ژنتیک نوین
دوره سوم،شماره۱،بهار ۱۳۸۷
صفحه ۵۸-۴۹

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

سعید کیوان شکوه[۱]، محمد رضا کلباسی*[۲]، بهروز وزیری[۳]، سامان حسینخانی[۴]
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، انیستیتو 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 (۲۰/۴٪)، متابولیسم و تولید انرژی (۳۱/۸٪)، پیام رسانی سلولی (۶/۸٪)، دفاع سلولی (۱۶٪)، نقل و انتقالات (۶/۸٪) و تقسیم سلولی (۲/۲٪) 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

تاسماهی ایرانی،
***Acipenser persicus*،**
بیضه،
پروتئومیکس

مقدمه

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

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 به‌نظر 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 انبوهی از اطلاعات مربوط به ژنهای مختلف را فراهم می سازد، و همچنین فناوری پروتئومیکس (Proteomics) که امکان انجام پژوهش های پساژنومی (Post-genomic) 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 همکاران، ۲۰۰۷)، اما تا کنون پروتئوم بافت گناد 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 مربع 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 تثبیت گردید و به آزمایشگاه شیمی پروتئین بخش بیوتکنولوژی انستیتو 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 هموژنایزر، ۵۰۰ مایکرولیتر از بافر لیزکننده شامل ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیواوره، ۴ درصد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

CHAPS، ۵۰ میلی مولار DTT، ۵۰ میلی مولار تریس، ۰/۲ درصد آمفولایت، 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 (۱۲۰۰۰ g) 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 بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد.

الکتروفورز دو بعدی (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 آمفولایت و مقدار کمی رنگ بروموفنل بلو) ترکیب گردید تا حجم نهایی هر نمونه به ۳۰۰ میکرولیتر برسد. سپس محلول بدست آمده در ۱۴۰۰۰ g 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) پیپت شد و یک نوار ۱۷ سانتی متری IPG در محدوده شیب 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 IEF (BioRad، آمریکا) بصورت ۲۰ دقیقه با شیب خطی (۲۵۰-۰ ولت)، ۵ ساعت با شیب خطی (۱۰۰۰۰-۲۵۰ ولت) و ۵۰۰۰۰ ولت ساعت با شیب 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 تریس، ۲۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد SDS و ۲ درصد DTT انکوباسیون گردید.

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

الکتروفورز پروتئین ها در بعد دوم (SDS-PAGE)

به منظور الکتروفورز پروتئین ها در بعد دوم از ژل های گرادیانت ۱۲-۸ درصد استفاده گردید. برنامه الکتروفورز هر ژل به صورت ۱۶ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه و ۲۴ میلی آمپر به مدت تقریبا 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 ۲۰۰dpi 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 به‌طرز 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_4HCO_3 ۵۰ میلی مولار) خیسانده شد تا آبگیری انجام شود. مجددا عمل شستشو در همین محلول، دو بار دیگر تکرار گردید. سپس نقاط بریده شده در محلول ACN ۷۵ درصد شستشو داده شد و کاملا خشک گردید. نقاط برش یافته در محلول تازه ۰/۵ میکروگرم تریپسین در ۲۵ مایکرولیتر NH_4HCO_3 ۲۰ میلی مولار و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت انکوباسیون گردید تا عمل آبگیری انجام شود. سپس پپتیدها با

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

دو بار شستشو در ۱۰۰ مایکرولیتر محلول ACN ۵۰ درصد و TFA ۰/۱ درصد استخراج و به یک پلیت ۹۶ خانه ای جدید منتقل گردید تا خشک شوند. سپس پپتیدهای هضم شده در ۳ مایکرولیتر محلول ACN ۵۰ درصد و TFA ۰/۱ 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 TFA ۰/۱ درصد مخلوط گردید. سپس طیف سنجی جرمی به روش MALDI-TOF/TOF MS انجام شد. مطابقت احتمالی داده های PMF و MS/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 (Parent Ions) ۱/۲ دالتون و برای قطعات یونی (Fragment 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 ۳/۸۸±۲۲/۲۷ 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 پروتئین، شماره ثبت آن ها در بانک ژن (Accession Number)، نام گونه مربوطه، امتیاز MASCOT و تعداد پپتیدهایی که با پروتئین مورد نظر مطابقت داشته، در جدول شماره ۱ آورده شده است.

