

## بیان ژن کدکننده ویتلوژنین در کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت تأثیر پساب کارخانه‌های کاغذ

### ایران

- ❖ امیر آرامون: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ حمید فرحمنده: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ علیرضا میرواقفی: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ محمدعلی نعمت‌اللهی: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

### چکیده

در ایران سالانه حجم زیادی از پساب کارخانه‌های کاغذسازی وارد محیط می‌شود. عمده‌ترین پساب‌های این کارخانه‌ها مقدار زیادی الکل و اسید چرب و اسید رزین دارند. این مواد شبه استروژنیک ارزیابی می‌شوند و باعث عقیمی، تغییر جنسیت، زرده‌سازی قبل از موعد تکثیر، و اختلال در چرخه هورمون‌های ماهیان می‌شوند که محرک تولید ویتلوژنین‌اند. اخیراً ویتلوژنین بیومارکری کارآمد برای تشخیص استروژنیکی این پساب‌ها به حساب می‌آید. بنابراین در این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر پساب کارخانه کاغذسازی در بیان ژن ویتلوژنین کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. پس از تعیین  $LC_{50}$ ، دوزهای مورد استفاده آزمایش ۲۰۰ ppm و ۵۰۰ ppm (۰/۱) و ۰/۲۵  $LC_{50}$ ) از پساب کارخانه کاغذسازی مازندران و پارس اهواز برای تیمار در روزهای ۰ و ۶ و ۱۴ به دست آمد. برای ارزیابی بیان ژن ویتلوژنین، از ماهیان شاهد و در معرض پساب، نمونه‌گیری کبد در روزهای ۰ و ۶ و ۱۴ به عمل آمد. استخراج RNA برای ارزیابی کیفیت و کمیت RNA روی ژل آگاروز ۱٪ و نانودراپ ۱۰۰۰ از بافت کبد صورت گرفت. بعد از سنتز cDNA، نمونه‌ها برای ارزیابی میزان بیان ژن با دستگاه Real time PCR به روش سایبرگرین تجزیه و تحلیل شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش بیان ژن ویتلوژنین در دوز بالای پساب (۵۰۰ ppm)  $(0/25 LC_{50})$ ، در روزهای ۶ و ۱۴ در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). در حالی که در غلظت ۲۰۰ ppm  $(0/1 LC_{50})$  در روز ۶ اختلاف معنی‌دار بیان ژن ویتلوژنین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد و فقط پس از ۱۴ روز افزایش معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). به همین علت می‌تواند حاکی از آن باشد که بیان ژن ویتلوژنین بیومارکری کارآمد برای پساب‌های استروژنیک کارخانه‌های کاغذسازی ارزیابی شود.

**واژگان کلیدی:** آلودگی‌های استروژنیک، بیان ژن، پساب کارخانه‌های کاغذسازی، ویتلوژنین، *Oncorhynchus mykiss*.

## ۱. مقدمه

در چند دهه اخیر به علت توسعه بخش کشاورزی، صنعتی، و شهری استفاده از آب رودخانه‌ها برای کشاورزی همچنین آلودگی آب به انواع سموم کشاورزی و فاضلاب‌های شهری و صنعتی حیات آبریان به خصوص ماهیان را به شدت در معرض خطر قرار داده است. از بین آلودگی‌ها و پساب‌ها، آلودگی‌های نفتی، سموم DDT، و پساب کارخانه‌های کاغذسازی و داروسازی، به علت داشتن مواد استروژنیک الکلی و اسید چرب، استروژنیک ارزیابی می‌شوند (Jobling et al., 1998). به طور کلی، حدود ۳۵ درصد از مواد ورودی به کارخانه‌های خمیر و کاغذ به صورت پسماندهای مختلفی مانند ضایعات پوست‌کنی، انواع پسماندهای مختلف حاصل از فرآوری الیاف بازیافتی، لجن و پسماند سیستم تصفیه آب، و پساب و پسماندهای ناشی از جوهرزدایی الیاف بازیافتی جداسازی می‌شود (Scott and Smith, 1995). تولید سالانه انواع پسماند کارخانه چوب و کاغذ مازندران ۱۷۵۰۰ تن است (Hamzeh et al., 2011). به طور کلی، در کارخانه‌های کاغذسازی ایران میزان بسیاری کولش برنج و باگاس (چوب نیشکر) برای ساخت کاغذ استفاده می‌شود که پساب مورد مطالعه در این تحقیق است. این پساب‌ها به طور متوسط حدود ۴۰ درصد مواد معدنی و ۶۰ درصد ماده آلی دارند که گلوکز با نسبت حدوداً ۲۵ درصد بیشترین ماده آلی را به خود اختصاص می‌دهد و ۱۰ تا ۱۵ درصد لیگنین شامل الکل و اسیدهای چرب به صورت حل شده و حل نشده دارند. بیشترین میزان اسیدهای چرب استر متیل پالمیتیک و اولئیک

اسیدند (Rahmati et al., 2010). همچنین به علت استفاده نکردن از درختان سوزنی‌برگ برای تهیه کاغذ در این پساب‌ها رزین کمی وجود دارد. به طور کلی، این الکل‌ها و اسیدهای چرب به علت داشتن مواد شبه استروژن میمیک<sup>۱</sup> باعث تأثیر در فنوتیپ‌های ماهی از قبیل: تغییر جنسیت، عقیمی، بروز گندهای بین جنسی، بیان پروتئین‌های مخصوص جنسیت، و تأخیر یا تسریع بلوغ تولیدمثلی شده‌اند (Jobling et al., 1998). همچنین در مطالعه درباره قزل‌آلای رنگین‌کمان، chlordecone, nonylphenol, PCBs, lindane و Aroclor 1245، که می‌توانند در پساب کارخانه‌های کاغذسازی وجود داشته باشند همگی باعث القای زرده‌سازی در کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان شدند (Flouriot et al., 1995). این مواد مشتق شده از چوب مثل سیتوسترول در ماهی نر باعث توقف تولید استروئیدهای بیضه و کاهش ظرفیت تولیدمثلی می‌شوند (Maclatchy and Vanderkraak, 1995). ویتلوژنین ماده‌ای است در کبد ماهیان مولد که برای ساخت زرده و از طریق هورمون‌های استروئیدی گندها به خون می‌ریزد تا در تخم‌ها قرار گیرد. ژن ویتلوژنین در کبد هر دو جنس نر و ماده یافت می‌شود که با قرار گرفتن در معرض استروژن فعال می‌شود (Folmar et al., 1996). به همین علت، ویتلوژنین شاخص زیستی<sup>۲</sup> ایدئالی برای ترکیبات شبه استروژن در جانوران به شمار می‌رود (Jobling and Sumpter, 1995).

