مجله بوم شناسی آبزیان

انتخاب مناسب‌ترین ژن‌های رفرنس جهت مطالعات Real-time PCR در مراحل ابتدایی زیست تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus*

آرش اکبرزاده[1*]، حمید فرحمند[2]، فروزنده محجوبی[3]، محمد علی نعمت اللهی[2]، کمال الدین حق بین[3]، حامد کلنگی میاندره[4]

[1] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان

[2] گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[3] پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری (NIGEB)

[4] گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۲/۰۴/۸
اصلاح: ۹۲/۰۷/۱۰
پذیرش: ۹۲/۰۷/۲۰

کلمات کلیدی:
تاسماهی‌ایرانی
ژن رفرنس
mRNA
Real-TimePCR

چکیده

در مطالعاتی که از تکنیک Real-time PCR کمی استفاده می شود، به منظور کمی سازی داده های حاصل از اندازه گیری سطوح mRNA می بایست میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن رفرنس داخلی نرمال سازی کرد. از آنجا که سطح بیان ژن کنترل داخلی می بایست در بین بافت‌های مختلف و نیز تمامی مراحل رشد یک موجود زنده ثابت بوده و نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار نگیرد، در هر یک از آزمایش های بیان ژن می بایست ثبات و پایداری بیان چندین ژن رفرنس مورد آزمایش و ارزیابی قرار گیرد تا مناسب ترین ژن رفرنس به منظور نرمال سازی داده های حاصل از بیان ژن هدف انتخاب گردد. در مطالعه حاضر ثبات بیان شش ژن رفرنس شامل actin- beta (*ACTB*)، Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)، Ribosomal protein L6 (*RPL6*)، Ubiquitin (*UBQ*)، Ribosomal protein L13 (*RPL13*) و Elongation factor 1-alpha (*EF1A*) در طی مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاسماهی ایرانی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR *Taq*Man مورد ارزیابی قرار گرفت. برآیند کلی نتایج حاصل از نرم افزارهای geNorm، Bestkeeper و NormFinder نشان داد که دو ژن *RPL6* و *ACTB* از بیشترین ثبات بیان ژن برخوردار بودند، در حالیکه ژن *RPL13* بیشترین تغییرات بیان ژن را از خود نشان داد. بر این اساس استفاده از ژن های *RPL6*، *ACTB* و نیز میانگین هندسی آنها به منظور نرمال سازی داده های بیان ژن هدف در مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاسماهی ایرانی و نیز سایر گونه های تاسماهیان توصیه می شود.

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: akbarzadeh@ut.ac.ir

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

مقدمه

امروزه تکنیک PCR کمی[۱] به طور متداولی به منظور اندازه‌گیری و مقایسه سطوح RNA مورد استفاده قرار می گیرد که از جمله دلایل آن می توان به دقت، تکرارپذیری، اختصاصی بودن، حساسیت و نیز توان عملیاتی بالای آن اشاره کرد (Infante *et al.*, 2008; McCurley & Callard, 2008; Mitter *et al.*, 2009; Small *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2008). در این تکنیک، به منظور کمی سازی داده‌های حاصل از اندازه گیری سطوح mRNA می توان میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن رفرنس داخلی مورد سنجش قرار داد (Bustin, 2000). نرمال سازی داده های حاصل از PCR کمی به منظور کنترل و از بین بردن خطای ناشی از بکارگیری نمونه ها در طی مراحل مختلف زمانی در خلال فرآیند آزمایش، ضروری است (Dheda *et al.*, 2005). سطح بیان ژن کنترل داخلی می بایست در بین بافت های مختلف یک موجود زنده و نیز در بین تمامی مراحل رشد و تمایز موجود ثابت بوده و همچنین میزان بیان آن تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار نگیرد (Bustin, 2000). به همین دلیل در هر یک از آزمایش های بیان ژن می بایست ثبات و پایداری بیان چندین ژن رفرنس مورد آزمایش و ارزیابی قرار گیرد تا در نهایت مناسب‌ترین ژن رفرنس به منظور نرمال سازی داده‌های حاصل از بیان ژن هدف انتخاب گردد (Tang *et al.*, 2007).

تحقیقات در زمینه مطالعه میزان بیان ژن‌های مختلف در مراحل ابتدایی زیست ماهیان با استفاده از تکنیک Real-time PCR روز به روز در حال افزایش است (Sæle *et al.*, 2009). بنابراین، تعیین ژن‌های رفرنس مناسب در مراحل ابتدایی زیست گونه های مختلف ماهیان از اهمیت به سزایی برخوردار است. اخیراً، مطالعات مختلفی در زمینه ارزیابی ثبات و پایداری بیان ژن-های رفرنس در مراحل ابتدایی زیست ماهیان به منظور انتخاب مناسب ترین ژن رفرنس جهت نرمال سازی داده‌های حاصل از بیان ژن هدف صورت گرفته است. به عنوان مثال در ماهی زبرا *Danio rerio* (McCurley & Callard, 2008)، ماهی فلاندر ژاپنی *Paralichthys olivaceus* (Zhong *et al.*, 2008)، ماهی کاد اقیانوس اطلس *Gadus morhua* (Sæle *et al.*, 2009) و ماهی باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* (Mitter *et al.*, 2009) ژن‌های رفرنس مختلف در مراحل ابتدایی رشد و تکامل مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته‌اند.

