"مقاله پژوهشی"

بیوتکنولوژی انتقال ژن در ماهی زبرا به عنوان مدل تحقیقاتی انتقال ژن در آبزیان پرورشی

شیرین جمشیدی[۱*]، شکان بنان[۲]

۱. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۲. گروه علوم و مهندسی شیلات و محیط‌زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۵

چکیده

جهت ایجاد ماهی رنگی زینتی زبرا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای پیشبر دو ژن انتخاب شده در سلول‌های عضلاتی و همسانه‌سازی این قطعات ژنی در وکتور *Tol2* که خود حاوی ژن پروتئین فلوئورسنت سبز (GFP) بود در ناحیه خوانش باز (ORF) صورت گرفت. به ترتیب قطعات ۲۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت بازیِ ناحیه پیشبر ژن‌های MYLZ2 و CKMB بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شده، در وکتور بیانی *Tol2* دارای جایگاه برشی آنزیم *SalI* همسانه‌سازی شد و به باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) سویه Dh5α انتقال یافت. همسانه‌های مثبت توسط colony PCR با استفاده از آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت و برای استخراج پلاسمید نوترکیب کشت شد. پلاسمید نوترکیب استخراج شده توسط هضم آنزیمی *SalI* بررسی شد و به کمک آغازگرهای عمومی تعیین توالی گردیدند. در این مطالعه، به ترتیب قطعات ۲۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت بازیِ راه انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB در وکتور بیانی *Tol2* همسانه-سازی شدند که تایید آن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توالی‌یابی و هضم آنزیمی صورت گرفت. همچنین، پلاسمید نوترکیب کشت داده شد و برای تزریق به همراه یک رونوشت سنتتیک خالص‌سازی گردید. جنین‌های تک سلولی تزریق شده (توسط پلاسمید نوترکیب و رونوشت) به وسیله میکروسکوپ فلوئورسنس برای بررسی بیان GFP آزمایش شدند و مشخص شد که بیان GFP در سلول‌های عضلانی برخی از نتاج نسل F_0 روی داده است. پلاسمیدهای نوترکیب شده با استفاده از پیشبرهای مختص سلول‌های عضلانی (MYLZ2 و CKMB) قادر به القاء بیان GFP در برخی از جنین‌های نسل F_0 به صورت موقت بودند و از این رو می توانند جهت تثبیت بیان در نسل‌های بعدی ماهی استفاده شوند.

کلمات کلیدی: همسانه‌سازی، ماهی زبرا تراریخت رنگی، وکتور *Tol2* نوترکیب، رونوشت

*عهده دار مکاتبات jamshidi99@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