از طرف دیگر، انتظار می‌رود این پساب‌ها به دلیل بلوغ زودرس و تخم‌ریزی قبل از موعد باعث شوند

1. Estrogen mimic

2. Biomarker

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. ماهی

در این آزمایش برای بررسی بیان ژن ویتلوژنین تعداد ۱۳۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان نابالغ نر و ماده (جنسیت اهمیتی ندارد چون هر دو جنسیت ژن ویتلوژنین را در کبد دارند) با وزن  $10 \pm 135$  گرم استفاده شدند؛ ماهیان بعد از خریداری از کارگاه تکثیر و پرورش تجاری به کارگاه بیماری‌های آبزیان گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند و بعد از انتقال ماهیان، بیش از ۲ هفته صرف سازگاری آنها با محیط آزمایشگاهی شد. دمای آب  $15 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد بود و تغذیه نیز با استفاده از غذای کنستانتره تجاری (بیومار، ساخت شرکت فرانسه) و تراکم ۳۵ عدد در هشتصد لیتر صورت گرفت.

### ۲.۲. تعیین LC<sub>50</sub>

برای به‌دست‌آوردن دوز مواجهه ماهیان با پساب کارخانه‌های کاغذ مازندران و پارس اهواز (کولش برنج و باگاس)، LC<sub>50</sub> قبل از مواجهه ماهیان با پساب به دست آمد. برای تعیین LC<sub>50</sub> ماهیان به تانک‌های ۱۰۰ لیتری منتقل شدند (۱۰ عدد در هر تانک) و بعد از کاهش استرس با ۴ دوز ۲ و ۱ و ۰/۵ گرم بر لیتر تیمار شدند و یک تانک شاهد در نظر گرفته شد و تکرار این آزمایش نیز ۳ بار صورت گرفت. تعداد تلفات روزانه از هر تانک در نرم‌افزار Probit Analyses ۷۱.۵ قرار داده شد تا میزان LC<sub>50</sub> به دست آید.

### ۳.۲. نمونه‌گیری کبد

بعد از به‌دست‌آوردن LC<sub>50</sub> سه تیمار شاهد، ۲۰۰ و ۵۰۰ ppm (۰/۱ و ۰/۲۵ LC<sub>50</sub>) در نظر گرفته شدند و

ماهی موقع فصل تکثیر ذخیره زرده کمی داشته باشد و لارو با ذخیره زرده کم تولید کند و درصد تلفات لارو بالا رود؛ به طوری که مطالعات زیادی برای سنجش رفتار و تأثیرات استروژنی مواد با برخی از روش‌های مختلف شناسایی ویتلوژنین در پلاسما انجام شده است، از جمله این مطالعات رادیو ایمنی شناختی و سنجش Immuno sorbent از طریق روش Western blot، ELISA، Idler و Campbell هستند (Denslow et al., 1999؛ Mellanean et al., 1999). همچنین بعدها از طریق روش Northern blot بیان ژن ویتلوژنین به صورت غیر کمی اندازه‌گیری شد (Mellanean et al., 1999)، اما با پیشرفت در عرصه بیوتکنولوژی و ابداع روش‌های کمیت‌سنجی نسبی، سطوح نسبی بیان ژن هدف نسبت به سطوح بیان یک یا چند ژن کنترل داخلی سنجیده می‌شود که به آن ژن رفرنس می‌گویند. بیان ژن رفرنس را می‌توان به طور کلی هم‌زمان یا به طور جداگانه نسبت به ژن هدف سنجش کرد که در روش کمیت نسبی نیاز به ساخت استانداردهایی با غلظت مشخصی از cDNA نیست و برای محاسبه آن مدل و فرمول ریاضی ارائه شده است (Pfaffl, 2004). بنابراین در این تحقیق سعی بر آن بود که قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با دوزهای مختلف (۲۰۰ و ۵۰۰ جزء مواد و روش‌هاست) از پساب کارخانه‌های کاغذسازی مازندران و پارس اهواز (کولش برنج و باگاس)، برای میزان بیان ژن ویتلوژنین، به صورت نیمه کمی به منظور تشخیص تأثیرات شبه استروژنی این پساب‌ها به دست آید.

فاز بالایی خالی شد و برای شست‌وشو ویال‌ها با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد پر شد. سپس، در ۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. فاز بالایی دور ریخته شد و ویال‌ها در زیر هود قرار گرفتند و بعد به میزان ۴۰ میکرولیتر آب عاری از RNase به آن اضافه شد.

## ۵.۲. سنجش کمیت و کیفیت RNA و حذف

### DNA

بعد از عملیات استخراج، کمیت RNA برای همه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ بررسی شد و بعد از آن روی ژل آگاروز ۱٪ کیفیت RNA برای همه نمونه‌ها ارزیابی شد. در دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰، نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای ارزیابی خلوص RNA استفاده می‌شود. نسبتی از ۲/۰~ به طور کلی به عنوان «خالص» بودن برای RNA پذیرفته شده است. اگر نسبت خیلی پایین‌تر باشد، در هر دو مورد ممکن است حضور پروتئین، فنل یا سایر آلاینده‌ها را در نزدیکی ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر نشان دهد.

