مجله ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره دوم، زمستان ۹۱

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

سکینه مشجور*[۱]، حسین ذوالقرنین [۲]، محمدعلی سالاری علی‌آبادی[۳]، احمد قاسمی[۴]

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

۲ و۳- 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 وپژوهش‌های خلیج فارس

sakynemashjoor@gmail.com

چکیده

علی‌رغم اینکه اکثریت پیشرفت‌های گذشته در صنعت آبزی‌پروری مرهون استفاده از روش‌های سنتی هم-آوری در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان است. اما در طول دو دهه‌ی گذشته، رشد و توسعه تکنولوژی دی.ان.اِ نوترکیب و مهندسی ژنتیک و بهره‌گیری از آن در تولید ماهیان و آبزیان تراریخته واجد صفات مطلوبی نظیر تسریع رشد و مقاومت به بیماری، توانسته سهم شایان توجهی را در پشرفت‌های این حوزه داشته باشد. ماهیان و آبزیان به علت اینکه اکثر گونه‌هایشان، لقاح خارجی و ظرفیت زادآوری بالایی دارند، یک سیستم ویژه و ممتاز برای پژوهش‌های انتقال ژن و دستورزی‌های ژنتیکی محسوب می‌شوند. در سال-های گذشته هورمون رشد (GH) معمول‌ترین ژن در بحث اصلاح ژنتیک آبزیان پرورشی بوده که مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. بیان تراژن‌های هورمون رشد منجر به افزایش رشد در ذخایر آبزیان شده است. به‌عنوان مثال نرخ رشد را در کوهو سالمون تا ۱۱ برابر ارتقا بخشیده است. تاکنون برای انتقال ژن به تخم-های ماهیان روش‌های متعددی مورد استفاده قرار گرفته است که در این میان، روش ریز تزریقی پیشگام بوده است، هرچند نرخ تلفیق تراژن در این روش به‌طور نسبی پایین است. بهره گیری از وکتورهای ویروسی نیز روشی جدید برای تلفیق مستقیم و پایدار ترنس ژن در ژنوم میزبان محسوب می‌شود. در حال

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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.اِی 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 سیستم-های 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.اِی 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 آبزی‌پروری و بحث افزایش میزان رشد ماهیان پرورشی، مسئله انتقال تراژن‌های هورمون رشد(Growth hormone(GH)) هورمون رشد یا سوماتوتروپین یک هورمون پروتئینی تک پلی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

پپتیدی است که بوسیله سلولهای سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می‌شود. 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 به‌عنوان مهمترین و شاخص‌ترین فاکتور در افزایش بازده تولید، محسوب می‌شود، در طول دهه‌های گذشته اکثر تحقیق‌ها در این زمینه، بر انتقال ژن هورمون رشد متمرکز شده است و این ژن معمول‌ترین ژنی است که به منظور افزایش و تسریع رشد و اصلاح ژنتیک آبزیان پرورشی، مورد بهره‌برداری 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 سلول‌های سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می‌شود 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 فعالیت‌های GH یک شبکه منظم و پیچیده قابل تعریف است (۵). در پژوهش‌های اولیه ژن‌های سنتتیک GH پستانداران برای انتقال مورد استفاده قرار می‌گرفت که هیچ گونه اثری بر رشد ماهیان نداشت، اما زمانیکه توالی‌های کدکننده GH ماهیان شناسایی و در دسترس قرار گرفت، رویکردهای انتقال ژن در آبزیان نیز، با تسریع رشد همراه شد (۶). زیرا هورمون رشد نوترکیب ماهیان (rGH) همانند هورمون رشد طبیعی، از کارکردهای فیزیولوژیک مشابه‌ای برخوردار بوده و تولید این پروتئین در ارتقای نرخ رشد ماهیان بسیار مؤثر بوده است. از سال ۱۹۹۲ تاکنون سی.دی.ان.اِی ژن هورمون رشد حداقل در بیش از ۳۵ گونه از ماهیان دنیا، شناسائی و کلون شده است (۷،۸) و محققین توانسته‌اند، این ژن را به منظور تسریع فرآیند رشد، به بیش از ۱۲ گونه از ماهیان نظیر ماهی طلایی، آزاد ماهی، کپور معمولی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گربه‌ماهی‌کانالی و... انتقال دهند (۸،۲).

