



توالی‌یابی و بررسی الگوی بیان ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل‌خورک (*Periophthalmus waltoni*) در شرایط طبیعی

سید احمد قاسمی^۱، عبدالعلی موحدی‌نیا^{۲*}، نگین سلامات^۲، بهرام کاظمی^۳

تاریخ پذیرش: مرداد ۹۵

تاریخ دریافت: خرداد ۹۵

چکیده

سیتوکروم CYP1A از آنزیم‌های مهم در سم‌زدایی است. از این رو شناسایی ژن‌های سیتوکروم به درک فرآیند متابولیسم مواد آلی و پاسخ‌های سازشی ماهیان دریایی نسبت به PAHها کمک می‌کند. بدین منظور، ۱۰۳۵ نوکلئوتید از ناحیه ORF ژن CYP1A در ماهی گل‌خورک (*Periophthalmus waltoni*) توالی‌یابی و شناسایی شد. در مقایسه بین اندام‌ها، میزان بیان پایه ژن CYP1A در آبشش، کلیه، قلب، روده، پوست و مغز به ترتیب ۳۳، ۲۲، ۱۹، ۱۷، ۱۱ و ۱۱ درصد از بیان پایه در کبد بود. بر این اساس، در ماهی گل‌خورک نیز مانند سایر ماهیان، کبد بیشترین بیان ژن CYP1A را داشت، اما میزان بیان پایه این ژن در سایر اندام‌ها در مقایسه با مطالعات گذشته، از درصد بالاتری برخوردار بود. اگر چه الگوی بیان پایه ژن به نوع گونه بستگی دارد، اما بالا بودن بیان پایه ژن CYP1A می‌تواند به دلیل مواجهه ماهی گل‌خورک با مواد آلاینده در شرایط طبیعی باشد. الگوی بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل‌خورک نشان دهنده شرایط اکوفیزیولوژیکی خاص این گونه است. بنابراین می‌توان الگوی بیان ژن CYP1A را در اندام‌های مختلف گل‌خورک والتونی به عنوان نشانگر زیستی برای ارزیابی مواجهه با آلاینده‌های آلی به ویژه PAHها به کار برد.

واژگان کلیدی: سیتوکروم P450، اکوفیزیولوژی، بیومارکر، گل‌خورک والتونی.

- ۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
 - ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
 - ۳- استاد گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
- * نویسنده مسئول: amovahedinia@yahoo.com

مقدمه

فوق خانواده سیتوکروم P450 (CYP)، گروهی بزرگ و متنوع از هموپروتئین‌ها و شامل چندین خانواده مختلف است. اعضای این خانواده آنزیمی دارای فعالیت منواکسیژنازی بر روی طیف وسیعی از ترکیبات درون و خارج سلولی در جانوران و گیاهان هستند. در ۲۰ سال اخیر ژن‌های زیادی از اعضای این خانواده در ماهیان شناسایی شده است. آنزیم‌های P450 در سم‌زدایی ترکیبات خارج سلولی از قبیل داروها، مواد شیمیایی سرطان‌زا، آلاینده‌های محیطی و همچنین در متابولیسم مواد داخل سلولی از قبیل استروئیدها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و پروستوگلان‌دین‌ها نقش دارند (Uno et al., 2012). در ماهیان، خانواده CYP1 شامل چهار زیرخانواده CYP1A، CYP1B، CYP1C و CYP1D است که مسئول کاتابولیسم و اکسیداسیون مواد محیطی و آلاینده‌ها هستند، بنابراین در سم‌زدایی، دفع مواد و جلوگیری از تشکیل DNA Adduct نقش اساسی دارند. در ماهیان، CYP1A مهم‌ترین نقش را در متابولیسم و سم‌زدایی مواد سمی دارد و بنابراین به عنوان یک نشانگر زیستی (بیومارکر) برای محیط‌های آبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Brammell et al., 2013).

مکانیسم تنظیمی، این ژن‌ها به وسیله مقادیر بسیار ناچیز از ترکیبات متنوع آروماتیکی فعال می‌شوند، بنابراین یک نشانگر بسیار حساس برای آلاینده‌های آلی محسوب می‌شوند (Uno et al., 2012). CYP1A حساس‌ترین نشانگر زیستی را برای آلاینده‌های نفتی فراهم می‌کند. آنزیم‌های CYP1A می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای پالایش و مشخص کردن آلاینده‌های نفتی استفاده شوند. گاوماهیان، ماهیانی کوچک با طولی حدود ۲۰-۴ سانتی‌متر و اغلب ساکن آب‌های شور هستند و از نظر ریخت‌شناسی رفتاری و اکولوژیکی تنوع بالایی دارند. اغلب گونه‌های آن شکارچی هستند و با زندگی در آب‌های ساحلی و کم‌عمق اقیانوس‌ها، دریاها و دریاچه‌ها سازگاری یافته‌اند (Thacker, 2003). این ماهیان متعلق به زیرخانواده Oxudercinae با ۱۰ جنس و ۳۹ گونه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در سواحل جزرومدی با بستری نرم در افریقای غربی و نواحی اقیانوس هند-آرام (Indo-pacific) پراکنش دارند و معروف به گل‌خورک ماهیان هستند (Agorreta et al., 2013). شش گونه از گل‌خورک‌ها از

