استفاده از فناوری انتقال ژن در پرورش آبزیان

شیرین جمشیدی[۱*]، سمیرا ناظم رعایا[۲]

[۱]پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری شمال کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

[۲]پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج و کشاورزی، اهواز، ایران.

چکیده

یک آبزی «تراریخته» موجودیست که در ژنوم آن، یک ژن خارجی «کد کننده پروتئین» یا قطعه‌ای از اسید نوکلئیک «غیرکدکننده پروتئین» به عنوان القاگر و به صورت مصنوعی معرفی شده باشد. اولین گزارش ماهی تراریخته از سال ۱۹۸۵، بسیاری از موجودات آبزی مثل ماهیان، سخت‌پوستان، دوکفه‌ای‌ها و نرم‌تنان با استفاده از روش ریزتزریق یا الکتروپورشن و انتقال ژن غیرمتجانس (غیر آبزی) یا متجانس (آبزی) به تخم تازه لقاح یافته، تخمک یا اسپرم جانور آبزی تراریخت شده‌اند. برای تولید آبزیان تراریخته، عوامل زیادی در نظر گرفته شده است. اولین و مهمترین عامل در انتقال ژن، گونه آبزی مورد نظر می‌باشد. در انتخاب گونه آبزی بیشتر به ماهیت تحقیقی که قرار است انجام شود و توانایی نگهداری جانور آبزی در محیطی با امنیت بالا و امکانات مناسب، توجه شده است. دومین عامل، «سازه» ژن هدف است که باید برای ساخت آن برنامه‌ریزی شود و از نیازهای اساسی این چنین مطالعاتی است. مثلاً سازه قابل انتقال باید شامل ناحیه «ORF» ژن مد نظر باشد. همین‌طور دارای عواملی باشد که بیان ژن را به شکل موقت یا دائم تنظیم می‌کنند یا در مراحل رشد و نموی تأثیر دارند. در مرحله سوم، سازه ژن باید به اسپرم یا جنین انتقال داده شود تا ژن مورد نظر در سلول‌های جنینی به شکل دائم بیان شود. در مرحله انتهایی چون تمامی افرادی که تراریخت شده‌اند کارآمد نمی‌باشند بنابراین برای یافتن افرادی که ژن مورد نظر را به شکل مؤثر دریافت کرده اند باید روش ردیابی انجام شود.در مجموع، کاربرد فناوری تراریختگی برای تولید ماهی و دیگر آبزیان تراریخته با صفات سودمند، مثل افزایش رشد سوماتیکی بدن، مقاومت به بیماری‌ها و تولید محصولات مفید برای انسان، دام، طیور و آبزیان با استفاده از فن‌آوری زیستی، افزایش یافته است.

کلمات کلیدی: جانوران آبزی تراریخته، انتقال ژن، سازه، ماهی تراریخته، تکنولوژی زیستی

* نویسنده مسئول: s.jamshidi@abrii.ac.ir

مقدمه

مراحل تولید آبزیان تراریخته

در تولید آبزیان تراریخته دریایی عوامل و عناصری دخیل هستند که از آن جمله «سازه ژنی»[۱]، جانور آبزی، روش انتقال ژن و بررسی و ردیابی احتمال انتقال و بیان ژن مورد نظر در موجود آبزی می باشد که در ذیل به آنها پرداخته می‌شود.

- ساختن سازه ژنتیکی برای انتقال ژن مورد نظر به آبزی

موجود تراریخته آبزی، قطعه‌ای از ژنی را دارد که به شکل متجانس (از آبزیان) یا غیرمتجانس (از غیر آبزیان) به موجود آبزی معرفی می‌شود. ژن قابل انتقال در قالب سازه پلاسمیدی قرار داده می شود که شامل «ژن‌های ساختمانی»[۲] و عوامل «پیشبر/ القاگر»[۳] برای بیان دقیق ژن قابل انتقال در آبزی می‌باشد. از زمانی‌که فناوری تولید آبزیان تراریخت آغاز شده خیلی از پیشبرهای غیرآبزی برای کنترل بیان ژن در آبزیان استفاده شده است، اما در سال‌های اخیر پیشبرهای خود آبزیان هم برای بیان ژن در آبزی به کار گرفته شده‌اند به‌طوریکه سازه‌ای که برای تراریخته کردن آبزی به‌کار گرفته شده به طور کامل از خود آبزیان گرفته شده است. در میان این پیشبرها ژن «بتا اکتین»[۴] گرفته شده از کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به عنوان پیشبر قوی در آبزیان و در تمامی انواع سلول‌های آبزیان به‌کار رفته است. ژن بتا اکتین در تمامی سلول‌ها بیان می‌شود و بنابراین زمانی‌که انتقال هر نوع ژنی با استفاده از پیشبر بتا اکتین باشد؛ باید انتظار داشت ژن مورد نظر در تمامی سلول‌ها بیان شود. پیشبرهای ویژه‌ای که فقط مختص یک بافت هستند، برای بیان ژن تراریخت فقط در یک بافت ویژه به کار می‌روند (Liu *et al*., 1990, Lu *et al*., 2002). روش انتقال ژن از نظر سازه مورد استفاده به سه گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شود:

استفاده از «عملکرد ژن انتقال داده شده»[۵]

در این قسمت یک ژن در یک موجود اضافه می‌شود تا عملکرد جدیدی در موجود به‌دست آید. قسمت ناحیه کد کننده پروتئین ژنی که انتقال داده می‌شود یا cDNA که پلی‌پپتیدی را کد می‌کند و محصول جدید تولید می‌شود، در سازه اضافه می‌شود. در این حالت بیان ژن تراریخته با استفاده از توالی پیشبر/ القاگر متجانس (از آبزیان) یا غیرمتجانس (از غیر آبزیان) انجام خواهد شد. اگر بخواهیم مثالی در این مورد بزنیم استفاده از توالی cDNA هورمون رشد انسانی یا ماهی با استفاده از پیشبر بتا اکتین مرغ یا ماهی می‌باشد. این روش از انتقال ژن کاربرد زیادی در مطالعات افزایش رشد به ویژه افزایش رشد سوماتیکی ماهی دارد (Chen *et al*., 2015).

استفاده از «عملکرد ژن گزارشگر»[۶]

در این روش از ژن‌های گزارشگری چون «کلرآمفینکل استیل ترانسفراز» (CAT)[۷]، «بتاگالاکتوسیداز» (β-gal)[۸]، نئومایسین فسفوترانسفراز II (neo)[۹]، «لوسی فراز»[۱۰] و «پروتئین سبز فلورسنت» (GFP)[۱۱] استفاده می‌شود .این ژن‌های گزارشگر اغلب برای ساخت سازه‌هایی کاربرد دارند که عملکرد ژن گزارشگر برای انتقال ژن مطرح است و همچنین ژن گزارشگر به عنوان نشانگر قوی برای موفقیت در انتقال ژن به کار گرفته می‌شود؛ زیرا که محصول ترجمه شده این ژن‌های گزارشگر قابل اندازه‌گیری به شکل کمی می‌باشد. ژن‌های گزارشگری که در سازه‌های گزارشگر قرار داده می‌شوند برای بررسی توالی نواحی پیشبری/ القاگری و همین‌طور اندازه‌گیری فعالیت نواحی «پیشبری»[۱۲] در القا ژن مورد نظر کاربرد دارند. بیشترین ژن گزارشگری که تاکنون استفاده شده‌است ژن GFP می‌باشد که از ژله ماهی (*Aequorea Victoria*) گرفته شده است چون ردیابی حساسیت آن آسان است. از GFP

