اسـتخراج شـده بـدون طـی مرحلـه cDNA سـازی است و این کنترل برای ردیابی احتمالی آلودگی بـه DNA ژنومی است . واکـنش در دسـتگاه ABI Biosystem 7500 انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در تجزیـه کمّـی Real-time PCR بـر اسـاس دوره‌هـای آسـتانه(Ct)بـه‌دسـت آمـده از نمونـه‌هـای مـورد آزمـایش (تیمارهای در معرض قرار گرفته با نونیل و کنترل مثبـت)، با نمونه‌های کنترل منفی (تزریق شده با ناقل) و با اسـتفاده از فرمـولΔΔCt، نسـبت ژن هـدف بـه ژن کنتـرل داخلـی (مرجع) با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شد.

(Muller et al.,2002)(۱) :$R=۲^{-\Delta\Delta Ct}$

برای محاسبات آماری از برنامه SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. چون داده‌ها طبیعی نبودند از آزمون غیرپارامتریک Kruskal Wallis استفاده شد. در مرحله بعد برای تشخیص اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. نتایج به شکل میانگین± خطای معیار میانگین (SEM)نشان داده شده است.

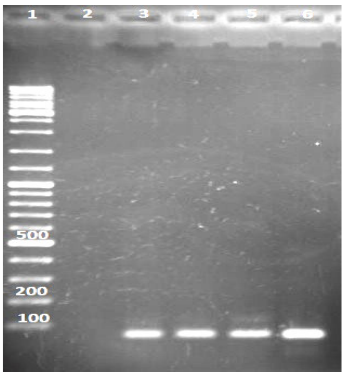
جدول ۱ پرایمرهای طراحی شده برای واکنش RT-PCR

ژن مورد بررسی	نام پرایمر و توالی آن‌ها	اندازه تکثیر شده باند موردنظر
AsZP3.1-RTF AsZP3.1-RTR	CTCACCCTGGCTCGGTTCTC AGCTGACCGATACCGAACAG	192bp
Vtg-F Vtg-R	GCACCAGCTCACTCCATTCAA CCTCCAAAACAAGCTTCTGCC	۸۰bp
18s rRNA (internal control)	CTTTCGAGGCCCTGTAATTG ACCGCGGCTGCTGGCACCAG	۲۳۰bp

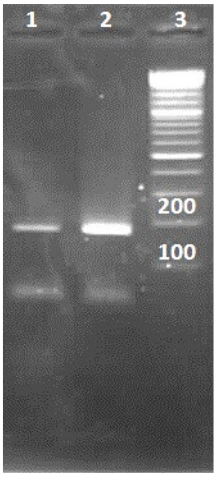
نتایج:

تأثیر ماده نونیل فنل روی بیان ژن ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت کبد

نتایج حاصل از واکنش RT-PCR ژن ویتلوژنین نشان داد که این ژن برای گونه تاس‌ماهی ایرانی فقط در کبد بیان دارد (شکل ۱- الف) و بیان ژنی برای اندام‌های آبشش، طحال و عضله مشاهده نشد (شکل ۱- ب)؛ بیان ژن ویتلوژنین در نمونه‌های کنترل مثبت و تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نونیل فنل بر وزن بدن ماهی. همچنین نتایج نشان داد که صحت واکنش RT-PCR مورد تأیید است، زیرا ژن کنترل داخلی در تمامی تیمارها به یک شکل بیان شده است (شکل۲). ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت کبد در نمونه‌های تحت تیمار با هورمون به‌عنوان کنترل مثبت و نونیل فنل دارای بیان بود، اما هیچ بیانی در تیمار کنترل منفی (بدون نونیل فنل و هورمون ۱۷ بتا استرادیول) نشان نداد.



