

ارزیابی پایدارترین ژن‌های مرجع در بافت بیضه‌ی مردان آزواسپرم

سید مرتضی جوادی‌راد^۱، دکتر زهره حجتی^۲، دکتر کامران قائدی^۳، دکتر محمدحسین نصر اصفهانی^۴، بهزاد عباسی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: واکنش PCR کمی در زمان واقعی (Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction یا qRT-PCR)، یک روش سریع، حساس و قابل اعتماد برای مقایسه‌ی بیان ژن‌ها می‌باشد که مستعد خطاهای تکنیکی فراوانی است. همچنین، استفاده از ژن‌های مرجع (خانه‌گردان) تاریخی، همیشه و در همه‌ی بافت‌ها مناسب نمی‌باشد. در این مطالعه، به بررسی و انتخاب ژن‌های مرجع مناسب در بافت بیضه پرداخته شد تا بتوان از این ژن‌های مناسب برای انجام واکنش qRT-PCR استفاده کرد.

روش‌ها: نمونه‌ی بافت بیضه از ۱۵ مرد آزواسپرم غیر انسدادی (NOA یا Non-obstructive azoospermia) به عنوان گروه مورد و ۱۵ مرد آزواسپرم انسدادی (OA یا Obstructive azoospermia) به عنوان گروه شاهد گرفته شد. با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer 8.1 پرایمرهای مناسب برای چهار ژن مرجع (GAPDH) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase، (RPL37) Ribosomal protein L37، (RING1) Ring finger protein 1 و (eEF2) Eukaryotic translation elongation factor 2 طراحی شد. بهینه‌سازی‌های قبل از انجام qRT-PCR، شامل کنترل مقدار RNA برای سنتز Complementary DNA (cDNA) و تعیین غلظت مناسب پرایمرها انجام شد. منحنی ذوب رسم گردید و مقادیر (Cq) Quantitation cycle استخراج شد. آنالیز میانگین Cq در دو گروه شاهد و مورد با استفاده از نرم‌افزار BestKeeper نسخه‌ی ۱ انجام شد و ژن‌های مرجع مناسب انتخاب گردید.

یافته‌ها: مقایسه‌ی میانگین Cq بین دو گروه NOA و OA حاکی از آن بود که دو ژن RPL37 و GAPDH به ترتیب با انحراف معیار ۱/۳۹ و ۱/۶۷ کمترین تغییرات را در بین چهار ژن مرجع کاندیدا نشان داد. بنا بر این، دو ژن RPL37 و GAPDH، به ترتیب با مقادیر r برابر با ۰/۹۵۹ و ۰/۹۲۷، به عنوان مناسب‌ترین ژن‌های مرجع در بافت بیضه انتخاب شد.

نتیجه‌گیری: دو ژن RPL37 و GAPDH به ترتیب، مناسب‌ترین ژن‌های مرجع در بافت بیضه هستند و برای مطالعه‌ی بیان ژن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR مناسب می‌باشند.

واژگان کلیدی: ژن مرجع، بیضه، Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction، نرم‌افزار BestKeeper

ارجاع: جوادی‌راد سید مرتضی، حجتی زهره، قائدی کامران، نصر اصفهانی محمدحسین، عباسی بهزاد. ارزیابی پایدارترین ژن‌های مرجع در بافت بیضه‌ی

مردان آزواسپرم. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۷): ۲۴۱۶-۲۴۰۷

مقایسه‌ی بیان ژن‌ها می‌باشد. qRT-PCR به طور ذاتی، یک روش غیر مستقیم اندازه‌گیری است و متغیرهای زیادی در مراحل متفاوت انجام qRT-PCR، می‌توانند موجب تفسیر نادرست نتایج شوند (۱-۲). این متغیرها، می‌توانند نتیجه‌ی تفاوت در مقادیر و یا کیفیت مواد اولیه‌ی

مقدمه

واکنش PCR کمی در زمان واقعی (qRT-PCR) یا Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction)، یک روش سریع، حساس و قابل اعتماد برای

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان و پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست فن‌آوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و گروه زیست فن‌آوری مولکولی، دانشکده‌ی، دانشگاه، اصفهان، ایران

۴- استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست فن‌آوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مرکز باروری و ناباروری اصفهان (IFIC)، اصفهان، ایران

۵- دانشجو، گروه ارولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر زهره حجتی

مورد استفاده در qRT-PCR و یا به دلیل تفاوت در کارایی آنزیم‌های درگیر در واکنش PCR و حتی، تفاوت در کارایی واکنش PCR بین نمونه‌های مختلف و/یا دوره‌های متفاوت واکنش باشد (۲). همچنین، ایرادات حاصل از عملکرد متغیر نیروی انسانی، تفاوت بین نمونه‌های بافتی و یا سلول‌های مورد نظر نیز می‌تواند موجب تغییرات نابه‌جا در نتایج حاصل از qRT-PCR شود (۱). بنا بر این، راهبردهای مناسب برای طبیعی کردن نتایج حاصل از qRT-PCR، بسیار مهم و ضروری به نظر می‌رسد.

راهبردهای متنوعی برای غلبه بر اثرات نابه‌جای حاصل از متغیرها بر qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفته است و این اعتقاد وجود دارد که باید سطوح بیان ژن توسط ژن‌های مرجع با بیان پایدار و ثابت، طبیعی گردد (۳-۴). یک ژن مرجع مطلوب، نباید در شرایط آزمایش، تحت تأثیر قرار گیرد و حداکثر، تغییر کوچکی در بیان Messenger RNA (mRNA) خود نشان دهد. در غیر این صورت، بررسی تغییرات کوچک در بیان ژن‌های هدف، غیر ممکن می‌شود و نتایج گمراه‌کننده‌ای به همراه خواهد داشت (۵).

گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که ژن‌های رایج برای طبیعی کردن داده‌های qRT-PCR، کارایی لازم برای همه‌ی بافت‌ها و سلول‌های مختلف را ندارد و تحت شرایط محیطی متفاوت، دچار تغییرات زیادی در بیان mRNA خود می‌شود (۶-۱۱). بنا بر این، لازم است که قبل از شروع مطالعه‌ی بیان ژن‌ها در سلول یا بافت مورد نظر، یک مطالعه‌ی اولیه برای شناسایی ژن‌های مرجع مناسب (با بیان به طور تقریبی ثابت در طول آزمایش) انجام شود. سپس، باید یک پیش‌بررسی آزمایشگاهی برای ژن‌های مرجع کاندیدا، صورت پذیرد و از بین این ژن‌های مرجع، بهترین ژن‌ها (ها) برای مطالعه‌ی مورد نظر انتخاب گردد (۱۲).

روش‌ها

فرم رضایت‌نامه از همه‌ی مردان آرواسپریم گرفته شد و تمامی شیوه‌نامه‌های مطالعاتی و فرم رضایت‌نامه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه اصفهان و موسسه‌ی تحقیقاتی رویان اصفهان (کد طرح: ۹۴۰۰۰۰۹۶) مورد تأیید قرار گرفت. فرم‌های رضایت‌نامه در بایگانی مؤسسه‌ی تحقیقاتی رویان اصفهان ضبط گردید. بافت تازه‌ی بیضه‌ی مردان آرواسپریم، که برای عمل جراحی Testicular sperm extraction (TESE) و یا micro-TESE به مرکز باروری و ناباروری اصفهان (Isfahan fertility infertility center یا IFIC) مراجعه کرده بودند، در بازه‌ی زمانی بهار ۱۳۹۳ تا بهار ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد.

اندازه‌ی مساوی (حدود ۵۰ میلی‌گرم) از بافت بیضه در درون محلول تثبیت‌کننده‌ی RNAlater (کد AM7024، Ambion life science) بر اساس آمریکا) غوطه‌ور شد. مقدار مناسب محلول RNAlater بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انتخاب شد و بعد از انکوباسیون بافت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، استخراج RNA انجام گردید. بر اساس نتایج پاتولوژی نمونه‌های حاصل از TESE و micro-TESE، از بین ۳۰ نمونه‌ی افراد آرواسپریم مورد بررسی، ۱۵ نفر آرواسپریم انسدادی (Obstructive azoospermia یا OA) و ۱۵ نفر آرواسپریم غیر انسدادی (Non-obstructive azoospermia یا NOA) تشخیص داده شدند. میانگین سنی مردان مورد مطالعه، 35 ± 3 سال بود و هیچ کدام سابقه‌ی تومور بیضه و یا بیماری‌های

Transcriptome بافت بیضه در انسان به دلیل مسایل اخلاقی، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته و بررسی بیان ژن‌های آن، اغلب محدود به نمونه‌های مدل موشی بوده است (۱۳-۱۴). در مطالعات مدل موشی نیز ژن مرجع Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) اغلب برای طبیعی کردن بیان ژن‌های هدف، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵، ۱۳). از این رو، کارایی ژن مرجع GAPDH و بیان با ثبات آن در بافت هتروژن بیضه‌ی انسان، تا زمان اجرای این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته بود. همچنین، مطالعه‌ی ژن مرجع GAPDH در ۷۲ نوع بافت مختلف انسان نشان داد که این ژن مرجع پرکاربرد، از تنوع بیان بسیار بالایی بین بافت‌های مورد مطالعه (شامل بافت بیضه) برخوردار است (۱۶). بررسی مجدد ژن GAPDH در جنین جوجه نیز نشان داد که هیچ کدام از دو ژن مرجع باستانی GAPDH و بتا-اکتین، کارایی مناسبی برای آنالیز داده‌های

درگیر کننده‌ی بیضه را نداشتند. همچنین، بر اساس مطالعات پیشین، افراد NOA به عنوان گروه مورد و افراد OA به عنوان گروه شاهد، مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۹).

بررسی پاتولوژیک: رنگ‌آمیزی Hematoxylin and eosin (H&E)، بر اساس شیوه‌نامه‌ی استاندارد، بر روی نمونه‌های بافت بیضه‌ی پارافینی مردان آزواسپرم انجام شد (۲۰).

با بررسی دو اسلاید متفاوت از هر بافت و مقایسه‌ی حداقل ۵۰ مقطع توبول سمنیفر بیضه، دسته‌بندی زیر برای نتایج پاتولوژی به کار گرفته شد.

افراد OA، کسانی بودند که اسپرماتوژنز طبیعی داشتند و همه‌ی رده‌های سلولی اسپرماتوژنیک در مقاطع بافتی آنان دیده می‌شد.

افراد NOA شامل Sertoli cell only syndrome (SCOS) یا آپلازی سلول‌های ژرمینال (Germ cell aplasia یا GCA)، توقف بلوغ اسپرم (Maturation arrest یا MA) و هیپواسپرماتوژنز (Hypospermatogenesis) بودند.

افراد SCOS شامل مردانی بودند که در مقاطع بافت بیضه‌ی آن‌ها، تنها و تنها سلول‌های سرتولی دیده می‌شد.

افراد GCA نیز علاوه بر سلول‌های سرتولی، دارای تعداد کمی از سلول‌های ژرمینال هم بودند.

افراد MA، دچار توقف در یکی از مراحل بلوغ اسپرماتوزوآ بودند و در نتیجه، برخی رده‌های سلولی در مقاطع بافتی آن‌ها دیده نمی‌شد.

افراد با هیپواسپرماتوژنز، با وجود دارا بودن همه‌ی رده‌های سلولی، کاهش چشم‌گیری در تعداد این سلول‌ها داشتند.