مقدمه

صنعت تولید ماهیان زینتی ایران، پتانسیل تولید ماهیان زینتی موجود در کشور (وارداتی و بومی) و بهبود طیف رنگی برخی از گونه‌های آن را جهت افزایش رشد اقتصادی این صنعت دارد (لشکری و همکاران، ۱۳۹۶). امروزه، افزودن برخی از رنگدانه‌های غذایی به جیره ماهیان توانسته تا حدی تغییراتی در رنگ ایجاد نماید (حسنی نیا و همکاران، ۱۳۹۵؛ Sefc *et al*., 2014)، اما فناوری بهتری جهت القاء و حفظ پایداری رنگ در ماهیان زینتی به کمک تکنیک‌های زیست فناوری بوجود آمده است (Tonelli *et al*., 2017). سنگاپور به عنوان پیشگام این فناوری، سند این اختراع را در امریکا تحت عنوان GloFish به ثبت رسانده است (Davies, 2014). برای اولین بار انواع رنگی ماهی زبرا در سال های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ توسط فرآیندی زیست-فناورآنه ایجاد گردیدند (Wan *et al*., 2002; Gong *et al*., 2003)، اما اکنون گونه‌های آکواریومی دیگری نیز توسط این فناوری تغییر یافته و مهندسی زیستی شده‌اند. این گونه‌ها عبارتند از تتراها (*Gymnocorymbus ternetzi*)، بارب (*Puntius tetrazona*) و کوسه رنگین‌کمان (*Epalzeorhynchos frenatum*) (Leggatt 2018; Barman *et al*., 2019). فرآیند زیست-فناوری برای تولید ماهیان رنگی همان فناوری تراریختگی می‌باشد چرا که یک ژن خارجی به یک جنین انتقال یافته و پروتئین جدیدی را بیان می‌نماید. این پروتئین‌های رنگی از خانواده پروتئین‌های فلئورسنس بوده که غالبا از جانوران آبزیِ محیط دریایی استخراج می‌شوند. به عنوان نمونه، پروتئین فلوئورسنت سبز (Green Fluorescent Protein [GFP]) از گونه‌ای از عروس‌های دریایی (*Aequorea victoria*) متعلق به شاخه کیسه تنان استخراج می‌گردد. تاکنون تنها دو تاییدیه از سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا برای ماهیان تراریخت صادر گردیده است؛ یکی از آنها GloFish و دیگری ماهی آزاد AquaAdvantage می‌باشد که گوشت بیشتری در دوره پرورش کوتاه‌تر تولید می‌نماید (Rasal *et al*., 2016). گذشته از تولید ماهیان تراریخت رنگی، می-توان ماهیان تراریخت را به عنوان واکنش‌گاه زیستی برای تولید پروتئین‌های جدید در نظر داشت (Murakami *et al*., 2019). در این مطالعه پیشبرهای ژن‌های MYLZ2 و CKMB به منظور همسانه‌سازی در وکتور حامل ژن پروتئین فلوئورسنت سبز انتخاب گردیدند. از این‌رو، اگر پلاسمید نوترکیب با ژنوم ماهی زبرا ادغام گردد، پروتئین فلوئورسنت سبز در سلول‌های عضلانی می‌تواند بیان گردد. این رویداد در نسل F_0 با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنس قابل بررسی می‌باشد. اگر ماهیانی که از نظر وجود GFP مثبت هستند با هم جفت‌گیری شوند، برخی از نتاج در نسل F_1 رنگ سبز را در عضلات‌شان نشان خواهند داد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر امکان‌سنجی انتقال و القاء بیان ژن پروتئین سبز با استفاده از پیشبرهای دو ژن انتخاب شده در سلول‌های عضلاتی در ماهی زبرا می-باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نواحی موردنظر راه انداز ژنی و طراحی آغازگر برای همسانه‌سازی راه انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB

نواحی راه‌انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB در ماهی زبرا بر اساس سند اختراع ماهی زبرا رنگی

(US8378169B2) از پایگاه داده Ensemble استخراج گردیده و برای تکثیر و همسانه‌سازی انتخاب شدند.

این ناحیه شامل یک افزاینده برای بیان پروتئین به طول ۳۵۵ جفت باز بود که در بخش اینترون یک ژن CKMB قرار داشت. پلاسمید *Tol2* و DNA الگو برای ساخت رونوشت توسط Shahram Eisa-Beygi از کالج پزشکی ویسکانسین (Medical College of Wisconsin) تهیه گردید. توالی پیشرو و جایگاه برشی به توالی هیبریداسیون از محل اولین باز توالی راه‌انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB ماهی زبرا اضافه گردیدند. از آن جا که قطعات تنها از جایگاه برش آنزیم *SalI* همسانه‌سازی شدند به آغازگرهای رو به جلو و معکوس اضافه گردیدند. برای توالی پیشرو، ۶ جفت باز آدنین به منظور جلوگیری از تشابه با هر گونه جایگاه برش آنزیمی اضافه گردید. توالی آغازگرهای رو به جلو و معکوس به ترتیب در زیر آمده‌اند:

رو به جلو:

AAAAAAGTCGACGGATTCGCCACAGAG GAATGAGC

معکوس:

AAAAAAGTCGACGTCGAGACGGTATGT GTGAAGTC

استخراج DNA؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای MYLZ2 و CKMB؛ محصولات PCR و هضم پلاسمید Tol2

