نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد دوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲
http://japu.gau.ac.ir

بررسی امکان ساخت ویتامین ث در مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی

***آرش اکبرزاده[۱]، حمید فرحمند[۲]، فروزنده محجوبی[۳]، محمدعلی نعمت‌اللهی[۴]، کمال‌الدین حق‌بین[۳] و حامد کلنگی‌میاندره[۵]**

[۱]استادیار گروه شیلات، دانشگاه هرمزگان، [۲]دانشیار گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران، [۳]دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری (*NIGEB*) تهران، [۴]استادیار گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران، [۵]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۹

چکیده

در این پژوهش برای نخستین بار در یک گونه از ماهیان ابتدایی، توانایی ساخت ویتامین ث در مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی از طریق بررسی میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم گلونولاکتون اکسیداز GULO مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج داده‌های بیان ژن و فعالیت آنزیم GULO نشان داد که ژن کدکننده آنزیم GULO در تمامی مراحل نمونه‌برداری تاس‌ماهی ایرانی از تخم چشم‌زده (مرحله جنینی) تا مرحله نوجوانی در سطوح mRNA و پروتیین بیان می‌گردد. این نتایج نشان‌دهنده آن است که تاس‌ماهی ایرانی توانایی ساخت ویتامین ث در بدن خود را داراست و همچنین آغاز ساخت ویتامین ث می‌تواند حتی پیش از تفریخ لاروها و در دوران جنینی ماهی اتفاق افتد. بیش‌ترین شدت بیان ژن GULO در مرحله جنینی (۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم) مشاهده شد که نسبت به سایر مراحل لاروی از اختلاف معنی‌دار برخوردار بود ($P<۰/۰۵$) و پس از آن میزان بیان ژن GULO روندی کاهشی را از خود به نمایش گذاشت. فعالیت آنزیم GULO در تمام مراحل نمونه‌برداری تاس‌ماهی ایرانی مشاهده شد، اما هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم GULO مابین مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). این نتایج نشان‌دهنده آن است که بخشی از نیاز بالای تاس‌ماهیان به ویتامین ث در مراحل ابتدایی جنینی و لاروی می‌تواند از طریق ساخت داخلی اسید اسکوربیک در بدن تأمین شود.

واژه‌های کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، آنزیم گلونولاکتون اکسیداز، ویتامین ث

* مسئول مکاتبه: akbarzadeh@ut.ac.ir

مقدمه

اسید اسکوربیک یا ویتامین ث، به‌عنوان یکی از ضروری‌ترین مواد مغذی مورد نیاز برای فعل و انفعالات حیاتی بدن انسان و جانوران از جمله رشد، توسعه و تکامل ماهیچه‌ها و استخوان‌ها، سیستم ایمنی و تولیدمثل محسوب می‌شود (نام و همکاران، ۲۰۰۲؛ موریو و دابروسکی، ۱۹۹۸). همچنین این ماده مغذی در بدن موجودات زنده به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و متابولیت‌های پروکسیدی تولید شده در سلول‌ها را سم‌زدایی و در نتیجه ساختارها و فرایندهای سلولی حساس در برابر اکسیداسیون را محافظت می‌کند (فراکالوسی و همکاران، ۲۰۰۱). در ماهیان، ویتامین ث نقش بسیار مهمی را در تشکیل کلاژن برای بافت‌های پیوندی شامل غضروف، استخوان و پوست ایفا می‌کند (دابروسکی، ۱۹۹۰). کاهش رشد، بدشکلی‌های ساختاری (اسکولیوزیس[1]، لوردوزیس[2] و ناهنجاری در بافت‌های غضروفی محافظ چشم، آبشش و باله)، تجمع غیرطبیعی رنگ‌دانه‌ها در بافت‌ها، کند شدن ترمیم زخم و کاهش قابلیت تولیدمثل از جمله علایم کمبود ویتامین ث در ماهیان محسوب می‌شود (فراکالوسی و همکاران، ۲۰۰۱). از آن‌جا که ماهیان در دوران لاروی رشد سریعی دارند، علایم کمبود ویتامین ث مانند بدشکلی‌های کمان آبششی و ستون مهره و در نتیجه کند شدن رشد و تکامل با سرعت بالاتری نسبت به ماهیان بالغ رخ می‌دهد (دابروسکی، ۱۹۹۰).

براساس مطالعات صورت گرفته در موجودات مختلف اثبات شده است که آنزیم گلونولاکتون اکسیداز (GULO)[3] کلیدی‌ترین آنزیم در مرحله نهایی مسیر تولید ویتامین ث است (لینستر و وان‌اسچافیتنگن، ۲۰۰۷؛ برنز، ۱۹۵۹؛ نیشیکیمی و همکاران، ۱۹۸۱) به‌طوری‌که در گونه‌هایی که قادر به تولید ویتامین ث نیستند، همه آنزیم‌های دخیل در مسیر تولید L- اسید اسکوربیک وجود دارد و تنها نبود فعالیت آنزیم GULO است که مانع تولید این ویتامین در آن‌ها می‌شود (کراسنو و همکاران، ۱۹۹۸؛ اتا و نیشیکیمی، ۱۹۹۹؛ نیشیکیمی و همکاران، ۱۹۹۴؛ لینستر و وان‌اسچافیتنگن، ۲۰۰۷). براساس مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی انجام گرفته در ماهیان مشخص شده است که ماهیان ابتدایی مانند لامپری‌ها، کوسه‌ماهیان، سپرماهیان و ماهیان خاویاری می‌توانند در بدن خود ویتامین ث را تولید کنند که این توانایی به‌دلیل حضور آنزیم GULO در آن‌ها می‌باشد. حال آن‌که در ماهیان استخوانی پیشرفته آنزیم GULO