کلونینگ ژن CYP1A و شناسایی توالی این ژن در ماهی گل‌خورک و بررسی میزان بیان پایه این ژن در اندام‌های مختلف به منظور تعیین نقش اندام‌های مختلف در سم‌زدایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ماهی گل‌خورک (*Periophthalmus waltoni*) از جزیره شیخ در بوشهر انجام گرفت. ماهیان گل‌خورک با دست صید و سپس به صورت زنده به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه تعداد ۵ قطعه ماهی با استفاده از ۲- فنوکسی اتانل (۰/۲ درصد) بیهوش شد و نمونه‌های کبد، آبشش، کلیه، قلب، روده، پوست و مغز آن‌ها در ازت مایع منجمد و در فریزر ۸۰- تا انجام آزمایش‌ها، نگهداری شدند.

سازگار کردن ماهی و تیمار با بنزوآلفاپایرن

برای شناسایی ژن

پس از یک هفته دوره سازگاری با شرایط آزمایشگاه، در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد، ماده بنزوآلفاپایرن (B[a]P) با غلظت ۲۵ میکروگرم به ازای گرم وزن بدن، به

خلیج فارس تا اقیانوس هند پراکنش دارند. از این تعداد سه گونه *Boleophthalmus* و *Periophthalmus waltoni dussumeri* در خلیج فارس یافت می‌شوند (Murdy 1989). از سه گونه گل‌خورک موجود در خلیج فارس گونه گل‌خورک والتونی (*P. waltoni*) بومی خلیج فارس و دریای عمان است و تنها در سواحل خلیج فارس تا دریای عمان پراکنش دارد (Abdoli, 2000).

در سال‌های اخیر این گروه از ماهیان به طور گسترده‌ای به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعات تطابق در شرایط یوری‌هالین و یوری‌ترمال، اکوفیزیولوژی، تغییرات ریختی برای سازش در شرایط خشکی، نقش انتخاب جفت در تکامل و مراقبت‌های والدینی و به عنوان بیواندیکاتور و بیومارکر برای سنجش شرایط زیستی در سواحل گلی و مانگرو مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Thacker, 2003; Ansari et al., 2014).

با توجه به اهمیت گل‌خورک‌ماهیان از نظر مطالعات اکوفیزیولوژیکی و اکوتوکسیکولوژیکی، این مطالعه با هدف بررسی وضعیت فیزیولوژیکی ماهی گل‌خورک (*P. waltoni*) در ارتباط با آلاینده‌های نفتی انجام گرفت. به این منظور

۵ ماهی گل خورک تزریق شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، ماهی‌ها با استفاده از ۲- فنوکسی اتانل (۰/۲ درصد) بیهوش شدند و از کبد، آبشش و قلب آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ایزت مایع منجمد و سپس به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

توالی‌یابی ژن CYP1A

برای طراحی آغازگرهای دژنره (Degenerate)، توالی‌های ژن CYP1A در

گونه‌های مختلف ماهیان که در NCBI ثبت شده‌اند، جستجو و در فرمت FASTA ذخیره‌سازی شدند. با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.0، هم‌ردیفی بین توالی‌ها انجام گرفت و طراحی آغازگرهای دژنره با استفاده از نرم‌افزارهای Primerclad و CLC Sequense انجام گرفت. در مجموع ۷ آغازگر برای ژن CYP1A طراحی شد (جدول ۱). تمامی آغازگرهای طراحی شده برای این مطالعه، توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده برای شناسایی و اندازه‌گیری بیان ژن

توالی ۳'-۵'	آغازگرها	
ATGGTNYTNATGATHYTNC	CYP1A-F1*	۱
CGT CAT CTG YGG NAT GTG	CYP1A-F2*	۲
TKC CCA CGA TCT TCT CRT C	CYP1A-R1*	۳
ATNGGNATGCGNCCYGTN	CYP1A-F3*	۴
CGYTTGTGYTTCATNGTBAGC	CYP1A-R2*	۵
CAGGTGTCYTTGGGRATGAA	CYP1A-R3*	۶
CTKGAGGARCAAYRTCNGCAA	CYP1A-F4*	۷
AGGCCCTGTAATTGGAATGAGT	18s F1	۸
GACTCTTTCGAGGCCCTGTAAT	18s F2	۹
AGCTTTCATTCTGGAGGTGTTGCG	CYPRTF1	۱۰
ACTGTTTCAGGAAACGCTCTGGGTT	CYPTR1	۱۱

*: آغازگرهای دژنره. N: G, A, T یا C; B: G, T یا C; Y: C یا T; K: G یا T; R: A یا G.

سانتی‌گراد در ۱ دقیقه و ۳۵ چرخه بهینه‌سازی شد. با توجه به این که از ۷ آغازگر مختلف شامل ۴ آغازگر پیشرو و ۳ آغازگر پیرو برای ژن اصلی استفاده شد، در نتیجه ترکیب‌های جفتی از این آغازگرها در واکنش PCR به کار رفت.