با توجه به کاهش چشمگیر ذخایر ماهیان خاویاری حوزه دریای خزر در خلال سال‌های اخیر و به منظور بازسازی ذخایر، سالانه میلیون‌ها قطعه بچه ماهی خاویاری به طور مصنوعی تکثیر و به دریای خزر رهاسازی می شوند (Nazari *et al.*, 2010). موفقیت در تولید مثل مصنوعی و تولید لاروها و بچه ماهیان خاویاری با کیفیت مستلزم انجام تحقیقات مولکولی و ژنتیکی بر روی مکانیزم‌های مختلف رشد، تولید مثل و ایمنی در مراحل جنینی و لاروی این ماهیان است و از این رو، استفاده از تکنیک PCR کمی به منظور ارزیابی سطوح بیان ژن های دخیل در مسیرهای مختلف زیستی در مراحل ابتدایی زیست تاسماهیان از اهمیت به سزایی برخوردار است. در بسیاری از مطالعات بیان ژن در ماهیان خاویاری به‌طور معمول از یکی از دو ژن ACTB و یا 18s rRNA به عنوان ژن‌های کنترل داخلی برای نرمال سازی داده های بیان ژن هدف استفاده شده است (Amberg *et al.*, 2009; Hurvitz *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; ZhiYong *et al.*, 2009)، بدون آنکه ثبات بیان و مناسب

[۱] - Quantitative PCR

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

بودن آنها جهت نرمال سازی داده های ژن هدف مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی ثبات و پایداری بیان ژن‌های رفرنس مختلف به منظور انتخاب مناسب ترین آنها برای نرمال سازی داده های بیان ژن هدف در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهیان می باشد. بدین منظور مطالعه موردی بر روی تاسماهی ایرانی به عنوان گونه با ارزش و بومی سواحل جنوبی دریای خزر انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، کلیه نمونه‌های تخم، لارو و بچه ماهیان مورد نیاز از تکثیر مصنوعی مولدین تاسماهی ایرانی در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر رشت در سال ۱۳۸۸ به دست آمد. هفت روز پس از انجام عملیات تکثیر و لقاح تخم‌ها در دمای ۱۵-۱۲ درجه سانتیگراد و میزان اکسیژن محلول ۹-۷ میلی گرم در لیتر، لاروهای تاسماهی ایرانی تفریخ شدند و پس از وزن شدن بلافاصله به حوضچه‌های پرورشی ونیرو منتقل شدند. نمونه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر، حاصل از تکثیر همزمان چندین جفت مولد تاسماهی ایرانی بودند که به طور تصادفی انتخاب و در حوضچه‌ای جداگانه نگهداری شدند. ١٤ روز پس از تفریخ در بازه دمایی ۱۵-۹ درجه سانتیگراد، لاروها شروع به تغذیه خارجی با نائوپلیوس آرتمیا (با تراکم ۳۰ درصد بایوماس) کردند. ۲۵ روز پس از پرورش لاروها در حوضچه‌های ونیرو، بچه ماهیان جوان به استخرهای خاکی منتقل شدند و حدود دو ماه پس از تفریخ، بچه ماهیان انگشت قد تاسماهی ایرانی آماده رهاسازی بودند. تمامی لاروها و بچه ماهیان مورد استفاده در تحقیق حاضر در شرایط پرورشی یکسان نگهداری شدند. در مجموع ۱۰ مرحله زمانی در طی مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاسماهی ایرانی شامل دو روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم (جنین پس از مرحله چشم زدگی)، لارو صفر روزه (زمان بیرون آمدن لارو از تخم)، لاروهای ۱، ۳ و ٦ روزه (دوره کمون یا دوره‌ای که لاروها از ذخیره کیسه زرده تغذیه می کنند)، لارو ۱۰ روزه (زمان تغذیه مختلط داخلی و خارجی)، لارو ۱۵ روزه (زمان شروع تغذیه فعال)، لارو ۲۰ روزه، لارو ۲۵ روزه (پایان زمان پرورش در حوضچه‌های ونیرو) و بچه ماهی ۵۰ روزه (بچه ماهیان انگشت قد پرورش داده شده در استخرهای خاکی) انتخاب و نمونه‌های مورد نیاز در هر یک از زمان‌های یاد شده به صورت تصادفی انتخاب و جهت بررسی‌های بیان ژن و فعالیت آنزیمی به ترتیب به درون ویال‌های ۱/۵ml عاری از RNase و معمولی قرار داده شدند و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور و جهت انجام آزمایشات بعدی به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری و آزمایشگاه ژنتیک بخش ژنتیک و فیزیولوژی جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه تورکو[2] در کشور فنلاند منتقل شدند.

در هر یک از مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاسماهی ایرانی، RNA شش نمونه استخراج گردید (تعداد تکرارهای آزمایش). استخراج RNA با استفاده از محلول Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) انجام شد. سپس تیمار DNase با استفاده از کیت Invitrogen DNase I (Invitrogen, CA, USA) و ساخت رشته DNA مکمل با استفاده از کیت DyNAmo^{TM} (Finnzymes, Espoo, Finland) و بر اساس دستورالعمل های موجود در کیت انجام گرفت. تعیین کمیت RNA استخراج شده با دستگاه NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) انجام شد.

در مجموع شش ژن رفرنس شامل Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)، ribosomal protein L6 (*RPL6*)، ribosomal protein L13 (*RPL13*)، Elongation factor 1-alpha (*EF1A*)، Ubiquitin (*UBQ*) و beta-actin

