

## اثر استرس شوری در بیان ژن Na/KATPase در دو جمعیت مختلف آرتمیا Parthenogenetic Artemia و Artemia franciscana با تکنیک RT-PCR-DGGE



مهدی محمد زاده<sup>۱\*</sup>، کزال یوسفی<sup>۲</sup> و ابراهیم حسین نجدگرامی<sup>۱</sup>

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

### چکیده

آرتمیا یکی از انواع سخت‌پوستان است که شوری‌های بسیار بالا را تحمل می‌کند. به واسطه‌ی تغییرات اقلیمی و بالا رفتن شوری منابع آب‌های داخلی و تالاب‌ها و همچنین اهمیت آرتمیا به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم در امر پرورش و تغذیه لارو ماهی و میگو، درک مکانیسم‌های مولکولی فرایندهای زیستی در جمعیت‌های مختلف آرتمیا ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر باهدف تأثیر استرس شوری بر روی بیان ژن Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase در اگزون شماره ۷ دو جمعیت مختلف آرتمیا با استفاده از تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد. در این تحقیق ابتدا ۲ جمعیت از آرتمیاهای گونه *Artemia franciscana* و *Artemia Parthenogenetic* در شوری‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ گرم درلیتر پرورش داده شد. در انتهای دوره mRNA ژن Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase تهیه و پس از تولید cDNA، تصویر آن با استفاده از تکنیک DGGE بررسی و همچنین باندهای ایجادشده توالی‌یابی شدند. نتایج این بررسی نشان داد محصول تولیدشده از این ژن در *A. franciscana* هموزیگوت، درحالی‌که در *Artemia Parthenogenetic* هتروزیگوت که حاصل دو آلل است. همچنین در *Artemia Parthenogenetic* حاصل ترجمه پروتئینی که از دو آلل مختلف حاصل شده است. جالب اینکه براساس نتایج این مطالعه، هیچ تفاوتی در نمونه‌های موردبررسی در شوری‌های مختلف مشاهده نشده و ظاهراً تنها اختلاف موجود در ژنوم این جمعیت‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیا، استرس شوری، پمپ سدیم-پتاسیم، RT-PCR، تکنیک DGGE.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۶۷۰۷، پست الکترونیکی: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

### مقدمه

در میان جانوران پرسلولی، آرتمیا یکی از موجوداتی است که قادر به تحمل شرایط بسیار سخت محیطی از جمله شوری‌های بالا می‌باشد (۱۸ و ۳۲). این موجود زنده دارای اندام‌های تخصص‌یافته برای دفع نمک اضافی (پمپ سدیم-پتاسیم) از همولف ایزواسموتیک داخلی به محیط خارج می‌باشد (۲۲). محل قرارگیری پمپ‌های پروتئینی دفع نمک، در دوران لاروی و بلوغ دارای تفاوت‌هایی می‌باشد چنانچه محل قرارگیری این پمپ‌ها در دوران لاروی در غدد نمکی پشت گردن و در دوران بلوغ در بخش‌های خارجی پاهای ضمیمه‌ای، غدد ماکزیلاری

در سال‌های اخیر در بیشتر نقاط جهان، صنعت آبزی‌پروری بعنوان راهی جهت دسترسی سریع به پروتئین ارزان انتخاب شده است. با این‌حال از عمده مشکلات این صنعت تهیه غذای مناسب برای آبزیان از جمله ماهی و میگو می‌باشد (۶، ۱۱، ۱۳، ۴۸). پرورش آرتمیا و استفاده از آن با وجود داشتن متوسط ۵۵-۵۲ درصد پروتئین و ۱۵-۴ درصد چربی و برخی اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری و همچنین بدلیل داشتن برخی آنزیم‌های گوارشی در بدن خود، می‌تواند نقش در رونق صنعت آبزی‌پروری داشته باشد (۷، ۱۵ و ۳۸).

از عوامل محیطی، اهمیت بسیار زیادی پیدا کرده است. بررسی این عوامل ژنتیکی می‌تواند کمک بسیار زیادی در تعیین جمعیت‌های مقاوم به تنش‌های محیطی نماید. از روش‌های استفاده‌شده در این بررسی‌ها می‌توان از تکنیک RT-PCR-DGGE نام برد. این روش امروزه یکی از مهم‌ترین ابزارها در زمینه اکولوژی میکروبی محسوب می‌شود (۴۴ و ۴۹). همچنین این روش در متمایز کردن سویه‌های مختلف باکتریایی براساس تفاوت در توالی‌هایشان از یکدیگر (۱، ۱۶، ۲۶ و ۴۷)، شناخت و ردیابی جهش در بین ارگانیسم‌های با ارتباط نزدیک‌تر باهم و در بررسی اکوسیستم‌های پیچیده مانند دریاچه، رودخانه، دریا و خاک کاربرد دارد. نمونه‌ای از استفاده از روش DGGE برای یافتن پلی‌مورفیسم در آگزون ۱۰ گیرنده هورمون رشد توسط جی و همکاران (۱۹۹۹) انجام شده است (۳۱).

