

بررسی رویکردهای تولید ماهیان و بی مهرگان تراریخته با بهره گیری

از تکنیک های مهندسی ژنتیک

سکینه مشجور^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، محمدعلی سالاری علی آبادی^۳، احمد قاسمی^۴

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی دریا، گروه علوم دریای و اقیانوسی، دانشگاه هرمزگان

۲ و ۳- به ترتیب، استادیار بیوتکنولوژی دریا و استادیار بیولوژی دریا، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۴- دانشجوی دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، مربی گروه بیولوژی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس

sakynemashjoor@gmail.com

چکیده

علی رغم اینکه اکثریت پیشرفت های گذشته در صنعت آبرزی پروری مریهون استفاده از روش های سنتی هم-آوری در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان است. اما در طول دو دهه ی گذشته، رشد و توسعه تکنولوژی دی.ان.ا. نوترکیب و مهندسی ژنتیک و بهره گیری از آن در تولید ماهیان و آبزیان تراریخته واجد صفات مطلوبی نظیر تسریع رشد و مقاومت به بیماری، توانسته سهم شایان توجهی را در پیشرفت های این حوزه داشته باشد. ماهیان و آبزیان به علت اینکه اکثر گونه هایشان، لقاح خارجی و ظرفیت زادآوری بالایی دارند، یک سیستم ویژه و ممتاز برای پژوهش های انتقال ژن و دستورزی های ژنتیکی محسوب می شوند. در سال-های گذشته هورمون رشد (GH) معمول ترین ژن در بحث اصلاح ژنتیک آبزیان پرورشی بوده که مورد بهره برداری قرار گرفته است. بیان تراژن های هورمون رشد منجر به افزایش رشد در ذخایر آبزیان شده است. به عنوان مثال نرخ رشد را در کوهو سالمون تا ۱۱ برابر ارتقا بخشیده است. تاکنون برای انتقال ژن به تخم-های ماهیان روش های متعددی مورد استفاده قرار گرفته است که در این میان، روش ریز تزریقی پیشگام بوده است، هرچند نرخ تلفیق تراژن در این روش به طور نسبی پایین است. بهره گیری از وکتورهای ویروسی نیز روشی جدید برای تلفیق مستقیم و پایدار ترنس ژن در ژنوم میزبان محسوب می شود. در حال

حاضر روش‌های انتقال ژن در سطح انبوه و توده‌ایی بخوبی توسعه یافته‌اند که شامل روش لیپوفکشن، بمباران ذره‌ایی و الکتروپوریشن سلول‌های جنینی است که به‌خصوص برای موجودات زنده دریایی چون سخت‌پوستان، نرم‌تنان و نیز ماهیان به‌نحوی بسیار کارآمد قابل اجراست. در این مقاله سعی شده، ضمن ارائه انواع پیشرفت‌های گذشته در تحقیقات بیوتکنولوژی و روش‌های مختلف انتقال ژن به آبزیان، به بررسی و تحلیل مزایا و معایب هر یک از این روش‌ها در دستکاری‌های سیستم‌های زنده ماهیان و بی‌مهرگان پرورشی پرداخته شود.

واژه‌های کلیدی: هورمون رشد، انتقال ژن، بیان ژن، تراژن، مهندسی ژنتیک.

مقدمه

انتقال یک ماده‌ی خارجی نظیر پروتئین، پپتید، سی.دی.ان.ای و دارو به درون سلول‌ها از جمله دستورزی‌های معمول در زیست‌شناسی سلولی مولکولی مدرن است که بواسطه روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی (ویروس-ها) عبور این ماکرومولکول‌ها از میان سد غشای سلولی امکان‌پذیر شده است. از این رو شناسایی و گزینش یک سیستم انتقال ژن کارآمد در تحقیق‌های پایه‌ای و کاربردی علوم مرتبط با بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی بسیار حائز اهمیت است. انتقال ژن یک تکنولوژی کلیدی برای دستکاری ژنوم جانوران است (۱). طی دهه‌های گذشته بیوتکنولوژیست‌ها با واردسازی ژن‌های متعدد و بررسی بیان آنها تحت سیستم‌های تنظیمی جدید توانسته‌اند، بر خصوصیات ارزشمند فنوتیپی جانوران تأثیرهای شگرفی

بگذارند. در این میان، ماهیان به‌خاطر لقاح خارجی و ظرفیت زادآوری بالا، یک سیستم ویژه و ممتاز برای پژوهش‌های انتقال ژن محسوب می‌شوند (۲). ماهیان تراریخته در واقع ماهیانی هستند که درون دی.ان.ای کرموزومی ژنومشان، به‌طور مستقیم یا از طریق وراثت (دورگ‌گیری و به‌گزینی)، یک ساختار ژنتیکی با منشأ خارجی وارد شده است و این جایگزینی به گونه‌ای است که ساختار ژنی وارد شده در اکثریت سلول‌های بدن میزبان حضور داشته، بیان شده و به نسل‌های بعدی نیز منتقل می‌شود (۳). بنابراین یکی از مهمترین کاربردهای مهندسی ژنتیک در تحقیق-های آبرزی‌پروری و بحث افزایش میزان رشد ماهیان پرورشی، مسئله انتقال تراژن‌های هورمون رشد (GH) Growth hormone هورمون رشد یا سوماتوتروپین یک هورمون پروتئینی تک پلی

پپتیدی است که بوسیله سلولهای سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می شود. این هورمون در تنظیم فرآیندهای پیچیده فیزیولوژیک چون، تنظیمات سوخت و ساز نقشی ویژه دارد. و تولید این نوع از ماهیان است. نظر به اینکه رشد به عنوان مهمترین و شاخص ترین فاکتور در افزایش بازده تولید، محسوب می شود، در طول دهه های گذشته اکثر تحقیق ها در این زمینه، بر انتقال ژن هورمون رشد متمرکز شده است و این ژن معمول ترین ژنی است که به منظور افزایش و تسریع رشد و اصلاح ژنتیک آبزیان پرورشی، مورد بهره برداری قرار گرفته است (۴). در ماهیان هورمون رشد یا سوماتوتروپین یک هورمون پروتئینی تک پلی پپتیدی با وزن مولکولی تقریبی ۲۱ تا ۲۳ کیلو دالتون است که بوسیله سلول های سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می شود و دارای یک عملکرد فیزیولوژیک پلیوتروپیک اندوکرینی است. این هورمون در تنظیم فرآیندهای متعدد و پیچیده فیزیولوژیک نظیر، تسریع رشد سوماتیکی، رشد و نمو گنادی، بسیج انرژی، تنظیم سوخت و ساز چربیها، پروتئینها و کربوهیدراتها، تنظیم اسمزی، کارکردهای سیستم ایمنی، تولیدمثل، دگردیستی و تکوین، اشتها و رفتارهای اجتماعی مشارکت دارد و از آنجا که در ماهیان رشد در تمامی طول عمر ادامه دارد، برای فعالیت های GH یک شبکه منظم و پیچیده قابل

تعریف است (۵). در پژوهش های اولیه ژن های سنتتیک GH پستانداران برای انتقال مورد استفاده قرار می گرفت که هیچ گونه اثری بر رشد ماهیان نداشت، اما زمانی که توالی های کدکننده GH ماهیان شناسایی و در دسترس قرار گرفت، رویکردهای انتقال ژن در آبزیان نیز، با تسریع رشد همراه شد (۶). زیرا هورمون رشد نو ترکیب ماهیان (rGH) همانند هورمون رشد طبیعی، از کارکردهای فیزیولوژیک مشابه ای برخوردار بوده و تولید این پروتئین در ارتقای نرخ رشد ماهیان بسیار مؤثر بوده است. از سال ۱۹۹۲ تاکنون سی.دی.ان.ای ژن هورمون رشد حداقل در بیش از ۳۵ گونه از ماهیان دنیا، شناسایی و کلون شده است (۷،۸) و محققین توانسته اند، این ژن را به منظور تسریع فرآیند رشد، به بیش از ۱۲ گونه از ماهیان نظیر ماهی طلایی، آزاد ماهی، کپور معمولی، قزل آلا، رنگین کمان، گربه ماهی کانالی و... انتقال دهند (۸،۲).

