View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

کلونینگ ژن هورمون رشد (GH) فیل ماهی (*Huso huso*) در سازه های لنتی ویروسی و غیر ویروسی و بررسی بیان ژن در سلولهای بنیادی جنینی انسانی

سکینه مشجور[۱]، حسین ذوالقرنین[*۱]، موسی گردانه[۲]،محمد علی سالاری علی آبادی[۱]، احمد قاسمی[۳]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۲. گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران

۳. گروه بیوتکنولوژی دریا، مرکز مطالعات وپژوهش های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

چکیده

یکی از مهمترین کاربردهای مهندسی ژنتیک در تحقیقات آبزی پروری، افزایش میزان رشد ماهیان پرورشی از طریق انتقال ترنس ژن های هورمون رشد به آنهاست. اما پیش از هر گونه تلاش در جهت انتقال ژن، ساخت و سنتز این ترنس ژن های مطلوب الزامی است. از این رو هدف از این تحقیق، ساخت لنتی ویروس های نوترکیب حاوی ژن هورمون رشد (GH) فیل ماهی *Huso huso* و بهره گیری از آنها برای انتقال سازه ژنی به سلول های هدف، به منظور تولید پروتئین نوترکیب هورمون رشد و آنالیزهای بیانی است. در این مطالعه، cDNA هورمون رشد فیل ماهی که با استفاده از RNA استخراج شده از غده هیپوفیز سنتز شده بود، توسط تکنیک PCR تکثیر شده و سپس این قطعه ژن پس از کلونینگ در وکتور پلاسمیدی pTZ57R/T بر اساس جایگاه های آنزیمی مشخص برش داده شده و نهایتاً به بدنه ناقل لنتی ویروسی pNL-EGFP/CMV-WPRE پیوند و ساب کلون گردید. بدین گونه این سازه قادر به تولید تیترهای بالایی از ویروس های نوترکیب بالغ و فعال است. طی ترانسفکشن همزمان ناقل نهایی (ناقل انتقال pLV-GH-IRES-EGFP) به همراه دو ناقل کمکی (ناقل بسته بندی ویروس pCD/NL- BH*ΔΔΔ و ناقل غشائی LTR-G) با لیپوفکتامین به درون رده سلولی جنینی انسانیHEK-293T، لنتی ویروس های نوترکیب حاوی سازه ژنی مورد نظر تولید و با تکنیک RT-PCR تأیید شدند. از آنجاکه در ساختار این وکتور ژن نشانگر EGFP، بواسطه قطعه IRES در فرودست ژن GH قرار داده شده است، بیان ژن در مراحل ترانسفکشن و ترانسداکشن به سهولت تحت نور فلورسنت پیگیری شد. با تیتراسیون این لنتی ویروس های نوترکیب در این رده سلولی و تغلیظ سوپرناتانت ویروسی با ستون های تخلیص پروتئین Amicon، استوک غلیظی از ویروس های نوترکیب بدست آمد، که در حدود (یک پنجم کل استوک) توانست در مرحله ترانسداکشن (آلوده سازی سلول های هدف با ویروس حامل ژن) تیترهای بالایی از ویروس های نوترکیب بالغ و فعال حامل ژن GH فیل ماهی را تولید نماید. نهایتاً بیان پایدار پروتئین هورمون رشد فیل ماهی به همراه پروتئین نشانگر EGFP تحت میکروسکوپ فلورسنت در این سلول ها آشکار شده و اثبات بیان توسط آنالیز RT-PCR در سطح mRNA محرز گردید. نتایج این تحقیق بیانگر این است که از لحاظ ارزیابی روش انتقال ژن بواسطه ناقلین لنتی ویروسی، این تکنیک از کارآیی بسیار بالایی برخوردار است و در جهت بستر سازی در عرصه تخلیص و انبوه سازی هورمون رشد نوترکیب فیل ماهی بعنوان دارو و نیز از دیدگاه مولکولی در جداسازی و انتقال ژن GH به ماهیان و دیگر آبزیان و تولید گونه های ترنس ژنیک، این مطالعه توانسته است راه گشا باشد.

واژگان کلیدی : *فیل ماهیHuso huso، ژن هورمون رشد، لنتی ویروس، انتقال ژن، بیان ژن*

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: zolgharnine@yahoo.com

۱. مقدمه

امروزه تکنولوژی DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیک، افق های روشنی از بیوتکنولوژی مدرن را در حوزهٔ شیلات و حفاظت از ذخایر آبزیان گشوده است، به نحویکه تشکیل پایگاه داده های عظیم ژنی آبزیان و ثبت نمونه های بسیاری از ماهیان ترنس ژنیک حامل صفات اقتصادی شیلاتی، گواه وقوع تحولاتی نوین در عرصه تکثیر و پرورش آبزیان است (Dunham, 2004).

ماهیان خاویاری (تاس ماهیان) از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی، از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه ای و بین المللی هستند و بدلیل توانایی آنها در تولید خاویار (مروارید سیاه) از جایگاه تجاری ویژه ای در صنعت شیلات و آبزی پروری برخوردارند. اما بدلیل کاهش ذخایر این ماهیان در زیستگاه های طبیعی ناشی از افزایش آلودگی های شدید زیست محیطی، بهره برداری فراتر از ظرفیت ذخایر و محدودیت مناطق جغرافیای مساعد برای رشد و بقا آنها و بسیار عوامل دیگر در حال حاضر این ماهیان با خطر انقراض گونه ها مواجه شده اند (سرافراز، ۱۳۸۴)، لذا پیروی از برنامه های بازسازی ذخایر و بهره گیری از تکنیک های پیشرفته انتقال ژن و مهندسی ژنتیک در صنعت آبزی پروری بویژه در ارتباط با تکثیر*Huso huso* و احیاء تاس ماهیان، امری اجتناب ناپذیر محسوب می شود.

در این میان فیل ماهی بزرگترین ماهی آبهای ایران است و در بین انواع تاس ماهیان بومی دریای خزر نیز، به علت سرعت رشد فوق العاده، سازگاری با شرایط پرورشی، کیفیت ممتاز خاویار و ارزش اقتصادی آن از نقطه نظرآبزی پروری بسیار حائز اهمیت است و از دیدگاه مولکولی نیز، گونه ایی مناسب برای اهداف بیوتکنولوژی شیلاتی است.