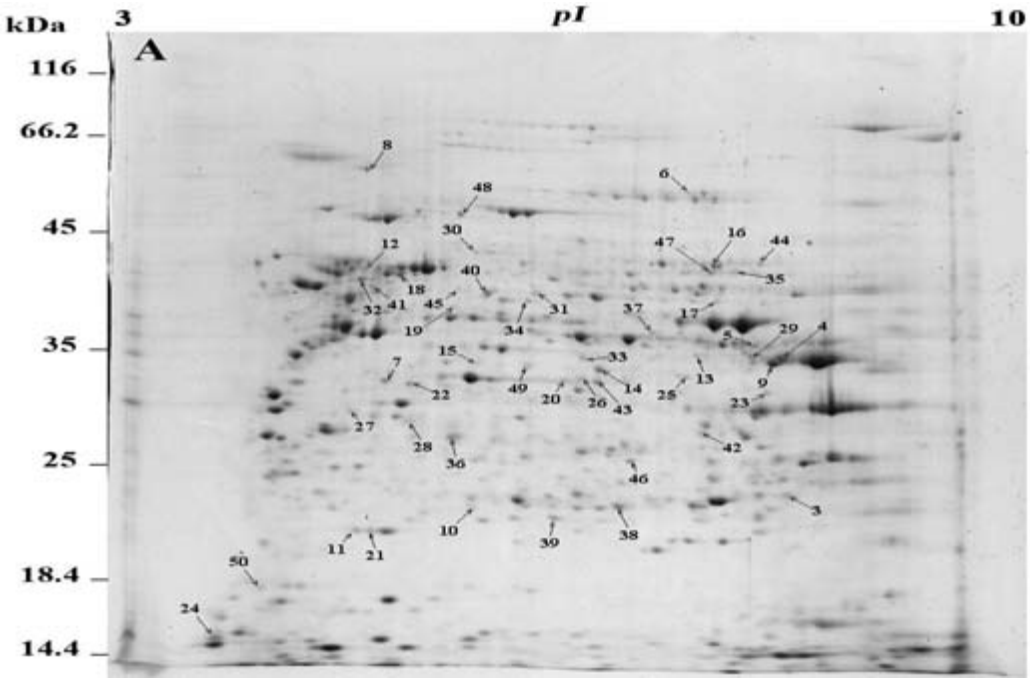
تعداد پپتید های پروتئین های شناسایی شده از نظر مطابقت با پروتئین های موجود در NCBI، بین ۳ و ۲۷ عدد متغیر بود. دامنه امتیازات MASCOT نیز بین ۴۶ و ۴۴۲ متغیر است. امتیاز MASCOT با محاسبه لگاریتم منفی ((P) log 10-) احتمال (P) شناسایی تصادفی توالی یک پروتئین از طریق جستجو در یک پایگاه اطلاعاتی به دست می آید.اطلاعات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

http://WWW.matrixscience.com/help/scoring_help.html

موجوداست. 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 Enolase 2 با سه نقطه بر روی ژل شناسایی گردیدند. کلیه پروتئین های شناسایی شده بر حسب عملکرد ثبت شده برای آنها در بانک های اطلاعاتی NCBI و SWISS-PROT 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 DNA و RNA، 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]



شکل ۱- الگوی الکتروفورز دو بعدی پروتئین های بافت بیضه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). تفکیک پروتئین ها در بعد اول بوسیله نوار IPG در شیب غیر خطی pH ۳ تا ۱۰، و در بعد دوم بوسیله ژل گرادیانت ۱۲-۸ 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 جدول۱ رجوع گردد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