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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 آبزی‌پروری 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 (۱۷،۱۶،۱۵،۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۹،۴). 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 (*Salmo salar*) GH– 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 تیلاپیای (*Oreochromis sp.*) GH– تراریخته و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) GH– تراریخته، موسوم به ''all-fish'' به دولت-ها ارائه و تأیید شده است(۲۰،۱۹). در ایران علی‌رغم توسعه چشمگیر مزارع تکثیر و پرورش آبزیان (ماهی و میگو) و استقبال مصرف‌کنندگان از پتانسیل‌های موجود در کشور، همواره تحقیق‌ها و پژوهش‌های کاربردی در حوزه مهندسی ژنتیک آبزیان کمتر کارآمد و شایان توجه بوده و برخی واجد ضعف‌هایی است. با این وجود در سال های 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، بالاخص 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.اِی/ وکتور به درون بافت میزبان به‌طورمستقیم انجام می‌پذیرد و روش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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

خانواده و گونه	سازه ژنی	نرخ افزایش رشد	کشور	مرجع
Salmonidae				
Atlantic salmon, *Salmo salar*	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, *Oncorhynchus kisutch*	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, *O. tshawhytscha*	opAFP-csGH	۶ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Rainbow trout, *O. mykiss*	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, *O. clarki*	opAFP-csGH	۶ برابر	کانادا	Devlin et al. (1995a)
Arctic charr, *Salvelinus alpinus*	Various constructs	بیش از ۱۴ برابر	فنلاند	Pitkanen et al. (1999)
Cichlidae				
Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*	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, *O. hornorum* hybrid	hCMV-tiGH	٪ ۸۲	کوبا	Martinez et al. (1996)
Tilapia, *O. hornorum* hybrid	hCMV-iGH	٪ ۶۲	کوبا	Martinez et al. (1999)
Ictaluridae				
Channel catfish, *Ictalurus punctatus*	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, *Carassius auratus*	mMT-hGH	–	چین	Zhu et al. (1985)
Common carp, *Cyprinus carpio*	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 (رژیم اشغالگر قدس)	Hinits and Moav (1999)
Common carp	ccβA-ccGH	۴ برابر	اسرائیل (رژیم اشغالگر قدس)	Hinits and Moav (1999)
Catla, *Catla catla*	RSVLTR-rtGH	–	هند	Sarangi et al. (1999)
Mrigal, *Cirrihinus mrigala*	RSVLTR-rtGH	–	هند	Sarangi et al. (1999)
Rohu, *Labeo rohita*	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, *Misgurnus misolepis*	mlβ-actin-mlGH	بیش از ۳۵ برابر	کره	Nam et al. (2001, 2002)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

in-vitro که ژنها در محیط آزمایشگاه به کشت های سلولی انتقال داده می‌شوند (۲۱). چهار استراتژی انتقال‌ژن به سلول‌های جانوری عبارتند از (۲۱): ۱) انتقال مستقیم دی.ان.اِی بوسیله ترانس‌فکشن(Transfection) فیزیکی: روش میکرواینجکشن(Microinjection)،الکتروپوریشن (Electroporation)، تفنگ‌ژنی و اولتراسوند (Ultrasound). ۲) ترانس‌فکشن بواسطه مواد شیمیایی: ترکیبات پلی‌کاتیونیک پلی‌پلکس‌ها و لیپوپلکس‌ها(Lipo-Plex). ۳) بسته‌بندی دی.ان.اِی توسط ویروس(ترانس‌داکشن(Transduction)). ۴) بسته بندی دی.ان.اِی 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.اِی خارجی به درون تخم(زیگوت)، هسته اووسیت، پیش‌هسته و یا سیتوپلاسم جنین‌های در حال رشد است. در این روش، حجم دقیقی از دی.ان.اِی 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، به‌طورمعمول ۲۰۰ میکرولیتر تا ۲۰ نانولیتر است (۲۳،۲۴،۲۵،۲۶). اما مقدار مطلوب برای دی.ان.اِی تزریق شده می‌بایست بیش از $۱۰^{۶}$ 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 نشانگررنگی دکسترین‌تگزاس‌قرمز (dextran Texas red)و یا پروتئین‌های فلورسانس شناسایی کرد (۳۰). از آنجا که پیش هسته 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.اِی را ریز تزریق کرد و این مسئله در مورد مهره داران پست و بی‌مهره‌گان 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.اِی از طریق منفذ میکروپیل به درون جنین ماهیان

