ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحه۲۵-۱۷

توالی‌یابی فاکتور رشد شبه انسولین– یک IGF-I در فیل ماهی Huso huso و بررسی بیان آن در بافت‌های مختلف

فاطمه پیکان حیرتی[۱]، باقر مجازی امیری[۲]*، حمید فرحمند[۳]

۱،۲و۳- به ترتیب دانشجوی دوره دکتری رشته شیلات، استاد و استادیار
گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

فاکتور رشد شبه انسولین-یک، IGF-I، نقش حیاتی در فرایندهای مختلف زیستی ماهیان بر عهده دارد. هدف از اجرای این تحقیق دستیابی به توالی کامل ژن کدکننده IGF-I و بررسی الگوی بیان آن در بافت‌های مختلف فیل ماهی Huso huso، به عنوان یکی از مهمترین گونه‌های ماهیان خاویاری بود. با استفاده از روش RACE-PCR، قطعه‌ای به طول ۱۲۲۹ نوکلئوتید به عنوان توالی کامل IGF-I در نمونه‌های کبدی فیل ماهی شناسایی و ثبت (AB۵۱۲۷۷۰/۱) گردید. ناحیه کدکننده پروتیین در این توالی، شامل ٤٨٣ نوکلئوتید است. پروتیین کاهش نیافته IGF-I (BAH85795/1) شامل ١٦٠ اسیدآمینه بوده که به طور کلی از دو بخش Signal peptide و پیش پروتیین IGF-I (proIGF-I) تشکیل شده است. ناحیه پیش پروتیین، خود شامل ۵ حوزه B، C، A، D و E می‌باشد. مقایسه توالی IGF-I فیل ماهی با توالی این فاکتور در سایر موجودات، مبین شباهت نسبتا بالای IGF-I این ماهی با دیگر مهره داران خصوصا انواعی از پرندگان بود. بررسی بیان IGF-I در بافت‌هایی نظیر معده، آبشش، کبد، طحال، کلیه، عضله، پوست، روده، قلب و مغز با روش Real-time PCR نشان داد که اگرچه این فاکتور در تمامی بافت‌های مورد مطالعه بیان می‌شود، اما مکان‌های اصلی بیان آن به ترتیب کبد و روده می‌باشد. کمترین میزان بیان در بافت عضله اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق می‌تواند به منظور بررسی فرایندهای فیزیولوژیکی فیل ماهی از دیدگاه مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

فیل ماهی،
Huso huso،
فاکتور رشد شبه انسولین-یک،
توالی‌یابی،
بیان ژن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

مقدمه

ماهیان خاویاری (تاس ماهیان) از جمله مهمترین و با ارزش‌ترین انواع آبزیان دریای خزر می‌باشند؛ اهمیت و ارزش تجاری آنها به دلیل قدمت طولانی و تولید محصولات بسیار با ارزش نظیر خاویار می‌باشد. در بین انواع تاس ماهیان بومی دریای خزر، فیل ماهی Huso huso، به دلیل کیفیت ممتاز خاویار و ارزش ممتاز اقتصادی، از اهمیت زیادی در فعالیت‌های صیادی و به لحاظ رشد سریع و عادت پذیری به شرایط پرورشی، واجد اهمیت فراوان از نقطه نظر آبزی پروری می‌باشد. حفظ این گونه ارزشمند از طریق بازسازی ذخایر دریایی و یا توسعه آبزی پروری، مستلزم درک عوامل کنترل کننده فرایندهای مختلف فیزیولوژیک نظیر توسعه جنینی، رشد، تنظیم اسمزی و تولیدمثل خواهد بود. فاکتور رشد شبه انسولین–یک (IGF-I)، در حقیقت پلی پپتید تک زنجیره‌ای با شباهت ساختاری قابل توجه به پیش انسولین (proinsulin) می‌باشد. این فاکتور در حالت فعال از نظر ساختاری شامل چهار حوزه B، C، A وD است و عملکردهای زیستی متعددی برای آن تاکنون شناسایی شده است (۱۴). علاوه بر نقش اصلی IGF-I به عنوان تنظیم کننده رشد و نمو و تحریک کننده تمایز و تقسیم سلولی در بافت‌های مختلف، این فاکتور به عنوان عامل اصلی جهت توسعه و تکامل فولیکول‌های تخمدان، آغاز و توسعه فرایند استروییدزایی، تحریک کننده مرحله زرده گیری داخلی و آغاز زرده سازی خارجی و حتی رسیدگی نهایی تخمک مطرح می‌باشد (۵، ۱۰، ۱۳، ۱۵ و ۱۶). تاکنون مطالعات متعددی در زمینه توالی‌یابی یا بررسی بیان IGF-I در گونه‌های مختلف نظیر قزل‌آلای رنگین کمان Oncorhynchus mykiss (۱۰) و کپورمعمولی Cyprinus carpio (۶) منتشر شده و برای بسیاری دیگر از گونه‌های مهم تجاری نظیر کپورعلفخوار Ctenopharyngodon idella (EU051323) و ماهی طلایی Carassius auratus (DQ777636) در بانک ژن جهانی (GenBank) به ثبت رسیده است.

