بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی
گروه بیولوژی دریا

جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیولوژی دریا
گرایش جانوران دریا

عنوان :

ساخت لنتی ویروسهای نوترکیب ناقل ژن هورمون رشد فیل ماهی (*Huso huso*) و بررسی بیان ژن در رده سلولی بنیادی جنینی انسانی HEK293T

اساتید راهنما :
دکتر حسین ذوالقرنین
دکتر موسی گردانه

اساتید مشاور :
دکتر محمد علی سالاری علی آبادی
احمد قاسمی

پژوهشگر:
سکینه مشجور

شهریورماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر است.

دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

دانشکده علوم دریایی

گروه بیولوژی دریا

پایان نامه ی کارشناسی ارشد خانم سکینه مشجور دانشجوی **رشته:** زیست شناسی دریا **گرایش :** جانوران دریا **با شماره دانشجویی ۸۷۳۰۱۰۳ تحت عنوان: (ساخت لنتی ویروس های نوترکیب ناقل ژن هورمون رشد فیل ماهی(*Hoso hoso*)و بررسی بیان ژن در سلول های بنیادی جنینی*HEK-293T*)**

در تاریخ **۱۳۹۰/۶/۲۹** توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما (۱) : **دکتر حسین ذوالقرنین**	مرتبه علمی : **استادیار**	امضاء
۲- استاد راهنما : (۲) **دکتر موسی گردانه**	مرتبه علمی: **استادیار**	امضاء
۳- استاد مشاور (۱) : **دکتر محمد علی سالاری**	مرتبه علمی: **استادیار**	امضاء
۴- استاد مشاور (۲): **آقای سید احمد قاسمی**	مرتبه علمی : **استادیار**	امضاء
۵- داور (۱): **دکتر بیتا ارچنگی**	مرتبه علمی: **استادیار**	امضاء
۶- داور (۲): **دکتر احمد سواری**	مرتبه علمی : **استاد**	امضاء
۷- نماینده تحصیلات تکمیلی(استاد ناظر) **دکتر کمال غانمی**	مرتبه علمی : **استادیار**	امضاء

امضای مدیر گروه

امضای مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه

قسم به اشک

آنگاه که آغاز و پایانی بر کارم بود.

و به یاد تمامی غربتم

که در آن راهروهای سرد و خاموش

با اشک و با دلتنگی گذشت

و جز یاد خداوند مرا مونسی نبود.

تقدیم به :

سالار شهیدان، اباعبدالله حسین (ع)

به یادگانه عاشورای غمناکی، که خاطر اشک هایش تا به ابد

مرا وامدار تو خواهد ساخت.

نهایت تشکر و سپاس از:

مادرم، عزیزترینم، یگانه الهه عشق و زیباترین واژه هستی ام.

پدرم، بزرگوارترینم، یگانه تکیه گاه زمینی و اسوه ایثار ام.

برادرانم، مهربانترین هایم، دلخوشی لحظه های زندگی ام.

تشکر و سپاس بی کران از :

اساتید راهنمای گرانقدر، جناب آقایان دکتر حسین ذوالقرنین و دکتر موسی گردانه، که با ارشاد های ارزشمند و نگاه نافذشان، مرا در تمامی مراحل توفیق به پیشبرد و اتمام این رساله هدایت نمودند.

اساتید مشاور ارجمند، جناب آقایان دکتر محمد علی سالاری و مهندس احمد قاسمی، که از مساعدت و مشاوره های ایشان بهره بردم.

کلیه اعضای محترم پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، بالاخص گروه ژنتیک مولکولی، که با ایجاد فضایی آزمایشگاه ی مطلوب مسیر انجام این پژوهش را برایم هموار نمودند.

ریاست محترم دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ریاست محترم دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، کلیه اعضا ی محترم هیئت علمی گروه بیولوژی دریا، هیئات محترم داوران

و تمامی دوستان و همکاران عزیزم.

نام: سکینه **نام خانوادگی : مشجور**
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته و گرایش: بیولوژی دریا (جانوران دریا)**

اساتید راهنما : دکتر حسین ذوالقرنین- دکتر موسی گردانه **تاریخ دفاع: ۱۳۹۰/۶/۲۹**
اساتید مشاور: دکتر محمد علی سالاری – مهندس احمد قاسمی

کلید واژه ها: فیل ماهی ، هورمون رشد، لنتی ویروس ، انتقال ژن، بیان ژن.