---

۱ gene construct
۲ structural genes
۳ promoter/ enhancer
۴ β-actin
۵ gain of function
۶ reporter gene function
۷ Chloramphenicol acetyltransferase
۸ Beta-glucuronidase
۹ neomycin phosphotransferase
۱۰ luciferase
۱۱ Green fluorescent protein
۱۲ promotor

که تولید کننده پروتئین رنگ سبز است واریته‌های متفاوتی ثبت شده است که شامل رنگ‌های آبی (BFP)، زرد (YFP) و قرمز (RFP) می‌باشد. این رنگ‌های گزارشگر به راحتی در گورخرماهی (*Danio rerio*) و مداکا (*Oryzias latipes*) ردیابی شده‌اند، زیرا که بدن جنین گورخرماهی و مداکا کاملا شفاف است و بیان پروتئین رنگی قابل ردیابی است بدون اینکه لازم باشد ماهی کشته شود. همچنین به عنوان ژن گزارشگر در ردیابی ژن‌های دیگر انتقال داده شده در اندامهای متفاوت، کاربرد دارند (Fetcho *et al*., 2008, Amsterdam *et al*., 1995, Higashijima *et al*., 2000). اولین ماهی تراریخته با استفاده از GFP در سال ۱۹۹۵ تولید شده است. بیان GFP در زیست شناسی پایه کاربرد بسیاری دارد. می‌توان بیان ژن، تغییرات ریختی سلول‌ها و اندام-زایی را در مدت زمان دروه رشد و نموی ماهی مورد بررسی قرار داد. مثلاً استفاده از پیشبرهایی که تنها در یک بافت خاص مثل عضله بیان می‌شوند و استفاده از ژن-های گزارشگر GFP و واریته‌های رنگی دیگر آن در گورخرماهی، ماهی مداکا و ماهیان آکواریومی هم‌اکنون در تولید ماهیان آکواریومی رنگی کاربرد تجاری پیدا کرده است (Higashijima *et al*., 1997, Wan *et al*., 2002). اما استفاده از ژن‌های گزارشگر دیگری که ردیابی پروتئین آنها به شکل مستقیم و با چشم مسلح امکان‌پذیر نمی‌باشد به صورت غیرمستقیم و از طریق واکنش آنزیمی با استفاده از سوبسترا یا رنگ‌آمیزی «ایمنوهیستوشیمی»[۱۳] توسط «آنتی بادی اختصاصی»[۱۴] می‌باشد تا بتوان محصول تولید شده ژن گزارشگر را ردیابی کرد.

استفاده از «عدم عملکرد یک ژن»[۱۵]

سازه ژنی که برای این روش استفاده می‌شود برای غیرفعال کردن بیان ژن مورد نظر یا اختلال در عملکرد ژن مورد نظر در موجودات متفاوت، آماده‌سازی می‌شود. در این حالت رشته مکمل (آنتی سنس) mRNA ژنی که ساخته شده در سازه نوترکیب کلون شده و محصول انتقال ژن توسط سازه، بامRNA هیبرید شده و باعث از بین رفتن mRNA می‌شود یا در زمان ترجمه با جلوگیری از چسبیده شدن ریبوزوم به mRNA مانع از ساخته شدن پروتئین می‌شود. گاهی مواقع RNA هایی دو رشته‌ای کوتاه (siRNA) همولوگ mRNA است که در سازه کلون شده و محصول انتقال ژن نوترکیب منجر به تخریب mRNAمی‌شود. تمامی این اشکال از اسیدنوکلئیک که منجر به تخریب RNA می‌شود، می‌تواند توسط سازه نوترکیب در مبحث انتقال ژن، ارائه شود. این روش از انتقال ژن کاربرد بسیار زیادی در بحث «ژن درمانی»[۱۶] دارد (Buckingham *et al*., 2004, Vickers *et al*., 2003, Uzbekova *et al*., 2000, Chen *et al*., 2015).

- انتخاب گونه آبزی مورد نظر برای انتقال ژن

از سال ۱۹۸۵ که اولین آبزی تراریخت یعنی ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) تولید شده است (Zhu *et al*., 1985)، بسیاری از آبزیان دیگر مانند ماهی سالمون (*Salmo salar*) (Shears *et al*., 1991)، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*)، گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*)، اردک ماهی شمال (*Esox Lucius*)، تیلاپیا (*Oreochromis*)، گورخرماهی (*Danio rerio*) و مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) (Chen and Powers, 1990, Chiou *et al*., 2006, Hackett, 1993, Fletcher and Davies, 1991) تراریخت شده‌اند که انتقال ژن در هر کدام از این گونه‌ها به هدفی که از این کار دنبال می‌شده است بستگی داشته است. برای انتخاب خیلی از گونه‌هایی که برای مطالعات انتقال ژن استفاده می‌شود، باید مواردی چون طول دوره زندگی، دوره زمانی که اسپرم و تخمک تولید می‌شوند، شرایط پرورش ماهی،

۱۳ immunohistochemistry
۱۴ monoclonal antibody
۱۵ lost of function
۱۶ gene therapy

اندازه ماهی در زمان بلوغ و در نهایت وجود داشتن اطلاعات زمینه‌ای روی ژنتیک، فیزیولوژی و هورمونی گونه ماهی در نظر گرفته شود.

گورخرماهی و همین طور مداکا از جمله گونه‌های ایده‌آل برای مطالعات انتقال ژن هستند چون از زمان تخم تا بلوغ آنها حدود سه ماه طول می‌کشد. تعداد زیادی تخم تولید می‌کنند بدون اینکه محدودیت فصلی در تولید تخم این دو ماهی وجود داشته باشد و به راحتی در مدت دو تا سه ماه در آزمایشگاه نگه‌داری می‌شوند. اندازه تخم این دو ماهی نسبتاً بزرگ است (قطر ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر) و کوریون تخم خیلی نازک و شفاف هست به‌طوری‌که رشد جنین را به خوبی می‌توان از ورای لایه کوریون بررسی کرد. همچنین DNA را به راحتی می‌توان به داخل تخم تازه لقاح یافته تزریق کرد. لاین ها و «موتانت هایی»[۱۷] که ویژگی‌های موفولوژیکی خاص دارند، در هر دو گونه تولید شده و موجود می‌باشد. این دو گونه به دلیل انجام مطالعات رشد و نموی تنظیم بیان ژن و عملکرد آن، اندازه‌گیری میزان عملکرد پیشبرها و تولید مدل تراریخته برای بیماری‌های انسان و سموم محیط زیستی نامزدهای مناسبی برای تولید ماهیان تراریخته هستند.

درحالیکه استفاده سودمند از دو گونه گورخرماهی و ماهی مداکا به عنوان مدل بیماری‌های انسانی به وجود داشتن اطلاعات ژنومی و اطلاعات پایه این دو ماهی برمی‌گردد، اما چون اندازه این دو ماهی خیلی کوچک است برای مطالعه‌ی هورمونی و بیوشیمیایی مناسب نمی‌باشند؛ به همین دلیل از ماهیانی مثل لوچ، گلدفیش و تیلاپیا استفاده می‌کنند. اندازه بدن این ماهیان برای خون‌گیری یا تهیه بافت برای مطالعات هورمون شناسی و بیوشیمیایی به اندازه کافی بزرگ می‌باشد. از جمله مزیت‌های دیگه این ماهیان این هست که دوره رسیدگی جنسی آن‌ها از ماهیان آزاد و قزل‌آلای رنگین‌کمان بسیار کوتاه‌تر است. تیلاپیا جز ماهیان با اندازه متوسط است که برای انتقال ژن استفاده شده است، زیراکه برای رسیدگی جنسی آن فقط چهار ماه زمان لازم است. در مدت زمان یک سال می‌توان سه نسل از تیلاپیا بدست آورد، اما متأسفانه چون اطلاعات ژنتیکی زیادی از ماهی تیلاپیا نداریم و همین‌طور چون از رفتار تولیدمثلی این ماهی اطلاعی نداریم، جمع کردن میزان لازم تخمک لقاح یافته برای انجام عملیات انتقال ژن غیرممکن است مگر اینکه زمینه جمع آوری تعداد لازم تخم لقاح یافته فراهم شود.