بلافاصله بعد از استخراج RNA، برای حذف آلودگی DNA از کیت Invitrogen (USA) با غلظت یک میکرولیتر DNase طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. بر این اساس، چهار میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر بافر DNase ۱۰x و یک میکرولیتر DNase (1U/μl) و چهار میکرولیتر آب عاری از RNase (DEPC- treatment Water) به ویال‌ها اضافه شد. سپس، در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. و بعد با اضافه کردن یک میکرولیتر ۰/۵ mM EDTA، DNase

قبل از نمونه‌گیری وسایل اتوکلاو شدند. ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به ظرف پودر گل میخک ۱g/l منتقل شدند و نمونه‌برداری از کبد به صورت استریل در روزهای ۰ و ۶ و ۱۴ انجام گرفت (این آزمایش ۳ بار تکرار شد و تراکم ۳۵ عدد در هزار لیتر بود) سپس، کبدها به تانک ازت منتقل شده و بعد برای استخراج RNA به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

## ۴.۲. استخراج RNA

برای استخراج RNA طبق پیشنهاد شرکت سازنده از کیت Biozol (USA) استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا همه وسایل اتوکلاو شدند و استخراج در اتاقک استریل RNA انجام شد. ۳ نمونه کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان به ازای هر تکرار در هاون له شدند و نمونه‌های خردشده کبد بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در ویال‌ها قرار داده شدند و ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول Biozol به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه Vortex شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد سپس، ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد و برای ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (مدل دستگاه Sigma 3-16K) شد. سپس، فاز بالایی به ویال‌های جدید انتقال داده شد و به مقدار حجم برابر ایزوپروپانول<sup>۱</sup> اضافه شد و به آرامی تکان داده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ انجام گرفت.

1. Isopropanol

مجدداً تأیید شد (جدول ۱). ژن  $\beta$  actin نیز به‌منزله ژن شاهد انتخاب و با توجه به آن دو آغازگر جلو و عقب طراحی شد (جدول ۱).

### ۲.۷.۲. Real time PCR

بیان ژن ویتلوژنین نیز با استفاده از دستگاه (ABI) Real time PCR و روش سایبرگرین در ۳ تکرار (تکرار تکنیکی در دستگاه) انجام شد. این عملیات به طور منفرد در میکروتیوپ‌ها انجام شد، که مخلوط PCR شامل: cDNA اشتقاق از دو میکرولیتر RNA master mix PCR 2x و (۳۰۰۰-۴۲۰۰ ng/ $\mu$ l) از هر پرایمر و محلول سایبرگرین Power sybr green (USA, ABI) رقیق شد. محلول Real time PCR به ازای هر واکنش در جدول ۲ آمده است.

شرایط PCR عبارت بود از: واسرشتی اولیه برای ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰ گردش در این دما در ۳۰ ثانیه انجام می‌شود و بعد با کاهش دما به ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و بعد برای ۴۰ ثانیه در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد و با ۴۰ گردش رنگ Sybr-green در محصول تجمع می‌یابد.

موجود غیر فعال شد. سپس، ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و برای سنتز cDNA دوباره به یخ منتقل شدند.

### ۶.۲. سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript cDNA synthesis I kit (USA, Bio-Rad) به طور خلاصه بر اساس پیشنهاد شرکت سازنده، چهار میکرولیتر iScript reaction mix و یک میکرولیتر آنزیم iScript reverse transcriptase و ۲۰ میکرولیتر آب عاری از Nuclease به ویال‌ها اضافه شد و به صورت پی‌درپی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، بعد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، و در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در بلاک‌های حرارتی<sup>۱</sup> قرار داده شد و در نهایت عمل ساخت cDNA از RNA صورت گرفت.

### ۷.۲. سنجش کمی بیان ژن ویتلوژنین

۱.۷.۲. طراحی آغازگر ژن هدف و رفرنس ( $\beta$  actin) طراحی آغازگر ژن ویتلوژنین قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از توالی (کد دسترسی<sup>۲</sup>: X92804.1) موجود در NCBI تجزیه و تحلیل شد؛ همچنین با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 (v 0.4.0) (Akbarzadeh, 2011)

جدول ۱. آغازگر پیشرو و پسرو ژن هدف (Vitellogenin) و ژن رفرنس ( $\beta$  actin) قزل‌آلای رنگین‌کمان

Tm (Temperature)	Reverse	Forward	Gene
78 <sup>0C</sup>	GCAGCTGGGACGAAAGG	CTTGTGAACCCTGAGATC	Vitellogenin
82 <sup>0C</sup>	TTCAACCCTGCCATGT	ACGGCCAGAGGCGTACAG	$\beta$ actin

1. Heat block
2. Accession number
3. Applied Biosystems

جدول ۲. محلول Real time PCR به ازای هر واکنش

ماده	مقدار مواد	غلظت مواد
پرایمر Forward	۱ μl	۱۰ pmol
پرایمر Reverse	۱ μl	۱۰ pmol
cDNA ژن هدف و رفرنس	۲ μl	W1/۱۰ cDNA
آب عاری از آنزیم نوکلئاز	۶ μl	-
محلول سایبرگرین	۱۰ μl	master mix ۲x

## ۸.۲. طرح آزمایش و روش آنالیز آماری

### ۸.۲.۱. نرمال سازی داده های خام

داده های حاصل از بیان ژن ویتلوژنین از نرم افزار Applied Biosystems ABI v 2.1 استخراج و به Excel 2010 و SPSS 16 برای نرمال سازی و تجزیه و تحلیل عملیات آماری انتقال داده شد. با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak, Schmittgen, 2001)، مقادیر بیان ژن به دست آمد، که در آن  $\Delta\Delta C_T$  برابر است با  $\Delta C_T$  ژن هدف منهای  $\Delta C_T$  کالیبراتور  $[\Delta C_T = (-\Delta C_T \text{ calibrator})]$  است با مقدار  $C_T$  ژن هدف منهای  $C_T$  منهای  $C_T$  ژن رفرنس  $[C_T = C_T \text{ target gene} - \text{refrence gene}]$  و  $\Delta C_T$  کالیبراتور برابر است با  $\Delta C_T$  ژن هدف هر نمونه منهای  $\Delta C_T$  نمونه کنترل (نمونه غیر تیمار) (Pfaffel, 2004).