چکیده

ماهیان خاویاری به دلیل توانایی آنها در تولید خاویار (مرواریدسیاه) از اهمیت ویژه ای در صنعت شیلات و آبزی پروری برخوردارند و از جمله با ارزش ترین ذخایر شیلاتی دریای خزر محسوب می شوند. در این مطالعه توالی کامل ژن کد کننده هورمون رشد (GH) فیل ماهی استروژن *Huso huso* بعنوان یکی از مهمترین گونه های ماهیان خاویاری ایران، که با استفاده از RNA استخراج شده از غده هیپوفیز سنتز شده بود، در یک وکتور غیر ویروسی (پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T) کلون گردید. سپس بر اساس سایتهای آنزیمی مشخص، این قطعه ژنی از این وکتور برش داده شده و به بدنه سازه لنتی ویروسی pNL-EGFP/CMV-WPRE پیوند زده شد. این سازه قادر به تولید تیترهای بالایی از ویروسهای نوترکیب بالغ و فعال حامل ژن GH فیل ماهی بوده و می تواند به نحوی بسیار کارآمد رده سلولهای جنینی انسانی HEK-293T را آلوده ساخته، ژن هورمون رشد را به این سلولها منتقل کرده و منجر به بیان پروتئین در آنها گردد. در ساختار این وکتور ژن نشانگر EGFP، بواسطه قطعه IRES در فرودست ژن GH قرار داده شده است، لذا بیان ژن را در مراحل ترانسفکشن و ترانسدوکشن بسهولت می توان پیگیری نمود. به منظور انتقال ژن، سلولهای جنینی انسانی HEK-293T با بهره گیری از ناقل ترانسفر لنتی ویروسی حامل ژن GH و ناقلین بسته بندی و غشایی ویروسی، به روش کمپلکس DNA- لیپوفکتامین ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد سوپرناتانت ویروسی را با ستونهای پروتیینی Amicon تغلیظ کرده تا استوک غلیظی از ویروسهای نوترکیب بدست آید. در حدود (یک پنجم کل استوک) به کشت جدیدی از سلولهای HEK-293T اضافه شد و در حدود هفتاد دو ساعت بعد، بیان ژن EGFP در نور فلورسنت پدیدار گشت. سپس سلولها برای آنالیزهای بعدی جمع آوری شدند. در مراحل بعدی RNA این سلولها را استخراج کرده و با تکنیک RT-PCR، بیان ژن GH در آنها به اثبات رسید. نتایج این تحقیق می تواند از دیدگاه مولکولی در جداسازی و انتقال ژن به دیگر گونه های ماهیان خاویاری و افزایش رشد و تولید خاویار و نهایتاً تولید ماهیان ترنس ژنیک، نقش بسزایی موثری داشته باشد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری ۳

۱-۲-۱- خانواده ماهیان خاویاری (تاس ماهیان) ۳

۱-۲-۲- جایگاه تاکسونومیک و زیست محیطی فیل ماهی *Huso huso* ۴

۱-۲-۳- پراکنش و زیستگاه اکولوژیک ۵

۱-۲-۴- رفتارهای تغذیه‌ای و تولیدمثلی ۶

۱-۲-۵- اهمیت اقتصادی ۷

۱-۳- تعاریف و اصطلاحات ۸

۱-۳-۱- ماهیان ترنس ژنیک ۸

۱-۳-۱-۱- اهمیت ماهیان ترنس ژنیک ۸

۱-۴- غده هیپوفیز ماهیان ۱۰

۱-۵- هورمون رشد (GH) ۱۱

۱-۵-۱- اثرات فیزیولوژیک هورمون رشد ، توزیع بافتی و مسیرهای پیام رسان ۱۲

۱-۵-۱-۱- عملکرد مستقیم هورمون رشد ۱۲

۱-۵-۱-۲- عملکرد غیر مستقیم هورمون رشد و محور GH-IGF-I ۱۴

۱-۵-۲- الگوی ترشحی GH ۱۵

۱-۵-۳- تنظیمات نورو اندوکرینی GH ۱۵

۱-۶- انتقال ژن ۱۶

۱-۶-۱- وکتورهای مورد استفاده در انتقال ژن ۱۷

۱-۶-۱-۱- وکتورهای لنتی ویروسی ۱۷

۱-۶-۱-۲- ایمن سازی لنتی ویروسها ۲۰

۱-۷- سلولهای برداری HEK 293T ۲۳

۱-۸- تکنیک ترانسفورماسیون به روش لیپوفکشن ۲۴

۱-۹- اهمیت و ارزش تحقیق ۲۴

۱-۱۰- اهداف و فرضیات تحقیق ۲۵

۱-۱۰-۱- اهداف تحقیق ۲۶

۱-۱۱- پیشینه مطالعات انجام شده ۲۶

۱-۱۱-۱- مطالعات انجام شده در داخل کشور ۲۶
۱-۱۱-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور ۲۶

