

## بررسی مقدماتی پروتئوم بافت گناد تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

سعید کیوان شکوه<sup>۱</sup>، محمد رضا کلباسی<sup>۲\*</sup>، بهروز وزیری<sup>۳</sup>، سامان حسینخانی<sup>۴</sup>  
۱-دانشجوی دوره دکتری رشته شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس  
۲-دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس  
۳-استادیار بخش بیوتکنولوژی، انسیستیتو پاستور ایران  
۴-دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس  
\*نویسنده مسئول مکاتبات، E-mail: Kalbassi\_m@modares.ac.ir

### چکیده

از آنجا که تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری جهت بازسازی ذخایر آنها ضروری می باشد، وجود نقشه پروتئینی بافت های تناسلی، طراحی شرایط محیطی به منظور کسب موفقیت بیشتر در عملیات تکثیر مصنوعی را تسهیل خواهد نمود. هدف از انجام این تحقیق، بررسی امکان شناسایی ترکیب پروتئینی بافت بیضه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و طیف سنجی جرمی بود. از میان ۸۰۰ نقطه پروتئینی تکرار پذیر موجود بر روی ژل برآیند مربوط به ۱۵ قطعه تاسماهی نر بالغ، ۴۸ نقطه پروتئینی جهت شناسایی به روش MALDI-TOF/TOF انتخاب شد. پروتئین های شناسایی شده بر حسب عملکرد اصلی خود در هفت گروه مختلف شامل پروتئین های دخیل در ساختمان سلولی (۱۶٪)، ترجمه و رونویسی (۲۰٪)، متابولیسم و تولید انرژی (۳۱٪)، پیام رسانی سلولی (۶٪)، دفاع سلولی (۱۶٪)، نقل و انتقالات (۶٪) و تقسیم سلولی (۲٪) قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق، منبع ارزشمندی جهت تجزیه و تحلیل شرایط طبیعی و غیر طبیعی موثر بر تولید مثل تاسماهی نر می باشد. علاوه بر این، شناسایی سایر پروتئین های موجود در بافت بیضه، امکان ایجاد پایگاه رایانه ای پروتئین های بافت گناد تاسماهی ایرانی نر را مهیا می سازد.

### واژه های کلیدی

TASMAHİ İRANI, *Acipenser persicus*, بیضه، پروتئومیکس

### مقدمه

در سال های اخیر ذخایر ماهیان خاویاری به دلایلی نظری صید بی رویه و قاچاق، تجمع آبدگی در آب و رسوبات محیط زیست و مسدود شدن مسیرهای متنهی به مناطق تولید مثل طبیعی این ماهیان با کاهش شدیدی مواجه گردیده است (برشتین، ۱۹۹۳؛ بیلاند و لکونتره، ۲۰۰۱؛

همکاران، ۲۰۰۷)، اما تا کنون پروتئوم بافت گند مورد پژوهش قرار نگرفته است. اخیرا کیوان شکوه و وزیری (۲۰۰۷) با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و طیف سنجی جرمی (MALDI-TOF/TOF)، نقشه پروتئینی تخمک تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) را تهیه نموده و پروتئین های شناسایی شده را با توجه به نوع عملکرد آنها دسته بندی نمودند. از آنجا که وجود نقشه پروتئینی بافت های تناسلی، طراحی شرایط محیطی به منظور کسب موفقیت بیشتر در عملیات تکثیر مصنوعی را تسهیل خواهد نمود، هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان شناسایی بخشی از ترکیب پروتئینی بافت بیضه تاسماهی ایرانی نر با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و طیف سنجی جرمی بود.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری

در این تحقیق از ۱۵ عدد تاسماهی ایرانی نر بالغ صید شده جهت عملیات تکثیر مصنوعی، در اسفند ماه ۱۳۸۴ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی واقع در سمسکنده ساری نمونه برداری شد. تمامی ماهیان خاویاری که از آنها نمونه برداری بعمل آمد در شرایط محیطی یکسانی نگهداری شده و با روش یکسانی صید و به سالن تکثیر منتقل گردیدند. حدود ۲ سانتی متر مریع از بافت بیضه هر ماهی بریده و پس از شستشو با آب مقطر در یک ویال اپندورف قرار داده شد. پس از نمونه برداری از بافت های هر ماهی، بلافاصله ویال های اپندورف حاوی بافت مورد نظر در چاهک های مخصوص تانک ازت، در دمای ۱۹۶ درجه سانتی گراد ثبیت گردید و به آزمایشگاه شیمی پروتئین بخش بیوتکنولوژی انسٹیتو پاستور ایران منتقل شد.