تولید آبزیان پرورشی تراریخته رویکردی است، که نهایت می تواند افزایش موجودی جهانی غذا و حفظ ذخایر ژنتیکی ارزشمند اقیانوس ها را تضمین نموده و کارایی پرورش موجودات زنده آبزی شاخص را نیز، به میزان بسیار بالایی توسعه بخشد (۴). زیرا این ماهیان و بی مهرگان تراریخته قادرند، با بکارگیری یک استراتژی قدرتمند، امکان شناسایی و درک سازو کارهای مختلف

فیزیولوژیکی رشد و نمو، تنظیم بیان ژن، عمل انکوژن‌ها، تعیین مسیرهای سیگنالینگ و بیوشیمیایی کلیدی و برهم کنش‌های پیچیده‌ی سیستم ایمنی را، در شرایط *in-vivo* فراهم ساخته (۴) و در بحث اقتصاد شیلاتی و اهداف تکنولوژی‌های مدیریت آبی‌پروری نیز بواسطه انتقال تراژن‌های متنوع می‌توانند صفات مطلوبی چون تقویت و افزایش رشد، ارتقاء نرخ تولیدمثل، افزایش مقاومت بیماری‌یابی و زیست-پالایی، افزایش توده‌ی بدنی و مقاومت در برابر سرما و بسیار فاکتورهای مهم دیگر را تولید کرده و از کاربردهای متنوعی برخوردار باشند (۹،۴،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷). در سالهای گذشته، کشورهای واجد تکنولوژی انتقال ژن به ماهیان توانسته‌اند، گام‌های جدیدی در امر تجاری‌سازی تولیدهای تراریخته بردارند. بعنوان مثال تولیدکنندگان آزاد ماهی اقیانوس اطلس *GH (Salmo salar)* - تراریخته، موفق به دریافت اجازه نامه تجاری‌سازی و عرضه تخم‌های این ماهی تراریخته از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) شده‌اند (۱۸). در کوبا و چین نیز درخواست‌های مشابهی به ترتیب برای تولید ماهیان تیلاپپای *GH (Oreochromis sp.)* - تراریخته و کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* - تراریخته، موسوم به "all-fish" به دولت-ها ارائه و تأیید شده است (۱۹،۲۰). در ایران

علی‌رغم توسعه چشمگیر مزارع تکثیر و پرورش آبزیان (ماهی و میگو) و استقبال مصرف‌کنندگان از پتانسیل‌های موجود در کشور، همواره تحقیقات و پژوهش‌های کاربردی در حوزه مهندسی ژنتیک آبزیان کمتر کارآمد و شایان توجه بوده و برخی واجد ضعف‌هایی است. با این وجود در سال‌های گذشته محققین سازمان شیلات ایران و مراکز دانشگاهی در تلاش‌اند تا ضمن ورود به حوزه بیوتکنولوژی دریا، در جهت شناسایی، استخراج و کلونینگ ژن‌های متنوعی از آبزیان، بالاختص گونه‌های پرورشی و بومی گام‌های جدیدی را برداشته و بستر مناسبی را برای دستیابی به تکنولوژی پیشرفته تولید ماهیان و آبزیان تراریخته فراهم سازند. در این راستا طی این مقاله سعی بر این است، ضمن ارائه انواع روشهای مختلف انتقال ژن به آبزیان، به بررسی و تحلیل مزایا و معایب هر یک از این روشها در انتقال ترنس ژن‌های هورمون رشد به سیستم‌های زنده آبزیان پرداخته شود.

بررسی انواع روش‌های انتقال ژن در آبزیان

به‌طور اساسی سیستم تحویل موضعی ژن به دو روش صورت می‌گیرد، روش *in-vivo* که در آن تزریق کمپلکس دی.ان.ای/ وکتور به درون بافت میزبان به‌طورمستقیم انجام می‌پذیرد و روش

جدول ۱- نمونه‌های منتخبی از نژادهای تراریخته ماهیان توسط سازه‌های ژنی حامل ژن هورمون رشد به منظور کاربردهای

آبزی پروری

خانواده و گونه	سازه ژنی	نوع افزایش رشد	کشور	مرجع
Salmonidae				
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	opAFP-csGH	۲ تا ۶ برابر	کانادا	Du et al. (1992) and Fletcher et al. (2004)
Atlantic salmon	mMT-hGH	—	نروژ	Rokkones et al. (1989)
Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i>	ssMT-ssGH	بیش از ۱۱ برابر	کانادا	Devlin et al. (1994a,b)
Coho salmon	opAFP-csGH	۳ - ۱۰ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Chinook salmon, <i>O. tshawytscha</i>	opAFP-csGH	۶ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Rainbow trout, <i>O. mykiss</i>	opAFP-csGH	۳/۲ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Rainbow trout	ssGH-ssGH	بی تاثیر	فنلاند	Pitkanen et al. (1999)
Rainbow trout	SV40-hGH	—	فرانسه	Chourrout et al. (1986)
Rainbow trout	mMT-rGH	—	انگلیس	Maclean et al. (1987)
Rainbow trout	mMT-hGH	—	نروژ	Rokkones et al. (1989)
Cutthroat trout, <i>O. clarki</i>	opAFP-csGH	۶ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Arctic charr, <i>Salvelinus alpinus</i>	Various constructs	بیش از ۱۴ برابر	فنلاند	Pitkanen et al. (1999)
Cichlidae				
Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	opAFP-csGH	۲ تا ۴ برابر	انگلیس	Rahman et al. (1998, 2001) and Rahman and Maclean (1999)
Nile tilapia	ssMT-ssGH	بی تاثیر	انگلیس	Rahman et al. (1998)
Nile tilapia	mMT-hGH	—	آلمان	Brem et al. (1988)
Tilapia, <i>O. homorum</i> hybrid	hCMV-tiGH	٪۸۲	کوبا	Martinez et al. (1996)
Tilapia, <i>O. homorum</i> hybrid	hCMV-iGH	٪۶۲	کوبا	Martinez et al. (1999)
Ictaluridae				
Channel catfish, <i>Ictalurus punctatus</i>	RSVLTR-rtGH	بیش از ۲۶ برابر	آمریکا	Dunham et al. (1992)
Channel catfish	RSVLTR-csGH	—	آمریکا	Dunham et al. (1992)
Channel catfish	mMT-hGH	—	آمریکا	Dunham et al. (1987)
Heteropneustidae				
Indian catfish	Zpβ-ypGH	٪۶۰-۳۰	هند	Sheela et al. (1999)
Indian catfish	Zpβ-ypGH	٪۶۰-۳۰	هند	Sheela et al. (1999)
Cyprinidae				
Goldfish, <i>Carassius auratus</i>	mMT-hGH	—	چین	Zhu et al. (1985)
Common carp, <i>Cyprinus carpio</i>	mMT-hGH	—	چین	Zhu et al. (1989)
Common carp	cβA-gcGH	٪۸۰-۴۲	چین	Zhu (1992) and Wang et al. (2001)
Common carp	RSVLTR-rtGH	—	آمریکا	Zhang et al. (1990)
Common carp	ccβA-csGH	۳ برابر	اسرائیل (روزم اشغالگر قدس)	Hinitz and Moav (1999)
Common carp	ccβA-csGH	۴ برابر	اسرائیل (روزم اشغالگر قدس)	Hinitz and Moav (1999)
Catla, <i>Catla catla</i>	RSVLTR-rtGH	—	هند	Sarangi et al. (1999)
Mrigal, <i>Cirrhinus mrigala</i>	RSVLTR-rtGH	—	هند	Sarangi et al. (1999)
Rohu, <i>Labeo rohita</i>	RSVLTR-rtGH	—	هند	Sarangi et al. (1999)
Rohu	CMV-roGH	۴ برابر	هند	Venugopal et al. (2004)
Rohu	gcβA-roGH	۴/۵ تا ۵/۸ برابر	هند	Venugopal et al. (2004)
Esocidae				
Northern pike	RSVLTR-bGH	٪۳۰	آمریکا	Gross et al. (1992)
Cobitidae				
Mud loach, <i>Misgurnus misolepis</i>	mIβ-actin-mI GH	بیش از ۳۵ برابر	کرو	Nam et al. (2001, 2002)

in-vitro که ژن‌ها در محیط آزمایشگاه به کشت های سلولی انتقال داده می‌شوند (۲۱). چهار استراتژی انتقال ژن به سلول‌های جانوری عبارتند از (۲۱): ۱) انتقال مستقیم دی.ان.ای بوسیله ترانس فکشن (Transfection) فیزیکی: روش میکرواینجکشن (Microinjection)، الکتروپوریشن (Electroporation)، تفنگ ژنی و اولتراسوند (Ultrasound). ۲) ترانس فکشن بواسطه مواد شیمیایی: ترکیبات پلی کاتیونیک پلی پلکس‌ها و لیپوپلکس‌ها (Lipo-Plex). ۳) بسته‌بندی دی.ان.ای توسط ویروس (ترانس داکشن (Transduction)). ۴) بسته بندی دی.ان.ای درون باکتری (باکتریوفکشن (Bacteriofection)). در فرآیند انتقال ژن سه عنصر اساسی دخالت دارند (۲): حامل ژن که ناقل یا پلاسمید (Plasmid) نام دارد، ژن مورد نظر برای انتقال که ژن خارجی یا انتقالی (تراژن) است و در نهایت سلولهای هدف که ژن به آنها انتقال می‌یابد.