این دسته بندی پاتولوژیک، برای افزایش دامنه‌ی کارایی ژن مرجع بافت بیضه ضروری به نظر می‌رسد. در نتیجه، سعی شد که حداقل یک نماینده از هر کدام از این گروه‌ها، جهت تعیین بهترین ژن مرجع در بافت بیضه حضور داشته باشد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: برای آنالیز mRNA، ۳۰ میلی‌گرم بافت غوطه‌ور در RNAlater مورد استفاده قرار گرفت و RNA تام این بافت استخراج شد. خرد کردن بافت، با استفاده از نیتروژن مایع و هاون و دسته‌ی هاون انجام شد. پودر سلولی، با استفاده از محلول TRIzol (کد 15596-018، Ambion life science، آمریکا) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده و به کمک سرنگ و سر سوزن هموزن شد.

حدود ۱ میکروگرم از RNA تام برای تیمار با DnaseI (کد EN0522، Thermo Scientific، لیتوانی) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده برداشته شد.

رشته‌ی اول Complementary DNA (cDNA) به کمک پرایمرهای تصادفی شش‌تایی و کیت سنتز آن (کد 6210B،

در نهایت، کیفیت RNA ساخته شده، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، مشخص شد. همچنین، کیفیت RNA استخراج شده، از نظر عدم آلودگی به مواد شیمیایی همچون فنل و گوانیدینوم موجود در TRIzol و پروتئین، به ترتیب با خواندن میزان جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر و ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کمیت RNA استخراج شده، به کمک جذب در دستگاه نانودراپ (Thermo scientific، 2000c، لیتوانی) تعیین و برای ساخت مقادیر یکسان cDNA به کار گرفته شد.

PCR کمی با زمان واقعی (qRT-PCR): طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer 8.13 (PREMIER biosoft، آمریکا) و طبق الگوی زیر انجام شد:

(۱) برای جلوگیری از آلودگی به DNA ژنومیک، حداقل یکی از پرایمرهای پیشرو و یا پیرو، بر روی تقاطع آگزونها طراحی شد. طول ایترون بین این آگزونها تا جایی که امکان داشت، بزرگ انتخاب شد تا محصولات تکثیر ژنوم، از cDNA مجزا گردند.

(۲) طول پرایمرها بین ۱۸-۲۵ توکلوئید انتخاب شد و درصد GC آن‌ها بین ۴۵-۵۵ در نظر گرفته شد. این پرایمرها، محصولاتی با طول بین ۹۰-۱۵۰ جفت باز ایجاد می‌کردند.

(۳) از ایجاد پرایمرهای غنی از جفت‌های AT و/یا GC در سمت ۳' انتهایی جلوگیری شد؛ اما برای پرایمرها، وجود یک G یا C در سمت ۳' انتهایی در نظر گرفته شد.

(۴) تأیید پرایمرها به کمک سرویس آنالیز بانک داده‌ی National center for biotechnology information primer-Basic local alignment search tool (NCBI Primer-BLAST) انجام شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

در نهایت، پرایمرهای طراحی شده، به منظور بررسی اختصاصی بودن اتصال به توالی هدف، عدم تشکیل دایمر پرایمری، عدم اتصال نابه‌جا و عدم تشکیل ساختارهای دوم، با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7.56 (Molecular biology insights، آمریکا) مورد بررسی نهایی قرار گرفتند. مشخصات پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است. غلظت پرایمرهای مورد استفاده، بر طبق مطالعه‌ی قبلی بهینه‌سازی شد (۲۱).

واکنش qRT-PCR با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-gene thermocycler (Corbett Life Science، Australia) و به کمک رنگ CyberGreen (کد RR820L، SYBR Premix Ex Taq II، رینگ) انجام شد.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه*

ژن (عدد دسترسی)	تعداد اگزونها	پرایمر (موقعیت)	طول اینترون (جفت باز)	طول محصول (جفت باز)	دمای منحنی ذوب (°C)
GAPDH (NM_002046.5)	۹	F: 5'-CCACTCCTCCACCTTTGACG-3' (اگزون ۸) R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' (اگزون ۹)	۱۰۴	۱۰۷	۸۴/۹
RPL37 (NM_000997.4)	۴	F: 5'-GTGGCAAATGTGGCTACCCTG-3' (اگزون ۲) R: 5'-ATCCATGCCTGAATCTGCGGTA-3' (تقاطع اگزون ۳-۴)	۲۰۵ (اینترون ۳-۲) و ۱۶۰۷ (اینترون ۳-۴)	۱۳۲	۸۳/۱
RING1 (NM_002931.3)	۷	F: 5'- AAGAATACGATGACCACCAAGGAG-3' (اگزون ۳) R: 5'-GCTTCTTTCGGCAGGTAGGAC-3' (اگزون ۴)	۱۲۸	۱۰۶	۸۴/۷
eEF2	۱۵	F: 5'-CCTCTACCTGAAGCCAATCCAGA-3' (اگزون ۹-۱۰) R: 5'-TGCTCGAAGGTGGTGTGGT-3' (اگزون ۱۰)	۴۴۷	۱۴۷	۸۷/۶

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RPL37: Ribosomal protein L37; RING1: Ring finger protein 1; eEF2: Eukaryotic translation elongation factor 2

* اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به همراه اعداد دسترسی ژن‌ها و تعداد اگزون‌ها، پرایمر پیشرو (F) و پیرو (R)، موقعیت پرایمرها در اگزون(ها)، طول اینترون بین اگزون‌های هدف، طول و دمای منحنی ذوب محصول PCR آمده است.

