

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های پولوژیک

بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های قدامی کلیه، کبد، پانکراس و طحال مولدین ماهی قره برون (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) با استفاده از روشی real time RT-PCR

• محمدرضا بیواره (نویسنده مسئول)

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاوس، گلستان، ایران

• حسنا قلی پور کنعانی

استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاوس، گلستان، ایران

• بلال صادقی

گروه بهداشت عمومی و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان ایران

• حجت‌الله جعفریان

دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاوس، گلستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۹-۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۱۲-۱۲

Email: mohamadrezabivareh@yahoo.com



چکیده

لیزوزیم‌ها از مهم‌ترین پروتئین‌های سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان به‌عنوان یک پپتید ضد باکتریایی بخصوص در برابر باکتری‌های گرم مثبت شناخته می‌شوند. با توجه به قابلیت انتقال این آنزیم از مولدین به نسل بعد و همچنین کسب پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک مولکولی در استفاده از روش‌های نوین در زمینه آنالیز mRNA با استفاده از روش Real Time PCR جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مختلف، مطالعه حاضر باهدف ارزیابی میزان بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های کبد، قدامی کلیه، پانکراس و طحال در ماهیان مولد قره برون (*Acipenser persicus*) با استفاده از روش مذکور مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌برداری از بافت‌های موردنظر در زمان تکثیر مصنوعی این‌گونه، پس از انجام عملیات تخم‌کشی، اسپرم‌گیری و کشتار از ۱۶ عدد ماهی مولد (هشت عدد ماهی نر، هشت عدد ماهی ماده) انجام شد. RNA کل استخراج و سنتز cDNA از بافت‌های تفکیک‌شده انجام شد. در ادامه بیان mRNA ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های مختلف با استفاده از تکنیک real time RT-PCR به‌وسیله ژن β -actin به‌عنوان کنترل داخلی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد ژن لیزوزیم نوع-C در تمام بافت‌های تحت بررسی بیان دارد و حداکثر تعداد نسخه‌های mRNA این ژن در بافت طحال و کمترین تعداد آن در بافت پانکراس مشاهده شد ($p < 0/01$). در مجموع، با توجه به نقش عوامل مختلف مانند جنسیت، سن، اندازه، فصل، دمای آب، pH، مسمومیت‌ها، عفونت‌ها و درجه عوامل استرس‌زا در میزان فعالیت و یا سطوح آنزیم لیزوزیم که در نهایت ممکن است باعث فعال شدن مستقیم رونویسی ژن لیزوزیم گردند و اهمیت ماهیان مولد خاوباری می‌توان بیان نمود که این ژن به‌خوبی می‌تواند به‌عنوان یک ژن مرجع به‌منظور پیش‌آگاهی، شناسایی و غربالگری ماهیان مولد بیمار و درمان آن‌ها و کنترل محیط‌زیست در این‌گونه مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، لیزوزیم نوع C، *Acipenser persicus* real time RT-PCR

- Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 161-170

Investigation of the expressions of the C-type Lysozyme gene in head kidney, liver, pancreas and spleen tissues in persian breeding sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) by using real time RT-PCR assays

By: Bivareh, M.R., (Corresponding Author) M.Sc. Student, Department of Fisheries and Forestry, Faculty of natural resource, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran. Gholipour Kanani, H., Assistant professor, Department of Fisheries and Forestry, Faculty of natural resource, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran. Sadeghi, B., Food Hygiene and Public Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman. and Jafarian, H., Associate professor, Department of Fisheries and Forestry, Faculty of natural resource, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran.

Email: mohamadrezabivareh@yahoo.com

Received: 2017-12-07 Accepted: 2018-03-03

Lysozymes are important proteins of the innate immune system for the defense against bacterial infection, especially gram-positive bacteria in fishes. According to the ability to transfer this gene from breeders to the next generation, as well as recent advantage-ground in molecular genetics on applying novel methods in the field of mRNA analysis using real time RT-PCR to measure the expression of the different genes, the present study was conducted to evaluate the expression of the C-type lysozyme gene in tissues of liver, head of kidney, pancreas and spleen in breeding of *Acipenser persicus*. For this purpose, tissue sampling was done after artificial breeding from 16 fish (8 males and 8 females). The tissues were transported to the laboratory in liquid nitrogen. Total RNA was isolated and cDNA synthesis was performed from resected tissues. The mRNA expression of the C-type Lysozyme gene in different tissues were detected by real time quantitative PCR with β -actin gene as an internal control. Expression of the c-type lysozyme gene was detected in all tested tissues. The maximum copy numbers of the mRNA expression of the C-type Lysozyme gene were detected in spleen tissue and the lowest expression of this enzyme was determined in the pancreas tissue ($p < 0.01$). Overall, considering the role of different factors such as sex, age, size, season, water temperature, pH, toxicants, infections and type of stressors in the lysozyme activity or level, which may have eventually caused the direct activation of transcription of lysozyme gene, as well as considering the importance of breeding of sturgeons, we could claim that this gene can well be used as a reference gene for the prognosis and screening of immune deficiency and control of their environment in *A. persicus*.

Key words: Gene expression, Lysozyme-C, real time RT-PCR, *Acipenser persicus*

ایمنی ذاتی ماهیان از قبیل لیزوزیم با توجه به خواص ضد میکروبی و نقش بسیار مهم این آنزیم به عنوان یکی از ژن‌های مسئول به خصوص در بحث انتقال ژن در طول دهه گذشته پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای داشته است. (۸). با در نظر گرفتن اهمیت آنزیم لیزوزیم در سیستم ایمنی ذاتی و توجه به قدرت و طیف گسترده فعالیت‌های لیتیکی این آنزیم (۱۲)، شناسایی ژن‌های کدگذاری شده آن و تنظیم آن توسط پاتوژن‌ها و یا افزایش‌دهنده‌های ایمنی به منظور بهبود استراتژی‌های مدیریت بیماری‌ها در بحث آبی‌پروری مهم است (۲). در همین ارتباط تا به امروز مطالعات متعددی نیز در این زمینه در گونه‌های مختلف آبزیان به انجام رسیده است که از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه داوتیجی و همکاران (۱۹۹۱) اشاره کرد که منجر به جداسازی نخستین ژن کدگذاری

