بررسی تأثیر پروبیوآنزیم بر بیان ژن های وابسته به ایمنی و کنترل بیماری دهان قرمز (yersiniosis) در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ابوالحسن راستیان نسب[۱]، سید محمد موسوی[۲*]، حسین ذوالقرنین[۳]، همایون حسین زاده صحافی[٤]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر پروبیوآنزیم بر بیان ژن های وابسته به ایمنی بخش قدامی کلیه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و نیز اثر حفاظتی این ترکیب در رویارویی با بیماری دهان قرمز روده ای (yersiniosis) بررسی گردید. میزان پروبیوآنزیم استفاده شده۰.۳ g/kg و ۰.۵ غذا بوده و به تعداد ۲۲۵ عدد ماهی با وزن متوسط ۲۶/۳±۲/۷ گرم در تیمارهای مختلف و در تانک های ۲۰۰ لیتری به مدت ۶۰ روز خورانده شدند. در انتهای دوره تغذیه، گروه های مختلف ماهیان و گروه شاهد در رویارویی با باکتری *Yersinia ruckeri* آزمایش شدند. گروه با دوز زیاد پروبیوآنزیم بیشترین مقاومت در مقابل عامل بیماری زای ذکر شده را نسبت به تیمار با دوز کمتر پروبیوآنزیم و گروه شاهد داشت ($p< 0.05$). پس از تعیین میزان mRNA سیتوکین های IL-1β و TNF-α در کلیه، TNF-α در تیمار با دوز زیاد (۰.۵g/kg) بیان بیشتری نسبت به گروه با دوز کم و گروه شاهد داشت ($p<0.05$). درحالیکه میزان پروبیوآنزیم در تیمارهای مختلف تأثیرمعنی داری بر بیان ژن IL-1β در کلیه نداشت ($p>0.05$). تنها دز زیاد پروبیوآنزیم بطور قابل توجهی بیان ژن TNF-α را نسبت به ژن IL-1β متفاوت نموده است. بر اساس نتایج، میزان بیان سیتوکین های مورد مطالعه وابسته به دز بوده و ممکن است در بافتهای مختلف الگوی متفاوتی در بیان داشته باشند. بر اساس یافته‌ها، افزایش بیان سیتوکین‌ها بویژه TNF-α در کلیه، می تواند بر توان مقاومت به بیماری در ماهی مؤثر باشد. در مطالعه حاضر، استفاده از مکمل پروبیوآنزیم به میزان ۰.۵g/kg غذا می تواند محرک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت به بیماری در ماهی‌قزل الای رنگین-کمان باشد. با این وجود، انجام تحقیقات مربوط به اثرات پروبیوآنزیم بر سیتوکین ها در بافت‌ها و سنین مختلف گونه‌های پرورشی ضروری بنظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوآنزیم، بیان ژن، سیتوکین، بیماری دهان قرمز

* نویسنده مسئول

مقدمه

به دلیل شرایط بوم شناختی و سازگاری با شرایط زیست محیطی و رشد سریع، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهمترین گونه های پرورشی در ایران می باشد. تولید سالانه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در کشور بیش از یکصد هزار تن می باشد (IFSA, 2015). در سالهای اخیر، این صنعت بدلیل شیوع انواع بیماری های ویروسی و باکتریایی با مشکل مواجه شده است، در مواردی حتی واکسیناسیون ماهیان جهت جلوگیری از شیوع بیماری باکتریایی دهان قرمز ناشی از باکتری یرسینیا روکری (*Yersinia ruckeri*) نتیجه رضایت بخشی حاصل نگردیده است (Soltani *et al.*, 2014). مقاومت دارویی باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها، هزینه بالای دارو درمانی ، از بین بردن فلور میکروبی محیط زیست ، آلودگی غذا و محیط و عوارض جانبی این داروها بر آبزیان و مصرف کننده منجر به کاهش استفاده از این داروها بویژه در ملل توسعه یافته شده است (Carnevali *et al.*, 2006; Gomez & Balcazar, 2008; Hoseinifar *et al.*, 2011;). تمایل به مصرف ترکیباتی نظیر محرک های ایمنی، پروبیوتیک ها و پریبیوتیک ها و یا ترکیبات دوگانه(سین بیوتیک)حاوی این مواد و آنزیم ها نظیر پروبیوآنزیم ها در حال افزایش است (Ringo *et al.*, 2014). محرک های ایمنی جهت افزایش مقاومت در مقابل عوامل عفونی و تقویت مکانیسم دفاع سلولی و هومورال آبزیان پرورشی استفاده می شوند (Pionner *et al.*, 2013). پروبیوآنزیم ها، ترکیبات دو بخشی بوده که با اثر هم افزایی مکانیسم عمل همدیگر را تقویت نموده، بطوری که آنزیم ها در شروع تغذیه مؤثرتر بوده و پروبیوتیک ها در محیط آماده شده به واسطه فعالیت آنزیم ها، در انتهای فرایند گوارش استقرار یافته و ایفای نقش می کنند. آنزیم ها عمل هضم را در معده و پروبیتیک ها جذب غذا را در روده افزایش می دهند. بخش عمده ترکیبات آنزیمی «پروبیو آنزیم» بر شکستن و هیدرولیز پلی ساکاریدها متمرکز است (Pettersson, 2005).

سیستم ایمنی ماهی پیچیده بوده و طیف وسیعی از مولکول ها، گیرنده ها و سلول ها در آن نقش دارند (Verlhac Trichet, 2010). سیتوکین ها دارای ساختاری ساده از پلی پپتید یا گلیکوپروتئین بوده که به چند دسته از جمله اینترفرون ها (IFN_S)، اینترلوکین ها (IL_S)، کیموکین ها و فاکتور های مشابه فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF-α) تقسیم می شوند. این مولکول ها محرک و موثر بر کلیه پاسخ های ایمنی و التهابی می باشند (Verlhac Trichet, 2010). آنها بر سیستم دفاعی ماهی در سطوح مختلف شامل تنظیم یا افزایش رشد و بر فعالیت سلول های سیستم ایمنی تأثیر گذارند (Huang *et al.*, 2008). در مقابل، وظیفه اصلی اینترلوکین-۱۰ (IL-10) تنظیم پاسخ التهابی و کاهش تأثیر نامطلوب التهاب بر میزبان می باشد (Raida & Buchmann, 2008). فاکتور نکروز کننده تومور به طور عمده توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید می شود. نقش اصلی TNF در تنظیم سلول‌های ایمنی است که از نظر ساختاری، پروتئین‌های محلول و یا متصل به غشاء می‌باشند (Gruss, 1996). این مولکول‌ها به طور عمده در اعمال تنظیم سلولی مانند کشتن سلول‌های تومور هنگام پاسخ‌های ایمنی و واکنش‌های التهابی درگیرند (Aoki *et al.*, 2008) و از سایتوکین‌های پیش‌التهابی بوده که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و نقش اصلی آن در ایمنی است اما نقش‌های جانبی دیگری هم ایفا می‌کند (آقاجانی و همکاران، ۱۳۹۱). TNF قادر به القاء تب، التهاب و مهار تومور و تکثیر ویروسی و پاسخ به عفونت از طریق تولید اینترلوکین-یک (IL1) و IL6 است (Swardfager *et al.*, 2010).

