# مروری بر انتقال ژن در ماهیان

مهندس وحید حق‌پناه

مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، تهران - صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶

## چکیده

وجود منابع محدود مواد غذائی و رشد سریع جمعیت انسانی موجب شده که بشر به سمت ابداع روشهائی در جهت افزایش بازده تولید غذا و کاهش ضایعات آن تمایل پیدا نماید. افزایش قابلیت رشد کمی و کیفی موجودات پرورشی و افزودن قابلیت انطباق آنها با شرایط مختلف اقلیمی در سر فصل اینگونه تحقیقات قرار دارد. علم مهندسی ژنتیک، عهده‌دار بررسی راههای رفع مشکل فوق با توجه به توانائیهای زیستی و خلقتی موجودات زنده می‌باشد. از حدود پنجاه سال قبل که مهندسی ژنتیک با کشف ساختمان مولکول DNA و آنزیمهای موثر در همانند سازی، نسخه‌برداری و کنترل آن، به سمت ژنتیک مولکولی سوق پیدا کرد، اطلاعات فراوانی در زمینه شناخت ژنهای مسئول تولید و یا کنترل تولید هر یک از فرآورده‌های پروتئینی (ساختمانی، اجرائی) موجودات زنده بدست آمد.

ابداع روشهای جدا سازی ژن موجب شد که زمینه انتقال ژن تقویت شده و بدین ترتیب می‌توان قابلیتهای جدید در موجودات زنده ایجاد نمود. در طی یک دهه اخیر تلاشهای زیادی در زمینه تولید ماهی حامل ژن بیگانه بعمل آمده است. تکنیکها و روشهای مختلفی بکار گرفته شده تا بتوان موفقیت تولید ماهی حامل ژن بیگانه را افزایش داد. در این تحقیقات عوامل مختلف موثر بر موفقیت نظیر روش انتقال ژن، شکل و فرم آن، ترکیب محلول حامل ژن و ... مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این مقاله ضمن مرور تحقیقات فوق، نتایج حاصله از کارهای مختلف در هر یک از موضوعات فوق را به بحث خواهد کشید.

## انتقال ژن در ماهیان

ماهیان به دلیل لقاح خارجی در آنها، تعداد زیاد تخم تولیدی در هر مرحله تکثیر و کوتاه بودن دوره بلوغ جنسی در برخی از گونه‌ها، نمونه‌های مناسبی جهت مطالعات ژنتیکی می‌باشند. تا قبل از پیدایش علم ژنتیک مولکولی، عمده تحقیقات ژنتیکی در مورد ماهیان در زمینه انتخاب اصلح مولدین و هیبریدگیری صورت می‌پذیرفت.

امروزه این هدف، با توجه به شناخت مولکولی از مکانیسمهای عمل آن بروش ژنتیک مولکولی دنبال می‌شود. انتقال ژن بیگانه در ماهیان برای اولین مرتبه در سال ۱۹۸۵ بوسیله آقای زو (۳۸) دانشمند چینی و تیم همکار وی انجام شد. آنها ژن هورمون رشد انسان را که متصل به ژن کنترل کننده نسخه‌برداری (پروموتور)[1] متالوتیونین موش بود به چهار گونه ماهی حوض نقره‌ای و سگ ماهی تزریق نمودند. امروزه بیش از ۱۰ آزمایشگاه در دنیا در زمینه انتقال ژن در ماهیان مشغول تحقیق و کار می‌باشند (۳۷). فقط در زمینه انتقال ژن به ماهیان در طی کمتر از یک دهه گذشته حدود ۲۵۰ مقاله منتشر شده است. هدف اکثر تحقیقات بعمل آمده افزایش قدرت رشد در ماهیان با تزریق ژن هورمون رشد بوده است. امروزه ساختار ژنی هورمون رشد در چندین ماهی شناخته شده و بدین ترتیب می‌توان ترکیب DNA مورد استفاده جهت انتقال ژن، اعم از ساختمانی و کنترلی را کاملاً از ماهیان بدست آورد. از مجموع ۴۰ ترکیب DNA استفاده شده در تحقیقات مربوط به انتقال ژن در ماهیان، ۲۵ ترکیب صرفاً با استفاده از ژن گزارشگر[2]، ۱۵ ترکیب با استفاده از ژن هورمون رشد (۲۲، ۱۸، ۱، ۴۱، ۵۹) و یک ترکیب با استفاده از ژن مقاومت در مقابل یخزدگی بوده است (۴).

## گونه‌های ماهی مورد مطالعه

با توجه به خصوصیات گونه‌های مختلف آبزیان، ماهیانی که دارای ارزش غذائی و اقتصادی بوده و نیز دوره بلوغ جنسی قابل قبولی داشته‌اند عمدتاً جهت تحقیق مورد استفاده

---

1 - Promoter 2 - Reporter

قرار گرفته‌اند. کپور ماهیان، آزاد ماهیان (ماهی آزاد و قزل‌آلا) تیلاپیا و گربه ماهی مجموعاً ۸۰ درصد تولید آبزیان پرورشی دنیا را بخود اختصاص داده‌اند. عمده تحقیقات بعمل آمده در زمینه شناسائی ژن و انتقال آن در آبزیان نیز در این گروه از ماهیان تجربه شده است. برخی مشخصات گونه‌های مهم آبزیانی که موضوع انتقال ژن در آنها دنبال می‌شود در جدول زیر ارائه می‌گردد.