از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سالمون، گربه‌ماهی روگاهی و کپور معمولی به عنوان گونه‌های بزرگ برای عملیات انتقال ژن استفاده شده است. چون اطلاعات خوبی درباره بیوشیمی، هورمون شناسی و فیزیولوژی این گونه ها موجود هست. بنابراین می‌توان در مطالعات از این اطلاعات مقایسه‌ای در آبزی‌پروری استفاده کرد. اما به هر روی، دوره تولیدمثلی هر کدام از این ماهیان، طولانی می‌باشد. مثلاً برای قزل‌آلای رنگین‌کمان و سالمون دو تا سه سال و برای کپور و گربه ماهی روگاهی نیز یک تا دو سال طول می‌کشد تا به رسیدگی جنسی برسند. در اصل چون این ماهیان یک بار در سال به رسیدگی جنسی می‌رسند بنابراین تکنیک رسیدگی جنسی و انتقال ژن که یک بار در سال باید انجام شود که به نظر می‌رسد این فرآیند سخت و زمان بر باشد.

- روشهای انتقال ژن در آبزیان

روش کلسیم فسفات، انتقال توسط «میکرواینجکتور»[۱۸]، انتقال از طریق اسپرم، «الکتروپورشن»[۱۹]، روش «رتروویروسی»[۲۰]، «لیپوفکشن»[۲۱] و انتقال توسط «تفنگ ژنی»[۲۲] از جمله روش‌های انتقال ژن در سلول‌های گیاهی و جانوری و لاین‌های زایای پستانداران و دیگر مهره‌داران می‌باشد. از بین همه‌ی آنها، روش «ریز تزریق»[۲۳] و روش الکتروپورشن روش مطمئنی برای انتقال ژن به تخمک‌های تازه لقاح یافته آبزی می‌باشد. روش انتقال رتروویروسی و

۱۷ mutants

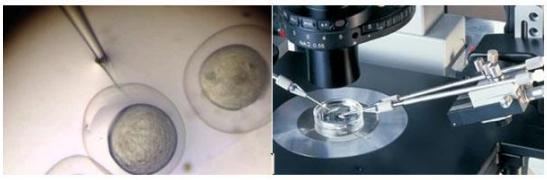
۱۸ microinjector
۱۹ electroporation
۲۰ Retroviral gene transfer
۲۱ Lipofection
۲۲ gene gun
۲۳ microinjection

روش لیپوزوم روش‌های انتقال ژن هستند که در سال‌های اخیر برای انتقال ژن به آبزیان استفاده شده‌اند (Fletcher and Davies, 1991, Chen and Powers, 1990, Hackett, 1993, Chiou *et al*., 2006).

انتقال ژن توسط ریزتزریقی

اولین بار از روش ریزتزریق برای انتقال ژن به موش در سال ۱۹۸۰ استفاده شده است، اما از این روش برای انتقال ژن به ماهی سالمون آتلانتیک (*Salmo salar*)، ماهی کپور معمولی، گربه ماهی، گدفیش، لوچ، مداکا، قزل‌آلای رنگین‌کمان، تیلاپیا و گورخرماهی نیز استفاده شده است. از جمله سازه‌های ژنی که برای انتقال ژن استفاده شده است شامل ژن «هورمون رشد انسانی»، ژن « هورمون رشد ماهی سالمون»، ژن پروتئین «گاما کریستالین»[۲۴]، ژن «پروتئین ضد یخ»[۲۵]، ژن «بتا گالاکتوسیداز»[۲۶] و «ژن مقاومت هیگرومایسین»[۲۷] می‌باشد (Fletcher and Davies, 1991, Chen and Powers, 1990, Hackett, 1993, Chiou *et al*., 2006, Chen *et al*., 2015).

برای انجام ریز تزریق در جنین ماهی، معمولاً تخمک و اسپرم جمع‌آوری می‌شود و پس از مخلوط کردن آنها با هم و اضافه کردن آب، که منجر به آغاز پدیده لقاح می‌شود، انتقال ژن به تخم لقاح یافته توسط سوزن‌های بسیار باریک به جنینی انجام می‌شود که چند ساعت یا چند دقیقه از عمرش سپری شده است. این سوزن‌های بسیار ظریف به دو «میکرومنیپولاتور»[۲۸] متصل می‌شود و عمل انتقال ژن به کمک این دو ابزار ریزتزریقی که روی میکروسکوپ فاز کنتراست نصب شده است، انجام می‌شود. این دو ابزار ریزتزریقی یکی برای نگهداشتن جنین ماهی است، به‌طوری‌که سوزن‌های شیشه‌ای برای مکش و نگه داشتن جنین به این ابزار متصل می‌شود و دیگری سوزنی است که روی آن نصب می‌شود و عملکرد آن برداشتن ماده تزریقی است. ماده‌ای که قرار است به جنین منتقل شود در این سوزن کشیده شده و به اندازه لازم به جنین تزریق می‌شود. به تعداد $۱۰^{۶}$ یا $۱۰^{۸}$ مولکول از ژنی که به صورت خطی در آمده‌است به تخم ماهی انتقال داده می‌شود. سپس جنین در آب قرار داده می‌شود تا به رشد خود ادامه دهد.



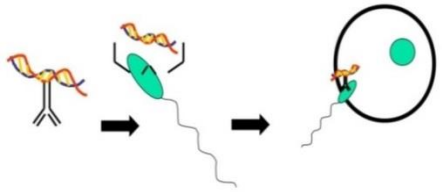
شکل۱: انتقال ژن توسط روش ریزتزریقی

«انتقال ژن توسط اسپرم»[۲۹]

در این روش سازه نوترکیب مورد نظری که باید انتقال داده شود، از طریق اسپرم جانور در اختیار تخمک قرار می‌گیرد و اسپرم به محض دیدار با تخمک در لقاح شرکت کرده و علاوه بر تولید جنین از طریق سر و دم منجر به انتقال سازه نوترکیب می‌شود. زمانی‌که اسپرم از بدن ماهی نر خارج و در آب رها می‌شود، مدت زمان کوتاهی فعال است و بلافاصله غیرفعال می‌شود، که این مدت زمان در بهترین حالت بین نیم تا یک دقیقه است. برای اینکه انتقال ژن از طریق اسپرم و با دخالت انسان، انجام شود لازم است تا از ریزش اسپرم در آب جلوگیری شود و اسپرم در مایعی که مانع از حرکت می‌شود ذخیره سازی شود تا به محض آماده شدن تخمک‌ها، از اسپرم در روش انتقال ژن به روش الکتروپورشن استفاده شود. در بسیاری از سخت‌پوستان مثل میگو که اسپرم‌ها بعد از جفت‌گیری به زیر بدن جانور ماده انتقال داده می‌شوند و هر بار که جانور ماده تخمک‌های رسیده دارد از ذخیره اسپرمی استفاده می‌کند، می‌توان اسپرم‌ها را برداشته و در محیط آزمایشگاه با استفاده از روش الکتروپورشن، ژن مورد نظر را به اسپرم و سپس به زیر بدن جنس ماده انتقال داد تا به محض رسیده شدن تخمک‌ها از اسپرم‌های تراریخته

۲۴ gamma-crystallin
۲۵ antifreeze protein
۲۶ β-galactosidase
۲۷ hygromycin resistance gene
۲۸ micromanipulator
۲۹ sperm mediated gene transfer

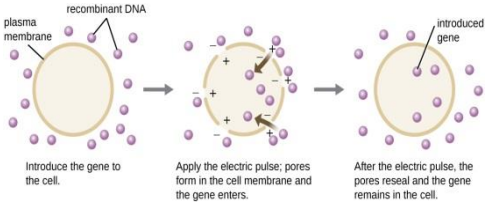
برای بارورسازی تخمک‌ها توسط میگو و سخت‌پوست استفاده شود.



شکل۲: انتقال ژن توسط اسپرم

«انتقال ژن توسط روش الکترو پورشن»[۳۰]

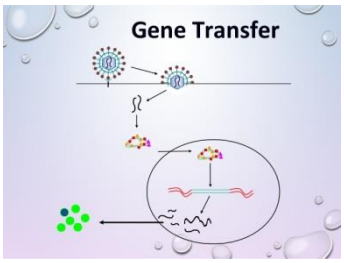
روش الکتروپورشن در انتقال ژن خارجی به باکتری، مخمر، گیاه و جانور در محیط کشت بسیار کارآمد است. این روش در انتقال ژن خارجی به اسپرم یا جنین ماهی که تازه لقاح یافته نیز به کار گرفته شده است. اساس این روش استفاده از ضربان‌های الکتریکی به شکل تک ضربان مقطعی یا ممتد است که از منبع تولید می‌شوند. میزان بازماندگی جنین ماهی در این روش کمتر از ۲۰ درصد است و در برخی مواقع کمتر از روش ریزتزریقی است، اما چون به یکباره تعداد زیادی تخم تحت تیمار این روش قرار می‌گیرند و مثل روش ریزتزریقی، تک به تک نمی‌باشد کارایی زمانی بهتری دارد (Sin *et al*., 2000).



شکل۳: انتقال ژن توسط روش الکتروپورشن

انتقال از طریق «وکتورهای رتروویروسی»[۳۱]

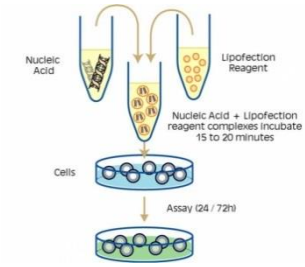
رتروویروس میمون «MMLV»[۳۲] دارای طیف وسیعی از میزبان‌ها می‌باشد. چون ورود ویروس به سلول میزبان با آمیختگی پروتئین G ویروس و فسفولیپید میزبان همراه است، بنابراین این ویروس در انتقال ژن کاربرد دارد. این روش که برای انتقال ژن در گورخرماهی، مداکا، خرچنگ و ستاره دریایی استفاده شده است (Core *et al*., 2012, Lin *et al*., 1994, Sarmasik *et al*., 2001) بسیار کارآمد بوده است، زیرا مشکل تولید جانور «موزایسم»[۳۳] در نسل اول با این روش انتقال ژن حل می‌شود.



شکل۴: انتقال ژن توسط رتروویروس

انتقال از طریق «لیپوزوم‌ها»[۳۴]

لیپوزوم‌هایی که بار مثبت دارند دارای قابلیت اتصال به هر نوع اسید نوکلئیک دارای بار منفی مانند DNA و RNA هستند و از این طریق به راحتی می‌توانند آنها را انتقال دهند. این روش برای انتقال ژن در آبزیان هم به‌کار گرفته شده است (Walker *et al*., 1992).



شکل۵: انتقال ژن توسط لیپوزوم ها

- بررسی مشخصات آبزی تراریخته برای ردیابی ژن مورد نظر

تشخیص افراد تراریخته

تشخیص افراد تراریخته در تکنولوژی تولید آبزی تراریخته یکی از وقت‌گیرترین و پرهزینه‌ترین مراحل است. بهترین راه برای ردیابی ژن تراریخته روش «ساترن بلاتینگ»[۳۵] است. بدین منظور از نمونه مورد نظر، استخراج DNA انجام شده و محصول استخراج شده با استفاده از «آنزیم-

۳۰ electroporated gene transfer
۳۱ retroviral vector
۳۲ murine leukemia viruses
۳۳ mosaic
۳۴ lipofection
۳۵ Southern blot

های برشی»[۳۶]، هضم شده و با استفاده از پروب‌های در نظر گرفته شده، هیبرید می‌شود. با اینکه این روش کار آزمایشگاهی سنگینی دارد، اما روشی مطمئن برای ردیابی انتقال ژن تراریخته به موجود است. اما زمانی‌که تعداد زیادی نمونه در دسترس باشد به دلیل هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن این روش، معمولاً از روش «واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز» استفاده می‌شود. این روش ردیابی کم هزینه‌تر و سریع‌تر است، اما نمی‌تواند تفاوت الحاق ژن تراریخته در سطح ژنوم یا الحاق غیرکروموزومی را مشخص کند (Chen *et al*., 1993, Zhang *et al*., 1990).

تشخیص القا ژن تراریخته

تحقیقات نشان داده است که ژن انتقال داده شده به شکل یک واحد کروموزومی اضافه تا زمان نسخه برداری DNA در مراحل ابتدایی جنینی باقی می‌مانند و برخی از آنها به-طور کاملاً تصادفی در ژنوم میزبان الحاق می‌شوند و بقیه از بین می‌روند. به همین دلیل موجوداتی موزائیسم درست می‌شوند که در نسل اول تمامی سلول‌های آنها حاوی ژن مورد نظر نیست اما با تلاقی این افراد به عنوان والد می-توان به افرادی در نسل بعد دست یافت که حاوی ژن مورد نظر باشند. ردیابی ژن مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی DNA ژنومی و روش ساترن بلاتینگ قابل دستیابی است. در مورد تمامی جانوران آبزی که تا به حال انتقال ژن در آنها انجام شده است نشان داده شده که کپی‌هایی از ژن انتقال داده شده به صورت سر به سر، سر به دم، و دم به دم القا شده است. در موارد زیادی، بیشتر از یک نسخه از ژن در ژنوم موجود گزارش شده است. در مورد کپور معمولی و گربه ماهی روگاهی یک نسخه از ژن در مناطق متفاوتی از کروموزوم میزبان القا شده است. القا ژن در آبزی حتماً باید به شکل ثابت و نه موقتی باشد، زیرا که تنها از این طریق است که می‌توان به انتقال عمودی (از والدین به فرزند) ژن مورد نظر اطمینان داشت و بتوان لاین آبزی تراریخته درست کرد. بدین منظور والدین تراریخته با والدین غیرتراریخته تلقیح شده و نسل حاصل از نظر وجود موجود آبزی تراریخته، بررسی می‌شود.

۳۶ restriction enzymes

معمولاً در نسل اول نرخ انتقال ژن به نسل بعد توسط یکی از والدین کم و حدود ۲۰ درصد می‌باشد. اما نسل دوم تراریخته حاوی ۵۰ درصد از ژن تراریخته هستند. این امر به وضوح بیانگر این است که نسل اولیه حاصل از انتقال ژن، موزائیسم بوده اند (Hackett, 1993, Sarmasik *et al*., 2001).

تشخیص بیان ژن تراریخته

وقتی‌که ژن انتقال داده شده در موجود آبزی بیان و پروتئین آن ساخته شود، می‌توان از طریق ردیابی با استفاده از RNA تولید شده و روش RT-PCR بیان ژن جدید در موجود تراریخته را ردیابی کرد. همین طور از روش «نورترن بلاتینگ»[۳۷] هم برای ردیابی RNA ژن بیان شده و روش Real time PCR برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن مورد نظر در جانور آبزی استفاده کرد. با این وجود در جانور آبزی که تراریخته می‌شود، ژن انتقال یافته حالت هتروزیگوتی دارد (ناهمسان) و برای اینکه حالت هموزیگوتی پیدا کند می‌باید حتماً با افراد هتروزیگوت دیگر آمیزش کند و قسمتی از نسل حاصل همگی هموزیگوت (همسان) خواهند بود (Ballagi-Pordany *et al*., 1991, Fronhoffs *et al*., 2002).

- کاربردهای فناوری زیستی آبزیان تراریخته

روش‌های تولید آبزیان تراریخته دریایی در سه دهه اخیر رشد زیادی داشته است و مثل انفجار عظیمی در استفاده از آبزیان تراریخته در علوم پایه و فناوری زیستی بوده است. ماهی به عنوان یک مهره‌دار آبزی، مدل زیستی بسیار مناسبی برای تحقیق در زمینه زیست‌شناسی مهره-داران است. به‌ویژه آنکه از نظر عملکرد ژن‌ها بسیار شبیه پستانداران می‌باشد. از نظر تکاملی، ماهی بسیار نزدیک پستانداران است و بسیار مناسب برای مطالعات مقایسه‌ای روی ژنوم انسان و دیگر مهره‌داران عالی است. چون ماهی تراریخته خیلی سریع و راحت ایجاد و در حجم زیادی پرورش داده می‌شود. از این روی، نسبت به موش که نگهداری آن در حجم زیاد مشکل هست، برتری دارد. در

۳۷ northern blotting

سال‌های اخیر، استفاده از ماهی تراریخته در مطالعات زیست‌شناسی رشد و نموی تأثیر عوامل پیشبر/ القاگر ژن-ها، بررسی جزء به جزء «مسیرهای انتقال ژن از طریق ویروس»[۳۸] و توسعه مدل بیماری‌های انسانی نقش دارند. ماهی تراریخته در مجموع از نظر اقتصادی هم برای انسان سودمند است. پاره‌ای از کاربردهای ماهی تراریخته به تفصیل در ادامه بیان می‌شود. توجه بسیاری به این سمت معطوف است که به محض آزادسازی ماهیان تراریخت در طبیعت و تکثیر با ماهیان جمعیت‌های زیست‌بوم، ممکن است این جمعیت‌ها را به نابودی بکشانند؛ لذا در استفاده از این آبزیان باید نهایت تمهید از نظر فرار احتمالی آنها به طبیعت در نظر گرفته شود که در صورت رهایی و فرار نتوانند با ماهیان دیگر تکثیر کنند. به طور مثال، ماهی سالمون آتلانتیک تراریخت، پس از تولید به شکل تریپلوئید درآمده و به سیستم پرورشی معرفی شده است تا در صورت رهایی و فرار شرایط فیزیولوژیک تکثیر را نداشته باشد.

بهبود مقاومت به بیماریها در آبزیان

یکی از تنگناها در صنعت پرورش ماهی، بیماری‌های ماهی است. به‌تازگی با توسعه علوم و دانش به دو مقوله تولید واکسن برای ماهی برعلیه بیماری یا استفاده از ماهیانی که از نظر ذاتی نسبت به بیماری مقاومت دارند، پرداخته شده است. با وجود اینکه واکسن‌های بسیار کارآمدی برای بیماری‌های ویروسی و باکتریایی ماهی تهیه شده است، اما تولید این واکسن‌ها هزینه‌بر و زمان‌بر است و احتیاج به کار آزمایشگاهی وسیعی دارد. معمولاً انتخاب زیرگونه‌هایی که مقاوم هستند و تلاقی آنها با گونه‌ای غیرمقاوم نیز زمان‌بر است و هم نتیجه غیرقابل پیش‌بینی و مأیوس کننده است چون بسیاری از صفت‌های مورد نظر، ژنی را برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا ندارد. توسط ماهیان تراریخته می‌توان جریان انتخاب طبیعی ژنتیکی، مانند صفاتی که جانور را نسبت به بیماری آسیب پذیر کرده است را تغییر داد؛ و یا ژنی را به آبزی منتقل کرد که صفت مقاومت به بیماری را در آن جانور زیاد کند. اما صفات ژنتیکی چطور می‌توانند مقاومت در مقابل عوامل عفونی مثل پاتوژن‌های (عوامل بیماری‌زا) ویروس و باکتری را انتقال دهند؟ جواب این سوال این است که بسیاری از موجودات مانند آبزیان و حشرات و مهره‌داران پیشرفته، در زمان مواجهه با عوامل بیماری‌زای عفونی پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که این پروتئین‌ها به خانواده‌ای از پلی‌پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تعلق دارند و «پپتیدهای ضدمیکروبی»[۳۹] (AMP) نامیده می‌شوند که به‌عنوان سیستم ایمنی ابتدایی در بسیاری از موجودات وجود دارند. این پپتیدها طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، ویروس‌های پوشش‌دار و سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند (Boman, 1995). با دستکاری ژنتیکی و انتقال این پلی-پپتیدها به بسیاری از آبزیانی که از نظر داشتن این پروتئین ضعیف هستند، می‌توان انتظار داشت که جانور نسبت به بیماری مقاومت پیدا کند. یکی از این پروتئین‌ها، «سیکروپین»[۴۰] است. سیکروپین اولین بار در شاپرک سکروپیا شناسایی شده است و از جمله پلی‌پپتیدهایی است که به صورت تکاملی از حشرات تا پستانداران وجود دارد. مطالعات *in vitro* و *in vivo* در آبزیان نشان داده-است که پروتئین سیکروپین B پاتوژن‌هایی مثل *Pseudomonas flourescens* ، *Aeromonas hydrophila* و *Vibrio anguillarum* را مهار می‌کند (Sarmasik et al., 2002). همین‌طور Chiou و همکاران نشان دادند که سیکروپین P1 و آنالوگ ساخته شده آن پپتید CF-17 می‌تواند ساخته شدن ویروس بافت خون‌ساز (IHNV)، ویروس بیماری سپتی سمی هموراژی (VHSV)، ویروس بیماری رابدو ویروسی (SHRV) و ویروس بیماری نکروز بافت پانکراس (IPNV) را متوقف کند. در مطالعه‌ای برای نشان دادن اهمیت این پروتئین-های ضدمیکروبی، ژن پروتئین‌های سکروپین از طریق انتقال ژن توسط اسپرم به قزل آلا انتقال داده شده و آبزی با باکتری آیروموناس و ویروس (IHNV) روبرو داده شده و با تست های RT-PCR، Real time PCR و

۳۸ Transduction

۳۹ antimicrobial peptides

۴۰ cecropin

Microarryمیزان افزایش و کاهش ژن‌های دخیل در سد دفاعی بدن ماهی اندازه‌گیری شده است. این مطالعات نشان داده‌اند که پتانسیل تولید ماهی تراریخته مقاوم به بیماری می‌تواند در افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا و افزایش تولید، نقش به‌سزایی داشته باشد (Chiou *et al.*, 2002).

بهبود رشد سوماتیکی بدن

اولین کاربرد آبزیان تراریخته، ایجاد دسته‌ای از آنها بوده است که از نظر تجاری با دریافت یک ژن توانسته‌اند میزان تولید را افزایش دهند. همان‌طورکه مشخص است در سال‌های اخیر میزان صید جهانی کاهش یافته است و با افزایش جمعیت جهان تقاضای مصرف پروتئین به‌ویژه گوشت سفید حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ افزایش یافته است. با آنکه پرورش آبزیان منجر به تولید گوشت سفید با کیفیت می‌شود، اما برای افزایش راندمان تولید می‌باید در چرخه تولید گوشت سفید از آبزیانی استفاده کرد که میزان تولید گوشت آنها در واحد زمان بالاتر باشد و اینجا استفاده از آبزیان تراریخته‌ای که صفت تولید گوشت در آنها قوت داده شده، اهمیت ویژه‌ای دارند. در این میان سه منظر در خصوصیات رشد آبزی که می‌باید در آبزی‌پروری اصلاح شود، شامل موارد پیش روست: ۱- افزایش میزان رشد اولیه بچه ماهی ۲- افزایش میزان رشد سوماتیکی در آبزی بالغ برای رسیدن به اندازه بازاری بزرگتر ۳- بهبود ضریب تبدیل غذا به گوشت ماهی برای استفاده مؤثرتر از غذا در پرورش آبزیان. در این سه منظر، افزایش رشد سوماتیکی بدن با استفاده از دستکاری هورمون رشد از دو مورد دیگر اهمیت بیشتری دارد. موارد بسیار زیادی از مطالعات نشان داده است که تیمار ماهی قزل‌آلای یک ساله (Agellon *et al.*, 1988) و صدف اویستر با هورمون رشد نوترکیب باعث بهبود رشد شده که این نتیجه نشان دهنده بهبود میزان رشد در ماهی با استفاده از دستکاری هورمون یا ژن رشد در آبزی بوده است (Paynter and Chen, 1991). مثلاً Zhu و همکاران در سال ۱۹۸۵ با استفاده از انتقال ژن هورمون رشد انسان که به پیشبر ژن متالوتیونئین متصل شده است نتیجه گرفتند که نسل حاصل F1 نسبت به خویشاوندان غیرتراریخته با هورمون رشد، میزان رشد دوبرابری را نشان داده‌اند. همچنین نتایجی در انتقال ژن هورمون رشد با منشا آبزی در تیلاپیا، کپور، قزل‌آلا، گربه ماهی، ماهی آزاد و ماهی سیم ثبت شده است. در همین راستا، نسل جدیدی از ماهی آزاد به نام ماهی آزاد «AquaAdvantage» توسط شرکت «AquaBounty Technologies» تولید شده است که به خاطر دریافت هورمون رشد ماهی آزاد چینوک که از نظر ذاتی بزرگترین ماهی آزاد می‌باشد، دارای رشد بیشتری نسبت به ماهی آزاد اقیانوس اطلس می‌باشد. این ماهی مراحل مقدماتی اخذ مجوز برای تولید و پرورش را در کشور آمریکا از سازمان غذا و داروی جهانی (FDA) دریافت کرده است.

افزایش و یا بهبود رنگ بدن آبزیان در ماهیان آکواریومی

پروتئین سبز ژله ماهی به نام پروتئین سبز فلورسنت (GFP) و واریته‌های زیادی از آن که توسط پیشبرهای بافت مخصوص عضله مثل (*mylz2*) و یا پیشبر بافت مخصوص بافت اپیتلیالی پوست (*krt8*) مهندسی شده‌اند، به منظور تغییر رنگ بدن ماهی به ویژه در ماهیان آکواریومی به کار رفته‌اند. زیرا رنگ جایگاه ویژه‌ای در بازار پسندی ماهیان آکواریومی دارد. این فناوری با استفاده از پیشبرهای مخصوص بافت به‌راحتی قابل انجام است. همچنین استفاده از ژن «هورمون جمع‌آوری ملانین» (MCH)[۴۱] که از آزاد ماهی چام گرفته شده و بعد از مهندسی ماهی مداکا در آن تولید شده است، قادر به تغییر رنگ ماهی مداکا بوده است. با استفاده از این فناوری، ماهیان آکواریومی خاصی با رنگ‌هایی مثل سبز، قرمز، بنفش یا صورتی تولید شده که متفاوت از رنگ‌های واریته‌های پروتئین سبز فلورسنس بوده‌اند. همچنین از این فناوری برای تولید ماهیانی با رنگ‌های بنفش و گلی و صورتی از رنگ بنفش شقایق دریایی و یا قارچ دریایی و جهش در برخی از اسیدآمینه‌های خاص آن برای دستیابی به رنگ‌هایی نظیر گلی و صورتی استفاده شده است (Holden, 2003, Gong *et al.*, 2002, Gong *et al.*,

۴۱ Melanin-concentrating hormone

2003, Kinoshita *et al*., 2001, Wakamatsu *et al*., 2001). معمولاً این ماهیان رنگی به صورت عقیم به بازار عرضه شده‌اند تا در صورت رها شدن در طبیعت قادر به تکثیر نباشند و زیست‌بوم طبیعی را با مشکل مواجه نکنند. فناوری تولید ماهیان تراریخته رنگی در گورخرماهی و نیز ماهی مداکا که بدنی شفاف دارند به راحتی انجام شده است. اما در سال‌های اخیر در ماهیان آکواریومی با اندازه متوسط نیز فناوری تغییر رنگ به‌طورموفقیت‌آمیز استفاده شده است. مثلاً در ماهی آنجل یا فرشته ماهی (*Pterophyllum scalare*) با استفاده از ترانسکریپت سازه حاوی «*tol2* »و سازه «*tol2*» حاوی پیشبر عضله مثل «*ckmb*» در پشت ژن گزارشگر فلورسنت قرمز (دریافت شده از مرجان‌های دریایی) و همراه با نواحی poly A که از ویروس «SV40» (Simian virus 40) گرفته شده است، دانشمندان را قادر ساخته تا فرشته ماهی صورتی خوش‌رنگ تولید کنند.

ماهی به عنوان مدل در مطالعات بیماری‌های با درمان سخت در انسان

برای انجام تحقیق روی بیماری‌های با درمان سخت در انسان مانند سرطان و بیماری‌هایی چون سکته مغزی، بیماری‌های قلبی و بیماری آلزایمر علاوه بر مدل پستاندار مثل «میمون»[۴۲] و «پستانداران نخستین»[۴۳] استفاده از گورخرماهی بسیار سودمند می‌باشد، زیراکه هفتاد درصد از ژن‌های گورخرماهی با انسان یکسان می‌باشد و نگهداری آن نسبت به موش و میمون در حجم کوچکتری قابل انجام و آسان است (Bakkers, 2011, Jing and Zon, 2011, Sager *et al*., 2010, Xi *et al*., 2011). با استفاده از ژن‌های گزارشگر رنگی و ژن‌هایی که مسؤول بروز بیماری‌هایی چون سکته مغزی و قلبی هستند، روند پیشروی بیماری و همچنین تأثیر برخی از داروها به‌راحتی قابل ردیابی خواهد بود. همچنین با استفاده از فناوری تولید ماهی تراریخته می‌توان لاین‌های گورخرماهی تراریخته‌ای تولید کرد که در آنها ژن‌های مسؤول سرطان را به صورت جهش وجود داشته باشند تا تأثیر داروهای متفاوت و مسیرهایی که در سرطان فعال می‌شوند را به راحتی بررسی و ردیابی کرد؛ و از این طریق برای درمان سرطان در انسان الگو برداری شود. هم‌اکنون مدل بیماری‌های با درمان سخت همچون آلزایمر، سرطان و سکته‌های مغزی و قلبی با ژن‌های مسؤول در این بیماری-ها در گورخرماهی تولید شده است.

ماهی تراریخته به عنوان نشانگر زیستی آلاینده‌های محیطی

بسیاری از آبزیانی می‌توانند به عنوان نشانگر زیستی طیف وسیعی از آلاینده‌ها آب مانند فلزات سنگین، هیدروکربن-های پلی‌سیکلیک و اکسیداتیوها مطرح باشند. آلاینده‌های سمی باعث ایجاد تغییرات زیستیِ قابل اندازه‌گیری می-شوند. بررسی‌های بسیاری روی اندازه‌گیری این تغییرات مانند تخریب DNA، تغییر آنزیم‌های دفاعی (گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز) و تغییر در بیان ژن‌ها توسط عوامل شیمیایی (P450) انجام شده است. بسیاری از این آبزیان که در محیط طبیعی هستند برای اندازه-گیری آلاینده‌ها کارآمد نیستند چون چندین عامل آلوده کننده تأثیرگذار است. استفاده از ژن‌های گزارشگر در گورخرماهی تحت کنترل پیشبرهایی که نشانگر برخی از آلاینده‌ها هستند و یا در بافت‌های خاصی بیان می‌شوند برای ردیابی این آلوده‌کننده‌ها بسیار کارآمد است. بسیاری از این آلاینده‌ها تأثیر تخریبی روی غدد درون‌ریز دارند و به نام عوامل «زنواستروژنی»[۴۴] یا شبه استروژنی شناخته می‌شوند. لاین‌هایی از گورخرماهی تولید شده است که نشانگر عوامل شبه استروژنی هستند و دارای ژن‌های گزارشگر GFP یا لوسیفراز هستند و به محض برخورد با عوامل شبه استروژنی تولید پروتئین‌های گزارشگر در آنها تغییر کرده و قابل ردیابی از طریق بررسی با چشم غیرمسلح یا اندازه‌گیری با استفاده از تغییرات آنزیمی می-باشند (Carvan *et al*., 2000, Schreurs *et al*., 2004).

دیگر کاربردهای آبزیان تراریخته در تحقیقات روی آبزیان

۴۲ murine
۴۳ primate
۴۴ xenoestrogen

آبزیان تراریخته به عنوان یک کارخانه تولید پروتئین یا «بیو راکتور»[۴۵] عمل می‌کنند. کاربردهای ساخت پروتئین با این روش به عنوان دارو یا مصرف مستقیم برای انسان یا حیوان است. منافع استفاده از آبزیان تراریخت به عنوان بیوراکتور این است که هزینه نگهداری آبزیان کم است و نگهداری آنها آسان است و می‌توان با امکانات بسیار حداقل میزان بسیار زیادی جنین تولید کرد. همچنین بیماری با درمان سخت که عامل آن ویروس یا پریونی باشد که بین انسان و آبزی مشترک باشد، هنوز گزارش نشده است (Qin *et al*., 2005). ساخت فاکتورهای انسانی مورد نیاز مثل فاکتور انعقادی خون انسانی، هورمون IGF-I و IGF-II از جمله برتری‌های تولید آبزیان تراریخت برای تولید دارو و فاکتورهای بیوشیمیایی مورد نیاز انسان است (Hu *et al*., 2011, Hwang *et al*., 2004, Radakovits *et al*., 2010). علاوه براین از جمله دیگر کاربری‌های آبزیان تراریخت، تولید میکروآلگ تراریخت *Nanochloropsis oculata* و زئوپلانکتون تراریخت آرتمیا می‌باشد که هورمون رشد ماهی را تولید می‌کند که از نظر زیستی فعال است (Chang *et al*., 2011).

توصیه ترویجی

از مطالعات صورت گرفته در سراسر دنیا چنین بر می‌آید که انقال ژن‌های مختلف به آبزیان منجر به نتایج مطلوبی شده است. هرچند که استفاده از موجودات تراریخته در آبزی‌پروری بحث برانگیز است، اما کوتاه‌ترین و مؤثرترین راه برای ایجاد ماهیان با ویژگی‌های خاص مانند ماهیان با رشد بالاتر، رنگ‌های خاص و مقاوم به بیماری‌ها استفاده از روش انتقال ژن می‌باشد. به‌طوریکه روش‌های اصلاح نژاد سنتی برای این اهداف بسیار زمان‌بر و پرهزینه هستند و در مسیر انتخاب یک صفت خاص، ممکن است صفات مطلوب دیگر حذف شوند. در مباحث اکولوژیکی نیز استفاده از ماهیان تراریخته حاوی ژن‌های خاص می‌تواند تشخیص دقیق‌تر از حضور برخی از آلاینده‌های محیطی را در مدت زمان کوتاه‌تری نشان دهند. همچنین استفاده از آبزیان تراریخته مسیر تولید فاکتورهای دارویی را کوتاه‌تر و کم هزینه‌تر خواهند کرد. در دهه اخیر دانش انتقال ژن در گیاهان در کشور ما بومی‌سازی شده است و امکان تهیه ماهی تراریخته نیز در مراکز تحقیقاتی وابسته به وزارت جهاد کشاورزی در مراحل انتهایی پژوهش است. بنابراین با وجود بستر مناسب، به پژوهشگران توصیه می‌شود با توجه به اولویت‌های آبزی‌پروری به جای استفاده از روش-های قدیمی، روی شناسایی و امکان انتقال ژن‌های مختلف کارکردی در آبزیان تمرکز داشته باشند.

منابع

AGELLON, L., EMERY, C., JONES, J., DAVIES, S., DINGLE, A. & CHEN, T. 1988. Growth hormone enhancement by genetically engineered rainbow trout growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 45**,** 146-151.

AMSTERDAM, A., LIN, S. & HOPKINS, N. 1995. The Aequorea victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental biology*, 171**,** 123-129.

BAKKERS, J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular research*, 91**,** 279-288.

BALLAGI-PORDANY, A., BALLAGI-PORDÁNY, A. & FUNA, K. 1991. Quantitative determination of mRNA phenotypes by the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 196**,** 89-94.

BOMAN, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of immunology*, 13**,** 61-92.

BUCKINGHAM, S. D., ESMAEILI, B., WOOD, M. & SATTELLE, D. B. 2004. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human molecular genetics*, 13**,** 275-288.

CARVAN, M. J., DALTON, T. P., STUART, G. W. & NEBERT, D. W. 2000. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution.

۴۵ bioreactor

Annals of the New York Academy of Sciences, 919**,** 133-147.

CHANG, S.-H., LEE, B.-C., CHEN, Y.-D., LEE, Y.-C. & TSAI, H.-J. 2011. Development of transgenic zooplankton Artemia as a bioreactor to produce exogenous protein. *Transgenic research,* 20**,** 1099-1111.

CHEN, T. T., KIGHT, K., LIN, C., POWERS, D., HAYAT, M., CHATAKONDI, N., RAMBOUX, A., DUNCAN, P. & DUNHAM, R. 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular marine biology and biotechnology,* 2**,** 88-95.

CHEN, T. T., LIN, C.-M., CHEN, M. J., LO, J. H., CHIOU, P. P., GONG, H.-Y., WU, J.-L., CHEN, M. H. C. & YARISH, C. 2015. Transgenic Technology in Marine Organisms. *In:* KIM, S.-K. (ed.) *Springer Handbook of Marine Biotechnology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

CHEN, T. T. & POWERS, D. A. 1990. Transgenic fish. *Trends in Biotechnology,* 8**,** 209-215.

CHIOU, P. P., KHOO, J., CHUN, C. Z. & CHEN, T. T. 2006. Transgenic Fish. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

CHIOU, P. P., LIN, C.-M., PEREZ, L. & CHEN, T. T. 2002. Effect of cecropin B and a synthetic analogue on propagation of fish viruses in vitro. *Marine biotechnology,* 4**,** 294-302.

CORE, A. B., REYNA, A. E., CONAWAY, E. A. & BRADHAM, C. A. 2012. Pantropic retroviruses as a transduction tool for sea urchin embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 109**,** 5334-5339.

FETCHO, J. R., HIGASHIJIMA, S.-I. & MCLEAN, D. L. 2008. Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain research reviews,* 57**,** 86-93.

FLETCHER, G. L. & DAVIES, P. L. 1991. Transgenic fish for aquaculture. *Genetic engineering.* Springer.

FRONHOFFS, S., TOTZKE, G., STIER, S., WERNERT, N., ROTHE, M., BRÜNING, T., KOCH, B., SACHINIDIS, A., VETTER, H. & KO, Y. 2002. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes,* 16**,** 99-110.

GONG, Z., JU, B., WANG, X., HE, J., WAN, H., SUDHA, P. M. & YAN, T. 2002. Green fluorescent protein expression in germ- line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from Keratin8. *Developmental Dynamics,* 223**,** 204-215.

GONG, Z., WAN, H., TAY, T. L., WANG, H., CHEN, M. & YAN, T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 308**,** 58-63.

HACKETT, P. 1993. The molecular biology of transgenic fish. *Biochemistry and molecular biology of fishes***,** 207-239.

HIGASHIJIMA, S.-I., HOTTA, Y. & OKAMOTO, H. 2000. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *Journal of Neuroscience,* 20**,** 206-218.

HIGASHIJIMA, S.-I., OKAMOTO, H., UENO, N., HOTTA, Y. & EGUCHI, G. 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Developmental biology,* 192**,** 289-299.

HOLDEN, C. 2003. That special glow. *a news report in Random Samples), Science,* 300**,** 1368.

HU, S.-Y., LIAO, C.-H., LIN, Y.-P., LI, Y.-H., GONG, H.-Y., LIN, G.-H., KAWAKAMI, K., YANG, T.-H. & WU, J.-L. 2011. Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors. *Transgenic research,* 20**,** 73-83.

HWANG, G., MÜLLER, F., RAHMAN, M. A., WILLIAMS, D. W., MURDOCK, P. J., PASI, K. J., GOLDSPINK, G., FARAHMAND, H. & MACLEAN, N. 2004. Fish as bioreactors: transgene expression of

SARMASIK, A., CHUN, C., JANG, I.-K., LU, J. & CHEN, T. T. 2001. Production of transgenic live-bearing fish and crustaceans with replication-defective pantropic retroviral vectors. *Marine Biotechnology,* 3**,** S177-S184.

SARMASIK, A., WARR, G. & CHEN, T. T. 2002. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Marine Biotechnology,* 4**,** 310-322.

SCHREURS, R. H., LEGLER, J., ARTOLA-GARICANO, E., SINNIGE, T. L., LANSER, P. H., SEINEN, W. & VAN DER BURG, B. 2004. In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish. *Environmental science & technology,* 38**,** 997-1002.

SHEARS, M., FLETCHER, G., HEW, C., GAUTHIER, S. & DAVIES, P. 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology,* 1**,** 58-63.

SIN, F., WALKER, S., SYMONDS, J., MUKHERJEE, U., KHOO, J. & SIN, I. 2000. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene. *Molecular reproduction and development,* 56**,** 285-288.

UZBEKOVA, S., CHYB, J., FERRIERE, F., BAILHACHE, T., PRUNET, P., ALESTROM, P. & BRETON, B. 2000. Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of Molecular Endocrinology,* 25**,** 337-350.

VICKERS, T. A., KOO, S., BENNETT, C. F., CROOKE, S. T., DEAN, N. M. & BAKER, B. F. 2003. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents A comparative analysis. *Journal of Biological Chemistry,* 278**,** 7108-7118.

WAKAMATSU, Y., PRISTYAZHNYUK, S., KINOSHITA, M., TANAKA, M. & OZATO, K. 2001. The see-through medaka: a fish model that is transparent throughout life. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 98**,** 10046-10050.

human coagulation factor VII in fish embryos. *Marine Biotechnology,* 6**,** 485-492.

JING, L. & ZON, L. I. 2011. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Disease models & mechanisms,* 4**,** 433-438.

KINOSHITA, M., MORITA, T., TOYOHARA, H., HIRATA, T., SAKAGUCHI, M., ONO, M., INOUE, K., WAKAMATSU, Y. & OZATO, K. 2001. Transgenic medaka overexpressing a melanin-concentrating hormone exhibit lightened body color but no remarkable abnormality. *Marine Biotechnology,* 3**,** 536-543.

LIN, S., GAIANO, N., CULP, P., BURNS, J. C., FRIEDMANN, T., YEE, J.-K. & HOPKINS, N. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-***,** 666-666.

LIU, Z., MOAV, B., FARAS, A., GUISE, K., KAPUSCINSKI, A. & HACKETT, P. 1990. Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Molecular and cellular biology,* 10**,** 3432-3440.

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. *Marine biotechnology,* 4**,** 328-337.

PAYNTER, K. T. & CHEN, T. T. 1991. Biological activity of biosynthetic rainbow trout growth hormone in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *The Biological Bulletin,* 181**,** 459-462.

QIN, S., JIANG, P. & TSENG, C. 2005. Transforming kelp into a marine bioreactor. *Trends in biotechnology,* 23**,** 264-268.

RADAKOVITS, R., JINKERSON, R. E., DARZINS, A. & POSEWITZ, M. C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell,* 9**,** 486-501.

SAGER, J. J., BAI, Q. & BURTON, E. A. 2010. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Structure and Function,* 214**,** 285-302.

WALKER, C., SELBY, M., ERICKSON, A., CATALDO, D., VALENSI, J.-P. & VAN NEST, G. 1992. Cationic lipids direct a viral glycoprotein into the class I major histocompatibility complex antigen-presentation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 89**,** 7915-7918.

WAN, H., HE, J., JU, B., YAN, T., LAM, T. J. & GONG, Z. 2002. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Marine Biotechnology,* 4**,** 146-154.

XI, Y., NOBLE, S. & EKKER, M. 2011. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Current neurology and neuroscience reports,* 11**,** 274-282.

ZHANG, P., HAYAT, M., JOYCE, C., GONZALEZ- VILLASEÑOR, L. I., LIN, C., DUNHAM, R. A., CHEN, T. T. & POWERS, D. A. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of PRSV- rainbow trout- GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Molecular reproduction and development,* 25**,** 3-13.

ZHU, Z., HE, L. & CHEN, S. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology,* 1**,** 31-34.

Application of gene transfer technology in aquaculture

Shirin Jamshidi[1]*, Samira Nazemroaya[2]

[1]Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Gilan Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

[2]South Iran Aquaculture Research center, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahwaz, Iran

Abstract

Aquatic transgenic organism is an organism with a foreign gene or non-coding deoxyribonucleic acid (DNA) fragment is artificially introduced and stably integrated in their genomes. Since the first report in 1985, a wide range of transgenic fish and marine bivalve mollusks and crustaceans have been produced by microinjecting or electroporating homologous or heterologous transgenes into newly fertilized or unfertilized eggs and sperm. For producing transgenic organism many factors has been included. The first and the most important factor is aquatic species for gene transfer. In species selecting for gene transfer the target of research and species preservation with a high safety conditions and facilities should be concerned. The second factor is construct of target gene should be programmed for make it and need for these studies. For example gene construct in gene transfer method should have open reading frame of gene target. Also gene construct should have regulatory factors for regulating stable or transient gene expression or affect growth and development in organism. In the third step, recombinant construct should be transfer into sperm or embryo for stable gene expression. In the end stage, individuals received target gene should be traced. in addition, application of transgenic technology for producing transgenic fish and other aquatic organisms with beneficial traits such as somatic body growth, resistance to diseases and producing useful product for human, domesticated animal, poultry and aquatic organisms have been increased by biotechnology.

Keywords: Aquatic transgenic organisms, gene transfer, construct, transgenic fish, biotechnology

*Corresponding author: s.jamshidi@abrii.ac.ir