ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۲۹-۲۱

بررسی بیان ژن *SOX9* در بافت‌های تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

Expression analysis of the *SOX9* gene in various tissues of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)

حمیدرضا رنجبر*[۱]، مهتاب یارمحمدی[۲]، میرمسعود سجادی[۱]، رضوان‌الله کاظمی[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه گیلان

۲- به‌ترتیب استادیار و مربی، موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان خزر، گیلان، رشت

Ranjbar HR*[1], Yarmohammadi M[2], Sajjadi MM[1], Kazemi R[2]

1-MSc Student, Associate Professor, University of Guilan, Iran
2-Assistant Professor, Instructor, Khazar International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Ranjbar.shilat88@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

چکیده

ژن *SOX9* در میان مهره‌داران یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی جهت تکامل بسیاری از بافت‌ها و ارگان‌ها و به‌طور ویژه تعیین جنسیت و غضروف‌زایی است. تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) یکی از گونه‌های مهم خانواده تاسماهیان بوده که بومی سواحل جنوبی دریای خزر می‌باشد. این گونه به دلیل ارزش اقتصادی آن و هم‌چنین بلوغ زودرس نسبت به دیگر گونه‌های پرورشی از جمله فیل‌ماهی، از گونه‌های موردنظر آبزی‌پروری در کشور می‌باشد. هدف از این تحقیق، شناسایی بخشی از توالی *SOX9* و بررسی الگوی بیان آن در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی با استفاده از تکنیک Real time PCR، بود. به این منظور ده بافت مختلف تاسماهی ایرانی جوان (آبشش، پیلوریک، طحال، گناد، کلیه، روده، قلب، پوست، کبد، ماهیچه) مورد مطالعه قرار گرفت. پس از توالی‌یابی قطعه‌ای به طول ۲۱۰ نوکلئوتید شناسایی و سپس در بانک ژن NCBI (KP300013) ثبت شد. نتایج نشان داد که ژن *SOX9* در اکثر بافت‌ها بیان شده و بیشترین میزان بیان (۰/۲۶ ± ۰/۵) در بافت آبشش مشاهده شد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که در سنین پایین، احتمالا ژن *SOX9* نقش کمتری در تعیین جنسیت داشته و بیشتر در فرآیندهای تکاملی دیگر نظیر غضروف‌سازی دخالت دارد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تاسماهی ایرانی
تعیین جنسیت
غضروف سازی
Real time PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

مقدمه

تاسماهیان[1] گروهی قدیمی و بازمانده ماهیان غضروفی استخوانی[2] هستند که از دوره ماقبل ژوراسیک وجود داشته‌اند (Birstein et al. 1997). این ماهیان آنادروموس کهن دارای موقعیتی بنیادی در سیستم تکاملی مهره‌داران، به‌ویژه ماهی‌ها، می‌باشند. امروزه ۲۷ گونه از تاسماهیان و دیگر خویشاوندان نزدیک آن‌ها، پارو پوزه ماهیان و به‌طور خاص ساکنین دریای خزر، در معرض خطر انقراض می‌باشند (Pourkazemi 2006). تاسماهی ایرانی[3] که به لحاظ تولید گوشت و خاویار با کیفیت، از گونه‌های با ارزش تجاری و آبزی‌پروری در ناحیه جنوب دریای خزر محسوب می‌شود، در زمره این گروه قرار دارد. به همین منظور، درک ویژگی‌های فیزیولوژیک و اکولوژیک، تکثیر مصنوعی، توسعه آبزی‌پروری و بازسازی ذخایر دریایی از جمله راهکارهای ضروری در جهت نگهداری این گونه با ارزش به شمار می‌آیند. تمایز غدد جنسی مهره‌داران حاصل تغییرات مولکولی است که از بدو تولد در بدن صورت می‌پذیرد و به‌طور کامل در گونه‌های مختلف مهره‌داران شناخته نشده است (Berbejillo et al. 2011). در تاسماهیان نیز به علت بلوغ جنسی دیرهنگام و عدم وجود تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین جنس نر و ماده، امکان تشخیص جنسیت از طریق ویژگی‌های ظاهری در مراحل لاروی، جوانی و حتی بلوغ امکان‌پذیر نیست (Yarmohammadi et al. 2011). به همین جهت، در پرورش تاسماهیان، یافتن راهکاری بدون مخاطره و قابل اطمینان جهت تعیین جنسیت در مراحل اولیه پرورش به‌منظور تفکیک جنس نر و ماده امری ضروری تلقی می‌گردد.