جدول ۱ ـ مشخصات ماهیان مورد مطالعه در زمینه انتقال ژن

| گونه | بلوغ جنسی | | | تخم | | | | زمان | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | سن (سال) | طول سانتیمتر | وزن کیلوگرم | توالی تخمریزی | تعداد تخم درهرمرحله | اندازه میلیمتر | دما سانتیگراد | اولین تقسیم سلولی | تولد (روز) |
| آزاد اقیانوس (۳) اطلس | ۳ـ۴ | ـ | ۳ـ۷ | یکبار درسال | ۵۰۰۰ـ۱۲۰۰۰ | ۵ـ۷ | ۸ | ۱۳ـ۱۵ ساعت | ۷۵ـ۸۰ |
| قزل‌آلای (۴) رنگین کمان | ۱ـ۵ | ۱۵ـ۲۰ | ـ | " " | ۸۰۰ـ۱۰۰۰ | ۳ـ۵ | ۱۰ | ۶ـ۸ ساعت | ۳۵ |
| کپورمعمولی (۵) | ۲ـ۴ | ۲۵ـ۴۰ | ـ | " " | >۱۰۰۰۰۰ | ۱ـ۱/۵ | ۲۰ | ۳۰ دقیقه | ۳ـ۴ |
| ماهی حوض (۶) | ۱ | ۵ | ـ | " " | >۲۰۰۰ | ۱/۵ | ۲۰ـ۲۵ | ۳۰ـ۵۰ دقیقه | ۴ |
| گربه ماهی (۷) جویباری | ۲ـ۵ | ۱۸ | ۰/۹ـ۴/۵ | " " | ۷۰۰۰ـ۳۰۰۰۰ | ۱/۲ـ۱/۵ | ۲۶ـ۲۷ | ۹۰ دقیقه | ۵ـ۱۰ |
| تیلاپیا (۸) | ۳ـ۶ ماه | ۱۱ـ۱۴ | ۱۰۰ gr | تمام طول سال | ۳۰۰ـ۱۰۰۰ | ۲/۵ | ۲۷ـ۳۰ | ۳۰ دقیقه | ۴ |
| مداکا (۹) | ۳ ماه | ۳ | ـ | " " | ۲۰ـ۴۰ | ۱ | ۲۷ | ۶۰ دقیقه | ۱۰ |
| زبرا (۱۰) | ۲ـ۳ ماه | ۲/۵ـ۳ | ـ | " " | ۱۵۰ـ۴۰۰ | ۱ | ۱۶ | ۳۵ دقیقه | ۴ |

3 - *Salmo salar*
4 - *Oncorhynus mykiss*
5 - *Cyprinus carpio*
6 - *Carrasius auratus*
7 - *Ictalurus punctatus*
8 - *Oreochromis miloticus*
9 - *Oryzias latipes*
10 - *Brachydanio rerio*

## تکنیکهای انتقال ژن

شروع حیات موجودات زنده (تکثیر جنسی) از یک سلول تخم اولیه می‌باشد که پس از تکثیر متوالی و تمایز سلولی، اندامهای مختلف هر موجود زنده را ایجاد می‌نماید. سلول تخم از لقاح بین اسپرم و تخمک که هر یک دارای n کروموزوم می‌باشند حاصل می‌شود، در نتیجه تعداد کروموزومهای سلول تخم معادل والدین خود خواهد بود. افزودن ژن جدید باید قبل از تشکیل سلولهای بدن صورت پذیرد تا ژنوم کلیه سلولهای بدن حاوی ژن جدید گردند، از این نظر بهترین حالت برای مشارکت ژن جدید، افزودن آن به تخمک، اسپرم و یا سلول تخم قبل از انجام اولین تقسیم سلولی در آن می‌باشد. معمول‌ترین روش انتقال ژن، تزریق آن از طریق سوراخ میکروپیل در سلول تخم به کمک سوزنهای ظریف میکروسکوپی می‌باشد. با شناخت مکانیسم عمل دیواره سلولی در تخم، روش انتقال انبوه ژن به کمک محرکهای مصنوعی نیز مورد بررسی و استفاده قرار گرفت. روشهای بکار گرفته شده در زمینه انتقال ژن را می‌توان به شکل زیر خلاصه نمود.

جدول ۲ - روشهای مورد استفاده جهت انتقال ژن (۳۷)

| | روش | تعداد مقاله | درصد انتقال ژن | ملاحظات |
|---|---|---|---|---|
| سلول تخم | تزریق ژن[11] | ۶۹ | ۸۰-۰ | نیروی کار زیاد و ماهر نیاز دارد |
| | الکتروپورشن[12] | ۷ | ۱۰۰-۰ | احتمال و میزان انتقال ژن در گونه‌های مختلف متغیر است. |
| | شلیک ژن[13] | ۱ | ۴ | ـــ |
| اسپرم | پرورش در محیط حاوی ژن[14] | ۲ | ۴ | درصد آزمایشی بوده و احتمال انتقال توده ژن وجود دارد. |
| | الکتروپورشن | ۲ | ۵/۵-۰ | " " " |
| | پرورش در محیط حاوی کروموزوم[15] | ۲ | ـ | انتقال ژن بصورت تصادفی است. |

11 - Microinjection
12 - Electroporation
13 - Shotgun
14 - Incubation
15 - Chromosome - Mediated gene transfer

حصول موفقیت در تولید نمونه‌های ماهی حامل ژن بیگانه پایدار و فعال از طریق تزریق ژن منوط به یافتن و استفاده اپتیمم از نکات زیر میباشد. محل تزریق تخم، مرحله تکاملی که تخم مورد تزریق قرار می‌گیرد، نوع ژن مورد استفاده (ساختمانی یا مکمل[۱۶]) شکل ژن (خطی یا حلقوی)، تعداد مولکولهای ژن، نوع محصول حاصل از ژن (۱۹).