دریاچه ارومیه در ایران با مساحتی بالغ بر ۵۰۰۰ کیلومتر مربع، همیشه به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های طبیعی مناسب برای آرتمیا محسوب می‌شود (۱۴). از زیستگاه‌های طبیعی دیگر تولید آرتمیا می‌توان از دریاچه بزرگ نمک (Great Salt Lake) در آمریکا که بدون شک نقش حیاتی را در تأمین نیازهای جهانی سیست آرتمیا ایفا می‌کند، مثال زد (۳، ۹ و ۳۵). البته در چند سال گذشته به‌دلیل کاهش نزولات آسمانی در دریاچه ارومیه، میزان شوری آب این دریاچه افزایش چشمگیری پیدا کرده و به ۳۵۰ گرم برلیتر رسیده است (۴). شوری بالا باعث کاهش میزان تولید توده‌ی زنده و سیست آرتمیا به میزان بسیار قابل‌توجه شده است (۱۹ و ۳۲). به نظر می‌رسد متفاوت بودن ساختار ژن  $Na^+/K^+$  ATPase در جمعیت‌های دوجنسی و پارتنوژنز آرتمیا که ناشی از درجات مختلفی از پلی‌مورفیسم مولکولی می‌باشد، قادر می‌باشد فنوتیپ‌های مختلفی را برای رشد در شوری‌های مختلف ایجاد نماید. این مسئله بررسی ویژگی جمعیت‌های مختلف آرتمیا را از نظر نحوه مقابله با این شرایط از نظر مولکولی، ضروری ساخته است. مطالعه حاضر باهدف تأثیر استرس شوری بر روی بیان ژن

و لوله‌گوارش میانی قرارداد (۳۴). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است در نتیجه‌ی عملکرد این پروتئین در انتقال یون‌های  $Na^+$  و  $K^+$  از غشای پلاسمایی آرتمیا، فشار اسمزی داخل بدن آن همیشه در یک محدوده نرمال قرار دارد (۵، ۲۲، ۲۴ و ۳۴).

براساس مطالعات قبلی وجود پلی‌مورفیسم مولکولی در ژن کنترل‌کننده پمپ  $Na^+/K^+$  ATPase در توانایی جمعیت‌های متفاوت آرتمیا برای تحمل شوری‌های مختلف، به اثبات رسیده است (۱۰). براساس نتایج این مطالعات، اختلاف ژنتیکی قابل‌توجهی در ساختار یکی از آگزون‌های ژن  $Na^+/K^+$  ATPase بین تیپ‌های مختلف آرتمیا از جمله آرتمیای دوجنسی و پارتنوژنز وجود دارد. با این حال محصول پروتئینی مشابه حاصل می‌شود (۲۱ و ۴۰). نظر به اختلافات فنوتیپی و قدرت سازش جمعیت‌های مختلف آرتمیا برای رشد در شوری‌های مختلف، به نظر می‌رسد که بایستی اختلافات ساختاری در محصول این ژن در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا وجود داشته باشد. به بیان دیگر جهش در این ژن بایستی موجب تغییر پیرایش (Gene splicing frame shift) در این ژنوم باشد که سبب تغییر پروتئین حاصل از این ژن می‌شود. همچنین وجود جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی در آگزون شماره ۷ می‌تواند موجب تغییر ساختار پمپ سدیم-پتاسیم در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا شود. تغییر ناحیه‌ای در ساختار زیر واحد آلفا از ژن  $Na^+/K^+$  ATPase می‌تواند احتمالاً موجب تغییر کارایی این پمپ غشایی شود (۱۰).

در زمینه ژنتیک مولکولی و تکنیک‌های مربوط به آن، نظرات مختلفی ارائه شده است که به‌واسطه آن‌ها شناسایی جمعیت‌های نادر ژنتیکی فراهم گردیده است. هدف اصلی بسیاری از آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزبان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آن‌ها می‌باشد (۳۷). در دهه‌های اخیر بررسی نقش عوامل ژنتیکی در تأثیرپذیری جانداران

های ۱/۵ml منتقل و در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند تا سایر آنالیزها بر روی آن‌ها صورت گیرد (۱۷).

تکنیک RT-PCR-DGGE اصولاً برای کشف تغییرات پایه ای و شناسایی تغییرات تصادفی در ساختار DNA و آشکارسازی جهش‌ها است. فرآورده‌های PCR در این روش، در صورتی که دارای طول قطعات ژنومی بیشتری باشند پس از بررسی بر روی ژل آگارز تحت تأثیر آنزیم برش‌دهنده قرار می‌گیرند و برای جلوگیری از دناتوره شدن کامل قطعات دو رشته‌ای حاصل از زنجیره پلی‌مراز، از یک ناحیه حاوی بالاترین دمای ذوب مصنوعی به نام GC-clamp با ۳۰-۴۰ جفت‌باز استفاده می‌شود (۲۸). سپس قطعات کوچک در محدود ژنومی (۴۰۰-۱۰۰۰ bp) جهت مشاهده تغییرات احتمالی بر روی ژل دناتوره‌کننده پلی-آکریل‌امید با گرادیان حاصل از اوره و فورمامید در دمای ثابت (معمولاً ۶۰°C-۴۵) به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در ۴۵ ولت الکتروفورز می‌گردند (۲ و ۴۹). الکتروفورز DGGE تکنیکی است که براساس اختلاف در دناتوره شدن و جدایی قطعات حاصل از PCR با اندازه مشابه در شیب اوره - فورمامید استوار است (۱۲، ۲۳، ۴۱، و ۴۲). در این بررسی، برای استخراج RNA از بافت نمونه‌ها، از کیت مخصوص استخراج RNA (سیناکلون، ایران) استفاده شد. مواد مورد نیاز جهت فراگمنت مورد نظر (اگزون شماره ۷ ژن  $Na^+/K^+ATPase$ ) شامل ۳/۸ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱/۸ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۸ میکرولیتر dNTPs، ۰/۲ میکرولیتر Taq پلی‌مراز و ۰/۲ میکرولیتر از پرایمرهای ex7(1) و de-R بودند که در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری باهم مخلوط شدند و سپس به تعداد نمونه‌ها در میکروتیوب‌های کوچک مخصوص PCR تقسیم شدند. سپس آن‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و براساس پروتکل دمایی (۱۰) cDNA ساخته شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مرحله دارای توالی نوکلئوتیدی به شرح زیر بودند:

$Na^+/K^+ATPase$  با استفاده از اگزون شماره ۷ توسط تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد.

