وزارت جهاد کشاورزي

مقدمه اي بر بيوتکنولوژي
انتقال ژن در ماهي

بسم الله الرحمن الرحیم

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

بخش اول: دست کاریهاي ژني در ماهیان

مقدمه.....

1-1- به کار گیري پروموتر از ژن ماهیان.....

2-1- بیان ژن هورمون رشد ماهي در باکتري.....

3-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طریق میکروپیل با میکروپیپت.....

4-1- انتقال ژن از طریق اسپرم با انکوبه کردن آن در سیستم بافري.....

5-1- انقال ژن از طریق اسپرم با الکتروپورشن در سیستم بافري.....

6-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طریق الکتروپورش

7-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طریق میکروپیل با میکرواینجکشن.....

8-1- بررسي امکان وراثت ژن منتقل شده به نسل ها بعد.....

بخش دوم : دست کاریهاي کروموزومي در ماهیان

1-2- دست کاریهاي جنسي.....

1-1-2- دست کاریهاي جنسي با تکنیك ژینوژنز...

2-1-2- دست کاریهاي مجموعه کروزومي به وسیله تکنیك اندروژنز.....

2-2- پلوئیدي.....

1-2-2- تریپلوئیدي .....

2-2-2- تتراپلوئیدي .....

بخش سوم: کلونینگ

مقدمه.....
3-1- ایجاد کلون به وسیله دوژینوژنز متوالي..
3-2- کلون کردن به وسیله ترکیبي از اندروژنز و ژینوژنز.....
3-3- جابجایي هسته.....
3-4- جابجایي سلولهاي سوماتیك جنیني به جنین دیگر
3-5- دورگه گیري.....
4- منابع.....

بخش اول: دست کاریهاي ژني در ماهیان

مقدمه:

یکي از زمینه هاي که امروزه بیوتکنولوژیست ها روي آن تحقیق مي کنند ایجاد گونه هاي ترانسژنیك است. طبق تعریف ترانسژنیك موجودي است که، داراي DNA نو ترکیبي باشد. به طوري که در ژنوم آن مو جود ژن نو ترکیب بیان مي شود. بیان ژن خارجي یکي از جنبه هاي تولید ترانسژنیك و انتقال DNA به زاده هاي هدف بعدي مي باشد. در این زمینه تکنیك میکروایجکش در انتقال ژن به تخم مهره داران اولین بار به وسیله گوردون (Gordon) و همکاران در سال 1980 گزارش شد. در این تکنیك یك لوله مؤئین شیشه اي را براي وارد کردن DNA نو ترکیب به پیش هسته نریا با سیتوپلاسم تخم لقاح یافته موش به کار گرفتند. در همین سال میکروانجکش مستقیم DNA نو ترکیب در شرایط آزمایشگاهي جهت ایجاد حیوانات ترانسژنیك مورد استفاده قرار گرفته است. طوري که ژن را از این طریق وارد تخم هاي لقاح نیافته یا لقاح یافته موجوداتي نظیر جنین توتیاي دریایي، موش، قورباغه، مگس سرکه، خرگوش و خوك کرده اند (Brem 1988) در سال 1985 زئو (Zhu) و همکاران ژني شامل پرتومتالوتیونین موش و ژن هورمون رشد انساني را به ناحیه مرکزي صفحه زایاي تخم هاي لقاح یافته ماهي طلایي تزریق کردند و قسمتي از این ژن را در DNA ماهیان مشاهده کرند. در همین سال روکونس (Rokkones) تکنیك میکروایجکشن دو مرحله اي بر روي

تخم آزاد ماهيان را شرح داده است. در اين تكنيك ابتدا به كمك يك وسيله نوك تيز فلزي در قطب حيواني سوراخي ايجاد شده و از طريق اين سوراخ محلول حاوي DNA نو تركيب به كمك پي پت ريز تخم شدند به طوري كه به كيسه زرده وارد نشوند. پس از 14 روز پلاسميدهاي كامل را مشخص كردند. چوروت (Chourrout) و همكاران در سال 1986 روش فوق را بر روي قزل آلاي قهوه اي رنگ به كار برند با توجه به وجود DNA خارجي همراه با ملكولهاي DNA ميزبان پيشنهاد شده كه اين ژن به داخل ژنوم ماهي وارد شده است. محققان به ورش دستي يا از طريق هضم آنزيمي از جمله با تريپسن كوريون را برداشته و تزريق ميكرواينجكشن انجام دادند. در همين سال اوزاتا (Ozata) ماهي كوچك مدوكا را به عنوان مدلي براي ترانسژنيك مطرح كرد. او پلاسميدهاي حاوي ژن كريستالين جوجه را به هسته تخم ها از طريق ميكرواينجكشن وارد كرد. به علت كوريون سفت در تخم لقاح يافته تعدادي از ماهيان استفاده از ميكرواينجكشن مشكل و مستلزم اتلاف وقت زيادي است. به همين منظور روشهايي جهت غلبه بر اين مشكل به كار گرفته شده است. از جمله در سال 1988 بريم (Brem) و همكاران ژن هورمون رشد انسان را به كمك وكتور مناسب از طريق ميكروپيل به صفحه زاياي تخم هاي تيلاپيا تزريق كردند و رشد بچه ماهيان طي 90 روز بررسي شد. مشابه اين تحقيق توسط فلت چر (Fletcher) و همكاران در همين سال بر روي ماهي آزاد

اتلانتيك انجام شد. همچنين تكنيكهاي ديگر شامل الكتروپورشن (Electroporation) شليك ذرات ژن Shatagun بر روي تخمك و طراحي ليپوزوم جهت ورود به زرده تخم انجام شده است. ميكر واينجكشن نياز به مهارت زيادي دارد و از طرفي سرعت آن كم و هزينه و تجهيزات آن زياد است و مستلزم زحمات و زمان زيادي براي ايجاد تعداد زيادي از ماهيان ترانسژنيك است علاوه بر اين از ديگر مشكلات آن اين است كه در تخم هاي القاح يافته اغلب ماهيان هسته به وسيله ميكرسكوپ قابل روئيت نيست بنابراين DNA را به سيتو پلاسم تزريق مي كنند.

در مجموعه تحقيقات انجام شده، ميزان باقي ماندگي جنين هايي كه مورد تزريق قرار گرفته اند بين 50 تا 80 درصد گزارش شده است. و كارآيي ميزان بيان ژن بين 3 تا 70 درصد بوده است. باقي ماندگي جنين ها و كارايي بيان ژن وابسته به فاكتورهايي نظير سيستم بافري، غلظت DNA و روش هاي مورد استفاده در تزريق مي باشد. لذا در مراحل بعدي غلبه بر اين مشكلات مورد توجه قرار گرفت به طوري كه ضمن ساده كردن تكنك و كم كردن هزينه ها كارآيي را افزايش مي دهند تا در عمل بتوان در تكنولوژي تكثير و پرورش آبزيان تعداد زيادي از ماهيان ترانسژنيك را ايجاد كرد. بنابراين روش استفاده از اسپرم جهت انتقال ژن مطرح شد. اگر چه مفهوم بكارگيري اسپرم به عنوان يك ناقل مسئله جديدي نيست بلكه در سال 1971 براكت (Brackett) با وارد كردن ژن خارجي به

اسپرم خرگوش و در سال 1987 فریمن (Fareeman) بر روي ماکیان این تحقیق را انجام داده اند و در سال 1989 لویترانو (Lavitrano) این تکنیك را بر روي موش به کار گرفته است. در سال 1992 کهو (Khoo) تکنیك استفاده از اسپرم به عنوان ناقل را جهت وارد کردن ژنهاي جدید به ماهي زبر به کار گرفت. همچنین در سال 1993 ایکسي (Xie) و همکاران جزئیات انتقال ژن از طریق اسپرم به کمك التروپورشن (Electroporation) بر روي ماهیان لوچ (Loach) و کاراس (Crucian) را شرح داده اند. در همان سال (سین) Sin و همکاران انتقال ژن به ماهي چنوك (Chinook) را با همین تکنیك شرح دادند. در این نوشتار جزئیات دستکاریهاي ژني در ماهیان با ذکر مثالهایي بررسي شده است.

1-1- به کار گیري پروموتر از ژن ماهیان

گزارشهاي اندکي در ارتباط با تحقیقات به کارگیري پروموتر از ماهي در دسترس است. در ماهي قزل آلاي رنگین کمان دو فرم مشابه از ژنهاي متالوتیونین بنام B,A وجود دارد. اگر چه پروموترژن B قادر به بیان ژن گزارشگر در محیطهاي کشت سلولي است. ولي درباره این ویژگي پروموترژن B در سلولهاي ماهي اطلاعات کمي وجود دارد. به منظور طراحي و کتورهاي مناسب براي ما هي و مطالعه تنظیم بیان ژن در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهي پروموترن ژن B متالوتیونین ماهي قزل آلا جدا شد. پس از PCR نقش آن در بیان ژن در لاینهاي سلولي انسان و ماهي توسط هونگ (Hong) به کار گرفته شد. به همین منظور وکتور

بنام PtMTb – CAT که داراي 4/6 کیلوباز است طراحي گردید. حدود 261 جفت باز وکتور مربوط به پروموترژن B متالتیونین قزل آلاي رنگین کمان (tMTb) کیلو باز آن ژن کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) و سیگنال پلي ادنیلاسیون ویروس SV40 و همچنین 2/7 کیلو باز آن قطعه اي مربوط به پلاسمید PUC_{18} بوده است همچنین طراحي آن بر پایه ساختمان pBL – CAT تکمیل شده بود. به طوري که طراحي BL پرایمري داراي سکانس اولیگونکلئوتیدي بر اساس ردیف نکلئوتیدهاي سمت 5 از 250 تا 221 ژن MTb ماهي قزل آلا بوده و داراي محل ویژه اي جهت برش توسط آنزیم EcoRI بوده است. همچنین در ساختمان پلاسمید – ptMTb CAT قطعه 261 جفت بازي پروموتر tMTb در جلوي ژن CAT در ساختمان pBL- CAT قرار گرفته است. در کنار این چهار وکتور دیگر طراحي گردید، که شامل $pBL\text{-}CAT_2\text{-}1$ که در آن پروموتر تیمیدین کیناز (TK) ویروسي در بالا دست ژن CAT قرار داده شده بود. $pBL\text{-}CAT_3\text{-}2$ بر اساس $pBL\text{-}CAT_2$ که در آن پروموتر TK برداشته بود طراحي شد $pTK\text{-}CAT_2E\text{-}3$ که در پلاسیمید $PBL\text{-}CAT_2$ تعداد 72 جفت باز تکراري از اینهنسر SV40(Enhancer) به صورت دوبل به ابتداي ژن CAT اضافه شده بود. PhMT IIA-4 که تعداد 850 جفت باز داراي محل ویژه برش Hind III/NcoI از پروموتر آن متالوتیونین II_A انساني (Hmt_{IIA}) به ژنCAT در ساختمان

pBL-CAT$_3$ اضافه شده بود اين وكتورها به روي 4 لاين سلولي ماهي و يك لاين انسانی به كار گرفته شدند. طوري كه در آن سلولها با ميزان 3/5 پيكومولار از DNA پلاسميد آلوده شدند جزئيات نتايج در جدول شماره يك آمده است.