در زمینه توالی‌یابی و نقش IGF-I در گونه‌های مختلف تاس ماهیان، اطلاعات بسیار محدودی تنها برای استرلیاد Acipenser ruthenus (۱۵ و ۱۶)، تاس ماهی روسی A.guldenstaedtii (۱) و تاس ماهی سیبری A.baeri (FJ428828) منتشر شده و تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه توالی یابی و بررسی نحوه بیان این فاکتور در فیل ماهی، به عنوان با ارزشترین و مهمترین گونه پرورشی تاس ماهیان در ایران، وجود نداشته است. لذا با توجه به اهمیت IGF-I در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی نظیر رشد، بلوغ جنسی و تولید خاویار و همچنین تنظیم فشار اسمزی، در این مطالعه سعی در توالی یابی IGF-I و بررسی نحوه بیان آن در بافت‌های مختلف فیل ماهیان پرورشی شد. دستیابی به چنین اطلاعاتی می‌تواند درک بهتر وضعیت فیلوژنتیکی، فیزیولوژی رشد و تولیدمثل فیل ماهی را از جنبه مولکولی فراهم کند.

مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه برداری

نمونه برداری از فیل ماهیان پرورشی در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی گیلان صورت گرفت. به این منظور پنج قطعه فیل ماهی پرورشی یک ساله (140±20 g) از یک حوضچه فایبرگلاس صید و به طور زنده به آزمایشگاه مرکز منتقل شدند. ماهیان سپس تحت تاثیر MS_{222} (10ppm) بیهوش شده و نمونه برداری از ۱۰ بافت مختلف شامل کبد، روده، معده، طحال، آبشش، کلیه، پوست، قلب، عضله و مغز انجام شد. مقدار حدود ۲۰۰ میلی گرم از هر یک از بافت‌های مذکور (مغز به طور کامل) بلافاصله پس از نمونه برداری در ویالهای ۱/۵ میلی لیتری RNAlater (Qiagen, Germany)، تثبیت و به گروه آبزی پروری در مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و شیلاتی آندولوسیا واقع در جنوب اسپانیا ارسال گردید و تا زمان استخراج RNA، در ۸۰Cº- نگهداری شد.

۲-۲ استخراج RNA و سنتز cDNA

در مرحله اول، استخراج RNA کل از حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت کبد به عنوان منبع اصلی تولید IGF-I با استفاده از کیت RNeasy (Qiagen, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده اجرا گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتر در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

نانومتر اندازه گیری شد. مقدار یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت iScriptTM cDNA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) به DNA مکمل تبدیل شد. واکنش نسخه برداری معکوس در دو تکرار اجرا و فقدان آلودگی با DNA ژنومی با استفاده از PCR نمونه‌های RNA مورد تایید قرار گرفت.

۲-۳ شناسایی اولیه IGF-I

با توجه به اینکه توالی ژن کدکننده IGF-I در فیل ماهی تاکنون شناسایی نشده بود، لازم گردید تا با طراحی آغازگرهای اولیه (جدول ۱) نسبت به تکثیر قطعه‌ای از ژن اقدام و در ادامه با توجه به توالی به دست آمده نسبت به طراحی آغازگرهای RACE و اختصاصی Real-time PCR، اقدام گردد. به این منظور توالی‌های شناسایی شده این فاکتور در انواع مختلف تاس ماهیان شامل توالی‌های نسبی در تاس ماهی روسی (DQ201138) و استرلیاد (DQ329352) و توالی کامل آن در تاس ماهی سیبری (FJ428828) با استفاده از BLAST مورد مقایسه قرار گرفت و بر اساس نواحی حفاظت شده و یکسان بین انواع مختلف، نسبت به طراحی آغازگر با نرم افزار Oligo v6.86 اقدام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن مزبور به طول حدود ۱۳۲ نوکلئوتید تحت شرایط دو دقیقه در ۹۴°C، ۱۵ ثانیه در ۷۰°C، یک دقیقه در ۷۲°C به ترتیب به منظور دناتوره شدن، اتصال آغازگر و بسط مورد استفاده قرار گرفت. بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد. محصول واکنش با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز آشکارسازی و پس از استخراج از روی ژل توالی یابی شد.