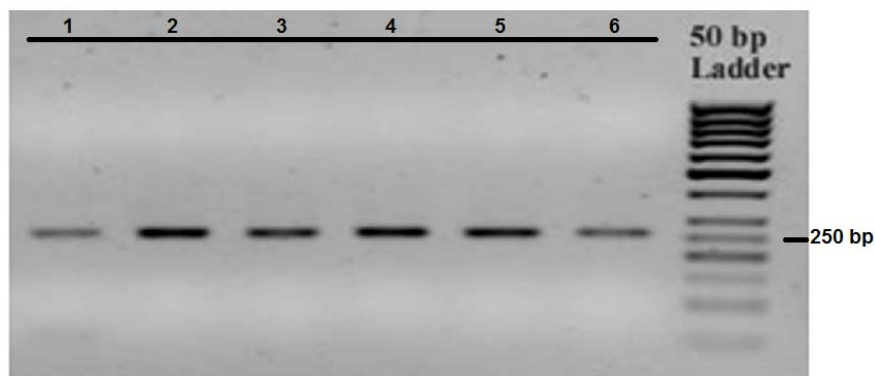
## مواد و روشها

سیست‌های آرتمیای مورد استفاده در این بررسی از بانک سیست پژوهشکده آرتمیا دانشگاه ارومیه تهیه شدند. این سیست‌ها شامل سیست‌های آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia fransiscana*) و آرتمیای پارتنوژنتیک دریاچه ارومیه (*Parthenogenetic Artemia*) بودند. سیست‌های هر دو جمعیت تحت شرایط یکسان (آب دریای ۳۵ ppt فیلتر شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور و هوادهی به حد کافی) در ظروف فالکون مخروطی براساس پروتکل استاندارد تخم‌گشایی گردید (۲۰). این بررسی در ۳ تیمار شوری (۱۲۰، ۱۸۰، ۶۰ گرم در لیتر) و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. از هر جمعیت آرتمیا تعداد ۵۰۰ عدد لارو اینستار یک شمارش شده و به داخل ظروف استوانه‌ای مخصوص حاوی ۱ لیتر (به ازای هر آرتمیا دو میلی‌لیتر آب) منتقل گردید. دمای پرورش  $26 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و هوادهی از ته ظرف مخروطی با کمک پیپت انجام شد. براساس نتایج کارهای آقای کاتیو و همکاران (۱۹۹۲) غذای مورد استفاده در پرورش آرتمیا، ترکیبی از جلبک *Dunaliella salina* با غلظت  $1.8 \times 10^6$  Cells/ml و مخمر فرموله شده lansy Pz با غلظت ۱g در ۱۵۰ml سرم فیزیولوژیک ۹٪ بود (۲۵). شوری ظروف پرورش، هر روز یکبار توسط شوری‌سنج اندازه‌گیری می‌شد و در صورت افزایش یا کاهش شوری، به ترتیب با اضافه کردن آب مقطر یا آب دریا، شوری آب تنظیم می‌شد. تراکم آرتمیا در روز ۸ به یک آرتمیا در سه میلی‌لیتر آب و در روز ۱۴ به یک آرتمیا در چهار میلی‌لیتر آب کاهش داده شد. در روز ۱۷ پرورش، آرتمیاهای هر تیمار به‌طور جداگانه توسط فیلتر ۴۰۰ میکرومتری جدا شده و توسط آب شیر و آب مقطر استریل به‌منظور برداشت نمک و مواد اضافی کاملاً شستشو شدند و به میکروتیوب-

در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای ۵۷°C الکتروفورز شدند. بعد از اتمام زمان الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ-آمیزی شد و سپس زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت (۴۱ و ۴۹).

### نتایج

نتایج الکتروفورز تکثیر قطعه مورد نظر بوسیله پرایمرهای اختصاصی نشان داد که در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، یک قطعه حدوداً ۲۸۰ جفت بازی بصورت کامل تکثیر یافته است. شکل ۱ نشان‌دهنده این باند در تعدادی از نمونه‌ها در مقایسه با مارکر وزنی می‌باشد.



شکل ۱- باندهای بدست آمده از الکتروفورز نمونه با وزن ۲۸۰ bp

شد و هیچ اثری از اختلاف در محصول جهش یافت شده در این آگزون یافت نشد لذا با انجام Reverse transcriptase PCR محصول حاصل از این ژن در الکتروفورز گرادپانت ژل دناتوره‌کننده مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی نشان داد که محصول تولید شده از این ژن در *A. franciscana* هموزیگوت بوده در حالی که در آرتمیای پارتنوژنتیک (*parthenogenetic Artemia*) هتروزیگوت و حاصل ترجمه پروتئینی با دو آلل مختلف می‌باشد. جالب اینکه هیچ تفاوتی در نمونه‌های مورد بررسی در شوری‌های مختلف مشاهده نشد و ظاهراً تنها اختلاف موجود در جمعیت آرتمیا می‌باشد (شکل ۴).

d-ER: 5'-ccg-ggg-ccc-gcg-ggc-ccc-cgg-gcc-ggg-ccc-ggg-gaa-ttc-agc-acg-act-gca-aa-<g>-3'

ex7(1): 5'-cag-cca-aac-gta-tgg-ctt-<c>-3'