در ماهیان هورمون رشد یا سوماتوتروپین یک هورمون پروتئینی تک پلی پپتیدی با وزن مولکولی تقریبی ۲۱ تا ۲۳ کیلو دالتون است که بوسیله سلول های سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می شود. این هورمون متشکل از تقریباً ۲۰۰ اسید آمینه بوده و دارای دو باند داخلی دی سولفیدی است. وجود بخش های غنی از سیستئین در اعضای خانواده GH بیانگر این است که این توالی بشدت حفاظت شده بوده و حاکی از نقش پر اهمیت هورمون رشد در فعالیت های بیولوژیکی است (Canosa, 2007). هورمون رشد دارای یک عملکرد فیزیولوژیک پلیوتروپیک اندوکرینی است. این هورمون در تنظیم فرآیندهای متعدد و پیچیده فیزیولوژیک چون، تسریع رشد سوماتیکی، رشد و نمو گنادی، بسیج انرژی، تنظیم متابولیسم چربیها، پروتئینها و کربوهیدراتها، تنظیم اسمزی، کارکردهای سیستم ایمنی، تولید مثل، دگردیستی و تکوین، اشتها و رفتارهای اجتماعی مشارکت دارد. از آنجاکه در ماهیان بر خلاف دیگر مهره داران، رشد در تمامی طول عمر ادامه دارد، برای فعالیتهای GH می توان یک شبکه منظم و پیچیده ایی را تعریف کرد که بسیاری از فاکتورهای اندوکرینی و محیطی را در بر می گیرد (Canosa, 2007).

در حوزه مهندسی ژنتیک، روش های متعددی برای انتقال ژن های سالم در سلول های جانوری بکار می رود که می توان آنها را در چهار دسته کلی، ترانسفکشن فیزیکی، ترانسفکشن شیمیایی، ترانسداکشن (استفاده از حامل های ویروسی) و باکتریوفکشن (استفاده از حاملهای باکتریایی) تقسیم بندی نمود (Twyman, 2005). در انتقال ویروسی که شایعترین و مؤثرترین روش انتقال است از ویروس های مختلف نظیر آدنوویروس ها (AV)، ویروس های وابسته به آدنو ویروس ها (AAV)، رتروویروس ها (RV) و لنتی ویروس ها (LV) استفاده می شود(Lundstrom, 2003).

از جمله این ناقلین ویروسی، لنتی ویروس ها از خانواده رتروویریده هستند، که همانند رتروویروس ها، قادرند پس از ورود به سلول میزبان، ژن های خود را به ژنوم سلول متصل کنند و با برخورداری از یک سازوکار پیچیده، می توانند بدون نیاز به تقسیم سلولی، وارد

هسته میزبان شده و الحاق به ژنوم آن را پیش ببرند و در حقیقت ، لنتی ویروس ها قادر به آلوده سازی هر دو نوع سلول تقسیم پذیر و تقسیم ناپذیر هستند(Quinonez and Sutton, 2002). زیرا آنها برای انتقال اطلاعات ژنتیکی خود به سلول میزبان، وابسته به تقسیم سلولی نبوده و دارای یک ماتریکس پروتئینی و سیگنال جایگیری در هسته هستند که آنها را قادر می سازد، کمپلکس پیش الحاقی ویروسی را طی یک فرآیند انتقال فعال از خلال منافذ غشا هسته به درون آن منتقل کرده و امکان تلفیق پایدار ژن ها را در ژنوم سلول میزبان فراهم سازند (Ansorge, 2010). از طرفی برخلاف رتروویروس ها، برای ورود پرولنتی ویروس به هسته دیگر نیازی به تقسیم سلولی و فروپاشی دیواره هسته نیست، لذا این ویروس ها بسهولت از دیواره سالم هسته عبور می کنند (Mitchell et al., 2004). مزیت دیگر لنتی ویروس ها در الحاق ژن های خارجی به بخش های فعال ژنوم میزبان و بیان پایدار ترنس ژن در سلول میزبان بدون تحریک فرآیند خاموش سازی ژنی توسط سیستم میزبان است (Schroder et al., 2002; Mitchell et al., 2004) و تحقیقات نشان داده است که ناقل های لنتی ویروسی می توانند برای انتقال هدفمند ژن با توجه به عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و میزان بالای بیان ژن و پایداری بیان ژن و مقاومت در برابر خاموش سازی ژن بسیار موثر باشند (Ansorge, 2010). تاکنون سه نسل از ناقل های لنتی ویروسی معرفی شده است، به طوری که نسل سوم آن ها از ایمنی زیستی بالاتری با توجه به خطر بیماریزا بودن این ویروس ها برخوردار است. در این تحقیق نیز، از ناقل های لنتی ویروسی نسل سوم استفاده شده که دارای سه ناقل مجزا بدون وجود توالی های همسان در آنها است، در این صورت امکان نوترکیبی بین این ناقل ها و کنار هم قرار گرفتن ژن های ویروسی وجود ندارد (Ramezani, 2002). این سیستم شامل یک ناقل انتقال دهند و دو ناقل کمکی، غشایی و بسته بندی کننده ویروس است. همچنین در توالی (Long Terminal Repeats) LTR´3قسمتی از ناحیه U3 (که حدوداً ۴۵۰ نوکلئوتید است) حذف شده (Δu) و ژنهای ویروسی به سه ژن gag، pol و rev کاهش یافته است. به این ترتیب احتمال تشکیل RCL یا لنتی ویروس های مستعد همانند سازی و عفونت زا نیز، بسیار پایین خواهد بود (Escarpe, 2003). به جای پروتئین پوششی Env ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع I، (Human Immunodeficiency virus Tupe-1: HIV-1) از پروتئین VSV-G استفاده می شود که متعلق به ویروس وزیکولار استوماتیتیس (vesicular stomatitis) است و گرایش (Tropism) بافتی وسیعی دارد. از طرفی هیچ یک از پلاسمیدهای کمکی دارای توالی های بسته بندی و LTR نیستند (Yee et al, 1994; Zufferey et al, 1998; Ansorge, 2010). ظرفیت انتقال ژن توسط ناقل های لنتی ویروسی محدود و حدود ۹ کیلوباز است(Segura, 2006). که البته این مسئله در مورد ژن های کوچک سایزی چون هورمون رشد فیل ماهی مشکلی ایجاد نمی کند. از این رو در تحقیق حاضر، لنتی ویروس ها برای انتقال ژن هورمون رشد فیل ماهی به سلول های بنیادی جنینی انسانی برگزیده شدند. بدین منظور و در اولین گام در مسیر فوق، توالی نوکئوتیدی ژن هورمون رشد (GH)، بعنوان مهمترین ژن در بحث افزایش و تسریع رشد آبزیان، به بدنه لنتی ویروس های نوترکیب (بعنوان وکتورهای انتقال دهنده) و همینطور به سازه های غیر ویروسی (بعنوان وکتور حامل ژن) متصل شد و یک سازه ژنی متشکل از ژن هورمون رشد فیل ماهی تحت کنترل پروموتورهای مناسب طراحی و ساخته شد و سپس این سازه ژنی توسط ناقل لنتی ویروسی با هدف وارد شدن پایدار در ژنوم میزبان و بیان ژن به رده سلولی هدف بعنوان یک مدل یوکاریوتیک منتقل گردید.