روش ترانسفکشن فیزیکی - میکرواینجکشن (ریز تزریقی)

میکرواینجکشن، روش انتقال مستقیم دی.ان.ای خارجی به درون تخم (زیگوت)، هسته اووسیت، پیش‌هسته و یا سیتوپلاسم جنین‌های در حال رشد است. در این روش، حجم دقیقی از دی.ان.ای موجود در محلول تثبیت‌کننده به طور

مستقیم به درون سیتوزول یا هسته، از طریق سوزن‌های ریزی با ضخامت کمتر از ۰/۱ میلی‌متر، ریز تزریق می‌شود. حجم قابل تزریق بسته به سایز تخم‌ها، به‌طور معمول ۲۰۰ میکرولیتر تا ۲۰ نانولیتراست (۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶). اما مقدار مطلوب برای دی.ان.ای تزریق شده می‌بایست بیش از 10^6 نسخه باشد که البته باز بسته به سایز تخم‌ها و گونه متغیر است (۲۷، ۲۸، ۲۹). سلول‌های ریز تزریق شده را می‌توان با کواینجکتورهایی چون نشانگر رنگی دکسترین تگزاس قرمز (dextran Texas red) و پروتئین‌های فلورسانس شناسایی کرد (۳۰). از آنجا که پیش‌هسته در دیگر گروه‌ها غیراز پستانداران، قابل رؤیت نیست. بنابراین در ماهیان تنها به سیتوپلاسم جنین یا تخم لقاح یافته یا هسته‌ی اووسیت می‌توان، دی.ان.ای را ریز تزریق کرد و این مسئله در مورد مهره داران پست و بی‌مهرگان نیز، صادق است. زیرا اکثریت آنها، تخمگذار بوده و رشد و نمو جنین، در خارج از بدن مادر صورت می‌گیرد. در ماهیان مشکل دیگری که مطرح است این است که تخم‌های ماهیان در برخی گونه‌ها مات و غیر شفاف بوده و واجد لایه ضخیم کوریونی است که اجرای فرآیند میکرواینجکشن را مشکل می‌سازد، از این رو محققین برای غلبه بر این مشکل‌ها رویکردهای مختلفی را گزیده‌اند: ۱) تزریق محلول دی.ان.ای از طریق منفذ میکروپیل به درون جنین ماهیان

(۳۱، ۲۸، ۳۲)، (۲) سوراخ کردن لایه کوریونی توسط یک سوزن فلزی پیش از تزریق و واردسازی سوزن میکروپیپتی شیشه‌ای انتقال دهنده دی.ان.ای خارجی به داخل سلول (۳۴، ۳۳) (و ۳) حذف لایه‌های ضخیم کوریونی با روش‌های دستی (۳۵) یا بهره‌گیری از آنزیم پروناز (Pronase) برای هضم لایه کوریونی قبل از اجرای میکروانجکشن (۲۳). بطور معمول دی.ان.ای را می‌توان در مرحله یک، دو و یا چهارسلولی به درون سیتوپلاسم جنین‌ها وارد ساخت که البته نرخ بقا در این جنین‌ها بسته به گونه، از ۱۶ درصد در گوره‌خرماهی تا ۸۵ درصد در آزاد ماهیان متغیر بوده است (۳۶، ۲۶). البته نوع بافر تعلیق دهنده دی.ان.ای، خطی یا حلقوی بودن آن و حجم دی.ان.ای تزریق شده هم در کارایی این روش انتقال ژن و نرخ بقا جنین تأثیرگذار بوده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد، زمانیکه از بافر معلق‌سازی دی.ان.ای استفاده شد، نرخ بقا ۱۰ تا ۱۳ درصد افزایش یافت، در حالیکه استفاده از EDTA ۰/۱۲۵ مولار با کاهش ۱۰ درصد نرخ بقا همراه بود. زمانیکه از حجم تزریقی 10^8 نسخه دی.ان.ای استفاده شد، در قیاس با 10^6 نسخه میزان بقای جنین‌ها در حدود ۱۰ درصد کاهش یافت. نرخ الحاق دی.ان.ای خطی در ژنوم هم ۱۵ درصد کارآمدتر از دی.ان.ای حلقوی بوده است (۳۷، ۳۴). انتقال ژن

به روش میکروانجکشن، یک فرآیند آزمایشگاهی است و نیازمند تجهیزات ویژه‌ای نظیر میکروسکوپ، میکروانجکتور و یک آپراتور آموزش دیده است. مزیت این روش، این است که تزریق ژنها بطور دقیق و در جایگاهی مطلوب از تخم، انجام گرفته و میزان کمی ژن‌های تزریق شده نیز به طور کامل قابل تعیین و برآورد است. لکن واجد معایبی نیز است، زیرا این روش زمانبر بوده و به علت ورود میکروسوزن، احتمال صدمه به سلول، وجود داشته و به‌طور کامل وابسته به مهارت آپراتور است. تزریق میکروسکوپی دی.ان.ای به درون هسته، مؤثرترین تکنیک و متداولترین شیوهی مرسوم برای ایجاد جانوران تراریخته است و در برخی شرایط ویژه، در کشت‌های سلولی استفاده شده و در مواردیکه سایر روش‌های انتقال ژن، غیر مؤثراند، نیز بکار می‌رود (۳). به‌طور اساسی ریز تزریق سی.دی.ان.ای به درون سلول در مقایسه با دیگر روشهای انتقال ژن (الکتروپوریشن، ترنسفکشن شیمیایی و اینفکشن ویروسی)، کمتر برای سلول استرس‌زا بوده و پیامدهای مرگ سلولی (apoptosis) آن به مراتب کمتر است (۳۰). این تزریق، در سلول‌های جداگانه‌ای که قادر به تکثیراند و کلونی‌های سلولی را ایجاد می‌کنند، انجام می‌پذیرد. بنابراین اگر ژن رمزکنندهی پروتئین فلورسانس سبز (GFP) نیز در ساختار ژن

وارد شده باشد، روند بیان ژن را می‌توان، با روش های غیرمتهاجمانه چون میکروسکوپ فلورسنس مشاهده و جداسازی نمود (۴). برای ریزتزریق تخم و جنین ماهیان، بطور معمول پنج میکرولیتر دی.ان.ای با غلظت دو میلی گرم در میلی لیتر را با ۹۵ میکرولیتر از محلول Tris HCl یک مولار با $pH = 7.5$ و ۰/۲۵ درصد فنول قرمز رقیق کرده تا به غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر برسد و از این محلول برای تزریق استفاده می‌شود (۴). در حوزه‌ی تولید آبزیان صدف‌دار (Shellfish) تراریخته نظیر سخت پوستان نیز تاکنون رویکردهای موفقیت‌آمیزی با روش میکرواینجکشن مشاهده شده است. Bensheg و Khoo در سال ۱۹۹۷ برای انتقال ژن گزارشگر به تخم‌های لقاح یافته میگوی آب شیرین *Macrobrachium lanchesteri* از روش میکرواینجکشن استفاده کردند (۳۸). اما از آنجا که این روش یک دستورالعمل سنتی آزمایشگاهی و زمانبر است به تنهایی دارای محدودیت‌هایی برای تعداد زیاد تخم‌ها است، بنابراین محققین روش ساده‌تر و کارآمدتری را ابداع کردند. بدین صورت که Li و همکارش Tsai در سال ۲۰۰۰ برای انتقال دی.ان.ای خارجی در مقیاس توده‌ای (Massive) به میگوی عظیم الجثه آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* از روش تزریق به اسپرماتوفور (Spermatophore-

Microinjection, SMI) استفاده کردند (۳۹). SMI تکنیکی منحصر بفرد و مفید برای پژوهش-های تنظیم بیان ژن و تشکیل سویه‌های جدید سخت پوستان واجد صفات مطلوب است. در این روش اسپرماتوفورها بواسطه شوک الکتریکی از میگوهای نر تخلیه شده و دی.ان.ای اگزوزنوس در غلظت‌های مختلف در حجم نهایی یک میکرولیتر به‌طور مستقیم به درون اسپرماتوفورهای ریز تزریق می‌شود، سپس این اسپرماتوفورهای تیمار شده به منظور تلقیح درون منفذ اسپرماتکای میگوی ماده واقع در بخش سینه‌ای بین پاهای سوم و پنجم شنا منتقل می-شوند. در مورد سرنوشت دی.ان.ای تزریق شده، باید به این نکته اشاره کرد که اگرچه در آغاز ممکن است، فراوانی بالایی از بیان تراژن در تخم های ماهیان و سخت‌پوستان مشاهده شود، لکن به‌طور غالب این بیان حاصل رونویسی نسخه‌های تلفیق نشده تراژن در ژنوم است و احتمال بروز پدیده موزایکیسم در این حالت بالاست. اما اگر ژن مورد نظر در گنادها تثبیت شده و به سلولهای جنسی منتقل شود، احتمال تولید نسلهای تراریخته بالاتر می‌رود.