شکل ۱- الف. قطعه تکثیر شده ژن ویتلوژنین در کبد تیمارهای کنترل مثبت (ردیف ٦) و تحت تیمار با نونیل فنل (ردیف ۳، ٤ و٥)؛ ردیف دوم تیمار کنترل منفی است؛ ردیف اول نشانگر مولکولی

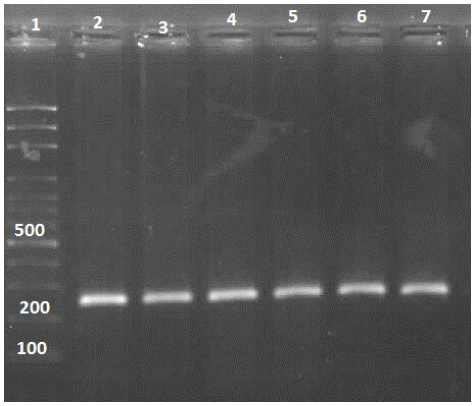


شکل ۱- ب. قطعه تکثیر شده ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در کبد در تیمارهای کنترل مثبت (ردیف ۲) و تحت تیمار با نونیل فنل (ردیف ۱).

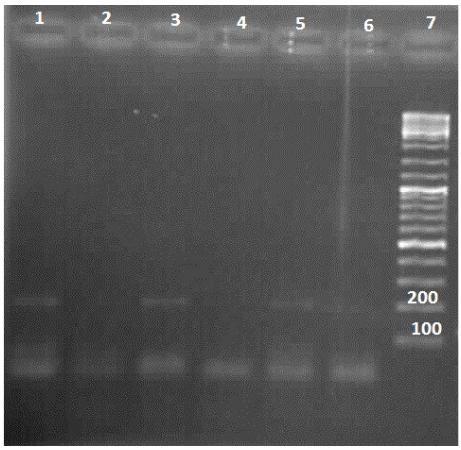
تأثیر ماده نونیل فنل روی بیان ژن ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت‌های طحال، آبشش، عضله

نتایج واکنش RT-PCR ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ نشان داد که این ژن در بافت طحال دارای بیان است، ولی بیان قابل مشاهده روی ژل ۲ درصد برای این ژن در اندام‌هایی مثل آبشش و عضله دیده نشد. بیان ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ برای

نمونه‌های تیمار شده با هورمون و ماده شبه‌استروژنی نونیل فنل قابل مشاهده است (شکل ۳). همچنین در تمامی تیمارها ژن کنترل داخلی کیفیت یکسانی از نظر بیان نشان داده است. بیان ژن ویتلوژنین در بافت‌های طحال، آبشش، عضله تاسماهی ایرانی مشاهده نشد.



شکل ۲– قطعه تکثیر شده از کنترل داخلی ژن 18s rRNA برای چک کردن صحت واکنش RT-PCR؛ ردیف دوم وسوم نمونه‌های کنترل مثبت و ردیف چهارم و پنجم نمونه‌های تیمار شده با نونیل فنل و ردیف ششم و هفتم نمونه‌های کنترل منفی است.



شکل ۳ قطعه تکثیر شده ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در طحال تیمارهای کنترل مثبت و تحت تیمار با نونیل فنل؛ ردیف ۱، ۳، ۵ قطعه تکثیر شده ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت طحال و ردیف ۲، ٤ و٦ در بافت آبشش است که هیچ قطعه‌ای تکثیر نشده است.

بیان کمّی ژن ویتلوژنین در کبدوژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در کبد وطحال

با مقایسه میزان بیان دو ژن در اندام‌ها، میزان بیان ژن ویتلوژنین در تیمارهای در معرض با غلظت ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷ بتااستراديول در کبد برابر ۲/٤۸± ۹/۹۵ و در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم نونیل فنل بر کیلوگرم وزن بدن ماهی در کبد برابر ۰/۳۵± ۲/۸۵بود ($p<0.05$). میزان بیان ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در کبد برای تیمار در معرض با غلظت ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷ بتااستراديول در کبد برابر ۲/۵۱± ۹/۹۸ و در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم نونیل فنل بر کیلوگرم وزن بدن ماهی در کبد برابر ۰/۳۵±۳/۳۷ بود. میزان بیان ژن زونا پلوسیدا ۳.۱ در طحال برابر۰/۰۲۱ ± ۰/۲۵بوده است.

بحث

تحقیق حاضر اولین مطالعه روی تغییرات بیان ژن ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در برخی از اندام‌ها مثل آبشش، طحال و عضله در مجاورت عوامل شبه‌استروژنی در تاسماهی ایرانی است.