۲. مواد و روش ها

همه پلاسمیدها با روش ترنسفورماسیون (Transformation) در باکتری اشرشیاکلی گونه Top10F′و براساس دستورالعمل استاندارد مربوط تکثیر شدند(Sambrook et al., 2001). برای رشد باکتریها از محیط LB-broth (Luria Bertani-broth) ساخت شرکت (آلمان، Merck) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین استفاده شد .کلیه دستکاری های مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، T/A وکتورکلونینگ و واکنش های آنزیمی، برش های آنزیمی، تخلیص از ژل، غربالگری، ژل الکتروفورز آگاروز، انبوه سازی نمونه های پلاسمیدی، واکنش های ترانسفورماسیون و لیگاسیون و غیره بر اساس دستورالعمل شرکت های سازنده کیت ها انجام شد. خالص سازی نمونه های پلاسمیدی استفاده شده در این مطالعه با استفاده از کیت Maxiprep و Miniprep از (آلمان، Qiagen) انجام شد. کیت استخراج از ژل نیز از (آلمان، Roche) تهیه گردید. آنزیمهای آندونوکلئاز محدود کننده از (لیتوانی، Fermentas) و آنزیم T4 DNA لیگاز از پرومگا تهیه شده است. سنتز آغازگرها(Primers) نیز توسط شرکت (ایران، Gen Fanavaran) انجام پذیرفت.

در تحقیق حاضر از محصول PCR ژن هورمون رشد فیل ماهی *H. huso* به طول ۶۴۵ bp و به شماره ثبت AB 517597 در بانک ژنی (NCBI) استفاده شد. این قطعه cDNA ژن، طی یک نمونه برداری از بافت غده هیپوفیز ده قطعه از فیل ماهیان مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر شهید بهشتی، به روش RT-PCR ساخته شده است. آزمایشات در این تحقیق شامل دو بخش مولکولی و سلولی می باشند.

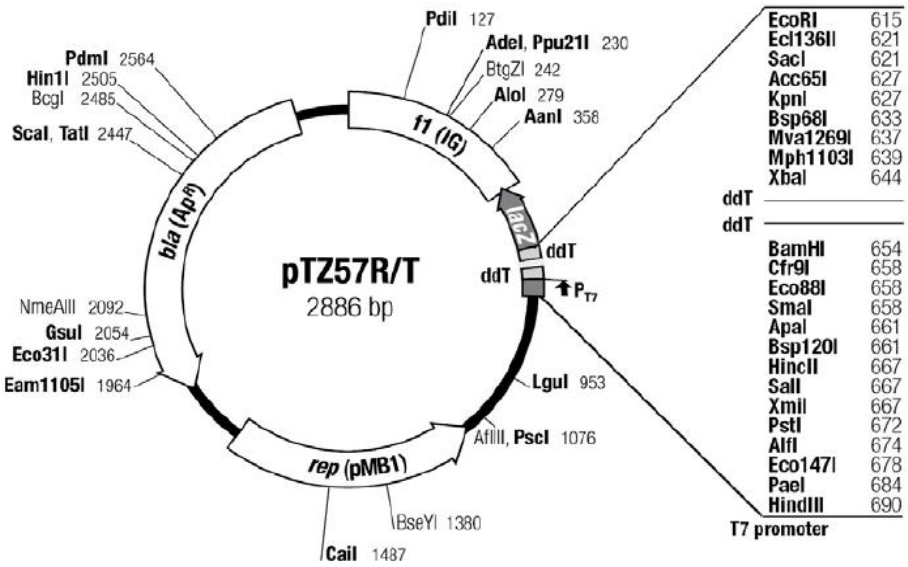
آزمایشات بخش مولکولی شامل دو مرحله کلونینگ است، نخست کلون ژن هورمون رشد فیل ماهی در ناقل غیر ویروسی (کلونینگ وکتور pTZ57R/T) و دوم اتصال این ژن به ناقل لنتی ویروسی (pNL-EGFP/CMV- WPRE) و سپس انجام آنالیز های بیانی و عملکردی است. ناقلین لنتی ویروسی نیز بنام های pLV-EGFP (pNL-EGFP/CMV-WPRE) (ناقل انتقال یا ترانسفر)، pCD/NL-BH*ΔΔΔ (ناقل بسته بندی ویروس)، LTR-G (ناقل غشائی)، از آزمایشگاه Reiser تهیه شدند (Pluta et al., 2005).

آغازگرهای مورد نیاز با قرار دادن جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای ′5 طراحی و سفارش ساخت آنها داده شد(جدول۱). برنامه واکنش PCR آن طی ۳۰ سیکل به ترتیب برای پرایمرهای اختصاصی ژن GH فیل ماهی به این قرار است: واسرشت سازی (Denaturation) اولیه به مدت ۵ دقیقه و واسرشتگی ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه هر یک در دمای ۹۴ °C درجه سانتیگراد، دمای اتصال (Annealing) آغازگر برای قطعه ژن GH ۵۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای طویل شدن و بسط (Extension) ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و ۱۰ دقیقه نیز در دمای ۷۲ °C برای انکوباسیون و در انتها محصول PCR که یک قطعه ژن ۶۴۵ bp است در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداشته شد. شرایط واکنش PCR توسط پرایمرهای درون ژنی که به گونه ایی طراحی شده اند که یک قطعه ۳۰۰bp را درون ژن GH فیل ماهی تولید نمایند، برای۳۰ سیکل، عبارت است از : ۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و ۳۰ ثانیه برای واسرشت سازی ثانویه هر دو در دمای ۹۴ °C، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷/۳ °C برای اتصال، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ °C برای بسط و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C برای انکوباسیون.

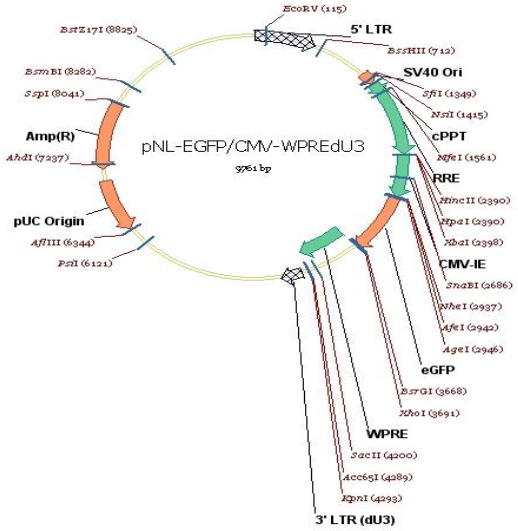
جدول۱. توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعات سازه ژنی هورمون رشد و طول قطعات محصولات PCR آن ها