تاکنون مطالعات زیادی با روش‌های مولکولی در زمینه تعیین جنسیت ماهی‌های خاویاری صورت گرفته که به طور مثال می‌توان به روش AFLP (Yarmohammadi et al. 2011; Xiao et al. 2014)، روش RAPD (Keyvanshokooh et al. 2007)، روش ISSR (Wuertz et al. 2006) و روش هیبریداسیون کاهشی (McCormick et al. 2008) اشاره کرد. اما با وجود تمامی تلاش‌های صورت گرفته هیچ‌کدام از روش‌های مبتنی بر DNA موفقیت‌آمیز نبودند. بر همین اساس استفاده از تکنیک PCR کمی و بررسی سازوکار بیان ژن‌های جنسی کاندیدا طی مراحل مختلف زیست در تاسماهیان پیشنهاد شده‌است. اولین مطالعه روی تاسماهیان توسط Hett et al. (2005) روی تاسماهی آتلانتیک اروپایی[4] صورت گرفت. همچنین گزارش‌هایی از بررسی ژن‌های جنسی مختلف توسط Hale et al. (2010) روی تاسماهی دریاچه‌ای[5]، Berbejillo et al. (2010) روی تاسماهی سیبری[6] و Hagihara et al. (2014) روی تاسماهی روسی[7]، ارائه شده‌است. در پستانداران، ژن تعیین کننده جنسیت یعنی *SRY*[8] روی کروموزوم Y قرار داشته و بیان این ژن و به طبع آن بیان ژن *SOX9* سبب می‌شود تا بافت گناد به بیضه تمایز یابد (Barrionuevo and Scherer 2010). علی‌رغم تمامی تلاش‌های صورت گرفته، این ژن در ماهی‌ها یافته نشد. به همین منظور دانشمندان ژن پایین دست آن یعنی ژن *SOX9* را مورد مطالعه قرار دادند (Barney 2010). خانواده ژن‌های *SOX*[9] کدکننده فاکتورهای رونویسی محافظت‌شده تکاملی بوده و در چندین فرآیند تکاملی مهم و بنیادی نظیر تعیین و تمایز جنسی (da Silva et al. 1996; Wilhelm et al. 2007)، تشکیل سیستم عصبی (Wegner and Stolt 2005)، غضروف‌سازی (Foster et al. 1994) و اسکلت‌سازی (Chimal-Monroy et al. 2003; Lefebvre et al. 2007) دخالت دارند. تاکنون حداقل ۳۰ ژن از خانواده *SOX* در بین مهره‌داران و بی‌مهرگان شناسایی شده که بر اساس توالی هر یک از آن‌ها، در ۱۰ زیرگروه A تا J تقسیم می‌شوند (Yokoi et al. 2002). ژن *SOX9* در گروه E این خانواده طبقه‌بندی شده و در بین مهره‌داران با روند تکامل جنس نر مرتبط می‌باشد. این ژن در تعداد زیادی از ماهی‌های استخوانی شناسایی شده و دو فرم آن (*SOX9*a و *SOX9*b) در بعضی از گونه‌ها نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان، زبرا فیش، مداکا و مارماهی ژاپنی مشاهده شده‌است (Johnsen 2012). در پستانداران، بیان ژن *SOX9* در عدم حضور

[1] Acipenseridae
[2] Chondrostei
[3] *Acipenser persicus*
[4] *Acipenser sturio*
[5] *Acipenser fulvescens*
[6] *Acipenserbaerii*
[7] *Acipenser gueldenstaedtii*
[8] Sex determining region of Y
[9] SRY related box genes

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

SRY کافیست تا از توسعه تکاملی جنس نر اطمینان حاصل شود، اما در مهره‌داران غیر پستاندار، نقش ژن *SOX9* کمتر مشخص شده‌است (Siegfried 2010). در زبرا فیش بیان ژن *SOX9*a در بیضه، مغز، کلیه و ژن *SOX9*b فقط در تخمدان گزارش شده‌است. همچنین در بالغین کپور معمولی[1] و قزل‌آلای رنگین‌کمان[2] ژن *SOX9* بیان بالایی در بافت‌های مغز و بیضه داشت (Takamatsu et al. 1997; Du et al. 2007). علاوه بر این، تحقیقات اخیر روی گورامی آبی[3] نشان داد میزان بیان ژن *SOX9* در گنادهای نر قبل از تخم‌ریزی بالا بود و پیشنهاد می‌شود که در اسپرماتوژنز دخیل است (Degani 2014).

برخلاف ماهی‌های استخوانی، عملکرد ژن *SOX9* در ماهی‌های خاویاری کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌است. معدود تحقیقات صورت گرفته روی تاسماهیان، عملکردهای متفاوتی نظیر تعیین جنسیت، تمایز جنسی و غضروف سازی را نشان داده‌است. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی نحوه بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی، به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی با ارزش تجاری و آبزی‌پروری، منتشر نشده‌است. باتوجه به نقش‌های بنیادی و پایه‌ای ژن *SOX9* طی فرآیندهای تکاملی مهره‌داران، در این مطالعه میزان کمی بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی جوان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در مطالعه حاضر، نمونه‌برداری از تاسماهیان پرورشی در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی واقع در گیلان صورت پذیرفت. به این منظور سه قطعه تاسماهی پرورشی هفت‌ماهه (میانگین وزن ۱۰۵ گرم و طول ۳۷ سانتی‌متر) به صورت تصادفی از یک حوضچه فایبرگلاس صید و به طور زنده به آزمایشگاه فیزیولوژی مرکز منتقل شدند. ماهیان سپس تحت تاثیر MS222 (10 ppm) بیهوش شده و نمونه‌برداری از بافت‌های مختلف شامل آبشش، پیلوریک، طحال، گناد، کلیه، روده، قلب، پوست، کبد و ماهیچه انجام شد. نمونه‌های موردنیاز مربوط به هریک از بافت‌های ذکرشده درون ویال های عاری از *RNase* قرار داده شد و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به منظور انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه همگن از هر کدام از بافت‌ها انجام شد (تعداد تکرار هر بافت ۳ عدد). استخراج RNA با استفاده از محلول BIOZOL (Bioflux-Bioer, China) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت بررسی کمی و کیفی RNA استخراج‌شده از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop ND-1000 (Nanodroptechnology, Wilmington, DE, USA) استفاده شد و نسبت جذب در طول‌موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی فنلی و پروتئینی در نمونه‌ها، تعیین و تایید شد.