تاسماهی ایرانی یکی از ماهیان با ارزش شیلاتی دریای خزر است و موضوع حفظ ذخایر این ماهی بسیار حائز اهمیت است. با توجه به جایگاه این ماهی در قسمت بالای زنجیره غذایی توجه به مسئله آلودگی دریا و تأثیر آن روی سیستم تولید مثلی ماهی ضروری است. Khodoreskaya و همکاران (۱۹۹۷)، Lukyanenko و همکاران (۱۹۹۹) و Ivanov و همکاران (۱۹۹۹) ثابت کردند که جمعیت‌های ماهیان خاویاری دریای خزر به‌علت برداشت بیش ازحد، کاهش مناطق تخم‌ریزی و برخی از عوامل آلوده‌کننده شیمیایی کاهش یافته است.

Chuang-Ju و همکاران (۲۰۱۱)، در ماهی خاویاری چینی *Acipenser sienensis* ثابت کردند که زیر واحد یک

ژن ZP3 در بافت‌های تخمدان، کبد، طحال و قلب ماهیان یک‌ساله و دوساله، دارای بیان است، ولی زیر واحد ۲ و ۳ تنها در بافت تخمدان و در سنین بالاتر یعنی ۳ و ٤ سال دارای بیان است. مطالعه حاضر نشان داد که در مجاورت عوامل استروژنی بیان زونا پلوسیدا ۳.۱ در بافت کبد، که اغلب تولید آن در این بافت است، می‌تواند در سنین پایین‌تر هم القا شود و بیان زود هنگام این ژن به همراه ژن ویتلوژنین در این مطالعه می‌تواند به‌عنوان نوعی نشانگر زیستی در این خصوص مورد توجه قرار گیرد. Wang و همکاران (۲۰۰۰ و ۲۰۰۵) با بررسی میزان بیان ویتلوژنین در کبد ماهی گورخری (*Danio rerio*) و بافت روده آن به این نتیجه رسیدند که بیان ژن ویتلوژنین در کبد به اندازه ۹۵ درصد و در بافت روده به اندازه ۵ درصد بوده است. بیان ژن ویتلوژنین علاوه بر موارد ذکر شده، در گونه‌های دیگر مثل آزاد ماهی اقیانوس اطلس هم دیده شده است. Arukwe و Røe (۲۰۰۸) هم با در معرض قرار دادن ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در برابر غلظت‌های متفاوت نونیل فنل، به این نتیجه رسیدند که بیان ژن ویتلوژنین و زونا رادیاتا در ماهی آزاد به غلظت نونیل فنل و مدت در معرض بودن ماهی با این ماده بستگی دارد. همچنین بیان این دو ژن علاوه بر کبد، در موکوس پوست و پوست هم دیده شده است.

در مطالعه‌ای در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تأثیر نوع دیگری از عوامل استروژنی مثل zeranenol با غلظت‌های متفاوت، نشان داده شد که این ماده منجر به بیان زود هنگام ژن ویتلوژنین و زونا رادیاتا شده است (Arukwe *et al.*, 2002). همچنین مطالعه‌ای دیگر از سوی Celius وهمکاران (۲۰۰۰) در همین گونه نشان داد که زونا رادیاتا نشانگر قوی‌تری برای حضور عوامل استروژنی در طبیعت است.