طول قطعات حاصل از PCR	آغازگر	توالی آغازگر
جفت باز ۶۴۵ = HGH	HGH - F1	5'ATG ATG GCC ATG GCA TCA GGT CTG CTT CTG TG 3'
	HGH - R1	5' GTC CCA AGC TT CTA CAG AGT ACA GTT GCT CTC CAC 3'
۳۰۰ = قطعه درون ژنی جفت باز	F2	5' - GAT GAG GCT CAA CAG CGA TCA G - 3'
	R2	5' - CAT GTC ACC ACC GTA TGT CTC C - 3'

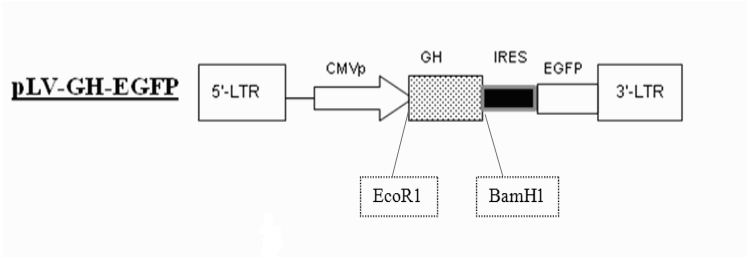
محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز ۱٪ با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورا بنفش دستگاه مستند ساز ژل (دستگاه مولد UV) مشاهده شد. باندهای ژن مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص DNAاز ژل، High pure PCR product purification kit محصول شرکت (آلمان، Roche) بازیافت و تخلیص شد. در اولین مرحله از کلونینگ ژن هورمون رشد فیل ماهی، قطعه ژن GH تکثیر شده، به طور جداگانه در ناقل کلونینگ pTZ57R/T(لیتوانی، Fermentas) طبق دستورالعمل کیت InsTAclone™ PCR Cloning Kit و طی واکنش الحاق (لیگاسیون) (دمای ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز) کلون گردید. فرآیند ترانسفورماسیون و انتقال DNA پلاسمیدی به سلولهای باکتریایی مستعد شده *E. coli* سویه Top 10با استفاده از تکنیک شوک حرارتی انجام پذیرفت. سپس آنالیز پلاسمیدهای نوترکیب ترانسفورم شده با روش هضم آنزیمی و بوسیله آنزیم های اندونوکلئاز تعریف شده توسط کیت (شکل-۱) و توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز و نیز روش آنالیز PCR انجام شد. با توجه به جایگاه های آنزیمی تعبیه شده در وکتور pTZ57R/T و نیز جایگاه آنزیمی مد نظر در وکتور لنتی ویروسیpNL-EGFP/CMV-WPRE ، برش ژن GH در وکتور حامل و برش وکتور ناقل لنتی ویروسی توسط آنزیمهای محدود کننده (EcoR1/BamH1) صورت پذیرفت (شکل-۱) و بدین شکل ژن GH در ناقل ترانسفر لنتی ویروسی pLV-EGFP در فرادست ژن EGFP بواسطه قطعه IRES پیوند زده شده و پلاسمید نوترکیب نهایی pLV-GH-IRES-EGFP نامیده شد (شکل ۲و۳). برای تأیید صحت پلاسمید نهایی، واکنش PCR و واکنش هضم آنزیمی برای این قطعات در این پلاسمید انجام پذیرفت. برای تعیین توالی سازه ژنی، آغازگرها طراحی و همراه نمونه به منظور تعیین توالی ارسال شد (ایران، Gen Fanavaran). پلاسمید pLV-GH-EGFP برای استفاده در مراحل بعدی با کیت تخلیص پلازمید Maxiprep (آلمان، Qiagen) استخراج شد.



شکل۱. پلاسمید pTZ57R/T (InsTAclone™ PCR Cloning Kit).



شکل۲. نمای شماتیکی از ناقل لنتی ویروسی (pNL-EGFP/CMV-WPRE). (Reiser, 2000). در تحقیق حاضر، ساب کلون های دیگری از این وکتور پایه تهیه شده است که جایگاه های آنزیمیEcoR1/BamH1 نیز در آن تعبیه گردیده است که در تصویر نشان داده نشده است.



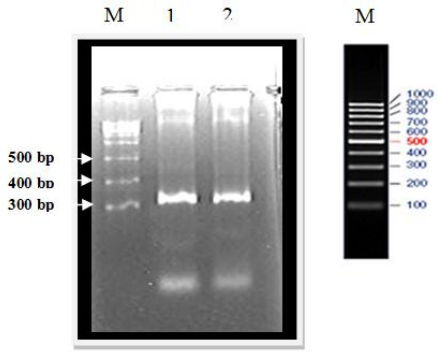
شکل۳. شمائی از ناقل لنتی ویروسی نوترکیب حامل ژن هورون رشد فیل ماهی(pLV-GH-EGFP). این ناقل دارای یک توالی GH و یک کاست IRES-EGFP است، که مجموعاً تحت کنترل پروموتور CMV می باشند.