DNA کل از ۵۰ میلی‌گرم بافت باله ماهی با استفاده از کیت تخلیص Roche (Roche، آلمان) و بر اساس دستورالعمل آن استخراج گردید. هر نمونه بافت با استفاده از نیتروژن مایع هموژنیزه گردید و سپس بافر لیزکننده بافت و پروتئیناز K اضافه گردیده و به مدت یک ساعت در دمای ۵۵°C انکوبه شدند. کمیت و کیفیت DNA تخلیص شده به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ و الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ تعیین گردید. واکنش PCR با استفاده از آنزیم Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) از طریق تکثیر قطعات ژنی ۲۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت بازی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام پذیرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲۵ واحد از آنزیم Platinum *Pfx* DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۲/۵ میلی‌مولار سولفات منیزیم و ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA ماهی زبرا بود. برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۷ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی، مرحله اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه که در آن دما محلول به طور تدریجی به ۵۵ تا ۶۵ °C می‌رسد، مرحله اولیه گسترش در دمای ۷۲°C و به مدت ۲ دقیقه برای قطعه ژنی MYLZ2 و ۲:۳۰ دقیقه برای قطعه ژنی CKMB و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصولات PCR و پلاسمید *Tol2* با استفاده آنزیم *SalI* جهت ایجاد انتهای چسبنده در قطعات پلاسمید و PCR هضم شدند. همه قطعات با استفاده از ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردیده و قطعات بدون تغییر جدا شده و با استفاده از کیت تخلیص Qiagen خالص‌سازی شد.

اتصال (Insertion or ligation) و انتقال (Transformation)؛ تخلیص و استخراج پلاسمید نوترکیب؛ سنتز رونوشت به صورت in vitro

فرآیند درج در دمای ۲۲°C به مدت ۶۰ دقیقه و با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Thermo Fisher

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

Scientific) انجام و تکمیل گردید. محصول فرآیند درج با اعمال شوک حرارتی به باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) سویه Dh5α که پیش‌تر به روش شیمیایی به سلول‌های مستعد همسانه‌سازی (competent cells) تبدیل گشته بودند، انتقال یافتند. کلونی‌های نوترکیب توسط آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غربال گردیده و حضور پلاسمید واجد راه‌انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB توسط روش‌های colony PCR، توالی‌یابی و هضم آنزیمی تصدیق گردید.

محصول رونویسی با استفاده از یک الگوی پلاسمیدی حاوی راه‌انداز پلیمراز فاژی sp6 (sp6 phage polymerase promoter) ایجاد گردید. کیت mMessage mMachine SP6 برای ساخت RNA بر اساس دستورالعمل سازنده مورد استفاده قرار گرفت (شماره کاتالوگ: AM1340). کمیت محصول رونویسی با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ سنجیده شد و کیفیت آن بوسیله ژل آگاروز بررسی گردید.

نگهداری و تخم‌ریزی مولدین ماهی زبرا؛ تزریق همزمان ترکیبات مولکولی به جنین‌ها

تعداد برابر مولدین نر و ماده در آکواریوم‌های مورد استفاده (۲ آکواریوم) نگهداری شدند. یک زمان‌سنج خودکار چرخه ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی را برای آکواریوم‌ها اعمال می‌نمود. دمای آب حدود ۲۸°C حفظ گردید (بر اساس کتاب ماهی زبرا [Westerfield, 2000]). ماهیان توسط آرتمیا و غذای تولیدی شرکت BioMar (BioMar Group، دانمارک) تغذیه گردیدند. پلاسمید نوترکیب و RNA پیام‌رسان ترانسپوزاز بطور همزمان به جنین‌های ماهی زبرا در مرحله تک سلولی تزریق گردیدند. یک روز پس از لقاح جنین‌های تزریق شده به منظور انتخاب انواعی که پروتئین فلوئورسنت سبز در آنها بیان شده است با استفاده از استریومیکروسکوپ فلوئورسنس مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه تنها تا سطح نسل F_0 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت مخلوط پلاسمید نوترکیب و RNA سنتزشده ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای محلول کاری (DNA و RNA) و ۰/۰۵٪ فنول قرمز بود (Yuan and Sun, 2009).

