مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ١، بهار ١٣٩٤، ٧-١

بررسی بیان مارکر سلولهای بنیادی SALL4 در مزنسفالن طی تکوین‌جنین جوجه

ملیحه بهادری .MSc[1] ، سعیده ظفر بالانژاد .Ph.D[2] محمد مهدی فرقانی فرد.Ph.D [1*]

١- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان ، گروه زیست شناسی، دامغان، ایران
٢- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: forghanifard@gmail.com

تاریخ دریافت: ١٣٩٢/٩/١٧ تاریخ پذیرش: ١٣٩٣/٤/٣١

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی کمی بیان mRNA ژن SALL4 در مزنسفالن طی مراحل رشد و نمو جنینی جوجه است .

مواد و روش‌ها : در این پژوهش تجربی از تخم مرغ‌های نطفه دار انکوبه شده در حرارت٣٧ تا ٣٧/٥ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٦٠ تا ٦٥ درصد استفاده شد. پس از شروع رشد و نمو جنینی قسمتی از بافت پروزنسفالن مغز به‌طور روزانه از تخم مرغها جمع آوری گردید، از بافت تفکیک شده Total RNA استخراج و سنتز cDNA انجام شد. cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو برای بررسی کمی بیان SALL4 mRNA؛ به‌روش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از Real-time PCR رونوشت‌های SALL4 در بافت مزونسفالون مغز در طی تکوین جوجه نشان می‌دهد که بیان ژن SALL4 در طول رشد و نمو جنین در مزنسفالن متغیر است، درحالی‌که بیان mRNA ژنSALL4 در طول رشد و نمو جنینی بررسی‌شد، بیشترین تعداد نسخه‌هایmRNA ژنSALL4 از لحاظ کمی در نوزدهمین روز جنینی یافت شد.

نتیجه گیری: در بررسی سطح بیان mRNA ژنSALL4 طی مراحل مختلف رشد و نمو جنینی جوجه، از روی شواهد می‌توان پیش‌بینی نمود که احتمالا ارتباطی بین بیان SALL4 درمراکزعصبی مزنسفالن مغز و تکامل اندام‌هایی بینایی وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، تکوین جنین، مزنسفالن،Real time PCR، SALL4

مقدمه

یکی از ابزارهای بیولوژیکی مهم در جنین شناسی، مطالعه جنین جوجه می‌باشد که به دلایل متعددی حائز اهمیت است، تشابه زیادی در نمو جنینی انواع پرندگان بالاخص جنین جوجه با انواع پستانداران دیده می‌شود. علاوه بر این با به‌وجود آوردن سیستم مصنوعی جهت رشد و نمو جنینی مطالعه آن‌ها در آزمایشگاه به‌سهولت امکان پذیر است؛ این موجود برای سال‌های زیادی از پیشرفته‌ترین مدل‌های مناسب برای جنین شناسی تجربی بوده است و به این ترتیب نشان دهنده مکمل مهمی برای سیستم‌های نظیر مدل موش می‌باشد (۱).

با استفاده از فهرست ساده‌ای از آزمایش‌ها، جوجه سهم مهمی در درک تنظیم تکامل اعضا مختلف نظیر تشکیل سیستم عصبی، استخوان‌بندی، اندام زایی، الگوهای جنینی، تشکیل سر و صورت، تکامل عروق، رگ‌زایی، بهبود زخم و ایمونولوژی دارد (۲). پیدایش و نمو مغز جوجه در اوایل دوره جنینی رخ می‌دهد و بخش‌های مختلف مغز جوجه شامل پروزنسفالن، مزنسفالن و رومبنسفالن شکل می‌گیرد (۳). در روزهای ۳و۴ جنینی دو نیمکره حبابی شکل مغز (telencephalon) درمنطقه‌ای واقع در پروزنسفالون از لوله عصبی تشکیل می‌شود و در روز ۴ مزنسفالون به عنوان ساختار مرکزی بزرگی شروع به رشد می‌کند (۴).