به منظور دستیابی به توالی کامل ژن مذکور روش RACE ´۳-´۵ با استفاده از Rapid Amplification cDNA Ends Kit (Invitrogen, Rockville, MD, USA) اجرا گردید. به طور خلاصه در ابتدا، انتهای cDNA ´۳ با استفاده از ۲/۵ میکروگرم RNA کل استخراج شده از کبد به همراه آغازگر آداپتور AP و آنزیم نسخه برداری معکوس SuperscriptII تولید شد. تکثیر cDNA هدف با استفاده از آغازگرهای مستقیم IGF-I1 و IGF-I3 (جدول ۱) و آغازگر UA (Universal Amplification) موجود در کیت RACE- ´۳ به عنوان آغازگر معکوس تحت شرایط °C ۹۴ به مدت ۲ دقیقه به همراه ۳۵ چرخه حرارتی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت۱۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه اجرا شد. محصول واکنش با استفاده از کیت PCR96 NucleoFast® (MACHEREY-NAGEL, GmbH, Germany) خالص سازی شده و سپس با استفاده از کیت توالی یابی TOPO TA Cloning مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Invitrogen, MD, USA) کلون گردید. کلون‌های مثبت با استفاده از کیت Big Dye Terminator و دستگاه آنالیز ژنتیکی مدل ABI۳۱۳۰ (Applied Biosystem, CA, USA) توالی یابی شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در مراحل مختلف توالی یابی و بررسی بیان IGF-I در فیل ماهی Huso huso، طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo v6/86 اجرا شد.

نام آغازگر	توالی	کاربرد*
IGF-I1F	5'-GTGCGGAGCTGAGCTTGTGGACACTCTTC-3'	۱ ۲ و ۳
IGF-I2R	5'-ACTCGTTCACGATGCCCCTGTGGTG-3'	۱ و ۳
IGF-I3F	5'-GACACGCTGCAGTTTGTGTGTGGAGA-3'	۳
AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACT$_{(17T)}$-3'	۳ و ۴
UAP(R)	5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACT-3'	۲
IGF-I4R	5'-GCAGAAAGCCCTCCACCT-3'	۵
IGF-I5R	5'-GCAATGGCAAATTCACCTCATCT-3'	۶
IGF-I6R	5'-GGTAGTTCCTGTTGCCTGTGTTC-3'	۶
IGF-I7R	5'-TACATCTCCAGTCGCCTCAG-3'	۶
Abridged Anchor (F)	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	۶

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

به منظور دستیابی به انتهای ´ ۵ در IGF-I، ابتدا نسبت به تولید cDNA اختصاصی از ۲/۵ میکروگرم RNA استخراج شده از کبد فیل ماهی با آغازگر IGF-I۴ و آنزیم نسخه برداری معکوس SuperscriptII اقدام گردید (جدول ۱). سپس با استفاده از آغازگرهای IGF-I۵، 6IGF-I و IGF-I۷ به عنوان آغازگرهای معکوس به همراه آغازگر مستقیمAbridged Anchor کیت ´۵-RACE، انتهای ´ ۵ در سه مرحله مختلف PCR شامل ۳۵ چرخه حرارتی ۹۴ºC به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ºC به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ºC به مدت یک دقیقه تکثیر شد. در نهایت محصول مطابق روش فوق خالص سازی، کلون و توالی یابی شد.

Real-time PCR ۴-۲

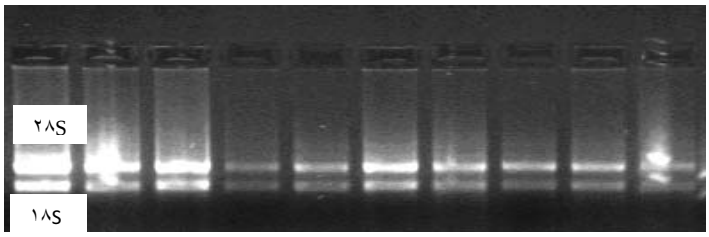
بررسی میزان بیان ژن IGF-I در بافت‌های مختلف از روش کمی Real-time PCR استفاده شد. به این منظور در ابتدا نسبت به استخراج RNA کل و سنتز DNA مکمل (بند ۲-۲) اقدام گردید. یک جفت آغازگر اختصاصی که پیش از این برای شناسایی اولیه مورد استفاده قرار گرفته بود (جدول ۱)، به عنوان آغازگرهای Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در حجم کلی25 µl شامل cDNA تولید شده از یک نانوگرم RNA اولیه الگو، ۳۰۰ نانو مولار از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط Quantitect Syber Green x2 (Bio-Rad, USA) و مابقی تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر فاقد آنزیم تجزیه کننده RNA، در دو تکرار آماده سازی گردید. واکنش در دستگاه iCycler Bio–Rad اجرا شد. مراحل انجام واکنش شامل ۱۵ دقیقه دناتوره و فعال شدن آنزیم در ۹۴°C به همراه ۴۰ چرخه حرارتی ۹۵ºC به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۰ºC به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه بود. جهت استانداردسازی نتایج از بیان ژن کنترل داخلی Elongation factor ´۵AGGAGGCCGCTGAGATGGGGAAAG۳´ به عنوان آغازگر مستقیم و ´۵GTGGCCGGGAGCATCAATGATGGT۳´ به عنوان آغازگر معکوس استفاده شد. به منظور تخمین راندمان، منحنی استاندارد برای هر جفت آغازگر بر مبنای مقادیر رقیق شده cDNA تهیه شد. بیان نسبی ژن هدف با روش $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ محاسبه گردید (۸). آماده سازی نمونه‌ها به منظور بررسی بیان ژن کنترل داخلی در دو تکرار و مطابق روش ارایه شده برای ژن هدف بود. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد و به منظور بررسی اختلاف معنی‌دار بین بافت‌های مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه کروسکال-والیس و در ادامه آزمون چند دامنه دانکن ($p<0/05$) استفاده گردید.