روش ترانسفکشن فیزیکی- الکتروپوریشن SMGT/

زمانیکه سلول در معرض یک میدان الکتریکی متناوب چند هزار ولتی قرار می‌گیرد، اجزای

غشای سلول قطبی شده و ولتاژ پتانسیل غشا در طول غشا پلاسمایی دو لایه فسفولیپیدی گسترش می یابد و هنگامی که اختلاف پتانسیل بین غشای درونی و بیرونی سلول از حد آستانه تجاوز کند، غشا در این ناحیه شکسته شده و به طور موقت یک منفذی شکل می گیرد و سلول را نسبت به ماکرومولکول های اگزوزنوس (مثلاً دی.ان.ای حامل تراژن) نفوذپذیر ساخته و این مواد بواسطه فرآیند انتشار و یا نیروی الکتروپوریتیک وارد سیتوزول می شوند، لکن این تغییر در تخلخل غشا برگشت پذیر است (۴۰). اندازه این منافذ تحت کنترل عواملی از قبیل، تغییرات طول پالس، شدت میدان الکتریکی، میزان ولتاژ و قدرت یونی محیط است و چون در این سیستم شوک الکتریکی باعث القای شکل گیری این منافذ می شود، این سیستم الکتروپورشن نامگذاری شده است. بر این اساس دستگاه الکتروپورشن با بهره گیری از یکسری پالس های الکتریکی کوتاه با شدت و قدرت نفوذ بالا، به طور موقت منجر به تشکیل روزنه های ناپایداری در غشا سلول شده و شاید روزنه ها را برای مدت زمانی کوتاه باز نگه می دارد و به دی.ان.ای اجازه می دهد قبل از بسته شدن مجدد آنها وارد سلول شود، با کاهش این پالس های الکتریکی نیز روزنه ها به یکباره به سرعت بسته می شوند (۲۱). شوک الکتریکی دستگاه الکتروپوریشن دارای مکانیسم های

مختلفی است که تحت شرایط متفاوت عمل می کنند، برخی از این مکانیسم ها پالس های الکتریکی با امواج مربعی تولید می کنند و برخی دیگر پالس هایی با امواج نمایی. از این رو زمانیکه از این دستگاه برای گونه خاصی از ماهی برای نخستین بار استفاده می شود، می بایست شرایط بسته به گونه کالبره و بهینه شود. تاکنون از این روش برای انتقال دی.ان.ای به جنین های لقاح یافته ماهیان مختلفی چون مداکا، ماهی طلایی، ماهی حوض، لوچ، کپور زرد- قرمز، گربه ماهی کانالی، گوره خرماهی، کپور معمولی، نرم تن آبالون- قرمز و صدف کلم استفاده شده است و هریک از این آبزیان نرخ بقا و تخمه گذاری متفاوتی را تحت شرایط بهینه الکتروپوریشن نشان داده اند (۴۱، ۴۲). نتایج پژوهش ها نشان می دهد، نرخ بقا و تلفیق ژن در تخم ها یا جنین های الکتروپوریت شده، بستگی به سن جنین یا تخم و مرحله نمو آن دارد و با افزایش دوره پالس ها و ولتاژ، کارایی انتقال ژن و تعداد نسخه های ژن منتقل شده افزایش می یابد. زمان مناسب برای الکتروپوریشن نیز در حدود ۳۰ دقیقه پس از لقاح است (۴۲). این روش در مقایسه با روش سنتی میکرواینجکشن به طور کامل ساده، راحت و کارآمد بوده و برای انواع سلول ها، به شیوه ای صد در صد تخصصی قابل اجراست و در مقایسه با روش ترانس فکشن شیمیایی با مشکل عدم

کفایت جذب کمپلکس‌های شیمیایی دی.ان.ای در سلول مواجهه نبوده و از جمله مزیت‌های آن حذف خاصیت سیتوتوکسیتی (معمول در روش‌های ترانسفکشن شیمیایی و اینفکشن ویروسی)، کوتاه بودن زمان مورد نیاز برای دستکاری حجم بالایی از جنین‌ها و عدم مواجهه با مشکلاتی چون لایه‌های سخت کوریونی و غیر شفاف بودن تخمها و نامرئی بودن پیش‌هسته تخم‌ها در برخی گونه‌هاست (۳۰). در هر حال روش الکتروپوریشن، برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های بنیادین جنینی و برخی از تخم‌های ماهیان، که برای انجام عمل میکرواینجکشن بسیار کوچک اند، یا جایگزینی ژنهای اندوژنوس با ژنهای هومولوگ نو ترکیب متناظر و یا ایجاد کلونهای حامل دی.ان.ای خارجی تلفیق شده بطور پایدار در ژنوم، هنوز بهترین روش محسوب می‌شود. اما این روش معایبی نیز دارد، زیرا از لحاظ کمی، تعداد ژنهای خارجی وارد شده به سلول را نمی‌توان به طور دقیق، تخمین زد و در برخی موارد نیز، شماری از سلول‌ها تحت تأثیر میدان الکتریکی از بین می‌روند (۳۰). یکی از پیشرفت‌های شایان توجه در روش الکتروپوریشن، تلفیق آن با روش انتقال ژن بواسطه اسپرم و ایجاد روش نوینی موسوم به SMGT یا انتقال ژن بواسطه اسپرم‌های الکتروپوریت شده است (۴۲، ۴۳). در سال‌های گذشته تمایل به استفاده از این روش

برای ماهیان (Finfish) و بی‌مهرگان آبی (Shellfish) بیشتر شده است، زیرا تکنیک انتقال ژن بواسطه اسپرم (SMGT) دارای چندین مزیت است: (۱) این تکنیک می‌تواند امکان انتقال ژن در سطح انبوه و توده‌ای (mass) را فراهم آورده و از این اسپرم‌های تیمار شده برای تعداد زیادی از اووسیت‌ها استفاده کند، (۲) این روش توانسته بر برخی عیب‌های معمول در دیگر سیستم‌های انتقال ژن که بیشتر وابسته به خصوصیات تخم (زیگوت) آبیان است نظیر: چسبندگی، مات-بودن، ضخامت، شناوری، غیرقابل رویت بودن پیش‌هسته و وجود لایه‌های ضخیم کوریونی فائق آید، (۳) نظر به اینکه دی.ان.ای خارجی می‌بایست به گونه‌ایی به هسته منتقل شود، اگر تخم‌های لقاح یافته به همراه دی.ان.ای الکتروپوریت شوند، احتمال اینکه قطعات دی.ان.ای خارجی به جای بلاستودیسک به نواحی دیگر تخم منتقل شوند، بیشتر است، زیرا حجم شان نسبت به حجم تخم بی‌نهایت اندک است و از طریق اسپرم شانس رسیدن آنها به محل هسته و بلاستودیسک بیشتر می‌شود، (۴) اسپرم ماهیان به راحتی قابل دستیابی است و برای فعال‌سازی به سهولت می‌توان مقادیری آب به آنها افزود، (۵) اسپرم جانوران آبی را می‌توان تحت شرایط انجماد نگهداری کرده و بدین شکل این اسپرم‌های تیمار شده همیشه قابل استفاده‌اند. بنابراین اسپرم ماهیان می‌-

تواند وکتور مناسبی برای واردسازی دی.ان.ای خارجی به ژنوم و تولید ماهیان تراریخته محسوب شود. بعلاوه این روش نه تنها ساده بوده بلکه در دیگر جانوران آبی هم در سطح انبوه کاربردی است (۴۴).