پس از بهینه‌سازی شرایط PCR برای ژن CYP1A، ۴ محصول در ترکیب CYP1AF2/CYP1AR2، CYP1AF4/CYP1AR2 و CYP1AF2/CYP1AR3 در CYP1AF4/CYP1AR3 به دست آمد. در نهایت محصول حاصل از جفت آغازگر CYP1AF2/CYP1AR2 و CYP1AF4/CYP1AR2 تعیین توالی شد و با استفاده از نرم‌افزار BioEid4.0 توالی‌ها بررسی و صحت توالی‌ها با استفاده از کروماتوگرام مربوطه سنجش شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از nBlast و Blastx با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شد. توالی CYP1A تعدادی از ماهیان از بانک جهانی استخراج شد و فاصله ژنتیکی بین ژن CYP1A در ماهی گل‌خوردک با سایر ماهیان با روش K2p و حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن،

استخراج RNA از ۲۵ میلی‌گرم از بافت‌های کبد، مغز، قلب و آبشش با استفاده از کیت High Pure RNA Tissue (Roche، آلمان) انجام شد. RNAهای به دست آمده از هر یک از این بافت‌ها به عنوان الگو برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis (Roche، آلمان) انجام شد. cDNA توسط آنزیم رونوشت‌برداری AMV و آغازگر Oligo (dT)، طبق روش استاندارد و در دو مرحله متوالی ساخته شد. برای به دست آوردن ژن CYP1A با استفاده از آغازگرهای دژنره طراحی شده (جدول ۱) و cDNA به دست آمده، تکثیر ژن با شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs ۰/۲ میلی‌مولار، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، ۴۰۰ نانوگرم cDNA، HotStarTaqTM DNA Polymerase ۲ واحد، کلرید منیزیم ۲/۵ میلی‌مولار و آب مقطر دیونیزه (برای رساندن به حجم مورد نظر) انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به ترتیب مرحله جداسازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله بسط آغازگر در ۷۲ درجه

الکتروفورز روی ژل آگارز حاصل شد. واکنش ساخت cDNA با استفاده از کیت (Vivantis، کره جنوبی) و یک میکروگرم RNA انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف، از روش Real-Time PCR با استفاده از ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix (Bioneer، چین)، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر با شرایط دمایی شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بسط، استفاده شد. برای هر یک از نمونه‌ها، ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای بررسی احتمال آلودگی، کنترل منفی در واکنش شامل تمامی ترکیبات واکنش بجز cDNA نیز انجام شد.

تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-Time PCR با تهیه ۴ سری رقت با سه تکرار از مخلوط cDNA و رسم منحنی استاندارد با تعیین شیب خط و راندمان PCR بر مبنای رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$E(\%) = 10^{1/\text{Slope} - 1} \times 100$$

سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد در نرم‌افزار MEGA6.0 محاسبه شد. درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor-Joining با استفاده از فاصله ژنتیکی K2p با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ بار، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد در نرم‌افزار MEGA6.0 ترسیم شد (Tamura et al., 2013).

اندازه‌گیری بیان ژن

برای بررسی بیان پایه ژن CYP1A، RNA کل از ۲۰ میلی‌گرم از بافت‌های کبد، آبشش، کلیه، قلب، روده، پوست، و مغز ماهی گل‌خورک بدون تیمار و با استفاده از کیت استخراج (RBC، آلمان) استخراج و آلودگی احتمالی DNA ژنومی در مرحله قبل از شستشو با استفاده از آنزیم DNase1 طبق روش کیت، بر طرف شد. برای اطمینان از حذف آلودگی DNA، RNA تیمار شده با آنزیم DNase1، به عنوان الگو به همراه آغازگر ژن CYP1A در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. اطمینان از کیفیت مطلوب و تعیین غلظت RNA از طریق اسپکتروفوتومتری و

والتونی (*Periophthalmus waltoni*) نشان داد که بیشترین شباهت ژنتیکی و کمترین اختلاف ژنتیکی با ژن CYP1A در گونه *Gobius nigra* به ترتیب به میزان ۰/۷۷ و ۰/۲۲ وجود داشت (جدول ۲).

دندروگرام توالی نوکلئوتیدهای CYP1A در ماهی گل‌خورک با سایر گونه‌های ماهیان بر اساس روش Neighbor-Joining نشان داد که توالی ژن CYP1A گونه گل‌خورک با گونه *G. niger* بیشترین قرابت را با هم دارند و در یک کلاستر قرار می‌گیرند (شکل ۱).

نتایج حاصل از مقایسه هم‌ردیفی توالی نوکلوتیدی CYP1A در ماهی گل‌خورک با دیگر گونه‌های ماهیان در شکل ۲ نشان داده شده است. بر این اساس بیشترین تشابه نوکلوتیدی CYP1A ماهی گل‌خورک با گونه *G. niger* به میزان ۷۷ درصد است. میزان تشابه توالی CYP1A در ماهیان بین ۶۶ تا ۸۹/۱ درصد محاسبه شد.

با توجه به این که C_T ژن 18srRNA در بافت‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بود بنابراین بر اساس رسم نمودار استاندارد با استفاده از C_T ژن‌های 18srRNA و CYP1A، مقادیر C_T ژن CYP1A نرمال‌سازی شد. سپس میزان بیان بر اساس رابطه $2^{-\Delta C_T}$ (رابطه ۲) محاسبه (Livak and Schmittgen, 2001) و بر حسب درصد نسبت به بیان حداکثری در کبد مقایسه شد.