نتایج

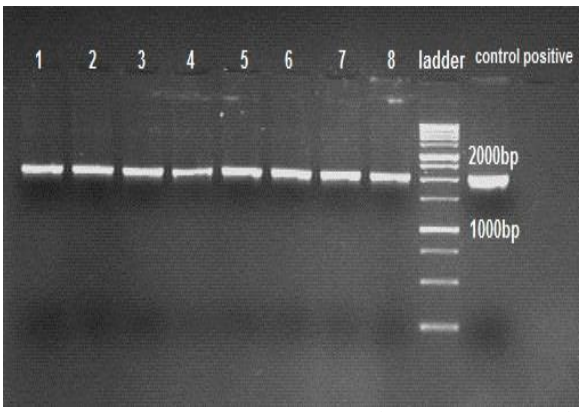
غلظت DNA استخراج شده ۲۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر تعیین گردید و کیفیت آن بر اساس بررسی ژل آگاروز عالی محسوب گردید (شکل ۱).



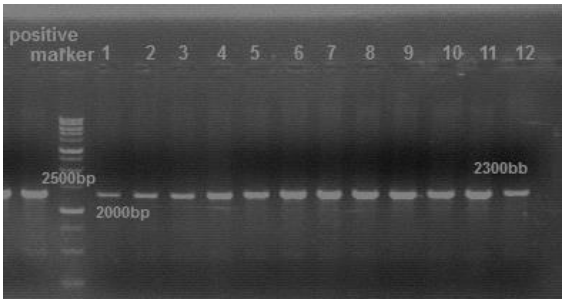
شکل ۱. DNA استخراج شده و بارگذاری شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ از بافت عضلانی دو ماهی زبرا

محصولات PCR که شامل قطعات تکثیرشده راه‌انداز ژن‌های MYLZ2 و CKMB بودند بر روی ژل آگاروز بررسی شدند (شکل‌های ۲ و ۳) و مشخص گردید که آنها از لحاظ اندازه (۲۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت باز) با ژن‌های هدف مطابقت داشتند. محصولات تکثیرشده توسط PCR با شیب کاهشی دمایی در محدود ۶۵ تا ۵۵°C، باندهایی با کیفیت یکسان ایجاد نمود.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

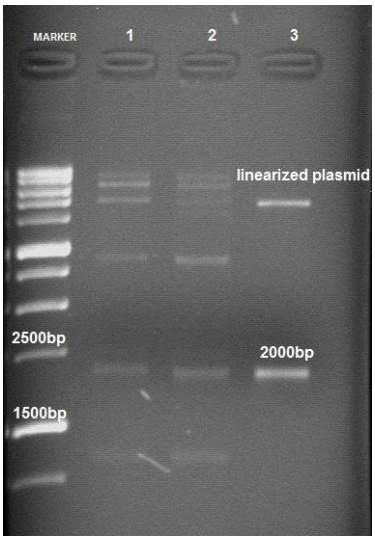


شکل ۲. محصولات تکثیرشده توسط PCR با شیب کاهشی دمایی از قطعات راه‌انداز MYLZ2 در محدود ۶۵ تا ۵۵°C. کیفیت تمامی محصولات PCR در دماهای مختلف یکسان بود.

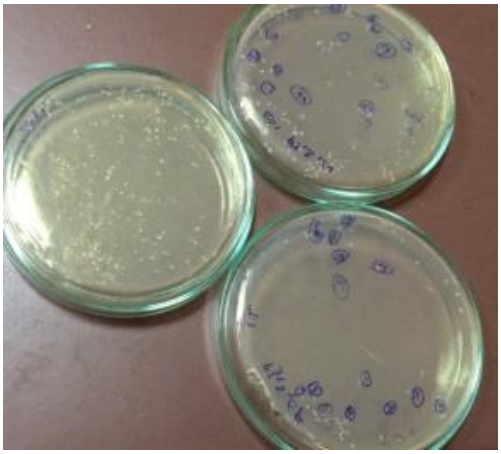


شکل ۳. محصولات تکثیرشده توسط PCR با شیب کاهشی دمایی از قطعات راه‌انداز CKMB در محدود ۶۵ تا ۵۵°C. کیفیت محصولات PCR در باندهای ۶ تا ۱۰ که متناظر دماهای ۶۲ تا ۵۸°C می‌باشند یکسان بود.