با توجه به غلظت RNA حاصل از انجام اسپکتروفتومتری، هر یک از نمونه‌ها با آب DEPC به غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق‌سازی شد، سپس ٤ میکرولیتر از RNA کل جهت ساخت رشته DNA مکمل مورداستفاده قرار گرفت. قبل از واکنش رونویسی معکوس (RT Reaction) توده RNA با استفاده از آنزیم DNase I، DNA زدایی شد.

سنتز cDNA

ساخت رشته DNA مکمل با استفاده از آغازگر $Oligo(dT)_{18}$ و کیت RevertAid TM (Fermentas, France) انجام شد. به طور خلاصه بر اساس پیشنهاد شرکت سازنده، ٤ میکرولیتر RNA عاری از DNA، یک میکرولیتر $Oligo(dT)_{18}$، ۷/۵ میکرولیتر آب DEPC و دو میکرولیتر dNTPs (Fermentas, France)، ٤ میکرولیتر بافر RT، ۰/۵ میکرولیتر Ribolock به همراه یک واحد آنزیم نسخه‌برداری معکوس RevertAid در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به ویال‌ها اضافه شد و به‌مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس برای غیر فعال شدن آنزیم‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محصول به دست آمده به‌عنوان رشته الگو برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

[1] *Cyprinus carpio*
[2] *Oncorhynchus mykiss*
[3] *Trichogaster trichopterus*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

طراحی آغازگر برای ژن *SOX9*

آغازگرهای اختصاصی ژن *SOX9* با توجه به نواحی محافظت‌شده این ژن در گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری موجود در بانک ژن NCBI (تاسماهی چینی: *KJ526295.1*، تاسماهی سیبری: *KJ526295.1*، تاسماهی آمور: *AY573261.1* و *AY581214.1*، تاسماهی آتلانتیک: *AY788912.1*) و با استفاده از نرم‌افزارهای (v. 5) Oligo و (v 0.4.0) Primer 3 جهت انجام واکنش Real Time PCR طراحی شد. جهت تایید و اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها از برنامه Primer-blast استفاده شد. جهت مطالعه بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف از ژن *RPL6*[1] به‌عنوان مناسب‌ترین ژن مرجع جهت کنترل داخلی و نرمال‌سازی بیان ژن در تاسماهی ایرانی استفاده شد (Akbarzadeh et al. 2011) (جدول ۱).

جدول ۱ – آغازگرهای طراحی‌شده مورد استفاده در بررسی بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف و کاربرد آن‌ها

آغازگر	توالی (′۳-′۵)	کاربرد
SOX9	**F:** GAAGCGTCCTTTCGTTGAAG **R:**AAGATCGCAGTGGGTGAGAT	شناسایی
SOX9	**F:** AGCAGCAAAAACAAGCCTCA **R:**AGCTCCGCGTTGTGAAGAT	Real Time PCR
RPL6	**F:**AGCTGGGCAAGCCCAACACC **R:**TGGTGGAAGGCCAGGTCGCT	Real Time PCR

توالی‌یابی

DNA مکمل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *SOX9* به‌وسیله تکنیک PCR تکثیر شد. تمامی واکنش‌های PCR معمولی در دستگاه Eppendorf thermal cycler (Eppendorf, Germany) و تحت شرایط ۳ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته سازی و فعال‌سازی اولیه، در ادامه ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، صورت گرفت. ترکیبات واکنش PCR معمولی شامل ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۳ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، دو میکرولیتر از هر دو آغازگر رفت و برگشت ۱۰ پیکومول، ۰/٦ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase (Fermentas) (۵ واحد) و ۱۰ نانوگرم از DNA مکمل تاسماهی ایرانی بود. DNA تکثیرشده به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد مشاهده شد. سپس قطعات تکثیر یافته به‌وسیله کیت (Fermentas, France) CloneJET TM PCR Cloning Kit کلون شده و توالی در یک مرکز تجاری تعیین توالی (Bioneer, Daejeon, South Korea) توالی‌یابی شد. اختصاصی بودن توالی از طریق مقایسه میان تشابه با سایر توالی‌های *SOX9* ماهیان خاویاری موجود در پایگاه داده BLAST[2]، تایید شد (Altschul et al. 1990).