رابطه ۲:

$$\Delta C_T = C_T \text{CYP1A} - C_T \text{18s}$$

آنالیز آماری مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد، با نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت.

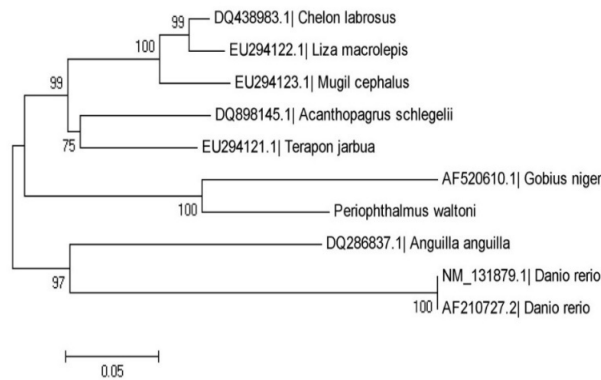
نتایج

آنالیز توالی و رابطه خویشاوندی

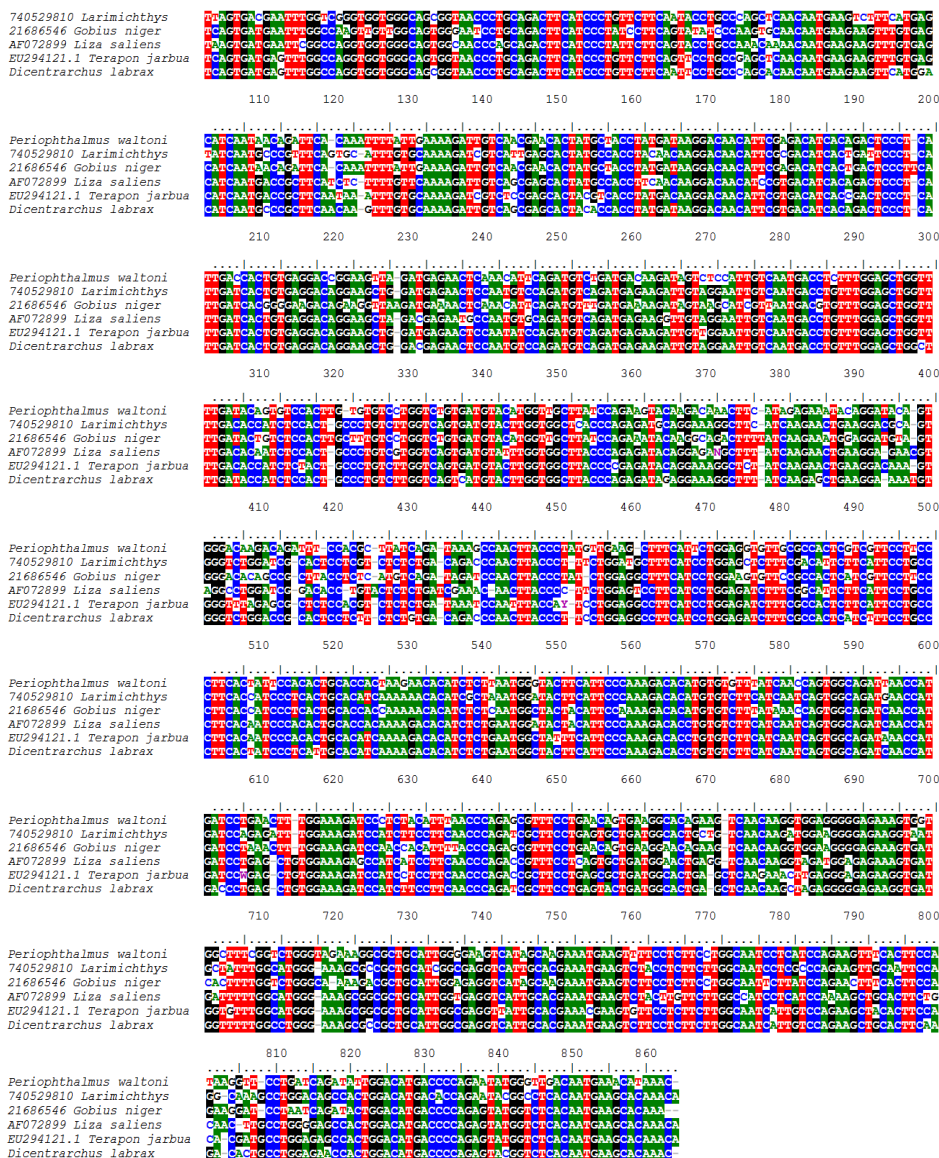
شباهت و فاصله ژنتیکی توالی نوکلئوتیدهای ژن CYP1A در ماهی گل‌خورک

جدول ۲: مقایسه شباهت ژنتیکی توالی ژن CYP1A در ماهی گل خورک والتونی با سایر گونه‌های ماهیان