نتایج

۳-۱ بررسی کیفی و کمی RNA

شکل ۱، نتایج بررسی کیفی RNA استخراج شده از برخی بافت‌ها را نشان می‌دهد. در هر نمونه، دو باند مجزا S18 و S28 rRNA به وضوح قابل مشاهده است. نتایج بیانگر کارایی محلول RNALater برای نگهداری نمونه‌ها و روش مورد استفاده به منظور استخراج RNA از بافت‌های مختلف است.

نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱-۱/۸ قرار داشت (نتایج به تفکیک ارایه نشده است)، که بیانگر کمیت قابل قبول RNA در بافت‌های مختلف بود.



شکل ۱- بررسی کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های مختلف فیل ماهی Huso huso بر ژل آگارز ۱٪: در تمامی نمونه‌ها دو باند واضح متعلق به S18 و S28 rRNA مشاهده می‌شود. نمونه‌ها از راست به چپ به ترتیب استخراج شده از بافت‌های عضله، معده، پوست، مغز، طحال، کلیه، روده ، قلب، آبشش و کبد می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

۳-۲ استخراج و توالی یابی IGF-I فیل ماهی

با استفاده از روش RACE-PCR، قطعه‌ای به طول ۱۲۲۹ نوکلئوتید به عنوان توالی ژن کدکننده IGF-I از نمونه‌های کبدی فیل ماهی استخراج و پس از بررسی نهایی در بانک ژن با کد دسترسی AB۵۱۲۷۷۰/۱ ثبت گردید. ناحیه کدکننده پروتیین در این توالی شامل ۴۸۳ نوکلئوتید بود. این ناحیه پس از توالی ۲۴۴ نوکلئوتیدی ۵´-UTR آغاز می شود. در پایان ناحیه کدکننده پروتیین، توالی ۵۰۲ نوکلئوتیدی ۳´-UTR، قرار می‌گیرد. توالی‌های GATAAA و AATACA به ترتیب در ناحیه ۱۱۴۱-۱۱۳۵ و ۱۱۷۱-۱۱۶۵ نوکلئوتید به عنوان non-canonical polyadenylation signal شناسایی گردید (شکل ۲).

پروتیین کاهش نیافته IGF-I (BAH۸۵۷۹۵/۱) فیل ماهی شامل ۱۶۰ اسیدآمینه بود. این پروتیین به طور کلی از دو بخش Signal peptide با ۴۳ اسید آمینه و پیش پروتیین IGF-I (proIGF-I) با ۱۱۷ اسیدآمینه تشکیل شده است. مولکول pro-IGF-I خود از ۵ حوزه B، C، A، D و E به ترتیب شامل ۲۹، ۱۲، ۲۱، ۸ و ۴۷ اسیدآمینه تشکیل شده است. فرم نهایی فاکتور IGF-I پس از جداشدن حوزه E از pro-IGF-I تشکیل می‌شود و لذا شکل فعال این فاکتور در فیل ماهی دارای ۷۰ اسیدآمینه خواهد بود (شکل ۳).

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه IGF-I فیل ماهی با برخی گونه‌های ماهیان و دیگر شاخه‌های جانوری اجرا گردید (جدول ۲). به طور کلی مشابهت زیادی، بیش از ۹۰٪، بین IGF-I فیل ماهی و دیگر تاس ماهیان مشاهده شد (جدول ۲).

توالی IGF-I فیل ماهی از نظر نوکلئوتیدی شباهت بالایی (۸۷٪) را با پرندگانی نظیر اردک Anser anser، نشان داد که به طور قابل توجهی بیشتر از میزان مشابهت آن با برخی ماهیان استخوانی نظیر کپورمعمولی (۷۴٪) و سیم دریایی Sparus aurata (۷۶٪)بود. میزان مشابهت IGF-I فیل ماهی با توالی این فاکتور در انسان، ۷۳٪ محاسبه شد (جدول ۲).