[2] - Turku

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

(*ACTB*) انتخاب گردید. از آنجا که تاکنون توالی ژن‌های *RPL6*، *RPL13*، *EF1A* و *UBQ* در ماهیان خاویاری مورد شناسایی قرار نگرفته است و هیچگونه اطلاعاتی نیز در این زمینه در بانک‌های اطلاعاتی موجود نمی باشد، در ابتدا لازم بود تا با استفاده از آغازگرهای یونیورسال، ژن‌های فوق در تاسماهی ایرانی جداسازی و توالی آنها مورد شناسایی قرار گیرد. بدین منظور در ابتدا توالی ژن‌های *RPL6*، *RPL13*، *EF1A* و *UBQ* در تتراپودا (انسان، موش، مرغ و قورباغه) و ماهیان استخوانی شامل ماهی زبرا (*Danio rerio*)، مداکا (Oryzias latipes)، سه خاره (Gasterosteus aculeatus) و فوگو (*Fugu rubripes*) از بانک های ژنی NCBI و Ensembl استخراج و نواحی حفاظت شده این ژن‌ها با بهره گیری از نرم افزار BioEdit (version 7.0.8) تعیین شد. پس از آن آغازگرهای یونیورسال با استفاده از نرم افزار طراحی آغازگر و پروب netprimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer) بر اساس نواحی حفاظت شده ژن‌های فوق طراحی گردید. به منظور افزایش احتمال به دست آوردن قطعات مورد نظر، برای هر ژن رفرنس سه الی چهار جفت آغازگر مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۱). به منظور بررسی صحت واکنش، پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ قطعات به دست آمده با اندازه صحیح برش داده شدند و سپس عمل توالی یابی بر روی قطعات استخراج شده انجام گرفت. پس از به دست آوردن توالی دقیق ژن-های رفرنس *RPL6*، *RPL13*، *EF1A* و *UBQ*، اقدام به طراحی آغازگرهای تخصصی برای ژن‌های مذکور گردید. توالی ژنهای *RPL6*، *EF1A*، *RPL13* و *UBQ* در تاسماهی ایرانی در بانک ژنی NCBI (Accession numbers: HQ449564, HQ449562, HQ449565, HQ449563) به ثبت رسید (http://ncbi.nlm.nih.gov).

جهت طراحی آغازگرهای تخصصی جهت انجام واکنش Real-time PCR از نرم افزار تخصصی طراحی آغازگر Primer3 (version 0.4.0) استفاده شد. بدین منظور برای هر یک از ژن‌های *RPL6*، *RPL13*، *EF1A* و *UBQ* چندین جفت آغازگر تخصصی qPCR طراحی گردید (جدول ۱) و به منظور انتخاب بهترین جفت آغازگر برای انجام واکنش Real-time PCR، تمامی جفت آغازگرها با واکنش PCR معمولی مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین از آنجا که توالی cDNA ژن‌های *GAPDH* و *ACTB* در چند گونه از تاسماهیان مورد شناسایی قرار گرفته و در بانک‌های ژنی به ثبت رسیده است، آغازگرهای اختصاصی برای این دو ژن از روی نواحی حفاظت شده آنها در ماهیان خاویاری با استفاده از نرم افزار تخصصی طراحی آغازگر Primer3 (version 0.4.0) طراحی گردید (جدول ۲). سپس با انجام واکنش PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، صحت باندهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. طراحی پروب‌های اختصاصی برای هر یک از ژن‌های رفرنس، در فضای نرم افزاری پایگاه اینترنتی شرکت Roche applied science (http://www.Roche-applied-science.com) انجام گرفت.

آزمایش‌های *Taq*Man Real-time PCR با استفاده از ۱µl cDNA رقیق شده با نسبت ۱:۱۰، ۵µl محلول Kappa Probe Fast qPCR Master Mix (Kappa Biosystems, Woburn, MA, USA)، ۱۰۰ نانومولار از پروب و هر یک آغازگرهای Forward و Reverse اجرا گردید. شرایط Real-time PCR در دستگاه (Applied 7900 HT Fast Real-time PCR System Biosystems) شامل ۱۰ دقیقه در ۹۴°C به منظور واسرشته‌سازی و فعال سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵°C و یک دقیقه در ۶۰°C جهت اتصال آغازگرها و بسط تنظیم گردید. برای هر یک از نمونه‌ها، سه تکرار در نظر گرفته شد. سطوح بیان ژن به صورت مقادیر C_T به ثبت رسید که عبارت است از چرخه ای از PCR که در آن سیگنال فلوروسنت از

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

جدول ۱. اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای یونیورسال آزمایش شده در تاسماهی ایرانی

ژن	آغازگرهای universal Forward / Reverse	طول قطعه (bp)
1) RPL6	GCNTACTTYAARAAGAAGAAGCTG CARYTTGTGWGGRTARAYHCCATT	۲۱۵
	RDCAYCARGARGGHGAGATCTT CARYTTGTGWGGRTARAYHCCATT	۱۶۰
	GCNTACTTYAARAAGAAGAAGCTG GGTANCCHYKSAGYTGAGG	۱۶۸
2) UBQ	CYGGSAAGACCATCACCCT GGTSGACTCYTTCTGGATGTTGTA	۴۰۵
	CCTKACYGGCAAGACCATCAC TGCAAAGATCARCCTCTGCTG	۵۷۳
	CCTKACYGGCAAGACCATCAC GGTSGACTCYTTCTGGATGTTGTA	۶۳۳
	CYGGSAAGACCATCACCCT TGCAAAGATCARCCTCTGCTG	۳۴۵
3) RPL13	CAYTTYCAYAARGAYTGGCA GAGWRCYGTCYCCYTTCTTSGG	۳۸۴
	TBSSYACNTGGTTCAACCAG CCSAAGAARGGRGACRGYWCTC	۳۵۶
	TBSSYACNTGGTTCAACCAG GAGWRCYGTCYCCYTTCTTSGG	۴۷۳
	CAYTTYCAYAARGAYTGGCA CCSAAGAARGGRGACRGYWCTC	۵۰۱
4) EF1A	AGVGAYTTYATCAAGAACATG CNGGGTGGTTCAGGATGAT	۷۶۵
	AGVGAYTTYATCAAGAACATG CCTTCCAKCCCTTGAACCA	۳۶۰
	CAAGAARATYGGCTACAACCC CNGGGTGGTTCAGGATGAT	۵۱۷
	CAYGGDGACAACATGCTGGA CNGGGTGGTTCAGGATGAT	۴۶۲