مقدمه

کاهش چشمگیر ذخایر ماهیان خاویاری در حوزه دریای خزر، باعث شده تا سازمان شیلات به منظور بازسازی ذخایر سالانه میلیون‌ها قطعه از این گونه‌ها را در مراکز تکثیر شیلاتی به‌طور مصنوعی تکثیر و در دریا رهاسازی نماید (۲۳). به منظور موفقیت در انجام این کار و تولید لارو و بچه ماهان خاویاری باکیفیت، انجام تحقیقات مولکولی و ژنتیکی بر روی مکانیسم‌های رشد، تولیدمثل و ایمنی در مراحل مختلف زیست این ماهیان به خصوص مراحل ابتدایی امری ضروری به نظر می‌رسد؛ زیرا مراحل لاروی و اولیه در ماهیان بسیار حساس بوده و موفقیت در این مرحله می‌تواند تا حدود زیادی میزان بازماندگی را در شرایط اسارت افزایش دهد (۱). در همین ارتباط کشف ژن‌های مسئول در سیستم

۱۰۰۰ محاسبه گردید. چنانچه نسبت جذب بالاتر از ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

سنتز و بررسی cDNA

مرحله نسخه‌برداری معکوس و ساخت و تولید رشته اول cDNA از RNA کل با استفاده از کیت تجاری RevertAid M-MuLVReverse Transcriptase (دارای پرایمرهای رندوم هگزامر) ساخت شرکت سینا ژن (ایران) انجام شد. ترکیبات لازم برای سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰ μ l شامل ۱ μ g نمونه RNA تیمار شده با DNase I در 1 μ l oligo d (T) 18 (40 μ M) و 1 μ l dNTPs mix (10Mm) بود. در نهایت به هر میکروتیوب تا حدی Nuclease-free water اضافه شد تا به حجم نهایی ۱۰ μ l رسید. مخلوط حاصل در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انکوبه شد و سپس به مدت دو دقیقه روی یخ سرد قرار گرفت. بعد از گذشت دو دقیقه به آرامی اسپین شدند. در مخلوط cDNA حاوی:

2 μ l M-MuLV Buffe (10X)

0.5 μ l RNase Inhibitor RiboLock (U20)

0.5 μ l M-MuLV Reverse Transcriptase

و اضافه کردن Nuclease-free Water تا رسیدن به حجم ۱۰ μ l آماده شد. مقدار ۱۰ μ l از مخلوط سنتز cDNA به هر میکروتیوب اضافه شد و به آرامی برای مدت کوتاهی سانتریفیوژ گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه به منظور غیرفعال نمودن واکنش، هر میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس لوله‌های میکروتیوب برای مدت کوتاهی روی یخ سرد قرار داده شدند و محلول توسط سانتریفیوژ آرام میکروتیوب‌ها جمع‌آوری گردید. نمونه‌های cDNA سنتز شده تا زمان شروع آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بهینه‌سازی شرایط RT-PCR

کیفی برای تکثیر ژن

بعد از استخراج RNA و ارزیابی کیفی RNA استخراج شده به منظور نشان دادن این مسئله که آیا این سلول‌ها قادر به بیان ژن لیزوزیم نوع-C هستند یا خیر از روش RT-PCR کیفی به منظور انتخاب بهترین جفت آغازگر برای انجام واکنش RT-PCR real time تمامی جفت آغازگرهای طراحی شده برای ژن لیزوزیم نوع C (C-type 1، C-type 2 و C-type 3) و ژن‌های RPL6، β -actin و GAPDH به عنوان ژن‌های رفرنس برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن با واکنش RT-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱). آزمایش حاضر با استفاده از مستر میکس با حجم نهایی ۲۵ μ l شامل ۱۰ μ l بافر 10X، ۱/۵ μ l، ۰/۱۵ μ l آغازگر پسر، ۰/۱۵ μ l آغازگر پیشرو، ۲ μ l نمونه cDNA و ۰/۲ μ l آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سینا ژن، ایران) و ۱۱ μ l آب مقطر دو بار یونیزه انجام شد. پس از آماده‌سازی مخلوط حاصل جهت انجام RT-PCR وارد چرخه دما-زمان در دستگاه ترموسایکلر شد. برنامه دمایی دستگاه شامل ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشتگی به مدت ۳۰ ثانیه در

شده این آنزیم تحت عنوان لیزوزیم نوع C- از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد (۶). از آن زمان تاکنون ژن‌های کدگذاری شده این آنزیم در ۱۳ گونه از ماهیان مختلف در بانک‌های ژن گزارش شده است که بیشتر آن‌ها در طول دهه اخیر جداسازی شده‌اند که این موضوع نشان‌دهنده مورد توجه قرار گرفتن بحث لیزوزیم در سیستم ایمنی ماهیان است (۹). با توجه به موارد ذکر شده مطالعه حاضر باهدف بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C در چهار بافت قدامی کلیه، پانکراس، کبد و طحال مولدین ماهی قره برون (A. persicus) یا تاس ماهی ایرانی به عنوان یکی از گونه‌های باارزش نواحی جنوبی دریای خزر و بومی کشور ایران توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد و به صورت نسبی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این آزمایش به منظور بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C از تعداد ۱۶ قطعه ماهی مولد قره برون (۸ عدد ماهی ماده، ۸ عدد ماهی نر) به ظاهر سالم با میانگین وزنی (انحراف معیار \pm میانگین) (546/79g \pm 23680) استفاده شد. نمونه‌های مورد نظر شامل چهار بافت قدامی کلیه، پانکراس، کبد و طحال در اسفندماه سال ۱۳۹۲ و در زمان تکثیر مصنوعی این گونه و پس از انجام عملیات تخم‌کشی و اسپرم‌گیری در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید مرجانی (گلستان، ایران) تهیه شد. پس از تهیه نمونه‌ها بلافاصله آن‌ها را درون نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) قرار داده و به منظور استخراج RNA و بررسی بیان ژن مربوطه به آزمایشگاه مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک مولکولی منتقل شدند. نمونه‌ها پس از استخراج RNA تا زمان شروع آزمایشات مولکولی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی‌های ژنوتیپی