## ساختمان تخم ماهی

بزرگی تخم ماهی بستگی به میزان کیسه زرده آنها دارد. در زمان تخمریزی، تخم ماهیان، با لایه‌ای ژلاتینی ـ رشته‌ای بنام کوریون پوشیده شده است. اسپرم قادر به عبور از کوریون به جزء از طریق منفذی که در قطب جانوری تخم قرار گرفته و میکروپیل نامیده می‌شود نمی‌باشد.

در ماهیانی که لایه کوریون در آنها ضخیم، چند لایه و پیچیده می‌باشد بمنظور افزایش احتمال لقاح تعداد میکروپیل در آنها بیشتر از یکی می‌باشد (نظیر ماهیان استورژن با حدود ۳۰ میکروپیل (۴۰)، اندازه میکروپیل به گونه‌ای است که عبور صرفاً یک اسپرم را از آن اجازه می‌دهد. بلافاصله زیر کوریون غشاء پلاسمایی قرار گرفته است. بخش میانی تخم عمدتاً از کیسه زرده که با لایه نازکی از سیتوپلاسم (حدود ۴۰ میکرومتر) احاطه شده تشکیل یافته است. ضخامت سیتوپلاسم در قطب جانوری یعنی منطقه زیر میکروپیل که پیش هسته و اولین گویچه قطبی در آن منطقه قرار دارد بیشتر از سایر مناطق می‌باشد (۱۰۰ میکرومتر) (۳۰).

در تخم ماهیان، تقسیم میوزی در مرحله دوم متافاز متوقف شده و اولین گویچه قطبی و دوک حاوی کروموزومها تشکیل گردیده‌اند و در قطب جانوری متمرکز شده است. با ورود اسپرم تخم مجدداً فعال شده و تقسیم میوزی ادامه پیدا کرده و با حذف دومین گویچه قطبی در زیر لایه کوریون این تقسیم تکمیل میشود. پس از این مرحله غدد موجود در زیر کوریون از خود مواد کلوئیدی ترشح که لایه‌ای را در زیر کوریون تشکیل می‌دهد و جمود لایه کوریونی فضائی را برای تخم ایجاد می‌نماید که به محتویات تخم اجازه چرخش به هر جهتی را میدهد.

---

16 - Complementary DNA

همزمان با تشکیل این لایه سیتوپلاسم به سمت قطب جانوری مهاجرت و پلاستو دیسک و اولین سلول جنینی را تشکیل می‌دهد.

## تزریق ژن به تخم

با توجه به بیولوژی تکثیر ماهیان بنظر می‌رسد موثرترین مکان جهت تزریق ژن، هسته تخمک و یا هسته سلول تخم قبل از انجام اولین تقسیم سلولی باشد. چون این تزریق قبل از اولین تقسیم سلولی که همراه با تقسیم کروموزومی در بین دو سلول دختر جدید است صورت می‌گیرد، لذا این گونه پیش‌بینی می‌شود که کلیه سلولهای بدن ماهی حاوی تعداد مشابه ژن جدید خواهد شد. گرچه در تحقیقات بعمل آمده بر روی پستانداران این پیش‌بینی اثبات شده (۳۱)، اما در مورد ماهیان نتایج حاصله چندان امیدوار کننده نبوده و عمدتاً حالت موزائیک حاصل شده است، یعنی ژنها عمدتاً بصورت غیر کروموزومی باقی مانده و یا در صورت مشارکت، در تمامی اندامهای ماهی نمی‌توان آن را پیدا نموده این مسئله مؤید عدم مشارکت ژن تزریقی حداقل قبل از انجام اولین تقسیم سلولی در آن می‌باشد.

مشکل اصلی در تخم ماهیان غیر قابل رؤیت بودن هسته در آنها می‌باشد. در نتیجه تزریق در سیتوپلاسم انجام می‌شود اما چون میزان مولکولهای موجود در محلول تزریقی به حد کفایت زیاد است. احتمال ورود تعدادی از آنها به هسته وجود دارد. تلاشهای بعمل آمده در زمینه آشکار سازی هسته تخم در ماهیان تاکنون به نتیجه‌ای نرسیده است. تنها گروهی که اقدام به تزریق ژن به هسته تخم ماهیان نموده گروه تحقیقاتی آقای اوزاتو Ozato (۲۳) بوده است.

در این روش قبل از رهاسازی تخم توسط ماهی مداکا، بوسیله جراحی تخمها را از بدن ماهی خارج می‌نمایند. در این مرحله تخم در مرحله پروفاز اولین تقسیم میوزی بوده و دارای هسته‌ای بزرگ و سیتوپلاسمی شفاف می‌باشد که به راحتی هسته می‌تواند مورد تزریق قرار بگیرد. تخم حاصله سپس تا رسیدن به مرحله بلوغ کشت و سپس لقاح داده می‌شود.

در این تحقیق حدود ۵۰ درصد از تخمهای تزریقی به بچه ماهی تبدیل شدند که از این میان ۵۰ درصد آنها دارای ژن جدید بوده‌اند. در بررسی این محقق مشخص شد که توزیع ژن در

هسته سلولهای مختلف هر بافت نیز بصورت موزائیک بوده و از مشارکت ژن در تمامی سلولهای بدن نمی‌توان اطمینان حاصل نمود. با توجه به مشابه بودن نتایج این روش با روشهای ساده‌تر تزریق، دیگر محققان این روش را دنبال ننموده‌اند.