بعد از اتمام سیکل‌های PCR، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها برای تأیید موفقیت PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر تریس/ بورات/ EDTA (TBE) حاوی ۴ میکرولیتر اتیدیوم بروماید، با استفاده از اشعه ماوراءبنفش (UV) و سیستم تصویربرداری Gel-documentation آزمایش شدند و بقیه آن برای استفاده‌های بعدی در دمای ۴°C قرار داده شدند. تکنیک DGGE براساس پروتکل (۳۹) انجام شد و شیب غلظتی مورد استفاده در ژل دناتوره‌کننده، ۵۰-۱۰٪ و ژل آکریل آمید ۹٪ تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۱۴ ساعت

قطعه آگزون ۷ از ژن Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase برای تعیین توالی به شرکت مورد نظر ارسال شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی گردید. شکل ۲ نشان‌دهنده توالی‌های مرتب‌شده در یک نمونه از هر جمعیت می‌باشد. این نتایج نشان داد که اختلافات بسیار کوچکی در ناحیه مورد نظر برای آگزون مورد بحث وجود دارد، با بررسی توالی نوکلئوتیدی آگزون شماره ۷ متعلق به *A. franciscana* تعیین توالی شده در این تحقیق و ترجمه اسیدهای آمینه آن (شکل ۳-الف) بررسی-ها نشان می‌دهد که در محصول نهایی هیچ تغییری مشاهده نمی‌شود (شکل ۳-ب)، با توجه به اینکه تنها اختلاف یافت شده در ناحیه مورد بررسی فقط در مولکول DNA یافت

بحث

نوسانات شوری دارند که باعث تولید سویه‌های مختلفی از آرتمیا شده است (۸، ۱۴، ۳۲ و ۵۰).

نتایج مطالعات دیگران نشان داده است برخی از جمعیت‌های آرتمیا دارای مقاومت بیشتری نسبت به

```

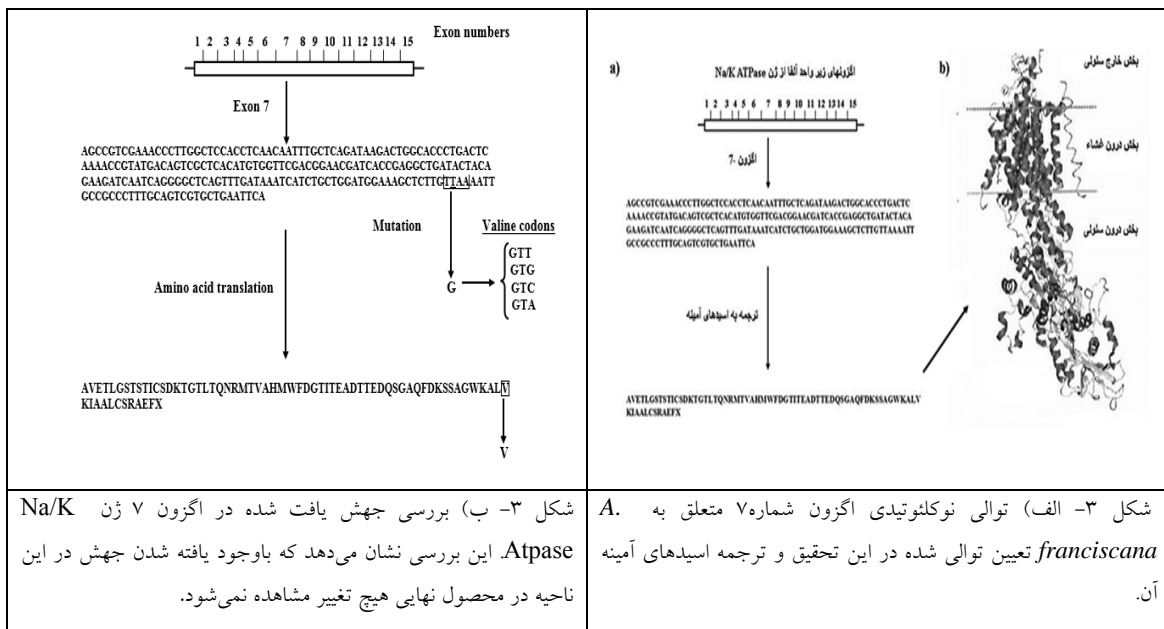
Parthenogenetic      AGCCGTCGAAACCCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC
60
A.franciscana        AGCCGTCGAAACCCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACTGGCACCCCTGAC
60
*****

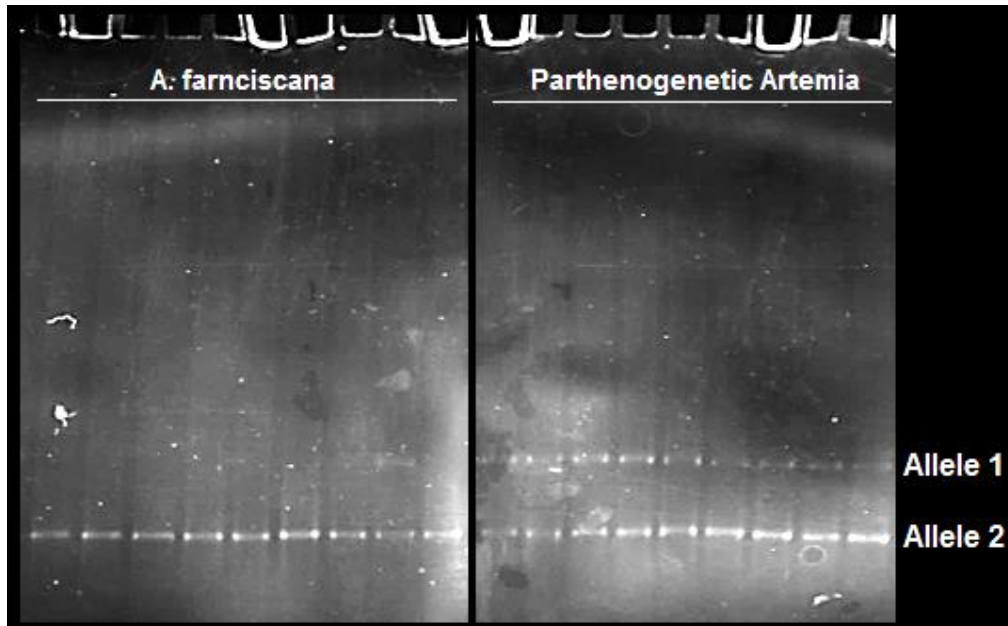
Parthenogenetic      AAAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 120
A.franciscana        TCAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGACGGAACGATCACCGAGGCTGATAC 120
*****

Parthenogenetic      TACTGAAGATCAGTCAGGGGCTCAGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTTGT 180
A.franciscana        TACAGAAGATCAATCAGGGGCTCAGTTTGATAAATCATCTGCTGGATGGAAAGCTCTTGT 180
***

Parthenogenetic      GAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGCTGTAATTCA 215
A.franciscana        TAAAATTGCCGCCCTTTGCAGTCGCTGTAATTCA 215
    
```