کلیه مراحل بخش سلولی با اقتباس از روش های آزمایشگاهی استاندارد انجام پذیرفته است(Freshney, 1994). سلول های مولد ویروسی از رده HEK-293T از بانک سلولی پاستور تهیه شدند و در محیط کشت High Glucose DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین (آنتی بیوتیک / Pen Strep)، ۲ میلی مولار گلوتامین به همراه ۱۰٪ سرم گاوی(FBS)، در انکوباتور مرطوب با شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 کشت و پاساژ داده شدند(تمامی مواد از شرکتGibco،آمریکا). دیگر مواد لازم نیز عبارتند از: $NaHCO_3$، محلول بافر نمکی (PBS)، محلول 2X HBS ، محلول ترپسین ، فلاسک T75وT25، پلیت های کشت سلول ، تریپان بلو و لام نئوبار. برای ترانسفکشن(Transfection) و تولید ویروس، حدود ۲ میلیون سلول HEK-293T در پتری دیش های ۱۰ سانتی متری گرد مخصوص کشت سلول ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد حدوداً ۵۰-۶۰٪ فضای پتری دیش را پر نمایند. برای آلوده سازی ویروسی نیز تعداد ۴۰۰ هزار سلول در پلیتهای ۶ خانه و ۲۴ ساعت قبل از ترانسداکشن (آلوده سازی) کشت داده شدند. برای تولید لنتی ویروس های نوترکیب و فعال از روش ترنسفکت با کمپلکس DNA- لیپوفکتامین و ازکیت حاوی کمپلکس های DNA-LipofectamineTM 2000(آمریکا، Invitrogen) استفاده شد. برای این منظور، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، محیط سلول های مولد ویروس را ۲ ساعت قبل از ترنسفکشن تعویض کرده و ۲ لوله میکروفیوژ ۱/۵ میلی لیتری آماده گردید. در لوله شماره ۱ همزمان سه ناقل لنتی ویروسی را به میزان ۲۰ میکروگرم از ناقل ترانسفر و ۱۵ میکروگرم از هریک از ناقلین بسته بندی و غشائی ریخته و با آب استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در لوله شماره ۲ نیز از محیط DMEM بدون سرم، به میزان ۴۷۵ میکرولیتر و از محلول لیپوفکتامین به میزان ۲۵ میکرولیتر ریخته، محلول های هر دو لوله بخوبی پیپتاژ گردید، سپس لوله شماره ۲ را به لوله شماره ۱ اضافه کرده، پس از پیپتاژ مجدد محلول حاصله را بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق و زیر هود نگه داشته شد، تا محلول مطلوبی از DNA بدست آید. سپس این محلول را بصورت قطره ای و به آرامی به سلول ها اضافه گردید. پس از آن سلول های ترنسفکت شده (Transfected cells) به مدت ۶-۵ ساعت در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. روز بعد محیط کشت آنها با محیط DMEM جدید حاوی ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS) تعویض گردید. بعد از این مراحل سلول ها تا تولید ویروس و رها سازی آن به محیط در شرایط انکوباتوری مذکور در بالا نگهداری شدند.برای این منظور، محیط کشت سلول های مولد ترانسفکت شده (سوپ رویی محتوی ویروس های نوترکیب) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن جمع آوری شده و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون گذرانده شد. آزمایشات مقایسه ای ما نشان داده است که چنین ترکیبی، از قدرت آلودگی و انتقال ژن بالاتری برخوردار است. سپس محیط فیلتر شده به درون ستون های تخلیص پروتئین Amicon-100 MW (Millipore) ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. این مرحله منجر به عبور بخش اعظم سوپرناتانت از فیلتر ستون فوق و عملاً جدا شدن آن از بقیه محلول می شود. بدین گونه با انجام یک مرحله فیلتراسیون، از وجود آلودگی باکتریایی اطمینان حاصل شده و محلول باقیمانده در پشت ستون فیلتر که محلولی غلیظ، تیره و مملو از ذرات ویریونی است، حجمی معادل ۵۰۰ میکرولیتر را داراست. این محلول را به لوله های میکروفیوژ منتقل کرده و بعنوان استوک ویروسی بلافاصله مورد استفاده قرار داده شد. برای آلوده ساختن سلول های هدف حجم های مختلفی از این استوک (مقادیر۵۰ ، ۱۰۰ و۲۰۰ میکرولیتر) را به ترتیب به سه خانه از ۶ خانه پلیت سلولی به صورت

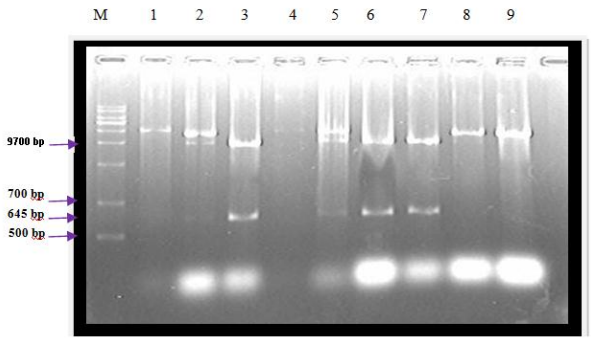
قطره ای و به آرامی اضافه کرده و در شرایط رشد ذکر شده در بالا انکوبه گردید، تا بیان ترانس ژن فلورسنت رویت شود. تصاویر سلول ها در مراحل ترانسفکشن و آلودگی ویروسی در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و ذخیره شد. بدین گونه بیان ژن نشانگر EGFP با میکروسکوپ فلورسنت آشکار شده و بیان mRNA ژن هورمون رشد فیل ماهی با روش RT-PCR محرز گردید.به منظور تأیید تولید لنتی ویروس های نوترکیب و بررسی کیفی بیان در سطح رونویسی ژن، از تکنیک RT-PCR استفاده شد. در این راستا، کل RNA سنتز شده در سلول‌های ترانسفکت شده با سازه های نوترکیب لنتی ویروسی، با استفاده از کیت تخلیص RNA موسوم به RNAX plus، از شرکت (ایران، Cinnagen) استخراج شد. سپس برای سنتز cDNA، ۱ میکروگرم از نمونه RNA تیمار شده با DNAase و عاری از RNAase را، با آنزیم رونوشت بردار معکوس (M-MLV reverse transcriptase) مخلوط کرده و طی تیمار بمدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و در حضور آغازگر هگزامر تصادفی(Random Hexamer) و مهارکننده RNase و نهایتاً ۱۰ دقیقه ماندن در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، رونویسی معکوس آن صورت پذیرفت. پس از اطمینان از سالم بودن cDNA های حاصله در روی ژل، واکنش PCR به تعداد ۳۰ چرخه در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۷۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۵ میلی مولار dNTP، ۱ میکرولیتر از هرآغازگر و ۰/۳ واحدآنزیم Taq پلیمراز (ABI, USA) AmpliTaq Gold DNA polymeras براساس دستورالعمل استاندارد انجام شد.

۳. نتایج

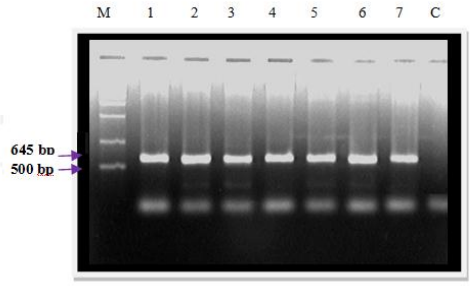
از جمله نتایج این تحقیق مهندسی ژن هورمون رشد فیل ماهی (GH) است، بدین شکل که قطعه ۶۴۵ جفت بازی ژن GH ابتدا یک ناقل کلونینگ موسوم به pTZ57R/T طی واکنش الحاق متصل شده و صحت کلونینگ با روش آنالیز PCR و واکنش هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت (شکل ۴). در ادامه این قطعه ژن GH (۶۴۵ جفت بازی) طی یک واکنش هضم آنزیمی(EcoR1/BamH1) از این ناقل اولیه جدا شده و در بدنه ناقل لنتی ویروسی pNL-EGFP/CMV-WPRE (جفت بازی ۹۷۰۰) ساب کلون گردید. بدین ترتیب در وکتور لنتی ویروسی pLV-EGFP ژن GH در فرادست EGFP پیوند زده شد و پلاسمید نوترکیب نهایی با طولی در حدود ۱۰۳۰۰ جفت بازی pLV-GH-EGFP نامیده شد. صحت و درستی تمام مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ با PCR وآنالیز آنزیمی تأیید شد (شکل ۵ و۶). درآخر نیز pLV-GH-EGFP توسط شرکت ژن فن آوران تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی، فقدان هرگونه جهش بیماری زا در ژن هورمون رشد فیل ماهی را مورد تایید قرار داد.