## تزریق ژن به تخم در ماهیان با کوریون نرم

در برخی ماهیان نظیر کپور معمولی و گربه ماهی کوریون در تخم آنها نرم بوده و سوزنهای میکروسکوپی ظریف (۱۰ - ۲ میکرومتر) براحتی می‌تواند از آن عبور نماید (۶، ۳۹). میزان تلفات تخم در این روش در مقایسه با شاهد نسبتاً زیاد می‌باشد) بررسی انجام شده در گربه ماهی میزان تلفات آزمایش ۸۷ درصد و شاهد ۵ درصد و میزان مشارکت جدید در ژنوم سلولی نیز ۲۰ - ۱۰ درصد برآورد شده است (۲۶، ۴). در ماهی کپور معمولی میزان تلفات آزمایش و شاهد برابر و حدود ۶۵ درصد و میزان مشارکت ژن جدید حدود ۵/۵ درصد محاسبه شده است (۳۹).

## تزریق ژن به تخم از طریق کوریون سخت

در برخی گونه‌ها کوریون سخت بوده (سالمونیده، تیلاپیا) و در برخی دیگر پس از لقاح سخت می‌شود (ماهی حوض، زبرا) به گونه‌ای که سوزنهای ظریف قادر به عبور از آنها نمی‌باشند. در گونه‌هایی که پس از لقاح کوریون در آنها سخت می‌شود جهت تزریق می‌توان بطریق فیزیکی یا شیمیایی شکافی در کوریون ایجاد و سپس با استفاده از سوزن شیشه‌ای ظریف نسبت به تزریق اقدام نمود. در تحقیقات بعمل آمده بر روی کوریون زدائی‌های ماهی حوض با استفاده از روش هضم آنزیمی میزان تلفات تخم پس از تزریق از ۹۰ درصد در کارهای اولیه تا ۵۰ درصد در کارهای اخیر متغیر بوده است (۳۶، ۳۸). آقای زو (Zhu) کیفیت تخم ماهی را عامل تلفات دانسته و کوریون زدائی را در این مسئله موثر نمی‌داند (۳۸). میزان مشارکت ژن تلقیحی در این آزمایشات نیز از ۵۰ - ۸ درصد متغیر بوده است. زیاد بودن درصد مشارکت ژن تلقیحی در آزمایش آقای زو می‌تواند به دقت مکان تزریق، ناشی از مشاهده اولین گویچه

قطبی، حاصل از رفع کوریون باشد. این روش توسط ایشان بر روی ماهیان کپور معمولی، نقره‌ای، قرمز و ماهی حوض با میزان مشارکت ژن جدید، بیشتر از ۴۰ درصد گزارش شده است (۳۸). کوریون زدائی در همه ماهیان امکان پذیر نبوده و در برخی موارد منجر به شکننده شدن تخم و عدم تحمل عمل تزریق می‌گردد (۱۲).

در ماهیان سالمونیده و تیلاپیا با وجود سخت بودن کوریون، پس از لقاح میکروپیل بسته نشده و می‌توان به کمک سوزنهای شیشه‌ای ظریف نسبت به تزریق از طریق میکروپیل اقدام نمود. در این روش با توجه به مکان بلاستودیسک، اندازه میکروپیل و امکان انسداد میکروپیل بوسیله اسپرم امکان موفقیت متغیر بوده است.

در سالمونیده، اسپرم پس از ورود به تخمک، در زیر میکروپیل باقیمانده و تا زمانیکه تخمک با آب تماس حاصل ننماید مراحل تکاملی لقاح صورت نمی‌پذیرد. لذا تزریق ژن قبل از فعال شدن عمل لقاح در تخم می‌تواند احتمال ورود ژن به هسته تخم را افزایش دهد (۹، ۸). برخی دیگر از محققین، پس از سفت شدن کوریون ناشی از جذب آب و فعال شدن تخم، بخشی از کوریون را بصورت مکانیکی برداشته و یا در آن شکافی ایجاد نموده و از آن طریق تزریق را انجام داده‌اند (۲۸، ۱۰، ۳).

گروهی دیگر بلافاصله پس از فعال شدن تخم و قبل از آنکه کوریون کاملاً سخت شود عمل تزریق را از طریق میکروپیل انجام داده‌اند (۲۰). از آنجاکه کیفیت تخم مورد استفاده در موقعیت هر روش موثر است، لذا نتایج حاصله از این روشها متفاوت بوده و باقیماندگی بین ۱۰۰ ـ ۳۰ درصد و مشارکت ژن در ژنوم سلولی بین ۷۰ ـ ۲۰ درصد متغیر بوده است.

در تیلاپیا نیز با سوزن به ضخامت حدود ۱۰ ـ ۵ میکرون براحتی می‌توان از طریق میکروپیل در هر یک از مراحل تکامل جنینی ژن را به تخم تزریق نمود. میزان تلفات تخمهای تزریقی تا مرحله تغذیه بین ۹۵ ـ ۲۵ درصد متغییر گزارش شده است که این مسئله نیز به کیفیت تخم مورد استفاده بستگی دارد. درصد مشارکت ژن جدید نیز در گزارشهای بین ۳۰ ـ ۶ درصد گزارش شده است (۲۵، ۱).