### استخراج پروتئین

به منظور حذف تاثیر تنوع ژنتیکی فردی بر الگوی پروتئینی، سه خزانه از بافت هر ۵ قطعه ماهی تشکیل شد که هر سه خزانه حاوی مقدار بافت های مساوی از ۱۵ ماهی بود. پس از خرد نمودن بافت بوسیله هموژنايزر، ۵۰۰ مایکرولیتر از بافر لیزکننده شامل ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیواوره، ۴ درصد

پورکاظمی، ۲۰۰۶)، بطوریکه تقریباً همه گونه های ماهیان خاویاری دنیا در معرض خطر انقراض قرار گرفته اند (برشتین، ۱۹۹۳). لذا برای حفظ ذخایر این ماهیان اقداماتی باید در نظر گرفته شود که از آن جمله می توان به تکثیر و پرورش مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به محیطهای طبیعی اشاره کرد. با توجه به اهمیت سیستم تناسلی ماهیان خاویاری در عملیات تکثیر مصنوعی، شناسایی ژن هایی که در این بافت ها و سلول های جنسی بیان می شوند و همچنین آگاهی از ترکیب پروتئینی آنها، در توسعه دانش زیست شناسی تولید مثل و حفاظت بهتر از این گونه های در معرض خطر انقراض، بسیار ضروری و مفید به نظر می رسد.

در حال حاضر اتمام پروژه های توالی یابی ژنوم برخی از موجودات نظیر زبرافیش (*Danio rerio*، منجر به شناسایی ژنهای متعددی گردیده است. وجود پایگاههای رایانه ای که دسترسی آسان به انبوھی از اطلاعات مربوط به ژنهای مختلف را فراهم می سازد، و همچنین فناوری پروتئومیکس Post-genomic) که امکان انجام پژوهش های پساژنومی (-Proteomics) تکرارپذیر را امکان پذیر ساخته است، فرصت مناسبی را جهت شناسایی فرایندهای سلولی و مولکولی آبزیان در اختیار زیست شناسان قرار داده است (پارینگتن و کوارد، ۲۰۰۲). ویلکینز و همکارانش (۱۹۹۶) واژه پروتئوم (Proteome) را جهت نامیدن کلیه پروتئین هایی که بوسیله ژنوم یک موجود زنده رمز می گردد پیشنهاد کردند. هدف دانش پروتئومیکس نیز مطالعه کلیه پروتئین هایی است که پروتئوم یک موجود زنده را تشکیل می دهند.

با وجود گسترش بسیار زیاد مطالعات پروتئومیکس در زمینه های مختلف زیست فناوری، هنوز استفاده از پروتئومیکس در زمینه های تحقیقاتی زیست فناوری آبزیان توسعه چندانی نیافته است. اگر چه در حال حاضر انتشار نتایج مطالعه روی پروتئوم آبزیان شتاب بیشتری یافته (رایم و همکاران، ۲۰۰۴؛ اسمیت و همکاران، ۲۰۰۵؛ بوس ورث و همکاران، ۲۰۰۵؛ چنگ و همکاران؛ ۲۰۰۶؛ تی و همکاران، ۲۰۰۶؛ راسل و همکاران، ۲۰۰۶؛ نظریان و همکاران، ۲۰۰۷؛ مک لین و همکاران، ۲۰۰۷؛ تونسجو و همکاران، ۲۰۰۷؛ چونگستجا و

مرحله دوم متعادل سازی نیز به مدت ۲۰ دقیقه و با اضافه نمودن یدوستاماید ۲/۵ درصد به جای DTT به ترکیب فوق انجام شد.

### (SDS-PAGE)

به منظور الکتروفورز پروتئین ها در بعد دوم از ژل های گرادیانت ۸-۱۲ درصد استفاده گردید. برنامه الکتروفورز هر ژل به صورت ۱۶ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه و ۲۴ میلی آمپر به مدت تقریباً ۵ ساعت تنظیم گردید. به منظور اطمینان از تکرارپذیری الگوی پروتئینی، نمونه های مربوط به هر سه خزانه به صورت جداگانه ران شد. برای رنگ آمیزی ژل هایی که جهت تجزیه و تحلیل نرم افزاری مورد نیاز بودند، از روش رنگ آمیزی نیترات نقره و برای رنگ آمیزی ژل هایی که جهت آزمایشات مربوط به طیف سنجی جرمی مورد نیاز بودند از رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده گردید (کاندیانو، ۲۰۰۴).

### ثبت تصاویر ژل ها و تجزیه و تحلیل نرم افزاری

تصاویر ژل های مورد نظر بوسیله اسکنر (GS-800) با بزرگ نمایی ۲۰۰ dpi تهیه و به صورت فایل های جداگانه با فرمت TIF ذخیره گردید. نقاط شناسایی شده بوسیله نرم افزار PG200 (ساخت شرکت Nonlinear Dynamics، انگلیس) بصورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت تا نقاط غیر واقعی حذف گردیده و همچنین نقاطی که به طرز صحیحی انتخاب نشده بود ویرایش گردد.