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱- ژن مورد استفاده ۲۹
۲-۲- آزمایشات بخش مولکولی ۲۹
۲-۲-۱- دستگاه ها و ابزار آزمایشگاهی و مواد مصرفی بخش مولکولی ۳۱
۲-۲-۲- کلونینگ ژن GH ۳۲
۲-۲-۲-۱- کلونینگ ژن GH در TA وکتور کلونینگ (وکتور غیر ویروسی) ۳۲
۲-۲-۲-۱-۱- پلاسمید مورد استفاده ۳۲
۲-۲-۲-۱-۲- واکنش الحاق (لیگاسیون) ۳۳
۲-۲-۲-۱-۳- انتقال DNA نوترکیب به درون باکتری (ترانسفورماسیون) ۳۴
۲-۲-۲-۱-۴- نوع باکتری ۳۵
۲-۲-۲-۱-۵- نحوه کشت باکتری ۳۵
۲-۲-۲-۱-۶- تهیه سلولهای مستعد برای پذیرش DNA خارجی ۳۷
۲-۲-۲-۱-۷- انتقال پلاسمید به باکتری ۳۷
۲-۲-۲-۱-۸- انتخاب و غربال سلول های ترانسفورم شده ۳۸
۲-۲-۲-۲- کلونینگ ژن GH در ناقل لنتی ویروسی ۳۹
۲-۲-۲-۲-۱- واکنش هضم آنزیمی ۴۰
۲-۲-۲-۲-۲- الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۴۲
۲-۲-۲-۲-۳- تهیه ژل آگاروز ۴۴
۲-۲-۲-۲-۴- بازیافت قطعه DNA نوترکیب از روی ژل آگاروز ۴۵
۲-۲-۲-۲-۵- تعیین کمیت و درجه خلوص DNA ۴۶
۲-۲-۲-۲-۶- بررسی سریع پلاسمید های نوترکیب با استفاده از بافر کراکینگ ۴۶
۲-۲-۲-۲-۷- استخراج پلاسمید از باکتری در مقیاس کم (Mini prep) ۴۷
۲-۲-۲-۲-۸- آنالیز پلاسمید نوترکیب ۴۸
۲-۲-۲-۲-۹- استخراج پلاسمید از باکتری در مقیاس زیاد (Maxi prep) ۴۹
۲-۲-۲-۲-۱۰- واکنش زنجیره ایی پلیمراز (PCR) ۵۱
۲-۳- آزمایشات بخش سلولی ۵۴
۲-۳-۱- دستگاه ها و ابزار آزمایشگاهی و مواد مصرفی بخش سلولی ۵۴
۲-۳-۲- مواد لازم برای برای کشت سلول های HEK- 293T ۵۵

۲-۳-۳- کشت رده سلولی کلیوی جنین انسان (HEK- 293T)..... ۵۶
۲-۳-۴- شمارش سلولی..... ۵۷
۲-۳-۵- انجماد و ذخیره سازی سلولها..... ۵۷
۲-۳-۶- آماده سازی سلولهای HEK- 293T برای ترانسفکشن ۵۷
۲-۳-۷- ترانسفکشن سلولی به روش لیپوفکشن و تولید لنتی ویروسهای نوترکیب ۵۹
۲-۳-۸- تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلولهای هدف..... ۶۰
۲-۳-۹- ترانسفکشن سلولی به روش هم رسوبی DNA- فسفات کلسیم..... ۶۱
۲-۳-۱۰- تکنیک RT-PCR..... ۶۲
۲-۳-۱۰-۱- استخراج RNA با استفاده از کیت Roche ۶۳
۲-۳-۱۰-۲- استخراج RNA با استفاده از کیت تخلیص RNA ۶۴
۲-۳-۱۰-۳- ساخت cDNA ۶۵

فصل سوم : نتایج

۳-۱- مهندسی ژن هورمون رشد غدد ماه ی (GH) ۶۷
۳-۲- کلونینگ ژن GH درTA وکتور کلونینگ..... ۶۸
۳-۳- کلونینگ ژن GH در ناقل لنتی ویروسی..... ۷۰
۳-۴- تولید لنتی ویروسهای نوترکیب ناقل ژن هورمون رشد غدد ماه ی..... ۷۵
۳-۵- بررسی بیان mRNA هورمون رشد غدد ماه‌ی در سطح ترانسفکشن ۷۶
۳-۵-۱- استخراج RNA..... ۷۶
۳-۵-۲- واکنش RT-PCR..... ۷۶
۳-۶- آلوده سازی سلولهای هدف ۷۷
۳-۷- بررسی بیان mRNA هورمون رشد غدد ماه ی در سطح ترانسفکشن ۷۹

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث..... ۸۰
۴-۱-۱- ساخت سازه ژنی غیر ویروسی..... ۸۱
۴-۱-۲- ساخت سازه های ژنی نوترکیب لنتی ویروسی..... ۸۲
۴-۱-۳- بهبود روشهای ترنسفکشن سلولی..... ۸۳
۴-۱-۴- بهبود روش ترانسدوکشن سلولها از طریق تغلیظ ویروس..... ۸۴
۴-۲- نتیجه گیری نهایی..... ۸۵
۴-۳- پیشنهادات ۸۶
ضمیمه ۸۷