خانواده ژن SALL نقش اساسی درطول تکامل حیوانات دارند، ژن‌های مربوط به SALL در c.elegans، ماهی، قورباغه (زنوپوس)، موش و انسان تشخیص داده شده است (۵). تاکنون سه عضو از خانواده ژنSALL شامل SALL1، SALL2، SALL4 در جوجه شناسایی شده است (۶). ژن‌های SALL4 وSALL1 درطول رشد و نمو جنینی در مغز، اندام‌های در حال رشد و قوس‌های احشایی به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند، محل قرارگیری ژن SALL4 درناحیه20q13.2 است، ژن SALL4 در بازوی بلند (q) کروموزوم ۲۰ و در موقعیت۱۳/۲ قرارگرفته است (۷). در سلول‌های بنیادی ژن SALL4 نقش اساسی در وقایع نمو جنینی و همچنین تعمیر و نگه‌داری سلول‌های پرتوان بنیادی جنینی برعهده دارد، بیان ژن SALL4 منتهی به تکثیر بسیار زیاد سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود به‌طوری‌که خاموش‌سازی این ژن در موش سبب مرگ موجود در روز ۷ جنینی می‌شود (۸). ژن SALL4 یک مارکر جدید و حساس در تشخیص ویژه تومورهای سلول زایشی اولیه‌ی تخمدان و تومورهای سلول جنسی بیضه‌ای است (۹).

با توجه به نقش ژن SALL4 در رشد و نمو دوران جنینی، در این مطالعه به ارزیابی بیان ژن SALL4 در بافت مزنسفالن مغز جوجه در مراحل مختلف جنینی با روش Real Time PCR پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری بافت مغز: تخم مرغ‌های نطفه دارتهیه شده از تعاونی مرغ‌داران طوس مشهد، نژاد ROSS جهت پرورش و سپس استخراج بافت مغز در داخل دستگاه جوجه کشی مدل (RCOM Digital incubator،korea) با ۳۷ تا ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین۶۰ تا ۶۵- قرارداده شد. بافت مغز در زیر استرئومیکروسکوپ شامل پروزنسفالن، مزنسفالن و رومبنسفالن است، از روز۴ جنینی به جداسازی بافت مزانسفالن پرداخته و از ۵ الی۶ نمونه در روزهای ابتدایی جنینی استفاده گردید و حجم بافت مزنسفالن جهت استخراج RNA حدود۵۰ میلی‌گرم در هر نوبت استخراج است با توجه به اینکه در روزهای نزدیک به انتها رشد و نمو مزنسفالن افزایش بیشتری دارد از۲ الی۳ نمونه استفاده گردید، پس از جدا کردن مزونسفالن، بافت در درون محلول RNAlater (ziestbaran، USA) قرارداده شده و دردمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

استخراج RNA از بافت مزونسفالن: استفاده ازRNA سالم جهت به‌کارگیری درروش‌های ژنتیک مولکولی مانند میکرواری Real time PCR یاRT PCR کمی، ضروری است. استفاده ازRNA با کیفیت پایین، ممکن است نتایج بعدی حاصل از کار بر روی این RNA را تحت تاثیر قراردهد. استخراج RNA با استفاده از دستورالعمل کیت تهیه شده از شرکت دنا زیست آسیا و برای هر روز جنینی طی سه مرحله تکرارگردید. بعد از استخراج، RNA درآب فاقد RNAase دردمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شود.

سنتز cDNA: RNAهای استخراج شده در روزهای مختلف بافت مزنسفالن مغز (E4-E20) با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت پارس توس جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات لازم برای سنتز cDNA با حجم نهایی۲۰ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر RNATotal، ۱میکرولیتر Oligodt، ۴

میکرولیتر sterilized D.W که در دمای۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در مرحله بعدی ۱۰ میکرولیتر RT-preMix(2X) به ترکیبات اولیه اضافه گردید و مجددا دردمای۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه قرار داده شد، سپس دستگاه برای مدت ۶۰ دقیقه دردمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و در مرحله آخر دستگاه برای مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

بهینه سازی شرایط RT-PCR برای تکثیر ژن SALL4: واکنش RT-PCR طبق دستور العمل کیت تهیه شده از شرکت پارس توس انجام شد به‌طوری‌که Mastermix با حجم نهایی ۲۹ میکرولیتر تهیه شده و شامل بافر X ۱۰ به‌میزان۳ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱میکرولیتر $Mgcl_2$، پرایمر۲میکرولیتر، ۰/۲میکرولیترآنزیم DNApolymerase Taq، ۲۱/۳ میکرولیتر sterilized D.W و۱میکرولیتر cDNA است. پس از آماده‌سازی مواد جهت RT-PCR تنظیمات دستگاه ترموسایکلر شامل ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی (Denaturation) به‌مدت ۳۰ ثانیه دردمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال(Annealing) به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extention) به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