## ترکیب محلول تزریقی

مولکول DNA همراه با محلول بافر مناسب جهت تزریق مورد استفاده قرار می‌گیرد. اجزاء مولکول DNA و ترکیبات شیمیائی موجود در بافر از جمله مسائلی هستند که مورد تحقیق قرار گرفته، و اپتیمم نمودن آن برای گونه‌های مختلف ماهی در موفقیت کار سهم اساسی را ایفاء می‌نماید.

ترکیب ژنی مورد تزریق معمولاً از چندین بخش تشکیل می‌شود که هر یک وظیفه‌ای خاص را بعهده دارند. بخش اصلی مولکول DNA مربوط به ژن ساختمانی است که کد ساخت پروتئین مورد نظر را دربر دارد. DNA مربوط به ژن ساختمانی می‌تواند مشابه DNA کروموزومی بوده و یا اینکه از DNA مکمل (CDNA[17]) که حاصل از تکمیل زنجیره دوم (mRNA[18]) است تشکیل شده باشد. نوع DNA مورد استفاده نیز با توجه به تکمیل زنجیره دوم mRNA اولیه (مجموع Exons,Introns) و یا mRNA نهائی (فقط Exons) می‌تواند متفاوت باشد (۳۵).

نسخه‌برداری از ژن ساختمانی، توسط بخشی از DNA که در فاصله مشخصی از این ژن قرار گرفته است کنترل می‌شود. اتصال اولیه آنزیم DNA پلی مراز به این بخش از DNA که به پروموتر معروف است صورت می‌گیرد، فعالیت پروموتر نیز به کمک عوامل محیطی و یا ترکیبات شیمیائی کنترل می‌گردد. در ساخت ترکیب DNA جهت تزریق، با توجه به هدف تحقیق می‌توان پروموترهائی را انتخاب نمود که در تمام بافتها و یا در برخی از آنها فعال باشند. در صورتیکه بتوان به کمک عوامل شناخته شده محیطی، فعالیت پروموتر را کنترل نمود، بدینوسیله فعالیت ژن تحت کنترل آن پروموتر را می‌توان بطور مصنوعی تحت نظر داشت. برای مثال پروموتر متالوتیونین[19] با افزایش میزان فلزات سنگین در محیط زیست ماهی، فعال و شروع نسخه‌برداری از ژن متصل به آن را ممکن می‌سازد. این پروموتر در بافتهائی نظیر کلیه و روده بخوبی فعال می‌باشد. پروموترهای ویروسی، نظیر پروموتر مربوط به ژن MMTV, SV40,

17 - Complementary DNA  18 - Massenger RNA  19 - Metallothionein

RSV در اکثر بافتها علی‌الخصوص عضله و پوست فعال می‌باشند، به همین دلیل جهت بروز ژنهائی که در اکثر بافتهای بدن باید ظاهر شوند از این پروموترها استفاده می‌شود.

در صورتیکه بررسی تکنیک انتقال ژن مورد نظر باشد معمولاً ژن ساختمانی که تولیدات آن به راحتی و از طریق آزمایشگاهی بدون کشتن ماهی قابل ردیابی باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد. به این گونه ژنها ژن گزارشگر اطلاق می‌شود. در برخی موارد نیز که بروز ژن ساختمانی دیگری نیز هدف باشد می‌توان با همراه نمودن ژن گزارشگر، فعال بودن ژن مورد نظر را ارزیابی نمود. از معمول‌ترین ژنهای گزارشگر که مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان از CAT[20] (۳۴، ۱۳، ۳)، بتا گالاکتوسیداز[21] (۲۱)، بتا کریستالین[22] (۱۵) نام برد که در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. شکل دیگر ژن گزارشگر انتقال قابلیت مقاومت به ترکیبی خاص، به موجود مورد بررسی میباشد. برای مثال استفاده از ژن مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک موجب می‌شود نمونه‌های فاقد این ژن در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک، تلف شده و نمونه‌های که در آن ژن مزبور فعال بوده زنده می‌مانند (۳۵). تکثیر انبوه ژن ساختمانی و یا ترکیب ژنی مورد تزریق، از طریق انتقال مولکول DNA مورد نظر به مجموعه ساختمانی یکی از مولکولهای DNA حلقوی باکتریائی (پلاسمید)[23] صورت می‌گیرد. در این حالت با تکثیر باکتری و تولید کلنی‌های متعدد می‌توان مولکول DNA مورد نظر را بدست آورد. با استفاده از آنزیمهای قطع کننده اختصاصی[24] یک نقطه از پلاسمید قطع و ترکیب DNA مورد نظر به آن اتصال داده می‌شود. در خاتمه تولید باکتری‌ها نیز، جهت جداسازی قطعه DNA از پلاسمید می‌توان با استفاده از همان آنزیم قطع کننده اختصاصی آن را جدا نمود. برخی از محققین شکل حلقوی پلاسمید را بطور کامل جهت انتقال استفاده نموده‌اند. گرچه نتایج حاصله از مقایسه میزان مشارکت مولکول DNA به شکل حلقوی یا خطی، شکل خطی آن نتایج بسیار بهتری را بروز داده است (۲۴). در تحقیق دیگری اظهار شده که علیرغم میزان مشارکت کمتر شکل حلقوی با بهم