<i>Dicentrachus labrax</i>	<i>Teapon jabrus</i>	<i>Mugil cephalus</i>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	<i>Liza saliens</i>	<i>Gobius niger</i>	<i>Liza aurata</i>	<i>Larimichthys sp.</i>	<i>Periophthalmus waltoni</i>	نام گونه‌ها
									<i>Periophthalmus waltoni</i>
							۶۶/۳		<i>Larimichthys sp.</i>
						۶۴/۴	۴۷/۱		<i>Liza aurata</i>
					۶۳	۶۶/۱	۷۷/۱		<i>Gobius niger</i>
				۶۳/۱	۹۷	۶۴/۴	۴۷/۲		<i>Liza saliens</i>
			۶۵	۶۷	۶۷/۵	۷۴/۹	۵۴		<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
		۶۲/۶	۸۵/۲	۶۱/۷	۸۴/۹	۶۰	۵۰		<i>Mugil cephalus</i>
	۶۷	۷۸/۱	۶۶	۶۲/۶	۶۸	۷۹/۷	۶۳		<i>Teapon jabrus</i>
۸۰/۹	۶۷	۷۹	۶۹	۶۵/۵	۷۱	۸۰	۵۸		<i>Dicentrachus labrax</i>



شکل ۱: نمودار فیلوژنی توالی به دست آمده از ژن CYP1A ماهی گل خورک با سایر گونه‌های ماهیان



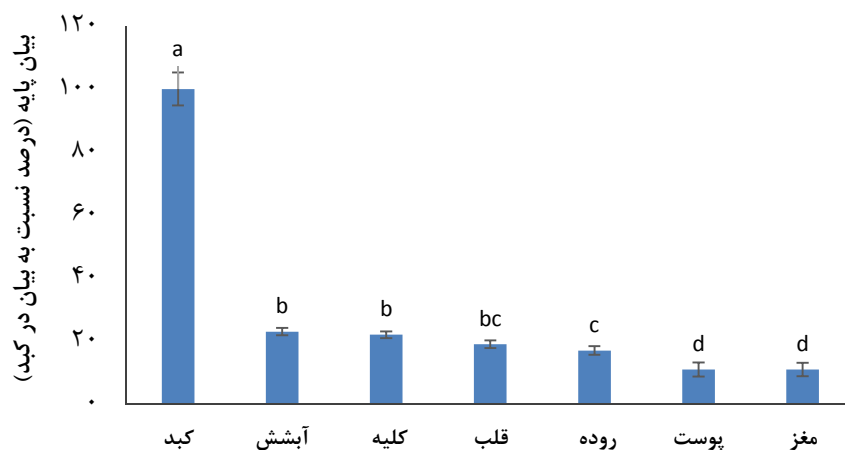
شکل ۲: مقایسه توالی نوکلئیدی CYP1A ماهی گل‌خوردک با سایر ماهیان با استفاده از Mega6.0

بیان پایه ژن CYP1A

بحث

به دلیل استفاده از آغازگرهای دژنره نیاز به میزان بالایی از بیان ژن CYP1A در کبد است. بنابراین، برای افزایش میزان RNA ژن CYP1A در بافت کبد، ماهی گل خورک (*Periophthalmus waltoni*) تحت تیمار BaP قرار گرفت. نتایج نشان داد که با تزریق بنزوآلفاپایرن افزایش ناگهانی در بیان CYP1A ایجاد شد و در نتیجه امکان شناسایی ژن فراهم شد.

در مقایسه بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل خورک، حداکثر بیان پایه در کبد مشاهده شد. در مقایسه بین اندام‌ها، به ترتیب کبد، آبشش، کلیه، روده، پوست و مغز بیشترین بیان پایه را داشتند. به صورت مقایسه‌ای، درصد بیان ژن CYP1A نسبت به کبد، در اندام‌های فوق، به ترتیب به میزان ۳۳، ۲۲، ۱۹، ۱۷، ۱۱ و ۱۱ درصد از بیان کبد را شامل می‌شدند (شکل ۳).



شکل ۳: بیان پایه نسبی ژن CYP1A در بافت‌های مختلف ماهی گل خورک (میانگین \pm انحراف معیار). بیان نسبی بر اساس روش $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه شد و بیان به صورت درصد در هر بافت نسبت به حداکثر بیان در کبد است.

گل‌خورک با گونه نزدیک خود (*G. niger*) ۸۴ درصد بود که میزان متوسطی است. میزان شباهت توالی ژن CYP1A1 در ماهی گل‌خورک با سایر گونه‌ها بین ۶۰ تا ۸۱ درصد بود که مانند سایر گونه ماهیان است.

میزان بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل‌خورک

میزان بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های مختلف بر حسب درصدی از بیان این ژن در کبد، اندازه‌گیری شد. بر این اساس در ماهی گل‌خورک حداکثر بیان پایه CYP1A در بافت کبد بود. در مقایسه بین بافتی به ترتیب کبد، آبشش، کلیه، قلب، روده، پوست و مغز بیشترین بیان پایه را داشتند. در مقایسه درصد بیان ژن نسبت به کبد، در بافت‌های به ترتیب به میزان ۳۳، ۲۲، ۱۹، ۱۷، ۱۱ و ۱۱ درصد از بیان کبد را شامل می‌شد. شبیه این نتایج در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است. در ماهی *Poecilia vivipara* بیان پایه ژن CYP1A در کبد بیشترین میزان را نسبت به روده و آبشش داشت، در حالی که بیان پایه در روده و آبشش در حدود ۱۲ درصد بیان پایه کبد بود (Dorrington et al., 2012). در ماهی کیلی‌فیش (*Fundulus heteroclitus*)