روش‌های موجود در دسترس برای پیش‌بینی ژن‌های هدف مناسب qRT-PCR بر اساس الگوی زیر انتخاب شد. ژن GAPDH به عنوان یک ژن تاریخی و بر اساس مطالعات پیشین (۲۲)، ژن Ring finger protein 1 (RING1) بر اساس بانک داده‌ی آنالیز Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/medmed.jsp>) و ژن‌های Ribosomal protein L37 (RPL37) و Eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2) بر اساس داده‌های حاصل از میکروارایانس (۲۳)، انتخاب شدند.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار BestKeeper انجام شد و مقدار عامل ضریب رخداد (r) و میزان P برای تخمین پایدارترین ژن(های) مرجع در بافت بیضه‌ی انسان استخراج شد (۲۴). $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر، در حضور غلظت ۰/۲ میکرومولار هر یک از پرایمرها و 1x از CyberGreen انجام شد. PCR در سه مرحله شامل واسرشت کردن اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت، یک چرخه برای رسم منحنی ذوب، انجام شد. بررسی بیان mRNA به کمک مقادیر مساوی از cDNA و به صورت سه تکرار، انجام شد و میانگین عدد چرخه‌ی کمیت‌سنجی (Quantitation cycle یا Cq) برای آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

آنالیز منحنی ذوب: بعد از آخرین چرخه‌ی تکثیر PCR بر روی کانال رنگ سبز دستگاه Corbett 6000 Rotor-gene thermocycler، آنالیز منحنی ذوب، بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. افزایش دمای ۱ درجه‌ی سانتی‌گرادی در PCR، از ۶۵ به ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام و به صورت مرتب جذب نوری خوانده شد. نرم‌افزار نسخه‌ی ۱/۷ دستگاه Corbett 6000 Rotor-gene برای آنالیز منحنی ذوب مورد استفاده قرار گرفت.

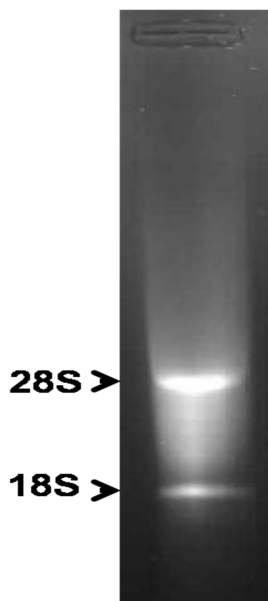
انتخاب ژن(های) مرجع مناسب: چهار ژن مرجع با استفاده از

یافته‌ها

بررسی کیفیت و کمیت RNA

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص شده است، شدت باند مربوط به 28S rRNA حدود دو برابر شدت باند مربوط به 18S rRNA بود. جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر در محدوده‌ی ۱/۹-۲/۱ و جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در محدوده‌ی ۱/۸-۲/۰، برای تمام نمونه‌های RNA ثبت

نتایج مشابهی برای مابقی پرایمرها نیز به دست آمد (البته تنها برای کمترین Cq)، تنها به توضیح نتایج ژن GAPDH اکتفا شده است.



شکل ۱. کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم برمایند مشخص شده است.

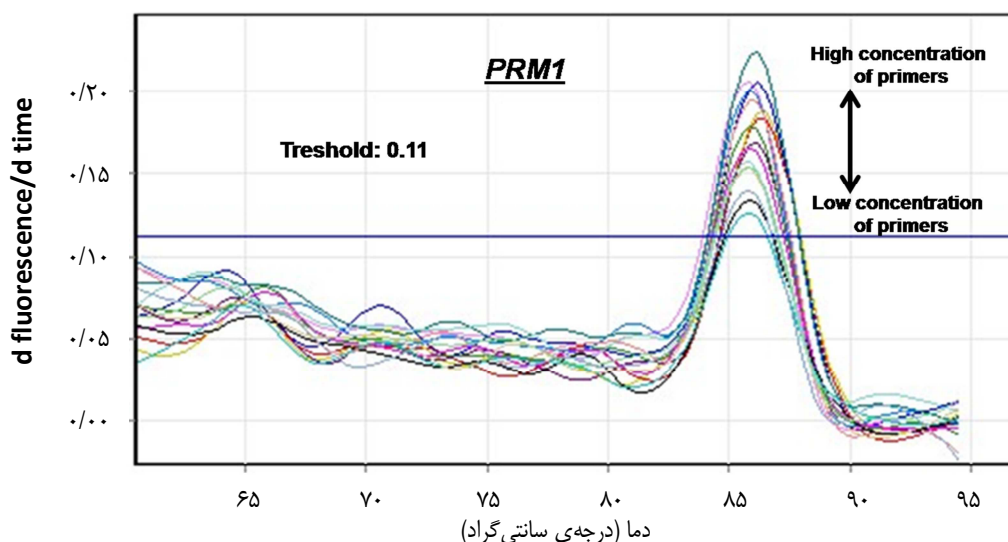
RNA تام دست نخورده، دو باند اصلی شامل باند مربوط به 28S rRNA و 18S rRNA را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، شدت باند مربوط به 28S rRNA حدود ۲ برابر شدت باند مربوط به 18S rRNA است.

شد که نشان دهنده‌ی کیفیت بالای RNA استخراج شده و عدم آلودگی به مواد مهار کننده است (۲۱). کمیت RNA استخراج شده برای نمونه‌های با وزن تقریبی ۳۰ میلی‌گرم، بین ۷۰۰-۲۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر به دست آمد.

بهینه‌سازی PCR

برای تعیین ترکیب غلظت بهینه‌ی پرایمرها، از ۹ ترکیب متفاوت غلظت پرایمرهای پیشرو و پیرو (غلظت‌های ۱-۲۵ میکرومولار) استفاده شد (۲۱). هر یک از ترکیبات غلظتی پرایمر به صورت دو بار تکرار و به کمک رنگ CyberGreen، در واکنش qRT-PCR وارد شد (۲۱). آنالیز منحنی ذوب برای غلظت‌های مختلف پرایمرهای پیشرو و پیرو، جهت تعیین اختصاصی بودن اتصال پرایمرهای پیشرو و پیرو انجام شد. بر اساس آنالیز منحنی ذوب، حتی در غلظت‌های بالای ۱ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو، هیچ گونه پیک تکثیر پرایمری مشاهده نشد (به عنوان مثال، منحنی ذوب غلظت پرایمر برای ژن GAPDH، شکل ۲). این نتایج نشان داد که کمترین Cq برای ژن GAPDH، $0/21 \pm 13/45$ بود و این Cq در غلظت مساوی از پرایمرهای پیشرو و پیرو (۵ میکرومولار از هر یک) به دست آمد. بزرگ‌ترین Cq برای ژن GAPDH، در ترکیب غلظتی ۱۰ میکرومولار پرایمر پیشرو و ۵ میکرومولار پرایمر پیرو ($0/17 \pm 13/99$) به دست آمد (جدول ۲).