شکل۴. تصویر ژل الکتروفورزی قطعات حاصل از واکنش PCR با پرایمرهای درونی در پلاسمید pTZ57R/T حامل ژن GH. M- مارکر استاندارد با وزن ۱۰۰ جفت باز(شرکت Fermentas)، ۱- ژن GH (کنترل) و ۲- پلاسمید نوترکیب حامل ژن GH.



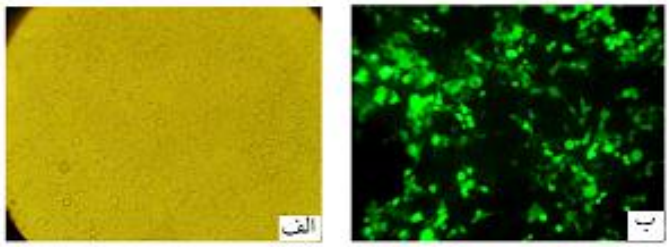
شکل۵. تصویر ژل الکتروفورزی از کلون های غربال شده طی فرآیند برش آنزیمی توسط آنزیمهای (EcoR1/BamH1). M- مارکر استاندارد با وزن ۱ کیلو بازی(شرکتMetabion)، ردیفهای ۲،۳،۵،۶،۷- پلاسمیدهای خطی و برش خورده توسط آنزیم.



شکل۶. تصویر ژل الکتروفورزی محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب pLV-GH-EGFP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GH. M- مارکر استاندارد با وزن ۱۰۰ جفت باز (شرکت Fermentas)، ۱- محصول PCR ژن GH، ۲-۷- محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب، C- کنترل منفی(H_2O).

۳-۲. ترانسفکشن سلول ها و تولید ویروس

سلول های بنیادی جنینی HEK-293T مولد ویروس با بکارگیری ناقل لنتی ویروسی نوترکب pLV-GH-EGFPبه روش لیپوفکشن ترانسفکت شدند. حدوداً ۱۰ ساعت بعد بیان پروتئین گزارشگر EGFP در نمونه های ترنسفکت شده، در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد و تصاویر حاصل از بیان نمونه های $EGFP^+$، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن عکس برداری شدند (شکل ۷).



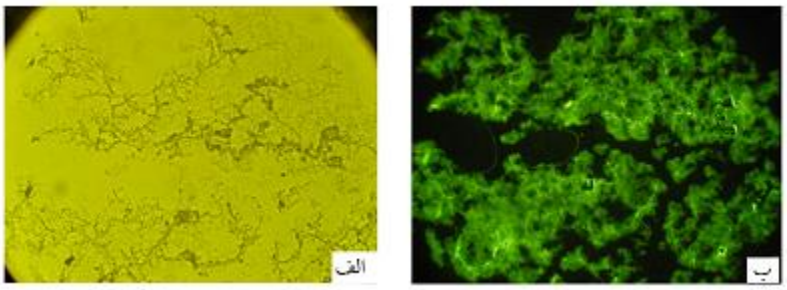
شکل۷. تصویر میکروسکوپی سلول های ترانسفکت شدهHEK-293T با پلاسمید بیانی pLV-GH-EGFP به روش لیپوفکشن را در شرایط بدون نور فلورسنت(الف) و نور فلورسنت(ب) نشان می دهد.

۳-۳. ترانسداکشن سلول ها و بیان ژن GH در سطح mRNA

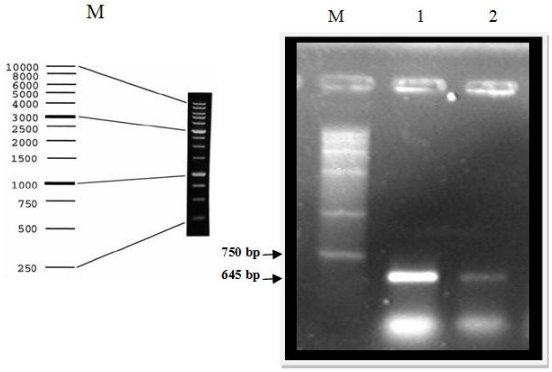
سلولهای HEK-293T که توسط ناقل لنتی ویروسی نوترکب pLV-GH-EGFP با تیتر $۱۰^۸$ TU/ml با مقادیر۵۰ ، ۱۰۰ و۲۰۰ میکرولیتر به ترتیب در سه خانه از پلیت ۶ خانه ترانسدیوس (Transduce) و آلوده سازی شده بودند. پس از گذشت ۳ روز (۷۲ ساعت)، شروع به بیان پروتئین نشانگر EGFP

نمودند(شکل ۸). در بررسی بیان ژن تحت میکروسکوپ فلورسنت مشخص شد که در پلیت ۶ خانه، در خانه اول حدود ۵۰ ٪ از سلولها، در خانه دوم ۱۰۰٪ و در خانه سوم حدود ۷۵ ٪ از سلولها GFP^+ بودند و این امر نشان دهنده این است که حدود یک پنجم (۱۰۰ میکرولیتر) از استوک تغلیظ شده ویروسی، توانسته تقریباً ۱۰۰٪ سلولها را آلوده سازد.

با استخراج RNA سلول های آلوده شده به ویروس، پس از اطمینان از بیان EGFP توسط آنها، واکنش RT-PCR برای تایید بیان GH و سنتز cDNA انجام شد(شکل۹). در نهایت تکثیر سازه ژنی سنتز شده توسط واکنش PCR از روی DNA سلول های آلوده سازی شده و نیز تعیین توالی محصول PCR تایید کننده ورود سازه ژنی GH در ژنوم سلول میزبان بود.



شکل۸. تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین EGFP توسط سلولهای HEK-293T آلوده شده با لنتی ویروسpLV-GH-EGFP. این تصویر سلول های آلوده شده را در شرایط بدون نور فلورسنت(الف) و نور فلورسنت(ب) نشان می دهد.



شکل۹. تصویر ژل الکتروفورزی از محصولات نهایی واکنش RT-PCR سلول هایHEK-293T آلوده شده به ویروس ناقل pLV-GH-EGFP. M- مارکر استاندارد با وزن ۱ کیلو بازی(شرکتMetabion)،۱- سازه ژنی سنتز شده با cDNA سلول های آلوده شده با لنتی ویروس های نوترکیب، ۲- سازه ژنی سنتز شده با cDNA سلول های ترانسفکت شده با لنتی ویروس های نوترکیب.