ایمن سازی ماهیان از طریق افزودنی های غذایی می تواند یکی از راه کارهای سودمند جهت افزایش مقاومت ماهیان در مقابله با بیماری های باکتریایی محسوب گردد. ارزیابی ایمنی زایی از طریق تغذیه از اهمیت بالایی برخوردار است. شناخت روابط ژنوم و ایمنی یک جاندار به منظور درک بهتر تأثیر شاخص های تغذیه ای بر پاسخ های ایمنی در اولویت می باشد. این تکنیک ها بررسی پاسخ های ایمنی از طریق فاکتور های هومورال از جمله سیتوکین ها را در گونه های ماهی میسر می سازد (Amar *et al.*, 2004). باکتری یرسینیا روکری (*Y. ruckeri*)، مدل مناسبی جهت مطالعات ایمنی زایی در مقابل باکتری ها محسوب می گردد (Stevenson, 1997). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر ترکیب پروبیوآنزیم بر بیان ژن های وابسته به ایمنی در بخش قدامی کلیه ماهی قزل آلای رنگین کمان و تعیین اثر حفاظتی آن در مقابل عامل بیماری زای یرسینیا روکری می باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در مخازن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰ لیتر انجام شد. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۰/۷ ± ۱۰/۵ درجه سانتی گراد با هوادهی به طور طبیعی و تعویض آب مخازن بصورت ثقلی به میزان ۰/۳ لیتر در ثانیه انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمار ۱(شاهد) : گروه تغذیه شده با غذای بدون پروبیوآنزیم، تیمار ۲: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰.۳ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا و تیمار ۳: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰.۵ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا بود. به طور تصادفی تعداد ۲۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی ۲/۷±۲۶/۳ گرم در هر یک از مخزن‌های فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند. به منظور سازش پذیری ماهی ها، کلیه تیمارها به مدت دو هفته با غذای تجاری تغذیه شده و در طول این مدت ماهی ها از نظر سلامتی بررسی می شدند. هم چنین، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دمای آب، اکسیژن محلول و PH کنترل می شد.

در این مطاله از ترکیب پروبیوآنزیم حاوی باکتری های*Lactobacillus acidophilus*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus lichenformis*، *Bacillus subtillis* و آنزیم های B-Glucanase 3.2.1.6 ،B-Glucanase 3.2.1.4، Alpha-Amylase 3.2.1.1، B-Xylanase 3.2.1.8، Protease و Cellulase به عنوان مکمل غذایی استفاده شده است. این محصول توسط شرکت "XVET GmbH " (آلمان) تولید و به سفارش سازمان دامپزشکی کشور توسط شرکت عرشیا دارو(تبریز) وارد می گردد. به منظور تهیه جیره های آزمایشی، غذای تجاری بصورت اکسترود (Extroded) از شرکت فرادانه تهیه شد (جدول۱).

جدول۱: ترکیبات جیره غالب مورد استفاده در آزمایش

Table1: The compositions of used dominant ration in the experiment

نوع غذا		ترکیبات(٪)			
	اندازه(میلی متر)	پروتئین	چربی	کربوهیدرات	خاکستر
GFT1 (غذای رشد)	۴	۳۰	۱۶.۴۲	۳۶.۵۴	۱۱.۲

مکمل به کمک محلول ژلاتین ۵ درصد با غذا مخلوط شد(Treves-Brown, 2000). برای این کار، ابتدا غذا با ترازوی دیجیتال توزین شد و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، پروبیوآنزیم به صورت محلول درآب و ژلاتین درآمده و با اسپری یکنواخت با غذا مخلوط شد. سپس جیره‌های آماده شده در هوای محیط و با رعایت نکات بهداشتی خشک شدند و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل شدند. لازم به ذکر است به جیره تیمار ۱ (شاهد) نیز به میزان یکسان با تیمارها، محلول ژلاتین ۵ درصد اسپری شد. ماهیان در ابتدا و انتهای دوره و همچنین در طول دوره آزمایش در فواصل زمانی ۱۴ روز زیست‌سنجی می‌شدند. غذادهی براساس ۳٪ وزن توده زنده ماهی در تانک به صورت دستی انجام می‌شد. میزان غذای مورد نیاز هر روز به سه قسمت مساوی تقسیم می‌شد و سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۱ و ۱۷ در اختیار ماهیان قرار می گرفت. این عمل برای مدت ۶۰ روز انجام شد.

تیمارهای مختلف از نظر مقاومت در مقابل باکتری های بیماریزا در رویارویی با باکتری یرسینیا روکری (*Y. ruckeri*) عامل بیماری دهان قرمز باکتریایی در ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان بررسی شدند. بدین منظور، در پایان دوره آزمایش (۶۰ روز پس از تغذیه) تعداد ۹۰ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از سه تیمار انتخاب شده و به طور زنده به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شده و در ۹ تانک ۸۰ لیتری (۱۰ عدد از هر تکرار در یک تانک) قرار

داده شدند. پس از کشت یک سویه از این باکتری (FJ870985) از ذخیره موجود در آزمایشگاه ذکر شده، شستشو و خالص سازی باکتری ها و انتقال به بافر نمکی فسفات (PBS)، دز $۲×۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی لیتر، به کمک لوله های استاندارد مک فارلند تهیه و ماهیان تیمارهای مختلف به روش حمام به مدت سه دقیقه با این باکتری تیمار شدند. بعد از حمام با باکتری، تلفات ماهیان به طور روزانه به مدت ۲۵ روز ثبت شد و طی این دوره نسبت به تغذیه ماهیان بر اساس روش قبل اقدام گردید. کشت باکتری شناسی از بافت کلیه ماهیان تلف شده جهت آگاهی از تلفات بواسطه عامل یرسینیا روکری انجام می شد. میانگین تلفات هر تیمار ثبت شده و میزان نسبی بازماندگی تیمارها نسبت به گروه شاهد بر اساس معادله (۱) محاسبه گردید (Amend, 1981).