به این ترتیب، غلظتی از پرایمرها برای بهینه‌سازی انجام qRT-PCR انتخاب شد که کمترین Cq را نشان می‌دهد. با توجه به این که



شکل ۲. آنالیز منحنی ذوب غلظت‌های مختلف پرایمرهای ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) با حد آستانه‌ی ۰/۱۱

میانگین Tm برابر با $0/20 \pm 85/92$ مربوط به تکثیر اختصاصی ژن GAPDH توسط پرایمرهای پیشرو و پیرو بوده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هیچ باند دایمر پرایمر (حتی در غلظت‌های بالای پرایمرها) دیده نمی‌شود.

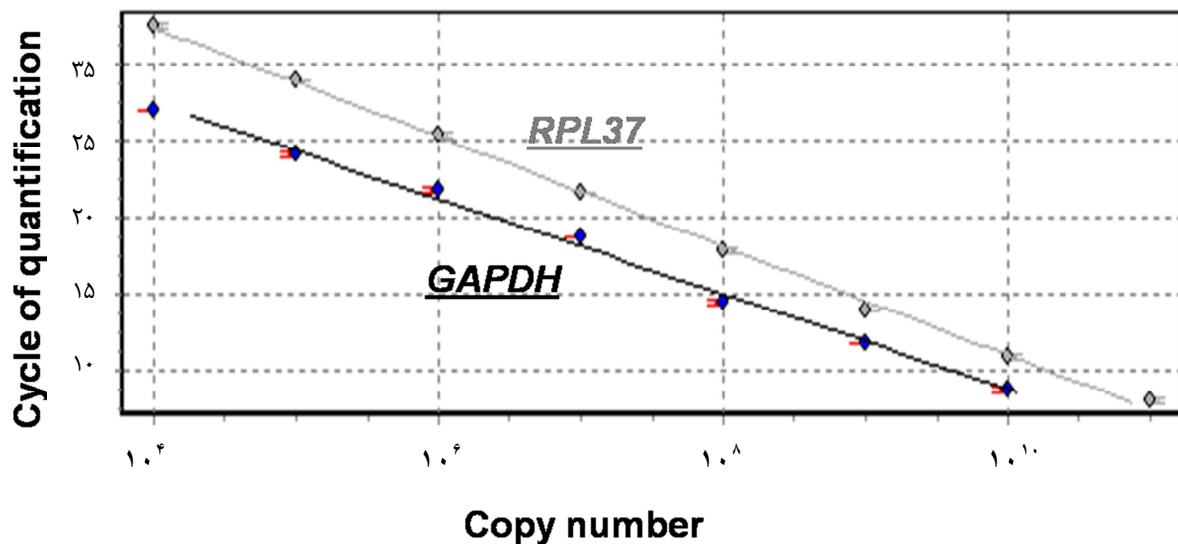
جدول ۲. بهینه‌سازی غلظت پرایمر ژن (GAPDH) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

میانگین \pm انحراف معیار Cq	غلظت پرایمر پیرو (میکرومولار)	غلظت پرایمر پیشرو (میکرومولار)
۱۳/۶۲ \pm ۰/۱۵	۲۰	۲۰
۱۳/۸۸ \pm ۰/۲۳	۱۰	۲۰
۱۳/۵۶ \pm ۰/۱۶	۵	۲۰
۱۳/۵۱ \pm ۰/۰۵	۲۰	۱۰
۱۳/۸۳ \pm ۰/۰۴	۱۰	۱۰
^o ۱۳/۹۹ \pm ۰/۱۷	۵	۱۰
۱۳/۹۱ \pm ۰/۲۰	۲۰	۵
۱۳/۹۷ \pm ۰/۱۶	۱۰	۵
^{oo} ۱۳/۴۵ \pm ۰/۲۱	۵	۵

Cq: Quantitation cycle;

* کوچک‌ترین Cq: ** کوچک‌ترین Cq

بهترین ترکیب غلظت پرایمرهای پیشرو و پیرو برای qRT-PCR برای cDNA ژن GAPDH تعیین شد. کوچک‌ترین مقدار Cq، زمانی حاصل شد که غلظت ۵ میکرومولار پرایمر پیشرو با غلظت ۵ میکرومولار پرایمر پیرو، به کار گرفته شد.



شکل ۳. منحنی استاندارد برای ژن‌های (GAPDH) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase و (RPL37) Ribosomal protein L37. بعد از T/A کلونینگ محصول (PCR) Polymerase chain reaction (PCR) ژن‌های GAPDH و RPL37 در وکتور مناسب، ۱۰ سریال رقت حاوی ۱۰^{۱۱} کپی وکتور (کپی ژن هدف) تا ۱۰^۱ کپی وکتور (کپی ژن هدف)، تکثیر شد. واکنش PCR در غلظت بهینه‌ی پرایمرهای پیشرو و پیرو انجام شد و منحنی استاندارد رسم گردید. با تعیین مقدار آستانه‌ی مناسب، میزان ۲^۴ و کارایی PCR تعیین شد. این مقادیر برای ژن GAPDH (منحنی سیاه رنگ)، برابر با ۰/۹۱ و برای ژن RPL37 (منحنی خاکستری رنگ)، برابر با ۰/۹۹ بود.