پیوست ۱ ..... ۸۸
منابع و مآخذ ۹۴
چکیده انگلیسی ۱۰۳

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- نمایی از جایگاه تاکسونومیک فیل ماهی ۴
شکل ۱-۲- نمایی از فیل ماهی ۵
شکل ۱-۳- نقشه پراکنش فیل ماهی در دریای خزر ۵
شکل ۱-۴- خاویار تیمروارید سرمایه ایرانیان ۷
شکل ۱-۵- روند تولید خاویار و گوشت فیل ماهی (برحسب تن) در ایران طی سالهای ۱۹۹۲- ۱۹۹۹ ..... ۸
شکل ۱-۶- آزاد ماهیان اصلاح ژنتیکی شده توسط هورمون رشد (GH) ۹
شکل ۱-۷- نمایی از توزیع منطقه ایی هورمونهای تولید شده توسط سلولهای اندوکرینی غده هیپوفیز ۱۰
شکل ۱-۸- باند شدن GH با گیرنده GHR و القای مسیر پیام رسان درون سلولی JAK- STAT ۱۳
شکل ۱-۹- فرآیند تجزیه GHR و تولید GHBP ۱۴
شکل ۱-۱۰- سیستم GH-IGF-I ۱۵
شکل ۱-۱۱- شمایی از یک لنتی ویروس و اجزاء آن ۱۸
شکل ۱-۱۲- نمایی از ادغام ژنهای لنتی ویروسی در ژنوم سلول هدف ۱۹
شکل ۱-۱۳- فرآیند تولید لنتی ویروسهای بالغ در سلولهای رده HEK-293T ۲۱
شکل ۱-۱۴- نمایی از نسل سوم وکتورهای لنتی ویروسی ۲۲
شکل ۱-۱۵- سلولهای HEK 293T ۲۳
شکل ۱-۱۶- وارد سازی ژن بوسیله لیپوزومهای کاتیونیک ۲۴
شکل ۲-۱- توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه های کد کننده ژن هورمون رشد فیل ماهی ۳۰
شکل ۲-۲- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن هورمون رشد فیل ماهی ۳۱
شکل ۲-۳- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای درون ژنی طراحی شده برای ژن هورمون رشد فیل ماهی ۳۱
شکل ۲-۴- نقشه پلاسمید pTZ57R/T ۳۲
شکل ۲-۵- جایگاه MCS در وکتور pTZ57R/T ۳۳
شکل ۲-۶- نمایی از فرآیند ترانسفورماسیون توسط کیت ۳۸
شکل ۲-۷- نمای شماتیکی از ناقل لنتی ویروسی ۴۰
شکل ۲-۸- مارکرهای استاندارد ۴۴

شکل ۲-۹- استخراج پلاسمید از باکتری به روش Mini prep ۴۸
شکل ۲-۱۰- استخراج پلاسمید از باکتری به روش Maxi prep ۵۰
شکل ۲-۱۱- تصویر لام نئوبار تحت میکروسکوپ ۵۷
شکل ۲-۱۲- نمای شماتیکی از ناقل بسته بندی ۵۸
شکل ۲-۱۳- نمای شماتیکی از ناقل غشایی ۵۸
شکل ۲-۱۴- مقادیر مورد نیاز برای ترانسفکشن سلولی به روش لیپوفکشن ۵۹
شکل ۲-۱۵- مراحل استحصال لنتی ویروسهای نوترکیب به منظور آلوده سازی سلولهای هدف ۶۰
شکل ۲-۱۶- ترانسفکشن سلولی به روش هم رسوبی $DNA-CaPO_4$ ۶۲
شکل ۲-۱۷- مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت RNAX plus ۶۵
شکل ۳-۱- الگوی حرکتی محصول PCR ژن GH بعد از فرآیند بازیافت از ژل آگارز ۶۸
شکل ۳-۲- الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده با روش کراکینگ ۶۹
شکل ۳-۳- الگوی حرکتی پلاسمید های استخراج شده با روش مینی پرپ ۶۹
شکل ۳-۴- تصویر ژل الکتروفورزی قطعات حاصل از واکنش PCR با پرایمرهای درون ژنی ۷۰
شکل ۳-۵- الگوی حرکتی پلاسمیدهای P208 و پلاسمید حامل ژن GH بعد از فرآیند هضم آنزیمی ۷۱
شکل ۳-۶- الگوی حرکتی پلاسمیدهای لنتی ویروسی نوترکیب با روش کراکینگ ۷۱
شکل ۳-۷- الگوی حرکتی پلاسمیدهای لنتی ویروسی نوترکیب با روش مینی پرپ ۷۲
شکل ۳-۸- تصویر ژل الکتروفورزی ازکلونهای غربال شده با فرآیند برش آنزیمی ۷۲
شکل ۳-۹- تصویر ژل الکتروفورزی محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی ۷۳
شکل ۳-۱۰- شمائی از ناقل لنتی ویروسی نوترکیب تولید شده ۷۴
شکل ۳-۱۱- نتایج حاصل از تعیین توالی وBLAST کلونینگ ژن GH در سازه لنتی ویروسی ۷۴
شکل ۳-۱۲-تصویر میکروسکوپی سلولهای ترانسفکت شده HEK-293T ۷۵
شکل ۳-۱۳- تصویر ژل الکتروفورزی از استخراج RNA از سلولهای ترانسفکت شده و کنترل ۷۶
شکل ۳-۱۴- تصویر ژل الکتروفورزی از محصول واکنش RT-PCR مرحله ترنسفکشن ۷۷
شکل ۳-۱۵- تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین EGFP در مرحله اینفکشن ۷۸
شکل ۳-۱۶- تصویر ژل الکتروفورزی از محصولات نهایی واکنش RT-PCR در مرحله اینفکشن ۷۹