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

شماره نقطه پروتئینی	نام و نوع عملکرد پروتئین	گونه/شماره ثبت	تعداد پپتیدهای قابل تطبیق/امتیاز MASCOT
متابولیسم و تولید انرژی			
۳	Glutamate dehydrogenase	gi|51863477/ *Cercopithecus sabaeus*	۲۷۸/۲۴
۴	PREDICTED: similar to 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribonucleotide transformylase/inosin	gi|114583143/ *Pan troglodytes*	۱۱۰/۲۳
۵	glutamine synthetase	gi|126648112/ *Algoriphagus sp. PR1*	۵۵/۱۹
۶	MGC82998 protein	gi|49256179/ *Xenopus laevis*	۱۲۳/۱۰
۷	enolase 2	gi|51467931/ *Danio rerio*	۸۴/۱۰
۸	pyruvate kinase, muscle	gi|45382651/ *Gallus gallus*	۷۰/۱۱
۹	hypothetical protein RSP_0472	gi|77464041/ *Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*	۵۴/۱۴
۱۰	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	gi|5174389/ *Homo sapiens*	۲۱۷/۱۲
۱۱	CoA-transferase family III	gi|70607455/*Sulfolobus acidocaldarius DSM 639*	۵۶/۱۵
۱۲	pyruvate kinase	gi|113207856/ *Crassostrea gigas*	۶۴/۱۱
۱۳	enolase 2, gamma neuronal	gi|7305027/ *Mus musculus*	۸۷/۱۴
۱۴	mitochondrial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi|52547708/ *Phaeodactylum tricornutum*	۸۹/۱۰
۱۵	alpha enolase-1	gi|11999247/ *Amia calva*	۲۰۶/۱۱
۱۶	unnamed protein product	gi|47211348/*Tetraodon nigroviridis*	۱۸۸/۹
۱۷	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	gi|4218518/ *Piromyces sp. E2*	۷۹/۹
۱۸	enolase 2	gi|51467931/ *Danio rerio*	۱۷۴/۱۰
۱۹	pyrophosphatase (inorganic) 1	gi|62955639/ *Danio rerio*	۷۰/۷
ساختمان سلولی			
۲۰	Actin A12	gi|113233/ *Dictyostelium discoideum*	۱۱۷/۹
۲۱	PREDICTED: tubulin, alpha, ubiquitous isoform 5	gi|109096506/ *Macaca mulatta*	۷۶/۱۴
۲۲	actin type 5, cytosolic	gi|86169/ *Gallus gallus*	۳۹۷/۱۵
۲۳	beta tubulin	gi|10242162/ *Notothenia coriiceps*	۲۰۴/۱۵
۲۴	PREDICTED: hypothetical protein	gi|126305451/*Monodelphis domestica*	۷۰/۱۸
۲۵	actin	gi|26522784/ *Galaxea fascicularis*	۲۲۴/۱۳
۲۶	TPM1 protein variant	gi|62087662/ *Homo sapiens*	۷۹/۱۱