انجام Real time PCR: توالی پرایمرهایی‌که برای بررسی ژن SALL4 استفاده شدند، شامل پرایمرهایی جهت Real time PCR و پرایمرهای مربوط به ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی جهت نرمال سازی است که از شرکت تکاپو زیست طبق جدول ۱ تهیه گردید.

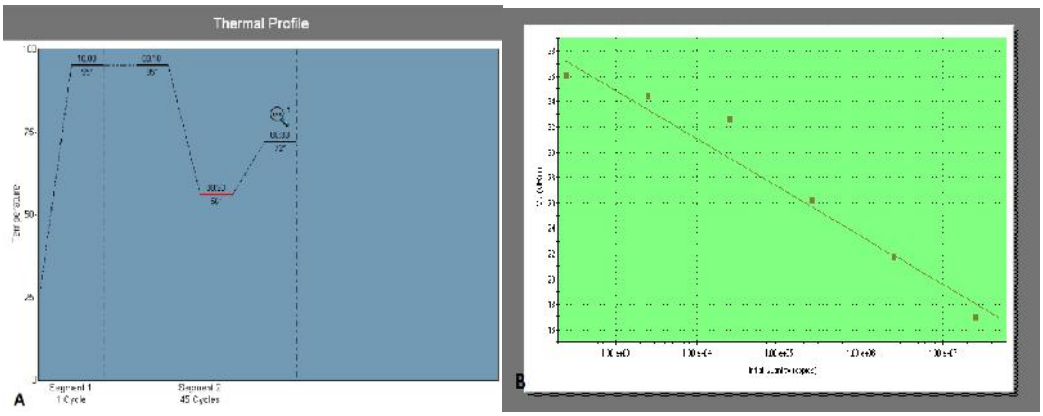
جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده جهت واکنش Real time PCR

Real –time PCR primer	5´→3´
SALL4 Forward	5-CGAAGGGGAACCTGAAGGTC-3
SALL4 Reverse	5-GAGATCTCGTTGGTCTTCATTG-3
GAPDH primer	5´→3´
GAPDH Forward	5-AGATGGTGAAAGTCGGAGTCA-3
GAPDH Reverse	5-ATCATTGATGGCCACCACTTG-3

مواد مورد نیاز جهت انجام Real time PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Sybergreen، ۰/۴ میکرولیتر ROX dye، ۰/۶ میکرولیتر پرایمر،۷ میکرولیتر Sterilized D.W. و۲ میکرولیتر cDNA است.

با استفاده از پرایمرهای Real time PCR و استفاده ازSybergreen، بیان ژن SALL4 در نمونه های cDNA تهیه شده از بافت مغز در روزهای مختلف جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برنامه دمایی که دستگاه برای انجام Real time PCR تنظیم شد شامل یک مرحله ۱۰دقیقه ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌های دمایی شامل ۱۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که در۴۵ سیکل تکرار گردید (شکل ۱، A). همراه با واکنش Real time PCR منحنی استاندارد و تکثیر ژن SALL4 بر اساس میزان فلورسانت ساطع شده نیز رسم گردید (شکل ۱، B).