جدول 1- سنجش فعاليت پروموتر در يك لاين سلولي انسان و چهار لاين سلولي ماهي

Constructs	Cell lines				
	HepG2	RTH	EPC	A2	PSM
pBL – CAT3	0.13[b]	1.16	0.27	0.52	0.43
pBL – CAT2	1.00	3.14	3.67	n.b.[c]	n.b.[c]
pTK-CAT2E	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ptMTb CAT	0.10	1.40	0.5	0.74	0.55
+zinc	0.33	39.11	10.95	4.53	0.43
	(3.30)	(27.94)	(21.9)	(6.16)	(0)
+cadmium	0.11	7.18	1.02	11.62	0.40
	(1.10)	(5.13)	(2.04)	(15.80)	(0)
phMTII$_A$CAT	1.21	14.11	3.68	3.71	0.96
+zine	72.56	480.69	139.00	99.28	13.26
	(69.20)	(34.07)+	(37.77)	(26.64)	(13.84)
+cadmium	13.90	227.48	106.67	98.12	5.66
	(11.50)	(16.12)	(29.00)	(26.33)	(5.91)

EPC (Carp epithelioma Papulosum) , PTH (Rainbaw trout hepatoma) Hep (Human hepatoblastoma) , PSM (Xiphophorus interspecific melanoma) , A$_2$ (xiphophorus xiphidium emryonal epitheloid)

جهت بررسي اثرالقاء فلزات بر روي ژن، لاين هاي سلولي ماهي آلوده با پلاسميد ptMTb- phMTII$_A$ – CAT , CAT براي مدت 48 ساعت قبل از برداشت، تحت اثر $ZnCl_2$ يا $CdCl_2$ قرار داده شدند. سنجش CAT بر طبق روش فريدين ريچ (Friedenreich) در سال 1990 انجام شده كه در آن فعاليت پروموتر به وسيله درصد تبديل CAT با مقايسه استيل كلرامفنيل (3-Ac) و كلرامفتيكل (Cm) به شرح زير تعيين شد.

$$\%CAT = \frac{3\text{-}AcCm}{(3\text{-}AcCm+Cm)}$$

پروموتر tMTb در تمام لاين هاي سلولي به جز لاين سلولي PSM فعال بوده است. بنابراين القاء ناشي از فلزات بر روي پروموتر tMTb بستگي به منشاء سلولها و نوع آنها دارد علاوه بر اين در بين چهارلاين سلولي بيشترين القاء در فعاليت پروموتر در لاين سلولي RTH بوده است و لاينهاي EPC , A_2 در مراتب بعد قرار داشتند. اين نتايج در كنار اين حقيقت كه در مهره داران سنتز عمده متالوتيونين در كبد اتفاق ميافتد نشانگر اين است كه، اين تكنيك ميتواند روشي براي ابزار ژن متاتيونين در ساير انواع سلولها باشد. همچنين پلاسميد p tMTb= CAT را به سيتوپلاسم يكي از دو سلول مرحله جنيني ماهي مدوكا از طريق ميكروانجكش تزريق كردند و مشاهده شد كه ژن CAT در تعداد محدودي از جنين ها براز شده است. تحقيقات هونگ و همكاران نشان داد كه، پروموتر ماهي در سلولهاي ماهي كارايي بيشتري از ساير سلولها نظير انسان داشته استم. محدوديتهاي

زيادي در استفاده از پروموترهاي چند گانه غير متجانس (Heterologous) براي مطالعات ابزار ژن در شرايط زيستي و آزمايشگاهي در زمينه توليد ماهيان ترانسژنيك وجود دارد. با توجه به اينكه پروموتر tMTb نقش غير محسوسي در بيان ذاتي ژن داشته است طوري كه تحت اثر فلزات سنگين القاء شده و سبب ابزار ژن گزارشگر مي شود. اين پروموتر، براي ايجاد ماهيان ترانسژنيك با ژن ساختماني شناخته شده و فهم عمل ژنهاي جديد مناسب است.

2-1- بيان ژن هورمون رشد ماهي در باكتريچ

هورمون رشد يك پلي پپتيد تك زنجيره است كه به وسيله هيپوفيز پيشين توليد و ترشح مي شود. در مهره داران اولين نقش هورمون رشد افزايش رشد سوماتيكي است علاوه بر اين ماهيان استخواني اين هورمون در تنظيم شرايط اسمزي و تعادل الكتروليتي بدن و چندين عمل متابوليكي ديگر نقش دارد. ساختار ژن هورمون رشد و بيان آن، از مدلهاي مهم براي مطالعه رابطه سا ختمان و عمل پروتئين و تنظيم بيان ژن است، طي تحقيقي كه سال 1993 توسط سونگ (Song) و همكارانش انجام شد جداسازي ژن هورمون رشد و توليد پلي پپتيد آن به ميزان بسيار زياد در ميكروارگانيسم ها بررسي شد. در سالهاي اخير در بسياري از ماهيان اين ژن از طريق cDNA كلون شده است. از جمله در يكي از فعاليتهاي تحقيقاتي ژن هورمون رشد ماهي آزاد چنوك (Chinook salmon) از اين طريق جدا و به باكتري اشيرشياكلي تزريق شده است

(Song 1993) در اين تكنيك ابتدا cDNA هورمون رشد و جدا و كلون شد. 1/2 cDNA كيلو جفت باز بوده و در ساختار $pSGH_4$ طراحي شد. سپس دو تا پروب اليگونكلئوتيدي و پرايمر براي آن ساخته شد.

طراحي پروبها و پرايمرها بر اساس رديف اسيدهاي امينه به روش باندهاي فسفر دي استري روي فاز جامد انجام گرفت. پروب A بر اساس رديف رزيدوهاي 7-1 و پرب B بر اساس رزيدوهاي 172-166 طراحي شدند و به وسيله الكتروفورز روي ژل اكريل آميد خالص گرديدند. همچنين طراحي پرايمرهاي 1و2 بر اساس الگوي cDNA انجام شد. سپس آمپلي فيكاسيون ژن هورمون رشد به وسيلهPCR انجام و محصولات PCR به وسيله الكتروفورز روي ژل آگاروز چك و با اتانل رسوب داده شدند و در قدم بعدي پلاسميد لازم براي بيان ژن طراحي گرديد. و ژن مديفاي شده cDNA هورمون رشد به وسيه آنزيمهاي برش دهنده Bam HI , Eco RI برش به ناقل پلاسميدي كه آن هم به وسيله همين آنزيمها برش شده بود منتقل شد.

سپس پلاسميد طراحي شده به باكتري Ecoli JM105 وارد گريدند نو تركيب به وسيله پروب نشانه گذاري شده A مشخص شدند. كلونهاي كه ژن به آنها وارد شده بود. به نام pmAK5 ناميده شدند. اگر چه جهت تأئيد بيشتر مجدد اين كلونها تحت اثر آنزيمهاي برش دهنده قرار داده شدند و با پروب نشانه B هيربد شدند. سپس اشيرشيا كولي هاي Ecoli K12 – JM105 حاوي پلاسميد pmAK5 كه داراي ژن هورمون رشد بودند در

محيط كشت YT كلون شدند. پس از انكوباسيون باكتريها با ايزوپروپيل دي تيوگالاكتو پيرانوزيد (IPTG) براي مدت 4 ساعت در دماي 37 درجه، سلولها جدا و در بافر لايملي (Laemmli 1971) حل و با SDS-PAGE و كماسي بررسي شدند. نتايج نشان داد كه به طور تخمين ميزان 10-6 درصد از مجموع تمام پروتئين سلولي در اشيرشياكولي مربوط به ژن هومون رشد بوده است.

3-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طريق ميكروپيل با ميكروپيپت

در سال 1998 بريم و همكاران در تحيقيقي ژن هورمون رشد انسان را از طريق ميكروپيل به صفحه زاياي ماهيان تيلاپيا انتقال دادند رشد ماهيان طي 90 روز بررسي شد. جهت تكثير، تعداد 4 يا 5 ماهي ماده را در كنار يك ماهي نر قرار دادند به طوريكه در شرايط آزمايشگاهي تخمك گذاري ماهيان ماده انجام و با اسپرم لقاح شدند. تخم هاي لقاح يافته 10 دقيه پس از تخمك گذاري در شرايط مصنوعي برداشته شدند. تمام تخم ها به انكو باتورهاي ويژه با جريان آب و دماي $27^{\circ}C$ منتقل شدند و تا زمان دست كاري نگهداري گرديدند. تزريق به تخم ها در زمانهاي 10 دقيقه و 24-21 و 43-40 ساعت پس از تخمك گذاري انجام شد. ساختار پلاسميدي كه در انتقال ژن به تيلاپيا به كار گرفته شد بنام pXGH -1 در تصوير 4 نشان شده است. اين پلاسميد داراي 9/31

کیلوباز شامل 2/35 کیلو باز از قطعه اي از BPV-1 که داراي دو محل ویژه برش توسط آنزیمهاي EcoRI , Bam H1 مي باشد. تصویر 4- ساختمان پلاسمید pXGH-1 و جایگاههاي مورد شناسایي آنزیمهاي برش دهنده از طرف دیگر 2/46 کیلو باز آن از قطعه اي از پلاسمید pBR322 و 4 کیلو باز آن که داراي دو محل ویژه برش توسط Eco RI در دو انتهاي خود مي باشد مربوط به پروموترمتالوتیونین موش mMTI و ژن هورمون رشد انسان hGH که به آن متصل کرده اند بوده است. اگر چه از این مقدار 1/8 کیلو باز آن مربوط به پروموترژن متالوتیونین موش و 1/7 کیلو باز آن مربوط به ژن ساختماني هورمون رشد انسان بوده است. در ژن هورمون رشد نواحي اگزون و انترون و ترتیبات غیر قابل ترجه در 5′,3′ طراحي شده بود همچنین در سمت 3′ ژن هورمون رشد انسان قطعه اي به اندازه 0/5 کیلو از فاژ λgt1 lwes طراحي شده که داراي محلهاي ویژه اي جهت برش توسط آنزیمهاي برش دهنده بوده است. علاوه بر این براي قطعه اي از ژن hGH که در اثر برش توسط دو آنزیم Bg1 II , Pvn II ایجاد مي شود پروب طراحي شده بود تزریق در یك پتري دیش پر از آب به کمك استریومیکروسکوپ (Wild M8) و دو پیپت انجام شد. تخم ها به کمك یك میکروپیپت نگهدارنده که سر آن به شکل فنجان طراحي شده بود مکش و تثبیت و از حرکت آنها به طرفین جلوگیري شد. سپس به کمك میکروپیپت دوم به قطر 5 میکرومتر محلول حاوي DNA از طریق میکروپیل به صفحه زایاي تخم ها تزریق شد.

مقدار تقريبي 10^6 كپي از DNA به كمك فشار هوا به هر تخم تزريق شده است. جزئيات تزريق و هچ تا مرحله 90 روز در جدول شماره 2 ذكر شده است.

جدول 2- تعداد تخمهاي مورد تزريق، هچ شده و ماهيان پس از 90 روز

Time of injection (after spawning)	Injected	Hatched	Hatching rate of in Jected eggs (controls)	Number of in Jected fish (n) Surviving to 90 Days of age (n)
10 min	30	20	66%	5(25%)
21-24 h	45	35	77%	18(51%)
40-43 h	50	45	90%	44(98%)
	125	100	(75%)	67(67%)

در پايان 90روز از تعداد 18 ماهي باقي مانده از تخم هايي كه در فاصله زماني 24-20 ساعت پس از تخم ريزي مورد تزريق قرار گرفته بودند فقط 3 تا از ماهيان سكانس ژن هورمون رشد را دارا بودند. يك قطعه از 44 ماهي باقي مانده از تخم هايي كه در فاصله زماني 43-40 ساعت پس از تخم ريزي مورد تزريق قرار داده شده بودند، ترانسژنيك شده و سكانس ژن را داشته است. تيلاپيا از جمله ماهياني است كه داراي كوريون سفت مي باشد. به طوري كه نمي توان كوريون آن را به راحتي با ميكروپيپت سوراخ كرد بنابراين نياز به دستكاريهاي ديگر مي باشد. ساده ترين و ضروري ترين راه غلبه برسد كوريون، تزريق از راه ميكروپيل است كه اين خود مستلزم نگهداري و تثبيت تخم مي باشد. تخم را بايد تا زماني در زير استريوميكروسكوپ چرخاند تا ميكروپيل

آن قابل روئیت شود. گاهي در يك آزمايش چندين تكرار لازم است تا ميكروپيپت از راه مركز ميكروپيل وارد شود. اگر چه در اين تحقيق كه مورد دستكاري قرار داده شده اند در مقايسه با شاهد يكسان بوده است.