اما یک فاکتور مهم در روش الکتروپورشن دی.ان.ای خارجی در اسپرم ماهیان (SMGT)، نگهداشتن اسپرم در مرحله غیرفعال در حین فرآیند الکتروپوریشن است، زیرا اسپرم در حضور مایع سمینال رقیق نشده در مرحله غیرفعال باقی می ماند و به محض رقیق سازی با یک بافر و یا آب و یا محلول دی.ان.ای، این اسپرم فعال شده و تنها تا حدود ۳۰ ثانیه فعال و متحرک باقی مانده و پس از آن قابلیت بارورسازی تخم ها را از دست می دهد. البته اسپرم اکثریت جانوران آبی پس از افزودن ۴ حجم از محلول بافری PBS (که شامل : ۱۳۰ میلی مول کلرید سدیم (NaCl)، ۲/۶ میلی مول کلرید کلسیم (KCl)، ۸ میلی مول فسفات هیدروژن سدیم (Na_2HPO_4), ۱/۵ میلی - مول فسفات هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4) و ۷/۳ pH = است) هنوز هم غیرفعال باقی می ماند. از این رو PBS و HEPES به عنوان محلول های بافری معمول برای گسترش اسپرم حین الکتروپورشن بکار می روند. برای این منظور حدود ۳۰۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق سازی نشده

(که معادل 10^{10} اسپرم در میلی لیتر است) با ۶۰۰ میکرولیتر دی.ان.ای در حضور بافر PBS با هم مخلوط شده تا نسبت 10^4 مولکول دی.ان.ای اسپرم بدست آید (۴۵). سپس این اسپرم ها به (Cell-porator) یا کانینرهای ۱-۲ میلی لیتری دستگاه الکتروپوریشن منتقل شده و الکتروپوریت می شوند. در مرحله بعدی ظرف محتوی اسپرم های الکتروپوریت شده برای بازیابی به مدت چند دقیقه بر روی یخ قرار داده می شوند. سپس این اسپرم ها برای لقاح در شرایط *in vitro* با اووسیت های تیمارنشده آماده اند. به هر حال در روش الکتروپوریشن میزان تحرک اسپرم، میزان توانایی بارورسازی اسپرم های تیمار شده، نرخ لقاح، نرخ تخمه گشایی (Hatching)، نرخ بقا، میزان انتقال ژن و میزان غیر عادی بودن جنین ها همگی به ولتاژ، غلظت دی.ان.ای و میزان رقیق سازی وابسته است (۴۵).

روش ترانسفکشن شیمیایی - لیپوفکشن گنادی

پیوستن دی.ان.ای به مولکولهای مختلف، در شرایط *in-vitro* می تواند باعث تشکیل کمپلکسی شود، که بخاطر قابلیت برهمکنش الکترواستاتیک با غشای پلاسمایی قادر است، به سلول وارد شده و بنابراین این روش، یکی از متداولترین شیوه های مرسوم، برای واردسازی دی.ان.ای است. در این میان یکی از این مولکول ها کلرید کلسیم

(CaCl₂) است که با پیوندشدن گروه فسفات دی.ان.ای با کلسیم، کمپلکس نامحلول DNA-CaPO₄ را تشکیل می‌دهد، در این حالت افزودن مقدار زیادتری از دانه‌های کوچک فسفات کلسیم به دی.ان.ای آن را ته‌نشین ساخته و با افزودن این مخلوط به محیط کشت سلولی، بخش کوچکی از این کمپلکس نامحلول، قادر است سلول را پوشانده و بطور خود بخودی منجر به القای فرآیند اندوسیتوز شود. این دی.ان.ای دوباره در سیتوپلاسم سلول، به حالت محلول در می‌آید. اما اکثریت دی.ان.ای‌های وارد شده به سلول طی تقسیمات سلولی تجزیه می‌شوند و درصد اندکی از آنها هسته را که مرکز رونویسی است، غنی می‌سازند. بنابراین با افزودن ترکیبات شیمیایی مختلفی، نظیر، گلیسرول یا دی متیل سولفوکساید، که با تشکیل کمپلکسی با آب میزان آب درون سلولی را کاهش می‌دهند، شاید بتوان احتمال وقوع اندوسیتوز را افزایش داد. زیرا این امر شانس ایجاد فرورفتگی در سلول و کشیده شدن وزیکول محتوی کمپلکس دی.ان.ای به درون سلول را افزایش می‌دهد. این ترانسفکشن سلولی روش هم رسوبی دی.ان.ای- فسفات کلسیم نامیده شده است و اندازه ذرات مهمترین پارامتر در موفقیت این روش است (۳). اگرچه امروزه از انواع مختلفی از روش‌ها به منظور ترانسفکشن سلول‌ها استفاده می‌شود، لیکن هنوز سلول‌هایی هستند که

ترانسفکشن آنها با سختی و بازدهی پایین انجام می‌پذیرد و کاربری برخی روشها در مورد آنها به-طور نسبی مشکل است. یکی از این روشها، روش هم رسوبی دی.ان.ای- فسفات کلسیم است، که اگرچه در مواردی (چون ترانسفکشن دی.ان.ای ویروسی) از کارایی ترنسفکشن بالایی برخوردار است، اما به‌طور اساسی ترانسفکشن با این روش مشکل بوده و میزان دی.ان.ای نو ترکیب مصرفی نیز بالاست. از طرفی فرآیند رسوب، حضور کینتیک‌های رسوبی و نیز بروز تغییرهای اندکی در pH می‌تواند، برای برخی رده‌های سلولی سمی بوده و به مرگ آنان منتهی شود (۴۶،۴۷،۴۸). یکی دیگر از روشهای انتقال ژن بصورت توده‌ای، روش لیپوفکشن (Lipofection) است که جزء روشهای شیمیایی ترانسفکشن محسوب می‌شود و در قیاس با سایر روشها، قابلیت سیتوتوکسینی آن به‌طور نسبی پایین است و تا حدودی به نسبت لیپید/ دی.ان.ای بستگی دارد. در این روش از برهمکنش مولکولهای لیپیدی با بار مثبت و مولکولهای دی.ان.ای با بار منفی استفاده می‌شود، بدین صورت دی.ان.ای قادر است با پلی کاتیونها (که پروتئین‌های پایه یا ترکیب‌های شیمیایی دارای بار مثبت، نظیر پلی اتیلن آمین هستند) تشکیل کمپلکس دهد. زیرا این پلی کاتیونها قادرند، با چربی‌ها اتصال‌های کووالانسی را

برقرار ساخته و با گروه فسفات دی.ان.ای باند شوند و این امر منجر به کاهش بار منفی دی.ان.ای خواهد شد. بدین گونه، این کمپلکس بطور خود بخودی، با مولکولهای دارای بار منفی غشاء خارجی پلاسمای سلول باند شده و این پیوستگی القاءکنندهی فرآیند اندوسیتوز برای کمپلکس خواهد بود. بعلاوه حضور لیپیدها در کمپلکس نیز امتزاج غشاء پلاسمایی و جذب کارآمد دی.ان.ای توسط سلول را تحریک می کند (۴۹). از طرفی، فرآیند اندوسیتوز دی.ان.ای بوسیله لیگاندهایی که به طور اختصاصی برای شناسایی مولکولها در سطح سلول بکار می روند نیز نشانه گذاری شده است. این لیگاندها، ممکن است، آنتی بادی های مونوکلونال باشند، که به طور اختصاصی برای باندشدن با طیف وسیعی از مولکولها در سطح سلول، آزاد شده اند و در برخی موارد این لیگاندها می توانند، هورمون ها، سیتوکین ها و یا مولکول هایی نظیر آسیلپروتئین ها باشند که دارای گیرنده هایی اختصاصی بر روی غشاء هستند و این رویکرد، مبتنی بر باند شدن دی.ان.ای با لیگاند، از طریق برقراری اتصال های محکمی نظیر اتصال های کووالان است (۳). Szelei و همکاران در سال ۱۹۹۴ از این لیپوزوم ها برای انتقال دو پلاسمید واجد ژنهای کلرامفنیکل استیل ترانسفراز و آمینوگلوکوزید فسفوترانسفراز (APT) به جنین های گربه ماهی