R= (A or G), Y= (C or T), M= (A or C), K= (G or T), S= (G or C), W= (A or T)
H= (A or C or T), B= (G or T or C), V= (G or C or A), D= (G or T or A), N= (G or A or T or C)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

خط آستانه فرضی فراتر رود. خط پایه و آستانه فرضی به صورت خودکار با استفاده از نرم افزار SDS RQ manager v 1.2 (Applied Biosystems) تنظیم گردید. کنترل منفی در واکنش، شامل استفاده از تمامی ترکیبات واکنش به جز cDNA جهت بررسی احتمال آلودگی خارجی و نیز نمونه‌های cDNA فاقد آنزیم Reverse Transcriptase جهت بررسی احتمال آلودگی DNA تهیه گردید. منحنی استاندارد برای ژن‌های هدف و رفرنس بر پایه مقادیر مشخصی از cDNA در رقت‌های مختلف ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۱۰۰۰ رسم شد. سپس بازده PCR بر مبنای رابطه $E\% = (10^{1/slope} - 1) \times 100$ محاسبه گردید (Radonic *et al.*, 2004).

به منظور تعیین مناسب ترین ژن رفرنس با ثابت ترین مقادیر بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی از سه نرم افزار تحت Excel با اسامی geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)، BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) و NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) استفاده شد. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با بهره گیری از نرم افزارهای آماری SPSS (version 18.0) و SigmaPlot انجام گرفت.

جدول ۲. اطلاعات توالی آغازگرهای استفاده شده جهت انجام Real-time PCR برای ژن‌های رفرنس در تاسماهی ایرانی

ژن	آغازگرهای qPCR Forward / Reverse	طول قطعه (bp)	راندمان (%)
ACTB	TGGAGGTACCACCATGTACCC CACATCTGCTGGAAGGTGGA	۱۶۷	۹۱
RPL6	GTGGTCAAACTCCGCAAGA GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۱۴۹	۹۹
UBQ	GGAAGACCATCACCCTGGA ACAGCGTGCGACCATCTT	۱۴۰	۸۹
RPL13	GGACGTGGTTTCACCCTTG GGGAAGAGGATGAGTTTGGA	۱۶۶	۹۶
GAPDH	ACACCCGCTCATCAATCTTT AGGTCCACGACTCTGTTGCT	۱۱۴	۹۲
EF1A	GGACTCCACTGAGCCACCT GGGTTGTAGCCGATCTTCTTG	۸۹	۱۰۱

نتایج

برای همه منحنی‌های استاندارد به غیر از ژن *GAPDH*، ضریب همبستگی (R^2) بیش از ۰/۹۷ محاسبه شد (این عدد برای *GAPDH* بیش از ۰/۹۵ بود). هیچگونه سیگنالی در کنترل‌های منفی واکنش، شامل نمونه‌های فاقد cDNA و نمونه‌های cDNA فاقد آنزیم Reverse Transcriptase مشاهده نشد. عدم مشاهده سیگنال برای نمونه‌های cDNA فاقد آنزیم Reverse Transcriptase نشان دهنده عدم وجود آلودگی DNA در نمونه‌ها بود. همچنین عدم مشاهده سیگنال برای نمونه‌های فاقد

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

cDNA این اطمینان را حاصل کرد که هیچگونه آلودگی خارجی در نمونه‌ها در حین انجام آزمایش‌ها وجود نداشت. میزان بازده واکنش PCR برای ژن‌های رفرنس *RPL6*، *EF1A*، *RPL13*، *UBQ*، *ACTB* و *GAPDH* به ترتیب برابر با ۹۹٪، ۱۰۱٪، ۹۶٪، ۸۹٪، ۹۱٪، و ۹۲٪ بود.

شکل ۱ میانگین شدت بیان ژن‌های کاندید رفرنس را در مراحل ابتدایی زیست تاسماهی ایرانی (۱۰ مرحله تکاملی و ٦ تکرار در هر مرحله) بر اساس میانگین و انحراف معیار مقادیر خام C_T نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، بیان ژن *RPL6* از کمترین میزان تغییرات برخوردار بود، در حالیکه میزان تغییرات در بیان ژن *RPL13* بسیار محرز و قابل ملاحظه بود. میانگین مقادیر C_T برای ژن‌های *RPL6*، *GAPDH*، *ACTB*، *UBQ*، *EF1A* و *RPL13* به ترتیب ۲٤/۳۱، ۲۲/۸۷، ۲۰/۷۰، ۲٤/۷۸، ۲۵/٤٦ و ۲۳/۷۵ بود (شکل ۱).

جدول ۳. روابط بین ژنی و همبستگی بین ژن‌های رفرنس و شاخص BestKeeper در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی.

	ACTB	***UBQ***	***RPL6***	***GAPDH***	***EF1A***
UBQ	۰/٦۷۳	-	-	-	-
RPL6	۰/٦۷۲	۰/۵۲۷	-	-	-
GAPDH	۰/۵۷۹	۰/٦۰۲	۰/٦۷٤	-	-
EF1A	۰/۸۰۷	۰/٤٦۲	۰/۷٤۷	۰/٤۸٤	-
BestKeeper	۰/۹۰۱	۰/۷۸۸	۰/۸۵۳	۰/۷۸۲	۰/۸۵۰
p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

جدول ٤. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های ثبات بیان ژن با استفاده از نرم افزار NormFinder در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی.