معادله(۱): میزان بازماندگی نسبی (درصد)

۱۰۰ × (درصد تلفات تیمار شاهد ÷ درصد تلفات تیمار)-۱ =

جهت بررسی بیان ژن های فاکتور نکروز کننده تومور الفا (TNF-α) و اینترلوکین-۱ بی (IL-1b)به عنوان دو ژن مهم واسطه ایمنی، بافت بخش قدامی کلیه ماهیان مورد استفاده قرار گرفت (Verlhac Trichet, 2010). پس از شصت روز تغذیه با مقادیر مختلف مکمل، برای بررسی میزان بیان ژن های IL-1b و TNF-α از هر تیمار ۶ عدد ماهی (۲ ماهی از هر تکرار) نمونه‌برداری شد (در مجموع ۱۸ عدد). ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط محلول پودر گل میخک (۲۰۰ppm)بیهوش و سپس به تانک ازت منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه ها خارج شده و بخش قدامی کلیه‌ها جمع-آوری و به داخل لوله های از قبل استریل‌شده انتقال داده‌شد و بلافصله لوله ها به تانک ازت انتقال داده شدند. در پایان نمونه‌برداری نمونه‌ها در یخچال منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آنجا نگهداری شدند. پس از خارج نمودن نمونه های ماهیان از فریزر، مقدار ۵۰ میلی گرم از بافت بخش قدامی کلیه ماهی جدا نموده و در هاون چینی در حضور ازت مایع به طور یکنواخت خرد و همگن می‌شدند. مراحل استخراج RNA با استفاده از روش اسید گوانیدینوم تیوسیانات- فنل کلروفرم (Acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform) انجام‌شد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده (سینا کلون)یک میلی لیتر از محلول سرد شده گوانیدین-فنل (RNX Plus) به لوله دو میلی‌لیتری حاوی بافت هموژن‌شده اضافه شده و ۵ تا ۱۰ ثانیه مخلوط می‌شد و پس از نگهداری در دمای معمولی به مدت ۵ دقیقه، به محلول فوق ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم خالص (مرک، آلمان) افزوده و طی ۱۵ ثانیه تکان دادن ، مخلوط حاصله مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد یا در مجاورت یخ نگهداری می گردید. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به یک لوله ۲ سی سی استریل منتقل شده و هم حجم آن (قریب به ۵۰۰ تا ۷۰۰ میکرولیتر) ایزو پروپانول خالص (مرک، آلمان) اضافه و به دقت مخلوط می شدند و پس از سپری شدن ۱۵ دقیقه، با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می شد. محلول رویی تخلیه شده و به رسوب سفید رنگ به جامانده یک میلی لیتر الکل اتیلیک ۷۵ درصد اضافه و پس از تکان دادن (vortex)، لوله با دور ۷۵۰۰ در دقیقه به مدت ۸ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ می گردید. پس از تخلیه محلول رویی، محتویات RNA رسوب شده تا حدی خشک شده و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه می شد. هم چنین، از حمام آب ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور کمک به انحلال RNA در آب استریل شده استفاده شد (Chomczynski & Sacchi, 2006).

به منظور ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، بعد از آماده سازی خلوص و کیفیت آن به روش رنگ سنجی به صورت زیر محاسبه گردید؛ ۵µ1 از محلول RNA در ۹۵µ1 آب مقطر حل شده و میزان جذب آن در۲۶۰ nm و در ۲۸۰nm و نیز در ۲۳۰nm توسط بایوفتومتر UV visible(eppendorf) قرائت شد که طول موج های مذکور به ترتیب میزان اسید های نوکلئیک، آلودگی های پروتئینی ، آلودگی پلی ساکاریدی و پلی فنلی را نشان می دهد(Winfrey *et al.*, 1997). نسبت OD ۲۶۰nm/۲۸۰nm و ۲۶۰nm/۲۳۰nm برای تعیین خلوص RNA به دست می آید. میزان نسبت های ذکر شده بین ۱/۸ تا ۲ مناسب است وخلوص بیشتر از ۱/۶ قابل قبول است(Wang & Stegemann, 2009). محلول RNA حاصله، تا شروع سنتز *cDNA* در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

RNA استخراج شده از کلیه ماهیان، جهت سنتز cDNA تک رشته ای استفاده شد. بدین منظور از کیت سنتز *cDNA* از mRNA یا totalRNA (The Thermo Scientific™ Rivert Aid First Strand *cDNA* Synthesis Kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده(Thermo Fisher Scientific Incorporation, USA) اقدام گردید. پس از ذوب نمودن و سانتریفیوژ تمام معرف ها، 1 µ۲ از RNA الگو به یک لوله ۰/۲ سی‌سی اضافه نموده و معرف ها و پرایمر های الیگونوکلئوتید تیمین جهت ساخت *cDNA* به آن افزوده شده و به مدت یک ساعت در دمای۴۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در انتها بمنظور غیر فعال نمودن آنزیم های تجزیه *cDNA*، محصول واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. حجم محلول حاوی *cDNA* سنتز شده بر اساس این پروتکل ۲۰µ1 بود (Wiame *et al*., 2000). در واقع این روش برای کمی کردن سنجش میزان mRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hunt, 2010).

بیان ژن های مورد مطالعه با استفاده از روش سایبرگرین (Syber green) در ترمال سایکلر مدل CFX96 Real time System ,C1000 کمپانی Bio-Rad با یک بلوک دارای ۹۶ چاهک، بر اساس پروتکل شرکت سازنده (Takara Bio Incorporation, Shiga, Japan) محلول حاوی سایبرگرین انجام گردید. بر اساس پروتکل ذکر شده، برای هر نمونه دو میکرولیتر از محلول *cDNA* ، ۱۲.۵ میکرولیتر محلول حاوی سایبرگرین(Syber Permix Ex Taq II, Bulk, Takara) به عنوان عامل فلورسنت، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و ۸.۵ میکرولیتر آب به لوله ۲۰۰ میکرولیتری اضافه گردید. در بررسی حاضر، توالی ژن های مورد نظر از بانک ژن (NCBI) استخراج و از نرم افزار PRIMER3 نسبت به طراحی آغازگرها اقدام گردید. جدول (۲) آغازگرهای استفاده شده را نشان می دهد.

جدول۲: آغازگرهای استفاده شده جهت شناسایی ژن های هدف و کنترل

Table 2: The primers that used to recognition of target and control genes

ژن	کد دسترسی	آغازگرها (رفت/برگشت)	اندازه محصول(bp)
Interlukin-1BETA (IL-1β)	NM_۰۰۱۱۲۴۳۴۷.۲	F:ACATTGCCAACCTCATCATCG R: TTGAGCAGGTCCTTGTCCTTG	۹۱
Tumor necrosis factor-1 alpha (TNF-1α)	NM_۰۰۱۱۲۴۳۵۷.۱	F: CAAGAGTTTGAACCTTGTTC R: GCTGCTGCCGCACATAGAC	۱۸۱
Beta-actin(β–actin)	NM_۰۰۱۱۲۴۲۳۵.۱	F:ATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTG R:CTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGT	۱۱۴

پروفایل حرارتی برای تمامی واکنش ها، ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۴۰ سیکل، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد،۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در انتها یک سیکل ۵ دقیقه در دمای ۷۲ سانتی گراد بود. میزان فلورسنت در انتهای هر سیکل توسط دستگاه ثبت می شد. پروفیل حرارتی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت ترسیم منحنی ذوب و اطمینان از وجود یک پیک برای همه نمونه ها و فقدان پرایمر دایمر انجام شد. اندازه گیری میزان محصول توالی هدف با روش اندازه گیری نسبی برای سنجش میزان بیان ژن های هدف انجام گردید(Livak & Schmittgen, 2001).