شکل ۲- سکانس مرتب شده توسط نرم‌افزار در ۲ جمعیت مختلف آرتمیا





شکل ۴ - ژل الکتروفورز DGGE در دو آرتمیای مورد مطالعه در شوری‌های مختلف

اندازه مناسب برای اهداف آبرزی‌پروری در عین حال مقاوم در برابر نوسانات محیطی باشد.

نتایج مطالعات بر روی ساختار مولکولی ژن  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase نشان داده است ژن‌های کدکننده زیرواحد  $\alpha 1$  از پمپ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase علائمی از وجود یک مکان پلی-مورفیک را در *A. franciscana* نشان داده‌اند و ایزوفرم  $\alpha 1$  این پمپ احتمالاً نقش کلیدی در سازگاری *A. franciscana* به شوری بازی می‌کند (۳۰). این تغییرات می‌تواند حاصل جهش‌هایی در بخش‌هایی از ساختار ژن کنترل‌کننده این پمپ در برخی از گونه‌های آرتمیا باشد. در توضیح توانایی جهش‌ها و یا تغییرات تک نوکلئوتیدی در تغییر ساختار سه‌بعدی و عملکرد پروتئین‌ها تاکنون تحقیقات زیادی انجام شده و جهش‌های تک نوکلئوتیدی مسئول صدها ناهنجاری همچون بیماری داسی شکل گلبول‌های انسان تشخیص داده شده است (۳۳ و ۴۶). لذا وجود چنین جهش‌های تک نوکلئوتیدی در آگرون شماره ۷ در آرتمیا هم می‌تواند موجب تغییر ساختار پمپ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase در بین جمعیت‌های مختلف آن باشد که جایی در ساختار زیرواحد  $\alpha 1$  از این ژن موجب تغییر شده

تحمل این شرایط مدیون پمپ پروتئینی بسیار مهمی به نام  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase می‌باشد که از نظر کارایی در آرتمیا در منحصربه‌فرد می‌باشد (۳۴). اهمیت این پمپ در آرتمیا در تحمل محیط‌هایی با فشار اسمزی بالا، در نتیجه عملکرد این پروتئین در انتقال  $\text{Na}^+$  و  $\text{K}^+$  از غشای پلاسمایی به اثبات رسیده است (۲۲ و ۲۴). بررسی‌های برخی محققان، نشان داده است بخشی از سازگاری با تنش‌های شوری می‌تواند به ساختار مولکولی ژن کنترل‌کننده  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ارتباط داده شود که در اغلب موجودات با ساختار متفاوتی وجود دارد (۳۴ و ۳۶). نتایج بررسی این ژن و ژن‌هایی مانند آن می‌تواند از دو دیدگاه مهم باشد: دیدگاه اول بررسی مکانیسم و کارکرد ژنتیکی پمپ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase که از نقطه نظر افزایش دانش در حوزه علوم پایه دارای اهمیت زیادی می‌باشد و دیدگاه دوم بررسی مقاومت دو گونه مهم آرتمیا در برابر شوری و ارتباط آن با بحث‌های ژنتیکی می‌باشد که دیدگاه اخیر در نهایت می‌تواند با بررسی‌های بیشتر و همچنین مهندسی ژنتیک منجر به تولید آرتمیاهایی باشد که دارای

مختلف دنیا برای پیدا نمودن اختلافات مولکولی در این ناحیه مورد مطالعه قرارگرفت (۴۰). در این تحقیق روش Chelex برای استخراج DNA از سیست (۲۷) و روش SDS-کلروفرم برای استخراج DNA از افراد بالغ مورد استفاده قرارگرفت (۴۵). آگزون شماره ۷ این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس آرتمیا تکثیر یافت. برش آنزیمی قطعه ۲۸۰ جفت بازی بوسیله ۸ آنزیم برش آندونوکلاز نتوانست هیچ تفاوت مولکولی در این آگزون را نمایش دهد. استفاده از روش DGGE برای تفکیک محصول PCR بر روی ژل دنا توره‌کننده نشان داد که این آگزون به شدت در بین گونه‌های آرتمیا پلی‌مورفیسیم دارد که قبلاً توسط تکنیک RFLP شناسایی نشده بود (۱۰).