(شکل ۳). لازم به ذکر است که مقدار $r^2 > 0/90$ ، یک درجه‌ی اطمینان بالا برای کارایی مناسب qRT-PCR محسوب می‌شود.

ارزیابی ژن‌های مرجع

با توجه به این که استفاده از بیش از یک ژن مرجع برای مطالعات مربوط به بیان ژن به روش qRT-PCR امری ضروری است (۱۰)، ارزیابی ژن‌های مرجع GAPDH، RING1، RPL37، و eEF2 در

برای تعیین کارایی PCR، غلظت مناسب پرایمرهای پیشرو و پیرو، انتخاب و برای تکثیر وکتورهای حاوی ژن هدف کولون شده، به کار گرفته شد. با استفاده از این وکتورهای حاوی ژن هدف، یک سریال رقت از دامنه‌ی ۱۰^{۱۱} کپی تا ۱۰^۱ کپی وکتور (ژن هدف) تهیه و با سه بار تکرار، qRT-PCR انجام شد (۲۱). به این ترتیب، کارایی PCR در محدوده‌ی ۱/۱۰-۰/۹۱ برای تمامی ژن‌های هدف مشاهده شد.

روش‌های مناسب، جهت طبیعی‌سازی داده‌ها اقدام گردد. یکی از روش‌های طبیعی کردن داده‌ها، طبیعی کردن غیر مستقیم به کمک RNA تام است که نیازمند روش‌های کمی‌سنجی قابل اعتماد می‌باشد (۳). از طرف دیگر، طبیعی کردن توسط RNA تام، قادر به حذف ایرادات حاصل از اشکال در مراحل رونوشت‌برداری معکوس و مقادیر مورد استفاده در واکنش qRT-PCR نیست. روش دیگر، به کار بردن ژن‌های (های) مرجع مناسب است که به عنوان کنترل داخلی به کار می‌روند و کاربردهای بیشتری نسبت به روش قبل دارند و هیچ یک از ایرادهای پیش‌گفته را نیز ندارد (۲۶). ژن‌های (های) مرجع مناسب، باید در شرایط متفاوت آزمایش، بیان ثابتی داشته باشند، تا به کمک آن‌ها، بتوان تغییرات تکنیکی را از تغییرات حاصل از شرایط متفاوت آزمایش تشخیص داد (۳۰-۲۷).

طبیعی کردن توسط ژن‌های مرجع، دارای ایرادهایی مانند هزینه‌ی بالا و زحمت زیاد است، اما به کمک ژن‌های مرجع مناسب، می‌توان به صحت و دقت نتایج qRT-PCR اعتماد کرد (۲۷). به کمک ژن‌های مرجع، حتی می‌توان مقادیر RNA مورد استفاده برای انجام رونوشت‌برداری معکوس را نیز طبیعی کرد (۴). از این رو، بر طبق شیوانه‌های Nolan و Bustin، لازم است که برای انتخاب ژن‌های (های) مرجع مناسب، ابتدا یک سری بهینه‌سازی‌ها برای واکنش PCR انجام شود (۲۱).

اولین بهینه‌سازی، مربوط به بررسی کیفیت RNA و سپس تعیین کمیت آن است؛ تا بتوان با به کار بردن مقادیر مساوی از RNA باکیفیت، یک رونوشت‌برداری معکوس یکسان را برای همه‌ی نمونه‌ها انجام داد. به این ترتیب، ژن مرجع نیز هم‌زمان با ژن‌های (های) مورد نظر برای مطالعه و به میزان مشابهی به cDNA تبدیل خواهد شد. همچنین، باید غلظت پرایمرهای پیشرو و پیرو بهینه شود (جدول ۲) و این غلظت‌های بهینه، برای انجام qRT-PCR استفاده گردد (۲۱).

شرایط بهینه PCR انجام شد. میانگین مقدار Cq حاصل از انجام ۳ بار تکرار یک واکنش qRT-PCR برای تعداد ۱۵ نمونه‌ی OA و ۱۵ نمونه‌ی NOA (شامل حداقل یک فرد SCOS یا GCA، یک فرد MA و یک فرد هیپواسپرماتوژن)، به دست آمد. میانگین مقدار Cq در نرم‌افزار BestKeeper وارد شد تا آنالیز همبستگی Pearson انجام شود. آنالیز پایداری بیان ژن‌های مرجع کاندیدا نشان داد که کمترین انحرافات معیار Cq، به ترتیب ۱/۳۹ برای RPL37، ۱/۶۶ برای RING1 و ۱/۶۷ برای GAPDH بوده است (جدول ۳).

به این ترتیب، ژن eEF2 حذف شد و در مرحله‌ی بعد نیز ژن RING1، به دلیل مقدار r کوچک‌تر (۰/۶۹۷) از دو ژن GAPDH و RPL37 از کاندیداتوری ژن مرجع حذف گردید (جدول ۳). به عبارت دیگر، مقدار r برابر با ۰/۹۵۹ و ۰/۹۲۷ به ترتیب برای دو ژن GAPDH و RPL37، نشان دهنده‌ی نزدیکی بیشتری این دو ژن به شاخص BestKeeper است. بنا بر این، دو ژن RPL37 و GAPDH، به عنوان اولین و دومین ژن مناسب مرجع برای بررسی بیان در بافت بیضه‌ی انسان انتخاب شد.