استخراج RNA

استخراج RNA کل از نمونه‌های تهیه شده با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (محصول شرکت STRATEC، آلمان) انجام شد. بلافاصله بعد از استخراج، به منظور حذف هرگونه آلودگی احتمالی DNA، از کیت DNase I (محصول شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) با اضافه کردن ۱۱ μ l بافر DNase I (۲U) به حدود ۱۰ μ g نمونه RNA مطابق با دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده در واکنشی با حجم ۱۵۰ μ l انجام شد. محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (مطابق با ادعای شرکت سازنده این شرایط واکنش تا ۲ میکروگرم از DNA ژنومی را حذف خواهد کرد). در مرحله بعد با اضافه کردن EDTA با غلظت نهایی ۵mM، به هر ویال، ویال‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیرفعال شدن DNase موجود قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها جهت سنتز cDNA به روی یخ منتقل شدند (نمونه‌های تهیه شده تا زمان شروع ساخت cDNA در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند). بعد از عملیات استخراج، غلظت RNA با استفاده از مقدار ۱/۵ μ g نمونه RNA و قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-

دست آمد. تولید آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت. در این آزمایش ژن β -actin در مقایسه با دو ژن مرجع دیگر به علت اینکه میزان تغییرات آن در دستگاه Real time PCR کم است با مقایسه تطبیقی توالی‌های متفاوت و BLAST کردن این ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI، به‌عنوان بهترین ژن مرجع برای انجام این آزمایش در نظر گرفته شد، که عدد ثبات آن در مطالعات پیشین در گونه قره برون معادل ۰/۱۲۹ تعیین شده است (۱) برای ژن مورد مطالعه نیز از پرایمرهای C-type ۳ استفاده شد. توالی، طول و شرایط آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱- خلاصه شده است.

انجام Real Time PCR

مواد مورد نیاز جهت انجام Real Time PCR با حجم نهایی $20 \mu\text{l}$ شامل $10 \mu\text{l}$ مستر میکس سایبر گرین (شرکت ABI، آمریکا)، $0.3 \mu\text{l}$ پرایمر، $2 \mu\text{l}$ نمونه cDNA و $7/7 \mu\text{l}$ آب مقطر دو بار یونیزه بود. تکثیر ژن‌های

دمای 94°C درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت 30 ثانیه در دمای 56°C درجه سانتی‌گراد و مرحله بازآرایی به مدت 30 ثانیه در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد بود.

طراحی پرایمر

جفت پرایمرهای متنوعی برای بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C در حذف‌های اتصالات آگزون - آگزون با تشخیص حذف DNA ژنومی با استفاده از بررسی توالی‌های سه ژن مرجع با پتانسیل‌های مختلف (β -actin، RPL6، GAPDH) به‌عنوان ژن‌های کنترل داخلی و ژن لیزوزیم نوع-C به‌عنوان ژن اصلی (C-type 1؛ C-type 2؛ C-type 3) بود که توالی آن‌ها مطابق با توالی‌های در دسترس در بانک‌های ژن و رعایت شرایط استاندارد و BLAST کردن در پایگاه‌های داده‌ای NCBI و RT Primer Data base جهت اتصال اختصاصی به ژن هدف بعد از حصول اطمینان از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها و ساختمان فضایی آن‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری Primer premier (۵.۷) به

جدول ۱- مشخصات توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در بررسی بیان لیزوزیم نوع-C در تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*)

ژن	توالی آغازگر (5' → 3')	طول قطعه	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
C-type 1	F: ACCACAGTCACCAACCATAACCGA R: CCCTAACGACACGTTTGCACAAT	۱۷۷pb	۶۳
C-type 2	F: GTGTAAGAGGGTTGTGAG R: AGATAGACGTGGAGGAGC	۱۵۰pb	۶۴
C-type 3	F: CAACTGACTACGGCATCTTC R: TCACTGACCGCTGCAACTGA	*۱۰۰pb	۶۳
RPL 6	F: GTGGTCAAACCTCCGCAAGA R: GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۱۴۹pb	۶۲
β -actin	F: AGACCTTCAACTCCTGCCATGT R: TGGATCTGGCTGGCAGAGATTTGA	*۲۰۰ pb	۶۲
GAPDH	F: GTCTACATGTTCAAGTATGACTC R: AGC GCC GGC ATC AAA GA	۷۷ pb	۶۲

*این جفت آغازگر برای انجام RT-PCR real time انتخاب گردید.

ترسیم منحنی ذوب

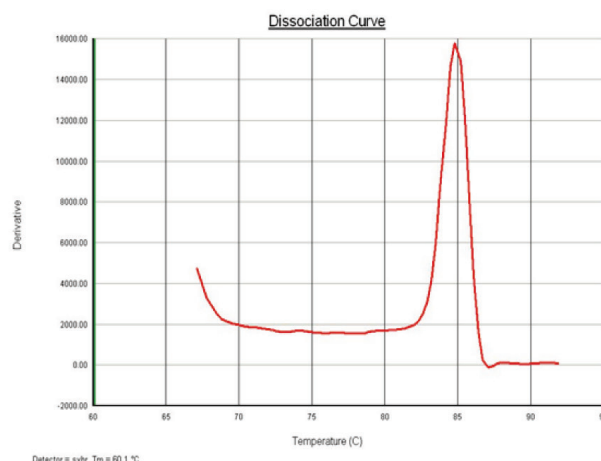
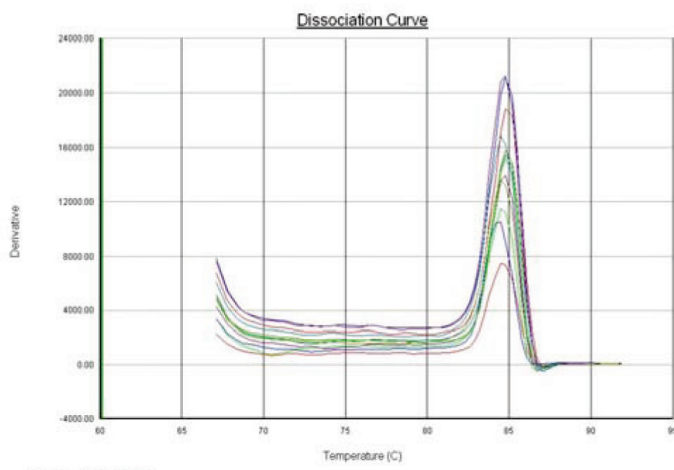
با توجه به خاصیت دستگاه (Applied Biosystems) ABI 7300 رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمان‌های مختلف در طیف حرارتی ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت بالاترین مقدار Rn و کمترین میزان CT ملاک انتخاب دمای بهینه اتصال آغازگرها بود. بر این اساس دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژن لیوزیم نوع 3 C-type و ژن رفرنس β -actin انتخاب شد. همچنین دمای Tm برای هر دو ژن نیز برابر ۸۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد؛ بنابراین قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب که در آن محور عمودی بر اساس سیگنال فلورسانس (محور Y) در مقابل درجه حرارت (محور X) قرار داشت برای ژن‌های موردنظر رسم شد. با بررسی این منحنی صحت پیک مربوط به ژن‌های موردنظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید گردید. همچنین طول زنجیره نیز به دلیل بالا بودن نقطه ذوب برای مطالعه بسیار مناسب تشخیص داده شد.

نتایج

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از طیف‌سنجی cDNA های تولیدشده نشان داد که cDNA ها از کمیت و کیفیت مناسبی برای انجام واکنش Real Time PCR برخوردار هستند. به سبب عدم اختصاصیت رنگ فلورسانس سایپرگرین، برای اطمینان از تولید قطعات اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه و دوتایی پرایمر در محصولات Real Time PCR منحنی ذوب رسم شد. همان‌طور که در شکل ۱- نیز مشاهده می‌شود، وجود پیک اضافی کوچک‌تر و قبل از پیک محصولات و همین‌طور وجود پیک اضافی بعد از پیک محصولات که نشان‌دهنده وجود پرایمر دایمر باشد در این نمودار مشاهده نمی‌شود. این موضوع نشان‌دهنده این مطلب است که آغازگرها تقابلی باهم

β -actin و لیوزیم نوع-C برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real Time PCR از طریق اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسانس در نتیجه اتصال رنگ سایپرگرین با استفاده از دستگاه (Applied Biosystems) ABI 7300 در سه تکرار برای تمام بافت‌های تحت بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت. برنامه دمایی در نظر گرفته شده برای دستگاه Real Time PCR برای تکثیر هر دو ژن C-type 3 به‌عنوان ژن اصلی و ژن β -actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی شامل: یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای برای فعال‌سازی اولیه آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌های دمایی شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر بود که در ۴۲ سیکل تکرار گردید. همراه با واکنش Real Time PCR منحنی ذوب نیز جهت تشخیص پرایمر دایمر و تشخیص تکثیر قطعه هدف رسم گردید.

پس از انجام واکنش تکثیر، داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج و تجزیه و تحلیل Ct ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. V.1.4) انجام شد. تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس به صورت ΔCt برای هر نمونه محاسبه شد. سپس برای هر مورد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد. در مرحله بعد نسبت اعداد حاصل به نرمال، بر اساس درصد محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از رویه تی دانشجویی توسط نرم‌افزار آماری (SPSS v21:۲۱) در سطح معنی‌داری ۱ درصد ($0/01 < p$) و ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Microsoft Excel ۲۰۱۳ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها نیز از تست چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.



شکل ۱- منحنی ذوب ترسیم شده از رقت‌های متوالی برای آغازگرهای β -actin (سمت چپ) و ژن لیوزیم نوع-C (سمت راست)

بحث

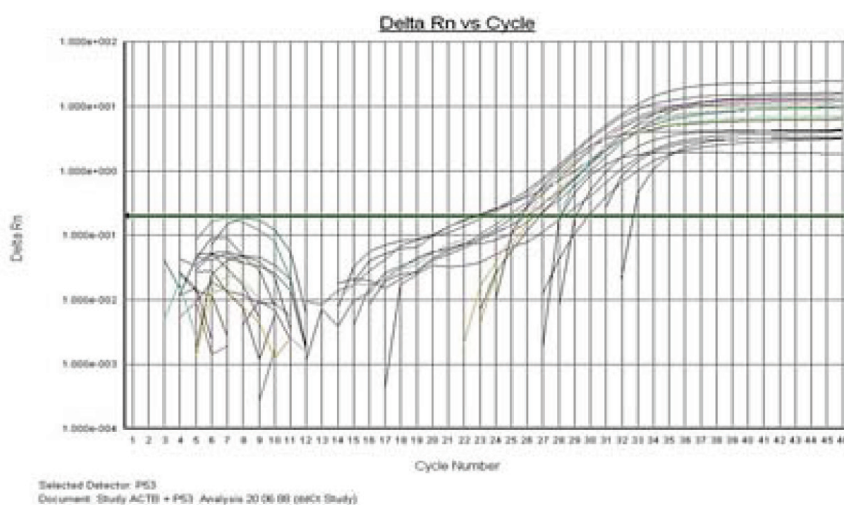
تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء جدایی ناپذیر مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده بشمار می رود (۳۴). در بیولوژی نوین، آنالیز صحیح بیان ژن، برای جستجوی رونشدهایی با سطح بیان پایین روزبه روز اهمیت بیشتری پیدا می کند. این رونشدها در مقادیر بسیار کم در زیست فناوری در تشخیص بیماریها کاربرد دارند (۳).

لیزوزیم به عنوان یکی از مولکولهای کلیدی سیستم ایمنی ذاتی با هیدرولیز پیوند N-استیل مورامیک اسید و N-استیل گلوکز آمین در لایه پپتیدوگلیکانی و تخریب دیواره سلولی در مقابل حمله پاتوژنهای باکتریایی (به ویژه باکتریهای گرم مثبت) در ماهیان فعالیت می کند و مانع از گسترش نفوذ باکتریها می شود (۲۵). با توجه به اینکه مکانیسمهای دفاع غیر اختصاصی در ماهیان پروسه های پیچیده کمتری را از لحاظ قابلیت های ایمنی اختصاصی نسبت به مهره داران رده های بالاتر دارند نقش این بخش از سیستم ایمنی و اجزاء تشکیل دهنده آن برجسته تر است (۲۹). این آنزیم به راحتی در نرم تنان و بی مهرگان، پستانداران، پرندگان، خزندگان و همچنین ماهیها و گیاهان و سایر جانوران بیان می شود (۱۴). بطوریکه مشخص شده است که در برخی از آنها دارای فرم مجزا و یا الگوهای بیانی بافت خاص نیز هستند (۱۶). به عنوان مثال طبق گزارشات ارائه شده این ژن در گاوها بیشترین میزان بیان را در بافت روده دارد. ضمن آنکه در بافت های معده، کلیه، دستگاه تنفسی و غدد پستانی نیز بیان می شود (۱۵). همچنین بیان این ژن در موشها نیز گزارش شده که عمدتاً در روده کوچک و به شکل های جزئی تر در چندین بافت دیگر بیان می شود (۵). در مورد ماهیان نیز بیان ژن لیزوزیم نوع-C برای مثال در ماهی کفشک *Paralichthys olivaceus* عمدتاً در بافت های قسمت قدامی و خلفی کلیه، طحال، مغز و تخمدان (۱۳)، در

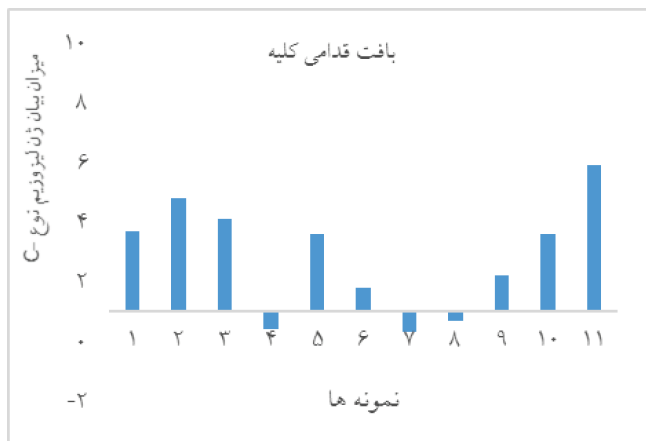
ندارند. همچنین در یک منحنی ذوب تکرارهای یک نمونه بایستی کاملاً بر روی هم قرار گیرند که این موضوع نیز در شکل به خوبی قابل مشاهده است. بنابراین با توجه به منحنی ذوب برای هر سه آغازگر مورد استفاده در این تحقیق می توان گفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به صورت کاملاً اختصاصی عمل کرده و یک نمونه منفرد از DNA را تکثیر کرده اند (شکل ۱).

پس از بهینه سازی دمای اتصال آغازگرها و بهینه سازی غلظت آغازگرها و سایر اجزاء واکنش نسبت به تکثیر قطعات اختصاصی ژن مورد نظر اقدام شد. بر این اساس همان طور که در منحنی تکثیر دیده می شود (شکل ۲) تکثیر ژن های لیزوزیم نوع-C و β -actin با استفاده از روش Real Time PCR به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچ گونه پارازیتی صورت گرفته است (شکل ۲). بطوریکه میزان فلورسانس ساطع شده با افزایش مقادیر محصولات طی چرخه های واکنش PCR افزایش یافته است. محور عمودی PCR چرخه های واکنش بر اساس شدت نور فلورسانس نشر شده از رنگ گزارش گر و محور افقی بر اساس تعداد چرخه های واکنش است (شکل ۲).

با مقایسه روش سیکل های آستانه ($\Delta\Delta CT$, Ratio = $2^{-\Delta\Delta CT}$) و استاندارد سازی آنالیزها مشخص شد که ژن لیزوزیم نوع-C در تمام بافت های تحت بررسی بیان دارد (شکل های ۳ تا ۶). همچنین معنی داری تفاوت بین $\Delta\Delta Ct$ نمونه ها با استفاده از رویه تی دانشجویی در سطح معنی داری یک درصد ($\alpha=0/01$) نشان داد که بالاترین میزان بیان این ژن در بافت طحال و کمترین میزان بیان آن در بافت پانکراس می باشد. این موضوع بدین معنی است که سطح mRNA لیزوزیم نوع-C در اندام طحال در مقایسه با سایر اندامها افزایش معنی داری داشته است ($p < 0/01$) (شکل ۷).



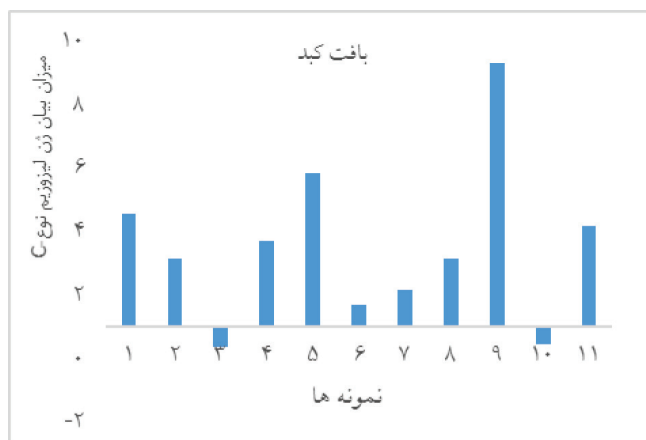
شکل ۲- منحنی های تکثیر ژن لیزوزیم نوع-C در رقت های متوالی در آزمایش Real Time PCR



شکل ۴- میزان بیان ژن لیروزیم نوع-C در بافت قدامی کلیه



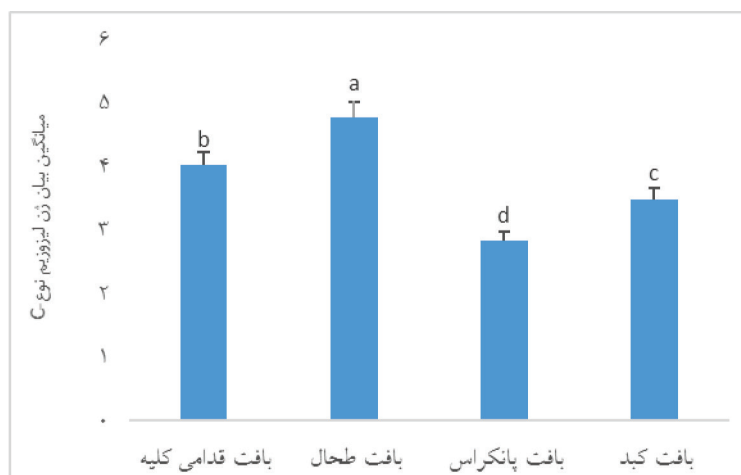
شکل ۳- میزان بیان ژن لیروزیم نوع-C در بافت پانکراس



شکل ۶- میزان بیان ژن لیروزیم نوع-C در بافت کبد



شکل ۵- میزان بیان ژن لیروزیم نوع-C در بافت طحال



شکل ۷- میانگین میزان بیان ژن لیروزیم نوع-C در بافت های تحت بررسی

ماهی آمور *Ctenopharyngodon idella* در بافت قدامی کلیه (۳۲) و در ماهی تیلایا در بافت کبد و ماهیچه (۱۱) گزارش شده است.

در طول سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی جهت توصیف ژن‌های وابسته به ایمنی ذاتی ماهیان تلئوست (۳۵) از قبیل کیموکاین (۲۴) پپتیدهای ضد میکروبی (۳۱) پذیرنده‌های پاتوژنی اختصاصی (۲۳) و دیگر ژن‌های وابسته به سیستم ایمنی ذاتی گونه‌های مختلف ماهیان انجام شده است. در همین راستا به جهت درک بیشتر نقش آنزیم لیزوزیم نوع-C در سیستم ایمنی ذاتی مطالعه حاضر باهدف تشخیص بیان mRNA ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های قدامی کلیه، کبد، طحال و پانکراس در ماهیان مولد قره برون (*A. persicus*) با تکنیک real time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان‌دهنده بیان این ژن در تمام بافت‌های تحت بررسی بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در بافت طحال شاهد بالاترین و در بافت پانکراس شاهد کمترین میزان بیان این ژن بودیم؛ که این نتایج مشابه با آنچه چیزی است که در مورد ماهی زبرا (*Daino riro*) (۱۹)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۶) و تیلایا (*Oreochromis aureus*) (۱۱) مشاهده شده است. با توجه به این‌که بافت طحال به‌عنوان یکی از اندام‌های مهم برای انجام عملکردهای ایمنی در ماهیان شناخته می‌شود، این نتایج نشان می‌دهد که ژن لیزوزیم نوع-C در این‌گونه نیز ممکن است نقش مهمی را در افزایش مقاومت در برابر بیماری و تهاجم عوامل بیماری‌زا در این‌گونه داشته باشد. در تائید این نتایج فو و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های مختلف (مغز، طحال، کلیه، آبشش، چشم، روده، ماهیچه، قلب و کبد) ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) گزارش دادند که این ژن در تمام بافت‌های تحت بررسی در این‌گونه بیان می‌شود و بیشترین میزان بیان نیز در بافت‌های طحال، کبد، روده و کلیه گزارش شد (۱۰). همچنین طبق تحقیق کایزو و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تجزیه و تحلیل عملکردهای آنزیم لیزوزیم نوع-C در میگوهای خانواده پنائیده مشخص شد که عدم وجود این آنزیم در میگوهای این خانواده باعث افزایش باکتری‌های بیماری‌زا در همولف و در نتیجه افزایش میزان مرگ‌ومیر در بین میگوهای این خانواده می‌گردد (۱۷). سکچینی و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی بیان ژن لیزوزیم نوع-C در مراحل مختلف زیست ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) شامل تخم بارور نشده، تخم بارور شده، لارو خارج شده در ۰ و ۱ ساعت پس از تخمه‌گشایی، لارو از یک تا هفت هفته پس از تخمه‌گشایی و نمونه‌های تهیه شده از ماهیان بالغ (بافت‌های عضله، تخمدان، قلب، مغز، آبشش، بیضه، کبد، روده، طحال، پوست، قدامی و خلفی کلیه و خون) گزارش دادند که بیان ژن لیزوزیم نوع-C از مرحله تخم‌های بارور شده به بعد (UEFs) در این‌گونه قابل‌شناسایی است. همچنین این محققین با توجه به یافته خود مبنی بر بیان ژن لیزوزیم نوع-C از مرحله UEFs به بعد پیشنهاد دادند که این موضوع ممکن است نشان‌دهنده همان چیزی باشد که از آن به‌عنوان سیستم ایمنی مادرانه یاد می‌شود (۴).

مشاهده میزان بیان بالاتر ژن لیزوزیم نوع-C در بافت طحال ماهیان مولد قره برون در مطالعه حاضر را می‌توان به عوامل محیطی مختلفی مانند دما، نور، کیفیت آب، شوری و القاء کنندگی‌های مختلف استرس و همچنین عوامل مختلف زیستی از قبیل جنسیت، سن و