به‌رحال روش RT-PCR روش پیشرفته و دقیقی می‌باشد که به‌عنوان یک روش Semi quantitative جهت ارزیابی Up regulation یک ژن مورد توجه قرار گرفته است. با استفاده از این روش، بیان ژن در جنین‌های دیپوز A. franciscana (۴۳) و همچنین میزان بیان DNA متیل ترانسفراز ۲ در طول تمام مراحل رشد در این گونه تعیین شد (۲۹). در تحقیقی دیگر نیز میزان بیان ژن زیر واحد آلفا پروتئین کیناز فعال شونده با AMP (AMPK) در طول رشد و در پاسخ به استرس در A. franciscana توسط این روش صورت گرفت (۵۱).

و احتمالاً موجب کاهش یا افزایش کارایی این پمپ می‌شود. در این تحقیق تأثیر شوری‌های مختلف بر روی بیان ژن پمپ  $Na^+/K^+ATPase$  با استفاده از بررسی ناحیه آگزون شماره ۷ توسط تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد. نتایج نشان داد که اختلافاتی در ناحیه مورد بررسی وجود دارد که با نتایج تحقیقات قبلی همخوانی دارد و می‌تواند توجیه‌کننده توانایی متفاوت دو جمعیت آرتمیا مورد بررسی در این تحقیق در تحمل شوری‌های مختلف باشد.

در مرحله بعد برای بررسی بیشتر این اختلافات، با انجام Reverse transcriptase PCR محصول حاصل از این ژن، از طریق تکنیک PCR-DGGE مورد بررسی دقیق‌تر قرارگرفت. نتایج نشان داد محصول تولیدشده از این ژن در A. franciscana هموزیگوت بوده درحالی‌که در آرتمیای پارتنوژنز (parthenogenetic Artemia) هتروزیگوت و حاصل ترجمه، پروتئینی از دو آلل مختلف می‌باشد. نتایج PCR-DGGE توسط تعیین توالی و محاسبه فاصله ژنتیکی تنوع نوکلئوتیدی در آگزون ۷ بین جمعیت‌های مدنظر در این بررسی، این فرضیه را مطرح نمود که احتمالاً این آگزون دارای نقش بسیار مهمی در ساختار پمپ  $Na^+/K^+ATPase$  می‌باشد که در طی روند تکاملی آرتمیا و تولید سویه‌های دوجنسی و پارتنوژنز نقش دارد (۱۰). پیش‌از این به‌قصد جستجو مارکرهای مولکولی مناسب، به‌طور کلی ۷۳۰ نمونه از ۲۳ جمعیت آرتمیا از نواحی

## منابع

- ۱- اکبری، ع.، قرنچیک، ش.، کوباز، پ.، کریمی، ا.، و صادقی، ۱۳۹۵. ا. بررسی تأثیر متقابل استرپتومایسس‌های تولیدکننده اکوتین‌ها و گندم در شرایط تنش شوری، مجله زیست‌فناوری گیاهان زراعی، شماره ۱۳، صفحات ۶۸-۵۷.
- ۲- توکلی، آ.، ۱۳۹۶. PCR- DGGE: روشی نوین در دنیای میکروبیولوژی، مجله بیولوژی کاربردی، دوره ۷، شماره ۳، صفحات ۱۵-۹.
- ۳- درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۹۰. گزارش لیمنولوژی و پالئولیمنولوژی دریاچه ارومیه، فاز: IV هیدرژئوشیمی دریاچه ارومیه، سازمان زمین‌شناسی کشور، ۸۰ صفحه.
- ۴- صالحی‌پور، م. ع.، محمدی، ع.، و درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۸۹. مدل‌سازی فضایی و زمانی نوسانات دریاچه ارومیه با استفاده از داده‌های ماهواره‌ای، چهاردهمین همایش انجمن زمین‌شناسی ایران و بیست و هشتمین گردهمائی علوم زمین، ارومیه.