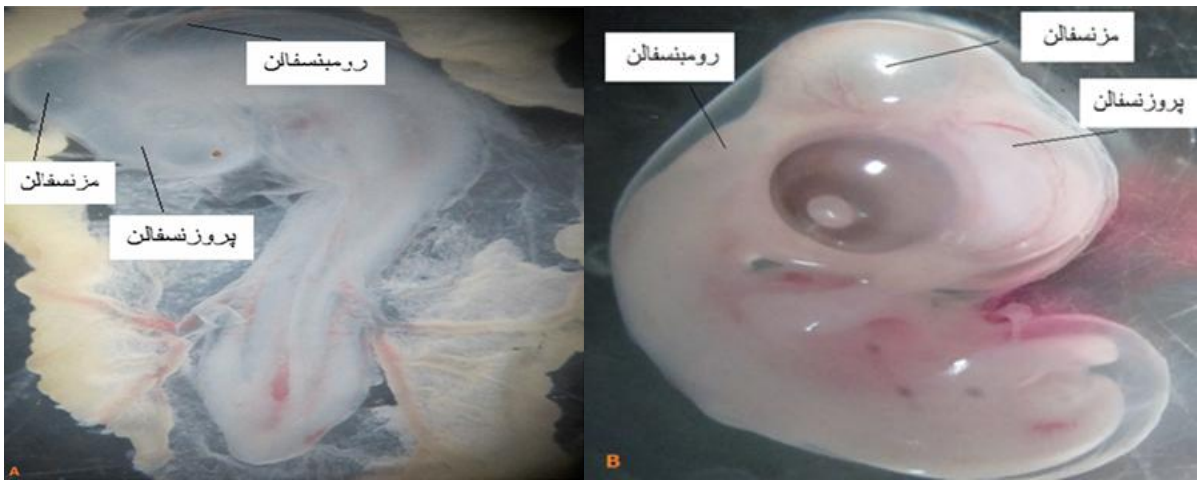


شکل ۱: A) تنظیمات دستگاه برای برنامه دمایی جهت انجام Real time PCR، B) منحنی استاندارد سنجش کمی SALL4 RNA شامل رقت های۳-۱۰-۷-۱۰ و محاسبه تعداد کپی‌های ژنی است.

آنالیزهای آماری: نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری Chi-square و t-test در محیط نرم افزاری SPSS، تجزیه و تحلیل شدند.

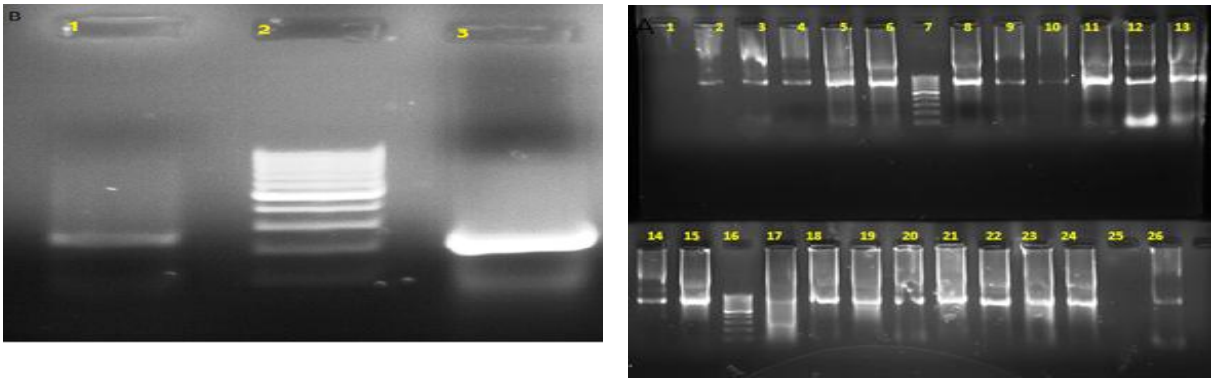
نتایج

براساس مطالعات آناتومیکی و استناد به جدول هامبورگ-همیلتون (H-H) با استفاده از استرئومیکروسکوپ استخراج از بافت مزنسفالن صورت پذیرفت، مزنسفالن از روز۳ جنینی شروع به بزرگتر شدن کرده و از قسمت خلفی به ناحیه باریکی از رومبنسفالن متصل می‌گردد، تغییرات مورفولوژی مزنسفالن در روزهای مختلف جنینی در شکل۲ (روز۳ و۶ جنینی) مشخص شده است .