به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلیت تهیه و با هر دو آغازگر ژن های هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرار پذیری آزمایش برای هرآغازگر ترسیم می شود (Ramakers *et al*., 2003) و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی شد (معادله۲).

معادله (۲):

$$Efficiency = 10^{-1/slope}$$

Slope : شیب منحنی استاندارد

روش اندازه گیری سیکل آستانه نسبی $E^{-\Delta CT}$

روش نسبی معمولاً برای بررسی تغییرات بیان ژن در برابر یک تیمار خاص، مورد استفاده قرار می‌گرفت. در این روش علاوه بر ژن هدف که باید مورد ارزیابی قرار گیرد از یک ژن نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده می شود که در واقع یک ژن رفرنس می‌باشد. این ژن ها معمولاً ژن‌هایی هستند که دائماً بیان می‌شوند زیرا برای عملکرد سلول و یا حفظ سلول نیاز هستند. برای حذف نوسانات مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای عملکرد دستگاه‌ها و فرد از استانداردهای داخلی استفاده می‌شود. این استانداردها باید در همه بافت‌ها بیان ثابت داشته باشند . بدین منظور از ژن بتا اکتین (β- Actin) به عنوان ژن رفرنس استفاده شده است. با مقایسه نمونه تیمار شده با شاهد و کنترل داخلی می‌توان کاهش یا افزایش بیان ژن های هدف را مشاهده کرد (Liu & Saint, 2002). بیان نسبی ژن های هدف با ژن کنترل در تیمارها بر اساس مدل ریاضی Pfaffl و همکاران (۲۰۰۲) انجام گردید معادله (۳).

معادله (۳):

$$\text{بیان ژن هدف در نمونه تیمار نسبت به شاهد} = \frac{Efficiency_{\text{ژن هدف}}^{\text{deltaCt (تیمار- شاهد) ژن هدف}}}{Efficiency_{\text{ژن کنترل}}^{\text{deltaCt (تیمار- شاهد) ژن کنترل}}}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در قالب طرح کاملاً تصادفی این تحقیق برنامه ریزی و اجرا گردید. Ct بدست آمده برای ژن‌های TNF-a واینترلوکین با استفاده از معادله(۲) در فضای نرم‌افزار Excel تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن رفرنس بتا اکتین گردید (Livak & Schmittgen, 2001). اعدد بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 مرتب و نمودارهای آن رسم شد. هم چنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و با آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یکطرفه (One – Way ANOVA) انجام شد.

نتایج

الف) ویژگی های توالی هدف ژن های مورد مطالعه، منحنی استاندارد و کارایی پرایمر های مورد استفاده

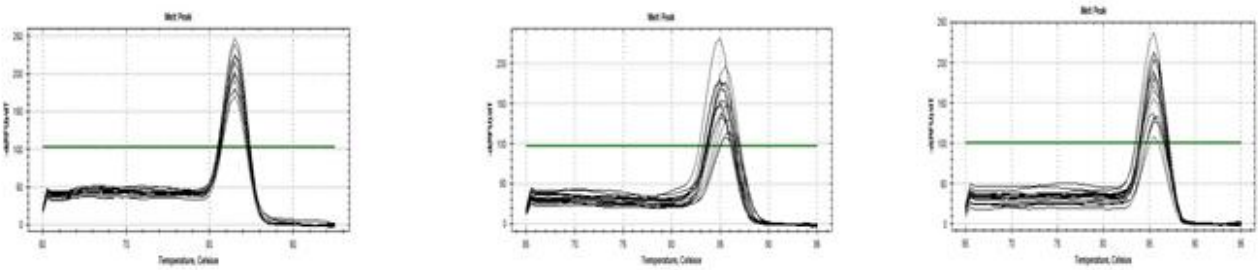
براساس یافته ها، کیفیت نمونه های cDNA بر اساس نسبت جذب ۲۶۰nm/۲۸۰nm و ۲۶۰nm/۲۳۰nm به ترتیب دارای مقادیر ۱.۸۵±۰.۰۷۳ و ۱.۷۷±۰.۰۸ بود.

بازده و شرایط حاکم بر واکنش براساس نتایج بدست آمده از منحنی ذوب و منحنی استاندارد ژن های مورد مطالعه و ژن کنترل در جدول (۳) و شکل (۱) نشان داده شده است.

جدول ۳: میزان کارایی، دمای ذوب و شیب منحنی استاندارد ژن های مورد مطالعه

Table 3: Efficiency, Melt Temperature and Standard Curve Slope of studied Genes

ژن	معادله خط رگرسیون	شیب منحنی استاندارد	ضریب رگرسیون(R^2)	دمای ذوب محصول (^{oC})	کارایی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)	
					کارایی(E)	(درصد)
IL-1β	y=-۳.۵۶۲۹X+۲۲.۰۴۲	-۳/۵۶	۰.۹۷۶۵	۸۳	۱.۹۱	۹۱
TNF-1α	y=-۳.۴۲۵X+۲۲.۷۷۸	-۳/۴۳	۰.۹۹۱۸	۸۵/۵	۱.۹۶	۹۶
β–actin	y=-۳.۴۳۰۳X+۱۵.۹۸۵	-۳/۴۳	۰.۹۸۴۷	۸۵	۱.۹۶	۹۶



شکل۱: منحنی ذوب محصول توالی هدف از راست به چپ به ترتیب ژن های TNF-1α، β–actin وIL-1β

Figure1: Melt Curve of Target Sequence Product of Genes, right to left: TNF-1α, β–actin and IL-1β

ب)اثر مکمل پروبیوآنزیم بر بیان ژن های اینترلوکین (IL-1β) و فاکتور نکروز کننده تومور-یک آلفا (TNF-1α)در کلیه

نتایج مربوط به سیکل آستانه و میزان بیان ژن های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف افزودن مکمل تغذیه ای پروبیوآنزیم در جدول (۴) آمده است. بر اساس جدول مذکور مکمل پروبیوآنزیم تأثیر معنی داری بر بیان ژن IL-1β در تیمارهای مختلف نداشته است($p>0.05$). با این وجود، بیان ژنIL-1β در تیمار ۰.۵ گرم پروبیوآنزیم بر کیلوگرم غذا (تیمار۳) نسبت به تیمار کنترل (شاهد) افزایش یافته است. تغییرات میزان بیان این ژن با سیکل آستانه مربوط به آن منطبق بوده و کمترین مقدار آن در تیمار ۰.۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا مشاهده گردید. تیمار ۳ دارای بیشترین مقدار مربوط به بیان ژن TNF-1α نسبت به سایر تیمارها و دارای تفاوت معنی داری بوده است ($p<0.05$). با وجود افزایش میزان بیان این ژن در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۱(شاهد)، دارای اختلاف معنی داری نبوده اند ($p>0.05$).