---

20 - Chloramphenicol Acetyl Transferase

21 - $\beta$. galactosidase

22 - $\beta$. Crystallin

23 - Plasmid

24 - Restriction Enzymes

پیچیده مولکول DNA در مقایسه با شکل خطی آن در ماهیان، پایداری آنها با گذشت زمان و افزایش عمر ماهی نسبت به حالت خطی آن بیشتر می‌باشد (۳۴، ۲). پروتئین اینتگراز[۲۵] ویروسها که مسئول ادغام کروموزوم ویروسی در کروموزوم سلول میزبان است جهت تقویت ادغام اولیه در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶). در طی این آزمایش، روز چهارم پس از لقاح در ماهی زبرا، نمونه‌هایی که پروتئین مزبور به همراه ژن گزارشگر به آنها تزریق شده بود میزان فعالیت ژن گزارشگر ۱۵ برابر شاهد (بدون پروتئین اینتگراز) و حدود ۴۰ ـ ۱۴ برابر در روز دهم گزارش شده است. در همین آزمایش نشان داده شده که به علت عمل پروتئین، ادغام ژن بیگانه در مراحل اولیه تکامل جنینی صورت گرفته و در نتیجه میزان بیشتری از سلولها حاصل ژن بیگانه بوده‌اند.

## انتقال انبوه ژن

با توجه به ظرافت کار تزریق تخم، نیاز به تخصص، تجربه و زمان، نتایج آن در هر گونه نسبت به گونه دیگر و حتی در گونه‌ای خاص از یک محقق نسبت به محقق دیگر متفاوت است. تجارب و نتایج حاصل از کار یک محقق در تجربه مشابه توسط محقق دیگر به دلیل نقش تجربه، مهارت در کار و نیز کیفیت مولد و تخم مورد استفاده می‌تواند نتایج متفاوتی را ارائه نماید. جهت رفع مشکل فوق استفاده از روشهای دیگر انتقال ژن نظیر اتصال ژن با اسپرم[۲۶] (۲۶) و الکتروپورشن[۲۷] (۳۱)، بکونیزاسیون[۲۸] (۲۷)، شلیک ذرات ژن[۲۹] (۱۷) و لیپوفیکشن[۳۰] (۷) مورد آزمون و بررسی قرار گرفته‌اند. با توجه به عدم امکان تزریق ژن به هسته سلول تخم، عمده تحقیقات تاکنون با تزریق میزان زیاد ژن مورد نظر به سیتوپلاسم، با هدف افزایش احتمال عبور تعدادی از آنها بداخل هسته صورت گرفته است. میزان ژن تزریقی حدود ۵۰۰ ـ ۲۰۰ برابر میزان طبیعی آن ژن در سلول مورد استفاده قرار گرفته است

25 - Integrase
26 - Incubation
27 - Electroporation
28 - Backonisation
29 - Shotgun
30 - Lipophication

که در گونه‌ها و آزمایشات مختلف نتایج متفاوتی در مورد میزان اپتیمم تزریق حاصل شده است. اسپرم قابلیت حمل این مقدار ژن را بداخل تخم نداشته در نتیجه استفاده از آن در انتقال ژن از نتایج قابل قبولی برخوردار نبوده است.

ماهیت دیواره سلولی تخم به گونه‌ای است که با قرار دادن آن در میدان الکتریکی و با ایجاد موجهایی با نوسانات متفاوت در آن می‌توان شکافهای غیر فیزیکی که امکان انتقال مولکولهای بزرگ نظیر DNA را دارند ایجاد نمود. این روش به نام الکتروپورشن شناخته می‌شود. در این روش، تخم در محیطی حاوی ژن مورد نظر و در حد فاصل دو قطب آند و کاتد یک منبع الکتریکی با ولتاژ زیاد قرار داده شده و با تنظیم تعداد، طول و فاصله بین دو نوسان موج الکتریکی امکان انتقال این مولکولها فراهم می‌آید (۲۲).

میزان تخم ماهی مورد عمل در فرآیند الکتروپورشن در مقایسه با روش تزریق بسیار بیشتر می‌باشد، اما نسبت تلفات آن نیز بیشتر است. با توجه به زیاد بودن نمونه‌های مورد آزمایش، میزان ژن منتقل شده انبوه‌تر و راحتر می‌باشد. شکل اصلاح شده‌ای از الکتروپورشن که از قابلیت‌های بیشتری جهت انتقال ژن و نیز کاهش تلفات برخوردار است، اخیراً مورد استفاده قرار گرفته است. این روش بکونیزاسیون نامیده شده در طی آن میزان باقیماندگی تخمها تا ۹۰ درصد و درصد انتقال ژن تا ۷۰ درصد گزارش شده است (۳۷).

## ردگیری ژن بیگانه

روشهای مختلفی جهت یافتن ژن منتقل شده در موجود جدید وجود دارد. ردگیری تولیدات ژن، از طریق ایمنولوژی و با اندازه‌گیری میزان پروتئین بوسیله ستیلاتور از روشهای ردگیری فعالیت ژن می‌باشند. حضور ژن در بافتهای مختلف با استخراج DNA از آنها و ردگیری ژن مورد نظر با استفاده از اولیگونوکلئوتید نشاندار (رادیو ایزوتوپ) صورت می‌گیرد.[۳۱] استفاده از PCR[۳۲] نیز می‌تواند حتی یک مولکول ژن را در مجموع سلولهای

31 - Southern blotting  32 - Polymerase Chain Reaction

بافت مورد نظر تشخیص و نشان دهد. استفاده از متد LMPCR[۳۳] نیز می‌تواند ادغام ژن بیگانه در کروموزوم میزبان را آشکار سازد (۱۶، ۳۷). در صورتیکه ژن بیگانه در غدد جنسی حضور و یا بروز داشته باشد، با نسل گیری از آن موجود می‌توان نسبت به حضور غیر کروموزومی یا ادغام شده ژن بیگانه در کروموزوم میزبان اظهار نظر نمود.)