برخی از محصولات درج (Insertion) جهت سنجش دقت و درستی واکنش‌های صورت گرفته روی ژل آگاروز بررسی شدند (شکل ۴). شکل ۵، پلیت‌های غربال‌گری توسط آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کلونی-هایی که بطور تصادفی برای colony PCR انتخاب شده‌اند را نشان می‌دهد. شکل ۶، colony PCR صورت گرفته بر روی کلونی‌ها را به تصویر می‌کشد. برخی از کلونی‌هایی که واجد محصولات PCR ژن-های MYLZ2 و CKMB بودند بر روی ژل آگاروز باندهای پررنگی ایجاد نمودند. همچنین، توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (T7 و SP6)، صحت توالی و جهت آن را تایید نمود (شکل ۷).

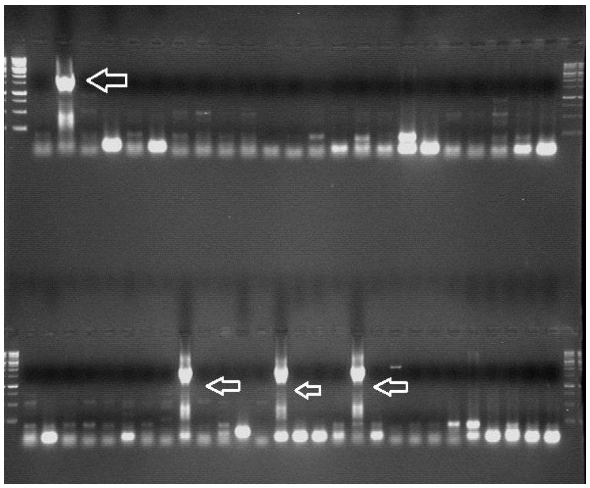


شکل ۴. محصول مرحله اتصال (Ligation) صورت گرفته بر روی محصول هضم شده PCR مربوط به قطعه MYLZ2: پلاسمید هضم شده توسط آنزیم لیگاز (باندهای ۱ و ۲) و بدون آنزیم لیگاز (باند ۳) به منظور بررسی دقت و صحت واکنش اتصال (ligation).

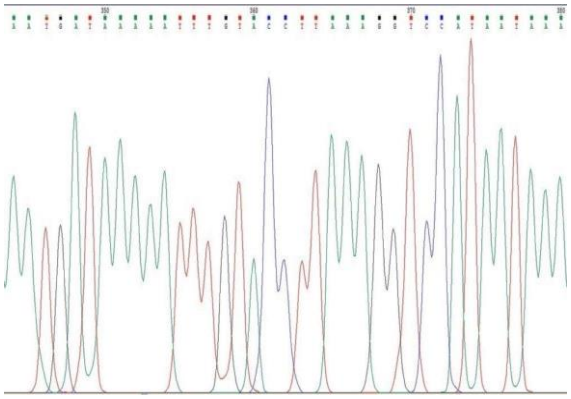


شکل ۵.کلونی‌های باکتریایی کشت یافته بر روی آگار پس از اتصال و انتقال؛ برخی از کلونی‌ها جهت بررسی وجود قطعات نوترکیب در حمام آب جوش (۱۰۰°C) قرار گرفته و DNA آزاد شده برای تکثیر توسط colony PCR استفاده گردیدند؛ بر اساس نتایج colony PCR، کلونی‌های واجد قطعات نوترکیب علامت‌گذاری شد و آزمون آگار LB بعنوان یک آزمون پشتیبان برای miniprep پلاسمید نوترکیب تدارک دیده شد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]



شکل ۶. colony PCR برخی از کلونی‌ها بر روی ژل آگاروز بعد از ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون؛ برخی از کلونی‌های نوترکیب قطعاتی با طول‌های ۲۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت بازی داشتند که این قطعات تکثیر گردیده و روی ژل آگاروز ۱٪ توسط پیکان‌هایی علامت‌گذاری شدند. تست پشتیبان آگار LB برای miniprep بکار گرفته شدند.