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- ابزارآزمایشگاهی بخش مولکولی ۳۱
جدول ۲-۲- مواد مصرفی بخش مولکولی ۳۱
جدول ۲-۳- الگوی حجمی ترکیبات واکنش لیگاسیون طبق پروتکل کیت ۳۴
جدول ۲-۴- محیط کشت مایع LB ۳۵
جدول ۲-۵- محیط کشت جامد LB Agar ۳۶
جدول ۲-۶- جدول الگوی حجمی ترکیبات واکنشهای هضمی در این تحقیق ۴۱
جدول ۲- ۷- واکنش هضم آنزیمی (EcoR1/BamH1) (مرحله اول) ۴۲
جدول ۲-۸- ادامه واکنش هضم آنزیمی (مرحله دوم) ۴۲
جدول ۲-۹- واکنش الحاق (لیگاسیون) ژن GH درسازه لنتی ویروسی ۴۲
جدول ۲-۱۰- مقادیر مورد نیاز جهت تهیهٔ ژل ۰/۸٪ ۴۳
جدول ۲-۱۱- مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE (50x) ۴۳
جدول ۲-۱۲- ترکیبات بافر کراکینگ ۴۷
جدول ۲-۱۳- مواد تشکیل دهنده بافرهای Mini prep ۴۷
جدول ۲-۱۴- بافرهای مورد نیاز برای Maxi prep ۴۹
جدول ۲-۱۵- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR ژن GH با آنزیم Taq ۵۲
جدول ۲-۱۶- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR ژن GH با آنزیم pfu ۵۲
جدول ۲-۱۷- پروفیل حرارتی واکنش PCR ژن GH با پرایمرهای اختصاصی ۵۳
جدول ۲-۱۸- پروفیل حرارتی واکنش PCR ژن GH با پرایمرهای درون ژنی ۵۳
جدول ۲-۱۹- ابزار آزمایشگاهی بخش سلولی ۵۴
جدول ۲-۲۰- مواد مصرفی بخش سلولی ۵۴
جدول ۲-۲۱- طرز تهیه محیط کشت سلولی برای رده سلولی HEK- 293T ۵۵
جدول ۲-۲۲- طرز تهیه محلول PBS ۵۶
جدول ۲-۲۳- طرز تهیه محلول 2X HBS ۶۱
جدول ۲-۲۴- مواد تشکیل دهنده بافرهای کیت استخراج RNA ۶۳
جدول ۲-۲۵- آلودگی زدایی DNA از محلول RNA ۶۴
جدول ۲-۲۵- واکنش رونوشت برداری معکوس (RT-PCR) ۶۶

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

امروزه تکنولوژی DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیک، افق های روشنی از بیوتکنولوژی مدرن را در حوزهٔ شیلات و حفاظت از ذخایر آبزیان گشوده است، بنحویکه تشکیل پایگاه داده های عظیم ژنی آبزیان و ثبت نمونه های بسیاری از ماهیان ترنس ژنیک حامل صفات اقتصادی شیلاتی، گواه وقوع تحولاتی نوین در عرصه تکثیر و پرورش آبزیان است.

در سالهای اخیر، حفظ و احیاء منابع زیستی بویژه ماهیان اندمیک و آسیب پذیر، بسیار مورد توجه مجامع بین المللی و سازمانهای زیربط قرار گرفته و رویکرد جهانی در جهت اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان است . در این میان، ماهیان خاویاری از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی ، از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه ای و بین المللی هستند و بدلیل توانایی آنها در تولید خاویار (مروارید سیاه) از اهمیت ویژه ای در صنعت شیلات و آبزی پروری برخوردارند و از با ارزش ترین ذخایر شیلاتی دریای خزر محسوب می شوند.

اما طی دهه های اخیر، ساخت وسازهای بی رویه در سواحل خزر، سد سازی، وجود کارخانجات بزرگ صنعتی و ورود پسابهای آنها به دریا (که محتوی مواد سمی و شیمیایی پایدار و فلزات سنگین است و منجر به بروز ناهنجاریهایی در تخمهای تاس ماهیان می گردد)، افزایش آلودگیهای شدید زیست محیطی، بهره برداری فراتر از ظرفیت ذخایر و محدودیت مناطق جغرافیای مساعد برای رشد و بقاء این نوع ماهیان و عوامل بسیار دیگر، همگی کاهش شدید ذخایر این ماهیان در زیستگاه های طبیعی و خطر انقراض گونه ها را به همراه داشته است (سرافراز، ۱۳۸۴)، لذا پیروی از برنامه های بازسازی ذخایر [1] و بهره گیری از تکنیکهای پیشرفته انتقال ژن و مهندسی ژنتیک در صنعت آبزی پروری بویژه در ارتباط با تکثیر و احیاء تاس ماهیان، امری اجتناب ناپذیر محسوب می شود.