آنالیزهای فیلوژنیک

توالی ژن *SOX9* به‌دست‌آمده با توجه به توالی دیگر مهره‌داران به‌وسیله نرم‌افزار CLUSTAL W، ترازبندی شد. درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های ترازبندی شده ۱۱ گونه مهره‌دار با روش Neighbor-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013)، ترسیم شد. لازم به ذکر است که آزمون Bootstrapping با ۱۰۰۰ تکرار صورت پذیرفت.

واکنش Real time PCR

جهت بررسی میزان بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف از روش کمی Real time PCR استفاده شد. این عمل با استفاده از دستگاه CFX96 Real time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) و با استفاده از کیت سایبرگرین (Fermentas) و بر اساس دستورالعمل استاندارد اجرا شد و شرایط واکنش PCR کمی به صورت دو دقیقه در دمای ۹٤ به‌منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، ٤۰ چرخه حرارتی شامل ۱۰ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۱۵ ثانیه در ٦۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (سنتز) و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (سنتز نهایی)، تنظیم شد. واکنش‌ها برای هر آغازگر دارای سه تکرار تکنیکی و در پلیت های ۹٦ خانه‌ای انجام شد. مخلوط واکنش PCR کمی شامل دو نانوگرم cDNA تولیدشده از RNA اولیه الگو، آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام با غلظت ۰/۲ میکرومولار ، ٦ میکرولیتر از مخلوط سایبرگرین ۱X، Rox reference dye ۲/۵ میکرومولار و

[1] Ribosomal protein L6

[2] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

مابقی تا حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر آب مقطر فاقد آنزیم تجزیه کننده RNA می‌باشد. به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش، کنترل منفی (استفاده از تمام ترکیبات واکنش بدون cDNA) در هر پلیت قرار گرفت (Yarmohammadi et al. 2014).

به‌منظور تخمین راندمان، منحنی استاندارد برای هر جفت آغازگر بر مبنای غلظت‌های سریالی رقیق شده cDNA تهیه شد. سپس راندمان PCR بر مبنای رابطه $E\%=(10^{(1/slop)}-1)\times 100$ و با استفاده از شیب منحنی استاندارد محاسبه شد.

نرمال‌سازی داده‌های خام

داده‌های به دست آمده از واکنش Real time PCR از نرم‌افزار CFX Manager v1.6 (Bio-Rad, USA) استخراج و به Excel 2007 و SPSS 16 برای نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل عملیات آماری انتقال داده شد. بیان نسبی ژن هدف به ژن مرجع بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schamittgen 2001) محاسبه شد؛ که در آن در آن ΔΔCt برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور [$\Delta\Delta Ct= \Delta Ct_{Target\ gene}- \Delta Ct_{Calibrator}$]، ΔCt ژن هدف برابر است با مقدار Ct ژن هدف منهای Ct ژن رفرنس [$\Delta Ct_{Target\ gene}= Ct_{Target\ gene}-Ct_{Refrence\ gene}$] و ΔCt کالیبراتور برابر است با ΔCt ژن هدف هر نمونه منهای ΔCt نمونه کنترل. شایان ذکر است که در میان تمامی داده‌ها نمونه‌ای که دارای بیشترین بیان ژن یا کمترین میزان Ct را داراست به‌عنوان نمونه کالیبراتور، جهت اندازه‌گیری تفاوت مقدار بیان ژن هدف، انتخاب گردید.

آنالیزهای آماری

تمامی داده‌های کمی به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین (SEM) ارائه شد. از آزمون Kolmogrov-Smirnov جهت ارزیابی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. چون داده‌ها نرمال نبودند، جهت مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی جوان از آزمون غیر پارامتریک Kruskal Wallis استفاده شد. در مرحله بعد برای بررسی تشخیص اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون Mann-Whitney استفاده شد.

نتایج

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده از هریک از نمونه‌ها به وسیله دستگاه NanoDrop ND-1000 صورت گرفت که نسبت شدت جذب RNAهای استخراج شده در دو طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ ($OD_{260/280}$) نانومتر بین ۲/۱ – ۱/۸ بود، این بازه نشان دهنده کیفیت قابل قبول و عاری بودن RNA استخراجی از آلودگی‌های فنلی، پروتئینی و سایر آلاینده‌هاست. همچنین کمیت RNA استخراج شده با جذب ۲۶۰ نانومتر بین ٤٣٨ تا ٢٨٣٤ نانوگرم بر میکرولیتر برای کل نمونه‌ها به دست آمد.

شناسایی ژن *SOX9* در تاسماهی ایرانی بر اساس تکثیر رشته اول cDNA با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده بر اساس ناحیه حفاظت‌شده در توالی‌های *SOX9* گونه‌های ماهیان خاویاری انجام شد. نتایج به دست آمده تعیین توالی قطعات کلون شده در وکتور PJET، قطعه‌ای با طول ۲۱۰ جفت باز را نشان داد. قطعه توالی‌یابی شده پس از بررسی‌های نهایی در بانک ژن با نام ژن *SOX9* تاسماهی ایرانی و با کد دسترسی *KP300013* ثبت شد. این قطعه توالی نسبی این ژن بوده و پروتئینی با ۷۰ اسیدآمینه را کد می‌کند (شکل ۱).