4-1- انتقال ژن از طريق اسپرم با انكوبه كردن آن در سيستم بافري

كهو (khoo) و همكاران در سال 1992 گزارشي در خصوص ورود ژن خارجي از طريق اسپرماهي زبرا و بررسي اينكه آيا اين ژن به نسل هاي بعد منتقل مي شود ارائه كردند. در اين تحقيق اسپرم را از ماهيان بالغ به دست آودره و آن را در محلول حاوي پلاسميد نو تركيب كه داراي ژن گزارشگر مورد علاقه بود انكوبه كردند. سپس اين اسپرم براي لقاح تخمكهاي ماده مورد استفاده قرار داده شد. جنين هايي به دست آمده حاصل از لقاح اسپرم حاوي ژن خارجي و تخمك تا مرحله بلوغ مراقبت شدند همچنين ژنوميك DNA آنها استخراج و بررسي حضور ژن خارجي منتقل شده با تكنيك ساترن بلوت انجام شد ژن گزارشگر مورد علاقه در اين تحقيق مشابه پلاسميد استفاده شده توسط جونگ (Chong) در سال 1989 پلاسميد pUSV – CAT بوده است. ساختمان اين پلاسميد در تصوير5 ديده مي شود ژن گزارشگر كرامفنتيل استيل ترانسفراز (CAT) انتخاب شد. زيرا محصول اين ژن به سرعت و به سادگي مورد آزمايش قرار مي گيرد و علاوه بر اين آنزيمي مشابه اين در سيستم آنزيمي يوكاريوتها وجود

ندارد. پلاسميد PUSV – CAT داراي ترتيبات تكراري براي اتمام از ويروس روزساكروما Rous sarcoma و پروموتر ويروس SV40 در شروع بوده است. مزيت استفاده از ماهيان زبرا جهت اين آزمايشات به دليل دوره كوتاه ايجاد نسل در آنها مي باشد. به طوريكه تخم ها در عرض 3 تا 4 روز هچ مي شوند و در فاصله زماني 3 تا 4 ماه ماهيان بالغ مي گردند. همچنين توليد ماهيان و نگهداري و مراقبت از لارو آنها در شرايط آزمايشگاهي امكان پذير است. لقاح تخمك هاي ماهي زبرا با سلولهاي اسپرم كه در معرض پلاسميد نوتركيب قرار گرفته بودند انجام شد. جهت دست آوردن اسپرم نرهاي بالغ به اندازه 4-3 سانتي متر و سن 4-3 ماه را تشريح كردند. سپس بيضه ها را جدا كرده و در 100 ميكروليتر بافر PBS قرار دادند. آنگاه آنها را در يك كاغذ پارافين قرار داده و به آرامي خرد كردند. سوسپانسيون هموژن تهيه شده از بيضه هاي را به اپندروفهاي 1/5 ميلي ليتري منتقل كردند. تكه هاي بافتي به وسيله سانتريفوژ با دور 800g براي مدت يك دقيقه، در دماي اطاق جدا كردند. سپس محلول رويي را به اپندروفهاي استريل ديگر منتقل كردند. به محلول رويي حاوي اسپرم 900 ميكروليتر از بافر PBS اضافه نمودند. در ادامه پس آنها را به مدت 3 دقيقه با دور 4000 سانتريفوژ كرده و محلول رويي را مجدداً جدا نمودند. اين فرآيند را دو مرحله تكرار كردند. پس از شستشوي نهايي اسپرمها را در سپانسيون 25 ميكروليتري از

بافر قرار دادند. به این سوسپانسیون آماده پلاسمید pUSV-CAT که به فرمهاي خطي و حلقوي بود اضافه شد. پس از مخلوط کردن براي این مدت 30 تا 40 دقیقه در دماي 22 درجه سانتي گراد انکوبه گردیدند. سپس تخمکهاي رسیده را از ماهیان ماده به دست آورده، در یك پتري دیش به دو قسمت مساوي تقسیم کردند، یك قسمت به آرامي با 25 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوي اسپرم که با یلاسمیدانکوبه شده بود و نصف دیگر آن را با اسپرم شاهد که تحت تیمارپلاسمید قرار نگرفته بود لقاح دادند. به کمك نمونه برداري از لاروها خا در سن یك هفتگي و برش باله سینه اي از ماهیان بالغ DNA استخراج و بررسي به روش ساترن بلوتینگ روي DNA با کلرامفنیل نشانه دار به عنوان سربستر انکو به شود فرم استیله شده آن تولید خواهد شد که پس از جدا سازي بوسیله کروماتوگرافي قابل تشخیص است. نتایج نشان داد که، پلاسمید حاوي ژن گزارشگر CAT در ماهیان و زاده هاي نسل بعد آن ظاهر مي شود. سنجش آنزیمي CAT روي ماهیان و زاده ها نشانگر عدم ابرازژن به پلي پیتید بوده است. از طرف دیگر استیورات (Stuort) و همکاران در سال 1990 روش میکرواینجکشن را با همین پلاسمید بر روي همین گونه ماهي به کار گرفتند در این تحقیق ابرازژن به پلي پییتید صورت گرفت بنابراین عدم بیان ژن به علت خصوصیات ذاتي ماهیان یا عدم شرکت پروموتریلاسمید در رونویسي نمي باشد، اغلب باشد ممکن است ژني که با استفاده از ناقل

اسپرم وارد مي شود تغيير كرده و ترتيب جديدي پيدا نمايد به طوري كه ژن بيان نشود. اين اختلاف در ابرازژن وابسته به دقايقي است كه در مقدمه ژن خارجي (پروماتور) صورت مي گ يرد در ميكرواينجكشن استيورات، DNA پلاسميد در مرحله ميتوز به ميزبان معرفي شده است. تعداد ديگر از محققان با به كارگيري پلاسميدها و كار روي ساير ماهيان نيز عدم بيان ژن را گزارش كرده اند. يكي از دلايل عدم بيان ژن ناشي از اين است كه، پروموترو اينهنسر مورد استفاده در ماهي به عنوان نواحي شروع شناخته نمي شوند. به نظر نمي رسد كه شكل خطي بودن يا حلقوي بودن DNA براي انتقال آميز ژن در ماهي تأثيري داشته باشد بلكه هر دو شكل DNA اثرات مشابهي از خود نشان مي دهند.

تصوير 5- دياگرام پلاسميد pUSV-CAT در آن قطعه RSV LTR , CAT و نواحي پروموتر و اينهسنر SV40 نشان داده شده است جايگاه برش توسط آنزيمهاي برش دهنده شامل (Kpn I) K , (Ps II) P , (Sal I)S مي با شد در اثر برش توسط آنزيم Ps II دو قطعه 4/63 و 3/24 كيلو جفت بازي ايجاد مي شود.

5-1- انتقال ژن از طريق اسپرم با الكتروپورشن در سيستم بافري

در سال 1993 سين (Sin) و همكاران انتقال ژن به ماهي آزاد چنوك را از طريق اسپرم به كمك الكتروپورشن انجام دادند. براي اين منظور از پلاسميد pRSV-LacZ استفاده كردند (تصوير 6) اين

پلاسميد آن LacZ و ناحيه اتمام RSV (Rous sarcama virus) و قطعه اي از ژن SV40 و دو ناحيه برش توسط آنزيمهاي Pst I , Hind III داشته است. سلولهاي اسپرم جهت الكتروپورشن در شرايط دماي سرد ناشي از آب يخ در طي آزمايش نگهداري شند. حدود نيم ميلي ليتر اسپرم با نيم ميلي ليتر از باز HEPES حاوي 10 ميكروگرم پلاسميد مخلوط كرده و آنها را در معرض پالس ميدان الكتريكي با قدرت هاي متفاوت قرار دادن جزيئات نتايج در جدول شماره 3 بيان شده است.

نتايج نشان داد، كه در قدرت ميدان 625 ولت بر سانتي متر و پالس 18/6 ميلي ثانيه است نسبت ماهياني كه پلاسميد را دريافت داشتند 2 به 20 بوده است. همچنين در قدرت ميدان 1150 و پالس 18/6 اين نسبت 1 به 20 بوده است. اگر اسپرم داراي تحريك پذيري (Motility) باشد خواهد توانست غشاء سيتوپلاسمي تخمك ارتباط برقرار كرده و به آن نفوذ نمايد. بنابراين سنجش تحريك پذيري اسپرم شاخص مناسبي جهت تشخيص توانايي آن در لقاح است. اين تحريك پذيري ممكن است تحت تأثير رقيق كننده ها قرار گيرد. بيلارد (Billard) در سال 1993 نشان داد كه، رقيق كردن اسپرمها به نسبت به 1 به 100 براي داشتن 100 درصد اسپرم با تحريك پذيري مناسب جهت القاح لازم مي باشد. با اين وجود رقت انجام شده در اين تحقيق به نسبت 1 به 1 شايد تخمين مناسبي نبوده است. از طرف ديگر موقعي كه ميدان قوي تر يا پالس طولاني تر شود

تحريك پذيري اسپرم كاهش مي يابد. عين همين مسئله در زمينه الكتروپورشن روي كشت هاي سلولي گزارش شده است. همچنين قدرت يوني بافر هم روي توانايي زيست اسپرم مؤثر است. در اين تحقيق اختلاف معني داري بين ميزان بافي ماندگي تخم هايي كه تحت اثر ميدان الكتريكي و پالس هاي مختلف قرار گرفته بودند با تخم هايي كه تحت سيستم بافري بدون پالس قرار داده شدند مشاهده نشده است. بلكه از نظر باقي ماندگي مشابه بوده اند. همچنين رشد جنيني در تخم هايي كه تحت تميار بافري قرار داده نشدند با تخم هايي كه تحت تميار بافري قرار گرفته بودند و تخم هايي كه تحت الكتروپورشن بوند يكسان بوده است. اختلافي كه در نتايج الكتروپورشن با اسپرم گون هاي مختلف است. كارايي ميزان ورود پلاسميد به سلول گيرنده در الكتروپورشن به نوع سلول پارامترهاي مختلف ديگري بستگي دارد. سين و همكاران گزارش كردند كه ، در خصوص ورود يا عدم ورود DNA پلاسميد به ميزبان اطلاعي ندارند اگر چه باندي از DNA پلاسميد با DNA ميزبان را مشاهده كرند. ولي در عين حال باندهايي از DNA با وزن ملوكولي كم را هم مشاهده كردند. نظير اين پديده روي ماهي لوچن توسط كوزلو (Kozlov) در سال 1989 گزارش شده است. علاوه بر اين در ماهي قزل آلاي 6 تا 12 ماه پلاسميد خارج كروموزومي گزارش شده است. اگر چه كهو در سال 1992 از پلاسميد خطي و حلقوي استفاده كرد و گزارش كرد كه هر دوي اينها خارج

کروزومي هستند جانگ (Chong) در سال 1989 DNA پلاسميدهاي خطي و سوپر كويل را به تخم هاي لقاح يافته مدوكا تزريق كرد و مشاهده كرد كه DNA پلاسميد خطي پس از 5 دقيقه به صورت به هم پيوسته مي شود. از طرف ديگر زماني كه DNA سوپر كويل را تزريق كرد مشاهده كرد DNA پلاسميدي در سه فرم سوپر كويل و حلقوي با يك شكست و واحدهاي متعدد حلقوي وجود دارد.

جدول شماره 3- اثرات الكتروپورشن بر اسپرم با DNA منتقل شده

Field strength (V/cm)	Pulse length (ms)	Proportion of fish Carrying RSV- lacZ
0	0	0/40
250	7.7	0/20
	18.6	0/20
625	7.7	0/20
	18.6	2/20
1150	7.7	0/20
	18.6	1/20

6-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طريق الكتروپورشن

در سال 1993 ايكسي (Xie) و همكاران انتقال ژن به تخم ماهي را با الكتروپورشن انجام دادند. براي اين منظور از پلاسميد pMhGH جهت انتقال ژن استفاده شد. اين پلاسميد داراي قطعه اي شامل 1500 جفت باز از ژن هورمون رشد بوده، كه در آن سه انترون آخري از چهار انتروژن هورمون برداشته شده

بود. DNA خطي به وسيله آنزيم برش دهنده Hind III مورد برش قرار داده شد. سپس قبل از استفاده در الكتروپورشن به وسيله فنل و كلروفرم خاصل شد. هر دو DNA خطي و حلقوي در بافر 1×TAE شامل 2 ميلي مول EDNA ، 90 ميلي مول $Tris - CH_3COOH$ با غلظت هاي 100 ميكرو مول حل شند. سيستم الكتروپورشن انتقال شامل پاوسوپلاي (E، 500 ولت برق DC) خازن متغيير (C، 0/042 ، 0/07 ، 22، 150 ، ميكروفاراد)، مقاومت (R_1 ، 1-0 كيلواهم) و مقاومت (R_2 ، 20 ، 180 ، 500 ، 1000 اهم) و كليدهاي K_1 , K_2 , K_3 و محفظه نمونه (S) بوده است. محفظه نمونه يك جعبه پلاستيكي به ابعاد 2 سانتي متر طول، 0/5 سانتي متر عرض و عمق طراحي شده بود. الكترودها سيم هاي پلاتينيم به اندازه 5 ميلي متر بوده است. الكترودها در كنار جعبه پلاستيكي در طول 2 سانتي متر قرار داده شدند. در اين آزمايشگاه از ماهي لوچ Misgumus anguillicaudatus و ماهي كاراس Carasius aurotus استفاده شد. مولدين اين ماهيان تحت تيمار هورموني قرار گرفتند و لقاح انجام شد. تخمهاي لقاح يافته به روش مشابه روش زئو (Zhu) در سال 1996 برداشته شد. سپس تخمهاي فاقد كوريون را در محلول محفظه كه حاوي پلاسميد و ژن بيگانه طراحي شده در آن بود، قرار دادند و پالس الكتريكي برقرار شد. طول مدت و ولتاژ پالس متغيير بود. سپس تخمهايي كه تحت تأثير الكتروپورشن قرار داده شدند با دقت به پتري حاوي محلول تازه Holtfreter با تراكم كم انتقال داده

شدند. در طي آزمايشان جنين هاي غير طبيعي شمارش و خارج گرديدند. از جنين ها، ما هيان انگشت قدر و باله دمي ماهيان بالغ DNA استخراج و با وت و ساترن بلوتينگ مورد آزمايش قرار داده شد. سپس نتيجه حاصله از دوت ساترون بلوتينگ به غشاء نيترو سلولزي منتقل شده آنگاه به غشاء نيترو سلولزي با پروب داراي قطعه اي از ژن هورمون رشد كه توسط آنزيمهاي EcoRI – Bgl II تهيه شده بود و داراي فسفر 32 بود هيبريد شدند. نتايج نشان داد كه باقي ماندگي جنين هاي ماهي لوچ و كاراس در معرض پالس 250 ولت به ترتيب با مدت هاي بيش از 6/6 ميلي ثانيه و 2/4 ميلي ثانيه كاهش مي يافت. از طرف ديگر پالس ولتاژ كم صدمه كمتري از پالس ولتاژ بالا در جنين ايجاد مي كرد طوري كه همانند سازي ترتيبات DNA وارد شده در مرحله بلاستولا صورت گرفته است. ولي پيك آن در مرحله آخر گاسترولا ظاهر شده است. اگر چه به دنبال آن دچار تغيير مي شود اما مقداري از آن تا مرحله عضله سازي باقي مانده بود، مشخص شده است.

تصوير 8- نمايش اتورادیوگرافي DNA كامل از ده جنين ماهي لوچ در مراحل مختلف رشد B: بلاستولا G: گاسترولا T: مرحله شكل گيري دم M:مرحله شكل گيري عضله بررسي نتايج دوت بلوتينگ نشان داد، كارايي انتقال ژن (Efficiency of gene transfer) GTE و تعداد كپي ژن انتقال يافته به ژنوم (Copy number per genome) CNP وقتي زمان در معرض گذاري در

رنج 7/8-0/48 تغيير مي كرد افزايش مي يافتند. ولي وقتي زمان در معرض گذاري به بيش از 9/6 ميلي ثانيه مي رسيد اثرات عكس آن مشاهده شد. هر دوي CNP , GTE با افزايش پالس ولتاژ افزايش مي يافتند. اين نتايج به ترتيب با P< 0/001 و P< 0/05 تأئيد شده است. بيشترين تعداد GTE عدد 62/5% تحت شرايط T = 0/97 ميلي ثانيه و C= 22 ميكروفاراد و R2 برابر با 20 اهم و ولتاژ برابر 300 ولت بوده است. CNP , GTE انتقال يافته به ماهي لوچ كه همچنان ظرفيت الكتريكي قابل عبور از محفظه زياد مي شد افزايش مي يافتند بيشترين مقدار تعداد كپي ژن يعني بيش از صد تا در هر جنين، تحت شرايط T= 6/6 ميلي ثانيه C= 150 ميكروفاراد و R2 برابر 20 اهم و ولتاژ برابر 250 ولت ايجاد شده است. در هر آزمايش تغييرات ظرفيتهاي الكتريكي و فرم خطي يا حلقوي پلاسميد سبب تأثيرات قابل ملاحظه اي در CNP , GTE شده است. در زمينه اثبات حضور ژن بيگانه در ژنوم ميزبان پس از دوت بلوتينگ، DNA هر نمونه كه به انتقال جواب مثبت داده بود به سه قسمت 5 ميكروگرمي تقسيم شده، دوتا از اين سه قسمت مورد اثر آنزيمهاي Hind III يا Xho قرار داده شدند. ساترن بلوت بدست آمده با پروب هورمون رشد داراي فسفر 32 هيربد و اتو رايوگرافي شد. نشان داده شد كه، قسمتي از DNA كه تحت اثر آنزيم قرار نگرفته در محل DNA كروموزمي باند داده است. تصوير 9- آناليز بررسي دوت از DNA بچه ماهيان انگشت قد

لوچ، مقدار 5 ميكروگرم از هر نمونة DNA روي غشاء نيتروسلولزي با پروبي كه داراي فسفر 32 در قطعه اي از ژن hGH بود بررسي شد. لاينهاي 2 تا 12 حاوي DNA ماهيان مورد آزمايش و لاين يك در E,D و F حاوي DNA پلاسميد pMhGH مي باشند اين لاين به عنوان شاهد بكار رفته است. چون كه فاقد DNA نمونه بوده و فقط شامل DNA پلاسميد بوده است. در حالي كه DNA تحت اثر آنزيم Hind III قرار گرفته بود يك باندي قوي 7/8 كيلوبازي و يك باند ضعيف 15/6 كيلوبازي ايجاد شده است. اين باندها با اندازة مونومري و دي مر پلاسميد pMhGH منطبق بوده اند نمونه هاي تحت برش آنزيم Xho I يك باند گسترده بين باندهاي گفته شدة قبل و يك باند ضعيف در 15/6 كيلوبازي ايجاد كرده. در حالي كه هيچ محل ويژه اي در داخل پلاسميد pMhGH براي برش توسط آنزيم Xho I وجود نداشته است. اين نتايج باز گو كنندة ورود تصادفي نسخه هاي متعدد از پلاسميد مي باشد كه ممكن است يك دي مر ترانسژنيك در اثر اتصال دو پلاسميد ايجاد شده باشد.

تصوير 10- نمايش اتورادیوگرافي ساترن بلوت ماهيان كپور كاراس ترانسژنيك مي‌باشد. اين ماهيان از تخمهايي كه پس از لقاح تحت تأثير الكتروپورشن قرار گرفتند توليد شده اند. مقدار ميكروگرم از DNA استخراج شد، از باله مورد استفاده قرار گرفت. C: لاين كنترل T: DNA برش نشده H: DNA برش

شده با آنزیم DNA :X Hind III برش شده تحت اثر آنزیم Xho I مي باشند.

جدول 4: اثرات پالس ولتاژ روي CNP , GTE

a: GTE داراي اختلاف معني دار P< 0/001 CNP:b داراي اختلاف معني دار p< 0/05 در ولتاژها مي باشد.

Voltrage of Pulse (V)	Number of Fish Analyzed	Number of Positive fish	GTE (%)	CNP[b]			
				<1	2-10	11-50	51-100
0	35	0	0				
50	4	0	0				
100	100	16	16	8			
150	6	0	0		7	1	
200	7	1	14.3	5	1		
250	161	24	14.9		16	2	1
300	32	20	62.5		11	6	3
350	4	2	50		1	1	

(جدول 5) اثرات ظرفيت الكتريكي روي CNP , GTE در ماهي لوچ موقعي كه اولتاژ در 250 ولت بوده است هر دوي CNP , GTE اختلاف معني داري در ظرفيت الكتريكي مختلف داشته اند كه به ترتيب P< 0/0001 و p< 0/05 بوده است. موقعي كه ولتاژ در 100 ولت بوده , CNP GTE هيچكدام اختلاف معني داري در ظرفيت الكتريكي نداشته اند و p> 0/05 براي هر بوده است.

Voltrage of Pulse (V)	C (μF)	Number of Fish Analyzed	Number of Positive fish	GTE (%)	CNP[b]			
					<1	2-10	11-50	51-100
100	22	100	16	16	8	7	1	

	150	82	9	11	3	5	1	
200	10	38	3	7.9		3		
	22	161	24	14.9	5	16	2	5
	150	77	44	57.1	7	21	5	

اغلب الكتروپورشن براي انتقال ژن در كشت هاي سلولي مورد استفاده قرار مي گيرد. اما به ندرت براي انتقال ژن در جنين مورد استفاده قرار گرفته است. در ابتداي اين تحقيق ميزان باقي ماندگي تخمهاي لوچ و كاراس تحت شرايط مختلف الكتروپورشن مورد بررسي قرار گرفت. كه براي اين منظور از خازن طراحي شده استفاده شد. نتايج نشان داد كه در اثر طولاني شدن زمان پالس صدماتي به جنين ماهيان وارد مي شود. در سيستم الكتروپورشن طراحي شده پالس الكتريكي داراي يك پيك موج بوده است و ظرفيت الكتريكي (Q_S) قابل عبور از داخل محفظه نمونه به شرح زير محاسبه شده است. موقعي كه يك پالس با مشخصات E برابر 250ولت، برابر 150 ميكروفاراد، R برابر20 اهم و T برابر 6/6 ميلي ثانيه بكار گرفته شد Q_S برابر C $2/34 * 10^{-5}$ بوده است. جنين زايي ماهي لوچ با ولتاژ دوبرابر مقدار 250، موقعي كه طول مدت در معرض گذاري از 30 ميكرو ثانيه افزايش يابد قطع مي شود. در حالتي كه ولتاژ دو برابر شده باشد مقدار ظرفيت الكتريكي كه از محفظة نمونه عبور مي كند را مي تواند به شرح زير محاسبه كرد.

كه در آن t طول مدت پالس است و مقدار Q_S در اين حالت برابر C $5/1*10^{-5}$ مي شود. بالاترين پالس به كار گرفته شده در سيستم خازن و مقاومت براي ايجاد سوراخ غشاء سلولي كافي نبوده است. بنابراين فرض

بر این گذاشته شده که، ژن بیگانه از طریق مجاري که قبل در غشاء قرار داشته وارد مي شود. در تکنیك الکتروپورشن کوریون و غشاء تخم نقش مهمي در افزایش CNP , GTE دارند. اینو (Inoue) و همکارانش معتقدند مسائلي که باعث پائین آمدن کارایي(4درصد) انتقال ژن در الکتروپورشن ماهي مدوکا شده این بوده ا ست که بدلیل وجود کوریون و پیش زرده، DNA پلاسمید نتوانسته وارد تخمك شده و با غشاء تماس برقرار کند. محققان دریافتند که کاهش CNP , GTE در فاصلة بین لقاح و الکتروپورشن زیاد مي شود.

7-1- انتقال ژن به تخم ماهي از طریق میکروپیل با میکرواینجکشن

در سال 1992 دیویس (Davies) و همکاران از انستیتو تحقیقاتي بیماریهاي کودکان در تورنتو کانادا انتقال ژن پروتئین ضد انجماد به ماهي آزاد اقیانوس را انجام دادند. طي زمستان در اتلانتیك کانادا دماي آبهاي دریا اغلب به دماي تقریبي 1- تا 1/6- درجه سانتي گراد نزول مي کند و یخبندان صورت مي گیرد. ماهي سالمون اتلانتیك در دماهاي پایین تر از 7/- درجه منجمند مي شود. بنابراین در پرورش آن در قفس هاي دریایي با محدودیت هایي مواجه مي شوند. که در دماهاي پایین مانع ایجاد کریستالهاي یخي در بدنشان مي شود قادر به زندگي هستند. لذا ژن پروتئین ضد انجماد (Antifreeze Protein) AFP را از ماهي زمستانه فلاندر (نوعي ماهي پهن کوچك) جدا کرده و به منظور افزایش قدرت مقاومت به

دماهاي پائين به تخم ماهي سالمون اتلانتيك از طريق ميكروپيل به كمك ميكرواينجكشن وارد كردند. نسبت باقي ماندهگي زاده ها مشابه نمونه هاي شاهد 80 درصد بوده است. اين آزمايش نشان داد كه، در صورتيكه ژنهاي پلي پپتيد ضد انجماد به ماهيان انتقال داده شود. اين صفت در آنها بروز خواهد كرد. در جدول شماره 6 ويژگيهاي ساختماني پروتئين هاي مختلف ضد انجماد در ماهيان بيان شده است. همچنين در تصوير 11 ساختمان ثانويه پروتئين ضد انجماد نوع اول AFPI در تصوير 12 چگونگي عمل AFP در جلوگيري از تشكيل كريستالهاي يخي، در تصوير 3 ساختمان ژن AFP كه در انتقال به ماهي آزاد استفاده شد، نشان داده شده است.

جدول شمار 6: ويژگيهاي ساختماني انواع مختلف پروتئينهاي ضد انجماد ماهيان كه در آن AFP پروتئين ضد انجماد و AFGP گيلوپروتئين ضد انجماد مي باشد.

	AFGP	AFP Type 1	AFP Type 11	AFP Type 111
Garbohydrate	Yes	No	No	No
Molecular weight	2.600-33.000	3.300-4.500	11.000-24.000	6.500
Primary structure	(Ala Ala Thr)n disaccaride	Alanine-rich multiple Of 11 aa repeats	Cystine – rich Disulfide-linked	General
Secondary structure	Expanded	a helical amaphiphilic	sheet β	Setructured but not distinct
Teriliary struclure	ND	100% helix	ND	ND
Biosynthetic precursor	Multiprotein	Prepro – AFP	Prepro-AFT	Pro- AFT
No. Protein components	8	7	2-6	12

Gene copies	ND	30-40	15	150

تصوير شماره 11- ساختمان ثانويه پروتئين ضد انجماد نوع اول (AFPI) از ماهي فلاندر كه از اين نوع پروتئين ضد انجماد سه ساختار فوق شناسايي شده است. اين پروتئين يك ساختار مارپيچ الفا دارد. اين ساختار ويژيگهاي آمفي پاتيك است. بنابراين با توجه به آمفي پاتيك بودن قابليت آب دوستي و آب گريزي دارد. طوري كه اكثر اسيدهاي آمينه آب دوست آن در يك طرف مارپيچ قرار گرفته اند. اين اسيد آمينه با مولكولهاي يخ ايجاد پيوندهاي هيدروژني مي كنند و در نتيجه از برزگ شدن آن جلوگيري مي شود.

تصوير 12- نمايش چگونگي واكنش ولكولهاي پروتئين ضد انجماد AFPI با مولكولهاي يخ و در نتيجه جلوگيري از بزرگ شدن كريستالهاي يخ.

1- به طور ترجيحي ملولكولهاي پروتئين ضد انجماد AFPI به سطح منشوري كريستال يخي در راستاي موازي با فلش 221 از طريق پيوندهاي هيدروژني و دو قطبي متصل مي شوند.

2- در نتيجه اين واكنشها مولكولها دو قطبي آب بين دو قطبي هاي مارپيچ الفا پروتئين ضد انجماد AFP قرار مي گيرند. بنابراين AFP مولكولهاي آب را از دسترس پيوند با ساير مولكولهاي آب خارج مي نمايند و از بزرگ شدن كريستال در سطح منشوري جلوگيري مي كند.

3- در اين حالت هنوز كريستالهاي يخي در سطوح بالا و پائين خود توانايي بزرگ شدن را دارند.
4- مولكولهاي AFP ديگري به كريستالهاي يخي جديد متصل مي شوند.
5- در همين حال فرآيندهاي فوق ادامه مي يابند و در نتيجه كريستال يخي به صورت منشوري مي شود.
تصوير 13 نمايش ساختار ژن AFP كه در انتقال به ماهي آزاد استفاده شده است. پلاسميد خطي شده 2A-7 از دو موقعيت محلهاي برش توسط آنزيم س ecoR I به داخل DNA مي باشد كه از پلاسميد pUC-9 به دست آمده و DNA ماهي فلاندر كه منتقل شده با خط تك نمايش داده شده است. در داخل DNA فلاندر مسطتيل نشان دهنده ژن AFP به طول يك كيلو باز مي باشد. قسمت هاي هاشور نخورده مسطتيل نشان دهنده اگزونهاي ژن AFP و قسمت هاشور خورده معرف ترتيبات فاصله انداز مي باشد. محلهاي برش توسط آنزيمهاي Hind III (H) , Sst (S) , Bam HI (B) مي باشد. همچنين يك پروب به طول 1/7 كيلوباز كه بين دو محل برش توسط آنزيم Sst I قرار گرفته، مشخص شده است.
8-8- بررسي امكان وراثت ژن منتقل شده به نسل هاي بعد
كهو و همكاران در سال 1992 پلاسميد pUSVCAT كه حاوي ژن گزارشگر CAT بود از طريق اسپرم به ماهيان زبراتو منتقل نمودند. نتايج حاصله نشان داد كه پلاسميد حاوي ژن در ميان زاده هاي نسل اول و دوم ظاهر شده است. پلاسميد در طي لقاح اسپرم با

تخمك قابليت انتقال به نسل جديد را داشته است. همچنين در بسياري از حالات پلاسميد معرفي شده در ميزبان اغلب به صورت خارج كروموزومي باقي مي‌ماند. البته قطعاتي از DNA الگو ممكن است وارد ژنوم شوند و حالت غير موزائيك در يكي از مجموع 7 والد ترانسژنيك ماهي زبرا ديده شد. ولي شش تاي ديگر حالت موزائيك داشته اند.

تصوير 14- نتايج انتقال ژن از طريق اسپرم با سيستم انكوبه كردن در بافر روي ماهي زبرا كه در آن 7 ماهي ترانسژنيك با ماهيان غير ترانسژنيك لقاح داده شدند. P (والدين) ، F_1 (نسل اول) ، F_2 (نسل دوم)،دايره مولد ماده، مربع مولد نر ،مثلث جنسيت ناشناخته رنگ سياه نشانه ترانسژنيك است.

علاوه بر اين دولين (Delin) و همكاران در سال 1995 ژن هورمون رشد ماهي آزاد چنوك با پروموتر ضد انجماد ماهي روغني اقيانوس (Ocean pout) را به ماهي آزاد كوهو (Coho) منتقل نمودند. نشان داده شد كه، ژن منتقل شده در نسل اول روي رشد ماهيان اثر داشته است. در ادامه اين تحقيق 5 تا از ماهيان نر ترانسژنيك توليد شد كه حاوي ژن منتقل شده بودند. (OPAFPGHC) و به حد بلوغ رسيدند براي لقاح تخمكاري ماهيان طبيعي مورد استفاده قرار گرفتند زادهاي حاصله بعد از مرحله لاروي يعني در شروع مرحله الوين (Alevins) دو فنوتيپ مشخص را نشان دادند. به طوري كه اكثر بچه ماهيان رنگ طبيعي قهوه اي مشابه ماهي والد داشته اند در حالي كه

تعداد ديگري از آنها داراي فنوتيپ رنگ سبز بوند. اگر چه اين اختلاف رنگ زود گذر بود و در مرحله بعد يعني فراي (Fry) رنگ قهوه اي در ماهيان غير ترانسژنيك كمتر مي شد. بررسيها DNA با PCR نشان داد كه، فنوتيپ سبز با حضور ژن OPAFPGHC مرتبط است بنابراين در تحقيق از رنگ سبز به عنوان شاخصي براي تشخيص ورود ژن استفاده شد بررسيها ثابت كرد كه نرهاي ترانسژنيك قادر به انتقال ژن وارده از طريق جرم لاين به سلولهاي اسپرم مي باشند بنابراين پيشنهاد شده كه ممكن است، ورود DNA منتقل شده به كروموزمي ميزبان صورت گرفته باشد يا اينكه همانند سازي DNA آن به صورت خارج كوموزمي صورت گرفته و در طي تقسيمات ميوزي به سلولهاي بعد منتقل شود. فركانس انتقال آن در اين آزمايشات كم و در حد زير 20 درصد بوده است. اين فركانس پائين ناشي از اين است كه 50 درصد از سلولهاي جرم لاين اوليه كه وارد مرحله تقسيم ميوزي شده اند ژن منتقل شده را دريافت كرده اند. فركانس هاي پائين تر از اين ممكن است از اين مسئله ناشي شده باشد كه تمام سلولهاي اسپرم ژن منتقل شده را دريافت نكرده باشد. در حقيقت يك موزائيسم به طور گسترده در ارگانيسم هاي موجود ترانسرنيك اتفاق مي افتد طوري كه در بافتهاي سوماتيك مشابه جرم لاينها اين موزائيسم مشاهده مي شود. در ارتباط با ظهور رنگ سبز در مرحله الوين در ماهيان ترانسژنيك پيشنهاد شده كه ناشي از تشديد رشد و نمو و رنگ زايي

(Pigmentation)بوده است. پيش از شروع تغذيه به افزايش رشد طولي و وزني ماهيان ترانسژنيك با توجه اينكه هيچ منبع انرژي كمكي داده نشده است. منجر به اين نتيجه گيري شده است كه، افزايش بيان ژن هورمون رشد ممكن است ميزان رشد را تحت تأثير قرار دهد يا بر كارايي تبديل انرژي ذخيره در زرده تخم اثر گذارد. اينكه آيا افزايش رشد به طور مستقيم ناشي از عملكرد هورمون رشد است يا به واسطه اي نظير عمل فاكتور شبه انسولين GF (Insulin like – growth factor) و همكارانش در سال 1992 پيشنهاد كردند كه بيان ژن IGF در طي مرحله لاروي آزاد ماهيان در رشد اوليه نقش دارد. همچنين نشان داده شده كه، تخم هاي آزاد ماهيان از منشاء مادري داراي هورمون تيروئيد است كه در رشد جنين نقش دارد به طوريكه در اين ماهيان هورمون تيروئيد T_3 به طور وضوع سبب افزايش رشد مي شود. علاوه بر اين مشخص شده است كه هورمون رشد در دوران جنيني با اثر روي فعاليت آنزيم T_4 دايو ديناز De- iodinase سبب افزايش تبديل T_4 به T_3 و در نتيجه افزايش رشد مي‌شود و IGF شبيه مهره داران عالي سبب افزايش رشد كارتيلاژ مي شود.

بخش دوم: دستكاريهاي كروموزمي در ماهيان

مقدمه

بر خلاف مهره داران عالي اقتصادي ماهيان استخواني داراي ويژگيهاي خاص بيولوژيكي و توليد مثلي نظير القاح و جنين زايي خارجي هستند. اين ويژگيها امكان دستكاريهاي ژنتيكي را در اين مراحل براي

ايجاد فنوتيپ هاي جديد فراهم كرده است به طوري كه يك يا چند ويژگي را مي توان به منظور افزايش توان توليد مثلي يا كارايي پرورش، حتي در زادهاي اندك توسعه داد.

قبل از توصيف تكنيكهاي دستكاري ژنتيكي لازم به توضيح است كه محيط + ژنوت= فنوتيپ (ph+G+E) مي باشد. به ويژگيهايي كه به طور جداگانه در گونه يا جمعيت قابل اندازه گيري باشند يا صفحات ظهور يافته فنوتيپ (ph) مي گويند همچنين به تمام اطلاعات ژنتيكي كه بطور جداگانه يا در يك جمعيت به وسيله ژنوم حمل مي گردد ژنوتيب G مي گويند. محيط (E) شامل هموستازي داخلي كه بوسيلة ژنوم يا بيولوژي كنترل مي شود و اثرات محيط اطراف مي باشد.

به منظور بدست آوردن فنوتيپ هاي مناسب در تكثير و پرورش ماهيان علاوه بر روشهاي ژنتيك كلاسيك نظير انتخاب، كراسهاي متقابل، ساير روشهاي بيوتكنولوژيكي و فيزيولوژيكي به كار مي روند طوري كه اثرات E,G در شرايط طبيعي را كارآمد و سريع نمايند. ترانسژنيك يكي از زمينه هاي اين دستكاريها است كه امكان معرفي گونه هاي جديد را فراهم كرده است، بطوري كه سبب ايجاد خصوصيات ژنتيكي و انتقال آن به نسل بعد مي گردد.

1-2- دستكاريهاي جنسي

1-1-2: دستكاريهاي جنسي با تكنيك ژينوژنز

بر طبق تعريف توگارد (Thorgaard) در سال 1986 ژينوژنز بنام وارث كامل مادري مي باشد كه در آن

مواد ژنتيكي اسپرم در ساختار جنين دخالتي ندارند. مثالهايي از وجود ژينوژنز در شرايط طبيعي تكثير پرورش ماهيان شناخته و گزارش شده است. در موجودات هرما فروديت كه گامت هاي هر دو جنس را ايجاد مي كنند يك پديدة ويژه و نادر بنام خود لقاي وجود دارد. همچنين در بعضي از گونه هاي هر مافروديت گامت ايجاد شده مي تواند جداگانه فعال شود. اگر چه تغييرات مجموعه كروموزومي در گونه هاي مختلف ماهيان توسط محققين زيادي مورد بررسي قرار گرفته، ولي اطلاعات كمي در اين زمينه ها در دسترس است. طبق بررسيهاي محققان كروزومهاي zw,xy در تعيين جنسيت ماهيان نقش دارند كه در حالت اول جنس ماده هموگامت (xx) در حالت دوم هتروگامت (zw) مي باشد. دستكاريهاي كروزومهاي جنسي در توليد چندين گونه از ماهيان تجاري نقش مهمي دارند. در حالتي كه تغييرات نسبت جنسيت مورد هدف باشد. به طوري كه جنس داراي رشد سريع بايد مورد پرورش قرار گيرد. ايجاد آن جنس در جمعيت مورد نظر قرار مي گيرد. يكي از روشهاي مناسب براي تغيير جنسيت يا تغيير نسبت جنسي در جمعيت ماهيان ايجاد ژينوژنز است. ژينوژتز را مي توان در مراحل جنيني در طي تقسيم ميوز دوم تخمك يا تقسيم ميتوزي اول تخم ايجاد كرد (تصوير 15) تقسيم ميكروزي مرحله اوليه رشد جنيني است اين مراحل براي دستكاري و ايجاد جنسيت مورد نظر مناسب مي باشند. تكثير مصنوعي براي به كارگيري روشهاي دستكاري جنسي ضروري است با بكارگيري ژينوژنز بر روي ماهيان ماده هموگامتيك

تمام زاده ماده خواهند شد. در صورتي كه به كارگيري ژينوژنر، بر روي ماده مترگامتي (zx) 50 درصد زادها (zz) و 50 درصد ماده (ww) خواهند شد. در اجراي اندروژنز بر روي ماهياني كه zw هستند تمام زادها نر zz خواهند شد براي ايجاد ژينوژنز مواد ژنتيكي اسپرم را به وسيله اشعه uv غير فعال مي كنند. سپس از آن براي القاح تخمك استفاده مي شود در ماهياني كه جنس ماده هموگومتي است با لقاح اين اسپرك با تخمك، تخمهايي با جنسيت ماده ايجاد مي شود. براي نگهداري دومين گويچه قطبي از شوك هاي فشار، گرما يا سرما استفاده مي شود كه با اين شوك ها مي توان ميزان زاده هاي ديپلوئيد را افزايش داد. ويو (wu) و همكارانش در سال 1981 موفق شدند ماهيان كپور هموزيگوت ژينوژنز را با كارگيري كلشي سين بر روي تخم در مرحله دو سلولي ايجاد نمايند. در ژينوژنز ميتوزي اولين تقسيم ميتوزي يك تخم ها پلوئيد به وسيله شوك جهت ايجاد موجود ديپلوئيد مهار مي شود. در نتيجه تمام زادهاي توليد ماده ولي با نسبت باقي ماندگي كم مي باشند. ژينوژنز ميتوزي را مي توان جهت ايجاد جمعيت تك جنس و تحقيقات ژنتيكي اصلاح نژاد به كار گرفت، همه ماهيان ديپلوئيدهاي ژينوژنز هموزيگوت به طور جداگانه داراي خصوصيات يكساني هستند كه از آنها مي توان در اصلاح نژاد و تحقيقات بيماري و رشد استفاده كرد. در ژينوژنز انتقال ژنوم را مي توان به صورت اختصاصي يا غير اختصاصي انجام داد. طوري

که در ژینوژنز غیر اختصاصي غلب وراث پدري به طور جزيي از اسپرم غیر فعال به زاده ها منتقل مي شود. اگر چه اغلب این ویژگیها در نسلهاي بعد از بین مي روند. با این وجود در ماهیان قزل آلاي رنگین کمان که به وسیله اشعه گاما ژینوژنز شده بودند به وسیله گسترش کروموزمي متا فاز مشخص شد که تعدادي از قطعات کروموزومي اسپرم را دریافت کرده اند. امروزه هنوز سوالات زیادي در اتباط با به کارگیري ژینوژنز مطرح است. چندین محقق به کارگیري تکنکي ژینوژنز میوزي را با موفقیت انجام دادند. در حالي که با کارگیري ژینوژنز میتوزي به وسیله تعداد کمي انجام شده است در سال 1981 استرسینگر (Stresinger) و همکارانش موفقیت در ایجاد ژینوژنز به وسیله مهار اولین تقسیم میتوزي را گزارش کردند همچنین ناجي (Nagy) در سال 1987 با انجام شوك گرمایي 40 دقیقه پس از لقاح ژینوژنز میتوزي در کپور ایجاد کرد. که براي این کار در کپور ماهي شوك به مدت 3 دقیقه به طور منقطع در طول T_0 برابر 1/1-2/9 به کار گرفته شد. که در آن T_0 زمان لازم استاندارد براي اولین تقسیم میتوزي است. بیشترین کارایي مهار اولین تقسیم در شوك 41 درجه بوده است. کومن (Koman) و همکارانش در سال 1990 به وسیله مهار اولین تقسیم میتوزي 12-5 درصد زاده هاي هموزیگوت ایجاد کردند که میزان باقي ماندگي لاروهاي تولیدي آن کم و در طي یك ماه اول مرگ و میر در آنها قابل ملاحظه بوده است. ولي پس از رسیدگي جنسي تعدادي از مولدین

ايجاد شده با اين روش به عنوان والد براي ايجاد كلون با كمك ژينوژنز ميوزي به كار گرفته شدند.

2-1-2- دست كاري مجموعه كروموزمي به وسيله تكنيك اندروژنز

اندروژنز بر عكس ژينونزي باشد، طوري كه در يك اندروژنز واقعي تمام كروموزمهاي جنين پدري هستند. توليد ماهيان اندروژنز ديپلوئيد بر اساس غير فعال كردن مواد ژنتيكي تخمك و به دنبال آن لقاح اين تخمك با يك اسپرم طبعي و مهار اولين تقيسم ميتوزي تخم ها پلوئيد ايجاد شده مي باشد. در ژنتيك و اصلاح نژاد مزاياي اندروژنز بيشتر از ژينوژنز است. اين مزايا شامل زمان كم ايجاد ماهيان نر، امكان نگهداري اسپرم نژادهاي اصلاح شده و انجام آزمايشات مربوط به وراثت ميتوكندرياي مي باشد. از طرف ديگر ميزان باقي ماندگي و باروري ماهيان اندروژنز كم باشد.

اندروژنز در ماهي قزل آلا به وسيله به كارگيري اشعه گاما روي غير فعال كردن ژنو تخمك و به دنبال آن ديپلوئيد اندروژنز اين گونه به وسيله تورگارد گزارش شده است. در اين روش از اسپرم تتراپلوئيد نر براي لقاح تخمك فاقد ژنوم استفاده شد. با اين تكنيك نيازي به ديپلوئيد كردن نيست چون جنين به دست آمده ديپلوئيد است. اولين بار روي كپور اندروژنز موفق آميز به وسيله گرونينا (Grunina) و همكارانش در سالف 1990 با به كارگيري 30-25 كيلو رد اشعه ايكس روي تخمك و شوك گرمايي به مدت 2 تا 3 دقيقه در درجه حرارت 41-40/5 درجه سانتگراد و

T_0 برابر 1/7-1/9 در طي لقاح انجام شد. در اين حالت T_0 برابر 20 دقيقه در 22/5 درجه يا 20 دقيقه در 23 درجه بوده است. از جهش در رنگ نرها (نارنجي b_1b_2) به عنوان يك نشانگر استفاده شود. طوري كه تعداد 6 تا 9 درصد از تخم هايي كه تحت عمل اندروژنز قرار داده شده بودند به لاروهاي بدون رنگ دانه تبديل شدند كه نشانگر موفقيت در ايجاد ديپلوئيدهاي اندروژنز بودند در حالي كه نمونه هاي طبيعي در مرحله لاروي رنگ دانه هاي كمي داشتند اگر چه در بين ماهيان باقي مانده به دليل غير فعال شدن ناكامل مواد ژنتيكي تخمك، ديپلوئيدهايي كه داراي صفات دو والد بودند وجود داشته است. نصف زادهاي اندروژنز ماده (xx) و نصف ديگر نرهاي (yy) مي شوند كه قابليت زيست yy در ساير گونه ها به اثبات رسيده است. گرونينا و همكارانش در سال 1993 در تعدادي از ماهيان كپور نرد پيلوئيد اندروژنز (yy) رسيدگي جنسي را مشاهده كردند. در طي دومين اندروژنز ميتوزي كه روي اينها انجام دادند ثابت شد كه تمام زادهاي جمعيت هموزيگوت شدند. با اين فرضيه هتروگامتي بودن جنس نور كپور تأئيد شود بنجرس (Bongers) در سال 1994 براي ايجاد كپور ژينوژنز تكنيك پيشرفته و ساده تري را شرح داد. اين تكنيك شامل: استفاده از اشعه uv به ميزان دوز 150-300 به منظور ايجاد ديپلوئيدي مي باشد. جهت اينكه توزيع اشعه به طور يكنواخت روي تخمكها صورت گيرد. تخمكها را در مايع تخمدان كه از فعال شدن

آنها جلوگيري مي كند قرار داده، به طور مرتب هم زده شدند. آنگاه به وسيله عدم وجود رنگ سياه غالب كه در ماده ها وجود دارد ميزان ديپلوئدها در اندروژنز 7/2-18/3 تعيين شد. در حالتي كه uv به ميزان 250 ميل ژول بر متر مكعب و به دنبال آن شوك گرمايي به كار گرفته شود هيچ ديپلوئيد دو والديني كه داراي رنگ سياه باشد ايجاد نمي شود.

2-2- پلوئيدي

بر طبق توگارد يك نمونه ماهي كه يك مجموعه كروموزومي اضافه را حمل كند پلوئيد ناميده مي شود از مهمترين كاربردهاي دستكاريهاي پلوئيدي در آبزي پرزوري تريپلوئيد و تتراپلوئيد است.

1-2-2- تريپلوئيدي

در جمعيت هاي طبيعي مي توان ماهيان تريپلوئيد با داشتن مجموعه كروموزمي 3n را در ميان ديپلوئيدها مشاهده كرد. وجود اين نوع ترپيلوئيدي ناشي از عدم تقسيم كاهشي ميوز مي باشد. ايجاد تريپلوئيد با دو فرايند قابل انجام است. زماني كه يك تخم ديپلوئيد به وسيله اسپرم ها پلوئيد ايجاد مي شوند. همچنين در اثر لقاح يك موجود ديپلوئيد و يك تترا پلوئيد ماهيان تريپلوئيد ايجاد مي شوند در ميان گونه هاي وابسته، هيبريدهاي ترپيلوئيد كه قابليت زيست دارند مي توانند وجود داشته باشند. براي ايجاد كپور نر تريپلوئيد چندين تكنكي قابل دسترس وجود دارد از جمله استفاده از شوك گرما، سرما، فشار هيدرواستاتيك و تركيبي از اينها مي باشد. در نتيجه اين شوكها دومين گويچه قطبي در تخمك حفظ

شده و در ساختار مواد ژنتيكي موجود شركت مي كند. در تكثير مصنوعي ايجاد ماهيان تريپلوئيد با به كارگيري شوك سرما به وسيله اوجي ما (Ojima) و همكارانش گزارش شده است. در حالي كه محققان ديگري استفاده از شوك گرمايي را گزارش كرده اند. يكي از دلايل توليد ماهيان تريپلوئيد كنترل جنسيت است چرا كه ماهيان تريپلوئيد عقيم هستند اگر چه دلايل عقيم بودن آنها به خوبي شناخته نشده است و اين اينينام (Van Eenonnaam) و همكارانش در خصوص رسيدگي جنسي، كپور علفخوار تريپلوئيد عقيم ايجاد كرده اند. در همين حال يك تيم چيني شامل ليو (Lu) و جن (Chen) دولاين مختلف از ماهيان تريپلوئيد چند گانه را ايجاد كردند طوري كه دو تا از سه مجموعه كروموزومي آن از يك گون كپور و يك مجموعه آن از گوه ديگر بوه است و قادر به زيست و توليد مثل بوده اند. زماني كه كنترل توليد مثل جنسي مورد نظر است عقيم بودن ماهي يك مزيت است. ماهيان عقيم معمولاً رشد و توان سازگاري بيشتري از ماهيان ديپلوئيد دارند زيرا هتروزيگوتي را افزايش مي دهند. مزيت رشد بيشتر تريپلوئيد در مقايسه با ماهيان ديپلوئيد هم نژاد ممكن است به علت توسعه رشد گنادي در ماهيان ديپلوئيد و فقدان آن در ماهيان تريپلوئيد باشد. جيرواي (Gervai) و همكارانش هيچگونه اختلافي در رشد كپور تريپلوئيد و ديپلوئيد مشاهده نكردند در صورتي كه چرفس (Cherfas) و همكارانش مشاهده كردند كه رشد باقي مانده گي كپور

دي پلوئيد بيشتر از تريپلوئيد بوده و تريپلوئيدها مزيتي نداشته اند.

2-2-2- تتراپلوئيدي

تتراپلوئيد در شرايط طبيعي يافت نشده است اگر چه در فيلوژني ممكن است دو برابر شدن ژنوم موجود ديپلوئيد اتفاق افتاده و منجر به ايجاد گونه هاي جديد شود. به طور عموم اين پذيرفه شده كه چندين گونه از ماهيان از جمله ماهي كپور، تتراپلوئيد كاذب هستند كه به طور نسبي در مقايسه با گونه هاي ديپلوئيد اين گونه ها ماهي قابليت زيست و رشد بيشتري دارند. براي ايجاد ماهيان تتراپلوئيد از تشكيل غشاء سلولي بين سلولهاي دختر در اولين تقسيم ميتوزي، به منظور افزايش مجموعه كروزومي جلوگيري مي شود. روشهاي شوك ايجاد تتراپلوئيد مشابه تيرپلوئيد است. تتراپلوئيدها بارور هستند طوري كه براي ايجاد ماهيان تريپلوئيد از طريق لقاح آنها با ديپلوئيد مناسب مي باشند رييكوبراتسكي (Rrkoubratsky) و همكارانش به موازات ايجاد ماهيان كپور تريپلوئيد توليد ماهيان تتراپلوئيد كپور را گزارش كرده اند. اگر چه اين ما هيان تتراپلوئيد در طي اولين سال توليد از بين رفته اند. بر پايه تحقيقات به نظر مي رسد باقي مانده گي ماهيان تتراپلوئيد مورد سوأل است. ولي نكته جالب موفقيت در ايجاد تتراپلوئيدي در گربه ماهي كانال توسط بيدول (Bidwell) بوده است. دي ضمن اينكه چورت (Chourrut) و همكارانش موفق به ايجاد ماهيان تتراپلوئيد نر و ماده قزل آلاي رنگين كمان

شدند. لقاح موجود تتراپلوئید با دیپلوئید در آزاد ماهیان منجر به ایجاد زاده هاي تریپلوئید شده است بر طبق نظر چورت قابلیت کم امکان لقاح بین تتراپلوئید و یپلوئید اینها ممکن است ناشي از بزرگ بودن اسپرم باشد طوري که در نتیجه امکان نفوذ آن به تخمك از راه میکروپیل وجود ندارد.

بخش سوم: کلونینگ

مقدمه

کپي هاي يکسان ژنتيکي از سلولها و ارگانيسم ها کلون ناميده مي شود. دوقلوهاي همزيگوت يکسان پستانداران، پارتنوژنز دوزيستان، توليد موجود از طريق جايگزيني هسته و ايجاد هموزيگوتهاي ژنتيکي همگي کلون هستند. همچنين مي توان جمعيت بعضي از گونه هاي ماهيان را به عنوان کلون در نظر گرفت. در شرايط طبيعي در ميوز نامنظمي که در کپور کاراس (Crucian) صورت مي گيرد اتصال کروموزومهاي همولوگ، کراسينگ اور، تقسيم کاهشي ميوز اول اتفاق نمي افتد و ميوز دوم پس از ورود اسپرم کامل مي شود و ماهيان تريپلوئيد ايجاد مي شود (تصوير 17). در بين رده هاي گوناگون مهره داران که منشاء فيلوژوني مختلفي دارند روشهاي گوناگوني مهره داران که منشاء فيلوژني مختلفي دارند روشهاي گوناگوني براي کلونينگ وجود دارد. يک روش براي ايجاد کلونهاي محدود در پستانداران جدا کردن سلولهاي جنين در مراحل اوليه است اگر چه استفاده از اين روش براي ماهيان بعلت نوع ساختمان تخم آنها غير ممکن است. از طرفي روشهاي ديگري براي کلونينگ در مهره داراني که لقاح و دوره جنيني خارج از بدن دارند نظير ماهي و دوزيستان وجود دارد.

1-3- ايجاد کلون بوسيله دو ژينوژنز متوالي

روش بکارگیري دو ژینوژنز متوالي در ایجاد کلون به کمك ژینوژنز متیوزي و میوزي یا بکارگیري توام آنها، با رسیدگي جنسي و فراهم کردن تخم امکان پذیر است. در اولین قدم از طریق ژینوژنز میتوزي جمعیت هموزیگوتي ایجاد مي گردد که در لوکوسهاي کروموزومها آللهاي یکساني را داشته باشند سپس این هموزیگوتها بعنوان والد براي کلون بعدي بکار گرفته مي شوند. اگر تخم این ماهیان براي ژینوژنز میوزي استفاده شود و پرورش آن موفق باشد کلون ایجاد شده در این نسل یك کلون واقعي خواهد شد. حتي اگر نوترکیبي بین کروموزومهاي همولوگ در میوز صورت گیرد این نوترکیبي هموزیگوتي آللها را تغییر نخواهد داد. کومن موفقیت در ایجاد یك کلون از ماهي کپور به روش فوق را شرح داده است که تعداد زیادي از کپور ماهیان ماده در طي زمان طولاني به جنس نر تغییر فنوتیپ دادند.

3-2 کلون کردن به وسیله ترکیبي از اندروژنز و ژینوژنز

روش ایجاد کلون با به کارگیري ترکیبي از اندروژنز به خوبي روش ژینوژنز متوالي تعریف نشده است، زیرا ایجاد ماهیان دیپلوئید از طریق اندروژنز از ژینوژنز مشکل تر است که این ناشي از دو علت مي باشد اول آنکه کاملاً مشکل است که پیش هسته ماده و اجسام قطبي از تخمك به نحوي کنار گذاشته شوند بدون اینکه به سیتوپلاسم آسیب برسد.دوم اینکه ایجاد دیپلوئیدهاي بارور از طریق پیش هسته نر پرزحمت است چونکه در ژینوژ نر دومین گویچه قطبي جهت کمك در کنار تخمك است ولي در اندروژنز این

وجود ندارد. به همین دلیل است ه در طي ایجاد اندروژنز براي دیپلوئید بودن موجود، اولین تقسیم میتوزي باید متوقف شود. بنابراین قدم دوم در اندروژنز با ژینوژنز میتوزي یکسان است. امکان ایجاد ژنوتیپ ماده xx فوق نر yy در نتیجه یك آندروژنز دیپلوئید موفق آمیز وجود دارد در هر دو حالت به طور جداگانه هموزیگوتهایي تولید مي شوند که مي توانند براي ایجاد کلونینگ در کپور مناسب باشد. در ادامه اینکار ماده هاي xx را به روش شرح داده شده در قسمت هاي قبل مي توان مورد استفاده قرار داد ولي براي نرهاي yy به تو تئوري مطلب بیان مي شود. این نرها اسپرمهایي که حاوي یك کروموزوم y هستند را تولید و لقاح اینها با تخمکهاي به دست آمده از مادر هموزیگوزت کلون مناسب را ایجاد مي کند طوري که تمام زاده هاي حاصله نر خواهند شد. این کلون را نمي توان براي تولید نسلهاي بیشتر از دوم مورد استفاده قرار داد زیرا ژنوم نر و ماده اي که در لقاح شرکت مي‌کنند از کلونهاي مختلفي بدست آمده اند و جور شدن کروموزومهاي همولگ در گامتها نمي توانند صورت گیرد، تلاش در جهت ایجاد و به کارگیري این تئوري در گونه هایي که جنس نر آن نسبت به ماده برتري دارد قابل توجیه مي باشد.

در حالي که در کپور این قضیه است و ماده آن در پرورش متراکم از جنس نر برتر است. این نکته را باید متذکر شد که در ایجاد کلون با فراینده هایي که در دو بحث قبل بیان شد ا گر والدین دهنده از

نژاد یکسان و هموزیگوت نباشند کلونها ایجاد شده هموزیگوت نخواهند شد.

3-3- جابجایي هسته

جابجایي یك هسته توتي پوتنت که تمایز در آن صورت نگرفته به یك تخم فاقد هسته روشي است که اولین بار به وسیله تانگ (Tung) و همکارانش در سال 1963 شرح داده شد و به طور گسترده در ایجاد کلونینگ مهره داران به کار گرفته مي شود. جهت اینکه یك تخم میزبان قابلیت پذیرش هسته جدید را داشته باشد باید ابتدا فعال و سپس به روش دستي هسته آن خارج شود یا اینه به کمك اشعه Xیا UV مواد ژنتیکي آن بي اثر شده سپس هسته یك جنین پلوري پوتنت برداشته شده به آن منتقل شود (تصویر 18). رابطه اي بین زمان توتي پوتنت و موقعیت موجود از نظر تکاملي وجود دارد. رابطه اي بین زمان توتي پوتنت و موقعیت موجود از نظر تکاملي وجود دارد. هر چه رده مهره دار عالي تر شود. به طور نسبي توان توتي پوتنت آن با زمان کوتاه مي شود. بر طبق اطلاعات توان توتي پوتنت در دوزیستان براي مدت طولاني در مراحل اولیه حفظ مي شود در صورتي که در پستانداران فقط در مرحله دو سلولي این توانایي وجود دارد. انتقال هسته در دوزیستان در سال 1952 توسط کینگ(King) و همکارانش گزارش شد و تانگ اولین گز ارش موفقیت آمیز از این کار را روي کپور ماهیان ارائه کرده که هسته تخم لقاح یافته کپور را به تخمك فاقد هسته کاراس منتقل کرد. در نتیجه جابجایي هسته، زاده ها صفات گونه دهنده را داشتند

اگر چه مقداري از صفات مادري هم در انها مشاهده شده جالب است كه يان (Yan) و همكارانش در سال 1984 در آزمايشاتي عكس اين كار را انجام دادند و موفق شدند كه سهته كپور كاراس را به كپور معمولي منتقل نمايند.

3-4 - جابجايي سلولهاي سوماتيك و جنيني به جنين ديگر

هو (Ho) و كان (Kane) در سال 1990 موفق به انتقال سلولهاي نشانه گذاري شده طبيعي و جهش يافته ماهي زبرا به ديپلوئيدهاي گيرنده شدند تا چگونگي اثر آنها را مطالعه نمايند. لين (Lin) و همكارانش به طور موفقيت آميز 20 تا 100 سلول رنگ دانه اي يكسان ماهي زبرا را به سلولهاي بلاستودرم البينو (فاقد رنگدانه) گيرنده آن تزريق كردند 23 تا از مجموع 70 تا تالبينو كه به آنها سلول رنگدانه اي منتقل شده بود پس از 4 تا 6 هفته شيمريك (موجود داراي دو ويژگي متفاوت) و 18 درصد از سلولها فقط رنگدانه داشتند. آزمايش مشابهي به وسيله نيلسون (Nilsson) و كلود (Cloud) در سال 1992 روي قزل آلاي رنگين كمان انجام شد. بر طبق نتايج بدست آمده 1000 سلول نشانه گذاري را تزريق كردند كه فلورسانس (نشانه) در 19 تا از 114 جنين شمريك يعني به ميزان 17 درصد ديده شده است. الگوي توزيع سلولها به طور گسترده اي در جنين شمريك پخش شده بود.

هروت (Horvath) و همكارانش سلولهاي توتي پوتنت كپور ديپلوئيد در مراحل مرولا يا بلاستولا را به يك

جنين در مرحله 3 تا 4 سلولي منتقل نمودند تا با نمونه ها ديپلوئيد طبيعي مقايسه نمايند. مشاهده شده كه، ميزان هاپلوئيد براي اين منظور مناسب تر است.

براي انجام اين انتقال يك كارشناس مي تواند در عرض يك ساعت تعداد زيادي از اينها را ايجاد نمايد و موفقيت اين تكنيك را مي توان با يك كاركرژنتيكي ثابت كرد براي اين منظور از مطالعه فلس استفاده شده سلولهاي گيرنده هاپلوئيد از يك ماهي ماده نقره ا بدون فلس (SSnn) در نظر گرفته شد. در ضمن اينكه سلولهاي ديپلوئيد دهنده از زاده هاي ناشي از تلاقي يك نر فلس دار(SSnn) و يك ماده فلس دار (Ssnn و SSnn) در نظر گرفته شده اگر بين زاده هاي ايجاد شد بچه ماهيان داراي فلس وجود داشته باشند اين نشان مي دهد كه صفت از ديپلوئيد دهنده منتقل شده است اگر چه اين آزمايش موفق نبوده است (تصوير 19).

تصوير 18- فرآيند جابجايي هسته در ماهي بالا: خارج كردن هسته از تخم ماهي (a) : جايگاه جسم قطبي و هسته (b) : ورود سوزن شيشه اي به سيتوپلاسم در جايگاه هسته (c): هسته به وسيله سوزن برداشته شده پايين : جابجايي هسته به تخم ماهي فاقد هسته (a): يك جنين بلاستولايي (b) جداسازي سلولهاي بلاستولا در محيط فاقد كلسيم (c): يك هسته از سولولها با پيپت مكش مي شود (d) : اين هسته با ميكرو پيپت به تخم فاقد هسته تزريق مي شود.

تصوير 19- سيستم كلونينگ امكان پذير با استفاده از سلولهاي كپور معمولي در جنين مرولايي و بلاستولايي (1) ايجاد تخمك گذاري ژنوتيپ ماده ssnn (آئينه اي) (2) لقاح (3): كورون زدايي با پروتئاز در مراحل اوليه جنيني (4): جدا كردن سلولهاي جنين مرولايي بلاستولايي (5): افزايش سلولها در جنين ميزبان 6- انكوباسيونو و مراقبت

5-3- دورگه گيري

يكي از مسائل مرتبط با دست كاري مجموعه كروموزومي دورگه گيري (Hyberidization) است دورگه ها به منظور دستيابي به ماهياني كه صفات وراثتي بينابين والدين را داشته باشند و براساس باروركردن تخمك يك گونه با اسپرم گونه ديگر توليد مي شوند. به طوري كه در طي دو دهه گذشته تحقيقات زيادي در زمينه دورگه گيري ماهيان انجام گرفته است (Kavumpurath, 1992) اغلب يكسان بودن گونه اي را در دورگه گيري در نظر مي گيرند. اگرچه گاهي اين مسأله رعايت نمي‌شود. مدت زيادي است كه دورگه هاي طبيعي بين گونه هاي مختلف آزاد ماهيان شناخته شده است (Tsygir 1993) . بيشتر از صد سال است كه دورگه گيري مصنوعي آزاد ماهيان به لحاظ پرورش و اقتصادي مورد علاقه پژوهشگران مي‌باشد (Mc Gowan) همچنين در بين ماهيان خاوياري دورگه هاي طبيعي و مصنوعي گزارش شده است طوري كه ماهي بستر كه توانايي پرورش آن در شرايط استخرهاي آب شيرين وجود دارد دورگه ماهي ماده بلوگاي درياي خزر و ماهي نر

استراليا است اگر چه توليد دورگه ها داراي مشكلاتي است و بسته به اينكه مولدين قبلاً چند مرتبه در شرايط طبيعي محيط خود تكثير شده اند كيفيت تخمكهاي استحالي از آنها با يكديگر فرق دارد كه اين مسئله مهمي در دورگه گيري مي باشد (Mc Gowan 1992) كه بايد در شرايط مصنوعي مورد توجه قرار گيرد فاكتور ديگر اندازه تخمك است كه سبب اختلاف در توانايي ايجاد دورگه هاي متقابل مي شود. تخمك هاي كوچكتر ممكن است فضاي كافي براي رشد جنين را نداشته باشند (Mc Gowan 1992) . علاوه بر اينها نقش اندازه قطر ميكروپيل نيز بايد مورد توجه قرار گيرد. درصد بالاي مرگ و مير دورگه ها در طي دوران انكوباسيون ممكن است. به علل مختلفي صورت گيرد. به طور مثال مشكلات ناشي از ناسازگاري ژنتيكي در مرحله جنيني موجب مرگ و مير دورگه هاي مي شود اغلب بيان نامتوازن ژنها در طي مراحل اوليه جنيني ممكن است مربوط به اختلاف در نحوه تنظيم ژنها باشد (Mckay 1992) الگوهاي حد وسط مشاهده شده در دورگه ها از جمله رنگ بدن ممكن است ناشي از آللهاي هم زور (Codmibnant) باشد. نظير اين در مورد نثل اول دورگه Salmo tratta و S.salar مشاهده شد كه آن را ناشي از توان ابراز يكسان آللهاي والدين در تمام لوكوسها مي دانند (kavumpurath -1992) ظهور صفت خاص در دورگه ها كه به يكي از والدين نزديكتر است ممكن است ناشي از غالب بودن اللهاي مربوط به آن صفت در دورگه ها باشد.

رفـرنـس

1- Brem, et.al.,1988 , Aquacultre . 68:202-219

2- Davies, P.L.et. AL., 1992 , Molocular maninie Biot Vol.1:309-317

3- Devlin, R.H. et.al., 1995, Aqu.137:161-169

4- Hongy,y.etal., 1993 Aqu. 111-215-226

5- Horvath, L.,et.al.,1995,Aqu. 129:157-181

6- Kavumpurath, S.et.al.,1992, Aqu:106:107-116

7- Khoo,H.W.,et.al.,1992,Aqu:107:1-19

8- Mc Gowan, C.et.al.,1992, Aqu.106:117-125

9- Mckay, L.R.et.al.,1992 Aqu.102:43-45

10- Sin,F.Y.T et al.,1993, Aqu 111:199-205

11- Song,S.et.al.,1993, Aqu 111:199-205

12- Xie,Y. et.al., 1993 , Aqu.Aqu.111:207-213