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

(۳۲،۲۸،۳۱)، ۲) سوراخ‌کردن لایه کوریونی توسط یک سوزن فلزی پیش از تزریق و واردسازی سوزن میکروپیپتی شیشه‌ایی انتقال دهنده دی.ان.اِی خارجی به داخل سلول (۳۳،۳۴)و ۳) حذف لایه‌های ضخیم کوریونی با روش-های دستی (۳۵) یا بهره‌گیری از آنزیم پروناز (Pronase) برای هضم لایه کوریونی قبل از اجرای میکروانجکشن (۲۳). بطور معمول دی.ان.اِی 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 (۲۶،۳۶). البته نوع بافر تعلیق‌دهنده دی.ان.اِی، خطی یا حلقوی بودن آن و حجم دی.ان.اِی تزریق شده هم در کارآیی این روش انتقال ژن و نرخ بقا جنین تأثیرگذار بوده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد، زمانیکه از بافر معلق‌سازی دی.ان.اِی 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 $۱۰^{۸}$ نسخه دی.ان.اِی استفاده شد، در قیاس با $۱۰^{۶}$ نسخه میزان بقای جنین‌ها در حدود ۱۰ درصد کاهش یافت. نرخ الحاق دی.ان.اِی خطی در ژنوم هم ۱۵ درصد کارامدتر از دی.ان.اِی حلقوی بوده است (۳۴،۳۷). انتقال ژن به روش میکرواینجکشن، یک فرآیند آزمایشگاهی است و نیازمند تجهیزات ویژه‌ای نظیر میکروسکوپ، میکرواینجکتور و یک اُپراتور 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 وبه‌طور کامل وابسته به مهارت اُپراتور است. تزریق میکروسکوپی دی.ان.اِی 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.اِی 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 جداگانه‌ایی که قادر به تکثیراند و کلونی‌های سلولی را ایجاد می‌کنند، انجام می‌پذیرد. بنابراین اگر ژن رمزکننده‌ی پروتئین فلورسانس سبز (GFP) نیز در ساختار ژن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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.اِی با غلظت دو میلی گرم در میلی لیتر را با ۹۵ میکرولیتر از محلول Tris HCl یک مولار با pH = ۷/۵ 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.اِی خارجی در مقیاس توده‌ایی (Massive)به میگوی عظیم الجثه آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* از روش تزریق به اسپرماتوفور (Spermatophore-Microinjection, SMI) استفاده کردند (۳۹). SMI تکنیکی منحصربفرد 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.اِی اگزوژنوس 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 سینه‌ایی بین پاهای سوم و پنجم شنا منتقل می-شوند. در مورد سرنوشت دی.ان.اِی 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