- تولیدمثلی سه جمعیت از آرتمیای ایران، مجله علوم دانشگاه تهران، جلد ۲۹، شماره ۲، صفحات ۳۱۶-۳۰۵.
- ۹- محمدی، ع.، لک، ر.، و درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۸۹. بررسی تاریخیچه رسوبگذاری هولوسن دریاچه ارومیه بر اساس مغزه‌های رسوبی تهیه‌شده از غرب دریاچه (جنوب بزرگراه شهید کلاتری)، چهاردهمین همایش انجمن زمین‌شناسی ایران و بیست و هشتمین گردهمائی علوم زمین، دانشگاه ارومیه.
- ۱۰- موسوی تومتری، گ.، مناف فر، ر.، و زارع، ص.، ۱۳۹۳. کاربرد تکنیک DGGE جهت بررسی تنوع ژن  $Na^+/K^+$  ATPase در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا، فصل‌نامه علمی- پژوهشی ژنتیک نوین، جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۴۱۸-۴۱۱.
- ۱۱- نجد گرامی، ا. ح.، عسگری، ث.، زارع، ص.، و مناف فر، ر.، ۱۳۹۵. تأثیر مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس بر پارامتر-های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در آرتمیا ارومیا (*Artemia urmiana*) و آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۹، شماره ۳، صفحات ۳۷۹-۳۶۹.
- ۵- صیاد بورانی، م.، ۱۳۹۲. بررسی قابلیت تحمل به آب دریا و فعالیت آنزیم  $Na/K$ -ATPase در طی مراحل مختلف رشد (پار و اسمولت) بچه ماهیان آزاد دریای خزر، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحات ۴۲۴-۴۱۴.
- ۶- عظیمی راد، م.، مشکینی، س.، احمدی‌فر، ن.، و حسینی فر، ح.، ۱۳۹۵. بررسی اثرات تغذیه با آرتمیای غنی‌شده با سین بیوتیک بر شاخص‌های رشد جمعیت میکروبی روده و مقاومت در برابر استرس ماهی آنجل، نشریه شیلات، شماره ۶۹، صفحات ۷۸-۷۷.
- ۷- کاظمی، ا.، آق، ن.، و مشکینی، س.، ۱۳۹۲. بررسی جایگزینی روغن‌های گیاهی به‌جای روغن ماهی برای غنی‌سازی ناپلی *Artemia urmiana* و اثرات آن بر بازماندگی و رشد لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۳، صفحات ۲۶۶-۲۵۵.
- ۸- لطفی، و.، آق، ن.، و سپهری، ح.، ۱۳۸۲. اثرات شوری‌های مختلف بر درصد ماندگاری، میزان رشد، طول عمر و صفات
- 12- Turaki, A., Bömer, M., Silva, G., and Kumar, P. L., 2017. PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm, *Viruses*, 9(7), 181 PP: 1-24.
- 13- Agh, N., Sorgeloos, P., Abatzopoulos, T., Razavi, R. S. M., and Lotfi, V.G., 2001. *Artemia* resources in Iran. International Workshop on *Artemia*, Urmia University, 12-15 May 2001, Urmia, Iran.
- 14- Agh, N., Van Stappen, G., Bossier, P., Sepehri, H., Lotfi, V., Razavi Rouhani, S. M., and Sorgeloos, P., 2008. Effects of Salinity on Survival, Growth, Reproductive and Life Span Characteristics of *Artemia* Populations from Urmia Lake and Neighboring Lagoons, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (2), PP: 164-172.
- 15- Ahmadi, M. R., Leibovitz, H., and Simpson, K. L., 1990. Nutrient composition of the Iranian brine shrimp (*Artemia urmiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95(2), PP: 225-228.
- 16- Alebouyeh, M., 2010. *Molecular methods in microbial typing and identification*, First ed, Iran: sarcheshme andishe tablgh, PP: 145-147.
- 17- Boone, E., and Baas-Becking, L. G. M., 1931. Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina* L, *Journal of General physiology*, 14(6), PP: 753-763.
- 18- Browne, R., 1992. Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction. Elsevier Science Publishers Ltd. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, PP: 232-237.
- 19- Chen, D. F., Lin, C., Wang, H. L., Zhang, L., Dai, L., Jia, S. N., Zhou, R., Li, R., Yang, J. S., Yang, F., S., Clegg, J., Nagasawa, H., and Yang, W. J., 2016. An La-related protein controls cell cycle arrest by nuclear retrograde transport of tRNAs during diapause formation in *Artemia*, *Bmc Biology*, 14: 16 PP: 1-13.
- 20- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Namita, R. N., and Murugan, V., 2006. Influence of selected Indian immune-stimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes, *Fish Shell fish Immunol*, 21, PP: 372-384.
- 21- Comeche, A., Martín-Villamil, M., Pico, Y., and Varó, I., 2017. Effect of methylparaben in



- Artemia franciscana*, Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 199, PP:98-105.
- 22- Conte, F. P., 1984. Structure and function of the crustacean larval salt gland, International Review of Cytology, 91, PP: 45-106.
- 23- Cornelissen, J. B., de Bree, F. M., van der Wal, F. J., Kooi, E. A., Koene, M. G., Bossers, A., Smid, B., Antonis, A. F., and Wisselink, H. J., 2017. Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases, BMC Veterinary Research, 8;13(1):97, PP: 1-12.
- 24- Cortas, N., Arnaout, M., Salon, J., and Edelman, I. S., 1989. Isoforms of Na/K-ATPase in *Artemia salina*: Tissue distribution and kinetic characterization. J. Membrane Biology, 108, PP:187-195.
- 25- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., and Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia, 234, PP: 25-32.
- 26- Dooms, S., Papakostas, S., Hoffman, S., Delbare, D., Dierckens, K., Triantafyllidis, A., Wolf, T. D., Vadstein, O. J., Abatzopoulos, T., Sorgeloos, P., and Bossier, P., 2007. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a tool for the characterisation of *Brachionus* sp. Strains, Aquaculture, 262, PP: 29-40.
- 27- Estoup, A., Largiader, C. R., Perrot, E., and Chourrout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, PP: 295-298.
- 28- Faruk Umar, A., Tahir, F., and Bede Agbo, E., 2017. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) Profile of Bacterial Community from Agricultural Soils in Bauchi, North-East Nigeria, *Advances in Microbiology*, 7, PP: 480-486.
- 29- Feng, C. Z., Zhu, X. J., Dai, Z. M., Liu, F. Q., Xiang, J. H., and Yang, W. J., 2007. Identification of a novel DNA methyltransferase 2 from the brine shrimp, *Artemia franciscana*, Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology, 147, PP: 191-198.
- 30- García-Sáez, A., Esclante, R., and Sastre, L., 2000. High DNA Sequence Variability at the  $\alpha$ 1 Na/K-ATPase Locus of *Artemia franciscana* (Brine Shrimp): Polymorphism in a Gene for Salt-Resistance in a salt-Resistant Organism, *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), PP: 235-250.
- 31- Ge, W., Davis, M. E., Hines, H. C., and Irvin, K. M., 2000. Rapid communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene, J ANIM SCI, 78, PP:2229-2230.
- 32- HangXiao, Z., QiBin, L., Jing, S., Fei, L., Gang, W., Jun, Y., and WeiWei, W., 2013. Mitochondrial genome sequences of *Artemia tibetiana* and *Artemia urmiana*: assessing molecular changes for high plateau adaptation, *Science China Life Science*, 5, PP: 440-452.
- 33- Hoj, S., Fredholm, M., Larsen, N. J., and Nielsen, V. H., 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle, *Animal Genetics*, 24, PP: 91-96.
- 34- Holliday, C. W., Roye, D. B., and Roer, R. D., 1990. Salinity-induced changes in branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*, *Journal of Experimental Biology*, 151, PP:279-296.
- 35- Kelts, K., and Shahrabi, M., 1986. Holocene sedimentology of hypersaline Lake Urmia, Northwestern Iran, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 54, PP: 105-130.
- 36- Lind, U. I., Alm Rosenblad, M., Wrangé, A. L., Sundell, K. S., Jonsson, P. R., André, C., Havenhand, J., and Blomberg, A., 2013. Molecular characterization of the  $\alpha$ -subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase from the euryhaline barnacle *Balanus improvisus* reveals multiple genes and differential expression of alternative splice variants, *PLoS One*, 8(10), e77069.
- 37- Lu, C. C., 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan, *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 18, PP:331-340.
- 38- MacDonald, G. H., 1980. The use of *Artemia* cysts as food by the flamingo (*Phoenicopterus ruber roseus*) and the shelduck (*Tadorna tadorna*). In: The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture (Eds G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers), Universa Press, Belgium, PP: 97-104.
- 39- Manaffar, R., 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium, 160 p.