شباهت توالی اسیدهای آمینه IGF-I فیل ماهی با سایر تاس ماهیان بسیار بالا و بیش از ۹۰٪ بود. همچنین توالی مذکور به ترتیب با ۷۴ و ۷۰٪ مشابهت با IGF-I کپورمعمولی و اردک، بیشترین و با ۶۰٪ مشابهت در موش Mus musculus کمترین میزان همسانی را نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه شباهت نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه IGF-I فیل ماهی Huso huso و برخی دیگر از گونه‌های مهره‌داران.

خانواده	گونه	کد دسترسی	نوکلئوتید ٪	اسید آمینه ٪
Acipenseridae	*Acipenser ruthenus*	DQ۳۲۹۳۵۲/۱	۹۹	۹۹
	A.gueldenstadtii	DQ۲۰۱۱۳۸/۱	۹۷	۹۱
	A.baeri	FJ۴۲۸۸۲۸/۱	۹۸	۹۸
Cyprinidae	*Cyprinus carpio*	EF۵۳۶۸۸۹/۱	۷۴	۷۴
Salmonidae	*Oncorhynchus kisutch*	M۳۲۷۹۲/۱۱	۷۳	۶۴
Sparidae	*Sparus aurata*	EF۵۶۳۸۳۷/۱	۷۶	۶۹
Phasianidae	*Gallus gallus*	DQ۲۷۵۳۵۱/۱	۸۴	۷۱
Anatidae	*Anser anser*	EF۳۸۲۶۶۸/۱	۸۷	۷۰
Muridae	*Mus musculus*	AK۰۵۰۱۱۸/۱	۸۱	۶۰
Bovidae	*Bos taurus*	FJ۱۹۶۵۸۳/۱	۸۲	۶۳
Homonidae	*Homo sapience*	NM۰۰۰۶۱۸/۳	۷۳	۶۷

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

```
1    ctgtcgaaaa tgtctgtgta atgtagataa atgtgaggat tttctctaaa tccctcttct
61   gtttgctaaa tctcgcttcc ctctacagaa aacagagtag aagagtcagc gcaattgaac
121  aaagtctgaa tattgaaatg tgacattgca cttcacatct catcctattt cgcgttggat
181  tttttttta atgacttcaa acacatttat tttgctggtc tttgtagttt tgggatccat
241  ggggatgtcc agcaggcatt ccgtcttcca tcagtggcac ttgtgtgatg tcttcaagtt
301  taagatgtgc tctttgtcct gtacccatta cttgctcctg tgtgttctgt gcctgactca
361  ggctgctgca gccggctcag agactctgtg cggagctgag cttgtggaca ctcttcagtt
421  tgtgtgtggg gagagaggct tctatttcaa caaaccaaca ggctatgggg ccagctcgag
481  gcggccacac cacaggggca tcgtgaacga gtgctgcttc cagagctgtg acctgaggcg
541  actggagatg tactgtgcgc ctgttaagcc agccaaagcc tcacgctctg tacgtgccca
601  gcgccatacc gatatgccga aagcacaaaa gaaacatata tctggtaata gccagccatc
661  ttgcaaggag gtacattcga agaattccag ccgcgggaac acaggcaaca ggaactaccg
721  gattagaag agcaaaatcc agagtaaaat taattataat aacaataata aaaataataa
781  caattaaaag atgaggtgaa tttgccattg cagaatggtt cactgtattg ttcatgcaaa
841  ctggtgaaac gtaatataaa tgagctcagt agtggagatg caggtggagg gctttctgct
901  gtttaacagt gcaatgtgtt ataggtagga aaatcacttt actaaaaatg tattgaacca
961  atatagccac gaagatctgg gctgtgacgt gtgaccccat ggctgttggt ttcatttcag
1021 tgcactaagc cttttcaaag cagcttctca gtgtcctgaa gttcatgtgg ctctgcttgt
1081 gcagaccttg atcaaagtag attggcacca gagtagcagc aatgctgaaa caatggataa
1141 atggacttga ggacaaagag gttcaaatac agcaatggac tttaagattt tttttatttg
1201 aaacacatat tgacaaccgc tccttcagg
```

شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی IGF-I درفیل ماهی (AB۵۱۲۷۷۰/۱). حروف سایه دار، ناحیه کدکننده ژن با ۴۸۳ نوکلئوتید. قبل و بعد از ناحیه کدکننده به ترتیب UTR-´5 و UTR-´3 با ۲۴۴ و ۵۰۲ نوکلئوتید قرار دارد. TAG توالی کدون پایانی، GATAAA و AATACA توالی Non-canonical polyadenylation signals خواهد بود.

```
MSSRHSVFHQWHLCDVFKFKMCSLSCTHYLLLCVLCLTQAAAAGSETLCGAELVDTLQFVCG
Signal peptide                                                B
ERGFYFNKPTGYGASSRRPHHRGIVNECCFQSCDLRRLEMYCAPVKPAKASRSVRAQRNTDM
B          C                A                          D     E
PKAQKKHISGNSQPSCKEVHSKNSSRGNTGNRNYRI
E
```

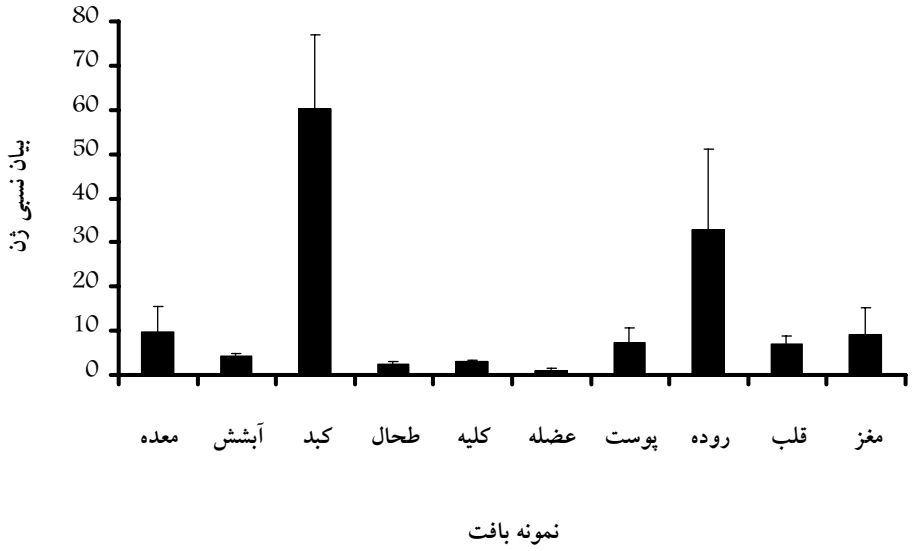
شکل ۳- توالی اسیدآمینه پروتیین کاهش نیافته IGF-I در فیل ماهی (کد دسترسی در GenBank: 1/85795BAH) شامل دو بخش اصلی signal peptide با ۴۳ اسید آمینه و ۵ حوزه مختلف B، C، A، D و E با ۱۱۷ اسید آمینه.

۳-۳ بررسی بیان IGF-I در بافت های مختلف فیل ماهی پرورشی

در این تحقیق روش نسخه برداری معکوس به همراه تکنیک Real-time PCR، به منظور تعیین سطوح بیان در بافت‌های مختلف شامل کبد، کلیه، طحال، آبشش، معده، روده، مغز، قلب، پوست و عضله در ۵ قطعه فیل ماهی پرورشی یک ساله مورد استفاده قرار گرفت. سطوح بیان نسبی ژن با سنجش میزان بیان Elongation factor، به عنوان ژن کنترل داخلی و با توجه به میزان بیان در عضله (به عنوان کالیبره کننده نمونه‌ها) متعادل گردید. نتایج نشان داد که در تمامی بافت‌های مورد بررسی IGF-I در مقادیر قابل سنجش بیان شده است؛ اگرچه شدت بیان با توجه به نوع بافت بسیار متفاوت است (شکل ۴). بیشترین شدت بیان در کبد، حدود ۶۰ برابر و پس از آن در روده حدود ۳۳ برابر میزان بیان در عضله اندازه گیری شد (شکل ۴). پس از عضله، کمترین شدت بیان به ترتیب در بافت‌های طحال، کلیه، آبشش و قلب محاسبه گردید (شکل ۴). بررسی‌های آماری نشان داد تنها مقادیر بیان ژن در کبد و روده به طور معنی‌داری بالاتر از میزان بیان در سایر بافتها بود ($p<0/05$).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]



شکل ۴- شدت بیان نسبی IGF-I در فیل ماهی Huso huso، یک ساله پرورشی (n=5) متعادل سازی داده‌ها بر اساس میزان بیان Elongation factor، اجرا گردید. داده‌ها به صورت میانگین تغییر به نسبت شدت بیان در عضله بیان گردید. *، مقادیر به طور معنی‌داری با میزان بیان در بافت عضله متفاوت است ($p<0.05$).

بحث

در این مطالعه برای اولین بار توالی کامل ژن کدکننده IGF-I در فیل ماهی به عنوان یکی از مهمترین گونه ماهیان خاویاری ایران مورد شناسایی قرار گرفت. پیش از این تنها توالی‌های IGF-I تنها در سه گونه دیگر از ماهیان خاویاری شامل تاس ماهی سیبری، استرلیاد و تاس ماهی روسی شناسایی شده بود که هیچ کدام قابلیت مناسب جهت توسعه آبزی پروری در ایران را، در مقایسه با فیل ماهی به عنوان گونه بومی، ندارند.