در مطالعات گذشته، شناسایی ژن CYP1A1 در ماهی قرمز به وسیله القای بنزوآلفاپایرن (Oh et al., 2008)، در ماهی *Oncorkynchus tshawytscha* (Campbell and Devlin, 1996) و سه گونه از آزادماهیان (Rees and Li., 2004) با القا به وسیله بتا نفتوفلاون و در تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) با القای پایرن (Zapata-Perez et al., 2002) انجام شده بود. در این پژوهش نیز شناسایی ژن CYP1A در ماهی گل‌خورک با تزریق بنزوآلفاپایرن انجام شد که نشان دهنده اثر القایی بنزوآلفاپایرن بر ژن CYP1A در ماهی گل‌خورک بود.

بخشی از توالی ژن CYP1A با طول ۱۰۳۵ نوکلئوتید از ناحیه ۵' شناسایی شد. این توالی بخشی از ناحیه کدکننده پروتئین است. توالی حاصل بیشترین شباهت را با ژن CYP1A1 در گونه *Gobius niger* از خانواده گاوماهیان داشت که هم‌خانواده ماهی گل‌خورک است. میزان شباهت توالی CYP1A1 در دو گونه ماهی آزاد اطلس و قزل‌آلای رنگین‌کمان در حد ۹۶ درصد محاسبه شد. این توالی در ماهی آزاد اطلس با سایر ماهیان استخوانی نیز ۷۶-۷۰ درصد شباهت داشت (Rees et al., 2005). میزان شباهت این ژن در ماهی

بنابراین، کلیه از نظر فیزیولوژیکی اندام فعال در دفع مواد سمی است.

در مطالعه حاضر بیان ژن CYP1A در تمامی اندام‌های مورد مطالعه، اندازه‌گیری شد. در مطالعات گذشته نیز بیان ژن CYP1A در بیشتر اندام‌ها گزارش شده بود (Jonsson et al., 2007). این نشان می‌دهد که همه اندام‌ها در سم‌زدایی نقش دارند و دارای مکانسیم دفاعی در مقابله با مواد سمی هستند.

پس از کبد، آبشش ماهی گل‌خوردک والتونی دارای بیان بالایی از ژن CYP1A بود که در مطالعات دیگر از جمله گوپی برزیلی (Dorrington et al., 2012)، ماهی گورخری (Jonsson et al., 2007)، کیلی‌فیش (Zanette et al., 2009)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Jonsson et al., 2010) و *G. aculeatus* (Gao et al., 2011) نیز گزارش شده است. آبشش اولین اندام در ارتباط با محیط بیرونی و مواد زنبیوتیک است، به همین دلیل اندام اصلی پس از کبد در متابولیزه کردن مواد سمی است و پتانسیل بالایی در بیان ژن‌های CYP1 دارد.

میزان بیان پایه به دست آمده در روده در ماهی گل‌خوردک بر خلاف ماهی گورخری، قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی *P. vivipara*

کبد بیشترین حد بیان پایه CYP1A را داشت و در مقایسه بین بافتی به ترتیب کبد، کلیه، روده، قلب، آبشش، چشم، مغز و بیضه بیشترین بیان پایه از ژن CYP1A را داشتند (Zanette et al., 2009). در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیشترین بیان پایه ژن CYP1A در کبد بود (Jonsson et al., 2010). در ماهی گورخری (*Danio rerio*) به ترتیب کبد، روده، کلیه، قلب، آبشش، چشم، مغز، تخمدان و بیضه دارای بیشترین بیان پایه ژن CYP1A بودند (Jonsson et al., 2007). در ماهی *Gasterosteus aculeatus* در مقایسه بین اندام‌ها به ترتیب کبد، کلیه، آبشش و مغز بیشترین بیان پایه ژن CYP1A را داشتند (Gao et al., 2011). کبد مهم‌ترین بافت در متابولیزه کردن مواد زنبیوتیک است. به طور کلی در اندام‌های حفره شکمی (کبد، روده و کلیه) میزان بیان پایه ژن CYP1A بسیار بالا است که نقش کبد و کلیه را در دریافت و متابولیسم مواد سمی و غذایی نشان می‌دهد (Jonsson et al., 2007; Dorrington et al., 2012). کلیه اندام اصلی دفع مواد حاصل از متابولیسم است. بیان بالای ژن CYP1A در کلیه به دلیل نقش دفعی مواد سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد متابولیسمی است.