آفریقایی استفاده کردند، که نتایج این تحقیق موفقیت آمیز بوده است (۵۰). یکی از این ترکیب ها پلی کاتیونیک لیپوفکتامین است، که یک معرف کاتیونیک لیپیدی است و با ایجاد کمپلکس لیپوزومی پایدار با دی.ان.ای موسوم به لیپوپلکس قادر است بار الکتریکی مؤثر کمپلکس را کاهش داده و طی یک برهمکنش الکترواستاتیک با غشا و القاء فرآیند اندوسیتوز، عبور کمپلکس از خلال غشا را امکان پذیر ساخته و آن را به طور مستقیم به درون هسته هدایت کند (۵۱). تحقیق های بسیار نشان داده است که این لیپوزوم های کاتیونیک، روشی قدرتمند در رمزگشایی و بیان کارآمد تراژن ها محسوب می شوند. لیپوفکتامین یک معرف تجاری معمول در فرآیند ترنسفکشن است که در پژوهش های بیولوژی سلولی مولکولی در سطحی گسترده مورد استفاده قرار می گیرد و از آن طی فرآیند لیپوفکشن برای وارد سازی دی.ان.ای پلاسمیدی به محیط کشت سلولی در شرایط *in-vitro* استفاده می شود (۵۲). مشجور در سال ۱۳۹۰ توانست، لتی ویروس های نو ترکیب حامل ژن هورمون رشد (GH) فیل ماهی *Huso huso* را با بهره گیری از معرف لیپوفکتامین به سلول های بنیادی جنینی انسانی HEK-293T با موفقیت انتقال دهد. یکی دیگر از پیشرفت های شایان توجه در حوزه مهندسی ژنتیک آبزیان و روش لیپوفکشن، تلفیق آن با

روش انتقال ژن بواسطه‌ی گندهای نر و ایجاد روش جدیدی موسوم به TMGT یا انتقال ژن بواسطه ترنسفکشن گندهای ماهی نر با مخلوط تراژن- لیپوزوم است (۴۳). در این روش، ترنسفکشن گنادی می‌بایست حداقل در ۴۸ ساعت پیش از تخم‌ریزی ماهی نر انجام پذیرد. Lu و همکارانش، در سال ۲۰۰۲ موفق شدند، سازه ژنی حامل ژن هورمون رشد نو ترکیب قزل آلالی رنگین‌کمان تحت کنترل پیشبر بتا اکتین کپور ماهی معمولی را، به روش لیپوفکشن و بصورت مخلوط تراژن- لیپوزوم به سلول‌های گنادی ماهی نر سیم دریایی *Sparus sarba* انتقال داده و ماهیان تراریخته‌ی که به سرعت رشد می‌کند را تولید نمایند. Lu بر این عقیده است که روش لیپوفکشن گنادی یک روش انعطاف‌پذیر، کارآمد، به‌طور نسبی ارزان و سریع برای تولید ماهیان و سخت‌پوستان تراریخته است (۴۳).

روش آلوده‌سازی با وکتورهای ویروسی

دو گروه رایج وکتورهایی که برای انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل وکتورهای ویروسی و غیرو ویروسی است. انواع مختلفی از وکتورها در هر دو گروه وجود دارند، اما معمولترین وکتورهای غیرو ویروسی پلاسمیدها و پلاسمیدهای ترکیب‌شده با لیپوزوم‌ها هستند. وکتورهای ویروسی رایج، عبارتند از آدنوویروس‌ها (AV)،

ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌ها (AAV)، رتروویروس‌ها (RV) و لتی ویروس‌ها (LV). که در آلوده‌سازی سلول‌ها، در شرایط *in-vitro* از پتانسیل بالایی برخوردارند (۵۲). اگرچه تاکنون وکتورهای ویروسی مختلفی، برای انتقال ژنها به سلول مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در اصل این روش به‌اجبار برای همه‌ی آنها مشابه است. در این روش ژنهای ضروری ویروسی از ژنوم ویروس حذف شده و بدین ترتیب ژنوم ویروس از نظر قابلیت خود همانندسازی ناتوان می‌شود، از طرفی در ژنوم ویروس، فضایی برای واردسازی ژنهای خارجی ایجاد می‌شود. از آنجا که این ژنوم نو ترکیب، پروتئین‌های ویروسی ضروری خود را از دست داده است، از لحاظ تولید ذرات ویروسی آلوده کننده و بیماری‌زا ناتوان است، حال می‌بایست به یک میزبان سلولی منتقل شده تا بتواند ژن‌های ویروسی لازم را بیان کرده و ذرات آلوده کننده‌ی ویروسی حامل ژنهای خارجی را تولید کند. وکتورهای رترو-ویروسی، اگرچه کشت‌های سلولی را آلوده می‌سازند، ولی قادرند به‌اجبار ژنوم‌شان را به درون ژنوم سلول میزبان وارد سازند. اما سایر وکتورها، بیشتر موضوع بحث ژن درمانی هستند. وکتورهای آدنوویروسی و رتروویروسی برای انتقال ژن به سلول‌هایی طراحی شده‌اند، که با هیچ روش دیگری بطور مطلوب، تثبیت نمی‌شوند. روش

آلوده سازی با وکتورهای ویروسی، نه تنها امکان ارزیابی اثرات ژن را فراهم ساخته، بلکه در برخی مواقع جایگزینی برای روش انتقال ژن هم محسوب می شود. زیرا در این حالت ژنوم ویروسی حکم وکتور انتقال دهنده تراژن به سلول را داشته و به حقیقت آلوده سازی از طریق وکتورهای ویروسی، به طور نسبی ساده و سریع است و بیان ژنهای خارجی نیز، به شیوه ای پایدار انجام می پذیرد (۳). تاکنون دو گروه از وکتورهای رتروویروسی برای تولید جانوران تراریخته توسعه یافته اند: ۱) وکتورهای مشتق شده از ژنوم رتروویروس پروتوتائپیک نظیر MLV، ۲) وکتورهای مشتق شده از ژنوم رترو ویروس های بسیار پیچیده تری نظیر لنتی ویروسها (۴۸). در پژوهشهای گذشته تولید جانوران تراریخته (به خصوص چارپایان)، وکتورهای MLV بیشتر رایج بودند. اما در اکثریت موارد تراژنهای منتقل شده بواسطه فرآیند متیلاسیون دی.ان.ای دستخوش فرآیند خاموش سازی ژنها قرار می گرفتند و برای انتقال ژنهای بزرگتر از ۱۰ کیلو جفت باز با محدودیت هایی مواجه بودند. وجود این عیبها منجر به توسعه ی وکتورهای لنتی ویروسی برای تولید جانوران تراریخته شد. زیرا لنتی ویروسها توانایی آلوده سازی و تلفیق ژن طیف وسیعی از سلولهای تقسیم پذیر و تقسیم ناپذیر را داشته و بواسطه وجود کمپلکس پیش

الحاقی ویروسی خود، قادرند تراژن را به هسته ی سلول منتقل کرده و در ژنوم میزبان ادغام سازند (۴۸). این وکتورها به طور اساسی از ظرفیت کلونینگ بسیار بالایی برخوردارند و قابلیت انتقال ژنهای خارجی را حتی تا نه کیلو جفت باز دارند (۴۶). به تازگی این روش موثرترین روش برای تولید جانوران تراریخته ای چون ماکیان و چارپایان بوده است (۴۸). تحقیقات نشان داده است، در چارپایان زمانی که از این وکتورهای لنتی- ویروسی حامل تراژن برای اینفکشن اووسیتها قبل از لقاح استفاده شده است، بیش از ۹۰ درصد از جنین های تراریخته تراژن را در دوره ی جنینی بیان نموده اند (۵۴). مشجور در سال ۱۳۹۰ موفق به ساخت لنتی ویروسهای نو ترکیب ناقل ژن هورمون رشد (GH) فیل ماهی *Huso huso* و بررسی بیان ژن در سلولهای بنیادی جنینی انسانی HEK-293T شد. در این پژوهش توالی کامل ژن کد کننده هورمون رشد فیل ماهی به یک سازه لنتی ویروسی پیوند زده شد که نتایج این تحقیق نشان می دهد، این سازه قادر به تولید تیتراهای بالایی از ویروس های نو ترکیب بالغ و فعال است که قادراند، به نحوی بسیار کارآمد رده سلولی جنینی انسانی را آلوده ساخته، تراژن هورمون رشد را به سلولها منتقل و آن را بطور پایدار در ژنوم سلول تلفیق سازد.