توالی IGF-I فیل ماهی به طور کلی شامل ۱۲۲۹ نوکلئوتید بود که از این میزان تعداد ۴۸۳ نوکلئوتید در ناحیه کدکننده پروتین قرار داشت. شکل فعال پروتیین IGF-I در فیل ماهی شامل ۷۰ اسیدآمینه می‌باشد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌های IGF-I فیل ماهی با سایر گونه‌های ماهیان خاویاری نشان دهنده مشابهت قابل توجه بین آنها می‌باشد. اگرچه از نظر فیلوژنی، فیل ماهی متعلق به جنس Huso و متفاوت از جنس Acipenser خواهد بود. این امر می‌تواند بیانگر مشابهت فیلوژنی گونه‌های مذکور علی رغم قرار گیری در دو جنس متفاوت باشد. همچنین مقایسه‌های دیگر نشان دهنده شباهت نسبی، علی رغم فواصل فیلوژنی بسیار زیاد، در بین توالی‌های مختلف IGF-I در بین شاخه‌های مختلف جانوری می‌باشد که می‌تواند دال بر نقش مهم و تقریبا یکسان IGF-I در جانوران مختلف باشد. جالب توجه آنکه، برخلاف انتظار، شباهت بیشتر IGF-I فیل ماهی با پرندگان یا پستانداران در مقایسه با ماهیان استخوانی نظیر کپور معمولی مشاهده شد که تاحدودی بازتاب دهنده موقعیت فیلوژنی تاس ماهیان در رده بندی جانوری است. تاس ماهیان از جمله ماهیان غضروفی- استخوانی بوده و در بسیاری از ویژگی‌ها قرابت زیادی با پرندگان و پستانداران در مقایسه با ماهیان استخوانی عالی دارند. چنین مشابهتی پیش از این در خصوص IGF-I و ژن هورمون رشد GH در تاس ماهی روسی نیز مورد توجه قرار گرفته است (۱).

در این تحقیق سطوح بیان IGF-I در برخی بافت‌های فیل ماهیان یک ساله پرورشی مورد سنجش قرار گرفت. در تمامی بافت‌ها، سطوح مختلف بیان IGF-I مشاهده شد. این امر می‌تواند دلالت بر نقش محوری IGF-I در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی در فیل ماهی باشد. نقش انواع مختلف IGF، خصوصا IGF-I در فرایندهای گوناگون فیزیولوژیکی نظیر تقسیم و تمایز سلولی،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

رشد، ایمنی، تنظیم فشار اسمزی و تولیدمثل به صورت اتو و پاراکراین، در گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است (۱، ۳، ۸ و ۱۵).

بیشترین میزان بیان IGF-I در کبد اندازه گیری شد که بیانگر نقش محوری کبد در تولید و رهاسازی IGF-I خواهد بود. به نظر می‌رسد در فیل ماهی نظیر سایر ماهیان استخوانی همچون آزادماهی کوهو Oncorhynchus kisutch (۲ و ۷)، سوف Perca fluviatilis (۴)، کپورمعمولی (۱۱ و ۱۲)، کفشک سنگالی Sola senegalensis (۳) و سیم نواری قرمز Pagrus auriga (۸)، کبد به عنوان محل اصلی بیان IGF-I باشد. این نتایج شاید بیانگر شباهت فرایند فیزیولوژیکی IGF-I ماهیان غضروفی-استخوانی، فیل ماهی، با ماهیان استخوانی باشد. اگرچه اظهار نظر قطعی در این زمینه نیازمند بررسی بیشتر و دقیقتر خواهد بود. در تاس ماهی روسی، بررسی بیان IGF-I در بافت‌هایی نظیر کبد، مغز، روده، عضله، هیپوفیز و کلیه نشان داد که شدت بیان با توجه به نوع بافت و درجه بلوغ متفاوت است (۱). در انواع نابالغ، بیشترین شدت بیان در روده و کبد گزارش شد، در حالی که در ماهیان بالغ بافت‌های کلیه و هیپوفیز بیشترین شدت بیان IGF-I را نشان دادند. کمترین میزان بیان IGF-I در ماهیان نابالغ و بالغ به ترتیب در بافت عضله و قلب اندازه گیری شد (۱). چنین اختلافاتی می‌تواند متاثر از تفاوت‌های گونه‌ای یا اختلاف در سایر ویژگی‌ها نظیر اندازه و وزن، وضعیت تغذیه‌ای، درجه حرارت و شوری آب و مرحله بلوغ باشد (۱، ۲ و ۹).