---

[1] - Restocking

فیل ماهی با نام علمی *Huso huso* ، بزرگ ترین ماهی آبهای داخلی ایران است و در بین انواع تاس ماهیان بومی دریای خزر، بعلت سرعت رشد فوق العاده، بسیاری زاد و ولد، سازگاری با شرایط پرورشی، کیفیت ممتاز خاویار و ارزش اقتصادی آن از نقطه نظر آبزی پروری، بسیارحائز اهمیت است (هدایتی، ۱۳۸۹) و از دیدگاه مولکولی نیز، گونه ایی مناسب برای اهداف بیوتکنولوژیکی و ترنسژنزیز[1]، محسوب می شود.

با توجه به اهمیت و ارزش غذایی ماهی در سبد خانوار و اهداف تکنولوژیهای مدیریت آبزی پروری که عمدتاً در جهت افزایش تولید در حداقل زمان و مکان ممکنه و صرف کمترین هزینه و زمان برای عرضه به بازار مصرف است، رشد بعنوان مهمترین و شاخص ترین فاکتور در افزایش بازده تولید، محسوب می شود.

محققین اساساً رشد را به دو دسته تقسیم می کنند:

۱) رشد سوماتیکی که شامل رشد تمامی قسمت های بدن به جز اندامهای جنسی است.

۲) رشد گنادی که همان بلوغ جنسی می باشد.

پرورش تجاری ماهیان خاویاری عمدتاً به منظور تولید گوشت و خاویار صورت می گیرد و افزایش سایز بدن و حتی بلوغ جنسی در گرو رشد سوماتیکی این ماهیان است. از طرفی در ماهیان سایز بدن عامل تعیین کننده در بلوغ محسوب می شود، لذا توجه به این رشد در تاس ماهیان امری حیاتیست و سبب افزایش راندمان تولید گوشت و خاویار می گردد (هدایتی، ۱۳۸۹).

اما از میان فاکتورهای موثر در رشد، هورمون رشد (GH) ، اصلی ترین عامل در رشد سوماتیکی ماهیان است و درگونه های سریع الرشدی نظیر فیل ماهی یک توالی حفاظت شده محسوب می شود . (GH) اساساً یک هورمون چند کارکردی بوده که در فرآیند های فیزیولوژیکی و تنظیمی مختلفی چون رشد، متابولیسم، تنظیم اسمزی، تولید مثل و تکوین، در ماهیان نقشهای متعددی را ایفا می کند (Shepherd *et al.*, 1997).

در حوزۀ دام و آبزیان، تکنیک های پیشرفته انتقال ژن می توانند، مکمل شیوه های سنتی اصلاح نژاد و بهگزینی باشند، در این نوع روشها ژنهای منفردی از یک گونه به منظور ایجاد صفات ژنتیکی مطلوب، جداسازی و به پروموتورها متصل می شوند،که توالیهای تنظیمی DNA بوده و مسئول روشن و خاموش سازی ژنها هستند. سپس این قطعات کلون شده در پلازمیدها، تکثیر شده و ژنهای مورد نظر، توسط وکتورهای ویروسی و یا دیگر روشهایی چون میکرواینجکشن، الکتروپورشن و یا بمباران با تفنگ ژنی به ژنوم دیگر گونه ها، انتقال داده می شوند. لذا به این ارگانیسهای مهندسی شده [2] (GMO) که حاوی ژنهای خارجی و یا ژنهای همولوگ و یا توالی های الحاقی DNA هستند، اصطلاحاً ترنس ژنیک[3] یا تغییر یافته از لحاظ ژنتیکی و به این ژنهای وارده، ترنس ژن می گویند (Houdebine, 2003).

---

[1] - Transgenesis
[2] - Geneticailly modified organism
[3] - Transgenic

اساساً تحقیقات در زمینه انتقال ژن در ماهیان از اواسط دهه ۱۹۸۰ و با بهره گیری از روش میکرواینجکشن آغاز شد و با پیشرفت کلونینگ مولکولی و ریزدستکاریها، امکان جداسازی ژنهای منفرد رمز کننده یک پروتئین خاص و به تبع آن وارد سازی این ژنها به درون تخمهای لقاح یافته ماهیان فراهم شد (Bending, 1981).

اولین کلونینگ و شناسائی ژنهای آبزیان، مربوط به ژن هورمون رشد(GH) قزل آلای رنگین کمان در سال ۱۹۸۸ بوده است، که بطور کامل نواحی کدکننده و غیرکدکننده آن شناسایی گردید (Agellon *et al*., 1988). پس از آن در آزاد ماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar* نیز، ژن هورمون رشد شناسایی و کلون شد (Johansen *et al*., 1989). از سال ۱۹۹۲ تاکنون cDNA ژن هورمون رشد حداقل در ۳۵ گونه از ماهیان دنیا، شناسائی وکلون شده است (Zbikowska, 2003) و محققین توانسته اند، این ژن را به بیش از ۱۲ گونه از ماهیان انتقال دهند (Hallerman, 2007).

۱-۲- مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری

۱-۲-۱- خانواده ماهیان خاویاری (تاس ماهیان)[1]

ماهیان خاویاری یا استرژن ها، یکی از قدیمی ترین گروه های زندهٔ مهره داران محسوب می شوند و مشتمل بر ۲۷ گونه اند، که غالباً از آنها بعنوان فسیل زنده یاد می شود، زیرا قدمت این ماهیان به بیش از ۱۵۰ میلیون سال قبل بر می گردد (Gardiner, 1984).

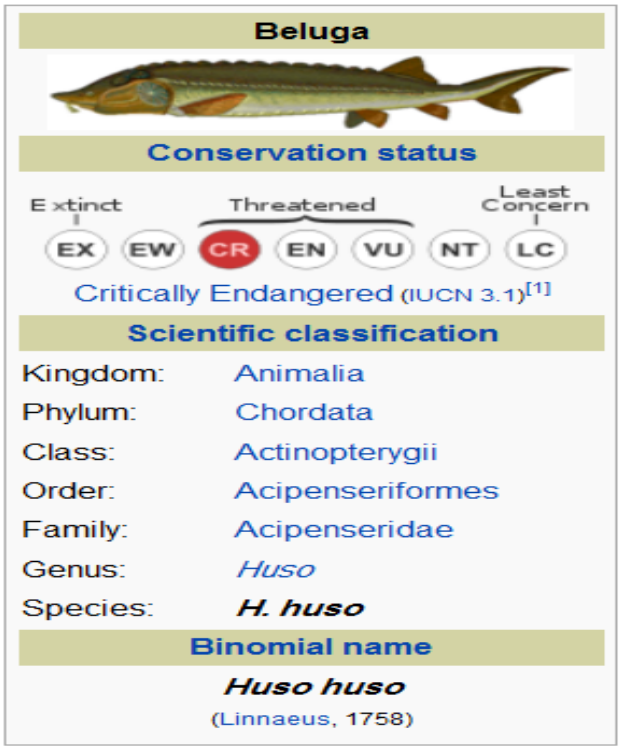
جمعیتهای استرژنها را می توان، در نواحی سرد و معتدلهٔ نیمکره شمالی نظیر آمریکای شمالی، اروپا و آسیا یافت، اما زیستگاه طبیعی آ نها رودخانه ها، مصبها، مناطق اقیانوسی نزدیک به سواحل [2] و دریاهای محصور در خشکی [3] هاست. این ماهیان از لحاظ ظاهری شبیه به کوسه ها هستند، دارای اسکلتی غضروفی- استخوانی اند و در قیاس با دیگر ماهیان، طویل العمر بوده و زمان رسیدن به بلوغشان نیز، طولانی است. فرم بدن کشیده، دراز و دوکی شکل است. مشخصه ویژه آنها وجود ۵ ردیف صفحات استخوانی پهن درکناره های پشتی، جانبی و شکمی است . در زیر پوزهٔ کشیده و مخروطی این ماهی ها ۴ سبیلک حساس وجود دارد، باله دمی، هتروسرکال و شاخه بالایی آن طویل است، در طرفین سر، یک منفذ اسپیراکل و یک شکاف آبششی وجود دارد، که توسط سر پوش آبششی پوشیده شده است. کیسه شنا در تاس ماهیان ، از نوع فیزوستوم بوده و با روده مرتبط است (Bertin, 1958).

این خانواده به دو زیر خانواده Acipenserinae و Scaphirhynchinae تقسیم می شود، زیر خانواده اول یا تاس ماهی ها خود مشتمل بر دو جنس است، که یکی جنس تاس ماهی Acipenser و دیگری فیل ماهی *Huso* است (سرافراز، ۱۳۸۴).

---

[1] - Acipenseridae
[2] - Near-shore oceanic environments
[3] - Inland sea

۱-۲-۲- جایگاه تاکسونومیک و زیست محیطی فیل ماهی *Huso huso*



شکل ۱-۱- نمایی از جایگاه تاکسونومیک فیل ماهی، اقتباس از سایت
(http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/10269/www.sturgeon.ir).

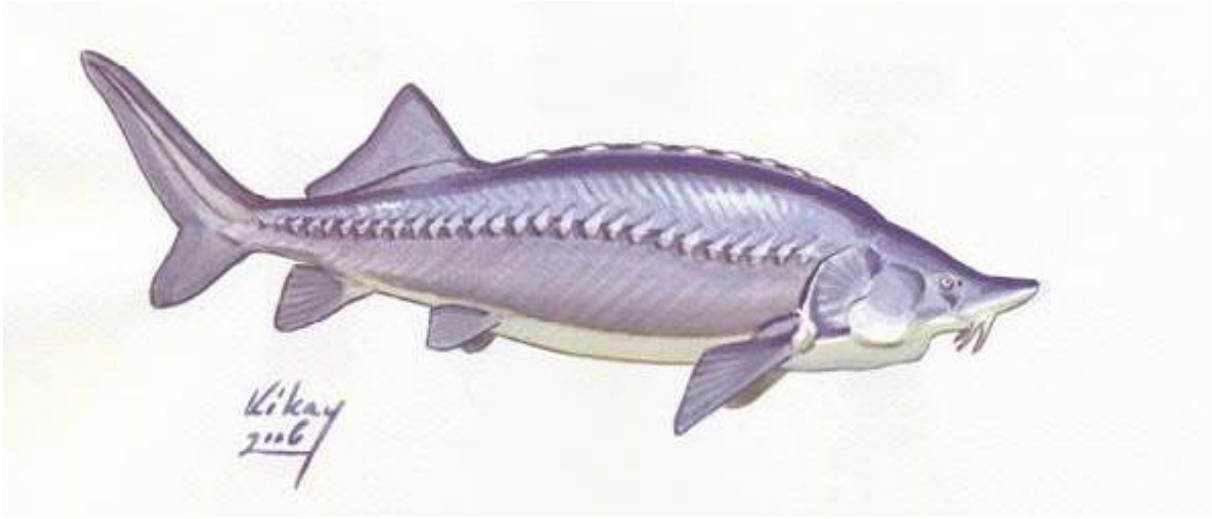
این گونه از ماهیان خاویاری در ایران، با نامهای فیل ماهی، بلوگا و سگ ماهی شناخته می شود، اما در زبان انگلیسی به نامهای Beluga ، Great Sturgeon ، Giant Sturgeon و European Sturgeon مشهور است. ریشه لغوی نام لاتین *Huso* نیز، از کلمه یونانی " Hus " به معنای حریص و پر خور برگرفته شده ا ست (سرافراز، ۱۳۸۴).

اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت [1] (IUCN) از سال ۱۹۹۶ تاکنون، فیل ماهی *H. huso* را بعنوان گونهٔ حساس و در معرض خطر، در لیست قرمز جای داده است.

بلوگا بزرگترین گونهٔ راسته Acipenseriformes، بزرگترین ماهی موجود در دریای خزر و آبهای داخلی ایران و حتی به عقیده برخی محققین، بزرگترین ماهی آبهای شیرین جهان محسوب می شود، بنحویکه طول آن به ۷ متر و وزن اش به بیش از یک تن می رسد، ماگزیمم سنی که تاکنون گزارش شده نیز، ۱۱۸ سال است (Babushkin, 1964). اما در دهه های اخیر به ندرت رشد فیل ماهیها به این حد می رسد و این امر ناشی از صید بی رویه و غیر قانونی، تخریب زیستگاهای طبیعی و آلودگی های زیست محیطی است، بنا برگزارش IUCN در

[1] - International Union for Conservation of Nature

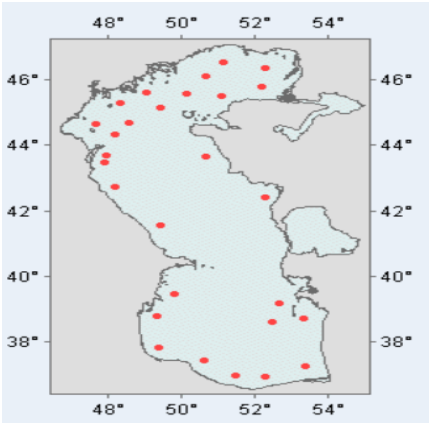
سال ۲۰۰۳ ، بلوگاهای صید شده، بطور میانگین ۳۲۸- ۱۴۲ سانتیمتر طول و ۲۶۴- ۱۳۰ کیلوگرم وزن داشته، ماده ها عموماً ۲۰ ٪ بزرگتر از نرها هستند، ماگزیمم سنی آنها نیز ۵۳ سال، برآورد شده است. مشخصه مورفولوژیک ویژه فیل ماهی، دهان بزرگ و هلالی شکل، رنگ آبی– خاکستری بدن و پیوستگی غشاهای آبششی در ناحیه تنگه چین آزادی است (سرافراز، ۱۳۸۴).



شکل ۱-۲- نمایی از فیل ماهی، اقتباس از سایت
(http://www.commons.wikimedia.org).

۱-۲-۳- پراکنش و زیستگاه اکولوژیک

بلوگاها از لحاظ پراکنش ازگسترهٔ وسیعی برخوردارند و در دریای خزر، دریای سیاه، دریای آزوف وگاهاً دریای آدریاتیک و نیز ، بسیاری از انشعابات حوزه آبریز این دریاها نظیر رودخانه های ولگا، کورا، آرال، آناتولیا و دانوب مشاهده می شوند (Berg, 1948). در ایران فیل ماهی برای تخمریزی به رودخانه های سفید رود، تجن و گرگان رود در سواحل جنوبی خزر وارد می شود (Razavi, 1988).



شکل ۱-۳- نقشه پراکنش فیل ماهی در دریای خزر، اقتباس از سایت
(http://www.caspianenvironment.org).