### طیف سنجی جرمی (MALDI-TOF/TOF MS)

از دستگاه هضم اتوماتیک برای هضم پروتئین های موجود در ژل استفاده شد. ابتدا هر نقطه برش یافته در ۱۰۰ مایکرولیتر محلول شستشو (شامل MeOH ۵۰ درصد و NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ۰/۵ میلی مولار) خیسانده شد تا آبگیری انجام شود. مجدداً عمل شستشو در همین محلول، دو بار دیگر تکرار گردید. سپس نقاط بریده شده در محلول ACN ۷۵ درصد شستشو داده شد و کاملاً خشک گردید. نقاط برش یافته در محلول تازه ۰/۵ میکروگرم تریپسین در ۲۵ مایکرولیتر NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ۲۰ میلی مولار و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت انکوباسیون گردید تا عمل آبگیری انجام شود. سپس پیتیدها با

CHAPS ۰/۲ درصد آمفولات، یک میلی مولار PMSF، ۰/۲۵ درصد RNase و یک درصد DNase به آن اضافه گردید. سپس نمونه های هموژن شده به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا پروتئین های موجود در بافت آزاد شود (ژو و همکاران، ۲۰۰۶). به منظور حذف قسمت های نامحلول بافت، از سانتریفوژ با دور بالا (g ۱۲۰۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد استفاده شد. پس از اتمام سانتریفوژ، فاز فوقانی نمونه ها که حاوی پروتئین های محلول می باشد جمع آوری گردید. به منظور تعیین غلظت پروتئین هر نمونه از روش برdfورد (۱۹۷۶) استفاده شد.

### (2DE)

### الکتروفورز پروتئین ها در بعد اول (IEF) و متعادل سازی

#### نوارهای IPG

حدود ۱۵۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده با بافر IEF (شامل ۸ مولار اوره، ۴ درصد CHAPS، ۵۰ میلی مولار DTT، ۰/۲ درصد آمفولات و مقدار کمی رنگ بروموفنل بلو) ترکیب گردید تا حجم نهایی هر نمونه به ۳۰۰ میکرولیتر برسد. سپس محلول بدست آمده در g ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. پس از اتمام سانتریفوژ، هر نمونه بوسیله سمپلر بطور یکنواخت در طول یکی از کانال های سینی ویژه آبگیری (Re-hydration) پیت شد و یک نوار ۱۷ سانتی متری IPG در محدوده شبیغ غیر خطی pH ۳ تا ۱۰ (BioRad، آمریکا) بر روی آن قرار گرفت. پس از آبگیری نوارهای IPG به مدت ۱۶ ساعت، برنامه ایزوالکتریک فوکوسینگ دستگاه BioRad (IEF، آمریکا) بصورت ۲۰ دقیقه با شبیغ خطی (۰-۲۵۰ ولت)، ۵ ساعت با شبیغ خطی (۱۰۰۰-۲۵۰ ولت) و ۵۰۰۰۰ ولت ساعت با شبیغ سریع تنظیم گردید. متعادل سازی نوارهای IPG در دو مرحله انجام شد. در مرحله نخست، نوارهای ژل به مدت ۲۰ دقیقه در بافر حاوی ۶ مولار اوره، ۵۰ میلی مولار DTT، ۲۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد SDS و ۲ درصد انکوباسیون گردید.

پیتیدهایی که با پروتئین مورد نظر مطابقت داشته، در جدول شماره ۱ آورده شده است.

تعداد پیتید های پروتئین های شناسایی شده از نظر مطابقت با پروتئین های موجود در NCBI، بین ۳ و ۲۷ عدد متغیر بود. دامنه امتیازات MASCOT نیز بین ۴۶ و ۴۴۲ متغیر است. امتیاز MASCOT با محاسبه لگاریتم منفی ( $\log_{10} P$ ) احتمال (P) شناسایی تصادفی توالی یک پروتئین از طریق جستجو در یک پایگاه اطلاعاتی به دست می آید. اطلاعات بیشتر در مورد مفهوم امتیاز MASCOT و نحوه محاسبه آن در پایگاه ایترنی