1- Scoliosis
2- Lordosis
3- Gulonolactone Oxidase

ساخته نمی‌شود و در نتیجه این ماهیان قادر به تولید ویتامین ث مورد نیاز در بدن خود نیستند (موریو و همکاران، ۱۹۹۹؛ موریو و دابروسکی، ۱۹۹۸؛ چو و همکاران، ۲۰۰۷؛ نام و همکاران، ۲۰۰۲).

جدیدترین پژوهش‌ها که مبتنی بر مطالعات مقایسه‌ای ژنومی انجام شده، نشان‌دهنده آن است که ژن کدکننده آنزیم GULO به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در سنتز اسید اسکوربیک در ماهیان ابتدایی عملکردی بوده و به همین دلیل این دسته از ماهیان قادر به ساخت ویتامین ث در بدنشان می‌باشند (چو و همکاران، ۲۰۰۷). این در حالی است که ژن کدکننده آنزیم نام‌برده در ماهیان استخوانی که تکامل‌یافته‌تر هستند، احتمالا به‌دلیل جهش‌های متوالی در طی تکامل، عملکرد خود را از دست داده است و به همین دلیل است که مرحله نهایی ساخت اسید اسکوربیک در این گروه از ماهیان صورت نمی‌گیرد (چو و همکاران، ۲۰۰۷؛ نام و همکاران، ۲۰۰۲؛ لینستر و وان‌اسچافیتنگن، ۲۰۰۷). بر خلاف اهمیت بسیار بالای ویتامین ث در مراحل جنینی و لاروی ماهیان، تاکنون گزارشی مبنی بر زمان آغاز تولید روند تغییرات آن در ماهیانی که این توانایی در آن‌ها حفظ گردیده وجود ندارد. بنابراین در این پژوهش با بررسی کمی میزان بیان ژن GULO و نیز فعالیت آنزیم GULO در مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، وجود توانایی ساخت ویتامین ث در این دوره حساس از زندگی ماهیان ابتدایی مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، تمامی نمونه‌های تخم، لارو و بچه‌ماهیان مورد نیاز از تکثیر مصنوعی مولدین تاس‌ماهی ایرانی در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر رشت تهیه گردید. در مجموع ۱۰ مرحله زمانی در طی مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی شامل ۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم (جنین پس از مرحله چشم‌زدگی)، زمان بیرون آمدن لارو از تخم (لارو صفر روزه)، لارو یک‌روزه، لارو ۳ روزه، لارو ۶ روزه، لارو ۱۰ روزه، زمان شروع تغذیه فعال (لارو ۱۵ روزه)، لارو ۲۰ روزه، پایان زمان پرورش در حوضچه‌های ونیرو (لارو ۲۵ روزه) و بچه‌ماهیان انگشت‌قد پرورش داده شده در استخرهای خاکی (بچه‌ماهی ۵۰ روزه) انتخاب و نمونه‌های مورد نیاز در هر یک از زمان‌های یاد شده درون ویال‌های عاری از RNase قرار داده شد و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور گردید. پس از اتمام آخرین مرحله نمونه‌برداری، نمونه‌های منجمد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از آن برای انجام مراحل استخراج RNA، ساخت cDNA و اندازه‌گیری میزان بیان ژن GULO و ژن‌های رفرنس، به آزمایشگاه‌های فیزیولوژی جانوری

ژنتیک دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تورکو در کشور فنلاند و نیز برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم GULO به آزمایشگاه بیوشیمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست و فناوری منتقل شد.

برای استخراج RNA، نمونه‌های جنین، لارو و بچه‌ماهی تاس‌ماهی ایرانی به درون ویال‌هایی با مقادیر مشخصی از محلول Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) قرار داده شدند (به‌ازای هر ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم بافت، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول Tri Reagent). سپس به هر ویال یک گلوله کوچک فلزی استریل شده اضافه گردید و پس از آن ویال‌ها برای خرد و له کردن نمونه‌ها به دستگاه هموژنایزر (Qiagen Tissue Lyser) منتقل گردیدند. لازم به ذکر است که در هر یک از مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی، ۶ نمونه انتخاب و RNA آن‌ها استخراج گردید (تعداد تکرارها برابر با ۶ است). به این ترتیب در مجموع RNA مربوط به ۶۰ عدد نمونه استخراج شد. سپس تیمار DNase با استفاده از کیت Invitrogen DNase I (Invitrogen, CA, USA) و براساس دستورالعمل موجود در کیت انجام گرفت. به‌منظور بالاتر بردن کیفیت RNA استخراج شده، محلول RNA تحت تیمار تمیز کردن با استفاده از کیت Nucleospin RNA clean up II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) و براساس دستورالعمل موجود در کیت قرار گرفت. کیفیت RNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد سنجیده شد. به‌منظور تعیین کمیت RNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتری و نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در دستگاه NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) استفاده شد. لازم به ذکر است که برای هر یک از نمونه‌های RNA، کمیت‌سنجی در ۲ تکرار انجام گرفت و عدد میانگین نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌منظور محاسبه میزان RNA مورد نیاز برای ساخت رشته DNA مکمل (cDNA) مورد استفاده قرار گرفت. ساخت رشته DNA مکمل با استفاده از کیت DyNAmo™ (Finnzymes, Espoo, Finland) و براساس دستورالعمل موجود در کیت انجام گرفت.

به‌منظور طراحی پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن GULO در تاس‌ماهی ایرانی و انجام واکنش Real-Time PCR، ابتدا نواحی حفاظتی ژن GULO در جانوران مختلف (Accession number: EF397519; EF397520; EF397522;...) از بانک‌های ژنی NCBI و Ensembl استخراج و سپس نواحی حفاظت شده ژن GULO با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.0.8) مورد شناسایی قرار گرفت و بر این اساس چندین جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار تخصصی طراحی آغازگر Primer3 (version 0.4.0) برای ژن GULO طراحی گردید (جدول ۱).

به‌منظور انتخاب بهترین جفت آغازگر برای انجام واکنش Real-time PCR، تمامی جفت آغازگرها با واکنش PCR معمولی مورد آزمایش قرار گرفتند. هر واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر

بافر PCR X۱۰، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Forward و Reverse ۱۰ میکرومولار، ۱/۳ میکرولیتر cDNA رقیق شده با نسبت ۱:۱۰، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase و باقی‌مانده تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. شرایط PCR شامل یک چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه و در پایان بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. در نهایت با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، درستی باندهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت و جفت آغازگری که قوی‌ترین باند را با اندازه صحیح خود ایجاد کردند برای انجام Real-time PCR انتخاب شدند (جدول ۱). طراحی پروب اختصاصی برای ژن GULO، در فضای نرم‌افزاری پایگاه اینترنتی شرکت Roche applied science (http://www.Roche-applied-science.com) انجام گرفت.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن GULO در تاس‌ماهی ایرانی

آغازگرهای Forward / Reverse	طول قطعه (bp)
TGGAAGCTGGGATTTTTCTG TGGGCAGAATTCCATGTTCT	۱۵۳
AGAGACAGGCTACGGTGGAAG ATGTTCTATCCCTGTGTTGTGAGTG	۱۵۴
CTGGGATTTTTCTGTGTGACCT ATGTTCTATCCCTGTGTTGTGAGTG	۱۳۳
AGAGACAGGCTACGGTGGAAG CCACCTGTGTGGGCAGAA	۱۷۶
CTGGGATTTTTCTGTGTGACCT CCACCTGTGTGGGCAGAA	۱۵۵
GTCTGGCTATGTCAAATTTAGGTG ATGTTCTATCCCTGTGTTGTGAGTG	۸۸
GTCATCCTTGACCTCACTATCCA GAAAATCCAAATTGTCCAAAACC	۹۹
GTCTGGCTATGTCAAATTTAGGTG GAGAGTCGGAGCACTTGAGGA	۱۶۴
GTCTGGCTATGTCAAATTTAGGTG CCACCTGTGTGGGCAGAA	۱۱۰
CACTCACAACACAGGGATAGAACA GAGAGTCGGAGCACTTGAGGA	۱۰۰*

* این جفت آغازگر برای انجام Real-time PCR انتخاب گردید (راندمان = ۱۰۱ درصد).

ژن‌های ribosomal protein L6 (*RPL6*) و beta-actin (*ACTB*) که به‌عنوان مناسب‌ترین ژن‌های رفرنس برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی شناخته شده‌اند (اکبرزاده و همکاران، ۲۰۱۱) برای نرمال‌سازی بیان ژن GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور بررسی بیان ژن GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی از روش TaqMan Real-Time PCR با استفاده از ۱ میکروگرم cDNA رقیق شده با نسبت ۱:۱۰، ۱۰۰ نانومولار پروب و پرایمرهای Forward و Reverse و نیز ۵ میکرولیتر (Kappa Biosystems, Woburn, MA, USA) Kappa Probe Fast qPCR Master Mix اجرا گردید. شرایط Real-time PCR در دستگاه 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) شامل ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۱۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و بسط تنظیم گردید. برای هر یک از نمونه‌ها، ۳ تکرار در نظر گرفته شد. کنترل منفی در واکنش، استفاده از تمامی ترکیبات واکنش به‌جز cDNA، برای بررسی احتمال آلودگی نیز تهیه گردید. منحنی استاندارد برای ژن‌های هدف و رفرنس بر پایه مقادیر مشخص از cDNA در رقت‌های مختلف ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ و ۱:۲۰۰ رسم شد. سپس راندمان PCR بر مبنای رابطه $E\% = (10^{1/slope}-1)\times 100$ محاسبه گردید. به‌منظور کمی‌سازی داده‌های Real-time PCR از رابطه $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (لاواک و اشمیتگن، ۲۰۰۱) استفاده شد که در آن $\Delta\Delta Ct=(\Delta Ct_{target}-\Delta Ct_{calibrator})$ و $\Delta Ct=Ct_{target\ gene}-Ct_{reference\ gene}$ و میانگین هندسی میزان بیان ژن‌های *RPL6* و *ACTB* به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن GULO در هر یک از نمونه‌ها و برای هر یک از مراحل آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی با بهره‌گیری از روش ارایه شده توسط عیاز و همکاران (۱۹۷۶) با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (عیاز و همکاران، ۱۹۷۶). این روش براساس واکنش مستقیم آنزیم GULO با سابستریت ال- گلونولاکتون[1] بنا شده است. نمونه‌های لارو تاس‌ماهی ایرانی در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۷/۴) هموژنایز شدند و پس از سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰۰ گرم بر ثانیه به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محلول فوقانی جدا و به همراه ۳ میلی‌لیتر محلول ال- گلونولاکتون ۵/۶ مولار، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه

1- L-Gulonolactone

سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از توقف واکنش توسط ۲ میلی‌لیتر محلول شامل ۱۸ درصد اسید متافسفریک و ۱۶ درصد اسید تریکلرواستیک، افزودن ذغال فعال و عبور محلول از کاغذ صافی، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول DNPH به ۴ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده بالا که شامل اسید اسکوربیک بود افزوده و محلول ایجاد شده زرد رنگ به‌مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از تشکیل رنگ قرمز که نشان‌دهنده تشکیل اسازون اسید اسکوربیک بود و افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۸۵ درصد، غلظت اسید اسکوربیک با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۴ نانومتر به‌دست آمد. آزمایش‌ها در ۵-۳ تکرار (تعداد تکرارهای زیستی) انجام شد. از آن‌جا که اندازه لارو تاس‌ماهی ایرانی در مراحل ابتدایی زندگی بسیار کوچک و سنجش فعالیت آنزیمی در یک عدد لارو دشوار است، برای سنجش فعالیت آنزیمی در هر یک از مراحل نمونه‌برداری تعداد ۳ عدد لارو با هم ادغام گردیدند. تعیین کمیت مقادیر اسکوربات موجود در هر نمونه از روی یک منحنی استاندارد که با استفاده از اسید اسکوربیک خالص و در ۵ رقت مختلف ساخته شد صورت گرفت و در نهایت میزان فعالیت آنزیم GULO به‌صورت میکرومولار اسکوربات تولید شده به‌ازای هر فرد در مدت ۱ ساعت [μmol ascorbate individual)$^{-1}$ hour^{-1}] محاسبه گردید. برای هر نمونه یک کنترل که بدون سابستریت ال- گلونولاکتون بود نیز برای تعیین میزان اسید اسکوربیک داخلی بافت مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت عدد جذب کنترل از عدد جذب نمونه کسر و نتیجه به‌دست آمده نشانگر مقدار واقعی اسید اسکوربیک تولید شده در نمونه بود. طیف‌سنجی برای هر نمونه در ۳ تکرار انجام گرفت. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون اسمیرنوف- کولموگروف مورد تأیید قرار گرفت. برای مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم GULO در بین مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون چند دامنه توکی در سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) استفاده شد. همه تجزیه و تحلیل‌های آماری با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای آماری SPSS (version 18.0) و SigmaPlot (version 11.0) انجام گرفت.

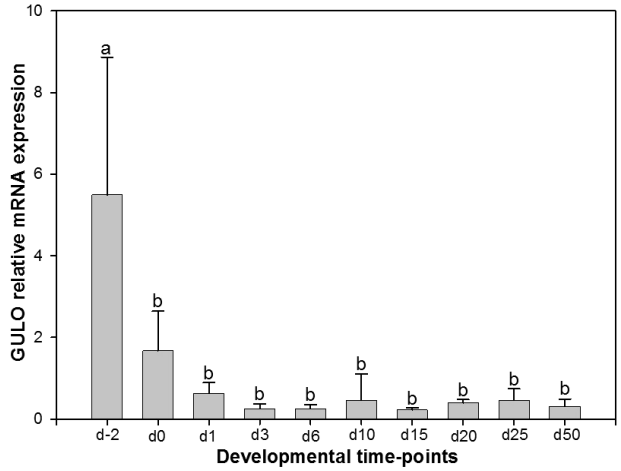
نتایج

میزان بیان نسبی ژن GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی، پس از نرمال‌سازی داده‌ها بر مبنای میانگین هندسی ژن‌های *RPL6*، *ACTB* داخلی در شکل ۱ ارایه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ژن کدکننده آنزیم GULO در تمامی ۱۰ مرحله نمونه‌برداری از تخم چشم زده

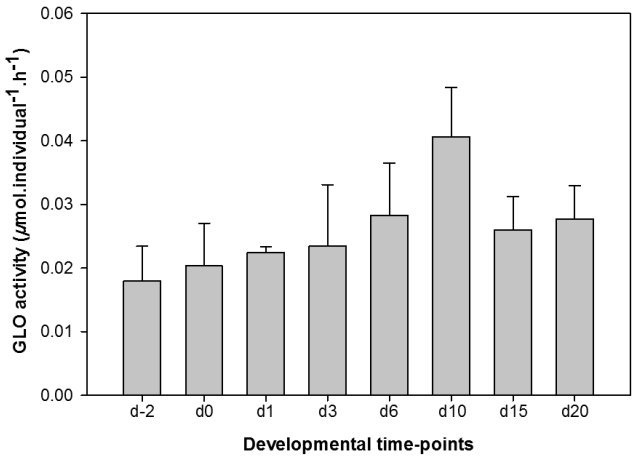
(مرحله جنینی) تا مرحله نوجوانی (بچه‌ماهیان ۵۰ روزه آماده رهاسازی) بیان گردید. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن GULO در بین مراحل مختلف آزمایشی، در اولین مرحله نمونه‌برداری که ۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم بود (مرحله جنینی) مشاهده شد. پس از آن میزان بیان ژن GULO در لارو صفر روزه (لارو تازه تفریخ شده) بیش‌تر از مراحل زمانی پس از آن بود و از لارو یک‌روزه به بعد تا زمان رهاسازی بچه‌ماهیان (بچه‌ماهی ۵۰ روزه) میزان بیان نسبی ژن GULO روند تقریبا ثابتی را از خود نشان داد.

در نتایج به‌دست آمده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن GULO مابین ۱۰ مرحله ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی، تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، با این حال نتایج آزمون چنددامنه توکی نشان داد که سطح بیان ژن GULO در اولین مرحله نمونه‌برداری که ۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم بود (مرحله جنینی) به‌طور معنی‌داری با هر یک از ۹ مرحله زمانی دیگر دارای اختلاف آماری بود (P<۰/۰۵). همچنین نتایج آزمون چند دامنه توکی در ۹ مرحله دیگر نمونه‌برداری شده از لارو صفر روزه (لارو تازه تفریخ شده) به بعد تا زمان رهاسازی بچه‌ماهیان (بچه‌ماهی ۵۰ روزه) نشان داد که سطح بیان ژن GULO به‌صورت دو به دو در هیچ‌یک از ۹ مرحله ذکر شده با هم اختلاف معنی‌دار آماری (P>۰/۰۵) نداشت. این نتیجه بیانگر آن است که شروع دوره تغذیه فعال لاروها (لارو ۱۵ روزه) و یا انتقال از مرحله لاروی (لارو ۲۵ روزه) به بچه‌ماهیان آماده رهاسازی (بچه‌ماهی ۵۰ روزه) تأثیر معنی‌داری بر میزان بیان ژن GULO در سطح mRNA نداشته است.

میزان فعالیت آنزیم GULO در مراحل ابتدایی زیست تاس‌ماهی ایرانی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم GULO در تمام مراحل نمونه‌برداری تاس‌ماهی ایرانی مشاهده شد، اما هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم GULO مابین مراحل ابتدایی رشد و تکامل تاس‌ماهی ایرانی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۱- بیان ژن GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی. d-2: ۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم، d0: لارو صفر روزه، d1: لارو یک‌روزه، d3: لارو ۳ روزه، d6: لارو ۶ روزه، d10: لارو ۱۰ روزه، d15: لارو ۱۵ روزه، d20: لارو ۲۰ روزه، d25: لارو ۲۵ روزه، d50: بچه‌ماهی ۵۰ روزه. برای مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن GULO در بین مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون چنددامنه توکی در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ استفاده شد. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بدون اختلاف معنی‌دار هستند (P>۰/۰۵).



شکل ۲- فعالیت آنزیم GULO در مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی. 2: ۲ روز پیش از بیرون آمدن لارو از تخم، d0: لارو صفر روزه، d1: لارو یک‌روزه، d3: لارو ۳ روزه، d6: لارو ۶ روزه، d10: لارو ۱۰ روزه، d15: لارو ۱۵ روزه، d20: لارو ۲۰ روزه. برای مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن GULO در بین مراحل ابتدایی رشد و تمایز تاس‌ماهی ایرانی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون چنددامنه توکی در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ استفاده شد.

بحث

نتایج داده‌های بیان ژن و فعالیت آنزیم GULO نشان داد که ژن کدکننده آنزیم GULO در تمامی مراحل نمونه‌برداری تاس‌ماهی ایرانی از تخم چشم‌زده (مرحله جنینی) تا زمان رهاسازی بچه‌ماهیان (مرحله نوجوانی) در سطوح mRNA و پروتیین بیان می‌گردد. این نتایج نشان‌دهنده آن است که تاس‌ماهی ایرانی توانایی ساخت ویتامین ث در بدن خود را داراست و همچنین زمان آغاز ساخت ویتامین ث می‌تواند حتی پیش از تفریخ لاروها و در دوران جنینی ماهی اتفاق افتد. اثبات بیان ژن GULO در مراحل اولیه جنینی و لاروی تاس‌ماهی ایرانی بر خلاف حضور ویتامین ث در ذخایر کیسه زرده می‌تواند بیانگر این نکته باشد که وجود توانایی ساخت ویتامین ث در ماهیان خاویاری صفتی می‌باشد که از شروع دوران جنینی ماهیان خاویاری در آن‌ها ظاهر می‌شود.

در این پژوهش، بیش‌ترین میزان بیان ژن GULO در سطح mRNA در مرحله جنینی (تخم چشم زده) و پیش از تفریخ لاروها در تاس‌ماهی ایرانی رخ داد، به‌طوری‌که میزان بیان ژن GULO در این مرحله نسبت به تمامی مراحل زمانی اندازه‌گیری شده پس از تفریخ لاروها تا زمان رهاسازی بچه‌ماهیان (بچه‌ماهیان ۵۰ روزه) از اختلاف معنی‌دار آماری برخوردار بود. در مراحل ابتدایی لاروی (لاروهای صفر و یک‌روزه) نیز میزان بیان ژن GULO نسبت به مراحل زمانی پس از آن به‌طور نسبی از سطح بالاتری برخوردار بود، اما از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار نبود. از آن‌جا که رشد و تغذیه ماهیان در دوران جنینی و ابتدایی لاروی بر پایه ذخایر موجود در کیسه زرده استوار است (رونستاد و همکاران، ۱۹۹۹)، بیان بالای ژن GULO در این مراحل می‌تواند جالب توجه باشد. یکی از دلایلی که می‌تواند بیان بالای ژن GULO در مراحل اولیه جنینی و لاروی را توجیه کند، نیاز بالای ماهیان به ویتامین ث در این دوران است. در گونه‌های مختلفی از ماهیان، چه آن‌هایی که توانایی ساخت ویتامین ث در آن‌ها وجود ندارد و چه آن‌هایی که این توانایی در آن‌ها باقی‌مانده، مشخص شده است که غلظت ویتامین ث در مراحل جنینی و ابتدایی لاروی در بالاترین میزان خود وجود دارد و با سپری شدن مراحل لاروی تا زمان آغاز تغذیه فعال با روندی ثابت کاهش می‌یابد (واگبو، ۲۰۱۰؛ ساتو و همکاران، ۱۹۸۷؛ رونستاد و همکاران، ۱۹۹۹) در گونه‌هایی مانند ماهی کلمه (*Rurilus rufilus*)، ماهی سفید (*Coregonus lavarefus*) و ماهی قزل‌آلای قطبی (*Salvelinus ulpinus*) میزان اسید اسکوربیک کل بدن از لارو تازه تفریخ شده تا چندماهگی کاهش یافت (دابروسکی، ۱۹۹۲). همچنین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان عنوان شده است که میزان نیاز به ویتامین ث با افزایش سن ماهی

کاهش می‌یابد و علایم کمبود ویتامین ث در مراحل ابتدایی زندگی بسیار مشهودتر از ماهیان مسن‌تر است (ساتو و همکاران، ۱۹۷۸).

اهمیت بالا بودن بیان ژن GULO در مراحل جنینی و آغازین لاروی تاس‌ماهی ایرانی می‌تواند با نقش تأثیرگذار ویتامین ث در تشکیل کلاژن برای ساخت بافت‌های پیوندی پوست، غضروف و استخوان در ارتباط باشد. ویتامین ث نقش یک کوفاکتور را برای آنزیم پرولیل هیدروکسیلاز[۲] ایفا می‌کند که موجب تسریع هیدروکسیلاسیون هیدروکسی پرولین[۳] در فرآیند پس از ترجمه می‌شود. در طی این واکنش، اسید اسکوربیک با آهن اکسیدشده‌ای که به پرولیل هیدروکسیلاز متصل است واکنش داده و سبب احیای آهن آن می‌شود و در نتیجه آزادسازی آنزیم را تسهیل می‌کند. هیدروکسی پرولین یک اسیدآمینه بسیار مهم در کلاژنو کلاژن پروتیین غالب در بافت‌های پیوندی مانند استخوان، پوست، غضروف و رگ‌های خونی است. وجود مقادیر ناکافی کلاژن باعث اختلال در حفظ و نگهداری بافت‌های پیوندی و در نتیجه بروز علایم کمبود ویتامین ث می‌شود (یان و همکاران، ۲۰۰۷؛ پارسونس و همکاران، ۲۰۰۶). بر طبق منابع مختلف (به‌عنوان مثال استازسکا و دابروسکی، ۲۰۰۹؛ لی‌گالک و همکاران، ۲۰۰۴) زمان آغاز تولید کلاژن برای تشکیل بافت‌های پیوندی در ماهیان در مرحله جنینی اتفاق می‌افتد. با توجه به نقش حیاتی ویتامین ث در تشکیل کلاژن برای ساخت و حفظ بافت‌های پیوندی پوست، غضروف و استخوان در مراحل جنینی و لاروی ماهیان، بیان بالای ژن GULO در مرحله جنینی و ابتدایی لاروی تاس‌ماهی ایرانی منطقی به‌نظر می‌رسد.

به‌دلیل آن‌که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه روند تغییرات بیان ژن GULO در مراحل ابتدایی زیست جانوران صورت نگرفته، بسیار مشکل است که بتوان مقایسه‌ای از روند تغییرات بیان ژن GULO در تاس‌ماهی ایرانی با سایر جانوران و به‌خصوص پستانداران داشت. مطالعاتی که در زمینه الگوی فعالیت آنزیم GULO در مراحل ابتدایی زیست جانوران دیگر انجام شده روند کاهشی فعالیت آنزیم GULO را با افزایش سن جانور نشان می‌دهد. به‌عنوان مثال در موش آزمایشگاهی فعالیت آنزیم GULO در روز هجدهم جنینی در بافت کبد مشاهده گردید و بسته به گونه موش، ۱۵–۵ روز پس از زایمان به بیش‌ترین میزان فعالیت خود رسید و پس از آن تا زمان رسیدن به سن بلوغ کاهش یافت (جنیس و همکاران، ۱۹۸۴). همچنین در پرندگانی همچون مرغ خانگی فعالیت آنزیم GULO در

2- Prolyl Hydroxylase
3- Peptidyl Proline

جنین‌های شش روزه قابل تشخیص بود و پس از گذشت ۳۵ روز از زمان لقاح، به بیش‌ترین میزان خود در بافت همه جوجه‌ها رسید و سپس تا زمان رسیدن به سن بلوغ کاهش یافت (جنیس و همکاران، ۱۹۸۴). در بافت کبد خوک نیز فعالیت آنزیم GULO در اواسط مراحل جنینی بالا بوده و پس از آن تا رسیدن به مرحله نوزادی کاهش می‌یابد. این کاهش میزان فعالیت آنزیم GULO از اواسط دوره جنینی تا ابتدای مرحله نوزادی مربوط به انتقال اسید اسکوربیک از مادر به فرزندان عنوان شد (چینگ و همکاران، ۲۰۰۱a). همچنین در طی دوران نوزادی و شیرخوارگی خوک‌های تازه به دنیا آمده میزان فعالیت آنزیم GULO در بافت کبد پایین بود و پس از این‌که نوزادان از شیر گرفته شدند، دوباره فعالیت آنزیم GULO در بافت کبد افزایش یافت. که دلیل کاهش میزان فعالیت آنزیم GULO در دوران شیرخوارگی نوزادان، فراهم بودن ویتامین ث از طریق شیر مادر عنوان شد (چینگ و همکاران، ۲۰۰۱b).

در خاتمه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تاس‌ماهیان از توانایی ساخت ویتامین ث در ابتدایی‌ترین دوران زیست خود برخوردارند. به‌طوری‌که ژن کدکننده آنزیم GULO در تمامی مراحل ابتدایی زیست تاس‌ماهی ایرانی و به‌خصوص در مرحله جنینی و ابتدایی لاروی در سطوح mRNA و پروتیین بیان گردید و نشان‌دهنده آن است که زمان آغاز ساخت ویتامین ث می‌تواند حتی پیش از تفریخ لاروها و در دوران جنینی ماهیان ابتدایی اتفاق افتد.

منابع

1. Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M.A., Leskinen, P., Rytkonen, K., and Nikinmaa, M. 2011. The transcription of l-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbate, during development of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Comp. Biochem. Physiol. B. 158: 282-288.
2. Ayaz, K.M., Jenness, R., and Birney, E. 1976. An improved assay for L-gulonolactone oxidase. Anal. Biochem. 72: l6l-171.
3. Burns, J.J. 1959. Biosynthesis of L-ascorbic acid - basic defect in scurvy. Am. J. Med. 26: 740-748.
4. Ching, S., Mahan, D.C., Ottobre, J.S., and Dabrowski, K. 2001a. Ascorbic acid synthesis in fetal and neonatal pigs and in pregnant and postpartum sows. J. Nutr. 131: 1997-2001.
5. Ching, S., Mahan, D.C., and Dabrowski, K. 2001b. Liver L-gulonolactone oxidase activity and tissue ascorbic acid concentrations in nursing pigs and the effect of various weaning ages. J. Nutr. 131: 2002-2006.

6.Cho, Y.S., Douglas, S.E., Gallant, J.W., Kim, K.Y., Kim, D.S., and Nam, Y.K. 2007. Isolation and characterization of cDNA sequences of L-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbic acid, from extant primitive fish groups. Comp. Biochem. Physiol. B. 147: 178-190.
7.Dabrowski, K. 1990. Ascorbic-Acid Status in the Early Life of Whitefish (*Coregonus-Lavaretus*). Aquaculture, 84: 61-70.
8.Dabrowski, K. 1992. Ascorbate concentration in fish ontogeny. J. Fish Biol. 40: 273-279.
9.Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, L.K., and Oftedal, O.T. 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. Aquaculture, 192: 321-332.
10.Jenness, R., Birney, E.C., Ayaz, K.L., and Buzzell, D.M. 1984. Ontogenetic development of L-gulonolactone oxidase activity in several vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B. 78: 167-173.
11.Krasnov, A., Reinisalo, M., Pitkanen, T.I., Nishikimi, M., and Molsa, H. 1998. Expression of rat gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the key enzyme of L-ascorbic acid biosynthesis, in guinea pig cells and in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochim. Biophys. Acta. 1381: 241-248.
12.Le Guellec, D., Morvan-Dubois, G., and Sire, J.Y. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). Int. J. Dev. Biol. 48: 217-231.
13.Linster, C.L., and Van Schaftingen, E. 2007. Vitamin C-Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. J. FEBS. 274: 1-22.
14.Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Methods. 25: 402-408.
15.Moreau, R., and Dabrowski, K. 1998. Body pool and synthesis of ascorbic acid in adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*): An agnathan fish with gulonolactone oxidase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 10279-10282.
16.Moreau, R., and Dabrowski, K. 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. J. Fish Biol. 57: 733-745.
17.Moreau, R., Dabrowski, K., and Sato, P.H. 1999. Renal L-gulono-1,4-lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Aquaculture, 180: 359-372.
18.Moreau, R., Kaushik, S.J., and Dabrowski, K. 1996. Ascorbic acid status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*): Tissue concentration, mobilisation and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Physiol. Biochem. 15: 431-438.
19.Nam, Y.K., Cho, Y.S., Douglas, S.E., Gallant, J.W., Reith, M.E., and Kim, D.S. 2002. Isolation and transient expression of a cDNA encoding L-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis, from the tiger shark Scyliorhinus torazame. Aquaculture, 209: 271-284.

20. Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., and Yagi, K. 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic-acid biosynthesis missing in man. J. Biol. Chem. 269: 13685-13688.
21. Nishikimi, M., Yamauchi, N., Kiuchi, K., and Yagi, K. 1981. Homology of L-Gulonolactone oxidase of species belonging to mammalia, aves and amphibia. Xperientia. 37: 479-480.
22. Ohta, Y., and Nishikimi, M. 1999. Random nucleotide substitutions in primate nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the missing enzyme in L-ascorbic acid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1472: 408-411.
23. Ostaszewska, T., and Dabrowski, K. 2009. Early development of Acipenseriformes (Chondrostei, Actinopterygii). P 171-229, In: Kunz, Y.W., C.A. Luer and B.G. Kapoor, (eds.), Development of non-teleost fishes, Science Publishers, USA.
24. Parsons K.K., Maeda, N., Yamauchi, M., Banes, A.J., and Koller, B.H. 2006. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 290: 1131-1139.
25. Ronnestad, I., Hamre, K., Lie, O., and Waagbo, R. 1999. Ascorbic acid and alpha-tocopherol levels in larvae of Atlantic halibut before and after exogenous feeding. J. Fish Biol. 55: 720-731.
26. Sato, M., Yoshinaka, R., Kuroshima, R., Morimoto, H., and Ikeda, S. 1987. Changes in water-soluble vitamin contents and transaminase-activity of rainbow-trout egg during development. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 795-799.
27. Waagbo, R. 2010. Water-soluble vitamins in fish ontogeny. Aquaculture Res. 41: 733-744.
28. Yan, J., Jiao, Y., Li, W., Jiao, F., Beamer, W.G., Rosen, C.J., and Gu, W. 2007. Evaluation of gene expression profiling in a mouse model of L-gulonolactone oxidase gene deficiency. Genet. Mol. Biol. 30: 322-329.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Utilization and Cultivation of Aquatics, Vol. 2(2), 2013
http://japu.gau.ac.ir

The possibility of ascorbate biosynthesis in early development of Persian sturgeon

***A. Akbarzadeh[1], H. Farahmand[2], F. Mahjoubi[3], M.A. Nematollahi[4], K. Haghbeen[3] and H. Kolangi Miandareh[5]**

[1]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, University of Hormozgan, [2]Associate Prof., Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, [3]Associate Prof., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, [4]Assistant Prof., Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, [5]M.Sc. Graduate, Dept. of Fisheries and Environmental, Tehran University

Received: 05/06/2012; Accepted: 12/09/2012

Abstract

In the present study, for the first time in a primitive fish species, the possibility of ascorbate biosynthesis during early development of Persian sturgeon was investigated via the evaluation of mRNA expression and GULO enzyme activity. The results showed that GULO gene is expressed in all developmental time-points of Persian sturgeon from eyed eggs (embryonic stage) to juvenile fish in both mRNA and protein levels. This suggests that: (*i*) Persian sturgeon can synthesize ascorbate; (*ii*) The ascorbate synthesis probably starts already before hatching. The mRNA expression of GULO was highest at embryonic stage (two days before hatching; $P<0.05$) and started to decline from hatching of larvae to the rest of developmental time-points. The GULO activity was detected in all developmental time-points of Persian sturgeon. However, Statistical analysis of the results indicated that the observed changes in the GULO activities were not significant ($P>0.05$). Our results suggest that some parts of vitamin C requirement must be fulfilled by endogenous formation of ascorbic acid during early larval development stages of sturgeon fish.

Keywords: Persian sturgeon, L-gulono-gamma-lactone oxidase, Ascorbate

* Corresponding Author; E-mail: akbarzadeh@ut.ac.ir