روش باکتریوفکشن

امروزه وارد نمودن ژن به درون سلولهای جانوری توسط باکتری توسعه بیشتری یافته است. در این حالت تراژن بعنوان بخشی از ژنوم باکتری یا بوسیله پلاسمید، به درون سلول میزبان حمل می-شود، از این رو این انتقال ژن توسط باکتری را باکتریوفکشن می-نامند (۲۱). در این روش یک پلاسمید می-تواند، به عنوان یک انتقال-دهنده، باعث آمیختن پروتوپلاسم باکتریایی با پروتوپلاسم سلول ترنسفکت شده شود. اما به علت ناکارآمد بودن این روش به-ندرت مورد استفاده قرار می-گیرد و اشکال عمده‌ی آن این است، که تمامی ژنهای باکتریایی را نیز، به سلول انتقال می-دهد (۳). تاکنون تعداد زیادی از ژنهای هورمون رشد ماهیان با استفاده از روش شوک حرارتی و یا الکتروپوریشن، در باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) به عنوان یک مدل پروکاریوتیک، کلون و بیان شده است که در پژوهش‌های فیزیولوژیک و تغذیه ماهیان از کاربردهای بسیاری برخوردار بوده است (۵۵،۵۶،۵۷،۵۸،۵۹). اما با این وجود *E. coli* یک پروکاریوت است و بسیاری از خصوصیات اصلی و طبیعی آن، نظیر فرآیندهای تولید پروتئین، تاخوردگی پروتئینها و اصلاحات پس ترجمه‌ای، به‌طور اساسی با یوکاریوتها متفاوت است. از طرفی ظرفیت پائین *E. coli* در فرآیندهای پس

ترجمه‌ای باعث شده، تولید پروتئینهای نو ترکیب فعال و اجسام ذخیره‌ایی در آنها کمتر صورت پذیرد (۶۰). لیکن با توسعه و پیشرفت سیستمهای بیانی یوکاریوتیک، چندین نمونه ژن از هورمون رشد ماهیان، در سلولهای یوکاریوتیکی چون مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Pichia pastoris* (۶۱،۶۲،۶۳). و میکروجلبک دریای کلرلا *Nannochloropsis oculata* (۶۴) و رده‌های سلولی HeLa بیان شده است (۶۵). محققین از این باکتری‌ها، مخمرها و جلبک‌های تراریخته، که تا نسل‌های متوالی قادر به بیان تراژن‌های هورمون رشد ماهیان بودند، بعنوان مکمل غذایی حاوی هورمون رشد نو ترکیب در تغذیه لاروهای ماهیان پرورشی بهره گرفته و به اثرات تسریع رشد شایان توجهی در این ماهیان دست یافتند.

نتیجه‌گیری نهایی

در حال حاضر، تحقیقات بسیار گسترده‌ایی بر روی ماهیان و بی‌مهرگان تراریخته در سراسر جهان انجام پذیرفته است و تولید تجاری آنها به یک واقعیت بدل شده است و علی‌رغم بحث برانگیز بودن آنها از لحاظ ایمنی زیستی، سرمایه گذاری‌های ویژه‌ای در بسیاری از کشورهای جهان معطوف به تحقیقات ژنتیک در این حوزه گشته است، زیرا فن‌آوری ماهیان تراریخته دارای

"مشجور و همکاران، بررسی رویکردهای تولید ماهیان و بی مهرگان تراریخته با بهره گیری از تکنیک های مهندسی ژنتیک"

پتانسیل بسیار وسیعی برای حصول حداکثر بهره-وری و تولید گونه‌های برتر با بهره‌گیری از روشهای ژنومیک، در بحث آبی‌پروری بوده است که می‌تواند بسیاری از مشکلات تجاری سازی را در صنعت شیلات بر طرف سازد.

بنابراین امید است محققین کشور نیز با ورود هرچه بیشتر به این عرصه از تکنولوژی، موفقیت‌های شایانی را برای کشور همیشه سرفراز ایران به ارمغان آورند.

References

منابع مورد استفاده

1. مشجور، س. ۱۳۹۰. ساخت لنتی ویروسهای نو ترکیب ناقل ژن هورمون رشد فیل ماهی (*Huso huso*) و بررسی بیان ژن در رده سلولی بنیادی جنینی انسانی HEK293T. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی. ۱۰۳ ص.
1. **National Research Council (NRC). (2002).** Animal biotechnology: scientific concerns. Nat. Acad. Pres. Washington. DC.
2. **Hallerman, E. M, McLean, E. and Fleming, I. A. (2007).** Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: a review identifying research needs. Appl. Anim. Beh. Sci. 104: 265-294.
3. **Houdebine, L. M. (2003).** Animal transgenesis and cloning. Published by John Wiley and Sons Ltd, ISBNs: 0-470-84827-8 (HB); 0-470-84828-6 (PB).
4. **Dunham, R. A. (2004).** Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn. University Alabama USA. CABI Publishing. pp. 7 - 13, 160 - 192, 207 - 211.
5. **Canosa, L. F, Chang, J. P and Peter, R. E. (2007).** Neuroendocrine control of growth hormone in fish. Endocrinology, 151: 1-26.
6. **Pitkanen, T. I, Krasnov, A , Teerijoki, H and Molsa, H. (1999).** Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) I. Growth response to various GH constructs. Gen. Ana. Biomol. Eng. 15: 91-98.
7. **Zbikowska, H. M. (2003).** Fish can be first advances in fish transgenesis for commercial applications. Transgenic Res. 12: 379-389.
8. **Hu, W, Zhu, Z.Y. (2010).** Integration mechanisms of transgenes and population fitness of GH transgenic fish. Science China. Life Sciences 53: 401-408.

"مشجور و همکاران، بررسی رویکردهای تولید ماهیان و بی مهرگان تراریخته با بهره گیری از تکنیک های مهندسی ژنتیک"

9. **Wang, R, Zhang, P, Gong, Z, Hew, C. L. (1995).** Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish(*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4: 20–26.
10. **Devlin, R. H, Yesaki, T. Y, Biagi, C. A, Donaldson, E. M, Swanson, E. M. P., Chan, W. -K. (1994a).** Extraordinary salmon growth. *Nature.* 371: 209–210.
11. **Devlin, R. H., Byatt, J. C., McLean, E., Yesaki, T. Y., Krivi, G. G., Jaworski, E. G., Donaldson, E. M. (1994b).** Bovine placental lactogen is a potent stimulator of growth and displays strong binding to hepatic receptor sites of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 31–41.
12. **Carvan III, M. J, Dalton, T. P, Stuart, G. W, Nebert, D. W. (2000).** Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 919: 133–147.
13. **Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H., Aoki, Y. (2000).** Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat. Biotechnol.* 18: 62–65.
14. **Nam, Y. K., Noh, J. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Cho, K. -N., Kim, C. G., Kim, D. S. (2001).** Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* 10: 353–362.
15. **Nam, Y. K, Cho, Y. S, Cho, H, Kim, D. S. (2002).** Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture.* 209: 257–270.
16. **Dunham, R. A, Chatakondi, N, Nichols, A, Chen, T. T, Powers, D. A, Kucuktas, H. (2002a).** Survival of F2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) containing pRSVrtGH1 complementary DNA when subjected to low dissolved oxygen. *Mar. Biotechnol.* 4: 323–327.
17. **Dunham, R. A, Warr, G. W, Nichols, A, Duncan, P. L, Argue, B, Middleton, D, Kucuktas, H. (2002b).** Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.* 4: 338–344.
18. **Fletcher, G. L, Shears, M. A, Yaskowiak, E.S, King, M. J, Goddard, S. V. (2004).** Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture. *Aust. J. Exp. Agric.* 44: 1095–1100.