غشای سلول قطبی شده و ولتاژ پتانسیل غشا در طول غشا پلاسمایی دو لایه فسفولیپیدی گسترش می‌یابد و هنگامی‌که اختلاف پتانسیل بین غشای درونی و بیرونی سلول از حد آستانه تجاوز کند، غشا در این ناحیه شکسته‌شده و به‌طور موقت یک منفذی شکل می‌گیرد و سلول را نسبت به ماکرومولکول‌های اگزوژنوس (مثلاً دی.ان.اِی حامل تراژن) نفوذپذیر ساخته و این مواد بواسطه فرآیند انتشار و یا نیروی الکتروپوریتیک وارد سیتوزول می‌شوند، لکن این تغییر در تخلخل غشا برگشت پذیراست (۴۰). اندازه این منافذ تحت کنترل عواملی از قبیل، تغییرات طول پالس، شدت میدان‌الکتریکی، میزان ولتاژ و قدرت یونی محیط است و چون در این سیستم شوک الکتریکی باعث القای شکل‌گیری این منافذ می‌شود، این سیستم الکتروپورشن نامگذاری شده است. بر این اساس دستگاه الکتروپورشن با بهره‌گیری از یکسری پالس‌های الکتریکی کوتاه با شدت و قدرت نفوذ بالا،به‌طور موقت منجر به تشکیل روزنه‌های ناپایداری در غشا سلول شده و شاید روزنه‌ها را برای مدت زمانی کوتاه باز نگه می‌دارد و به دی.ان.اِی اجازه می‌دهد قبل از بسته شدن مجدد آنها وارد سلول شود، با کاهش این پالس‌های الکتریکی نیز روزنه‌ها به یکباره به سرعت بسته می‌شوند (۲۱). شوک الکتریکی دستگاه الکتروپوریشن دارای مکانیسم‌های مختلفی است که تحت شرایط متفاوت عمل می‌کنند، برخی از این مکانیسم‌ها پالس‌های الکتریکی با امواج مربعی تولید می‌کنند و برخی دیگر پالس‌هایی با امواج نمایی. از این رو زمانیکه از این دستگاه برای گونه خاصی از ماهی برای نخستین بار استفاده‌می شود، می‌بایست شرایط بسته به گونه کالیبره و بهینه شود. تاکنون از این روش برای انتقال دی.ان.اِی به جنین‌های لقاح یافته ماهیان مختلفی چون مداکا، ماهی‌طلایی، ماهی‌حوض، لوچ ، کپور زرد- قرمز، گربه‌ماهی کانالی، گوره‌خرماهی، کپورمعمولی، نرم‌تن آبالون-قرمز و صدف‌کلم استفاده شده است و هریک از این آبزیان نرخ بقا و تخمه‌گشایی متفاوتی را تحت شرایط بهینه الکتروپوریشن نشان داده‌اند (۴۱،۴۲). نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد، نرخ بقا و تلفیق ژن در تخم‌ها یا جنین‌های الکتروپوریت شده، بستگی به سن جنین یا تخم و مرحله نموی آن دارد و با افزایش دوره پالس‌ها و ولتاژ، کارایی انتقال ژن و تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده افزایش می‌یابد. زمان مناسب برای الکتروپوریشن نیز در حدود ۳۰ دقیقه پس از لقاح است (۴۲). این روش در مقایسه با روش سنتی میکرواینجکشن به‌طور کامل ساده، راحت و کارآمد بوده و برای انواع سلول‌ها، به شیوه‌ای صد در صد تخصصی قابل اجراست و در مقایسه با روش ترانس فکشن شیمیایی با مشکل عدم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

کفایت جذب کمپلکس‌های شیمیایی دی.ان.اِی در سلول مواجه نبوده و از جمله مزیت‌های آن حذف خاصییت سیتوتوکسیتی (معمول در روش های ترانسفکشن شیمیایی و اینفکشن ویروسی)، کوتاه بودن زمان مورد نیاز برای دستکاری حجم بالایی از جنین ها و عدم مواجه با مشکلاتی چون لایه‌های سخت کوریونی و غیر شفاف بودن تخمها و نامرئی بودن پیش هسته تخم‌ها در برخی گونه‌هاست (۳۰). در هرحال 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 نوترکیب متناظر و یا ایجاد کلونهای حامل دی.ان.اِی 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 نمی-توان به طور دقیق، تخمین زد و در برخی موارد نیز، شماری از سلول‌ها تحت تأثیر میدان الکتریکی از بین می‌روند (۳۰). یکی از پیشرفت-های شایان توجه در روش الکتروپوریشن، تلفیق آن با روش انتقال ژن بواسطه اسپرم و ایجاد روش نوینی موسوم به SMGT یا انتقال ژن بواسطه اسپرم های الکتروپوریت شده است (۴۳،۴۲). در سال های گذشته تمایل به استفاده از این روش برای ماهیان (Finfish) و بی‌مهرگان آبزی (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) آبزیان است نظیر: چسبندگی، مات-بودن، ضخامت، شناوری، غیرقابل‌روئیت‌بودن پیش‌هسته و وجود لایه‌های ضخیم کوریونی فائق آید، ۳) نظر به اینکه دی.ان.اِی خارجی می‌بایست به گونه‌ایی به هسته منتقل شود، اگر تخم‌های لقاح یافته به همراه دی.ان.اِی الکتروپوریت شوند، احتمال اینکه قطعات دی.ان.اِی 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 آبزی را می‌توان تحت شرایط انجماد نگهداری کرده و بدین شکل این اسپرم‌های تیمار شده همیشه قابل استفاده‌اند. بنابراین اسپرم ماهیان می-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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