جدول ۴: سیکل آستانه و بیان نسبی ژن های مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد*

Table 4: Threshold Cycle and Relative Expression of studied genes in treated and control groups

ژن	پارامتر	تیمارهای آزمایشی ۱(شاهد)	۲	۳
β–actin	انحراف معیار± سیکل آستانه	۱۶.۱۹ ±۰.۹۸ [a]	۱۶.۵۱ ±۰.۶۵ [a]	۱۶.۶۲ ±۰.۶۰ [a]
	انحراف معیار± بیان کنترل	۱ ±۰.۱۲ [a]	۱ ±۰.۱ [a]	۱ ±۰.۰۷ [a]
IL-1β	انحراف معیار± سیکل آستانه	۲۱.۹۴ ±۰.۶۳ [a]	۲۲.۴ ±۰.۲۸ [a]	۲۲.۱ ±۰.۵۵ [a]
	انحراف معیار± بیان نسبی	۱ ±۰.۵ [a]	۰.۹۲ ±۰.۳۹ [a]	۱.۲ ±۰.۵۷ [a]
TNF-1α	انحراف معیار± سیکل آستانه	۲۲.۷۳ ±۰.۳۱ [a]	۲۲.۶۶ ±۰.۳۸ [a]	۲۰.۶۶ ±۰.۳۴ [b]
	انحراف معیار± بیان نسبی	۱ ±۰.۲ [a]	۱.۳ ±۰.۶۶ [a]	۵.۳۸ ±۳ [b]

* حروف a و b معنی دار بودن را در یک ردیف نشان می دهد.

ج)تاثیر تست مقاومت باکتریایی

تلفات ماهیان از روز ۳ پس از تست رویارویی با باکتری *Y. ruckeri* شروع گردید. میزان تلفات و بازماندگی نسبی ماهیان تیمارهای مختلف بر اساس معادله(۱) محاسبه و در جدول(۵) آمده است. بر اساس این معادله، مقدار بازماندگی نسبی تیمار شاهد برابر با صفر و سایر تیمارها با آن مقایسه شدند. تیمار۳ دارای کمترین میزان تلفات و بیشترین بازماندگی را نسبت به سایر تیمارها دارابود ($p<0.05$).

تیمار۱و۲ فاقد اختلاف معنی دار بودند ($p>0.05$). با این وجود، میزان بازماندگی نسبی تیمار ۲ (۱۰.۹۹± ۶.۹-)کمتر از مقدار آن در تیمارشاهد بود.

جدول ۵: تلفات و بازماندگی نسبی ماهیان تیمارهای مختلف در رویارویی با باکتری یرسینیا روکری طی دوره ۲۰ روز*

Table 5: Mortality and Relative Survival of fish in different treatments in challenge with *Y. ruckeri* bacterium during 20 days

تیمارهای آزمایشی			
پارامتر	۱(شاهد)	۲	۳
تلفات(%)	۴۴.۹ ±۳.۵ [b]	۴۸ ±۸.۵[b]	۲۹.۳ ±۴ [a]
بازماندگی نسبی(%)	۰[a]	- ۶.۹ ±۱۰.۹۹ [a]	۳۴.۵ ±۸.۹۴ [b]

*حروف a و b معنی دار بودن را در یک ردیف نشان می دهد.

بحث

پروبیوآنزیم مورد استفاده در این مطالعه، شامل پروبیوتک ها و ترکیبات آنزیمی می باشد. بخش آنزیمی زمینه فعالیت پروبیوتیک ها را بعنوان محرک سیستم ایمنی ماهی فراهم می سازد. پژوهشی توسط حسینی فر و همکارانش مبنی بر بررسی اثرات مکمل‌های غذایی گالاکتوالیگوساکارید (galactooligosaccharides (GOS، باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و ترکیب *P. acidilactici* و GOS در پاسخ ایمنی ذاتی، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد که بر اساس نتایج آن، بالاترین پاسخ ایمنی در تغذیه ماهی با سین بیوتیک مشاهده شد (Hoseinifar *et al*., 2011). بسیاری از محققین بیان ژن های سیتوکین را به عنوان روشی مؤثر جهت سنجش پاسخ های ایمنی پذیرفته اند (Awad *et al*., 2011). این سیتوکین های محرک و بازدارنده به عنوان ژن های تنظیم ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مکانیسم دفاعی ماهی را در رویارویی با ورود و تهاجم باکتری ها تقویت می‌کنند(Kim. & Austin, 2006).

در سال های اخیر پیشرفت های قابل توجهی در شناسایی وجدا سازی ژن های سیتوکین ماهیان به ویژه سیتوکین های پیش التهابی شامل اینترلوکین- یک بتا (IL-1b)، اینترلوکین-۸ (IL-8) و فاکتور نکروز کننده تومور-آلفا (TNF-α) و سیتوکین های ضد التهابی اینترلوکین-۱۰ (IL-10) حاصل شده است (Secombes, 2001; Gioacchini *et al*., 2008; Mulder *et al*., 2007). تأثیر پروبیوآنزیم به عنوان محرک سیستم ایمنی با مقایسه میزان بیان سیتوکین های TNF-α و IL-1β در تیمارهای مختلف آشکار می شود. یافته ها حاکی از دوز زیاد این ترکیب بر بیان ژن های مورد نظر می باشد. به طوری که تیمار ۳ با دوز ۰.۵ گرم در کیلوگرم غذا بیشترین میزان بیان هر دو ژن مورد مطالعه را داشته است. عدم تأثیر قابل توجه مکمل مورد مطالعه در تیمار ۲ بر بیان ژن ها ناشی از دوز کم مکمل در این تیمار و تیمار شاهد بوده است و تأثیر آن وابسته به دوز می باشد. میزان توصیه شده این مکمل توسط شرکت سازنده"XVET GmbH " (آلمان) در دام و آبزیان در محدوده ۰.۵-۰.۳ گرم در کیلوگرم غذا بوده است. بر اساس نتایج این تحقیق، تأثیر ناچیز دوز کم در محیط های آبی به واسطه آب شویی (leaching) مکمل از غذا تشدید می شود. یافته های یررسی تأثیر پروبیوآنزیم بر بیان ژن ها به طور واضح تأثیر وابسته به دز را نشان می دهد و دیگر مطالعات تأثیر وابسته به دز مواد محرک ایمنی را در ماهیان تأیید می کنند (Yuan *et al*.,2008; Awad *et al*., 2011). در تحقیقی، در ماهی کپور معمولی اثرات تزریق پلی ساکارید آستراگالوس (APS) بر بیان ژن‌های پاسخ ایمنی در بخش قدامی کلیه، آبشش و طحال ارزیابی شد. بر اساس نتایج آن، دوز بالایی از APS بیان ژن TNF-α و IL-1b را در بافت آبشش و طحال در سطح بالا نگه داشت در حالی که سطوح mRNA این ژن ها با یک دوز پایین APS به طور معنی‌دار