به طور خلاصه می‌توان بیان داشت که توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای IGF-I فیل ماهی، که برای اولین بار در این تحقیق شناسایی گردید، شباهت قابل توجهی با توالی‌های IGF-I در سایر مهره داران خصوصا پرندگان دارد که می‌تواند نشان دهنده نقش مهم و تاحدودی یکسان این فاکتور در بین انواع مختلف جانوران باشد. محل اصلی تولید و فعالیت IGF-I در فیل ماهی یکساله، بافت کبد بود.

در نهایت، شناسایی انواع مختلف IGF در فیل ماهی به عنوان مهمترین گونه ماهی خاویاری ایران و بررسی نقش آنها در فرایندهای مختلف زیستی نظیر رشد و تولید مثل پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از مدیریت و کارکنان مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر بهشتی گیلان، جهت فراهم کردن نمونه‌ها سپاسگزاری می‌گردد. تمامی مراحل آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و شیلاتی اندلوسیا IFAPA, El Toruno در اسپانیا با استفاده از گرانت تحقیقاتی Carlos Infante، محقق آن مرکز اجرا گردید.

منابع

1- Din S Y, Hurvitz A, Goldberg D, Jackson K, Levavi-Sivan B, Degani G (2008) Cloning of Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii growth hormone and insulin-like growth factor I and their expression in male and female fish during the first period of growth. Journal of endocrinology investment. 31:201-210.

2- Duan C, Duguay S, Plisetskaya E (1993) Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, Oncorhynchus kisutch: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family proteins. Fish physiology and biochemistry. 11:371-379.

3- Funes V, Asensio E, Ponce M, Infante C, Canavate JP, Manchado M (2006) Insulin-like growth factor I and II in the sole, Solea senegalensis: cDNA cloning and quantitation of gene expression tissues and during larval development. General and comparative endocrinology.149:166-172.

4- Jentoft S, Aastveit AH, Andersen Ø (2004) Molecular cloning and expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Eurasian perch, Perca fluviatilis: lack of responsiveness to growth hormone treatment. Fish physiology and biochemistry. 30:67-76.

5- Kagawa H, Gen K, Okuzawa K, Tanaka H (2003) Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, Pagrus major. Biology of reproduction. 68: 1562-1568

6- Liang YH, Cheng CH, Chan KM (1996) Insulin-like growth factor-I Ea2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp, Cyprinus carpio. Molecular marine biology and biotechnology. 5: 145-152.

7- Pierce AL, Dickey JT, Larsen DA, Fukada H, Swanson P, Dickhoff WW (2004) A quantitive real-time RT-PCR assay for salmon IGF-I mRNA, and its application in the study of GH regulation of IGF-I gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. General and comparative endocrinology. 135: 401-411.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

8- Ponce M, Infante C, Funes V, Manchado M (2008) Molecular characterization and gene expression analysis of insulin-like growth factors I and II in the redbanded seabream, Pagrus auriga: transcriptional regulation by growth hormone. Comparative biochemistry and physiology. 150: 418-426.

9- Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R, Loffing-Cueni D (1997) Insulin-like growth factor I in the teleost Oreochromis mossambicus, the tilapia: Gene sequence, tissues expression, and cellular localization. Endocrinology. 138: 3613-3619.

10- Shamblott MJ, Chen TT (1992) Identification second insulin-like growth factor in a fish species. Proceeding of natural academic science. USA, 89: 8913-8917.

11- Tse MC, Vong QP, Cheng CH, Chan KM (2002) PCR-cloning and gene expression studies in common carp, Cyprinus carpio insulin-like growth factor-I. Biochemistry and Biophysics. 1575: 63-74.

12- Vong QP, Chan KM, Cheng CH (2003) Quantification of common carp, Cyprinus carpio IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. Journal of endocrinology. 178: 513-521.

13- Weber GM, Sullivan CV (2001) In vitro hormone induction of final oocyte maturation in striped bass, Morone saxatilis follicles is inhibited by blockers of phyosphatidylinositol 3-kinase activity. Comparative biochemistry and physiology. 129: 467-473.

14- Wood WA, Duan C, Bern HA (2005) Insulin-like growth factor signaling in fish. International review of cytology.243: 215-285.

15- Wuertz S, Gessner J, Kirschbaum F, Kloas W (2007) Expression of IGF-I and IGF-I receptor in male and female sterlet, Acipenser ruthenus; Evidence for an important role in gonad maturation. Comparative biochemistry and physiology.147: 223-230.

16- Wuertz S, Nitsche A, Jastroch M, Gessner J., Klingenspor M, Kirschbaum F, Kloas W (2007) The role of the IGF-I system for vitellogenesis in maturing female sterlet, Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758. General and comparative endocrinology. 150: 140–150.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.3.2.0] [Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-23]