اندازه ماهیان مولد و همچنین وجود مسمومیت‌ها و عوامل بیماری‌زا در محیط‌زیست ماهی نسبت داد. بطوریکه طبق تحقیقات انجام شده مشخص شده است که این عوامل باعث افزایش میزان فعالیت و یا سطوح لیزوزیم می‌گردند که این موضوع ممکن است در نهایت باعث فعال شدن مستقیم رونویسی ژن‌های لیزوزیم در بافت‌های مربوطه گردد. علاوه بر این میزان بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت طحال ماهی ممکن است تحت تأثیر افزایش مقدار لیزوزیم تولیدی توسط سلول‌ها از بافت‌های میلوئیدی در تقسیمات غیراختصاصی و تقسیم نوتروفیل‌ها نیز باشد (۲۰). ضمن اینکه فرض بر این است که این آنزیم در حمایت از هموستازی بدن و در طول آداپتاسیون با شرایط غیرمنتظره در طول تغییرات زیست‌محیطی نیز نقش دارد (۲۶). در همین ارتباط میکریاکوف و همکاران (۲۰۰۲) واکنش قوی بافت طحال را در پاسخ به سموم مختلف در بررسی غلظت‌های تحت کشنده برخی نمک‌های فلزات سنگین مانند جیوه، کادمیوم و مس بر روی مقادیر لیزوزیم در بافت‌های بچه ماهیان خاویاری (*A. baeri*) گزارش دادند (۲۱). بنابراین با توجه به موارد ذکر شده و نتایج به‌دست‌آمده در خصوص بررسی میزان بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت‌های قدامی کلیه، کبد، پانکراس و طحال در ماهیان مولد قره برون با استفاده از تکنیک Real time PCR کمی و مقایسه آن با دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه با توجه به بالاتر بودن میزان بیان ژن لیزوزیم نوع-C در بافت طحال در مقایسه با سایر بافت‌های تحت بررسی و اهمیت این بافت به‌عنوان یکی از اندام‌های مهم در ایمنی‌شناسی ماهیان به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان این‌چنین بیان داشت که احتمالاً ژن لیزوزیم نوع-C به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر و یک شاخص مولکولی کلیدی در سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان مولد قره برون (*A. persicus*) فعالیت دارد. همچنین با توجه به نقش این آنزیم در زیست‌شناسی بیمارها می‌توان از آن به‌عنوان یک ژن مرجع به‌منظور پیش‌آگاهی، شناسایی و غربالگری ماهیان مولد بیمار و درمان آن‌ها استفاده کرد. بطوریکه طبق تحقیقات انجام شده مشخص شده است که این آنزیم در تخم‌های لقاح یافته نیز وجود دارد و اعتقاد بر این است که نقش مهمی را در پیشگیری از انتقال عمودی پاتوژن‌های باکتریایی به جنین بر عهده دارد (۳۳). فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌عنوان یک نشانگر بیماری با استفاده از فرمول بیان RES (Reticulo-endohelial system) که یکی از اساسی‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر عفونت‌هاست انعکاس داده می‌شود (۱۸). در همین ارتباط یافته‌های حاصل از شواهد تجربی نیز مدارکی را مبنی بر توانایی لیزوزیم به‌عنوان یک شاخص مناسب برای مطالعه بر روی عملکرد ماکروفاژی ارائه کرده است (۷). با این وجود تا به امروز توجه چندانی به این نقش لیزوزیم در آبزیان نشده است. اما در سایر مطالعات انجام شده بر روی حیوانات اهلی در این زمینه تورستینس دوفیر و همکارانش (۱۹۹۹) گزارش دادند که لیزوزیم سرم خون می‌تواند به‌عنوان یک مارکر بالقوه برای تعیین میزان فعالیت مونوسیت/ ماکروفاژی در بیماری آرتریت روماتوئید فعالیت کند (۳۰). همچنین مشخص شده است که شیر گاو به‌طور طبیعی حاوی سطوح بسیار پایینی از لیزوزیم (در حدود ۰/۱۵ µg/ml) است؛ اما از مقایسه همین مقدار کم با شیرهای به‌دست‌آمده از گاوهای مبتلابه بیماری آماس پستان که محتوی غلظت‌های بالاتری از این آنزیم هستند (۱-۲۵ml/µg)

8- Fernandes, J.M.O., G.D. Kemp and V.J. Smith. 2004. Two novel muramidases from skin mucosa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 138(1): 53-64.

9- Fernandez-Trujillo, M.A., J. Porta, M. Manchado, J.J. Borrego, M.C. Alvarez and J. Bejar. 2008. c- Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish and Shellfish Immunology* 25(5): 697-700.

10- Fu, G.H., Z.Y. Bai, J.H. Xia, F. Liu, P. Liu and G.H. Yue. 2013. Analysis of Two Lysozyme Genes and Antimicrobial Functions of Their Recombinant Proteins in Asian Sea bass. *PLoS ONE* 8(11): e79743.

11- Gao, F.y., L. Qu, S.G. Yu, X. Ye, Y.Y. Tian, L.L. Zhang, J.J. Bai and M. Lu. 2012. Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. *Fish and Shellfish immunology* 32(5): 779-788.

12- Hew, C.L., G.L. Fletcher and P.L. Davies. 1995. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of tailoring the genome for food production. Journal of Fish Biology* 47(sA): 1-19.

13- Hikima, J., I. Hirono and T. Aoki. 1997. Characterization and expression of C-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6(4): 339-44.

14- Hikima, S., J. Hikima, J. Rojtinakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 316(16): 187-195.

15- Irwin, D.M., and Z. Gong. 2003. Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. *Journal of Molecular Evolution* 56(2): 234-242.

16- Jimenez-Cantizano, R.M., C. Infante, B. Martin-Antonio, M. Ponce, I. Hachero, J.I. Navas, and M. Manchado. 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill *Scophthalmus rhombus*. *Fish and Shellfish Immunology* 25(1-2): 57-65.

17- Kaizu, A., F.F. Fagutao, H. Kondo, T. Aoki and I. Hirono. 2011. Functional Analysis of C-type Lysozyme in Penaeid Shrimp. *The Journal of Biological Chemistry* 286(52): 44344-44349.

18- Lie, O. 1980. Genetic variation in the serum lysozyme activity in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica* 21: 448-450.

19- Liu, F., and Z. Wen. 2002. Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebra fish. *Mechanisms of Development* 113(1): 69-72.