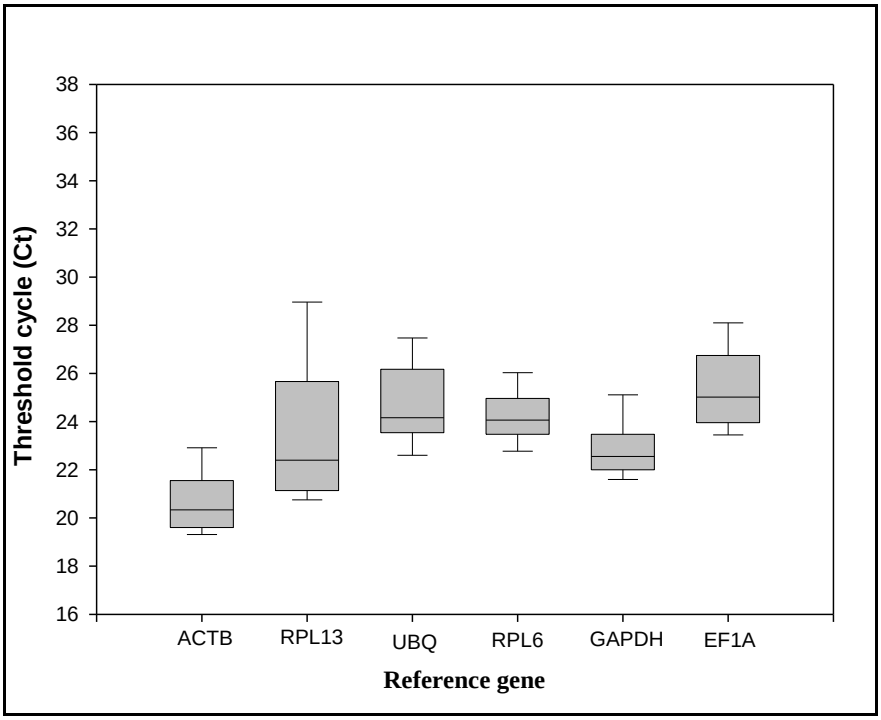
رتبه	ژن	عدد ثبات بیان ژن
۱	***ACTB***	۰/۱۲۹
۲	***RPL6***	۰/۱۳۹
۳	***EF1A***	۰/۱۵۳
۴	***GAPDH***	۰/۱٦۹
۵	***UBQ***	۰/۱۷۵
۶	***RPL13***	۰/۲۰۰

مقایسه میزان بیان ژن‌های کاندید رفرنس در مراحل مختلف رشد و تمایز تاسماهی ایرانی، الگوی تقریباً مشابهی را برای تمامی شش ژن رفرنس مورد مطالعه نشان می دهد (شکل ۲). به طوریکه بیشترین مقدار C_T که نشان دهنده کمترین میزان بیان ژن است در اولین مرحله زمانی (مرحله جنینی) به دست آمد که البته تنها استثناء در مورد ژن *RPL6* بود که در آن کمترین میزان بیان ژن در آخرین مرحله زمانی (بچه ماهی ۵۰ روزه) مشاهده گردید. همچنین در همه ژن‌های کاندید رفرنس به غیر از *RPL13*، بیشترین میزان بیان ژن در مرحله زمانی ٤ (روز سوم پس از تفریخ) مشاهده گردید. بیشترین میزان بیان ژن *RPL13* در مرحله زمانی ۵ (روز ششم پس از تفریخ) بود. همانطور که در شکل‌ها مشاهده می شود، از میان شش ژن رفرنس مورد

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

مطالعه در تحقیق حاضر، ژن *RPL6* در تمامی مراحل رشد و تمایز تاسماهی ایرانی ثابت‌ترین الگوی بیان ژنی را از خود نشان داد (شکل ۲D) که نشان دهنده وجود کمترین میزان تغییرات در بیان ژن مذکور است. بیشترین میزان تغییرات بیان ژن در مراحل مختلف رشد و تمایز تاسماهی ایرانی مربوط به ژن *RPL13* بود (شکل ۲B).