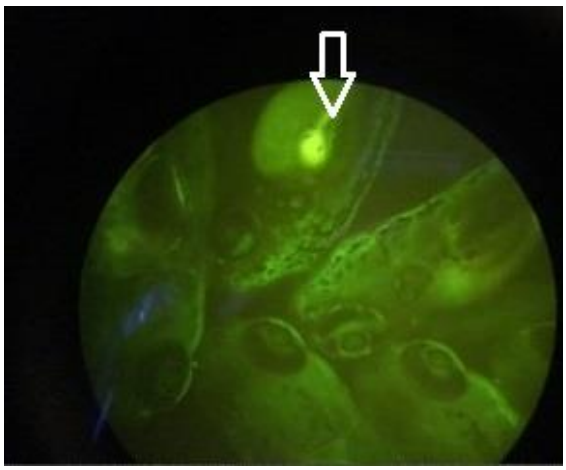


شکل ۷. توالی‌یابی بخشی از قطعات MYLZ2 توسط آغازگرهای عمومی SP6 بعد از انجام miniprep بر روی پلاسمیدهای نوترکیب مثبت.

بحث

در مطالعه حاضر، ماهی زبرا بعنوان یک مدل برای نشان دادن امکان‌پذیری استفاده از فناوری تراریختگی جهت تولید انواع رنگیِ جدید ماهیان زینتی مورد بررسی قرار گرفت. GloFish نوعی ماهی زبرا دستکاری شده می‌باشد که ژن‌های پروتئین‌های فلوئورسنت (GFP، YFP[۲]، BFP[۳] یا RFP[۴]/dsRED) و کروموپروتئین‌ها به آن‌ها الحاق گردیده است. پروتئین-های GFP، YFP، BFP یا RFP/dsRED از گونه‌ای از عروس‌های دریایی (*Aequorea victoria*) و جنس

غلظت محصول رونویسی ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و کیفیت آن جهت تزریق مناسب محسوب گردید. القای تخمریزی در مولدین ماهی زبرا با اعمال یکسری تغییرات صورت گرفت و در نهایت بیان ژن پروتئین فلوئورسنت سبز به صورت گذرا نشان داده شد (شکل ۸).



شکل ۸. پروتئین فلوئورسنت سبز بیان شده بصورت گذرا نشان-داده شده در سلول‌های عضلاتی ماهی زبرا.

[۲] Yellow Fluorescent Protein
[۳] Blue Fluorescent Protein
[۴] Red Fluorescent Protein