## ۳. نتایج

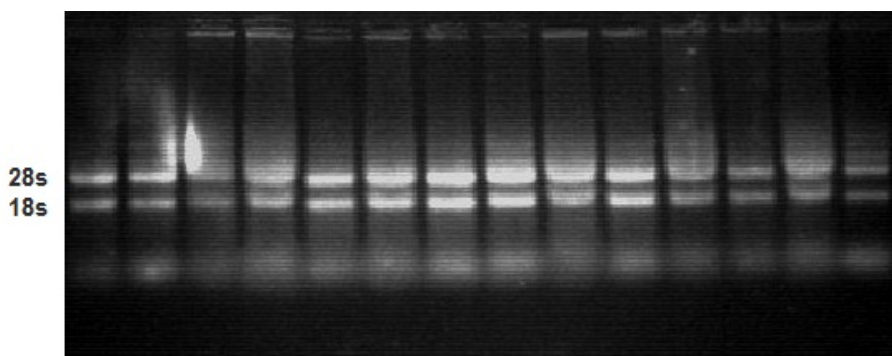
### ۳.۱. تعیین $LC_{50}$

میزان  $LC_{50}$  پساب کارخانه کاغذسازی برای قزل آلائی رنگین کمان با وزن  $135 \pm 10$  گرم به مدت ۹۶ ساعت  $2 \text{ g/l}$  به دست آمد.

### ۳.۲. بررسی میزان کمیت و کیفیت RNA

شکل ۱ کمیت و کیفیت RNA استحصالی کبد قزل آلائی رنگین کمان را از دستگاه های نانودراپ ۱۰۰۰ و ژل آگاروز ۱٪ نشان می دهد.

غلظت RNA در کل نمونه ها بین  $3000 \text{ ng}/\mu\text{l}$  تا  $4200$  به دست آمد. نسبت جذب  $260/280$  و  $260/230$  RNA بین  $1/7$  تا  $1/9$  بود (شکل ۱). همچنین کیفیت RNA روی ژل آگاروز ۱٪ و دو زیر واحد RNA ریبوزومی (28s و 18s) که شاخص کیفیت RNA است به خوبی مشاهده می شود.



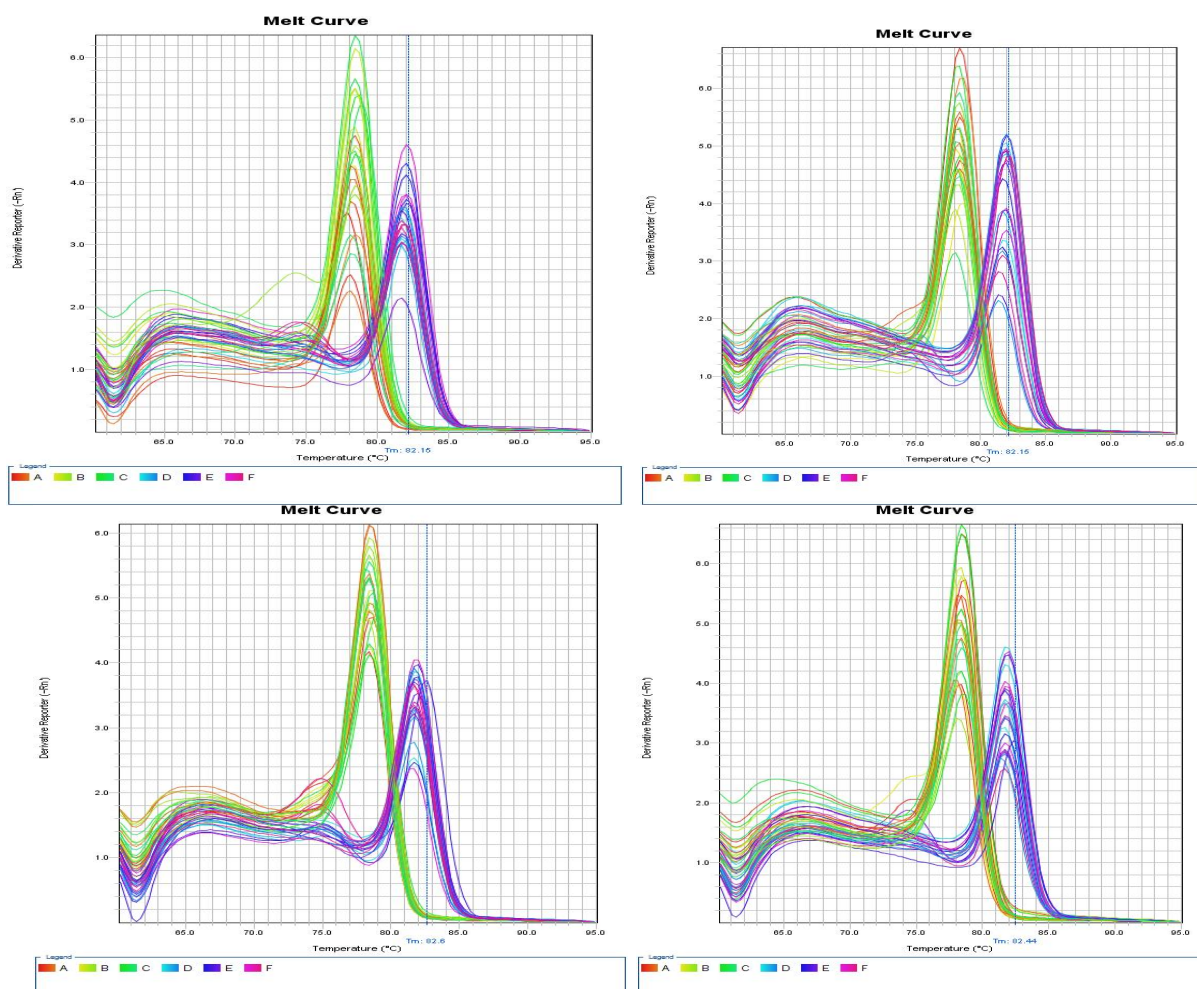
شکل ۱. کیفیت RNA استحصالی کبد قزل آلائی رنگین کمان روی ژل آگاروز ۱٪. دو زیر واحد RNA ریبوزومی (28s و 18s) که شاخص کیفیت RNA است به خوبی مشاهده می شود.

### ۳.۳. تعیین بهترین ژن رفرنس<sup>۱</sup>

در این آزمایش  $\beta$  actin به این علت که میزان تغییرات آن در دستگاه Real time PCR کم است، با مقایسه تطبیقی توالی‌های متفاوت و Blast کردن این ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI بهترین ژن رفرنس برای این آزمایش در نظر گرفته شد، که عدد ثابت آن در مطالعات پیشین اکبرزاده و همکاران در سال ۱۳۹۰ روی تاس ماهی ایرانی به دست آمد.