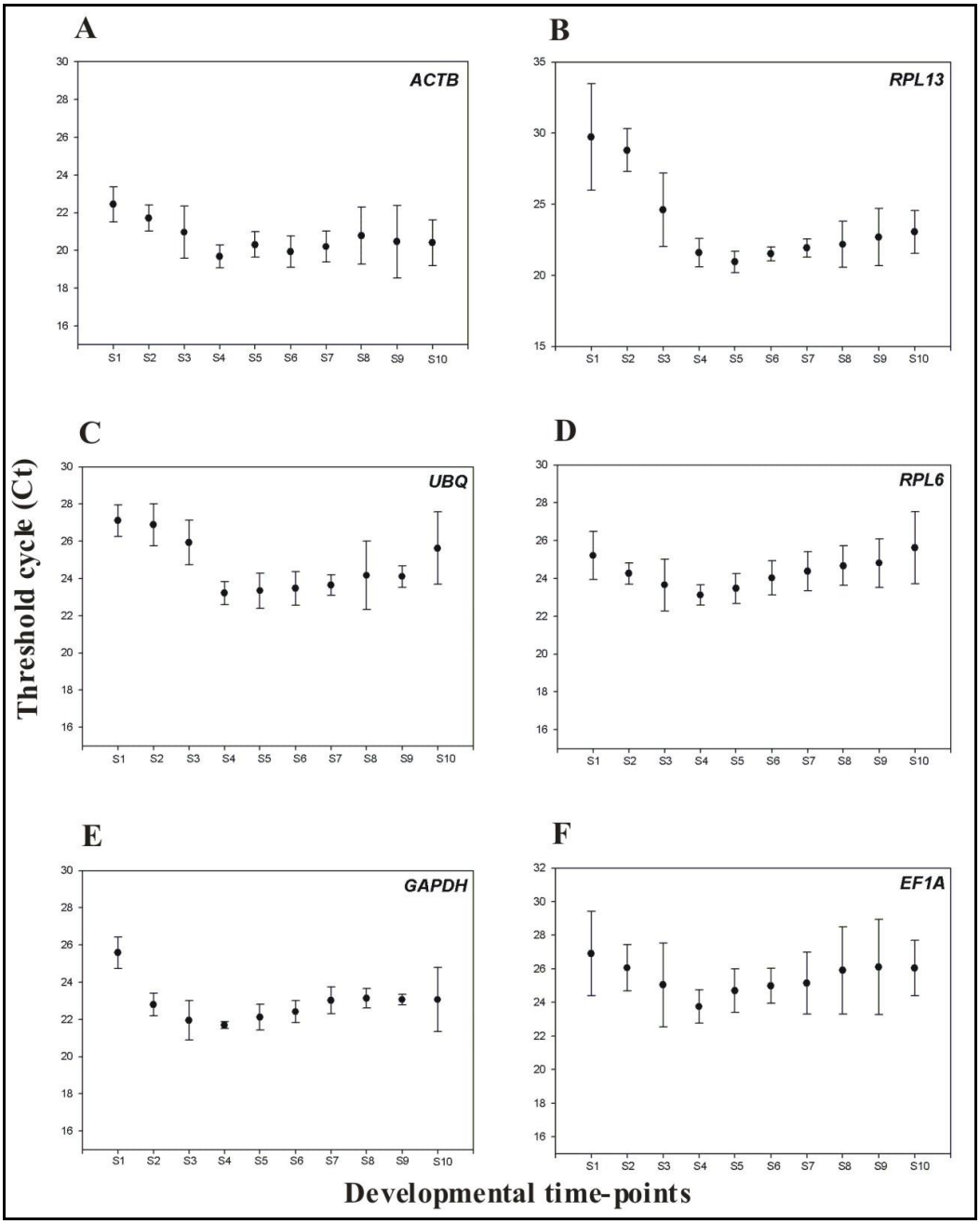


شکل ۱. الگوی کلی میزان بیان ژن‌های کاندید رفرنس در مراحل ابتدایی زیست تاسماهی ایرانی. برای هر ژن رفرنس دامنه، میانگین و انحراف معیار مقادیر خام C_T (محور y) رسم شده است. هر جعبه بیان کننده دامنه تغییرات بیان آن ژن رفرنس است، خط افقی داخل هر جعبه نشان دهنده میانگین و بارهای قرار گرفته در بالا و پایین هر جعبه نشان دهنده انحراف معیار از میانگین می باشد. برای هر ژن رفرنس تعداد نمونه‌ها برابر با ٦٠ است (n = ٦٠).

آماره توصیفی Bestkeeper ثبات ژن‌های رفرنس را براساس مقادیر خام Ct به صورت زیر رتبه بندی کرد: *PL6>GAPDH>ACTB>UBQ>EF1A>RPL13*. بیشترین همبستگی با شاخص Bestkeeper در ژن های ACTB (r=0.901, P=0.001) و RPL6 (r=0.853, P=0.001) مشاهده شد (جدول ۳) و بنابراین نرم افزار Bestkeeper این دو ژن را به عنوان قابل اعتمادترین ژن های رفرنس برای نرمال سازی داده های بیان ژن هدف در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی شناسایی کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل های نرم افزار geNorm نشان داد که ژن های *RPL6*، *GAPDH* و *ACTB* از بیشترین ثبات بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی برخوردار بودند (شکل ۳). بر اساس محاسبات انجام شده توسط نرم افزار NormFinder، ژن *ACTB* با عدد ثبات بیان ژنی ۰/۱۲۹ بعنوان با ثبات ترین ژن رفرنس شناخته شده و به دنبال آن ژن *RPL6* با عدد ثبات بیان ژنی ۰/۱۳۹ در جایگاه دوم قرار داشت (جدول ٤).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

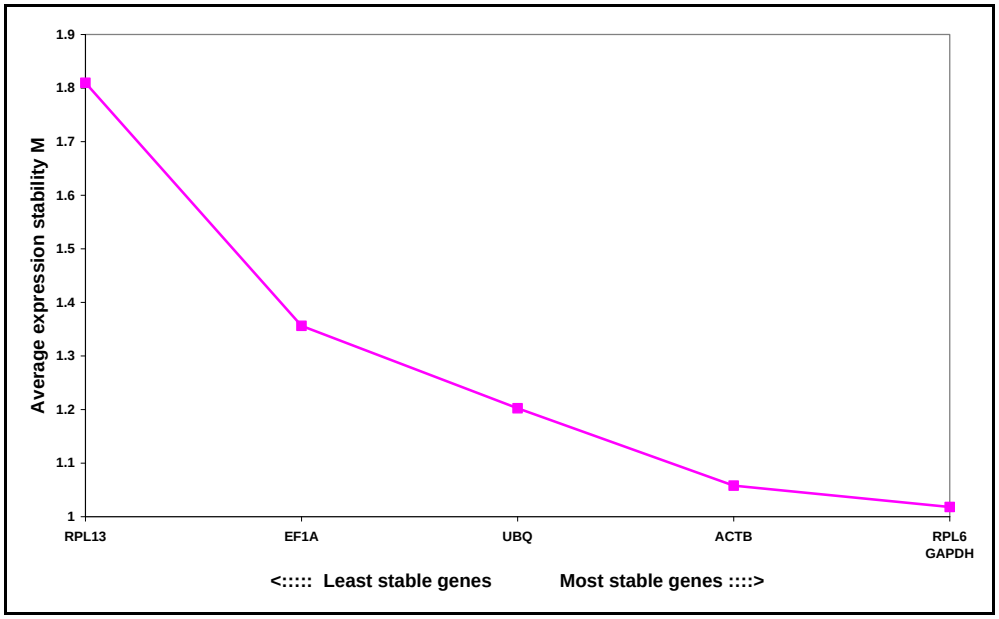
[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]



شکل ۲. الگوی بیان ژن های رفرنس در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی. S1: دو روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم، S2: لارو صفر روزه، S3: لارو یک روزه، S4: لارو ۳ روزه، S5: لارو ٦ روزه، S6: لارو ۱۰ روزه، S7: لارو ۱۵ روزه، S8: لارو ۲۰ روزه، S9: لارو ۲۵ روزه، S10: بچه ماهی ۵۰ روزه.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]



شکل ۳. نتایج حاصل از محاسبات نرم افزار geNorm در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی. مقدار M (محور y) بیان کننده ثبات بیان ژن است و هر چه این مقدار بیشتر باشد نشان دهنده کمتر بودن ثبات بیان ژن است. کم ثبات‌ترین ژن‌های رفرنس در سمت چپ نمودار و با ثبات‌ترین ژن‌های رفرنس در سمت راست نمودار نشان داده شده‌اند.