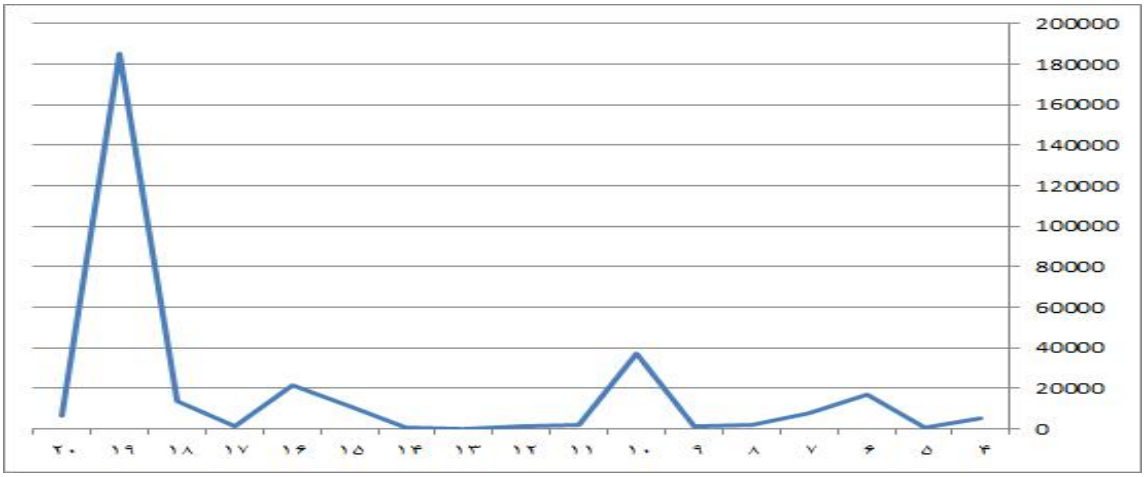
شکل ۲: A) جنین ۷۲ ساعت جوجه با درشتنمایی X۱۲/۵، B) جنین ۶ روزه با درشتنمایی ×۱۰ (تصاویری از تغییرات مزنسفالن درطی رشدو نمو جوجه)

با استفاده ازRNA استخراج شده برای بهینه سازی واکنش PCR و انتخاب سیکل مناسب، قبل از انجام واکنش PCR Total RNA، حاصل از مزنسفالن در طول رشد و نمو جنین جوجه درشرایط RNase-free تهیه گردید و برای بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده در روزهای رشد و نمو جنینی مزنسفالن از ژل آگارز استفاده شد، سپس سنتز cDNA از Total RNA بافت جنینی مزنسفالن برای استفاده به‌عنوان الگو در Real time PCR انجام گرفت شده و از ژن GAPDH به‌عنوان نرمالایز استفاده شد (شکل-۳).



شکل۳: A) الکتروفورز RNA های استخراج شده در روزهای جنینی جهت بررسی کیفی حضور باندهای ۲۸S و ۱۸S بر روی ژل آگارز، B) الکتروفورز cDNA های مزنسفالن مغز جوجه (روز ۱۹ جنینی) وژن GAPDH بر روی ژل آگارز جهت استفاده درReal time PCR چاهک ۱ مربوط به ژن GAPDH ، چاهک ۲ مربوط به نشانگر و چاهک ۳ مربوط به ژن SALL4 می‌باشد.

نتایج حاصل از Real time PCR بافت مزنسفالون مغز در طی تکوین جوجه نشان می‌دهد بیان ژن SALL4 درطول رشد و نمو جنین در مزنسفالن متغیر است به‌طوری‌که در روز ۶ جنینی۱۰۴ × ۱/۷۲، روز۱۰ جنینی۱۰۴× ۳/۷۴، روز۱۶ جنینی۱۰۴ × ۲/۱۸ و در روز ۱۹جنینی۱۰۴×۱۸/۵۴ نسخه‌های ژنی را نشان می‌دهد که بیان بالاتری نسبت به روزهای دیگر جنینی دارد، بیان این ژن در روز ۱۸ جنینی در بافت مزنسفالن مغز شروع به افزایش و در روز ۱۹ به حداکثر بیان خود می‌رسد (نمودار ۱).



نمودار ۱: رشد و نمو در مزونسفالن مغز جنین جوجه در روزهای تکوین و میزان بیان ژن SALL4