اما یک فاکتور مهم در روش الکتروپورشن دی.ان.اِی 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-می‌ماند و به محض رقیق‌سازی با یک بافر و یا آب و یا محلول دی.ان.اِی، این اسپرم فعال شده و تنها تا حدود ۳۰ ثانیه فعال و متحرک باقی مانده و پس از آن قابلیت بارورسازی تخم‌ها را از دست می‌دهد. البته اسپرم اکثریت جانوران آبزی پس از افزودن ۴ حجم از محلول بافری PBS (که شامل : ۱۳۰ میلی مول کلرید سدیم (NaCl)، ۲/۶ میلی‌مول کلرید کلسیم (KCl)، ۸ میلی‌مول 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 می‌ماند. از این رو PBS و HEPES به عنوان محلول‌های بافری معمول برای گسترش اسپرم حین الکتروپورشن بکار می‌روند. برای این منظور حدود ۳۰۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌سازی نشده (که معادل 10^{10} اسپرم در میلی‌لیتر است) با ۶۰۰ میکرولیتر دی.ان.اِی در حضور بافر PBS با هم مخلوط شده تا نسبت 10^{4} مولکول دی.ان.اِی اسپرم بدست آید(۴۵). سپس این اسپرم‌ها به(Cell- porator) یا کانتینرهای ۲-۱ میلی‌لیتری دستگاه الکتروپوریشن منتقل‌شده و الکتروپوریت می‌شوند. در مرحله بعدی ظرف محتوی اسپرم-های الکتروپوریت شده برای بازیابی به مدت چند دقیقه بر روی یخ قرار داده می‌شوند. سپس این اسپرم‌ها برای لقاح در شرایط *in vitro* با اووسیت های تیمارنشده آماده‌اند. به هر حال در روش الکتروپوریشن میزان تحرک اسپرم، میزان توانایی بارورسازی اسپرم‌های تیمار شده، نرخ لقاح، نرخ تخمه‌گشایی (Hatching) ، نرخ بقا، میزان انتقال ژن و میزان غیر عادی بودن جنین‌ها همگی به ولتاژ، غلظت دی.ان.اِی و میزان رقیق‌سازی وابسته است (۴۵).

روش ترانسفکشن شیمیایی- لیپوفکشن گنادی

پیوستن دی.ان.اِی به مولکولهای مختلف، در شرایط *in-vitro* می‌تواند باعث تشکیل کمپلکسی شود، که بخاطر قابلیت برهمکنش الکترواستاتیک با غشای پلاسمایی قادر است، به سلول وارد شده وبنابراین این روش، یکی از متداولترین شیوه‌های مرسوم، برای واردسازی دی.ان.اِی است. در این میان یکی از این مولکول‌ها کلرید کلسیم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

($CaCl_2$) است که با پیوندشدن گروه فسفات دی.ان.اِی با کلسیم، کمپلکس نامحلول DNA-$CaPO_4$ را تشکیل می‌دهد، در این حالت افزودن مقدار زیادتری از دانه‌های کوچک فسفات کلسیم به دی.ان.اِی 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.اِی دوباره در سیتوپلاسم سلول، به حالت محلول در می‌آید. اما اکثریت دی.ان.اِی‌های 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 افزایش‌داد. زیرا این امر شانس ایجاد فرورفتگی در سلول و کشیده شدن وزیکول محتوی کمپلکس دی.ان.اِی به درون سلول را افزایش می‌دهد. این ترانسفکشن سلولی روش هم رسوبی دی.ان.اِی- 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 ترانسفکت سلول ها 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.اِی- فسفات کلسیم است، که اگرچه در مواردی (چون ترانسفکشن دی.ان.اِی ویروسی) از کارآیی ترنسفکت بالایی برخوردار است، اما به‌طور اساسی ترنسفکشن با این روش مشکل بوده و میزان دی.ان.اِی نوترکیب 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 توده‌ایی، روش لیپوفکشن (Lipofection) است که جزء روشهای شیمیایی ترنسفکشن محسوب می‌شود و در قیاس با سایر روشها، قابلیت سیتوتوکسینی آن به‌طور نسبی پایین است و تا حدودی به نسبت لیپید/ دی.ان.اِی بستگی دارد. در این روش از برهمکنش مولکولهای لیپیدی با بار مثبت و مولکولهای دی.ان.اِی با بار منفی استفاده می‌شود، بدین صورت دی.ان.اِی 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