نتیجه BLAST توالی ثبت‌شده در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که *SOX9* mRNA در تاسماهی ایرانی دارای ۱۰۰درصد تشابه با تاسماهی سیبری و ۹۷ درصد تشابه با گونه‌های تاسماهی آمور[1] و تاسماهی چینی[2] دارد. همچنین توالی *SOX9* تاسماهی ایرانی از نظر نوکلئوتیدی دارای شباهت بالایی (بیش از ۷۰ درصد) با توالی ژن مذکور در ماهیان استخوانی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی به ترتیب ۷۷ درصد و ۸۰ درصد بود. میزان مشابهت *SOX9* تاسماهی ایرانی با توالی این فاکتور در انسان ۷۹ درصد محاسبه شد (جدول ۲). درخت فیلوژنی *SOX9* تاسماهی ایرانی به‌منظور بررسی ارتباط تکاملی بین تاسماهی ایرانی و توالی‌های موجود این ژن در دیگر تاسماهیان و مهره‌داران به روش Neighbor-joining ترسیم شد (شکل ۲). نتایج فیلوژنی نشان داد که تاسماهی ایرانی از لحاظ تکاملی مشابهت بالایی با سایر ماهیان خاویاری دارد.

[1] *Acipenser schrenckii*
[2] *Acipenser sinensis*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

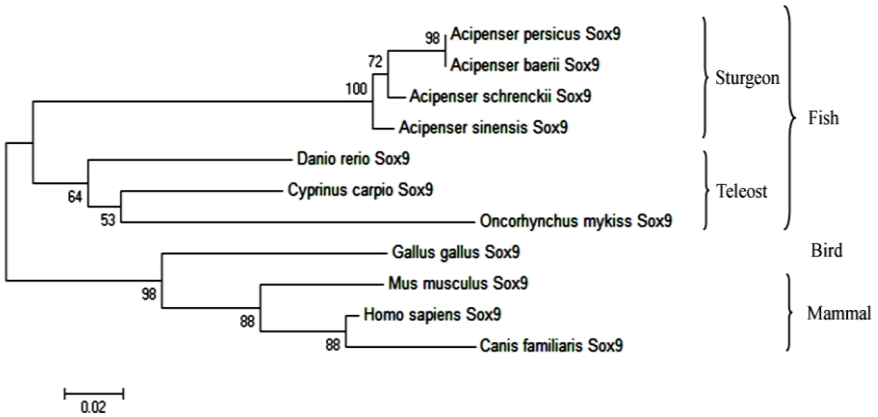
```
  1  V  E  E  A  E  R  L  R  V  Q  H  K  K  D  H  P  D  Y  K  Y  20
  1 CGTTGAAGAGGCAGAGAGACTGAGGGTGCAGCACAAGAAAGATCACCCCGATTACAAGTA  60

 21  Q  P  R  R  R  K  S  V  K  N  G  Q  N  E  A  E  D  G  S  E  40
 61 CCAGCCGAGGAGAAGGAAGTCAGTGAAGAACGGGCAGAACGAAGCTGAAGACGGATCTGA 120

 41  Q  S  H  I  S  P  T  A  I  F  K  A  L  Q  Q  A  D  S  S  H  60
121 GCAAAGTCACATCTCACCCACTGCGATCTTCAAAGCGCTGCAACAGGCCGATTCCTCTCA 180

 61  S  A  S  S  M  S  E  V  H  S  70
181 CTCTGCGTCCAGCATGAGCGAGGTGCATTC 210
```

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی قسمتی از ژن *SOX9* (شماره دسترسی در بانک ژن: *KP300013*) (۲۱۰ باز) و اسیدآمینه پیش‌بینی‌شده آن (۷۰ آمینواسید) در تاسماهی ایرانی. نوکلئوتیدها در ردیف پایین و اسیدآمینه مربوط به آن در ردیف بالا نمایش داده شده‌است.



شکل ۲- روابط فیلوژنی بین تاسماهی ایرانی، ماهیان خاویاری، ماهیان استخوانی و دیگر مهره‌داران بر مبنای مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *SOX9*، برای رسم نمودار از روش Neighbor-joining و نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد.

جدول ۲- مقایسه شباهت نوکلئوتیدی ژن *SOX9* تاسماهی ایرانی و برخی دیگر از گونه‌های مهره‌داران

گونه	درصد تشابه	کد دسترسی
Acipenser baerri	۱۰۰	*EU241882.1*
Acipenser schrenckii	۹۷	*AY581214.1*
Acipenser sinensis	۹۷	*KJ526295.1*
Danio rerio	۸۰	*NM_131643.1*
Cyprinus carpio	۸۰	*AY956415.1*
Gallus gallus	۷۹	*AB012236.1*
Homo sapiens	۷۹	*NM_000346.3*
Mus musculus	۷۸	*NM_011448.4*
Oncorhynchus mykiss	۷۷	*AB006448.1*
Canis familiaris	۷۷	*AY237827.1*