19. **Guillen, I, Berlanga, J, Valenzuela, C. M, Morales, A, Toledo, J, Estrada, M. P, Puentes, P, Hayes, O, LaFuente, J. (1999).** Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *Mar. Biotechnol.* 1: 2–14.
20. **Wu, G, Sun, Y, Zhu, Z. (2003).** Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat. Living Resour.* 16: 416–420.
21. **Twyman, R. M. (2005).** Gene Transfer to Animal Cells. BIOSciences, ISBN. 1: 8599 - 6204.
22. **Levine, B. L, Humeau, L. M, Boyer, J, MacGregor, R. R, Rebello, T, Lu, X, Binder, G. K, Slepishkin, V, Lemiale, F, Mascola, J. R, Bushman, F. D, Dropulic, B. and June, C. H. (2006).** Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103(46): 17372-7.
23. **Zhu, Z, Li, G, He, L and Chen, S. (1985).** Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z. angew. Ichthyol.* 1: 31-34.
24. **Culp, P, Nusslein-Volhard, C and Hopkins, N. (1991).** High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 7953-7957.
25. **Lu, J.-K, Chen, T. T, Chrisman, C. L, Andrisani, O. M and Dixon, J. E. (1992).** Integration, expression, and germ-line transmission of foreign growth hormone genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1:366-375.
26. **Devlin, R. H, Yesaki, T. Y, Donaldson, E. M and Hew, C.-L. (1995).** Transmission and phenotypic effects of an antifreeze /GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture.* 137: 161-169.
27. **Dunham, R. A, Eash, J , Askins, J and Townes, T. M. (1987).** Transfer of a metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 87-91.
28. **Fletcher, G. L, Shears, M. A, King, M. J, Davies, D. L and Hew, C. -L. (1988).** Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 352-357.
29. **Du, S. J, Gong, Z, Fletcher, G. L, Shears, M. A, King, M. J, Idler, D. R and Hew, C. -L. (1992).** Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an 'all fish' chimeric growth hormone gene construct. *Biotechniques.* 10: 176-180.
30. **Zhang, Y and Yu, L. C. (2008).** Microinjection as a tool of mechanical delivery. *Cur. Opin. Biotechnol.* 19: 506–510.

"مشجور و همکاران، بررسی رویکردهای تولید ماهیان و بی مهرگان تراریخته با بهره گیری از تکنیک های مهندسی ژنتیک"

31. **Brem, G, Brenig, B, Horstgen-Schwark, G and Winnacker, E. L. (1988).** Gene transfer in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 68: 209-219.
32. **Devlin, R. H, Yesaki, T. Y, Donaldson, E. M., Du, S. J and Hew, C. -L. (1993).** Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 1376-1384.
33. **Chourrout, D, Guyomard, R and Houdebine, L. M. (1986).** High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri Rich.*) by microinjection into egg cytoplasm. Aquaculture. 51: 143-150.
34. **Penman, D. J, Beeching, A. J, Penn, S and Maclean, N. (1990).** Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. Aquaculture. 85: 35-50.
35. **Ozato, K, Kondoh, H, Inohara, H, Iwamatsu, T, Wakamatsu, Y and Okada, T.S. (1986).** Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken α -crystallin gene in medaka embryos. Cell Diff. 19: 237-244.
36. **Stuart, G. W, McMurray, J. V and Westerfield, M. (1988).** Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. Dev. 103: 403-412.
37. **Fletcher, G. L and Davies, P. L. (1991).** Transgenic fish for aquaculture. Gen. Eng. 13: 331-370.
38. **Besheng, J, Khoo, H. W. (1997).** Transient expression of two luciferase reporter gene constructs in developing embryos of *Macrobrachium lanchesteri* (De Man). Aquaculture. Res. 28:183-190.
39. **Li, S. S, Tsai, H. J. (2000).** Transfer of Foreign Gene to Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by Spermatophore-Microinjection. Mol. Rep. Dev. 56:149-154.
40. **Knight, D. E and Scrutton, M. C. (1986).** Gaining access to the cytosol: the technique and some application of electroporabilization. Biochem. J. 234, 497-506.
41. **Sin, F.Y.T. (1995).** Transgenic fish. J. Fish Biol. Rev. 7: 417-441.
42. **Sin, F.Y.T, Walker, S. P, Symonds, U. K, Mukherjee, J. G. I, Khoo and Sin, I. L. (2000).** Electroporation of Salmon Sperm for Gene Transfer: Efficiency, Reliability, and Fate of Transgene. Mol. Rep. Dev. 56:285-288.

43. **Lu, J.-K, Fu, B. H, Wu, J. L, Chen, T. T. (2002).** Production of transgenic Silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.* 4: 328-337.
44. **Tsai, H. J. (2000).** Electroporation sperm Mediation of a Gene Transfer System for Finfish and Shellfish. *Mol. Rep. Dev.* 56: 281-284.
45. **Chen, T. T, Chen, M. J, Chiou, T. T and Lu, J. K. (2009).** Transfer of foreign DNA into aquatic animals by electroporation. *Springer.* 10.1007/978-4-431-09427-2_20.
46. **Segura, M. M, Garnier, A, Durocher, Y, Coelho, H and Kamen, A. (2007).** Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification. *Biotechnol. Bioengin.* 98: 789-799.
47. **Toledo, J. R, Prieto, Y, Oramas, N and Sanchez, O. (2009).** Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157: 538-544.
48. **Ansorge, S, Henry, O and Kamen, A. (2010).** Recent progress in lentiviral vector mass production. *Biochem. Eng. J. Rev.* 48: 362-377.
49. **Smith, J. G, Walzem, R. L and German, J. B. (1993).** Liposomes as agents of DNA transfer. *Bioch. Biophys. Acta.* 1154: 327-340.
50. **Szelei, J, Varadi, L, Muller, F, Erdelyi, F, Orban, L, Horvath, L and Dudo, E. (1994).** Liposomemediated gene transfer in Fish embryos. *Transgenic Res.* 3: 116-119.
51. **Lim, Y, Kim, C, Kim, K, Kim, S. W and Park, J. (2000).** Development of a safe gene delivery system using biodegradable polymer, poly-[a-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 6524-6525.
52. **Jiao, Y, Peng, Z. H, Zhang, J. Y, Qin, J. Y and Zhong, C. P. (2008).** Liposome-mediated transfer can improve the efficacy of islet labeling with superparamagnetic iron oxide. *Elsev.Inc.* 40: 3615-3618.
53. **Lundstrom, K. (2003).** Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trend. Biotechnol.* 21(3): 117-122.
54. **Hofmann, A, Zakhartchenko, V, Weppert, M, Sebald, H, Wenigerkind, H, Brem, G. (2004).** Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod.* 71: 405-9.
55. **Sekine, S, Mizukami, Nishi, T, Kuwana, Y, Saito, A, Sato, M, Itoh, S and Kawauchi, H. (1985).** Cloning and expression of Salmon growth hormone in *Escherchia coli*. *Proc.he Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 4306-4310.

"مشجور و همکاران، بررسی رویکردهای تولید ماهیان و بی مهرگان تراریخته با بهره گیری از تکنیک های مهندسی ژنتیک"

56. **Agellon, L. B and Chen, T. T. (1986).** Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA.5: 463-467.
57. **Mahmoud, S. S, Wang, S, Moloney, N. M and Habibi, H. R. (1998).** Production of a biologically active novel goldfish growth hormone; in *Escherichia coli*. Com. Biochem. Physiol. B120: 657-663.
- 58- **Ben-Atia, I, Fine, M., Tandler, A, Funkenstein, B, Maurice, S, Cavari, E and Gertler, A. (1999).** Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. Gen. Comp. Endocrinol. 113: 155-164.
59. **Chen, C. M, Cheng, W. T, Chang, Y. C, Chang, T. J and Chen, H. L. (2000).** Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. Life Sci. 67: 2103-2115.
60. **De Bernardez Clark, E. (1998).** Refolding of recombinant proteins. Cur. Opin. Biotechnol. 9: 157- 163.
61. **Chen, D, Yang, F, Wang, W and Xu, X. (1998).** Intracellular expression of Lateolabrox japonicus growth hormone in methyltrophic yeast, *Pichia pastoris*. Prog. Biochem. Biophy. 25: 140-143.
62. **Bai, J. J, Ma, J, Jian, Q, Li, X. H and Luo, J. R. (1999).** Clone of cDNA for common carp GH and its expression in prokaryocyte. Chin. Biochem. Mol. Biol. 15: 409-412.
63. **Ma, J, Bai, J. J, Li, X. H, Luo, J. R, Jian, Q and Zhang, H. J. (1999).** Expression of rainbow trout GH cDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Chin. J. Biotechnol. 15: 219- 224.
64. **Tsai, H. J, Huang, R, Li, S. S and Chen, H. L. (2008).** Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). Phycol. 44: 768–776.
65. **Feng, H, Cheng, J, Luo, J, Liu, S. J and Liu, Y. (2006).** Cloning of Black carp β -actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. Act. Gen. Sin. 33 (2): 133-140.

"مجله ایمنی زیستی، دوره پنجم، شماره دوم، زمستان ۹۱"