### ۴.۳. آنالیز منحنی ذوب (Melt curve)

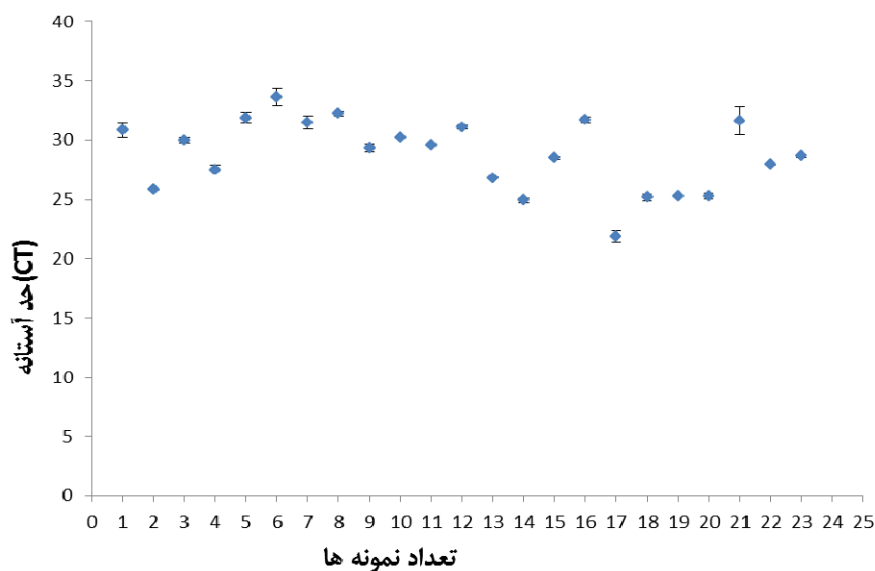
دمای ذوب cDNA پارامتری ویژه برای این مولکول است و به ساختمان cDNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتید، غلظت پروب، میزان نمک محیط، و درصد GC بستگی دارد. از آنجا که Sybr-green نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل شود، می‌توان با استفاده از Melt curve تنوع محصول را در فرایند PCR مشخص کرد. شکل نشان می‌دهد که نوکلئوتید غیر هدف و پرایمر دایمر وجود ندارد و طول زنجیره نیز به دلیل بالابودن نقطه ذوب برای مطالعه بسیار مناسب است.



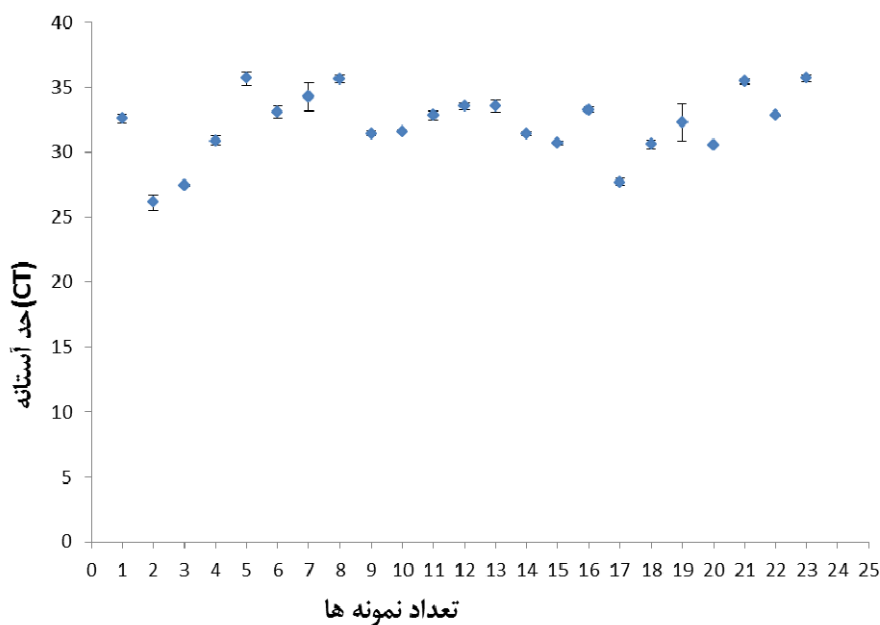
شکل ۲. منحنی ذوب Real time PCR برای همه نمونه‌ها که در آن سیگنال فلئورسانس (محور y) در مقابل درجه حرارت (محور x) رسم شده است. همه نمونه‌های زیستی با ژن رفرنس و ژن اصلی و با سه تکرار آزمایشی اندازه‌گیری شد. این شکل نشان می‌دهد که پیک اول، ژن هدف (ویتلوژنین) با دمای ذوب ۷۸ و پیک دوم، ژن رفرنس ( $\beta$  actin) با دمای ذوب ۸۲ است.

نمونه‌ها بسیار کم است؛ همچنین میانگین‌ها نیز از ۲۵ تا ۳۵ نوسان دارند که بالا بودن راندمان PCR را نشان می‌دهند.

**۵.۳. الگوی بیان ژن بر اساس میانگین و  $\pm SD$**   
 شکل‌های ۳ و ۴ الگوی بیان ژن ویتلوژنین (ژن هدف) و (ژن رفرنس) را بر اساس میانگین و  $\pm SD$  نشان می‌دهند که میزان انحراف معیار برای همه