۴. بحث و نتیجه گیری

در طول دهه های اخیر اکثریت تحقیقات در زمینه مهندسی ژنتیک آبزیان، برانتقال ژن هورمون رشد متمرکز شده است و این ژن معمول ترین ژنی است که به منظور افزایش و تسریع رشد و اصلاح ژنتیک آبزیان پرورشی، مورد بهره برداری قرار گرفته است (Anathy et al., 2001) . در تحقیق حاضر نیز، ژن هورمون رشد فیل ماهی را برگزیده و به منظور تولید لنتی ویروس های نوترکیب حامل cDNA ژن هورمون رشد(GH)، کلونینگ این ژن، در سازه های ویروسی و غیر ویروسی انجام پذیرفت، سپس برای حصول اطمینان از عملکرد صحیح ژن هورمون رشد، بیان این ژن در سلول های بنیادی جنینی انسانی (یک رده سلولی پستانداران) بعنوان مدلی یوکاریوتیک، مورد ارزیابی قرار گرفت.

تاکنون تعداد زیادی از ژنهای هورمون رشد ماهیان، در باکتری اشرشیا ایکلی *Escherichia coli* به عنوان

یک مدل پروکاریوتیک کلون و بیان شده است که در مطالعات فیزیولوژیک و تغذیه ماهیان از کاربردهای بسیاری برخوردار بوده است (Chen et al., 2000; Ben-Atia et al.,1999; Sekine et al.,1985). اما با این وجود *E. coli* یک پروکاریوت است و بسیاری از خصوصیات اصلی و طبیعی نظیر فرآیندهای تولید پروتئین، تاه خوردگی پروتئینها و اصلاحات پس ترجمه ایی آن، اساساً با یوکاریوتها متفاوت است. از طرفی ظرفیت پائین *E. coli* در فرآیندهای پس ترجمه ایی باعث شده تولید پروتئین های نوترکیب فعال در آنها کمتر صورت پذیرد (De Bernardez Clark, 1998). با توسعه و پیشرفت سیستم های بیانی یوکاریوتیک، چندین مورد از هورمون رشد ماهیان، در سلول های یوکاریوتیکی چون مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Pichia pastoris* و سلولهای HeLa cell line نیز بیان شده است (Tsai et al.,1994; Feng, 2006). با این وجود تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر بیان ژن هورمون رشد ماهیان در سلولهای بنیادی یوکاریوتیک HEK- 293T منتشر نشده است. از طرفی با توجه به اینکه لنتی ویروس ها در بحث انتقال ژن در قیاس با دیگر روش ها از مزایای برجسته ایی برخوردارند. این امر سبب شده تا از لنتی ویروس ها به عنوان ناقلین ژن برتر، برای مطالعات فیزیولوژیکی- تکاملی و ترنس ژنیک استفاده گردد، زیرا ناقل های لنتی ویروسی قادرند هر دو نوع سلول هدف در حال تقسیم و تقسیم ناپذیر را از طریق تشکیل کمپلکس پیش الحاقی (Preintegration) که از غشای هسته عبور می کنند و ژن را در ژنوم سلول تلفیق می سازد، آلوده سازند. این امر باعث انتقال موثر و بیان بالای ژن خواهد شد (Ansorge et al., 2010).

وکتورهای بی سیسترونیک اساساً برای بیان مستقل دو ژن (یکی ژن کاندیدا و دیگری ژن گزارشگر) ایده آل هستند، زیرا بخاطر وجود عناصر IRES در ساختار این وکتورها امکان بیان همزمان ژن کاندیدا و ژن گزارشگر تسهیل شده است. امروزه کارایی بسیار بالای این وکتورهای بی سیسترونیک در سیستم های بیانی ماهیان و پستانداران به اثبات رسیده است(Anathy et al.,2001) . از این رو در تحقیق حاضر از یک وکتور بی سیسترونیک لنتی ویروسی با ژن گزارشگر EGFP استفاده شد و پلاسمید نهایی ساخته شده pLV-GH-IRES-EGFP نامگذاری شد. بدین ترتیب بیان EGFP نشانگر سهمی از بیان هورمون رشد نیز، است و تراکم رنگ سبز یک نشانگر قوی مبنی بر شدت بیان ژن است. در مطالعه حاضر، پس از ساخت سازه های لنتی ویروسی نوترکیب ناقل ژن هورمون رشد فیل ماهی، توالی کلون شده در این ناقل، توسط شرکت ژن فن آوران تعیین توالی شده و پس از BLAST توالی نوکلئوتیدی آن در NCBI با توالی نوکلئوتیدی هورمون رشد فیل ماهی، صحت کلونینگ تایید شد. بعلاوه نتایج حاصل از آنالیز بیانی نشان داده است که اولاً این سازه لنتی ویروسی نوترکب توانسته است، توالی ژن هورمون رشد فیل ماهی را بیان کند. ثانیاً سلول های آلوده شده به ویروس نوترکیب نیز، قادر به سنتز و ترشح هورمون رشد بالغ و فعال به محیط خارج شده اند. از دیگر نتایج این تحقیق بهبود روش های ترنسفکشن سلولی با بهره گیری از روش لیپوفکشن است زیرا اگرچه تکنیک هم رسوبی DNA- فسفات کلسیم یک روش معمول برای ترانسفکشن است اما روشی مشکل بوده و با محدودیت هایی نظیر بالا بودن میزان حجم DNA نوترکیب مصرفی، حساسیت سلول ها به حضور کینتیک های رسوبی و تغییرات pH مواجه است (Ansorge et al., 2010; Toledo et al., 2009). در حالیکه روش لیپوفکشن کاربری بسیار ساده تری داشته و تشکیل کمپلکس لیپوپلکسی DNA- لیپوفکتامین آن، برای سلول ها از سمیت کمتری برخوردار است و بالا بودن نرخ $EGFP^{+}$ بودن سلول ها در مرحله ترانسفکشن موید این امر است.

تحقیق حاضر نشان داد که میزان ۱۰۰ میکرولیتر از استوک ویروسی تغلیظ شده برای آلوده سازی تمامی سلول ها مناسب است، در حالیکه نرخ اینفکت و$EGFP^+$ بودن سلول ها در دوز بالاتر (۲۰۰ میکرولیتر)، کمتر از میزان قبل بود و این امر بیانگر سمیت دوزهای بالای ویروس، برای سلول ها است.

Sanchesو همکارانش در سال ۲۰۰۴ در بررسی رابطه بین دوز مصرفی ویروس و سطح بیان پروتئین های نوترکیب نتایج مشابهی را کسب کرده و نشان دادند که، اساساً مقدار دوز مصرفی ویروس ها برای آلوده سازی سلول های هدف و ترشح پروتئین با محدودیت هایی مواجه است و دوزهای بالا می توانند بر سلول ها، اثرات سیتوپاتیک داشته و منجر به واکنش های شدید سیتوتوکسییک سیستم ایمنی در سلول های آلوده گردند (Sanches et al., 2004). از لحاظ ارزیابی روش انتقال ژن به سلول ها بواسطه ناقلین لنتی ویروسی، تحقیق حاضر نشان داد که، این تکنیک از کارآیی بسیار بالایی برای ترانسدیوس کردن سلول های پستانداران برخوردار است، لذا در مطالعات آینده می توان از آنها برای ارائه ژن به سلول های جنسی ماهیان در بحث تولید ماهیان ترنس ژنیک (بالاخص دیگر گونه های ماهیان خاویاری و افزایش تولید محصول ارزشمند آنان) استفاده کرد. بعلاوه در عرصه انبوه سازی دارو نیز می توان این هورمون رشد را تخلیص کرده و میزان تولید آن در سلول های مولد مستعد تعیین نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با هزینه طرح پژوهشی مصوب در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به انجام رسیده است. لیکن کلیه مراحل آزمایشگاهی این تحقیق در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران (NIGEB) اجرا گردید که از مدیریت و کلیه کارکنان این پژوهشگاه و نیز مرکز مطالعات خلیج فارس بخاطر ارسال ژن و دیگر همکاریها، صمیمانه سپاس گذاری می گردد.