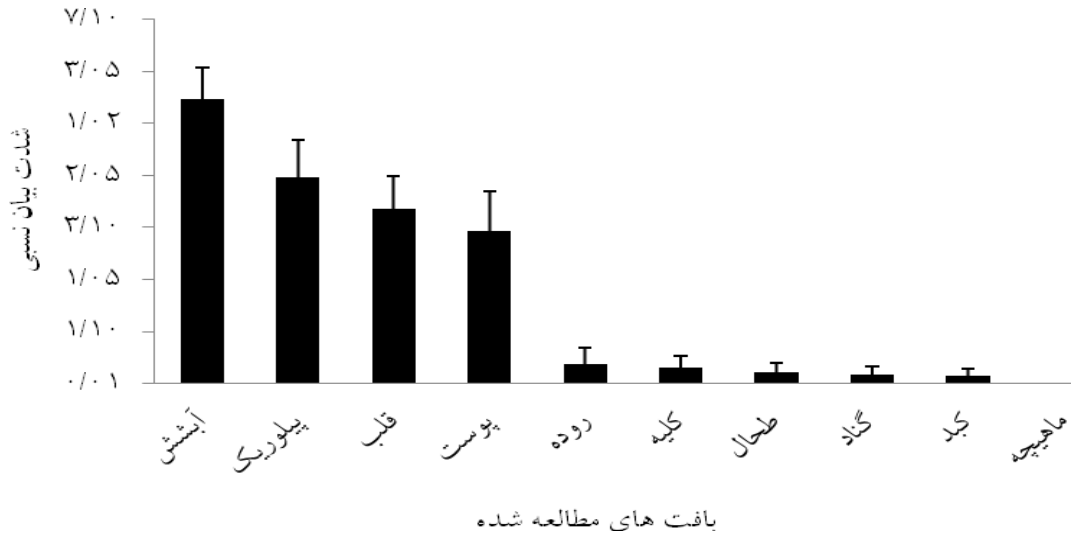
همچنین مقایسه‌های دیگر نشان‌دهنده شباهت نسبی (علی‌رغم فواصل ژنتیکی زیاد)، بین توالی‌های مختلف *SOX9* بین شاخه‌های گوناگون جانوری بود. نتایج نشان داد که تاسماهیان با Bootstrap معادل ۱۰۰ در یک کلاستر قرار گرفتند.

در این مطالعه از روش Real time PCR، به منظور تعیین میزان بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف شامل آبشش، پیلوریک، طحال، گناد، کلیه، روده، قلب، پوست، کبد و ماهیچه در سه عدد تاسماهی ایرانی جوان استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده از ژن *RPL6*، به‌عنوان ژن مرجع، نرمال‌سازی شد. نتایج نشان داد که در اکثر بافت‌های مورد بررسی ژن *SOX9* در مقادیر قابل‌سنجش بیان شده است؛ اگرچه سطوح بیان ژن با توجه به نوع بافت بسیار متفاوت است (شکل ۳). بیشترین میزان بیان ژن در بافت آبشش و پس از آن در پیلوریک بیان شد.

بحث

SOX9 یکی از اعضای خانواده *SOX* بوده که علاوه بر عملکردهای تکاملی نظیر تشکیل غضروف، نقش بسیار مهمی در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]



شکل ۳- شدت بیان نسبی ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) هفت‌ماهه پرورشی (n=3) (نرمال‌سازی داده‌ها بر اساس میزان بیان ژن *RPL6*، انجام شد).

تعیین جنسیت دارد (Healy et al. 1999; Jakubiczka et al. 2010). بنابراین، شناسایی ژن *SOX9* اطلاعات ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل عملکرد *SOX9* در فرآیندهای تکاملی و تعیین جنسیت ارائه می‌کنند.

در مطالعه حاضر برای اولین بار توالی قسمتی از ژن *SOX9* تاسماهی ایرانی شناسایی و به صورت اختصاصی برای این گونه در بانک ژن NCBI ثبت شد. تاکنون ژن *SOX9* در چندین گونه از ماهیان خاویاری نظیر تاسماهی دریایی اروپایی (Hett et al. 2005)، تاسماهی سیبری (Berbejillo et al. 2011)، تاسماهی آمور (Chen et al. 2006) و تاسماهی چینی (کد دسترسی: *KJ526295.1*)، شناسایی شده‌است.

توالی نسبی ژن *SOX9* تاسماهی ایرانی شامل ۲۱۰ نوکلئوتید بوده که شکل فعال پروتئین آن دارای ۷۰ اسیدآمینه است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی *SOX9* تاسماهی ایرانی با سایر گونه‌های ماهیان خاویاری نشان‌دهنده مشابهت قابل‌توجه بین آن‌ها می‌باشد. نکته قابل‌توجه اینکه تاسماهی ایرانی بیشترین تشابه را به تاسماهی سیبری داشته و سپس به ترتیب با تاسماهی آمور و تاسماهی چینی دارد. همچنین مقایسه‌های دیگر نشان‌دهنده شباهت نسبی بین شاخه‌های مختلف جانوری می‌باشد که می‌تواند به دلیل نقش بنیادین و تکاملی این ژن در جانوران مختلف باشد. در مطالعه حاضر ماهیان خاویاری در شاخه‌ای جدا از ماهیان استخوانی قرار گرفتند که مطالعات پیشین روی تاسماهی‌های سیبری و دریاچه‌ای نیز این یافته را تایید می‌کند (Hett et al. 2005; Berbejillo et al. 2012).