بحث

در مطالعه حاضر به منظور تعیین مناسب‌ترین ژن رفرنس با ثابت‌ترین مقادیر بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی از سه نرم افزار geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)، BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) و NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) استفاده شد. برآیند کلی نتایج ثبات بیان ژن حاصل از سه نرم افزار فوق نشان داد که ژن *RPL6* از بیشترین ثبات بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی برخوردار بود و برعکس ژن *RPL13* بیشترین تغییرات بیان ژن را در بین مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی از خود نشان داد. با توجه به اینکه هر دو ژن *RPL6* و *RPL13* جزو اجزای ساختاری زیرواحد بزرگ ریبوزومی ٦٠S می باشند و بنابراین تنظیم بیان آنها می بایست تا حد زیادی مشابه هم باشد (Vandesompele *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2006)، اما در اینجا مشاهده می شود که پایداری بیان این دو ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی تا حد زیادی با هم تفاوت دارد. RNAهای ریبوزومی حدود ۹۰-۸۵ درصد از RNA کل سلول‌ها را تشکیل می دهند و بعنوان کنترل‌های داخلی مناسب جهت نرمال سازی داده‌های PCR کمی شناخته شده اند، چرا که بیان RNAهای ریبوزومی توسط یک آنزیم پلی مراز مشخص کنترل می شود و به همین دلیل احتمال اینکه سطح بیان آنها دچار تغییر شود کم است (Bustin, 2000).

تاکنون اکثر اجزای پروتئین ریبوزومی ٦٠S به عنوان ژن‌های رفرنس مناسب در مراحل ابتدایی رشد و تمایز ماهیان مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله ژن‌های پروتئین ریبوزومی ٦٠S که به عنوان ژن رفرنس در مراحل ابتدایی رشد و تمایز ماهیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند عبارتند از ژن *RPL7* در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (Overgard *et al.*, 2010)، ژن *RPL13* در ماهی زبرا (Tang *et al.*, 2007) و هالیبوت اقیانوس اطلس (Infante *et al.*, 2008) و ژن‌های *RPL4* و *RPL17* در ماهی فلاندر

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

ژاپنی (Zhong *et al.*, 2008). اگر چه ژن *RPL6* تاکنون به عنوان ژن رفرنس در مراحل ابتدایی رشد و تمایز هیچیک از گونه‌های آبزیان مورد استفاده قرار نگرفته است، اما تحقیق حاضر نشان داد که ژن *RPL6* به عنوان یکی از ژن‌های پروتئین ریبوزومی ٦٠S می تواند نقش یک ژن رفرنس مناسب را جهت نرمال سازی داده های بیان ژن در مراحل ابتدایی زیست ماهیان و به خصوص ماهیان خاویاری به خوبی ایفا کند.

از آنجا که استراتژی نرمال سازی داده‌های بیان ژن هدف بر پایه استفاده از تنها یک ژن رفرنس می تواند منجر به بروز خطا در نرمال سازی داده‌ها شود، لذا توصیه شده است که برای نرمال سازی داده‌های بیان ژن هدف از یک عامل نرمال‌سازی بر پایه میانگین هندسی بهترین ژن‌های رفرنسی که دارای بیشترین ثبات بیان ژن هستند استفاده شود (Strube *et al.*, 2008; Vandesompele *et al.*, 2002). همچنین توصیه شده است که به هنگام انتخاب ژن‌های رفرنس جهت نرمال سازی داده‌های بیان ژن هدف، ویژگی‌های زیستی و عملکردی آنها نیز مورد توجه قرار گیرد و حتی الامکان از ژن‌های رفرنسی استفاده شود که دارای عملکردهای مختلفی در سلول‌ها باشند (Sæle *et al.*, 2009).

در مطالعه حاضر پس از ژن *RPL6* که بیشترین ثبات بیان ژن را در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی از خود نشان داد، ژن *ACTB* نیز از بیان نسبتاً پایداری در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی برخوردار بود. به طوریکه بر اساس نرم افزار Normfinder، دو ژن *ACTB* و *RPL6* از بیشترین ثبات بیان ژن برخوردار بودند (جدول ٤). همچنین بیشترین همبستگی با شاخص Bestkeeper نیز در ژن های *ACTB* و *RPL6* مشاهده شد و بنابراین نرم افزار Bestkeeper این دو ژن را به عنوان قابل اعتمادترین ژن‌های رفرنس برای نرمال سازی داده‌های بیان ژن هدف در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی شناسایی کرد (جدول ٣). بر اساس نرم افزار geNorm نیز ژن *ACTB* به همراه ژن‌های *RPL6* و *GAPDH* از ثبات بیان ژن نسبتاً بالایی برخوردار بود. با توجه به این نتایج و همچنین لزوم استفاده از ژن‌های رفرنس با عملکردهای سلول متفاوت جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن، نرمال سازی داده‌های بیان ژن GULO در مطالعه حاضر بر مبنای میزان بیان ژن‌های *RPL6* و *ACTB* و میانگین هندسی آنها به عنوان با ثبات‌ترین ژن‌های کنترل داخلی انجام گرفت.