نتایج کلی بیانگر این است که بیان ژن ویتلوژنین و زونا پلوسیدا ۳.۱ در مجاورت عوامل استروژنی و شبه‌استروژنی دستخوش تغییرات شده است. با توجه به گزارش اخیر ماده نونیل فنل به همراه مواد شبه‌استروژنی دیگر مثل اکتیل فنل در دریای خزر(Mortazavi *et al.*, 2011) و اثرهای سینرژتیک مواد شبه‌استروژنی بر تولید ویتلوژنین و تأثیر روی سیستم تولید مثلی آبزیان و موجودات با ارزش دریای خزر به‌خصوص گونه تاس‌ماهی ایرانی، لزوم ردیابی این مواد پر اهمیت جلوه می‌کند. این دو ژن در دوره تولید مثلی ماهی نقش به‌سزایی داشته و با توجه به این‌که در طبیعت جانور با گستره عظیم مخلوطی از ترکیبات مواد شبه‌استروژنی روبه‌رو است، می‌توانند سلامت جانور را تحت‌الشعاع قرار داده و نسل‌های آینده را با خطر انقراض مواجه کنند و یا از طریق تغذیه از سوی انسان، سلامت انسان را به مخاطره اندازد. از این‌رو پیشنهاد می‌شود برای درک عمیق‌تر چگونگی تأثیرگذاری عوامل شبه‌استروژنی در تاس‌ماهی ایرانی با توجه به گزارش بیان ژن‌های ویتلوژنین و زونا پلوسیدا در بافت‌های دیگر در آبزیان مختلف، علاوه بر ادامه ردیابی پروفایل بیان ژن‌های مذکور در دیگر اندام‌ها، میزان بیان در زمان‌های متفاوت از دورهٔ جوانی و تولید مثلی ارزیابی شود تا هم بهترین نشانگر زیستی که بتواند حضور حداقل ماده استروژن‌زا راردیابی کند و هم پر مخاطره‌ترین زمان در معرض قرار گرفتن برای این گونه ارزشمند دریای خزر مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت بخش تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دادمان گیلان به‌دلیل همکاری در فراهم‌سازی امکانات مورد نیاز این پروژه در زمان تیمارها و همچنین از

همکاری آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم‌زیستی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Arukwe, A., Kullman, S.W., Berg, K., Goksoyr, A., Hinton, D.E. 2002. Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell *zona radiata* protein complementary DNA: mRNA expression in17b-estradiol- and nonylphenol-treated fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B, 132: 315-326.

Arukwe, A., Røe, K. 2008. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol, *Cell tissue research*, 331: 701-712.

Bork, P., Sander, C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Letters*, 300: 237-240.

Chang, Y. S., Wang, S. C, Tsao, C. C, Huang, F. 1996. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. *Molecular Reproduction and Development*, 44: 295-304.

Chuang-Ju, L., Qi-We, W., Xi-Hua, C., Li, Z., Hong, C., Fang, G., Jian-Fang, G. 2011. Molecular characterization and expression pattern of three zona pellucida 3 genes in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 471-484.

Christiansen, L. B., Pedersen, K. L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 1998. Estrogenicity of Xenobiotics in Rainbow Trout *(Oncorhynchus mykiss)* using *in vivo* Synthesis of Vitellogenin as a Biomarker. *Marine Environmental Research*, 46: 137-140.

Celius, T., Haugen, T. B., Grotmol, T., Walther, B. T. 1999. A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenicpotency of xenobiotics and mycotoxins, *Environmental Health Perspectives*, 107; 63-68.

Colborn, T., Saal, F. S., A. M. Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environmental Health Perspectives*. 101, 378.

Damstra, T., Page, S.W. and Herrman, J.L. 2002. Meredith T: Persistent organic pollutants: potential health effects, *Journal of Epidemiol Community Health,* 56: 824-825.

Dean, J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm–egg recognition with mouse genetics. *Bioessays*, 26: 29-38.

Harries, J. E., Shehan, D. D., Jobling, S., et al., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom Rivers detected by measurementof vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 534-542.

Hiramatsu, N., Hara, A., 1996. A relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 115A, 243-251.

Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Hirano, K., 2002. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso Huso x Acipenser ruthenus*): identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131, 429-441.

Hoodbhoy, T., Dean, J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm–egg recognition in mammals. *Reproduction*, 127: 417-422.

Hyllner, S.J., Westerlund, L., Olsson, P.E., Schopen, A. 2001. Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biology of Reproduction*, 64, 3:805-11.

Ivanov, V. P., Vlasenko, A. D., Khodorevskaya, R. P., Raspopov, V. M., 1999. Contemporary status of Caspian sturgeon (Acipenseridae) stock and its conservation. *Journal of Applied Ichthyology*, 15,103-105.