- 40- Manaffar, R., Zare, S., Agh, N., Abdolazadeh, N., Soltanian, S., Sorgeloos, P., Bossier, P., and Van Stappen, G., 2011. SNP detection in Na/K ATPase gene  $\alpha 1$  subunit of bisexual and parthenogenetic *Artemia* strains by RFLP screening, *Journal of Molecular Ecology Recourse*, 11, PP: 211-214.
- 41- Myers, R. M., Maniatis, T., and Lerman, L. S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis, *Methods Enzymol*, 155, PP:501-527.
- 42- Bhakta, N. J., Lahiri, S., Bhuiyana, A. F., Rokunuzzaaman, M., Ohonishi, K., Iwasaki, K., and Jana, B. B., 2017. Profiling of heavy metal(loid)-resistant bacterial community structure by metagenomic-DNA fingerprinting using PCR – DGGE for monitoring and bioremediation of contaminated environment, *Energy, Ecology and Environment*, 2, PP:1-8.
- 43- Qiu, Z., Tsoi, S. C.M., and MacRae, T. H., 2007. Gene expression in diapause-destined embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*, *Mech Develop*, 124, PP: 856-867.
- 44- Rychlik, T., Szwengiel, A., Bednarek, M., Arcuri, E., Montet, E., Mayo, B., Nowak, J., and Czarnecki, Z., 2017. Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity, *Food Control*, 73, PP: 1074-1081.
- 45- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, PP: 260-280.
- 46- Sasabe, T., Furukawa, A., Matsushita, S., Higuchib, S., and Ishiuraa, S., 2007. Association analysis of the dopamine receptor D2 (DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients, *Neuroscience Letters*, 412, PP:139-142.
- 47- Sheu, S. J., Chen, H. C., Lin, C. K., Lin, W. H., Chiang, Y. C., Hwang, W. Z., and Tsen, H. Y., 2013. Development and application of tuf gene-based PCR and PCR-DGGE methods for the detection of 16 Bifidobacterium species, *Journal of Food and Drug Analysis*, 21, PP: 177-183.
- 48- Sorgeloos, P., Dhert, P., and Can dreva, P., 2001. Use of the shrimp, *Artemia SPP*, in marine fish larviculture, *Aquaculture*, 200, PP: 147-159.
- 49- Vanhoutte, T., Huys, G., and Cranenbrouck, S., 2005. Exploring microbial ecosystems with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), *BCCM NEWS*, PP: 2-4.
- 50- Yik Sung, Y., Pineda, C. H., Macrae, T. h., Sorgeloos, P., and Bossier, P., 2008. Exposure of gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae to abiotic stress promotes heat shock protein 70 synthesis and enhances resistance to pathogenic *Vibrio campbellii*, *Cell Stress and Chaperones*, 13, PP:59-66.
- 51- Zhu, X. J., Feng, C. Z., Dai, Z. M., Zhang, R. C., and Yang, W. J., 2007. AMPK alpha subunit gene characterization in *Artemia* and expression during development and in response to stress, *Stress*, 10, PP:53-63.

## Effect of salinity stress on the gene expression of Na/K ATPase on two *Artemia* populations (*Artemia franciscana* and Parthenogenetic *Artemia*) by RT-PCR-DGGE

Mohammadzadeh M., Yousefi K. and Najde gerami E.H.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

### Abstract

*Artemia* is One of types of crustacean that can withstand in very high salinity. Due to the climate changes and increasing the salinity of inland waters and importance of *Artemia* as a main food sources for crustacean and marine fish larvae as well, it is necessary to understand the molecular mechanisms of biological processes in different populations of *Artemia*. The current study, investigates the effects of salinity stress on Na<sup>+</sup>/ K ATPase gene expression in exon 7 of two *Artemia* population with using of RT-PCR-DGGE. Two different populations of *Artemia franciscana* and Parthenogenetic *Artemia* were reared at salinities 60, 120 and 180 mg/l. At the end of the experiment the mRNA of Na<sup>+</sup>/ K ATPase was provided and converted to cDNA. Subsequent DGGE and sequencing analyses revealed that the products of these genes in *A. franciscana* is homozygous while in Parthenogenetic *Artemia* is heterozygous which is produced by two alleles. Also it was found that in the Parthenogenetic *Artemia* protein translation and the production of two different alleles is obtained. Interestingly, no difference was observed in the samples studied and apparently the only difference can be related to genomic variation among these populations.

**Key words:** *Artemia*, salinity stress, sodium-potassium pump, RT-PCR, DGGE technique