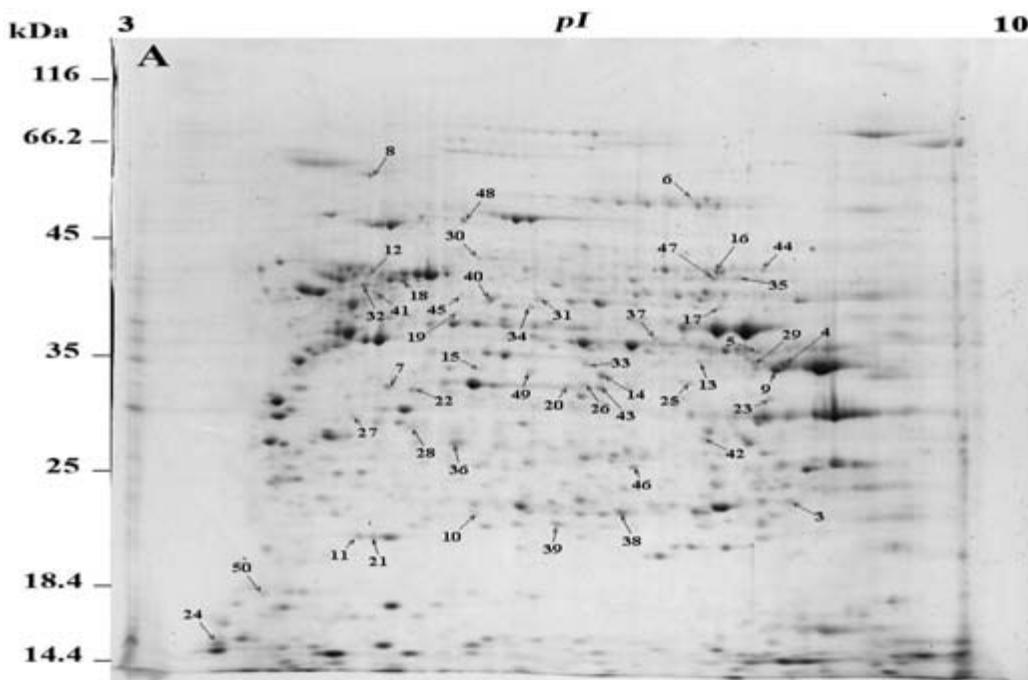
[http://WWW.matrixscience.com/help/scoring\\_help.html](http://WWW.matrixscience.com/help/scoring_help.html) موجود است، برخی از نقاط پروتئینی بیضه مربوط به یک نوع پروتئین بودند که از میان آنها، Pyruvate Kinase و Heat Shock Protein 60 با دو نقطه و 2 Enolase با سه نقطه بر روی ژل شناسایی گردیدند. کلیه پروتئین های شناسایی شده بر حسب عملکرد ثبت شده برای آنها در بانک های اطلاعاتی SWISS-PROT و NCBI در گروه های مختلف دسته بندی گردیدند. این گروه ها شامل آنزیم های فعال در متابولیسم و تولید انرژی، اسکلت و ساختمان سلولی، دفاع سلولی و چپرون ها، رونویسی و ترجمه و باند شدن به RNA و DNA و نقل و انتقالات سلولی، پیام رسانی و تقسیم سلولی می باشد. حدود ۳۱/۸ درصد از پروتئین های اختصاصی بیضه در متابولیسم و تولید انرژی نقش دارند. پروتئین هایی که در رونویسی و ترجمه شرکت می نمایند، ۲۰/۴ درصد از پروتئین های اختصاصی بافت بیضه را تشکیل می دهند. شانزده درصد از پروتئین های شناخته شده نیز چپرون بوده و یا در فرایندهای دفاع سلولی مشارکت می نمایند. پروتئین هایی که در ساختمان سلولی شرکت می نمایند، نظیر اکتین و توبولین، ۱۶ درصد از پروتئین های بافت بیضه را به خود اختصاص می دهند. بررسی عملکرد سایر پروتئین ها نشان داد که ۶/۸ درصد از آنها در پیام رسانی سلولی، ۲/۲ درصد در تقسیم سلولی و ۶/۸ درصد دیگر در نقل و انتقالات سلولی شرکت می نمایند.

دو بار شستشو در ۱۰۰ مایکرولیتر محلول ACN ۵۰ درصد و ۰/۱ TFA درصد استخراج و به یک پلیت ۹۶ خانه ای جدید منتقل گردید تا خشک شوند. سپس پیتیدهای هضم شده در ۳ مایکرولیتر محلول ACN ۵۰ درصد و ۰/۱ TFA درصد قرار داده شد و ۰/۳ مایکرولیتر از آن در پلیت دستگاه طیف سنجی جرمی قرار گرفت و با ۰/۳ مایکرولیتر از محلول اسید آلفا-سیانو-۴-هیدروکسی سینامیک (CHCA) اشباع شده ۹۰ درصد در ACN ۵۰ درصد و ۰/۱ TFA درصد محلول MALDI-گردید. سپس طیف سنجی جرمی به روش PMF TOF/TOF MS انجام شد. مطابقت احتمالی داده های MS/MS و MS با اطلاعات موجود در پایگاه NCBI بطور اتوماتیک و از طریق نرم افزار MASCOT (ساخت شرکت Matrix، انگلیس) مورد بررسی قرار گرفت. تنظیمات جایزشماری جرم (Mass Tolerance) برای یون های اصلی Fragment (Parent Ions) ۱/۲ دالتون و برای قطعات یونی (Ions) ۰/۵ دالتون در نظر گرفته شد. سطح اعتماد آماری ۹۵ درصد جهت شناسایی پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج

میانگین غلظت پروتئین استخراج شده از نمونه های بافت (سه خزانه) بیضه تاسماهی ایرانی  $22/27 \pm 3/88$  میلی گرم در میلی لیتر بود. تجزیه و تحلیل نرم افزاری الگوی پروتئینی بافت بیضه تاسماهی ایرانی نشان داد که حدود ۸۰۰ نقطه پروتئینی مشخص بر روی ژل برآیند حاصل از هر سه خزانه، قابل مشاهده می باشد. با توجه به عدم ردیف یابی ژنوم ماهیان خاویاری و به منظور ارزیابی امکان شناسایی پروتئین های بافت گناد، ۴۸ نقطه پروتئینی مشخص (شکل ۱) از روی ژل بریده شد و به روش MALDI-TOF/TOF مورد طیف سنجی جرمی قرار گرفت که همه نقاط پروتئینی با استفاده از روش مذکور شناسایی گردید. مشخصات کامل پروتئین ها شامل نام Accession، شماره ثبت آن ها در بانک ژن (Number)، نام گونه مربوطه، امتیاز MASCOT و تعداد

ژنتیک نوین / دوره سوم / شماره ۱ / بهار ۱۳۸۷



شکل ۱- الگوی الکتروفورز دو بعدی پروتئین های بافت بیضه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). تفکیک پروتئین ها در بعد اول بوسیله نوار IPG در شب غیر خطی pH ۳ تا ۱۰، و در بعد دوم بوسیله ژل گرادیانت ۸-۱۲ درصد انجام شده است. نقاط پروتئینی شناسایی گردیده با پیکان مشخص گردیده است. برای اطلاعات بیشتر در مورد نقاط پروتئینی، با توجه به شماره آنها در شکل به جدول ۱ رجوع گردد.

جدول ۱- پروتئین های شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF/TOF MS در بافت بیضه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

تعداد پیتیدهای قابل تطبیق/امتیاز MASCOT	گونه/شماره ثبت	نام و نوع عملکرد پروتئین	شماره نقطه پروتئینی
<b>متابولیسم و تولید انرژی</b>			
۲۷۸/۲۴	gi 51863477/ <i>Cercopithecus sabaeus</i>	Glutamate dehydrogenase	۳
۱۱۰/۲۳	gi 114583143/ <i>Pan troglodytes</i>	PREDICTED: similar to 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribonucleotide transformylase/inosin glutamine synthetase	۴
۵۵/۱۹	gi 126648112/ <i>Algoriphagus sp.</i> <i>PRI</i>	MGC82998 protein	۵
۱۲۳/۱۰	gi 49256179/ <i>Xenopus laevis</i>	enolase 2	۶
۸۴/۱۰	gi 51467931/ <i>Danio rerio</i>	pyruvate kinase, muscle	۷
۷۰/۱۱	gi 45382651/ <i>Gallus gallus</i>	hypothetical protein RSP_0472	۸
۵۴/۱۴	gi 77464041/ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	۹
۲۱۷/۱۲	gi 5174389/ <i>Homo sapiens</i>	CoA-transferase family III	۱۰
۵۶/۱۵	gi 70607455/ <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM 639	pyruvate kinase	۱۱
۶۴/۱۱	gi 113207856/ <i>Crassostrea gigas</i>	enolase 2, gamma neuronal	۱۲
۸۷/۱۴	gi 7305027/ <i>Mus musculus</i>	mitochondrial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	۱۳
۸۹/۱۰	gi 52547708/ <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	alpha enolase-1	۱۴
۲۰۶/۱۱	gi 11999247/ <i>Amia calva</i>	unnamed protein product	۱۵
۱۸۸/۹	gi 47211348/ <i>Tetraodon nigroviridis</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	۱۶
۷۹/۹	gi 4218518/ <i>Piromyces sp. E2</i>	enolase 2	۱۷
۱۷۴/۱۰	gi 51467931/ <i>Danio rerio</i>	pyrophosphatase (inorganic) 1	۱۸
۷۰/۷	gi 62955639/ <i>Danio rerio</i>	ساختمان سلولی	۱۹
۱۱۷/۹	gi 113233/ <i>Dictyostelium discoideum</i>	Actin A12	۲۰
۷۶/۱۴	gi 109096506/ <i>Macaca mulatta</i>	PREDICTED: tubulin, alpha, ubiquitous isoform 5	۲۱
۳۹۷/۱۵	gi 86169/ <i>Gallus gallus</i>	actin type 5, cytosolic	۲۲
۲۰۴/۱۵	gi 10242162/ <i>Notothenia coriiceps</i>	beta tubulin	۲۳
۷۰/۱۸	gi 126305451/ <i>Monodelphis domestica</i>	PREDICTED: hypothetical protein	۲۴
۲۲۴/۱۳	gi 26522784/ <i>Galaxea fascicularis</i>	actin	۲۵
۷۹/۱۱	gi 62087662/ <i>Homo sapiens</i>	TPM1 protein variant	۲۶