منابع

سرافراز، ژ. و اکبریان، م. ع.، ۱۳۸۴. مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر، انتشارات نقش مهر، تهران.

Anathy, V., Venugopal, T., koteeswaran, R., Pandian, T. J. and Mathavan, S., 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). Journal of Biosciences, Vol. 26, 315-324.

Ansorge, S., Henry, O. and Kamen, A., 2010 .Recent progress in lentiviral vector mass production. Biochemical Engineering Journal. *Review*, 48: 362-377.

Ben-Atia, I., Fine, M., Tandler, A., Funkenstein, B., Maurice, S., Cavari, E., and Gertler, A., 1999. Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. General and Comparative Endocrinology, 113: 155-164.

Canosa, L. F., Chang, J. P. and Peter, R. E., 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. Endocrinology, 151: 1-26.

Chen, C. M., Cheng, W. T., Chang, Y. C., Chang, T. J., and Chen, H. L., 2000. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. Life Sciences, 67: 2103-2115.

De Bernardez Clark, E., 1998. Refolding of recombinant proteins. Current Opinion in Biotechnology, 9: 157- 163.

Dunham, R. A., 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology : Genetic Approaches , Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn, University Alabama USA, CABI Publishing. Pp. 7 - 13, 160 - 192, 207 - 211.

Escarpe, P., Zayek, N., Chin, P., Borellini, F., Zufferey, R., Veres, G. and Kiermer, V., 2003. Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large scale HIV-based vector preparations. Molecular Therapy, 8: 332-341.

Feng, H., Cheng, J., Luo, J., Liu, S. J. and Liu, Y., 2006. Cloning of Black carp β-actin gene

Schroder A. R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J. R., and Bushman F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. Cell, 110: 521-529.

Segura, M. M., Kamen, A. and Garnier, A., 2006. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. Biotechnology Advances, 24: 321-337.

Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S. and Kawauchi, H., 1985. Cloning and expression of Salmon growth hormone in *Escherchia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82: 4306-4310.

Tsai, H. J., Kuo, J. C., Lou, S. W. and Chen, T. T., 1994. Growth enhancement of juvenile striped mullet by feeding recombinant yeasts containing fish growth hormone. Progressive Fish-Culturist, 56: 7 -12.

Toledo, J. R., Prieto, Y., Oramas, N. and Sanchez, O., 2009. Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology, 157: 538-544.

Twyman, R. M., 2005. Gene Transfer to Animal Cells. BIOSciences, ISBN. 1 8599 6204 1.

Yee, J. K., Friedmann, T., Burns, J. C., 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. Methods Cell Biology, 43: 99-112.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D., 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivogene delivery. *Journal of Virology*, 72(12): 9873-80.

and primarily detecting the function of its promoter region. Acta Genetica Sinica, 33 (2): 133-140.

Freshney , I. R., 1994**.** Culture of animal cells, A Manual of basic technique. 3rd edition, Alan R. InC, new York.

Lundstrom, K., 2003. Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends in Biotechnology, 21(3): 117-122.

Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., Bushman, F. D., 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. PLoS Biology, 2: E234.

Pluta, K., Luce, M. L., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., Reiser, J., 2005. Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. Gene Medicine, 7: 803-817.

Quinonez, R., Sutton, R. E., 2002. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA Cell Biology, Review. 937-51.

Ramezani, A., and Hawley, R. G., 2002. Overview of the HIV-1 lentiviral vector system. Current Protocols in Molecular Biology Supplement, 60, 16. 21. 1-16. 21.15.

Sambrook, J., Russel, D. and Maniatis., 2001. Extraction and purification of plasmid DNA. In molecular cloning: laboratory manual. Trd edition. CSHL Press. New York. Pp. 1.21-1.52.

Sanches, O., Toledo, J. R., Rodriguez, M. P. and Castro, F. O., 2004. Adenoviral vector mediates high expression in the milk of mice and goats. Biotecnology, 114: 89-97.

Cloning of the GH gene from the Beluga sturgeon (*Huso huso*) into a Lentivial & none viral constructs and its Expression in HEK Cell Lines

Sakine Mashjoor[1], Hossein Zolgharnain[1*], Mossa Gardaneh[2], Mohammad Ali Salari Aliabadi[1], Ahmad Qasemi[3], Zahra Azimi [1]

1.Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, P.O.Box: 669, Khoramshahr, Iran

2.National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), , P.O.Box:14965-161, Tehran, Iran

3. Persian Gulf Research and Studies Center (PGRSC), P.O.Box: 7516913798, Boushehr, Iran.

Abstract

Caviar-producing fish with their economically valuable product are important in fisheries. The cDNA growth hormone (GH) of Beluga sturgeon (*Huso huso*) was constructed using total RNA from pituitary glands. To construct the recombinant and active lentiviruses carring GH gene, this DNA sequence was inserted into the cloning vector pTZ57R/T and subsequently cutted from pTZ57R/T by endonuclease enzyme and incorporated into lentivirus vector pNL-EGFP/CMV-WPRE on upstream of an IRES cassette. We also insert a reporter EGFP gene downstream of IRES so transfection and transduction steps can be traced. Using this vector plus virus packaging and envelope vectors, HEK-293T cells was co-transfected by DNA-Lipofectamine complexes method. Cell supernatant full of virions was collected 48 hours later and concentrated using Amicon columns to obtain a high-titer virus stock. Nearly 1/5 of this stock was applied to a new batch of cultured HEK-293T. After 72h expression of EGFP gene was detected and the cells was collected for further analysis. Total RNA of these transduced cells was extracted and GH mRNA expression was revealed by RT-PCR. Results showed that, lentiviral vectors (LV) as a gene transfer system provide efficient delivery, integration and long-term expression by establishing a stable provirus in target cells and could be important tool in aquaculture and fisheries biotechnology research to increase the growth rate of farmed fish by transferring growth hormone (GH) transgenes into fish.

Key words: *growth hormone, Huso huso, Lentivirus, Gene Expression,Transgene.*

[*]Coesponding author, Email**:** zolgharnine@yahoo.com