کاهش یافت (Yuan *et al*., 2008). نسبت بیان ژن های IL-1β، IL-8 و TGFβ در کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در افزودن یک درصد گیاه لوپین (Lupin) به غذای ماهی دارای تفاوت معنی دار بوده ، بطوریکه با افزودن دو درصد این محرک ایمنی تغییر معنی داری حاصل نشد (Awad *et al*., 2011). هم چنین، اثرات عصاره چای سبز بر بیان ژن های سیتوکین در موش به دوز استفاده از آن وابسته بوده است (Lin *et al*., 2004). بنابراین تعیین دوز مناسب در استفاده مؤثر از محرک های ایمنی مهم است.

نسبت بیان ژن IL-1β و TNF-α در کلیه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان پس از تیمار تأثیر مواد محرک ایمنی بر بیان ژن با توجه به دوز استفاده، گونه، شرایط محیطی و زیستی، دوره استفاده، وزن و سن گونه و ژن های مورد بررسی متفاوت است. اغلب سیتوکین ها از بافت های مختلفی تولید شده و عملکرد گوناگونی دارند (Gabay & kushner, 1999). در تحقیقی توسط هوتنهیس و همکارانش، بیان ژن IL1- β ، TNF- α در روده با تجویز خوراکی محرک‌های ایمنی در ماهی کپور معمولی تحت تأثیر قرار نگرفت (Huttenhuis *et al*., 2006). بیان ژن‌های IL-1β(IL)، TNF-α و IL-6 در بررسی تجویز خوراکی محرک ایمنی لیپو پلی ساکارید LPS برای کپور معمولی، ارزیابی شد. نتایج آن نشان داد که بیان ژن IL-1β(IL) و TNF-α تقویت شده است اما بیان ژن IL-6 کاهش یافته است (Kadowaki *et al*., 2013). در یک مطالعه توسط (Tacchi *et al*., 2011) نتایج مطالعات قبلی در مورد تغذیه ماهی از مکمل‌ها (پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، محرک‌های ایمنی، ویتامین ها و نوکلئوتید) به همراه یک رویکرد جدید ژنومی، با استفاده از تجزیه و تحلیل ریزآرایه (microarray)، در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل ژنی کاهش بیان ژن مربوط به پروتئین‌های سیال پلاسما، و ژن های دخیل در پاسخ ایمنی و کاهش گردش پروتئین های پلاسما را نشان داد. در مطالعه‌ای بیان شد که در مورد ژن TNFα در قزل-آلای رنگین‌کمان نتایجی بدست آمده است که نشان می‌دهد این ژن دارای توانایی تنظیم سطح بیان خود در پاسخ به محرک‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج آن، سطح بیان ژن TNFα در ماکروفاژهای بدست آمده از قسمت قدامی کلیه در پاسخ به لیپو پلی ساکارید (LPS) افزایش یافته بود (Zou *et al*., 2002). در یک آزمایش تغذیه بچه ماهیان قزل‌الای رنگین-کمان با غذای حاوی مکمل پروبیوتیک باکتری لاکتو باسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) بیان نسبی ژن های IL1-b، TNF- α در ماهیان تیمار شده نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۱۰ و ۲۵ برابر بود. بر اساس نتایج این مطالعه، میزان بازماندگی ماهیان گروه تیمار در رویارویی با باکتری بیماریزای *Lactococcus garvieae* نسبت به گروه کنترل ۶۱ درصد بود (Perez *et al*., 2011). نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج تحقیقات گذشته مبنی بر افزایش بیان ژن TNF-α نسبت به ژن IL-1β در بخش قدامی کلیه ماهیان در تیمار ۳ (۰.۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا) بوده و بالا بودن بازماندگی در رویارویی با باکتری یرسینیا روکری در این تیمار نسبت به گروه شاهد با افزایش معنی دار بیان ژن TNF-α منطبق است. تزریق باکتری یرسینیا روکری به حفره شکمی ماهی قزل آلا منجر به یک سری واکنش های ایمنی از جمله بیان ژن های مربوط به ایمنی و ژن های گیرنده سلولی و تولید ایمنوگلبولین می شود (Raida & Buchmann, 2008). از طرف دیگر، با وجود عدم مطالعه هم زمان بافت های دیگر، با توجه به تفاوت بیان ژن ها در بافت های مختلف، شدت بیان ژن IL-1β می تواند در دیگر بافت ها مشاهده گردد. IL-1β یک سیتوکین پیش التهابی بالقوه در آبزیان بشمار می رود (Lindenstrom *et al*., 2004) و باعث افزایش مهاجرت لکوسیت ها از کلیه به طحال می گردد (Hong *et al*., 2003). ظاهراً محل اصلی بیان ژن IL-1β در ماهیان استخوانی، علاوه بر ماکروفاژها، سلول های اپیتلیالی و فیبروبلاست ها هستند (Chaves *et al*., 2004; pelegrin *et al*., 2003). به عنوان مثال، در آزمایش بررسی میزان بیان ژن IL-1β در بافت کلیه و طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از واکسیناسیون در مقابل بیماری دهان قرمز روده ای، حاکی از افزایش بیشتر میزان بیان این ژن در بافت طحال نسبت به کلیه بود (Raida & Buchmann, 2007). یا بعد از تغذیه پروبیوتیک به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان TNF1، TNF2و TGFβ در کلیه و طحال ماهی متفاوت بود (Panigrahi *et al*., 2007). در کپور، اثرات آستراگالوس پلی ساکارید بر بیان ژن لیزوزیم در بافت های آبشش و طحال افزایش و در کلیه تغییراتی نداشته است (Yuan *et al*., 2008). نتیجه مشابه

این در افزودن نوکلوتید به میزان ۰.۴ درصد به غذای ماهی کفشک با افزایش بیان ژن ایمنوگلبولین در آبشش و طحال و کاهش بیان آن در کلیه اتفاق افتاده است(Low et al., 2003). در مطالعه دیگری در بخش قدامی کلیه، بیان ژن TNF-α در پاسخ به دوز پایین استراگالوس پلی ساکارید بشدت کاهش یافته، درحالی که در آبشش این نمونه ها، بیان ژن لیزوزیم نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود (Yuan *et al.*, 2008). در مطالعه بررسی اثر چای سبز بر بیان ژن های واسطه ایمنی، افزایش بیان ژن ها در کبد و طحال بیشتر مشاهده گردید در حالی که بخش قدامی کلیه اندام اصلی در تولید ایمنی می باشد (Nootash *et al.*, 2013). با این وجود، شناخت دلایل تفاوت بیان ژن های ایمنی در بافت های مختلف با استفاده از انواع محرک‌های ایمنی توجه ویژه‌ای می‌طلبد.