شکل ۳. الگوی میانگین و  $\pm SD$  بیان ژن ویتلوژنین



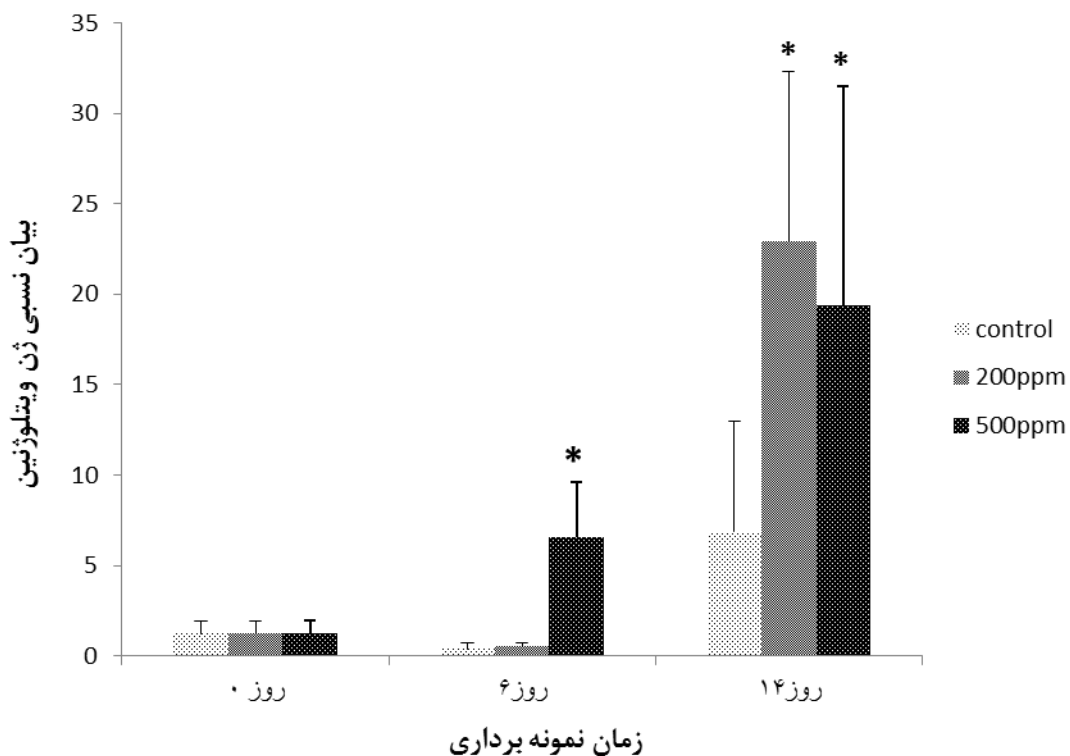
شکل ۴. الگوی میانگین و  $\pm SD$  بیان ژن  $\beta$  actin



دوز (LC50 (ppm 500 ۰/۲۵) در روز ششم بیان ژن افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد، تا در روز ۱۴ به حداکثر خود می‌رسد. در غلظت کمتر (200 ppm) در روز ششم بیان ژن ویتلوژنین افزایش معنی‌دار نداشت، اما در روز ۱۴ این میزان افزایش معنی‌داری را نشان داد.

### ۶.۳. مقادیر بیان ژن ویتلوژنین کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان

نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش دوز پساب کارخانه کاغذسازی بیان ژن ویتلوژنین نیز در مدت زمان کمتری (روز ششم) رخ می‌دهد و در روز ۱۴ بیان ژن به حداکثر خود می‌رسد. همان‌گونه که شکل نشان می‌دهد (شکل ۵)، در بیان ژن ویتلوژنین در



شکل ۵. بیان ژن ویتلوژنین کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان در روز ششم و چهاردهم در دوز بالاتر (500 ppm) پساب کارخانه کاغذسازی و همچنین در دوز پایین‌تر (200 ppm) در روز چهاردهم نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

ژن‌های رفرنس با نرم‌افزار Bestkeeper ژن‌های رفرنسی که انحراف معیار بالایی دارند برای آزمایش استفاده نشوند (Pfaffl et al., 2004). در این آزمایش نشان داده شد که ژن رفرنس ( $\beta$ actin) ثبات بالایی

### ۴. نتیجه‌گیری

بیشترین مقادیر انحراف معیار برای ژن رفرنس ( $\beta$ actin) عمدتاً زیر یک بود (شکل ۵). توصیه می‌شود به هنگام تجزیه و تحلیل داده‌های بیان

است استروژنیک ارزیابی کرد. همچنین علت بالابودن  $LC_{50}$  (۲ g/l) ناچیز بودن اسید رزین ( $mg/l = LC_{50}$ ) ۰/۳۲ تا ۱/۲) و کلر ( $LC_{50} = 0.1 mg/l$ ) در این پساب‌هاست، چون از درختان سوزنی‌برگ که اسید رزین بالایی دارند برای تهیه کاغذ در ایران استفاده نمی‌شود. بقیه مواد سمی به خصوص کلر نیز که در رنگ‌بری استفاده می‌شوند تصفیه و حذف می‌شوند. جدول ۳ عناصر موجود در کارخانه کاغذسازی مازندران را بر حسب درصد نشان می‌دهد، همان طور که مشاهده می‌شود میزان لیگنین (الکل و اسید چرب) به میزان ۱۵/۳ درصد حل‌نشده و ۱/۰۲ درصد حل شده است (Rahmatiet al., 2010).

دارد. بر اساس مطالعات رحمتی و همکاران در سال ۱۳۸۹ و همزه و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی پروفیل کارخانه‌های کاغذ ایران این پساب‌ها دارای ۱۰ تا ۱۵ درصد لیگنین شامل الکل و اسیدهای چرب به صورت حل‌شده و حل‌نشده است. همچنین به علت استفاده نکردن از درختان سوزنی‌برگ برای تهیه کاغذ در این پساب‌ها رزین کمی وجود دارد. بیشترین میزان اسیدهای چرب استر متیل پالمیتیک و اولئیک اسیدند (جدول ۳) (Rahmati et al., 2010). به همین علت می‌توان پساب‌های کارخانه‌های کاغذسازی ایران را (کارخانه کاغذسازی مازندران و کارخانه کاغذسازی پارس اهواز) که ماده اولیه آن برای تهیه کاغذ کولش برنج و باگاس (چوب نیشکر)

جدول ۳. عناصر موجود در کارخانه کاغذسازی مازندران

مواد آلی		مجموع مواد معدنی		منشأ پسماند						
مجموع	آرابینوز	گالاکتوز	مانوز	زایلوز	گلوکز	حل شده	کلازون	۱۵/۳	۳۹/۵	کاغذسازی مازندران
۶۰/۵	۰/۰۵	۳/۷۲	۰/۵۳	۱۷/۳۱	۲۲/۶۱	۱/۰۲				

اساس مطالعات Mellanean و همکاران (1999) دو کارخانه با روش غیر کمی Northern blot فاقد بیان ژن بودند، اما در یک کارخانه در روز چهاردهم بیان ژن افزایش یافت و در این تحقیق نیز در هر دو تیمار ۰/۱ و ۰/۲۵  $LC_{50}$  در روز چهاردهم به صورت نیمه کمی افزایش بیان ژن ویتلوژنین مشاهده شد. به همین علت بیان ژن ویتلوژنین در روز چهاردهم می‌تواند شاخصی برای تشخیص آلودگی‌های استروژنیکی