## سرنوشت ژن پس از انتقال به تخم

برخی از محققین در زمینه سرنوشت DNA پس از انتقال به تخم مطالعه نموده‌اند. عمده مطالعات نشانگر آن است که مولکول DNA بلافاصله پس از ورود به محیط سلول و در طی روند تشکیل جنین تکثیر شده و اشکال مختلفی را بخود می‌گیرد. مولکولهای ژن جدید در محیط سلول به یکدیگر متصل و مولکول سنگینی را تشکیل می‌دهند، اما بتدریج با رشد جنین از میزان ژن جدید کاسته شده و در کروماتوگرافی با ژل به همراه DNAهای کوتاه و بصورت لکه‌ای کوچک در ژل نمایان می‌شود که نشانگر زوال و تجزیه DNA مربوطه می‌باشد (۳۸، ۳۲، ۲۴، ۱۸، ۲). شکل مولکول DNA تزریق شده نیز با پیشرفت مراحل تکامل جنینی از شکل خطی خارج شده و تا مرحله گاسترولا و نورولا بصورت مولکولهای بهم پیچیده، حلقوی باز[۳۴]، حلقوی بسته[۳۵] و مولتی مر[۳۶] باقی می‌ماند (۳۸، ۲۵، ۱۹، ۲). در استفاده از مولکول بهم پیچیده در تزریق ژن، شکل مولکول دایره مولتی‌مر، یا مولکول خطی بلند که در آن ژنهای تزریقی از طریق سر ـ دم به یکدیگر متصل شده‌اند تبدیل گردیده است (۲).

در اکثر تحقیقات در زمینه انتقال ژن در ماهیان، DNA تزریق شده بصورت غیر کروموزومی باقی مانده و طی فرآینده‌های بیوشیمیائی در روند تکامل جنینی تغییر شکل داده و یا تکثیر می‌شوند. کوزلوف[۳۷] وجود آنزیم DNA پلی‌مراز در سیتوپلاسم را در مراحل اولیه تکثیر سلولی عامل افزایش تعداد مولکولهای DNA خارجی، در تخم دانسته و نتیجه می‌گیرد که تکثیر

---

33 - Ligation Mediated Polymerase Chain Reaction
34 - Open Cirvular
35 - Closed Circular
36 - Multimer
37 - Kozlov

DNA با مهاجرت آنزیم پلی‌مراز به هسته سلولهای جنینی کاهش می‌یابد (۱۷).

طبیعت DNA غیر کروموزومی که معمولاً در خارج از هسته قرار دارد موجب عدم امکان تقسیم یکنواخت آن در طی روند تقسیم سلولی می‌گردد، بعلاوه این حقیقت که DNA غیر کروموزومی فقط در سلولهای در حال تکثیر سریع، امکان بقاء دارند مجموعاً دلائل تشکیل حالت موزائیک در فرآیند انتقال ژن در ماهیان می‌باشد.

بر طبق استنتاجات استوارت (۳۳)، طول دوره‌ای که DNA غیر کروموزومی می‌تواند در موجود حضور داشته باشد، به میزان DNA تزریق شده و قابلیت تکثیر آن در مراحل اولیه تکامل جنینی بستگی دارد، یعنی هر چه میزان DNA غیر کروموزومی در سلول بیشتر باشد حضور آن در موجود طولانی‌تر خواهد بود. این مسئله ظهور حالت موزائیک را در برخی بافتها می‌تواند توجیه نماید که نتایج حاصل از کار سایر محققین نیز مؤید این مسئله است (۲۹، ۲۴، ۲۱، ۵، ۳) DNA غیر کروموزومی می‌تواند تا مرحله بلوغ جنسی در ماهی باقی مانده و در صورت حضور در سلولهای جنسی به نسلهای بعدی منتقل شود.

انتقال ژن جدید به نسلهای بعدی به شرطی ممکن است که DNA جدید با ژنوم ماهی حداقل در سلولهای جنسی مشارکت و یا بصورت موزائیک در آن حضور داشته باشد. نسبت انتقال ژن از مادر به فرزند یا نوه با توجه به شکل مشارکت DNA جدید در نوزادان متفاوت است. مثالهای متعددی در انتقال موفق ژن به نسلهای بعدی در ماهیان نظیر قزل‌آلا (۱۱)، کپور (۳۹)، مداکا (۱۴) و زبرا (۳۴) وجود دارد.

## چشم انداز آتی انتقال ژن

ژنتیک مولکولی در زمینه‌های متعددی می‌تواند به رشد تولید در آبزی‌پروری کمک نماید، حدود ۱۰ سالی از تولید اولین جانداری که در اثر انتقال چند ژن اضافی هورمون رشد، رشدی خارق‌العاده از خود نشان داده گذشته است ولی هنوز در مورد ماهیان نتیجه چندان چشمگیری حاصل نشده است. گرچه رشد تا ۳۷ برابر حالت طبیعی در یک مرحله از رشد ماهی آزاد گزارش شده است (۲۹)، اما ژن منتقل بصورت موزائیک و در مرحله‌ای محدود از

عمر ماهی بروز کرده و بطور ثابت در ژنوم سلولی آن مشارکت ننموده است.

میزان دانسته‌های موجود از ژنتیک مولکولی در ماهیان امکان بررسی در مورد صفاتی راکه صرفاًبوسیله یک ژن کنترل می‌شوند را فراهم می‌آورد، در نتیجه بخش عمده‌ای از تلاش بایستی در جهت شناسائی این گونه ژنها متمرکز شود تا بدینوسیله بتوان از استفاده از ژن سایر جانداران که با مشکل پذیرش بازار روبرو خواهد بود پرهیز نمود.