در مطالعات دیگری، تأثیر مکمل های غذایی بر الگوی بیان ژن‌ها در دوره های زمانی مختلف قابل توجه می‌باشد. در مطالعه ای، طی یک هفته تغذیه میگوی وانومی (*Litopenaeus vannamei*) با بتا-۱،۳- گلوکان، برخی ژن های ایمنی نظیر لیزوزیم در زمان های مختلف نمونه برداری دارای الگوی بیان متفاوت بودند (Wang *et al.*, 2008). در آزمایش تیمار لکوسیت های بخش قدامی کلیه ماهی کاد اقیانوس اطلس با باکتری زنده (*Pseudomonas sp.*) بیان ژن گرانزیم (granzyme) بعد از ۳ ساعت افزایش یافته و پس از گذشت ۲۴ ساعت کاهش یافته بود (Lazado *et al.*, 2010). تغییر الگوی بیان ژن ها در دوره های مختلف نمونه برداری در چنین مطالعاتی می تواند جهت تبیین دلایل نتایج متفاوت و حتی متضاد در هنگام استفاده از گونه های متفاوت ماهی،انواع ژن ها، زمان های مختلف نمونه برداری و نمونه برداری از بافت های مختلف مفید باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که استفاده از مکمل پروبیوآنزیم به عنوان یک ماده محرک ایمنی در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به میزان ۰.۵ گرم در کیلوگرم غذا باعث افزایش مقاومت به بیماری دهان قرمز روده ای (yersiniosis) شده و بیان برخی ژن های واسطه ایمنی بویژه TNF-1α را در بخش قدامی کلیه تقویت می کند. با این وجود، انجام تحقیقات مربوط به تأثیر این ماده بر بیان ژن های مورد مطالعه در بافت های مختلف و نمونه برداری در دوره های زمانی متفاوت ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری تشکر و قدردانی به عمل می آید. از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر بخاطر پشتیبانی مالی از این پژوهش تقدیر و تشکر می شود.

منابع

آقاجانی، م.، واعظ مهدوی، م.ر.، غضنفری، ط.، خلیلی، م.، عظیمی، آ. و ارباب سلیمانی، س.، ۱۳۹۱. اثرات موقعیت اجتماعی غالب/مغلوب بر پاسخ درد و تغیرات سرمی سیتوکاین‌های پیش التهابی در موش‌های آزمایشگاهی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، دوره ۱۶، شماره ۴، صفحات ۳۹۲-۳۸۰.

Amar, EC., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immunol, 16: 527-537. DOI: 10.1016/j.fsi.2003.09.004

Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., USA, 1981. Dev Biol Stand, 49: 447-454

Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H. and Hirono, I., 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives, Fisheries for Global Welfare and Environment, Memorial Book of the 5th World Fisheries Congress, Terrapub: Tokyo, Japan. pp. 263-276.

www.terrapub.co.jp/onlineproceedings/fs/wfc2008

Awad, E., Mitchell, WJ. and Austin, B., 2011. Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis, 34: 629-634.
DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01271.x

Carnevali, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture, 258: 430-438.
doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.025.

Chaves-Pozo, E., Pelegrin, P., Garcia-Castillo, J., Garcia-Ayala, A., Mulero, V. and Meseguer, J., 2004. Acidophilic granulocytes of the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) produce interleukin-1b following infection with *Vibrio anguillarum*. Cell Tissue Res, 316: 189-195.
DOI: 10.1007/s00441-004-0875-9

Chomczynski, P. and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc, 1: 581-585.
DOI: 10.1038/nprot.2006.83.

Gabay, C. and Kushner, I., 1999. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. New England Journal of Medicine, 340: 448-454.
DOI: 10.1056/NEJM199902113400607

Gioacchini, G., Smith, P. and Carnevali, O., 2008. Effects of Ergosan on early immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles to enteric red mouth (ERM) vaccine. Vet Imm Path, 123(3-4): 215-222.

Gomez, G.D. and Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunol Med Microbiol, 52: 145-154.
DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x

Gruss, H.J., 1996. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. International Journal of Clinical and Laboratory Research, 26: 143-159.

Hong, S., Peddie, S., Campos-Perez, J.J., Zou, J. and Secombes, C.J., 2003. The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1beta on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev Comp Immunol, 27(9): 801–812. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818637.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Rostami, H.K. and Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal micro biota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquac Nutr, 17: 498-504. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2010.00828.x

Huang, C.F., Lin, S.S., Liao, P.H., Young, S.C. and Yang, C.C., 2008. The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine. Cell Mol. Immunol, 5: 23-31.
DOI: 10.1038/cmi.2008.3

Hunt, M., 2010. Real time PCR. Microbiology and Immunology Online. Columbia: Board of Trustees of the University of South Carolina. www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm.

Huttenhuis, H.B., Ribeiro, A.S., Bowden, T.J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A.J. and Rombout, J.H., 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and shellfish immunology, 21: 261-271. doi.org/10.1016/j.fsi.2005.12.002.

IFSA., 2015. Iran fisheries organization, Deputy of planning and development manager, Office of Budget and Planning, 33 P.

Kadowaki, T., Yasui, Y., Nishimiya, O., Takahashi, Y., Kohchi, C., Soma, G.I. and Inagawa, H., 2013. Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish & shellfish immunology. 34: 1569-1575. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.03.372

Kim, D.H. and Austin, B., 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. Vet Immunol Immunopathol, 114: 297-304.