Khodorevskaya, R. P., Dovgopol, G. F., Zhuravleva, O. L., Vlasenko, A. D., 1997. Present status of commercial stocks of sturgeons in the Caspian Sea basin. *Environmental Biology of Fish*, 48, 209-219. 4: 805-811.

Lukyanenko, V. I., Vasilev, A. S., Lukyanenko, V. V., Khabarov, M. V., 1999. On the increasing threat of extermination of the unique Caspian sturgeon populations and the urgent measures required to save them. *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 99-102.

Kwon, J.Y., Parat, F., Randal, C and Tyler, C.R. 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 65: 1701-1709.

Mortazavi, S., Riyahi Bakhtiari, A., Esmaili Sari, A., Bahramifar, N., F Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali. Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-

Sumpter, J. P. 1998. Xenoendocrine disrupters-environmental impacts**. Toxicology Letter**, 102-103: 337-342.

Wallace, R. A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmamalian vertebrate. In: Browder, L.W. (Ed.), Developmental Biology 1. Plenum Press, New York, 127-177 pp.

Wang, H., Tan, J. T. T., Emelyanov, A., Korzh, V., Gong, Z., 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio. Genetics*, 356, 91-100.

Wang, H., Yan, T., Tan, J. T. T., Gong, Z., 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Genetics*, 256, 303-310.

Zhang, Z., Hu, J., An, W., Jin, F., An, L., Tao, S., Chen, J. 2005. Induction of vitellogenin mRNA in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) treated by 17-ß estradiol and 4-nonylphenol, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, No. 8, 1944-1950 pp.

nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A, *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1067.1073.

Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., et al., 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. BioTechniques, 23: 2-7.

Murata, K., Sasaki, T., Yasumasu, S., Iuchi, I., Enami, J., Yasumasu, I and Yamagami, K. 1995. Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*,167: 9-17.

Silverst, C and Haux, C. 1995. Fatty acid composition of vitellogenin from four Teleost species. *Journal of Camparative Physiology*, 164: 593-599.

Specker, J. L., Sullivan, C. V., 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: Davey, K.G., Peter, R. E., Tobe, S. S. (Eds.), Perspective in Comparative Endocrinology. National Research Council, Ottawa, Ontario, 304-315 pp.

Comparison of nonylphenol effect on Vitellogenin and Zona pellucida3.1 genes expression changes in liver, spleen, gill and muscle tissues of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)

Shirin Jamshidi[1], Mohammadreza Kalbassi[2*], Majid Sadeghizadeh[3] and Mohammadali Yazdani Sadati[4]

1. Graduated Ph.D. student, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
3. Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Shahid Dadman International sturgeon fishes institute, Rasht, Iran

Received: 13.10.2012 Accepted: 03.09.2013

Corresponding author: kalbassi_m@gmail.com, 01226253101

Abstract: The effect of nonylphenol on vitellogenin and zona pellucida 3.1 expressions in the liver, spleen, gill and muscle tissues of the juvenile Persian sturgeon were investigated. The fish were initially injected per kilogram of their body weights with 100mg nonylphenol, 5mg 17 beta estradiol, and 2ml peanut oil carrier agent (respectively, for the main treatment, positive and negative controls), and had the extracted RNA of their tissues converted into cDNA. Afterwards, RT-PCR reaction for each tissue sample was done separately. Results showed vitellogenin gene was expressed only in the liver, but zona pellucid 3.1 gene was expressed in the liver as well as the spleen of the fish exposed to nonylphenol and 17 beta estradiol. No vitellogenin gene in the spleen, gill and muscle was expressed; no gene for zona pellucida 3.1 was either observed in the gill and muscle. The expression rate of vitellogenin gene was 9.95±2.48 for the treatment with 17 beta estradiol and 2.85 ± 0.35 with nonylphenol; the expression rate of zona pellucida 3.1 was 9/98 ± 2/51 for exposed treatment with 17 beta estradiol and 3.37±0.35 for the treatment with nonylphenol. In conclusion, considering the meaningful effect of nonylphenol on vitellogenin and zona pellucid 3.1 expression in liver and spleen, it could be used for detection of xenoestrogen biomarker in the Persian sturgeon.

Keywords: Vitellogenin, Zona pellucida 3.1, Nonylphenol, Persian sturgeon