بحث

این مطالعه، با هدف تعیین ژن‌های مرجع مناسب برای مقایسه‌ی بیان ژن‌ها در بافت بیضه‌ی انسان، به کمک روش qRT-PCR انجام شده است. روش بسیار حساس qRT-PCR، به طور بسیار دقیق به بررسی میزان بیان mRNAهای خاص موجود در Transcriptome بافت‌ها یا سلول‌های هدف می‌پردازد، اما همان‌طور که می‌دانیم، Transcriptome خاصیت وابسته به محتوای سلول دارد و در شرایط فیزیولوژیک، پاتولوژیک و تکاملی متفاوت، دچار تغییر و یا تعدیل می‌شود (۲۵). اگر این تغییرات سلولی، با ایرادات حاصل از اشکال‌های تکنیکی همراه شود، ممکن است نتایج حاصل از qRT-PCR گمراه کننده باشد. بنا بر این، لازم است که به کمک

جدول ۳. اطلاعات آماری ژن‌های مرجع انتخاب شده

ژن	میانگین هندسی (CP)	کمترین مقدار CP	بیشترین مقدار CP	میانگین \pm انحراف معیار	ضریب رخداد (r)	مقدار P
RPL37	۲۰/۲۱ [†]	۱۷/۹۱	۲۲/۹۴	۲۰/۲۸ \pm ۱/۳۹	*۰/۹۲۷	۰/۰۰۱
RING1	۲۵/۶۶	۲۳/۸۳	۲۹/۲۸	۲۵/۷۳ \pm ۱/۶۶	۰/۶۹۷	۰/۰۲۵
GAPDH	۱۸/۴۳ [†]	۱۵/۸۱	۲۲/۵۴	۱۸/۵۳ \pm ۱/۶۷	*۰/۹۵۹	۰/۰۰۱
eEF2	۲۰/۷۹	۱۸/۰۲	۲۳/۳۴	۲۰/۸۹ \pm ۱/۸۷	۰/۷۴۴	۰/۰۱۴

CP: Control point; GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RPL37 Ribosomal protein L37; RING1 Ring finger protein 1; eEF2: Eukaryotic translation elongation factor 2

CP نقطه‌ی تقاطع که همان (Cq) Quantitation cycle است و در نرم‌افزار BestKeeper به کار می‌رود. چندین پارامتر برای CP نشان داده شده است که شامل میانگین هندسی (ریشه‌ی n حاصل ضرب n متغیر)، میانگین حسابی (مجموع مقادیر موجود در یک مجموعه داده تقسیم بر تعداد آن‌ها)، کمترین و بیشترین مقدار CP و انحراف معیار CP می‌باشند. ضریب رخداد Pearson (r) و مقدار P با استفاده از نرم‌افزار BestKeeper به دست آمد.

†: نشان دهنده‌ی هماهنگی بالا بین میانگین هندسی مقادیر CP است؛ *: نشان دهنده‌ی ضریب رخداد بالا و نزدیکی به شاخص BestKeeper است.

تفاوت بیان این ژن‌ها بین افراد NOA و OA به عنوان نمونه‌ی شاهد مقایسه و واکاوی شد. با توجه به داده‌های جدول ۳، دو ژن RPL37 و GAPDH با شاخص‌های نزدیک به ۱ و انحراف معیار کمتر، نسبت به دو ژن RING1 و eEF2 برتری دارند و به عنوان دو ژن مرجع مناسب برای بافت بیضه‌ی انسان انتخاب شدند. دلیل دیگر برای برتری دو ژن RPL37 و GAPDH، نتایج آنالیز همبستگی Pearson است که مقدار P کوچک‌تری برای دو ژن انتخاب شده‌ی مرجع نشان می‌دهد. با توجه به رعایت اصول مدل پذیرفته شده‌ی MIQE، یافته‌های این مطالعه، با داده‌های حاصل از مطالعه‌ی ژن‌های مرجع در باکتری‌ها، مخمر نان، گربه‌سانان، گیاهان، رده‌ی سلولی گلیوما و کارسینوم اندوتلیال انسان مطابقت نشان می‌دهد (۳۸-۳۳).

در نتیجه، آنالیز میانگین Cq بین دو گروه NOA و OA نشان داد که دو ژن RPL37 و GAPDH با کمترین انحراف معیار بین دو گروه و بالاترین مقدار \pm مناسب‌ترین ژن‌های مرجع در بافت بیضه می‌باشند و برای مطالعه‌ی بیان ژن‌ها به روش qRT-PCR در بافت بیضه مناسب هستند.

نتایج بهینه‌سازی غلظت پرایمرهای پیشرو و پیرو ثابت می‌کند که پرایمرهای طراحی شده، دارای اختصاصیت اتصال بالایی برای cDNA ژن‌های هدف هستند، هیچ دایمر پرایمری تشکیل نمی‌دهند و تأیید کننده‌ی مطالعات بیوانفورماتیک است (شکل ۲). در نهایت، باید داده‌های حاصل از qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزارهای تخصصی تجزیه و تحلیل شوند و ژن مرجع مناسب انتخاب شود.

در حال حاضر، سه نرم‌افزار GeNorm، Norm finder و BestKeeper برای انتخاب ژن مرجع مورد استفاده است و نتایج حاصل از این نرم‌افزارها تا حد زیادی قابل تعمیم به یکدیگر است (۳۱-۳۲). از این رو، در مطالعه‌ی حاضر با توجه به دسترسی آسان و رایگان بودن نرم‌افزار BestKeeper، از این نرم‌افزار استفاده شد. بر اساس الگوریتم مورد استفاده در نرم‌افزار BestKeeper، بهترین ژن مرجع ژنی است که به شاخص BestKeeper نزدیک‌تر باشد و انحراف معیار کمتری بین نمونه‌های مورد و شاهد داشته باشد (۲۴).