20- Mikryakov V.R., T.B. Lapirova, M. Soltani, A.S. Mavrin, and

می‌توان فعالیت لیزوزیم شیر را به‌عنوان یک مارکر تشخیصی بالقوه در بیماری ورم پستان تحت بالینی گاوها مبتلابه این بیماری پیشنهاد داد (۲۷). همچنین سرا و همکاران (۲۰۰۲) نقش این پروتئین شیر را حتی به‌عنوان یک عامل پیش‌آگاهی دهنده در بیماران مبتلا به سرطان سینه در انسان نیز پیشنهاد دادند (۲۸). علاوه بر موارد ذکر شده عنوان شده است که این آنزیم برای تسکین تب رماتیسمی نیز کاربرد دارد و در برخی موارد، خواص ضد درد نیز برای آن گزارش شده است (۲۷). در مجموع با توجه به اینکه مطالعه حاضر به‌عنوان اولین مطالعه انجام شده در زمینه بررسی بیان ژن‌های لیزوزیم در بین گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری می‌باشد؛ بنابراین جهت ابراز نظر قطعی در زمینه پتانسیل این ژن‌ها بخصوص لیزوزیم نوع-C در سیستم ایمنی ماهیان خاویاری نیاز به انجام مطالعات بیشتر در خصوص بررسی عوامل مختلف محیطی، زیستی و تغذیه‌ای بخصوص مطالعات در معرض قرارگیری یک عامل عفونی در گونه تحت بررسی و سایر گونه‌های ماهیان خاویاری کاملاً احساس می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Akbarzadeh, A. 2011. Expression of the gene encoding the enzyme L-gulo in the early stages of growth and differentiation of Persian sturgeon. PHD Thesis. Department of Fisheries. Faculty of Natural Resources. University of Tehran. Iran (in Persian).

2- Bu, X., X. Du, W. Zhou, X. Zhao and J. Wang. 2008. Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Chinese Journal of Biotechnology* 24(5): 723-732.

3- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.

4- Cecchini, S., M. Paciolla, E. Biffali, M. Borra, M.V. Ursini and M.B. Lioi. 2013. Ontogenetic profile of innate immune related genes and their tissuespecific expression in brown trout (*Salmo trutta* (Linnaeus, 1758)). *Fish and Shellfish Immunology* 35(3): 988-992.

5- Cortopassi, G.A., and N. Arnheim. 1990. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Research* 18(23): 6927-6933.

6- Dautigny, A., E. M. Prager, D. Pham-Dinh, J. Jollès, F. Pakdel, B. Grinde and P. Jollès. 1991. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *Journal of Molecular Evolution* 32(2): 187-198.

7- Di Luzio, N.R. 1979. Lysozyme activity: An index of macrophage functional status. In *Lysozymes in biology and pathology* J.T. Dingle, P. J. Jacques and J.H., Shaw (eds). North Holland Publishing Company. Amsterdam. New York. Oxford: 447-462.

- G.A. Vinogradov. 2002. Influence of sublethal concentrations of some heavy metal salts (Hg, Cd and Cu) on the contents of lysozyme in tissues of sturgeon fingerlings (*Acipenser baeri*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22(1): 15-20.
- 21- Mikryakov, V.R., and T.B. Lapirova. 1997. Influence of salts of some heavy metals on picture of white blood cells of Siberian sturgeon fingerling (*Acipenser baeri*, Brandt). *Journal of Problems Ichthyology* 37(4): 538-542.
- 22- Nazari, R.M., M. Modanloo, M.R. Ghomi and M.R. Ovissipor. 2010. Application of synthetic hormone LHRH-A2 on the artificial propagation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Aquaculture international* 18 (5): 837-841.
- 23- Niu, D., E. Peatman, H. Liu, J. Lu, H. Kucuktas, S. Liu, F. Sun, H. Zhang, T. Feng, Z. Zhou, J. Terhune, G. Waldbieser, J. Li and Z. Liu. 2011. Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) genes in catfish play a novel role in innate immune responses. *Developmental and Comparative Immunology* 35(5): 568-579.
- 24- Peatman, E., and Z. Liu. 2007. Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics* 59(8): 613-623.
- 25- Rajabzadeh, E., F. Asadi, A. Jolodar, M.R. Seyfi, A. Shapouri, M. Soltani and M. Eslami. 2012. Molecular cloning and expression of g-type Lysozyme from the skin mucus of common Carp (*Cyprinus carpio*) and its lytic activity. *Advanced Studies in Biology* 4(9): 419- 435.
- 26- Rice, C. D. 2001. Fish immunotoxicology: understanding mechanisms of action. pp.96-138. In: D. Schlenk and W. H. Benson (ed.), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, vol. 2. Taylor & Francis, London: CRC Press.
- 27- Saurabh, S., and P.K. Sahoo. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system; *Aquaculture Research* 29223-239.
- 28- Serra, C., F. Vizoso, L. Alonso, J.C. Rodríguez, L.O. González, M. Fernández, M.L. Lamelas, L.M. Sánchez, J.L. García-Muñiz, J. Baltasar and A. Medrano. 2002. Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer. *Breast Cancer Research*, 4:16.
- 29- Soltani, M., and R. Pourgholam. 2007. Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *Journal of Veterinary Research University of Tehran bilingual* 62(2): 49-52.
- 30- Torsteinsdottir, I., L. Hakansson, R. Hallgren, B. Gudbjornsson, N.G. Arvidson and P. Venge. 1999. Serum lysozyme: a potential marker of monocyte/macrophage activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol* 38: 1249-1254.
- 31- Wang, Q., Y. Wang, P. Xu and Z. Liu. 2006. NK-lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis. *Molecular Immunology* 43(10): 1676-1686.
- 32- Wen, Y., and D.M. Irwin. 1999. Mosaic evolution of ruminant stomach lysozyme genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(3): 474-482.
- 33- Yousif, A., L. Albright and T. Evelyn. 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in Salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* 19: 15-19.
- 34- Yuan, J.S., A. Reed, F. Chen and C.N. Stewart. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 22(7): 85.
- 35- Zhou, Z., H. Liu, S. Liu, F. Sun, E. Peatman, H. Kucuktas, L. Kaltenboeck, T. Feng, H. Zhang, D. Niu, J. Lu, G. Waldbieser and Z. Liu. 2012. Alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): molecular characterization, mapping and expression analysis of factors Bf/C2 and Df. *Fish and Shellfish Immunology* 32(1): 186-195.