بحث

ژن SALL4 ارائه دهنده دستور العمل برای ساخت پروتئین‌هایی است که در تشکیل بافت‌ها و اندام‌ها در طی رشد و نمو جنین نقش دارند، خانواده SALL از عوامل رونویسی است به این معنی که به مناطق خاصی از DNA متصل می‌شود و به کنترل فعالیت ژن‌های خاصی کمک می‌کنند، براساس عمل‌کرد پروتئین‌های مشابه SALL4 در دیگر ارگانسیم‌ها مانند گوره خرماهی و موش به نظر می‌رسد، این پروتئین نقش حیاتی در اندام‌های در حال رشد ایفا می‌کند، این پروتئین برای رشد عصب‌های تحت کنترل حرکات چشم و برای جداسازی دیواره بین دهلیزهای قلب نقش کلیدی دارد (۱۰). با توجه به نتایج به‌دست آمده بیان این ژن درطی۳ روز انتهایی تکوین مزنسفالن جنین جوجه، افزایش بیشتری نشان می‌دهد به‌طوری‌که در طول روز۶ جنینی نیز افزایش دارد؛ و این زمان مطابق با تمایز لوب‌های بینایی می‌باشد (۱۱).

در تحقیق حاضر بیان ژن SALL۴ در بافت مزنسفالن مغز جنین جوجه با استفاده از روش Real time PCR در طول رشد و نمو این موجود مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات بیان این ژن در طی تکوین این بافت ارزیابی‌گردید، به‌طوری‌که بیشترین بیان در روز ۱۹جنینی مشاهده شد.

ژنSALL4 در برخی از مسیرهای سیگنالینگ در طول مهاجرت سلول‌های تاج عصبی و تشکیل قلب نقش دارند (۱۲-۱۴)، SALL4 در طی مراحل ابتدایی رشد و نمو جنینی در توده سلول‌های داخلی بلاستوسیست و ترفواکتودرم و همچنین در مراحل پایانی جنینی در تشکیل لوله عصبی، تکوین مغز، قوس‌های ریوی و جوانه اندام‌ها دخالت دارد، جهش درSALL4 طی اوایل دوران بارداری، سبب تغییر شکل در روده جنین و فقدان در بسته شدن لوله عصبی می‌شود (۸). Nanog و SALL4 به‌ترتیب فاکتورهای کلیدی در حفظ مرحله عدم تمایز و تکثیر سلولی می‌باشند خاموش شدن بیان ژن SALL4 منتهی به تکثیر بسیار زیاد سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود و در صورت از بین رفتن SALL4 موش‌ها قادر به زنده ماندن تا روز ۷ جنینی نمی باشند (۱۵).

میزان بیان mRNA، SALL4 در سرطان‌های پستان به‌وسیله روش RT-PCR روی نمونه بافت‌های سرطانی و غیرسرطانی به‌دست آمده از بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام گرفته است که سطح بیان mRNA، SALL4 در بافت‌های سرطانی به‌طور قابل توجهی بیشتر از بافت‌های غیر سرطانی بود، میزان بیان Nanog در سلولهای سرطانی بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد. تنظیم متقابل بیان ژن، بین SALL4 و

Nanog که در سلول‌های بنیادی موش مشاهده شده‌اند ممکن است در انسان هم اتفاق بیافتد به این ترتیب این امکان وجود دارد که چندین مولکول مرتبط سلول‌های بنیادی با همکاری این ژن نقش اساسی در رفتار سلول‌های سرطانی انسان را داشته باشند (۱۰).

نتیجه گیری

با توجه به اینکه بیشترین بیان در روز ۱۹ جنینی در مزنسفالن رخ داده است و این قسمت مغز دارای مراکز تطبیق و انعکاس برای پیام‌های بینایی‌است تکوین کامل مراکز انعکاسی و تطابق و تمایز لوب‌های بینایی در طی روزهای پایانی انجام یافته است. با مقاسیه بیان این ژن در روزهای مختلف جنینی در طی مراحل تکوین مزنسفالن جنین جوجه، در روزهای ابتدایی جنینی‌که مغز در حال‌تشکیل می‌باشد، نوسانات زیادی در بیان ژن SALL۴ در بافت مزنسفالن مغزمشاهده نشد، در حالی‌که در روز۱۹ جنینی که رشد و نمو مزنسفالن در حال تکمیل است بیان این ژن افزایش بیشتری نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد افزایش ناگهانی بیان این ژن در روزهای آخر جنینی در مزنسفالن که مرکز انعکاس‌های بینایی است به هدایت و پردازش اطلاعات حسی در این بخش و ارتباط بین اندام‌های بینایی و مراکز عصبی جهت کنترل سیستم بینایی مربوط باشد که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاری و مساعدت‌های خانم‌ها مریم خالقی زاده و سیما اردلان ابراز داشته و همچنین از پرسنل پژوهشکده بوعلی مشهد بخش ژنتیک انسانی و همکاران آزمایشگاه زیست شناسی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در اجرای این پژوهش نهایت سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Agudo D, Gomez-Esquer F, Diaz-Gil G, Martinez-Arribas F, et al. Proteomic analysis of the Gallus gallus embryo at stage-29 of development. Proteomics. 2005; 5(18): 4946-57.