دهنده وجود مکانیسم‌های متفاوت تنظیمی بیان ژن در هر اندام در گونه‌های مختلف است. در مطالعات گذشته میزان بیان پایه CYP1A در کبد بسیار بالاتر از سایر بافت‌ها گزارش شده است (Jonsson et al., 2007, 2010; Zanette et al., 2009; Gao et al., 2011). طبق نتایج به دست آمده در ماهی گل‌خورک، بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های دیگر نسبت به کبد درصد بالاتری را در مقایسه با سایر گونه‌های ماهیان نشان داد. به طوری که بیان پایه در کلیه ماهی گل‌خورک والتونی ۳۳ درصد بیان پایه کبد بود اما در ماهی *P. vivipara* میزان بیان پایه CYP1A کلیه و روده ۱۲ درصد بیان کبد (Dorrington et al., 2012)، در کیلی‌فیش بیان پایه کلیه ۲۵ درصد بیان کبد (Zanette et al., 2009) و در قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان پایه CYP1A در آبشش ۲۷ درصد بیان کبد (Jonsson et al., 2010) بود. در ماهی گورخری روده (با ۳۰ درصد بیان کبد) پس از کبد دارای بیشترین بیان و سایر بافت‌ها کمتر از یک درصد بیان کبد را داشتند (Jonsson et al., 2007) و در ماهی سه‌خاره بافت کلیه پس از کبد دارای ۲۰ درصد بیان بود و آبشش و مغز کمتر از ۴ درصد بیان کبد را داشتند (Gao et

al., 2007; Dorrington et al., 2012). بسیار پایین بود. روده از طریق مواد غذایی ارتباط مستقیم با زنبویوتیک دارد. به طور کلی میزان بیان ژن‌های CYP1 به عوامل محرک ژن‌ها و فعال بودن یک بافت بستگی دارد. به دلیل نمونه‌گیری در فصل زمستان و کم بودن فعالیت و تغذیه ماهی گل‌خورک، بافت روده فعالیت زیادی نداشت. بیان ژن‌های CYP1 در لایه اپیتلیوم روده و معده صورت می‌گیرد. این لایه بسیار کم ضخامت است و با توجه به این که نمونه روده که برای استخراج RNA استفاده شد دارای بافت‌های جانبی بود، بنابراین لایه اپیتلیوم در کل نمونه روده مخلوط و میزان پایین‌تری نسبت به واقعیت به دست آمد (Jonsson et al., 2007).

در برخی گونه‌های ماهیان و پستانداران ژن CYP1A حتی در بافت عضله و پوست بیان می‌شود (Yengi et al., 2003; Lee et al., 2005; Erdogan et al., 2011). در حالی که در برخی گونه‌های (*Gobiocypris rarus*) عدم بیان پایه ژن CYP1A گزارش شده است (Yuan et al., 2013). اما در گل‌خورک ماهیان بیان پایه ژن CYP1A در پوست قابل اندازه‌گیری است. این نتایج متضاد، نشان

نشان دهنده نقش فیزیولوژیکی متفاوت این آنزیم در اندام‌های مختلف و وجود تنظیم ژن وابسته به بافت در بیان ژن CYP1A است (Yuan et al., 2013). الگوی بیان پایه ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل‌خورد نشان دهنده شرایط اکوفیزیولوژیکی خاص این گونه است. بنابراین، می‌توان الگوی بیان ژن CYP1A در اندام‌های مختلف گل‌خورد والتونی را به عنوان یک نشانگر زیستی دقیق برای ارزیابی مواجهه با آلاینده‌های آلی به ویژه PAHها به کار برد.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران گرامی در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی پژوهشکده خلیج فارس به ویژه آقایان علی فخری و احمد فقیه به جهت همکاری در نمونه‌گیری تشکر و قدردانی می‌گردد.

(al., 2011). در منطقه نمونه‌برداری در جزیره شیف، مناطقی وجود دارد که دارای میزان بالایی از ترکیبات PAH است (Shirani et al., 2014) به همین دلیل نمونه‌های گل‌خورد صید شده از این مناطق در مواجهه با ترکیبات PAH بودند. بنابراین، بیان ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل‌خورد شرایط القا را داشت و میزان نسبی در سایر اندام‌ها نسبت به کبد افزایش یافت.

میزان بیان ژن CYP1A در هر اندام نشان دهنده میزان نقش هر یک از اندام‌ها در سم‌زدایی است. بنابراین کبد، آبشش و کلیه نقش اصلی را در متابولسیم مواد سمی در ماهی گل‌خورد والتونی دارند. نتایج نشان داد که همه اندام‌های مورد مطالعه ماهی گل‌خورد والتونی در سم‌زدایی نقش داشته، تمامی آن‌ها دارای مکانسیم دفاعی در مقابله با مواد سمی هستند. الگوی بیانی خاص هر گونه و میزان متفاوت بیان ژن CYP1A در اندام‌ها