تأثیرات پساب فاضلاب بر القای ویتلوژنین را اولین بار Harris و همکاران (1994) گزارش کردند (Sumpter et al., 1995). همچنین بعدها در کفشک ماهیان<sup>۱</sup> جنسیت نرها از آب خلیج بریتانیا و کپور وحشی<sup>۲</sup> در رودخانه می‌سی‌سی‌پی مشاهده شد (Jobling et al., 1998; Folmar et al., 2001) بر

1. flounders
2. Feral carp

تأثیرات محیطی مثل دما و نور در بیان ژن ویتلوژنین محاسبه شود و سعی شود با استفاده از روش‌های مختلف، مانند نانولوله‌های تیتانیوم اکسید<sup>۱</sup> (Zhang *et al.*, 2012)، مواد استروژنیک حذف شود.

### تقدیر و تشکر

از دکتر علیرضا سلامی و دکتر سحاب حجازی برای راهنمایی‌ها و خدمات ارزنده‌شان طی تحقیق، همچنین از همه مسئولان کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای نظرآباد، کارگاه بیماری‌های آبزیان، آزمایشگاه بیولوژی، آزمایشگاه ژنومیکس، و آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنیم.

پیشنهاد شود. همچنین دوز  $LC_{50}$  ۰/۲۵ (۵۰۰ ppm) در روز ششم افزایش معنی‌دار بیان ژن ویتلوژنین را داشت. Vetillard و همکاران (2006) نیز تأثیر  $20 \mu\text{g/l}$  4-n-nonylphenol را در پساب کارخانه‌های کاغذسازی و آلودگی‌های نفتی روی کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند که در روز ششم افزایش بیان ژن ویتلوژنین را نشان داد. در این بررسی همانند مشاهدات Islinger و همکاران (1999) روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، که شش روز بعد از تزریق استروژن بیان ژن ویتلوژنین افزایش داشت، حداقل افزایش بیان ژن ویتلوژنین نیز در روز ششم بوده است. هر چه دوز پساب بیشتر باشد بیان ژن ویتلوژنین در مدت کمتری (روز ششم) اتفاق می‌افتد. به همین علت روز ششم برای آلودگی‌های شدیداً استروژنیک و روز چهاردهم برای تشخیص آلودگی‌های استروژنیک خفیف‌تر پیشنهاد می‌شود. البته بررسی‌های زیادی درباره بیان ژن ویتلوژنین در جهان شده است که روش‌های مختلف و مواد مختلفی داشتند و در زمان کمتری بیان ژن اتفاق افتاد. به نظر می‌رسد روش تزریق و میزان و نوع ماده استروژنیک در زمان بیان ژن ویتلوژنین مؤثر باشد. برای مثال، بررسی‌های Le Guellec و همکاران (1988) درباره بیان ژن ویتلوژنین در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که با استفاده از تزریق استرادیول ( $3 \text{ mg/kg}$  وزن بدن WT) القای اولیه mRNA ویتلوژنین در کبد قزل‌آلای در ۲ روز منجر به رسیدن RNA به سطح حداکثر خود ۲۶۰ ppm شد. در این آزمایش پیشنهاد می‌شود میزان تأثیرات این آلودگی در تغییر جنسیت و عقیمی نیز مطالعه شود. همچنین در تأثیرات پساب کارخانه کاغذسازی،

## References

- [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, P 35-45. (In Persian).
- [2]. Andersson, T., Forlin, L., Harding, J., Larsson, A., 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 1525-1536.
- [3]. Arukwe, A., Knudsen, F.R., Goksyr, A., 1997. Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives* 105, 418-422.
- [4]. Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- [5]. Bustin, S.S., Muller, R., 2005. Real time reverse transcription PCR (QRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 109, 365-379.
- [6]. Bustin, S.A., Nolan, T., 2005. Pitfalls of quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15, 155-166.
- [7]. Couillard, C.M., Berman, R.A., Panisset, J.C., 1988. Histopathology of rainbow trout exposed to a bleached kraft pulp mill effluent, *Environment Contamination Toxicology* 17, 319-323.
- [8]. Deeley, R.G., Gordon, J.I., Burns, T.H., Mullinix, K.P., Binastein, M., Goldberger, R.F., 1977. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *The journal of Biological Chemistry* 83, 10-8319.
- [9]. Denslow, N.D., 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8, 385-398.
- [10]. Denslow, N.D., Kocerha, J., Sepúlveda, M.S., Gross, T., Holm, S.E., 2004. Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents. *Mutation Research* 552, 19-34.
- [11]. Denslow, N., Sepulveda, M., 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. *The Fish Oocyte* 10, 255-322
- [12]. Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- [13]. Dixon, T., Taggart, J., Georg, S.G., 2002. Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research* 54, 267-270.
- [14]. Dhar, A., Dettori, R.A., Klimpel, M., Read, K.B., 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Archives of virology* 148, 2381-2396.
- [15]. Ewart, V., Belanger, K., Williams, J., Karakach, J., Penny, T., Tsoi, S., Richards, S., Douglas, R.S., 2005. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 333-347.
- [16]. Ferreira, F., Santos, M.M., Castro, L.F. C., Henriques, M.A., Lima, D., Vieira, M.N., Monteiro,