برقرارساخته و با گروه فسفات دی.ان.اِی باند شوند و این امر منجر به کاهش بار منفی دی.ان.اِی خواهد شد. بدین گونه، این کمپلکس بطورخود 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.اِی توسط سلول را تحریک می‌کند (۴۹). از طرفی، فرآیند اندوسیتوز دی.ان.اِی بوسیله لیگاندهایی که به‌طوراختصاصی برای شناسایی مولکولها در سطح سلول بکار می‌روند نیز نشانه‌گذاری شده است. این لیگاندها، ممکن است، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال باشند، که به‌طور اختصاصی برای باندشدن با طیف وسیعی از مولکولها در سطح سلول، آزاد شده‌اند و در برخی موارد این لیگاندها می‌توانند، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها و یا مولکول‌هایی نظیر آسیلیلوپروتئین ها باشند که دارای گیرنده هایی اختصاصی برروی غشاء هستند و این رویکرد، مبتنی بر باند شدن دی.ان.اِی با لیگاند، از طریق برقراری اتصال‌های محکمی نظیر اتصال‌های 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 جنین‌های گربه‌ماهی آفریقایی استفاده کردند، که نتایج این تحقیق موفقیت‌آمیز بوده است (۵۰). یکی از این ترکیب-ها پلی‌کاتیونیک لیپوفکتامین است، که یک معرف کاتیونیک لیپیدی است و با ایجاد کمپلکس لیپوزومی پایدار با دی.ان.اِی موسوم به لیپوپلکس قادر است بار الکتریکی مؤثرکمپلکس را کاهش داده و طی یک برهمکنش الکترواستاتیک با غشا و القاء فرآیند اندوسیتوز، عبور کمپلکس از خلال غشا را امکان‌پذیر ساخته و آن را به‌طور مستقیم به درون هسته هدایت کند (۵۱). تحقیق‌های بسیار نشان داده است که این لیپوزوم‌های کاتیونیک، روشی قدرتمند در رمزگشایی و بیان کارآمد تراژن‌ها محسوب می‌شوند. لیپوفکتامین یک معرف تجاری معمول در فرآیند ترنسفکشن است که در پژوهش‌های بیولوژی سلولی مولکولی در سطحی گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد و از آن طی فرآیند لیپوفکشن برای وارد سازی دی.ان.اِی پلاسمیدی به محیط کشت سلولی در شرایط *in-vitro* استفاده می‌شود (۵۲). مشجور در سال ۱۳۹۰ توانست، لنتی ویروس های نوترکیب حامل ژن هورمون رشد (GH) فیل ماهی *Huso huso* را با بهره‌گیری از معرف لیپوفکتامین به سلول‌های بنیادی جنینی انسانی HEK-293T با موفقیت انتقال دهد. یکی دیگر از پیشرفت‌های شایان توجه در حوزه مهندسی ژنتیک آبزیان و روش لیپوفکشن، تلفیق آن با

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

روش انتقال ژن بواسطه‌ی گنادهای نر و ایجاد روش جدیدی موسوم به TMGT یا انتقال ژن بواسطه ترنسفکشن گنادهای 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.

Luو همکارانش، در سال ۲۰۰۲ موفق شدند، سازه ژنی حامل ژن هورمون رشد نوترکیب قزل آلای 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 می-کند 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 غیرویروسی است. انواع مختلفی از وکتورها در هر دو گروه وجود دارند، اما معمولترین وکتورهای غیرویروسی پلاسمیدها و پلاسمیدهای ترکیب‌شده با لیپوزوم‌ها هستند. وکتورهای ویروسی رایج، عبارتند از آدنوویروس‌ها (AV)، ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌ها (AAV)، رتروویروس‌ها (RV) و لنتی‌ویروس‌ها (LV). که در آلوده‌سازی سلول‌ها، در شرایط *in-vitro* و*in-vivo* 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. ازآنجا که این ژنوم نوترکیب، 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 کشت های سلولی را آلوده می سازند، 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