منابع

- Abdoli A. 2000.** The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Iran. 378P.
- Agorreta A., San Mauro D., Schliewen U., Van Tassell J.L., Kovacic M., Zardoya R. and Ruber L. 2013.** Molecular phylogenetic of Gobioidae and phylogenetic placement of European gobies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3): 619–633.
- Ansari A.A., Trivedi S., Saggu S. and Rehman H. 2014.** Mudskipper: A biological indicator for environmental monitoring and assessment of coastal waters. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(6): 22–33.
- Brammell B.F., McClain J.S., Oris J.T., Price D.J., Birge W.J. and Elskus A.A. 2010.** CYP1A expression in caged rainbow trout discriminates among sites with various degrees of polychlorinated biphenyl contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3): 772–782.
- Campbell P.M. and Devlin R.H. 1996.** Expression of CYP1A1 in livers and gonads of *Pacific salmon*: Quantitation of mRNA levels by RT-PCR. *Aquatic Toxicology*, 34(1): 47–69.
- Dorrington T., Zanette J., Zacchi F.L., Stegeman J.J. and Bainy A.C.D. 2012.** Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1a, 1b and 1c genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquatic Toxicology*, 124–125: 106–113.
- Erdogan O., Ceyhan S.B., Ekinçi D. and Aksakal E. 2011.** Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. *Gene*, 484: 13–17.
- Gao K., Brandt I., Goldstone J.V. and Jonsson M.E. 2011.** Cytochrome P450 1a, 1b, and 1c Mrna induction patterns in three-spined stickleback exposed to a transient and a persistent inducer. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 154(1): 42–55.
- Jonsson M.E., Gao K., Olsson J.A., Goldstone J.V. and Brandt I. 2010.** Induction patterns of new Cyp1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 98(4): 311–321.
- Jonsson M.E., Orrego R., Woodin B.R., Goldstone J.V. and Stegeman J.J. 2007.** Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1a, 1b and 1c genes in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1): 29–41.
- Jung J.H., Kim M., Yim U.H., Ha S.Y., An J.G., Won J.H., Han**

- G.M., Kim N.S., Addison R.F. and Shim W.J. 2011.** Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year following the Hebei Spirit oil spill (Taean, Korea). *Marine Pollution Bulletin*, 62(8): 1859–1866.
- Lee Y.M., Williams T.D., Jung S.O. and Lee J.S. 2005.** cDNA cloning and expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 769–775.
- 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(4): 402–408.
- Murdy E.O. 1989.** A taxonomic revision and cladistic analysis of the *Oxudercinae gobies* (Gobiidae: Oxudercinae). *Records of the Australian Museum*, 11: 1–93.
- Oh S.M., Park K. and Chung K.H. 2006.** Combination of in vitro Bioassays encompassing different mechanisms to determine the endocrine-disrupting effects of river water. *Science of the Total Environment*, 354(2–3): 252–264.
- Rees C.B. and Li W. 2004.** Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquatic Toxicology*, 66(4): 357–368.
- Rees C.B., Wu H. and Li W. 2005.** Cloning of Cyp1a in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 246(1–4): 11–23.
- Shirani M., Mirvaghefi A., Farahmand H. and Abdollahi M. 2012.** Biomarker responses in mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) from the coastal areas of the Persian Gulf with oil pollution. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43: 705–713.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Thacker C.E. 2003.** Molecular phylogeny of the gobioid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(3): 354–368.
- Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. 2002.** Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. P: 2.3.1–2.3.22. In: Roberts R.J. (Ed.). *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Uno T., Ishizuka M. and Itakura T. 2012.** Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1): 1–13.
- Yengi L.G., Xiang Q., Pan J., Scatina J.A., Kao J., Ball S.E., Fruncillo R., Ferron G. and Roland Wolf C. 2003.** Quantitation of cytochrome

- P450 mRNA levels in human skin. *Analytical Biochemistry*, 316: 103–110.
- Yuan L., Lv B., Zha J., Wang Z., Wang W., Li W. and Zhu L. 2013.** New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo [a] pyrene. *Chemosphere*, 93: 209–216.
- Zanette J., Jenny M.J., Goldstone J.V., Woodin B.R., Watka L.A., Bairy A.C.D. and Stegeman J.J. 2009.** New cytochrome P450 1b1, 1c2 and 1d1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish Cyp1s to the Ahr agonist Pcb126. *Aquatic Toxicology*, 93(4): 234–243.
- Zapata-Perez O., Gold-Bouchot G., Ortega A., Lopez T., Albores A. 2002.** Effect of pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(4): 477–485.



CYP1A gene sequencing and Study of gene expression pattern in different tissues of mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) captured from natural habitat

Seyed Ahmad Ghasemi¹, Abdolali Movahedinia^{2*}, Negin Salamat²,
Bahram Kazemi³

Received: June 2016

Accepted: August 2016

Abstract

Cytochrome CYP1A is one of the main involved enzymes in the metabolism of the xenobiotic. Identifying the cytochrome P450 (CYP1A), responsible for the major metabolic pathways, can lead to understanding the metabolism pathway of organic materials and PAHs adaptation of sea fish. Results from cloning and identifying CYP1A gene in *Periophthalmus waltoni* showed CYP1A contained 1035 nucleotide from open reading frame sequenced. CYP1A basal gene expression was varied from 23, 22, 19, 17, 11, 11% for gill, kidney, heart, intestine, brain respectively. According to the results, liver organ showed the highest response of CYP1A gene expression like other fish species. But, the basic gene expression of CYP1A in other organs in comparison with liver organ was higher. Although basal expression pattern of genes depending on the species, high basal expression of gene CYP1A due to *P. waltoni* was exposure to PAH in natural conditions. Different CYP1A gene expression pattern in different organs showed ecophysiological condition of mudskipper. So, *P. waltoni* has the potential to be used as an exact biomarker for evaluation of organic pollutant of ecosystems especially PAHs.

Key words: *Cytochrome P450*, *Ecophysiology*, *Biomarker*, *Periophthalmus waltoni*.

1- Assistant Professor in Biotechnology Department, Persian Gulf Research Center, University of Persian Gulf, Boushehr, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Professor in Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: amovahedinia@yahoo.com