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

دفاع سلولی			
۲۷	heat shock protein 60 kDa	gi|82466662/ *Paralichthys olivaceus*	۳۱۰/۲۵
۲۸	cell adhesion protein retina cognin - chicken (fragment)	gi|422699/ *Gallus gallus*	۶۰/۱۱
۲۹	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type	gi|78187764/ *Pelodictyon luteolum DSM 273*	۶۲/۲۴
۳۰	synuclein, beta	gi|45360923/ *Xenopus tropicalis*	۲۷۷/۴
۳۱	unnamed protein product	gi|47218700/*Tetraodon nigroviridis*	۴۴۲/۲۴
۳۲	heat shock protein 60	gi|71724948/ *Pseudosciaena crocea*	۶۰/۱۵
۳۳	Chain , Lysozyme (E.C.3.2.1.17) Mutant With Cys 77 Replaced By Ala (C77a)	gi|443110/ *Homo sapiens*	۹۵/۵
۳۴	natural killer cell enhancing factor	gi|52219464/ *Ictalurus punctatus*	۴۰۱/۱۰
رونویسی و ترجمه			
۳۵	Hypothetical protein CBG14983	gi|39598303/ *Caenorhabditis briggsae*	۴۸/۱۷
۳۶	Osmolarity two component response regulator	gi|115423843/ *Bordetella avium 197N*	۵۴/۱۳
۳۷	DEAD/DEAH box helicase	gi|83942539/ *Sulfitobacter sp. EE-36*	۵۰/۱۶
۳۸	CDC48 like AAA ATpase	gi|66357178/ *Cryptosporidium parvum Iowa II*	۵۳/۲۷
۳۹	PREDICTED: aspartyl-tRNA synthetase isoform 5	gi|114581044/ *Pan troglodytes*	۴۷/۱۶
۴۰	PREDICTED: similar to YB2	gi|126340161/*Monodelphis domestica*	۹۸/۳
۴۱	cold shock protein	gi|53804855/*Methylococcus capsulatus str. Bath*	۴۶/۸
۴۲	response regulator receiver, transcriptional	gi|90418271/ *Aurantimonas sp. SI85-9A1*	۷۵/۶
۴۳	predicted protein	gi|126135368/ *Pichia stipitis CBS 6054*	۶۴/۱۰
نقل و انتقالات سلولی			
۴۴	quinohemoprotein amine dehydrogenase, 60 kDa subunit	gi|56476668/ *Azoarcus sp. EbN1*	۵۳/۱۸
۴۵	putative FoF1 ATP synthase, subunit B'	gi|78696953/ *Bradyrhizobium sp. BTAi1*	۵۶/۱۲
۴۶	catalase	gi|52354832/ *Oplegnathus fasciatus*	۱۰۶/۱۰
پیام رسانی سلولی			
۴۷	unnamed protein product	gi|47223957/ *Tetraodon nigroviridis*	۵۶/۶
۴۸	binding	gi|15218697/ *Arabidopsis thaliana*	۵۱/۲۲
۴۹	synaptosome-associated protein 25a	gi|55251215/ *Danio rerio*	۹۵/۱۴
تقسیم سلولی			
۵۰	topoisomerase II subunit B	gi|28627817/*Streptomyces roseochromogenes subsp. oscitans*	۶۴/۲۵

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

بحث

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 *Danio rerio*، *Tetraodon nigroviridis*، *Paralichtys olivaceus*، *Oplegnathus fasciatus* و *Ictalurus punctatus* مطابقت دارد. تجزیه و تحلیل پروتئوم تخمک تاسماهی ایرانی با MALDI-TOF/TOF MS نیز منجر 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 توالی‌یابی 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 قرابت 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 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 Cold Shock Protein در *Methylococcus capsulatus* (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 بافت بیضه تاسماهی به عنوان چپرون و یا HSP عمل نموده و یا اینکه در مقابله با تنش 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 مبین نقش حیاتی HSPها در فرایند اسپرماتوژنز می باشد (سارج و کالن، ۱۹۹۷؛ نیور و همکاران، ۲۰۰۰)، نتایج

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

این پژوهش می تواند نقش HSPها در اسپرماتوژنز را علاوه بر فعالیت چپرونی آنها، پررنگ تر نماید.

پروتئین دیگری که در گروه پروتئین های دفاعی قرار می گیرد NKEF (Natural Killer Cell Enhancing Factor) می 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 آنتی‌اکسیدان 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؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۱؛ لی و والدبیسر، 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 یا اینکه به عنوان یک عامل 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 انستیتو پاستور ایران که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر بعمل می آید.

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 l, 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 (*Symphysodon 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]

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 (*Ichtalurus 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, Guitton 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- Tunsjo 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, Humphery-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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.4.1]