آلوده‌سازی با وکتورهای ویروسی، نه تنها امکان ارزیابی اثرات ژن را فراهم‌ساخته، بلکه در برخی مواقع جایگزینی برای روش انتقال ژن هم محسوب می‌شود. زیرا در این حالت ژنوم ویروسی حکم وکتور انتقال دهنده تراژن به سلول را داشته و به حقیقت آلوده‌سازی از طریق وکتورهای ویروسی، به‌طور نسبی ساده و سریع است و بیان ژنهای خارجی نیز، به شیوه‌ای پایدار انجام می‌پذیرد (۳). تاکنون دو گروه از وکتورهای رتروویروسی برای تولید جانوران تراریخته توسعه یافته‌اند: ۱) وکتورهای مشتق شده از ژنوم رتروویروس پروتوتایپیک نظیر MLV، ۲) وکتورهای مشتق‌شده از ژنوم رترو ویروس‌های بسیار پیچیده‌تری نظیر لنتی‌ویروسها (۴۸). در پژوهشهای گذشته تولید جانوران تراریخته (به‌خصوص چارپایان)، وکتورهای MLV بیشتر رایج بودند. اما در اکثریت موارد تراژن‌های منتقل شده بواسطه فرآیند متیلاسیون دی.ان.اِی دستخوش فرآیند خاموش‌سازی ژن‌ها قرارمی‌گرفتند و برای انتقال ژنهای بزرگتر از ۱۰ کیلو جفت باز با محدودیت‌هایی مواجه بودند. وجود این عیب‌ها منجر به توسعه‌ی وکتورهای لنتی‌ویروسی برای تولید جانوران تراریخته شد. زیرا لنتی‌ویروسها توانایی آلوده‌سازی و تلفیق ژن طیف وسیعی از سلولهای تقسیم‌پذیر و تقسیم-ناپذیر را داشته و بواسطه وجود کمپلکس پیش الحاقی ویروسی خود، قادرند تراژن را به هسته‌ی سلول منتقل کرده و در ژنوم میزبان ادغام سازند (۴۸). این وکتورها به‌طور اساسی از ظرفیت کلونینگ بسیار بالایی برخوردارند و قابلیت انتقال ژنهای خارجی را حتی تا نه کیلو جفت باز دارند (۴۶). به‌تازگی این روش موثرترین روش برای تولید جانوران تراریخته‌ای چون ماکیان و چارپایان بوده است (۴۸). تحقیقات نشان داده است، در چاپایان زمانیکه 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 دوره‌ی جنینی بیان نموده‌اند(۵۴). مشجور در سال ۱۳۹۰ موفق به ساخت لنتی‌ویروسهای نوترکیب 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 لنتی‌ویروسی پیوند زده شد که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، این سازه قادر به تولید تیترهای بالایی از ویروس‌های نوترکیب بالغ و فعال است که قادراند، به نحوی بسیار کارآمد رده سلولی جنینی انسانی را آلوده ساخته، تراژن هورمون رشد را به سلولها منتقل وآن را بطور پایدار در ژنوم سلول تلفیق سازد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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 می‌نامند (۲۱). در این روش یک پلاسمید می‌تواند، به عنوان یک انتقال‌دهنده، باعث آمیختن پروتوپلاسم باکتریایی با پروتوپلاسم سلول ترنسفکت شده شود. اما به علت ناکارآمد بودن این روش به‌ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرد و اشکال عمده‌ی آن این است، که تمامی ژنهای باکتریایی را نیز، به سلول انتقال می‌دهد (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 نوترکیب 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 نوترکیب 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 وعلی رغم 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

پتانسیل بسیار وسیعی برای حصول حداکثر بهره-وری و تولید گونه‌های برتر با بهره‌گیری از روشهای ژنومیک، در بحث آبزی‌پروری 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، موفقیت-های شایانی را برای کشور همیشه سرفراز ایران به ارمغان آورند.

منابع مورد استفاده References

۱. **مشجور، س.۱۳۹۰.** ساخت لنتی ویروسهای نوترکیب 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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 channelcatfish *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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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, Slepushkin, 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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 ä-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 *Macrobrachiumm 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 electropermeabilization. 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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 superparamagne- tic 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1391.5.2.3.9]