اگرچه بر اساس نرم افزارهای geNorm و Bestkeeper ثبات بیان ژن *GAPDH* تا حدی مطلوب به نظر می رسید، اما مطالعات زیادی وجود دارد که نامناسب بودن این ژن جهت استفاده به عنوان یک کنترل داخلی در مراحل ابتدایی رشد و تمایز ماهیان را تایید می کند. از جمله در مطالعات بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز ماهی زبرا (Tang *et al.*, 2007)، ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (Fernandes *et al.*, 2008)، ماهی فلاندر ژاپنی (Zhong *et al.*, 2008) و ماهی باس دریایی اروپایی (Mitter *et al.*, 2009) ژن *GAPDH* به عنوان یک ژن رفرنس نامناسب جهت نرمال سازی داده‌های بیان ژن هدف معرفی شده است. همچنین باید توجه داشت که اعتبار نتایج حاصل از نرم افزار Normfinder بیشتر از نرم افزارهایی مثل geNorm یا Bestkeeper است، چراکه Normfinder هم تغییرات درون و هم بین گروهی را در محاسبات خود مدنظر قرار می‌دهد، درحالی‌که دو نرم افزار دیگر فاقد این توانایی هستند (Hibbeler *et al.*, 2008; Pfaffl *et al.*, 2004; Piehler *et al.*, 2010)، از این رو ژن *ACTB* بر ژن *GAPDH* جهت استفاده به عنوان دومین کنترل داخلی پس از ژن *RPL6* در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاسماهی ایرانی ترجیح داده می شود. بر این اساس استفاده از ژن‌های *RPL6*، *ACTB* و نیز میانگین هندسی آنها به منظور نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن هدف در مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاسماهی ایرانی و نیز سایر گونه‌های تاسماهیان

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور انجام گرفت.

منابع

Amberg, J.J., Goforth, R., Stefanavage T., Sepulveda, M.S. 2009. Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*). Fish Physiology and Biochemistry. 36: 923-932.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research. 64: 5245-5250.

Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 25: 169-193.

Dheda, K., Huggett, J.F., Chang, J.S., Kim, L.U., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G.A.W., Zumla, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. Analytical Biochemistry. 344: 141–143.

Fernandes, J.M.O., Mommens, M., Hagen, O., Babiak, I., Solberg, C. 2008. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. Comp Biochem Physiol B Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 150: 23-32.

Hibbeler, S., Scharsack, J.P., Becker, S. 2008. Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. BMC Molecular Biology. 9: 18.

Hurvitz, A., Degani, G., Goldberg, D., Din, S.Y., Jackson, K., Levavi-Sivan, B. 2005. Cloning of FSH beta, LH beta, and glycoprotein alpha subunits from the Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), beta-subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. General and Comparative Endocrinology. 140: 61-73.

Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Canavate, J.P., Reith, M., Manchado, M. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. BMC Molecular Biology. 9: 28.

Li, C.J., Wei, Q.W., Zhou, L., Cao, H., Zhang, Y., Gui, J.F. 2009. Molecular and expression characterization of two somatostatin genes in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology. 154: 127-134.

McCurley, A.T., Callard, G.V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. BMC Molecular Biology. 9: 102.

Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., Sarropoulou, E. 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax)*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 153: 340-347.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]

Nazari, R.M., Modanloo, M., Ghomi, M.R., Ovissipor, M.R. 2010. Application of synthetic hormone LHRH-A2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Aquaculture International. 18: 837–841.

Overgard, A.C., Nerland, A.H., Patel, S. 2010. Evaluation of potential reference genes for real time RT-PCR studies in Atlantic halibut (*Hippoglossus Hippoglossus* L.); during development, in tissues of healthy and NNV-injected fish, and in anterior kidney leucocytes. BMC Molecular Biology. 11: 36.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters. 26: 509-515.

Piehler, A.P., Grimholt, R.M., Ovstebo, R., Berg, J.P. 2010. Gene expression results in lipopolysaccharide-stimulated monocytes depend significantly on the choice of reference genes. BMC Immunology 11:13.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications. 313: 856-862.

Rytkonen, K.T., Renshaw, G.M.C., Ashton, K.J., Williams-Pritchard, G., Leder, E.H., Nikinmaa, M. 2010. Elasmobranch qPCR reference genes: a case study of hypoxia preconditioned epaulette sharks. BMC Molecular Biology. 11: 27.

Sæle, O., Nordgreen, A., Hamre, K., Olsvik, P.A. 2009. Evaluation of candidate reference genes in Q-PCR studies of Atlantic cod (*Gadus morhua*) ontogeny, with emphasis on the gastrointestinal tract. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 152: 94–101.

Small, B.C., Murdock, C.A., Bilodeau-Bourgeois, A.L., Peterson, B.C., Waldbieser, G.C. 2008. Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 151: 296-304.

Strube, C., Buschbaum, S., Wolken, S., Schnieder, T. 2008. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. Gene. 425: 36-43.

Tang, R.Y., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R. 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 39: 384-390.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. 3: 1-12.

Wang, J., Yang, X., Zhou, P., Han, H. 2002. Cloning of mouse genomic ribosomal protein L6 gene and analysis of its promoter. Biochimica et Biophysica Acta. 1576: 219– 224.

ZhiYong, L., XiaoLi, C., MingJiang, W. 2009. Molecular cloning and functional analysis of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) growth hormone receptor. Science in China, Series C-Life Science. 52: 911-921.

Zhong, Q., Zhang, Q., Wang, Z., Qi, J., Chen, Y., Li, S., Sun, Y., Li, C., Lan, X. 2008. Expression Profiling and Validation of Potential Reference Genes During *Paralichthys olivaceus* Embryogenesis. Marine Biotechnology. 10: 310–318.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1391.2.3.1.5]