## دفاع سلولی

۲۷	heat shock protein 60 kDa	gi 82466662/ <i>Paralichthys olivaceus</i>	۳۱۰/۲۵
۲۸	cell adhesion protein retina cognin - chicken (fragment)	gi 422699/ <i>Gallus gallus</i>	۹۰/۱۱
۲۹	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type	gi 78187764/ <i>Pelodictyon luteolum DSM 273</i>	۶۲/۲۴
۳۰	synuclein, beta	gi 45360923/ <i>Xenopus tropicalis</i>	۲۷۷/۴
۳۱	unnamed protein product	gi 47218700/ <i>Tetraodon nigroviridis</i>	۴۴۲/۲۴
۳۲	heat shock protein 60	gi 71724948/ <i>Pseudosciaena crocea</i>	۶۰/۱۵
۳۳	Chain , Lysozyme (E.C.3.2.1.17) Mutant With Cys 77 Replaced By Ala (C77a)	gi 443110/ <i>Homo sapiens</i>	۹۵/۵
۳۴	natural killer cell enhancing factor	gi 52219464/ <i>Ictalurus punctatus</i>	۴۰۱/۱۰

## رونویسی و ترجمه

۳۵	Hypothetical protein CBG14983	gi 39598303/ <i>Caenorhabditis briggsae</i>	۴۸/۱۷
۳۶	Osmolarity two component response regulator	gi 115423843/ <i>Bordetella avium 197N</i>	۵۴/۱۳
۳۷	DEAD/DEAH box helicase	gi 83942539/ <i>Sulfitobacter sp. EE-36</i>	۵۰/۱۶
۳۸	CDC48 like AAA ATPase	gi 66357178/ <i>Cryptosporidium parvum Iowa II</i>	۵۳/۲۷
۳۹	PREDICTED: aspartyl-tRNA synthetase isoform 5	gi 114581044/ <i>Pan troglodytes</i>	۴۷/۱۶
۴۰	PREDICTED: similar to YB2	gi 126340161/ <i>Monodelphis domestica</i>	۹۸/۲
۴۱	cold shock protein	gi 53804855/ <i>Methylococcus capsulatus str. Bath</i>	۴۶/۸
۴۲	response regulator receiver, transcriptional	gi 90418271/ <i>Aurantimonas sp. SI85-9A1</i>	۷۵/۶
۴۳	predicted protein	gi 126135368/ <i>Pichia stipitis CBS 6054</i>	۹۴/۱۰

## نقل و انتقالات سلولی

۴۴	quinohemoprotein amine dehydrogenase, 60 kDa subunit	gi 56476668/ <i>Azoarcus sp. EbNI</i>	۵۳/۱۸
۴۵	putative FoF1 ATP synthase, subunit B'	gi 78696953/ <i>Bradyrhizobium sp. BTAl1</i>	۵۶/۱۲
۴۶	catalase	gi 52354832/ <i>Oplegnathus fasciatus</i>	۱۰۶/۱۰

## پیام رسانی سلولی

۴۷	unnamed protein product	gi 47223957/ <i>Tetraodon nigroviridis</i>	۵۶/۶
۴۸	binding	gi 15218697/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	۵۱/۲۲
۴۹	synaptosome-associated protein 25a	gi 55251215/ <i>Danio rerio</i>	۹۵/۱۴

## تقسیم سلولی

۵۰	topoisomerase II subunit B	gi 28627817/ <i>Streptomyces roseochromogenes subsp. oscitans</i>	۹۴/۲۵
----	----------------------------	---	-------

## بحث

MASCOT (۱۰۴/۸) می باشد. برخی از پروتئین های شناسایی شده در این تحقیق با پروتئین های شناخته شده در گونه هایی که فاصله بسیار زیادی از نظر تکاملی با ماهیان خاویاری دارند

تطبیق یافتند، که از آن جمله به عنوان مثال می توان به *Methylococcus capsulatus* Cold Shock Protein (خانواده *Methylococcaceae*) اشاره کرد. اگر چه این نتایج می تواند نشان دهنده عملکرد مهم و حفاظت شده چنین آنزیم هایی در گونه های دور از لحاظ فایلوژنتیکی باشد، اما احتمال تطبیق تصادفی را نیز نباید بعید دانست. برخی از پروتئین های شناسایی شده در بیضه تاسماهی ایرانی با نقاط متعددی بر روی ژل بیان شده بود. وجود نقاط متعددی از یک پروتئین بر روی ژل می تواند به دلیل فرایند های فسفوریلاسیون، گلیکوزیلاسیون و یا سایر تغییرات پساترجمه ای باشد (جنسن، ۲۰۰۶) که اهمیت وجودی این تغییرات پساترجمه ای در زیست شناسی تولید مثل مشخص نیست و مطالعات بیشتری در این خصوص باید انجام شود.

تجزیه و تحلیل پروتئین های شناسایی شده نشان دهنده مشارکت بخش بزرگی از این آنزیم ها در متابولیسم و تولید انرژی می باشد. این آنزیم های متابولیک که ۳۱/۸ درصد از کل پروتئین های شناسایی شده در گناد تاسماهی نر را شامل می شود، در فرایندهای متابولیکی مختلفی نظیر گلیکولیز فعال هستند.

حدود ۱۶ درصد از پروتئین های شناسایی شده در بفت بیضه تاسماهی به عنوان چپرون و یا HSP عمل نموده و یا اینکه در مقابله با تنفس های اکسیداتیو مشارکت می نمایند. پروتئین هایی که به عنوان HSP شناخته شدند به احتمال زیاد محصول بیان دو ژن مختلف شامل hsp60 (پروتئین شماره ۲۷ و ۳۲) و hsp70 (پروتئین شماره ۳۱) می باشند. بیان این پروتئین ها در بیضه سایر گونه های جانوری نظیر خوک (هوانگ و همکاران، ۲۰۰۵) و موش (آلن و همکاران، ۱۹۸۸) نیز گزارش گردیده است. از آنجا که مطالعات انجام شده مختلف میان نقش حیاتی HSP ها در فرایند اسپرماتوژنر می باشد (سارج و کالن، ۱۹۹۷؛ نیور و همکاران، ۲۰۰۰)، نتایج

هدف از انجام این تحقیق تهیه نقشه مقدماتی پروتئین های بافت بیضه تاسماهی ایرانی نر و بررسی امکان شناسایی آنها به روش MALDI-TOF/TOF MS بود. از آنجا که ژنوم تاسماهی ایرانی و سایر ماهیان خاویاری هنوز بطور کامل توالی یابی نشده است، هیچکدام از پروتئین های شناسایی شده در این تحقیق، قابل تطبیق با پروتئین های از قبل شناخته شده ماهیان خاویاری که در حال حاضر در بانک های اطلاعاتی وجود دارد، نبود. این در حالی است که نتایج مطالعات کیوان شکوه و وزیری (۲۰۰۷) نشان می دهد حدود ۲۳ درصد از پروتئین هایی که در تخمک تاسماهی ایرانی شناسایی گردیده با پروتئین های شناخته شده در گونه های مختلف ماهیان خاویاری مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان می دهد که ۲۰/۸ درصد (۱۰ نقطه) از نقاط پروتئینی با پروتئین های شناخته شده در سایر گونه های ماهی شامل *Tetraodon nigroviridis* *Danio rerio* و *Oplegnathus fasciatus* *Paralichthys olivaceus* و *Ictalurus punctatus* تخمک تاسماهی ایرانی با MALDI-TOF/TOF MS مطابقت دارد. تجزیه و تحلیل پروتئوم به تطبیق حدود ۲۰ درصد از نقاط پروتئینی با پروتئین های شناخته شده ماهی ها گردیده (کیوان شکوه و وزیری، ۲۰۰۷) که از این لحاظ با نتایج حاصل از تحقیق حاضر یکسان است. عدم تطبیق درصد بالاتری از پروتئین های مورد مطالعه با پروتئین های شناخته شده در ماهیها می تواند به دلیل عدم توالی یابی کامل ژنوم بسیاری از گونه های ماهی و محدود بودن تعداد پروتئین های آنها در بانک های اطلاعاتی باشد. اگر چه این احتمال نیز وجود دارد که تعداد محدودی از پروتئین های موجود در ماهیان خاویاری، از نظر تکاملی قربت بیشتری با آنزیم های شناخته شده در گونه های غیر ماهی داشته باشد، اما همانطور که انتظار می رفت کیفیت تطبیق پروتئین های ماهیان خاویاری با پروتئین های ماهی ها (میانگین امتیازات MASCOT ۱۹۲/۶) بهتر از کیفیت تطبیق آنها با پروتئین های سایر موجودات (میانگین امتیازات

## منابع

- 1- Allen RL, Obrien DA and Eddy EM (1998) A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 828-832.
- Billard R and Lecointre G (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 355-392.
- 2- Birstein VJ (1993) Sturgeons and paddlefishes-threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology*, 7: 773-787.
- 3- Bosworth CAT, Chou CW, Cole RB, and Rees BB (2005) Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure. *Proteomics* 5: 1362-71.
- 4- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci I, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L and Righetti PG (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327-1333.
- 5- Chong K, Joshi S, Jin LT, and Shu-Chien AC (2006) Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Sympphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior. *Proteomics* 6: 2251-8.
- 6- Chongsatja PO, Bourchookarn A, Lo CF, Thongboonkerd V and Krittanai C (2007) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection. *Proteomics* 7: 3592-601.
- 7- Huang SY, Lin JH, Chen YH, Chuang CK, Lin EC, Huang MC, Sun HFS and Lee WC (2005) A reference map and identification of porcine testis proteins using 2-DE and MS. *Proteomics*, 5: 4205-4212.