در حال حاضر ژنهای فنوتیپی محدودی در ماهیان شناسائی شده است. با توجه به فیزیولوژی ماهیان هر ژن بایستی در زمانی خاص از مراحل تکاملی موجود و در بافتهائی خاص بروز نماید، مکانیسم کنترل عمل ژن بوسیله پروموتر آن در ماهیان بایستی مطالعه و معین گردد.

## منابع


1 - Bream, G. et.al, 1988. Aquaculture 68, 209 - 219.

2 - Chong, S.S.C et.al, 1989. Theor. Appl. Gene. 78, 369 - 380.

3 - Chourrout, D. et.al, 1986. Aquaculture 51, 143 - 150.

4 - Davies, P. I. et.al, 1990. Transgenic models in medicine and agriculture, 141 - 161. Wiley - liss, Toronto.

5 - Du, S.J. et.al, 1992. Transgenic fish (book). 176 - 189.

6 - Dunham, R.A. et.al, 1987. Trans. Amer. Fish. Soc. 116, 87 - 91.

7 - Felgner, P. L. et.al, 1987. Nature 327, 70 - 73.

8 - Fletcher, G. L. et.al, 1988. Can.J.Fish.Aquat.Sci. 45, 352 - 357.

9 - Fletcher, G. L. et.al, 1990. Fish Physi. Toxic. Fish. manag. symp.

10 - Gibbs, P.D.L. et.al, 1988, Aqua. Inter. Congre. Exhi. Vancouver Canada, p. 56.

11 - Guymard, r. et.al, 1989. Biochemia 71, 857 - 863.

12 - Hallerman, E.M. et.al, 1988. Trans. Amer. Fish. Soc. 117, 456 - 460.

13 - Hallerman, E.M. et.al, 1990. Animal Biothec. 1, 79 - 93.

14 - Inoue, K. et.al, 1990, Cell Differ. Dev. 29, 123 - 128.

15 - Inoue, K. et.al, 1989. Cell Differ. Dev. 27, 57 - 68.

16 - Ivics, Z. et.al, 1993. Mole. Mar. Biol. & Biotech. 2(3) 162 - 173.

17 - Klein, T. M. et.al, 1987. Nature 327, 70 - 73.

18 - Lavitrano, M. et.al, 1989. Cell 56, 717 - 723.

19 - Maclean, N. et.al, 1988. Bio/Techno. 5, 257 - 261.

20 - Male, R. et.al, 1992. Biochem. Biophys. ACTA 1130, 345 - 348.

21 - McEvoy, T. et.al, 1988. Aquaculture 68, 27 - 37.

22 - Muller, F. et.al, 1993. Fedra. Euro. Biochem. Soc. 324, 27 - 32.

23 - Ozato, K. et.al, 1986. Cell Differ. 19, 237 - 244.

24 - Penman, D. et.al, 1990. Aquaculture 85, 35 - 50.

25 - Phillips, P. C. 1989. Ph.D. dessertation, dep. Zoology south. Illinois uni. Carbondale.

26 - Powers, D. A. et.al, 1990. Proc. of Confe. transge. Techn. Medi. and Agri.

27 - Pfeifer, G. P. et.al, 1989. Science. Vol. 246, 818 - 813.

28 - Rokkones, E. et.al, 1985. Acta physio. Scand. 124, suppl. 542 - 417.

29 - Rokkones, E. et.al, 1989. J. Comp. Physio. 158, 751 - 758.

30 - Shears, M. A. et.al, 1992. Transgenic Fish (book), 44 - 60.

31 - Shigekawa, K. et.al, 1988. Bio Techno. 6, 742 - 751.

32 - Strojek, R. M. et.al, 1988. Genetic engine. 10 (book), 221 - 246.

33 - Stuart, G. W. et.al, 1988, Development 103, 403 - 412.

34 - Stuart, G. W. et.al, 1990. Development 109, 577 - 584.

35 - Watson, J. D. 1992. Recombinant DNA (book).

36 - Woodwark, M. et.al, 1992. Insti. of aquac. Stieling report.

37 - Warshawsky, D. & Miller, L. 1994. Biotechniques vol. 16, No. 5, 792 - 797.

38 - Zhu, Z. et.al, 1985. J. Appl. Lchthy. 1, 31 - 34.

39 - Zhang, P. et.al, 1990. Mol. Reprod. Dev. 25, 3 - 13.

40 - Dettlaff, T. A. et.al, 1993. Sprienger Publisher.

# Review on Transgenic Researches in the Fishes

**Vahid Haghpanah**
**I.F.R.T.O.**
**P.O.Box 14155-6116**

## ABSTRACT

Molecular genetic techniques were used to establish new characteristics in the animals and plants. Fishes are good animal protein resources and are suitable for genetic researches because of their short maturation time, high number of egg production in each spawning, and easy rearing. New characteristic can be establishes by it's related gene transfer. Transgenic researches in the fishes started about ten years ago. Different gene constructs were used in these researches. More than 60% of works were pure research to find the principal of gene transfers in the fishes. About 37.5% of research used growth hormone gene to improve fish growth; the rest of researches used anti-freeze protein gene. Adjustment of DNA forms, buffer contents, transferring method for gene transfere are the main factors in the success of fish transgenic. There are different published researches to meet these problems in the last decade. In this paper these research is going to be reviewed and discussed.