تجزیه و تحلیل بیان ژن *SOX9* در بافت‌های مختلف تاسماهی ایرانی جوان با استفاده از روش Real time PCR بیان ژن را در نه اندام این ماهی نشان داد. این امر می‌تواند دلالت بر فعالیت عمومی و نقش چندگانه این ژن در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی در ماهیان خاویاری باشد. ژن *SOX9* بر اساس توالی در گروه *SOX* E قرار دارد. در میان ژن‌های موجود در این گروه ژن‌های *SOX*8 و *SOX9* با تعیین جنسیت نر در پستانداران در ارتباط هستند (Bowles et al. 2000; Chaboissier et al. 2004; Koopman 2005). در سطوح عملکردی، *SOX9* نقش بسیار مهمی در تمایز سلول‌های سرتولی دارد، آن‌ها یکی از اولین ژن‌های تنظیم‌کننده فعالیت سلول‌های پیش سرتولی تحت بیان ژن *SRY* می‌باشند و نقشی کلیدی در تمایز جنسی پستانداران ایفا می‌کنند (Bowles and Koopman 2001; Brennan and Capel 2004). بااین‌حال، اطلاعات محدودی در خصوص نقش ژن *SOX9* در مراحل اولیه زندگی ماهیان خاویاری و موجودات غیر پستاندار منتشر شده است. در مطالعات پیشین روی ماهیان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

خاویاری ژن *SOX9* به‌عنوان یکی ژن کاندید شرکت‌کننده در تمایز بیضه، انتخاب شده است (Berbejillo et al. 2011, 2013). با این‌حال، نتایج ما بیان ضعیفی را در گنادهای تاسماهی ایرانی هفت‌ماهه نشان داد که این وضعیت می‌تواند نشانگر دخالت این ژن در تمایز جنسی در سنین بالاتر باشد (Berbejillo et al. 2012). این نتایج مطابق تحقیقات پیشین روی تاسماهی سیبری بوده و بیان می‌کند که ژن *SOX9* نمی‌تواند به‌عنوان ژن تعیین‌کننده جنسیت در تمامی مراحل زندگی (جنینی، لاروی، نوجوانی، بلوغ) ماهیان خاویاری به کار گرفته شود (Berbejillo et al. 2012).

در تحقیق حاضر بیشترین سطح بیان ژن در بافت آبشش مشاهده شد که می‌توان آن را مرتبط با نوع بافت‌های موجود در آبشش دانست. آبشش‌ها دارای ساختاری غضروفی بوده و مشارکت در غضروف سازی، به‌عنوان یکی از فعالیت‌های بنیادی مرتبط با ژن *SOX9* در مهره‌داران گزارش شده‌است (Bi et al. 1999; Evans and Claiborne 2005). در گونه‌های استخوانی نظیر روغن ماهی (*Gadus morhua*) و زبرا فیش (*Danio rerio*) فعالیت‌های *SOX9* در امر غضروف‌سازی آبشش گزارش شده‌است (Johnsen 2012). به‌طور مشابه، Chen et al. (2006) نیز با مطالعه روی تاس‌ماهی آمور فعالیت *SOX9* در فرآیند غضروف سازی را پیشنهاد کردند. این نتایج شاید بیانگر شباهت فرآیند فیزیولوژیکی ژن *SOX9* در ماهیان غضروفی استخوانی با ماهیان استخوانی در امر غضروف سازی باشد. اگرچه اظهارنظر قطعی در این زمینه نیازمند تحقیقات بیشتر و روش‌های دقیق‌تر است.

به‌طور خلاصه، در این پژوهش برای اولین بار توالی نسبی ژن *SOX9* تاسماهی ایرانی شناسایی شد. نتایج بررسی نشان داد که ژن *SOX9* در سنین پایین نمی‌تواند به‌عنوان ژن اصلی تعیین جنسیت در تاسماهی ایرانی محسوب شود. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان داشت که این ژن در امر غضروف سازی نیز دخیل می‌باشد.

سپاسگزاری

از مدیریت و کارکنان موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، جهت فراهم سازی امکانات آزمایشگاهی این پروژه و همچنین از مهندس علی حلاجیان و دکتر آرش اکبرزاده برای راهنمایی‌ها و خدمات ارزنده‌شان طی تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Akbarzadeh A, Farahmand H, Mahjoubi F, Nematollahi M.A, Leskinen P, Rytkönen K, 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. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 158: 282-288.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Barney ML (2010) Molecular investigations on sex determination and differentiation pathways in the common carp, Cyprinus carpio. Dissertation, University of Tasmania, Australia.

Barrionuevo F, Scherer G (2010) SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 42: 433-436.

Berbejillo J, Martinez- Bengochea A, Bedo G, Brunet F, Volff JN, Vizziano- Cantonnet D (2012) Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, Acipenser baerii. Molecular Reproduction and Development 79: 504-516.

Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedó G, Vizziano-Cantonnet D (2011) Molecular characterization of testis differentiation in the Siberian sturgeon, Acipenser baerii. Indian Journal of Science and Technology 4: 71-72.

Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedó G, Vizziano-Cantonnet D. (2013) Expression of dmrt1 and SOX9 during gonadal development in the Siberian sturgeon (Acipenser baerii). Fish Physiology and Biochemistry 39: 91-94.

Bi W, Deng JM, ZhangZ, Behringer RR, de Crombrugghe B (1999) SOX9 is required for cartilage formation. Nature Genetics 22: 85-89.

Birstein VJ, Waldman JR, Bemis WE (1997) Sturgeon biodiversity and conservation. Springer 17: 25-71.

Bowles J, Koopman P (2001) New clues to the puzzle of mammalian sex determination. Genome Biology 2: 1-1025.4.

Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. Developmental Biology 227: 239-255.

Brennan J, Capel B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nature Reviews Genetics 5: 509-521.

Chaboissier M.-C, Kobayashi A, Vidal VI, Lützkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A (2004) Functional analysis of SOX8 and SOX9

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402–408.
McCormick C, Bos D, DeWoody J (2008) Multiple molecular approaches yield no evidence for sex- determining genes in lake sturgeon (Acipenser fulvescens). Journal of Applied Ichthyology 24: 643-645.
Pourkazemi M (2006) Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. Journal of Applied Ichthyology 22: 12-16.
Siegfried KR (2010) In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. Journal of Fish Biology 76: 1879-1902.
Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T (1997) Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. Gene 202: 167-170.
Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
Wegner M, Stolt CC (2005) From stem cells to neurons and glia: a SOXist's view of neural development. Trends in Neurosciences 28: 583-588.
Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. Physiological Reviews 87: 1-28.
Wuertz S, Gaillard S, Barbisan F, Carle S, Congiu L, Forlani A, Aubert J, Kirschbaum F, TosiE, Zane L (2006) Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. Aquaculture 258: 685-688.
Xiao TQ, Lu CY, Li C, Cheng L, Cao DC, Sun XW (2014) An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in Amur sturgeon Acipenser schrenckii Brandt, 1869. Journal of Applied Ichthyology 30: 1282-1285.
Yarmohammadi M, Pourkazemi M, Ghasemi A, Hassanzadeh M, Chakmehdouz F (2011) AFLP reveals no sex-specific markers in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) or beluga sturgeon (Huso huso) from the southern Caspian Sea, Iran. Progress in Biological Sciences 1: 55-114.
Yarmohammadi M, Pourkazemi M, Kazemi R, Hallajian A, Soltanloo H, Hassanzadeh Saber M, AbbasalizadehA. (2014) Persian sturgeon insulin-like growth factor I: molecular cloning and expression during various nutritional conditions. Journal of Applied Genetics 55: 239-247.
Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K ,.Morohashi KI, Ozato K (2002) SOX9 in a teleost fish, medaka (Oryzias latipes): evidence for diversified function of SOX9 in gonad differentiation. Molecular Reproduction and Development 63: 5-16.
during sex determination in the mouse. Development 131: 1891-1901.
Chen J, Yuan H, Sun D, Liang B, Zhang S (2006) Sequence and expression of three members of the SOX gene in Amur sturgeon (Acipenser schrenckii). Journal of Applied Ichthyology 22: 77-81.
Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero J, Ganan Y, Macias D, Merino R, Hurle J (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: (SOX) genes and BMP signaling. Developmental Biology 257: 292-301.
da Silva SM, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R (1996) SOX9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nature Genetics 14: 62-68.
Degani G (2014) Expression of SOX3 and SOX9 genes in gonads of Blue gourami. Advances in Biological Chemistry 4: 322-330.
Du Q.-Y, Wang F-Y, Hua H-Y, Chang Z-J (2007) Cloning and study of adult-tissue-specific expression of SOX9 in Cyprinus carpio. Journal of Genetics 86: 85-91.
Evans DH, Claiborne JB (2005) The Physiology of Fishes, Third Edition. Taylor & Francis, 90-93.
Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, GoodfellowPN (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 372: 525-529.
Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT (1999) Regulation and role of SOX9 in cartilage formation. Developmental Dynamics 215: 69-78.
Hett A, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A (2005) Characterization of SOX9 in European Atlantic sturgeon (Acipenser sturio). Journal of Heredity 96: 150-154.
Jakubiczka S, Schröder C, Ullmann R, Volleth M, Ledig S, Gilberg E, Kroisel P, PWieacker P (2010) Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. Sexual Development 4: 143-149.
Johnsen H. (2012) Key genes and regulators associated with sexual differentiation and gonad development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Dissertation,University of Tromsø UIT, Norway.
Keyvanshokooh S, Pourkazemi M, Kalbassi MR (2007) The RAPD technique failed to identify sex- specific sequences in beluga (Huso huso). Journal of Applied Ichthyology 23: 1-2.
Koopman P (2005) Sex determination: a tale of two SOX genes. Trends in Genetics 21: 367-370.
Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B (2007) Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (SOX) transcription factors. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39: 2195-2214.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.3.6]