این پژوهش می تواند نقش HSPها در اسپرماتوزنر را علاوه بر فعالیت چپرونی آنها، پررنگ تر نماید. پروتئین دیگری که در گروه پروتئین های دفاعی قرار می گیرد (Natural Killer Cell Enhancing Factor) NKEF باشد. این پروتئین به خانواده ژن های Peroxiredoxin تعلق دارد که در ژنوم گونه های مختلف تا حد بسیار زیادی حفاظت شده، مقاومت سلول در برابر تنش های اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن، Alkyl Hydroperoxide و فلزات سنگین نظیر جیوه را افزایش داده و به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می نماید (ساری و همکاران، ۱۹۹۵؛ کیم و همکاران، ۱۹۹۷). اگر چه بیان NKEF در بافت های مختلف بدن ماهی ها (شین و همکاران، ۲۰۰۱؛ زنگ و همکاران، ۲۰۰۱؛ لی و والدیسر، ۲۰۰۶) و همچنین تخمک تاسماهی ایرانی (کیوان شکوه و وزیری، ۲۰۰۷) گزارش گردیده است، اما عملکرد بیولوژیکی آن در ماهی ها تا کنون از طریق آزمایش مشخص نگردیده و معلوم نیست که دارای نقش آنتی اکسیدانی بوده و Natural Killer Cell-Enhancing عمل می نماید.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که با وجود عدم ردیف یابی کامل ژنوم تاسماهیان، امکان شناسایی و تجزیه و تحلیل پروتئوم آنها وجود دارد. شناسایی کامل پروتئین های موجود در بافت ها و سلول های تناسلی تاسماهیان، امکان ایجاد پایگاه رایانه ای پروتئین های آنها را مهیا می سازد که می تواند منبع ارزشمندی جهت تجزیه و تحلیل شرایط طبیعی و غیر طبیعی موثر بر تولید مثل ماهیان خاویاری باشد.

## سپاسگزاری

از دانشگاه تربیت مدرس و انتیتو پاستور ایران که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر بعمل می آید.

- 8- Jensen ON (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Natural Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 7: 391-403.
- Keyvanshokooh S and Vaziri B (2007) Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.008
- Kim AT, Sarafian TA and Shau H (1997) Characterization of antioxidant properties of natural killer-enhancing factor-B and induction of its expression by hydrogen peroxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147: 135-142.
- 9- Li RW and Waldbieser GC (2006) Genomic organization and expression of natural killer cell enhancing factor (NKEF) gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 20:72-82.
- 10- McLean L, Young IS, Doherty MK, Robertson DH, Cossins AR, Gracey AY, Beynon RJ and Whitfield PD (2007) Global cooling: cold acclimation and the expression of soluble proteins in carp skeletal muscle. *Proteomics* 7: 2667-81.
- 11- Nazarian J, Hathout Y, Vertes A, and Hoffman EP (2007) The proteome survey of an electricity-generating organ (*Torpedo californica* electric organ). *Proteomics* 7: 617-27.
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z and Witkin SS (2000) The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update*, 6: 149-159.
- 12- Parrington J and Coward K (2002) Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology. *Aquatic Living Resources*, 15:193-196.
- 13- Pourkazemi M (2006) Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past, present and future. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 12-16.
- 14- Rime H, Guittot N, Pineau C, Bonnet E, Bobe J and Jalabert B (2004) Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 26.
- 15- Russell S, Hayes MA, Simko E and Lumsden JS (2006) Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injection. *Dev Comp Immunol* 30: 393-406
- 16- Sarge KD and Cullen KE (1997) Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 191-197.
- 17- Sauri H, Butterfield L, Kim A and Shau H (1995) Antioxidant function of recombinant human natural killer enhancing factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208: 964-969.
- 18- Shin DH, Fujiki K, Nakao M and Yano T (2001) Organization of the NKEF gene and its expression in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 597-606.
- 19- Smith RW, Wood CM, Cash P, Diao L, and Part P (2005) Apolipoprotein AI could be a significant determinant of epithelial integrity in rainbow trout gill cell cultures: a study in functional proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1749: 81-93
- 20- Tay TL, Lin Q, Seow TK, Tan KH, Hew CL, and Gong Z (2006) Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Proteomics* 6: 3176-88.
- 21- Tunsgo HS, Paulsen SM, Mikkelsen H, L'Abee-Lund TM, Skjerve E and Sorum H (2007) Adaptive response to environmental changes in the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Res Microbiol* 158: 244-50.
- 22- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF and Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 13:19-50.
- 23- Zhang H, Evenhuis JP, Thorgaard GH and Ristow SS (2001) Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 25-35.
- 24- Zhu JY, Huang HQ, Bao XD, Lin MQ, and Cai Z (2006) Acute toxicity profile of cadmium revealed by proteomics in brain tissue of *Paralichthys olivaceus*: potential role of transferrin in cadmium toxicity. *Aquatic Toxicology*, 78: 127-35.