2. Wang X, Erf GF. Melanocyte-specific cell mediated immune response in vitiliginous Smyth line chickens. Journal of autoimmunity. 2003; 21(2): 149-60.

3. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. Neuropsychology review. 2010; 20(4): 327-48.

4. Henshel DS, Martin JW, DeWitt JC. Brain asymmetry as a potential biomarker for developmental TCDD intoxication: a dose-response study. Environmental health perspectives. 1997; 105(7): 718-25.

5. Gassei K, Orwig KE. SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. PLoS One. 2013;8(1): e53976.

6. Sweetman D, Smith T, Farrell ER, Chantry A, et al. The conserved glutamine-rich region of chick csal1 and csal3 mediates protein interactions with other spalt family members. Implications for Townes-Brocks syndrome. The Journal of biological chemistry. 2003; 278(8): 6560-6.

7. Gao C, Kong NR, Chai L. The role of stem cell factor SALL4 in leukemogenesis. Critical reviews in oncogenesis. 2011; 16(1-2): 117-27.

8. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, et al. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. Development (Cambridge, England). 2006; 133(15): 3005-13.

9. Cao D, Guo S, Allan RW, Molberg KH, et al. SALL4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguishing yolk sac tumor from clear cell carcinoma. The American journal of surgical pathology. 2009; 33(6): 894-904.

10. Warren M, Wang W, Spiden S, Chen-Murchie D, et al. A Sall4 mutant mouse model useful for studying the role of Sall4 in early embryonic development and organogenesis. Genesis (New York, NY: 2000). 2007; 45(1): 51-8.

11. Bellairs, R, Osmond, M.The Atlas of Chick Development; 2th Ed; London: Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, UK; 2005.

12. Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2000; 218(2): 383-93.

13. Delot EC, Bahamonde ME, Zhao M, Lyons KM. BMP signaling is required for septation of the

outflow tract of the mammalian heart. Development (Cambridge, England). 2003; 130(1): 209-20.

14. Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, et al. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. The American journal of surgical pathology. 2009; 33(7): 1065-77.

15. Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. Oncology reports. 2011; 26(4): 965-70.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2015; 6(1): 1-7

Original Article

Expressional Analysis of Stem Cell Marker SALL4 in Mesencephalon during Chicken Embryogenesis

Bahadori M, M.Sc.[1], Zafar Balanejad S, Ph.D.[2], Forghanifard MM, Ph.D.[1*]

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad university, Damghan, Iran
2. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad university, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: forghanifard@gmail.com

Received: 9 Dec. 2013 Accepted: 22 Jul. 2014

Abstract

Aim: Our aim in this study was to analyze and quantify mRNA expression of SALL4 in mesencephalon, during different stages of chicken embryogenesis.

Material and methods: In this experimental study, incubated Ross fertilized eggs were applied in 37°C-37.5°C in 60-65% humidified atmosphere after beginning of embryogenesis. Mesencephalon part of the brain tissue was collected from the eggs, daily. Total RNA extraction and cDNA synthesis was performed from resected tissues. The synthesized cDNA was used as template for quantitatively analysis of SALL4 mRNA expression by real-time PCR.

Results: The Real-time PCR analysis of SALL4 mRNA expression in mesencephalon tissues indicated that the level of gene expression is significantly variable during embryogenesis. While the basal level of SALL4 mRNA expression was detected during the rest of embryogenesis, the maximum copy number of SALL4 mRNA was quantified on 19th day of chicken development.

Conclusion: Having analyzed the level of SALL4 mRNA expression in different stages of chicken embryogenesis, we can extrapolate that a probable relationship may be existed between expression of SALL4 in nerve centers of mesencephalon brain and development of optic organs.

Keywords: Embryogenesis, Gene expression, Mesencephalon, Real time PCR, SALL4