در این مطالعه، با بررسی بیان چهار ژن مرجع RPL37، GAPDH، RING1 و eEF2 در بافت بیضه‌ی افراد آزواسپرم، میزان

References

- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30(6): 503-12.
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De PA, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): RESEARCH0034.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004; 37(1): 112-9.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6(4): 279-84.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005; 344(1): 141-3.
- Arukwe A. Toxicological housekeeping genes: do they really keep the house? *Environ Sci Technol* 2006; 40(24): 7944-9.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2001; 15(5): 307-11.
- Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S. Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci* 2007; 32(1): 38-46.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De BB, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75(2-3): 291-5.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distanto V, Pazzagli M, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309(2): 293-300.
- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle CL, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, et al. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* 2006; 6: 49.
- Xu Z, Xu J, Ji A, Zhu Y, Zhang X, Hu Y, et al. Genome-wide selection of superior reference genes for expression studies in *Ganoderma lucidum*. *Gene* 2015; 574(2): 352-8.
- Kasioulis I, Syred HM, Tate P, Finch A, Shaw J, Seawright A, et al. Kdm3a lysine demethylase is an Hsp90 client required for cytoskeletal rearrangements during spermatogenesis. *Mol Biol Cell* 2014; 25(8): 1216-33.
- Okada Y, Tateishi K, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity. *J Androl* 2010; 31(1): 75-8.
- Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prml transcription and spermatogenesis. *Nature* 2007; 450(7166): 119-23.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH

- mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21(3): 389-95.
17. Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol* 2012; 222(6): 369-76.
 18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
 19. Pansa A, Sirchia SM, Melis S, Giacchetta D, Castiglioni M, Colapietro P, et al. ESX1 mRNA expression in seminal fluid is an indicator of residual spermatogenesis in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 2014; 29(12): 2620-7.
 20. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008; 2008: db.
 21. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1559-82.
 22. Tateishi K, Okada Y, Kallin EM, Zhang Y. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 2009; 458(7239): 757-61.
 23. Kouadjo KE, Nishida Y, Cadrin-Girard JF, Yoshioka M, St-Amand J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* 2007; 8: 127.
 24. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; 26(6): 509-15.
 25. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-66.
 26. Karge WH, III, Schaefer EJ, Ordovas JM. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol Biol* 1998; 110: 43-61.
 27. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 2004; 4: 14.
 28. Ji H, Wang J, Liu J, Guo J, Wang Z, Zhang X, et al. Selection of Reliable Reference Genes for Real-time qRT-PCR Analysis of Zi Geese (*Anser anser domestica*) Gene Expression. *Asian-Australas J Anim Sci* 2013; 26(3): 423-32.
 29. Zhou YH, Raj VR, Siegel E, Yu L. Standardization of Gene Expression Quantification by Absolute Real-Time qRT-PCR System Using a Single Standard for Marker and Reference Genes. *Biomark Insights* 2010; 5: 79-85.
 30. Ferguson BS, Nam H, Hopkins RG, Morrison RF. Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. *PLoS One* 2010; 5(12): e15208.
 31. Fernandes JM, Mommens M, Hagen O, Babiak I, Solberg C. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 150(1): 23-32.
 32. Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, Marsili L, Casini S, Frati F, et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 32.
 33. Zornhagen KW, Kristensen AT, Hansen AE, Oxboel J, Kjaer A. Selection of suitable reference genes for normalization of genes of interest in canine soft tissue sarcomas using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Vet Comp Oncol* 2015; 13(4): 485-93.
 34. Rocha DJ, Santos CS, Pacheco LG. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 108(3): 685-93.
 35. Nadai C, Campanaro S, Giacomini A, Corich V. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation in the presence of sulfite. *Int J Food Microbiol* 2015; 215: 49-56.
 36. Liu Z, Zhu Q, Li J, Yu J, Li Y, Huang X, et al. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis of *Cassi*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 79(11): 1818-26.
 37. Iser IC, de Campos RP, Bertoni AP, Wink MR. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in C6 glioma cell line treated with conditioned medium from adipose-derived stem cell. *Biomed Pharmacother* 2015; 75: 75-82.
 38. Ayakannu T, Taylor AH, Willets JM, Brown L, Lambert DG, McDonald J, et al. Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. *Mol Hum Reprod* 2015; 21(9): 723-35.

Evaluation of the Most Stable Reference Genes in Testicular Tissue of the Men with Azoospermia

Seyed Morteza Javadirad MSc¹, Zohreh Hojati PhD², Kamran Ghaedi PhD³,
Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD⁴, Behzad Abbasy⁵

Original Article

Abstract

Background: Real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction (qRT-PCR), is a fast, sensitive and reliable method of gene expression comparison that is prone to a lot of technical errors. On the other hand, historical reference (housekeeping) genes are not suitable for all tissues. Herein, we have tried to identify and evaluate the best reference gene for testis tissues for further qRT-PCR experiments.

Methods: Testis tissues of 15 men with non-obstructive (NOA) and 15 men with obstructive (OA) azoospermia (as control individuals) were collected. Primer designing and verification of four candidate reference genes including glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ribosomal protein L37 (RPL37), ring finger protein 1 (RING1) and eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2) were performed using Beacon designer 8.1 software. PCR pre-optimization for reverse transcriptase input RNA and best primer concentration were included. Melt curve analysis was drawn and values of quantitation cycle (Cq) were extracted. Mean Cq analysis was calculated using BestKeeper v1 software and suitable reference genes were selected afterward.

Findings: Comparing the mean Cq values between the NOA and OA groups declared that RPL37 and GAPDH showed the lowest standard deviations of 1.39 and 1.67 among the other candidates. GAPDH and RPL37 were selected as the best reference genes in testis tissues with their r values of 0.959 and 0.927, respectively.

Conclusion: The results of this study show that the best reference genes for normalization of qRT-PCR data of testis tissues are GAPDH and RPL37.

Keywords: Reference gene, Testis, Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR), BestKeeper software

Citation: Javadirad SM, Hojati Z, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH, Abbasy B. **Evaluation of the Most Stable Reference Genes in Testicular Tissue of the Men with Azoospermia.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(367): 2407-16

1- PhD Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan AND Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research (ACER), Isfahan, Iran

4 Professor, Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research (ACER) AND Isfahan Fertility and Infertility Center (IFIC), Isfahan, Iran

5- Student, Department of Orology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Zohreh Hojati PhD, Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir