Nova Biologica Reperta 6(2): 148-154 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۱۴۸ الی ۱۵۴ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

مطالعه بیان ژن‌های GH و گرلین در دوره تکامل لاروی ماهی گورخری

حامد پاک‌نژاد، طیبه عنایت غلام‌پور، رقیه صفری و سیدحسین حسینی‌فر
دانشکدهٔ شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
مسئول مکاتبات: حامد پاک‌نژاد، hkolangi@gau.ac.ir

چکیده. ماهی گورخری به عنوان یک گونه مهم در علم ژنتیک است و با توجه به نزدیکی ژنوم آن به ژنوم انسان، بررسی بیان برخی از ژن‌های مربوط به رشد و اشتها طی دورهٔ تکامل لاروی این ماهی ضروری به نظر می‌رسد. ژن‌های کدکننده هورمون رشد و اشتها (GH و گرلین) در سنتز و رهاسازی هورمون رشد نقش دارند که می‌توانند به عنوان ژن‌های اقتصادی در ماهیان مطرح شوند. با توجه به اهمیت ژن‌های مذکور در دوران تکامل لاروی، تحقیق حاضر به‌منظور بررسی روند فعالیت آنها در مراحل ابتدایی رشد صورت گرفت. نمونه‌برداری از لاروها در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ صورت پذیرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار گرفتند و تا زمان استخراج RNA (با استفاده از کیت RNX-Plus) در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. داده‌های ژن‌های هدف با استفاده از ژن رفرنس *β-actin* به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تحلیل شد. بیان ژن‌های مذکور در طی مراحل مختلف تکاملی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند؛ به‌طوری‌که بیان ژن GH و گرلین به‌ترتیب در روز ۴ و ۱۰ پس از تفریخ به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر روزهای نمونه‌برداری بود ($P<0.05$). بطور کلی با توجه به اهمیت بسیار زیاد ژن‌های مرتبط با رشد و اشتها که تأثیر به سزایی در روند بازمانی و بقاء لاروها در مراحل اولیه زندگی بر عهده دارند، در مراحل اولیهٔ لاروی و روزهای ابتدایی لاروها بیان ژن‌های GH و گرلین، بیشتر از سایر دوره‌های تکاملی است.

واژه‌های کلیدی. اشتها، انتوژنی، بتااکتین، ژنتیک، هورمون رشد

Study of GH and Ghrelin genes expression during the larvae developmental period in *Danio rerio*

Hamed Paknejad, Tayebeh Enayat Gholampour, Roghieh Safari & Seyed Hossein Hossenifar
Department of Fisheries, Gorgon University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran
Correspondent author: Hamed Paknejad, hkolangi@gau.ac.ir

Abstract. Zebra fish is an important species in genetics and considering the proximity of its genome to the human genome, investigating the expression of some of the growth and appetite genes during its larvae development is essential. Genes coding growth and appetite (GH and ghrelin) hormones are involved in the synthesis and release of growth hormone, which can be considered to be economic genes in pisciculture. Given the importance of these genes during the early larvae development stages, this study was performed to assess their activity. Samples were collected at 4, 7, 10, 15, 30 and 45 post-hatching days. Samples were immediately placed in liquid nitrogen (-196 degree centigrade) and then stored in a freezer at -80 degree centigrade until RNA extraction (using RNX-Plus kit). To analyze normal expression of target genes, reference gene *β-actin* was used by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The expression of genes associated with the growth and appetite was significantly different at various stages of the development of zebra fish, as the gene expression of GH on day 4 and ghrelin gene on day 10 after hatching were significantly higher compared with other samples ($P<0.05$). Overall, the expression of GH and ghrelin genes at the early stages of growth is higher than other fish developmental stages due to their great importance in the survival of larvae at these stages of life.

Keywords. appetite, beta actin, genetic, growth hormone, ontogeny

Received 05.07.2017/ Revised 22.04.2018/ Accepted 28.05.2018/ Published 01.08.2019

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴/ اصلاح: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۷/ انتشار: ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]

مقدمه

هورمون رشد یا Growth Hormone که به اختصار GH نامیده می‌شود، در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک بدن جانداران از جمله رشد بدن، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و بالانس انرژی نقش دارد (Parhar *et al.*, 2003). این هورمون توسط بسیاری از فاکتورها به‌ویژه دو نوروپپتید مترشحه از هیپوتالاموس، GHRH که سبب رهاسازی هورمون رشد و سوماتوستاتین که از رهاسازی هورمون رشد ممانعت می‌کند، کنترل می‌شود. تحریک رشد در زمان کمبود GH در انسان و حیوانات به خوبی مشخص شده است (Schmid *et al.*, 2003). براساس گزارشاتی که تاکنون ارائه شده باید بیان داشت که تنظیم رهاسازی هورمون رشد عملکرد بسیار مهم گرلین در مهره‌داران است. گرلین یک پپتید با ۲۸ اسید آمینه و یک گروه ان-اکتانوئیل است که به‌عنوان یک لیگاند درون‌زاد برای گیرنده‌های هورمون رشد شناخته شده است و موجب آزادسازی هورمون رشد، افزایش رفتار دریافت غذا و کاهش انرژی مصرفی و در نهایت موجب افزایش وزن بدن می‌شود (Parhar *et al.*, 2003). از سوی دیگر، گرلین دارای چندین فعالیت بیولوژیکی بوده و مهم‌ترین عملکرد آن رهاسازی هورمون رشد و ایجاد اشتها است و از دسته پپتیدهای تنظیمی دستگاه گوارش محسوب می‌شود (Unniappan *et al.*, 2014). گرلین برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ از معده انسان و موش استخراج شد. اطلاعات نشان می‌دهد که گرلین در سطح پائینی در زمان قبل از تغذیهٔ خارجی و تکامل معده بیان می‌شود. اما بررسی بیان ژن گرلین نشان داد که گرلین دارای نقش تحریک روی اشتها، رهاسازی هورمون رشد است (Parhar *et al.*, 2003).

ماهی گورخری (*Danio rerio*) ازجمله ماهیان زینتی مهمی است که در بسیاری از شاخه‌های علوم شامل بیماری‌های انسان (Lieschke & Currie, 2007) زیست‌شناسی رشد و ژنتیک (Grunwald & Eisen, 2002) سم شناسی محیطی (Scholz *et al.*, 2008)، آزمایش دارو (Barros *et al.*, 2008)، تکامل (Canestro *et al.*, 2007) و به‌طور فزاینده‌ای به عنوان مدل (Lawrence *et al.*, 2011) مورد استفاده قرار گرفته است. بسیاری از ویژگی‌های دیگر مانند شباهت ژنومی با انسان، صرفه اقتصادی و پرورش آسان، موجب افزایش استفاده از این جانور مدل در رشته‌های گوناگون شده است (Hill *et al.*, 2005; Spence *et al.*, 2008). از سوی دیگر، یکی از مشکلات مهم در دورهٔ لاروی تلفات سنگین لاروها است. لذا پیش بینی می‌شود تا با مطالعه ژن‌های درگیر در رشد و اشتها در طی دورهٔ لاروی آبزیان بتوان راهکار مناسبی برای کنترل تلفات و بهینه‌سازی رشد پیشنهاد نمود. فرض بر این است که ژن‌های مذکور در این ماهیان دارای عملکردهای بسیار مهم در زمینه‌های رشد و افزایش اشتها و در نتیجه افزایش مصرف غذا است. از این رو تحقیق حاضر به منظور بررسی بیان این ژن‌ها در طی دوره تکاملی لاروی ماهی گورخری به‌عنوان یک گونه مهم در علم ژنتیک و با توجه به نزدیکی ژنوم این ماهی با ژنوم انسان، صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. جهت انجام آزمایش، لاروهای ماهی گورخری از مرکز ماهیان زینتی استان گلستان تهیه شدند. تغذیه لاروها پس از جذب ۷۵ درصد کیسه زرده با شیرخشک، زرده تخم مرغ و غذای زنده حاوی ناپلی زئوپلانکتون‌های ریز و پس از آن تغذیه با غذای بیومار صورت گرفت. در طول دوره آزمایش خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد (اکسیژن محلول: ۰/۱±۴/۴ میلی-گرم در لیتر، پی. اچ: ۰/۲±۷/۲، نیتریت: ۰/۲±۱/۵۳ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل: ۸/۱±۲۰۲ میلی‌گرم در لیتر، دما: ۱±۲۴/۵ درجهٔ سانتی-گراد). تغذیه ماهیان به‌صورت دستی و روزانه ۳ بار و به میزان ۱۰ درصد وزن بدن صورت گرفت. به‌منظور بررسی بیان ژن‌های GH و گرلین، نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از نمونه‌برداری با استفاده از ازت مایع (۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد) فریز شدند و سپس در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند (Kolangi Miandare *et al.*, 2013).

استخراج RNA

پس از همگن نمودن نمونه‌های منجمد شده در ازت مایع، فرایند استخراج با استفاده از کیت RNX-Plus و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Sina Colon، ایران) انجام شد. به این صورت که در هر مرحله نمونه‌برداری، RNA کل سه نمونه استخراج شد و برای هر مرحله سه تکرار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]

ارزیابی کمی و کیفی RNA

ارزیابی کیفی RNA کل توسط دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ انجام شد و کمیت (غلظت) RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-1000، Thermo Scientific، USA) تعیین شد (شکل ۱). مقدار جذب نوری نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100، BioRAD, USA) در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر قرائت شد (Kolangi Miandare *et al.*, 2013).

آماده سازی ژل

جهت آماده‌سازی ژل آگارز برای یک سینی با حجم ۲۵ میلی لیتر، ابتدا به میزان ۲۵ میلی لیتر بافر TAE یا TBE که به‌صورت 1X آماده‌سازی و رقیق شده است در یک بشر ریخته سپس به میزان ۰/۳۷۵ گرم پودر آگارز به آن اضافه کردیم سپس آن را روی حرارت هیتر یا در داخل ماکروویو قرار داده تا آگارز به شکل کامل حل شود. هنگامی که مقداری دمای ژل پایین آمد به میزان ۲ تا ۳ ماکرولیتر از رنگ مورد نظر به آن اضافه کرده و به آرامی مخلوط می‌کنیم.

ساخت cDNA

سنتز cDNA با مسترمیکس سنتز cDNA شرکت GENET BIO محصول کشور کره جنوبی انجام شد. ۵ میکرولیتر از RNA که قبلاً آماده شده به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo dt به تیوب‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انکوبه شد و سپس به روی یخ انتقال داده شد و ۱۰ میکرولیتر مستر حاوی آنزیم Reverse transcriptase به آن اضافه شد. در نهایت با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ میکرولیتر بر روی یخ گذاشته شد تا خنک شود و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

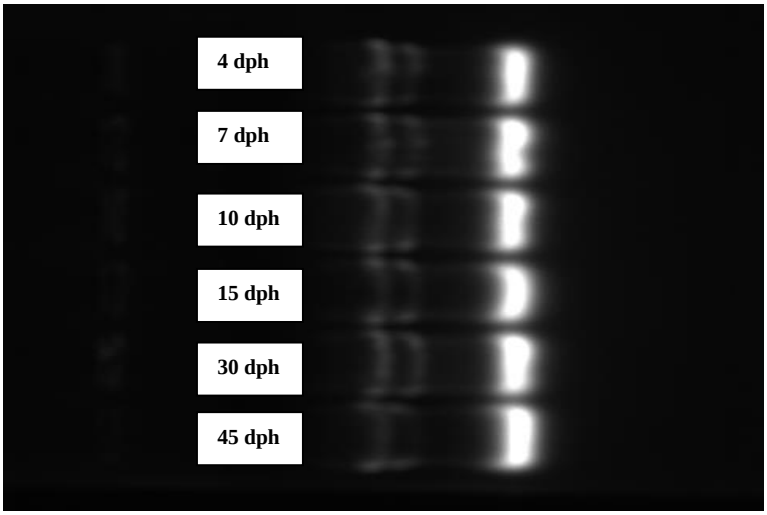
طراحی آغازگر

آغازگرهای مورد نیاز برای ژن‌های تحت بررسی و ژن مرجع (*β-actin*) برای انجام RT-PCR، طبق توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI طراحی شد (جدول ۱). اندازهٔ محصول PCR با توجه به آغازگرها و اختصاصی بودن عمل آنها با کمک ژل آگارز یک درصد تحت بررسی قرار گرفت. با توجه به این که از یک سو، تقریباً در تمامی منابع برای بررسی بیان ژن از ژن *β-actin* به‌منزلهٔ ژن مرجع استفاده شد (Trant *et al.*, 2001; Cheshenko *et al.*, 2007) و از سوی دیگر، بررسی بیان نسبی این ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد مشخص شد که در تمامی مراحل تقریباً بیان ثابتی دارد (Bustin *et al.*, 2009)، از این رو در این تحقیق، نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن مرجع *β-actin* صورت گرفت.

فرایند RT-PCR

واکنش RT-PCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR و با استفاده از کیت (Cyber BioPars, IRAN) و براساس دستور العمل استاندارد، در مرحله اول، تعداد ۴۰ عدد چرخه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد در مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در مرحله بعد دما به ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد در مدت ۲۰ ثانیه کاهش یافت و پس از آن ۴۰ ثانیه در دمای ۷۴ درجهٔ سانتی‌گراد و در مرحلهٔ آخر به مدت ۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد. از آنجا که در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد محصول غیر-اختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به‌منزلهٔ دمای واکنش در نظر گرفته شد. PCR در تیوب‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوب به مقدار ۲۰ میکرولیتر بود (۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و مرجع، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف و مرجع، ۶/۴۰ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده، ۱ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکساید). برای انجام RT-PCR تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی شد. خروجی دستگاه به‌صورت Ct (Threshold Cycle) یا چرخهٔ آستانه ثبت شد. منحنی استاندارد با استفاده از نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی cDNA (۱ به ۵، ۱ به ۱۰، ۱ به ۵۰، ۱ به ۱۰۰ و ۱ به ۲۰۰ میکرولیتر) رسم شد. بازدهی PCR با استفاده از رابطهٔ $E\ (\%) = [10\ (1/Slope) - 1] \times 100$ محاسبه شد (Radonic *et al.*, 2004). تغییرات نسبی بیان ژن‌های GH و گرلین با دو بار مشتق‌گیری از Ct ($۲^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه شد (Livak & Schmittgen, 2001). در بین زمان‌های تحت مطالعه مرحله‌ای که کمترین Ct را دارا بود به عنوان کالیبراتور به‌منظور ارزیابی بیان نسبی ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت (Larionov *et al.*, 2005). در نرم‌افزار SPSS 19 ابتدا پراکنش نرمال سطح بیان ژن‌های GH و گرلین با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]



شکل ۱- باندهای RNA مشاهده شده در ژل آگارز در روزهای مختلف پس از تفریخ (dph= day post hatch).

Fig. 1. Observed RNA bands in agarose gel on different days after hatching (dph= day post hatch).

جدول ۱- اطلاعات توالی آغازگرهای آزمایش شده جهت انجام Real-Time PCR برای ژن های هدف و رفرنس(Kolangi Miandare *et al.*, 2013).

Table 1. Sequence of used primers in real-time PCR for target and reference genes (Kolangi Miandare *et al.*, 2013).

نام آغازگر	توالی '۳-'۵	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)	درصد کارایی آغازگر
GH	F: GTGGTCAAACTCCGCAAGA R: GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۵۹	۲۳۰	۹۶
Ghrelin	F: CGGCTGAACCCAAGATGAC R: CAGTCAGTTCAATTAAGCAT	۵۹	۲۲۰	۹۸
β-actin	F:AGGTCATCACCATCGGCAAT R:GATGTCCACGTCGCACTTCT	۵۸	۱۴۰	۹۸

بررسی شد. میانگین داده‌ها محاسبه و به‌منظور تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد.

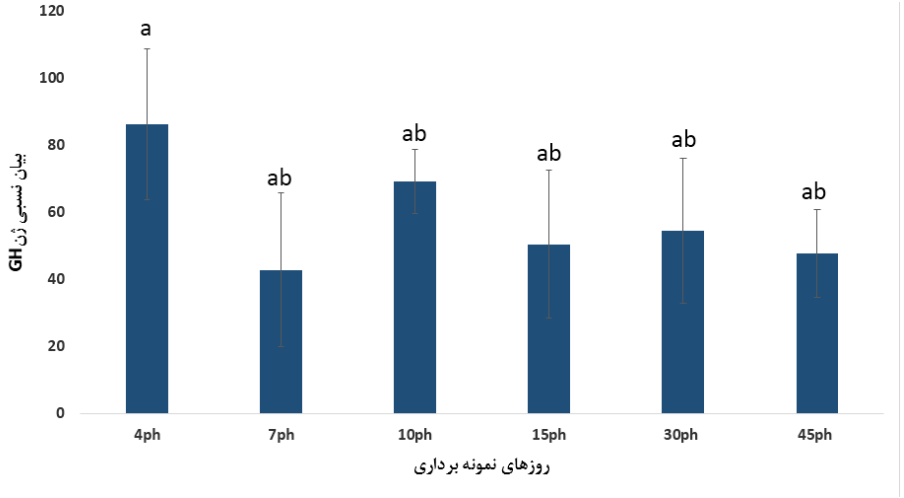
نتایج

همانطور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، بیان ژن‌های گرلین و GH در تمامی ۶ مرحله نمونه‌برداری از روز چهارم پس از تفریخ تا روز ۴۵ پس از تفریخ بیان شد که البته با توجه به زمان نمونه‌برداری و نوع ژن تحت بررسی، مقدار آن متفاوت بود. بر طبق شکل ۳ مشخص شد بیان ژن درگرلین روز ۱۰ پس از تفریخ به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر روزهای نمونه‌برداری بود و در روزهای ۴، ۷، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

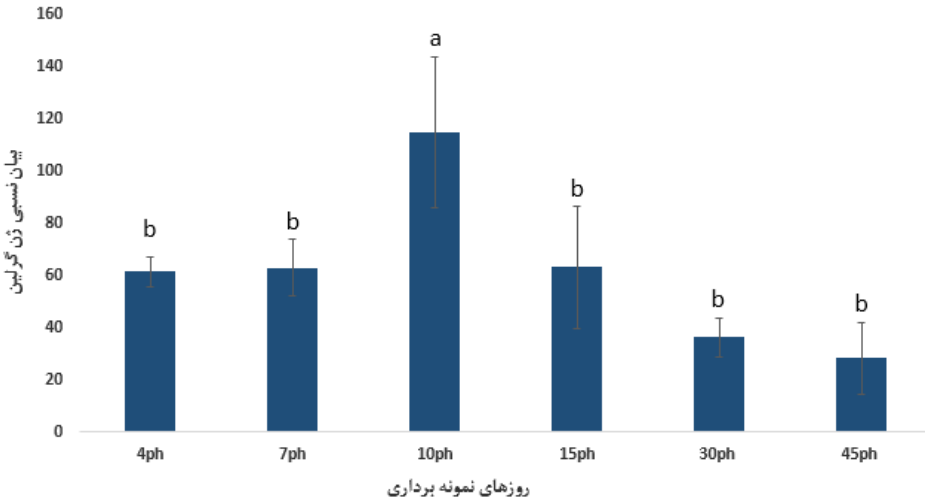
مطالعه و شناسایی ژن‌های درگیر در رشد آبزیان نقش مهمی در آبزی‌پروری و پیشرفت علم ژنتیک بخصوص در طی دوران تکامل لاروی ماهیان بر عهده دارد. یکی از شاخص‌های بسیار مهم در جهت تکامل و رشد متعادل در موجودات، هورمون رشد است که این هورمون در رشد سلول‌های بدن، متابولیسم پایه و انجام فرایند تنظیم اسمزی در این موجودات نقش مؤثری را بر عهده دارد (Riley *et al.*, 2002). مطالعات متعددی بیان ژن را در طی دورهٔ لاروی تحت مطالعه قرار داده‌اند و بیان کردند که هورمون GH نقش مؤثری روی رشد دارد (Van der Lely *et al.*, 2004). هر چند پس از جداسازی و شناسایی مشخص شد که ژن گرلین به‌طور مستقیم کنترل‌کننده تغذیه است (Kojima *et al.*, 2001). با توجه به اهمیت و جایگاه ژن کدکنندهٔ هورمون رشد روند بیان این ژن در ماهی گورخری که به‌مثابهٔ یک گونه در آبزی‌پروری و علوم پزشکی مطرح است، تحت بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد ژن‌های مرتبط با رشد و اشتها (GH و گرلین) در

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]



شکل ۲- بیان نسبی ژن GH در روزهای مختلف نمونه برداری در ماهی گورخری.

Fig. 2. Relative expression of GH gene on different days of sampling in Zebra fish.



شکل ۳- بیان نسبی ژن گرلین در روزهای مختلف نمونه برداری در ماهی گورخری.

Fig. 3. Relative expression of ghrelin gene on different days of sampling in Zebra fish.

تمام دوره تکاملی بیان شدند. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن GH نشان داد در روز ۴ پس از تفریخ بیان این ژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر روزهای نمونه‌برداری بود و در سایر روزهای نمونه-برداری بیان این ژن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($P>0.05$).

تحقیق در این رابطه در چند گونه از ماهیان صورت گرفته است. به‌عنوان مثال ژن کدکنندهٔ رسپتور هورمون رشد در ماهی حوض (*Carassius auratus*) بررسی و شناسایی شده است (Lee *et al.*, 2001). ژن کدکنندهٔ هورمون رشد در ماهی گورخری (*Danio rerio*) و بسیاری از ژن‌های دیگر در ماهیان جداسازی و شناسایی شده و بیان آنها در مراحل مختلف تکاملی تحت بررسی قرار گرفته است (Torgeson *et al.*, 2002). این محققین بیان نمودند که بیان ژن‌های مرتبط با رشد طی دورهٔ رشد و نمو لاروی افزایش یافت.

فعالیت گرلین در رهاسازی هورمون رشد و هورمون‌های دیگر هیپوفیزی در تحقیقات متعددی تحت بررسی قرار گرفته است. مشخص شد که گرلین می‌تواند به‌طور مستقیم روی هیپوفیز ماهی تأثیر بگذارد. پپتید گرلین به خاطر فعالیتی که در رهاسازی هورمون رشد و تحریک اشتها دارد، در مطالعات مختلفی تحت بررسی قرار گرفته است. در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، گرلین ماهی قزل‌آلا باعث آزادسازی هورمون رشد شده اما تأثیری روی آزادسازی پرولاکتین و سوماتولاکتین در هیپوفیز کشت‌شده

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]

نداشت (Kaiya *et al.*, 2003 a,b). گرلین همچنین روی ترشح هورمون‌های دیگر هیپوفیز تأثیر می‌گذارد. بعبارتی دیگر گرلین نیز همانند هورمون رشد یک پپتید چند عملکردی است (Kawakoshi *et al.*, 2007).

بر طبق نتایج حاصل از تحقیق حاضر، بیان پایین ژن گرلین در مراحل ابتدایی می‌تواند جالب توجه باشد. یکی از دلایلی که می‌تواند بیان پایین ژن گرلین در مراحل ابتدایی را توجیه کند عدم تغذیه خارجی است. در تحقیق حاضر، بیشترین بیان ژن گرلین در روز دهم پس از تفریخ مشاهده شد. بیان ژن گرلین در تمامی دورهٔ لاروی ماهی هالیبوت شناسایی شد (Yeung *et al.*, 2004)، که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. این امر نشانگر این موضوع است که ژن گرلین در تمامی مراحل زندگی بیان می‌شود. فعالیت بیان ژن گرلین در ماهی هالیبوت در مراحل ابتدایی بیان بالایی نداشته و در این زمان رشد و تغذیه ماهیان از اندوخته درونی تأمین می‌شود. مشخص شد گرلین در مراحل ابتدایی بیشتر در زمینه تکامل لاروی نقش دارد. در تحقیق حاضر، تحلیل تغییرات بیان ژن کدکننده هورمون رشد (GH) نشان داد که بیان ژن GH در روزهای ۴ تا ۴۵ پس از تفریخ لاروها بیان می‌شود، که در روز چهارم پس از تفریخ بیشتر از سایر روزهای نمونه‌برداری بود. ژن کدکننده هورمون رشد در دورهٔ لاروی ماهی سی بریم پس از تفریخ شدن شروع به بیان کرد اما سطح بیان پائین بوده و این روند تا اتمام جذب زرده ماهی ادامه داشت و همزمان با شروع تغذیه خارجی بیان ژن GH روند صعودی پیدا کرد. بیشترین میزان بیان ژن GH در ماهی سی بریم ۴ و ۱۰ روز پس از تفریخ شدن و این روند در ۱۳ روز پس از تفریخ نیز مشاهده شد به‌طورکلی روند بیان ژن GH به‌صورت صعودی است و کمترین بیان ژن GH در ۲ روز پس از تفریخ مشاهده شده است (Yeung *et al.*, 2004). در تحقیق حاضر بیان ژن GH پس از روز چهارم پس از تفریخ کاهش یافت ولیکن این کاهش معنی‌دار نبود. مطالعات صورت‌گرفته روی ژن GH در دورهٔ تکامل لاروی قزل‌آلای رنگین کمان نشان داده است که mRNA ژن GH قبل از شکل‌گیری غده هیپوفیز در جنین وجود دارد (Shepherd *et al.*, 2007). با مطالعهٔ ماهی تن اقیانوس اطلس (*Thunnus orientalis*) مشاهده شد که بیان ژن گرلین در طی دورهٔ تکامل لاروی، تفاوت معنی‌داری نداشت (Suda *et al.*, 2012). بیان ژن‌های مرتبط با رشد را در طی مراحل تکاملی ماهیان خاویاری (فیل ماهی و قره برون) بررسی شده است (Kolangi Miandare *et al.*, 2013). نتایج این محققین نشان داد که در طی مراحل تکامل اولیه، بیان mRNA مربوط به ژن گرلین پایین بود ولیکن در زمانیکه لاروها تغذیه خارجی را شروع کردند بیان این ژن افزایش یافت. در تحقیق حاضر بیان ژن گرلین در روز دهم پس از تفریخ به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر روزهای نمونه‌برداری بود که حاکی از شروع افرایش تغذیه خارجی لاروها است همچنین در تحقیق حاضر بیان ژن GH در روزهای ابتدایی دوره تکاملی، بالاتر بود.

طبق نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشخص شد که بیان ژن‌های مرتبط با رشد و اشتها در طی دورهٔ تکامل لاروی ماهی گورخری حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در میزان بیان این ژن‌ها در طی مراحل مختلف تکاملی ماهی گورخری است به‌طوری‌که بیان ژن مرتبط با رشد در روزهای ابتدایی نمونه‌برداری و به‌عبارتی در اوایل دورهٔ تکاملی لاروهای ماهی بیشتر از روزهای پایانی نمونه‌برداری گزارش شد.

سپاسگزاری

از کارشناس سالن آبزی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و تمامی دوستانی که در انجام این طرح ما را یاری رساندند، تشکر می‌گردد.

REFERENCES

Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G. and Berghmans, S. 2008. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. – Brit. J. Pharm. 154: 1400-1413.

Bustin, A.S., Benes, V., Garson, J.A., Healmans, J., Huggett, J., Kubista, M., Muller, R., Nolaan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. – Clin. Chem. 55: 611-622.

Canestro, C., Yokoi, H. and Postlethwait, J. 2007. Evolutionary developmental biology and geno-mics. – Nat. Rev. Gen. 8: 932-942.

Cheshenko, K., Brion, F., Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H. and Eggen, P. 2007. Expression of Zebra fish aromatase cyp19a and cyp19bm genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. – Toxi. Sci. 96: 255-267.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]

Grunwald, D. and Eisen, J. 2002. Headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate. – Nat. Rev. Gen. 3: 717-724.

Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R.E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. – Toxi. Sci. 86: 6-19.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G. and Kangawa, K. 2003a. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloningin the Japanese eel and its biological activity. – J. Endoc. 176: 415-423.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, S., Moriyama, M., Takahashi, A. and Kawauchi, H. 2003b. Peptide purification, cDNA and genomic DNA cloning, and functional characteristics of ghrelin in rainbow trout. – J. Endoc. 144: 5215-5226.

Kawakoshi, A., Kaiya, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Miyazato, M., Hosoda, H. and Kangawa, K. 2007. Identification of a ghrelin-like peptide in two species of shark, *Sphyrna lewini* and *Carcharhinus melanopterus*. – Gen. Com. Endoc. 151: 259-268.

Kojima, M., Hosoda, H. and Kangawa, K. 2001. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. – Horm. Res. 56: 93-97.

Kolangi Miandare, H., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M. and Nikinma, M. 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. – Gen. Comp. Endoc. 182: 41-47.

Larionov, A., Krause, A. and Miller, W. 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics 6: 62-77.

Lawrence, C. 2011. Advances in Zebrafish husbandry and management. – Methods Cell Biol. 104: 429-45.

Lawrence, C. 2011. Advances in zebrafish husbandry and management. – Methods Cell Biol. 104: 429-451.

Lee, L.T.O., Nong, G. and Chan Y.H .2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone recept or and its funct ional interaction with human grow the hormone. – Gene. 270: 121-129.

Lieschke, G.J. and Currie, P.D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. – Natu. Rev. Genet. 5: 353-367.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. – Methods 25: 402-408.

Parhar, I.S., Sato, H. and Sakuma, Y. 2003. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. – Biochem. Biophys. Res. Communi. 305: 169-175.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313: 856-862.

Riley, L.G., Hirano, T. and Grau, E.G. 2002. Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. – Zool. Sci. 19: 797-800.

Schmid, A.C., Lutz, I., Kloas, W. and Reinecke, M. 2003. Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in vitro and in vivo. – Gen. Comp. Endoc. 130: 129-134.

Scholz, S., Fischer S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T. and Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment applications beyond acute toxicity testing. – Environ. Sci. Pollut. Res. 15: 394-404

Shepherd, B.S., Johnson, J.K., Silverstein, J.T., Parhar, IS., Vijayan, M.M., McGuire, A. and Weber, G.M. 2007. Endocrine and orexigenic actions of growth hormone secretagogues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). – Comp. Biochem. Phys. A. 146: 390-399.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C. 2008. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. – Biol. Rev. 83: 13-34.

Suda, A., Kaiyai, H., Nikaido, S., Moshiro, H. and Ando, K. 2012. Identification and gene expression analysis of ghrelin in the stomach pacific Bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). – Gen. Comp. Endoc. 178: 89-97.

Torgersen, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Husebye, H. and Alestrom, P. 2002. In silico and in situ characterization of the zebrafish (Danio rerio) Gnrh3 (sGnRH) gene. – BMC Genom. 3: 25-36.

Trant, J., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B. and Place, A. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in Zebrafish fry (*Danio rerio*). – J. Exper. Zool. 290: 475-483.

Unniappan, S., Canosa, L.F. and Peter, R.E. 2014. Orexigenic activities of ghrelin in goldfish: feeding-induced vagaries in brain and gut mRNA appearance and serum levels, and comebacks to central and peripheral injections. – Physiol. Rev. 12: 38-50.

Van der Lely, A.J., Tschöp, M., Heiman, M.L. and Ghigo, E. 2004. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. – Endocrin. Rev. 25: 426-457.

Yeung, C.M., Chan, C.B., and Cheng, C.H. 2004. Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the growth hormone secretagogue receptor gene from black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. – Mol. Cell. Endocrin. 223: 5-15.

*****

How to cite this article:

Paknejad, H., Enayat Gholampour, T., Safari, R. and Hossenifar, S.H. 2019. Study of GH and Ghrelin genes expression during the larvae developmental period in *Danio rerio*. – Nova Biol. Reperta 6: 148-154.

پاک‌نژاد، ح.، عنایت غلام‌پور، ط.، صفری، ر. و حسینی‌فر، س.ح. ۱۳۹۸. مطالعه و بررسی بیان ژن‌های GH و گرلین در دوره تکامل لاروی ماهی گورخری. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۱۵۴-۱۴۸.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.5.2]

[DOI: 10.29252/nbr.6.2.148]