Lazado, C.C., Caipang, C.M., Gallage, S., Brinchmann, M.F. and Kiron, V., 2010. Expression profiles of genes associated with immune response and oxidative stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* head kidney leukocytes modulated by live and heat-inactivated intestinal bacteria. Comp. Biochem. Physiol, Part B.155: 249-255. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.11.006

Lin, S.J., Tsai, J.H., Tsai, C.H., Lin, Y.C., Hsu, H.T., Xu, F.L. and Yang, C.C., 2004. The in vivo effects of cytokines modulation for BALB/C mice fed with a traditional combined Chinese herb-soaked solution, Yi-Fey Ruenn-Hou tea. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 26: 435–444. dx.doi.org/10.1081/IPH-200026897

Lindenstrom, T., Secombes, CJ. and Buchmann, K., 2004. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. Vet Immunol. Immunopathol, 97: 137–148.

Liu, W. and Saint, D.A., 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Analytical biochemistry, 302: 52-59. doi:10.1006/abio.2001.553

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402-408.

Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C. and Secombes, C.J., 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. Aquaculture, 221: 23-40.

Mulder, I.E., Wadsworth, S. and Secombes, C.J., 2007. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. Fish and Shellfish Immunol, 23: 747-759. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.02.002

Nootash, S., Sheikhzadeh, N., Baradaran, B., Ali Khani , O., Maleki Moghadam, M. R., Katayoon, N., Monfaredan, A., Aghebati, L., Zare, F. and Shabanzadeh, S., 2013. Green tea(*Camellia sinensis*) adminstration induces expression of immune relevent genes and biochemical parameters in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunol, 35: 1916-1923. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.030

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. and Aokib, T., 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout Oncorhynchus mykiss upon probiotic feeding. Dev Comp Immunol, 31: 372-382. DOI: 10.1016/j.dci.2006.07.004

Pelegrin, P., Chaves-Pozo, E., Mulero, V. and Meseguer, J., 2003. Production and mechanism of secretion of interleukin-1b from the marine fish gilthead seabream. Dev Comp Immunol; 28:229-237. doi:10.1016/j.dci.2003.08.002

Pérez-Sánchez, T., Balcázar, JL., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, I., 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish and Shellfish Immunol, 31: 196-201. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.05.005

Pettersson, A., 2005. Extracellular enzyme system utilized by the fungas(*sporotrichum pulverulentum*) for breakdown of cellulase.Europian Journal of Biochemistry, 5: 193-206.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30: 1-10.

Pionner, N., Falco, A., Miest, J., Frost, P., Irnazarow, I., Shrive, A. and Moole, G., 2013. Dietry beta-glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during an Aeromonas salmonicida infection. Fish Shellfish Immunology, 34: 819-831.

Raida, M.K. and Buchmann, K., 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. Diseases of Aquatic Organisms, 77: 41–52. DOI: 10.3354/dao01808

Raida, M.K. and Buchmann, K., 2008. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. Fish Shellfish Immunol, 25: 533-541. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.07.008

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L. and Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience letters, 339: 62-66.

Ringo, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H. and Davies, S.J., 2014. Prebiotics in finfish: an update.In: Merrifield D, Ringø E, editors. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing.

Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M. and Laing, K.J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. Dev Comp Immunol, 25: 713-723.

Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S. and Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunol, 37(1): 60–65. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.027

Stevenson, R.M.W., 1997. Immunization with bacterial antigens: Yersiniosis. Dev Biol Stand, 90: 117–124.

Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J. and Herrmann, N., 2010. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. Biological psychiatry. 68: 930-941.
DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.06.012

Tacchi, L., Bickerdike, R., Douglas, A., Secombes, C.J. and Martin, S.A., 2011. Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish & shellfish immunology. 31: 704-715.
DOI: 10.1016/j.fsi.2011.02.023

Treves-Brown, K.M., 2000. Applied fish pharmacology. Springer pub., 309 P. [ISBN 978-94-017-0761-9]

Verlhac Trichet, V., 2010. Nutrition and immunity: an update. Aquacult Res, 41: 356-372.
DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x

Wang, L. and Stegemann, J.P., 2009. Extraction of high quality RNA from Polysaccharide matrices using cetlytrimethylammonium bromide. Elsevier Ltd, Biomaterials, 31: 1612.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.024

Wang, Y.C., Chang, P.S. and Chen, H.Y., 2008. Differential time-series expression of immunerelated genes of Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei in response to dietary inclusion of b-1, 3-glucan. Fish and Shellfish Immunol, 24: 113-21.
DOI: 10.1016/j.fsi.2007.09.008

Wiame, I., Remy, S., Swennen, R. and Sági, L., 2000. Irreversible heat inactivation of DNase without RNA degradation. Biotechniques, 29: 252-256.

Winfrey, M.R., Rott, M.A. and Wortman, A.T., 1997. Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 369 P. [ISBN-13: 978-0132700344]

Yuan, C., Pan, X., Gong, Y., Xia, A., Wu, G., Tang, J. and Han, X., 2008. Effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. Int. Immunopharmacol, 8: 51-58.
DOI: 10.1016/j.intimp.2007.10.009

Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., Soma, G.I., Ototake, M., Nakanishi, T. and Ellis, A., 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology, 26: 161-172.
DOI: 10.1016/S0145-305X(01)00058-1

Effect of the food supplemented probioenzyme on expression of immune-related genes and redmouth disease (yersiniosis) control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Rastiannasab A.[1]; Mousavi S.M.[1*];Zolgharnein H.[1]; Hosseinzadeh Sahafi H.[2]

[*] seied1356@yahoo.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
2-Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) P.O. Box 149/14965 Tehran, Iran

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effect of probioenzyme on the control of yersiniosis as well as to assess the impact of probioenzyme on the expression of immune-related genes in the head kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Probioenzyme was supplemented at 0.3, and 0.5g/kg diet and fed to fish (average weight: 26 g) in 200l tanks for 60 days. At the end of the feeding period, fish were challenged with *yersinia ruckeri*. Only the fish fed the diet containing high dose of probioenzyme showed significantly ($p<0.05$) improved protection against *y. ruckeri* compared to the low dose and control groups. Subsequently, real-time PCR was employed to determine the mRNA levels of IL-1β and TNF- α cytokines in the head kidney of the control and probioenzyme groups. High dose of probioenzyme significantly ($p<0.05$) up-regulated the TNF- α transcription in the kidney compared with low dose and control groups. Meanwhile, the probioenzyme didn,t change nterleukin-1β mRNA level in the kidney in treatment groups compared with control group ($p>0.05$). Only, high dose of probioenzyme noticeably differs IL-1β and TNF-α gene expressions. Based on results, expression levels of studied cytokines were different, dose-dependent and tissue-specific. Results showed that cytokine gene expressions, especially TNF-α, in kidney may affect fish disease resistance. Present study suggests that probioenzyme especially at 0.5g/kg feed may effectively stimulate the immune system and enhance disease resistance in rainbow trout. Meanwhile, it is necessary to study effects of probioenzyme on cytokines in various tissue and different growth period of breeding species.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Probioenzyme, Gene expression, Cytokine, Yersiniosis

*Corresponding author