- N.M., 2009. Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149, 58–64.
- [17]. Finn, R.N., Kristoffersen, A., 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the “3R hypothesis” correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *Plos One* 2, 169.
- [18]. Finn, R.N., 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction* 76, 926–935.
- [19]. Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R., 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81, 219–231.
- [20]. Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 15, 143.
- [21]. Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Louis J.G., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male Carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspective* 104, 1096-1101.
- [22]. Folmar, L.C., Gardner, G.R., Schreiber, M.P., Magliulo-Cepriano, L., Mills, L.J., Zaroogian, G., Gutjahr-Gobell, R., Haebler, R., Horowitz, D.B., Denslow, N., 2001. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*) 51, 431-441
- [23]. Gomez, Ch.V., Estepa, N., Perez, A.L., 2006. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 132, 154-159.
- [24]. Hamzeh, Y., Mirzaei, B., Ashori, A., Doosthoseini, K., Rashedi, K., Olfat, A., 2011. Chemical composition of the paper making solid wastes. *Iranian Journal of Wood and Paper Science Research* 26, 281-290. (In Persian).
- [25]. Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology* 149, 35-47.
- [26]. Hook, S.E., Skillman, A.D., Small, J.A., Schultz, I.R., 2006. Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. *Aquatic Toxicology* 77, 372-385.
- [27]. Hook, S. E., Skillman, A. D., Small, J. A., Schultz, I. R., 2007. Temporal changes in gene expression in rainbow trout exposed to ethynyl estradiol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145, 73–85
- [28]. Islinger, M., Pawlowski, S., 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *The Science of the Total Environment* 233, 109-122.
- [29]. Islinger, M., Yuhan, H., Voelkl, A., Braunbeck, T., 2002. Measurement of vitellogenin gene expression by RT-PCR as a tool to identify endocrine disruption in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Biomarkers* 1, 80-93
- [30]. Jobling, S., Nolan, M., Tyler, Ch.R., Brighty, G., Sumpter, J. P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish, *Environmental Science and Technology* 32, 2498–2506

- [31]. Lazier, C.B., Langley, S., Ramsey, N.B., Wright, J. M., 1996. Androgen Inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 104, 321–329
- [32]. Lim, E.H., Ding, J.L., Lam, T.J., 1996. Estradiol-Induced vitellogenin gene expression in a teleost fish (*Oreochromis aureus*). *General and Comparative Endocrinology* 82, 206-214
- [33]. Le Guellec, K., Lawless, K., Valotaire, Y., Kress, M., Tenniswood, M., 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* 71, 359-371.
- [34]. Liu, Z., Teng, Y., Liu, H., Jiang, Y., Xie, X., Li, H., Lv, J., Gao, L., He, J., Shi, X., 2008. Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 149, 103-109.
- [35]. Maclatchy, D.L., Vanderkraak, G.J., 1995. The Phytoestrogen  $\beta$ -Sitosterol Alters the Reproductive Endocrine Status of Goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134, 305-312
- [36]. Meng, X., Jang, I., Seo, H., Cho, Y., 2010. A TaqMan real-time PCR assay for survey of white spot syndrome virus (WSSV) infections in *Litopenaeus vannamei* postlarvae and shrimp of farms in different grow-out seasons. *Aquaculture* 310, 32-37
- [37]. Mellanen, P., Soimasuo, M., Holmbom, B., Oikari, A., Santi, R., 1999. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile white fish (*Coregonus lavaretus L. s.l.*) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 133-137
- [38]. Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Penec, J.P., Wolff, J., 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* 174, 59-64.
- [39]. Navasa, J.M., Segner, H., 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti) estrogenic activity of chemical substances. *Aquatic Toxicology* 80, 1–22.
- [40]. Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R., Holdway, D., 2010. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 99, 160–167.
- [41]. Pait, A.S., Nelson, J.O., 2002. Endocrine disruption in fish: an assessment of recent research and results. University of Maryland, 63p.
- [42]. Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in Real time PCR, IN: Bustin, S. A. (Editor). A-Z of quantitative PCR International, University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, Pp, 87-112.
- [43]. Pfaffle, M.W., Tichopad, A., Progomont, C. and Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnology Letters* 26, 509-515.
- [44]. Rahmati, H., Abdolkhani, A., Hamzeh, Y., 2010. Characterization and removal of resins from mixed tropical hardwoods kraft pulp, *Journal of Wood and Paper Industries*. Number 1. Spring and Summer 46-56, (InPersian).
- [45]. Rimstad, E., Krona, R., Hornes, E., Olsvik, Q., Hyllseth, B., 1990. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. *Veterinary Microbiology* 23, 211-219.
- [46]. Scott, Q.M., Smith, A., 1995. Sludge Characteristics and disposal alternative for the pulp and paper industry. *Proceedings of the International Environmental Conference* 269-279.

- [47]. Szenasy, E., Vancouver, B.C., Gray, C., Brewer, R., Vancouver, B.C., Juergensen, L., Kent, R., Caux P.Y., 1999. Developing Water quality guidelines for chemicals of concern from pulp mill effluent. *Developing Guidelines for Chemical of Concern* 43, 35-44.
- [48]. Stanko, J.P., Angus, R.A., 2006. Manufacture and its impact on the aquatic environment. *Environmental Contamination Toxicology* 185, 67-92.
- [49]. Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic. Contamination of the aquatic environment. *Environment Health Perspective* 103, 173-178.
- [50]. Svenson, S.A., Viktor, T., Holbech, H., Norrgren, L., 2006. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in zebrafish exposed to effluent water from a swedish pulp mill. *Environmental Contamination and Toxicology* 51, 445-451.
- [51]. Vaillant, C., Le Guellec, C., Pakdel, F., Valotaire, Y., 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology* 70, 284-290.
- [52]. Vetillard, A., Bailhache, T., 2006. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicological Sciences* 92, 537.
- [53]. Vetillard, A., Bailhache, T., 2005. Expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biology of Reproduction* 72, 119 -126.
- [54]. Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J., 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8, 491-500.
- [55]. Wang, Q., Nunan, L., Lightner, D., 2000. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Disease of Aquatic Organisms*, 43, 175-181.
- [56]. Wang, H., Jacqueline, T., Tan, T., Emelyanov, A., Korzh, V., Gong, Zh., 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Gene* 356, 91 – 100.
- [57]. Wang, R., Zhang, Y., Zhang, G.L., Y., Jianguo, Fang, Z., Zhang, W., Guangzhi, M., 2008. Cloning, expression, and induction by 17-*b* estradiol (E2) of a vitellogenin gene in the white cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*). *Fish Physiology Biochemical* 36, 157-164
- [58]. Wijegoonawardane, P., Cowley, J., Walker, P., 2010. A consensus real-time RT-PCR for detection of all genotypic variants of yellow head virus of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods* 167, 5-9.
- [59] Zhang, W., Li, Y., Wang, Q., Hu, H., 2012. Removal of endocrine-disrupting compounds, Estrogenic activity, and *Escherichia coliform* from secondary effluents in a TiO<sub>2</sub>-Coated photocatalytic reactor. *Environmental Engineering Science* 29, 195-201