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

Discosoma sp از شقایق‌های دریایی که از میان آن‌ها می‌توان به شقایق دریایی موکتی (*Stichodactyla haddoni*) اشاره نمود، استخراج می‌گردند (Chiang *et al*., 2014). ژن‌های کروموپروتئین به دنبال راه‌انداز مختص-سلول عضلانی نظیر MYLZ2 می‌آیند (Gong *et al*., 2003; Zeng *et al*., 2005) و برای تجاری-سازی در تجارت ماهیان زینتی ثبت گردیده‌اند. در این مطالعه، همسانه‌سازی دو راه‌انداز ژنی مهم در ماهی زبرا به طور موفقیت‌آمیز انجام گرفت. برای اولین بار، Wan و همکاران (۲۰۰۲) دو ماهی زبرا تراریخت رنگی را که با استفاده از فرآیندهای زیست فناوری ایجاد شده بودند را معرفی نمودند. MYLZ2 و CKMB، راه-اندازهای قوی‌ای برای بیان پروتئین‌ها در بافت عضلانی محسوب می‌گردند (Zeng *et al*., 2005). پروتئین‌های رنگی حدود ۳ تا ۵ درصد بافت عضله را تشکیل می-دهند که مقدار زیادی تلقی می‌گردد. از این‌رو، عضله ماهی می‌تواند به عنوان یک واکنش‌گاه زیستی برای تولید پروتئین‌های جدید عمل نماید (Gong, 2003). از فواید واکنش‌گاه زیستی ماهیان تراریخت، سرعت تولید آن‌ها، هزینه کم و نبود خطر انتقال ویروس‌های خاص پستانداران و... می‌باشد (Hwang *et al*., 2008). Higashijima و همکاران (۱۹۹۷) نژادهای تراریخت ماهی زبرا دارای ژن پروتئین فلوئورسنت سبز را با استفاده از نواحی تنظیمی ژن‌های آلفا و بتا اکتین تولید نمودند. Chou و همکاران (۲۰۰۱) نژادهای تراریخت مداکا (*Oryzias latipes*) دارای پروتئین فلوئورسنت سبز را با استفاده از نواحی تنظیمی ژن بتا اکتین ایجاد نمودند. در این تحقیق، بیان راه‌اندازهای MYLZ2 و CKMB در باکتری اشریشیاکلی سویه Dh5α از طریق پلاسمید *Tol2* صورت پذیرفت. colony PCR صورت گرفته روی قطعات اضافه شده و بررسی محصولات آن روی ژل آگاروز، صحت همسانه‌سازی را نشان داد. با استفاده از توالی‌یابی DNA، وجود قطعات تایید گردید و هر دو قطعه با توالی موجود در پایگاه داده Ensemble مشابه بودند (zebrafish assembly version 7). در این تحقیق، پلاسمید *Tol2* برای همسانه‌سازی و همچنین تزریق همزمان با رونوشت سنتتیک استفاده گردید، اما برخلاف کارآمدی گزارش شده آن در بیان ژن پروتئین‌ها، هیچگونه افزایشی در بیان در مقایسه با سیستم‌های پیشین همسانه‌سازی یافت نشد (Kawakami, 2007)؛ در این ارتباط نتایج به دست آمده توسط Rezaei و همکاران (۲۰۱۸) نیز یافته‌های تحقیق حاضر را تایید می‌نماید. وجود پروتئین فلوئورسنت سبز در برخی از جنین‌های مورد تزریق قرار گرفته توسط میکروسکوپ فلوئورسنس نمایان گشت (شکل ۸). ماهیان نسل F_0 تراریخت باید با یکدیگر جفت‌گیری شوند تا نسل F_1 واجد رنگ سیز ایجاد گردد (Wan *et al*., 2002; Gong *et al*., 2003; Zeng *et al*., 2005; Kawakami, 2007). در صنعت ماهیان زینتی، الگوی رنگی حائز اهمیت می‌باشد. با استفاده از پیشبرهای مختص بافتی مختلف، پروتئین‌های رنگی می‌توانند به بافت‌ها و بخش‌های مختلف بدن انتقال بیابند. بطور خاص، الگوهای رنگی متنوعی را می‌توان با استفاده از ترکیب‌های مختلفی از پروتئین‌های رنگی و پیشبرهای مختص بافتی بدست آورد. از آنجائیکه تنها تعداد اندکی از الگوهای رنگی جدید با استفاده از تکنیک‌های کلاسیک تکثیر و اصلاح ماهیان قابل ایجاد می‌باشند، رویکرد تراریختگی مسیر جدیدی را برای تولید سریع ماهیان زینتی جدید ایجاد می‌نماید. همچنین، زمانی‌که ماهی تراریخت فلوئورسنت برای

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

یک نژاد ایجاد گردد، انتقال ژن مدنظر به سایر نژادهای تجاری آن گونه با استفاده از روش‌های استاندارد تکثیر و جفت‌گیری به آسانی قابل انجام می‌باشد (Gong *et al*., 2003).

در نتیجه، این تحقیق تکثیر و همسانه‌سازی موفقیت‌آمیز ناحیه پیشبر را برای ژن‌های MYLZ2 و CKMB ارائه می‌دهد و همچنین بیان موقت پروتئین فلوئورسنت سبز را تایید می‌نماید. بدین ترتیب توصیه می‌گردد که برای غربال انواع دارای پروتئین مذکور ماهیان تراریخت نسل F_0 با انواع وحشی جفت‌گیری شوند.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. حسنی‌نیا، ع.، وهاب زاده رودسری، ح.، صادق‌پور، ع.، ۱۳۹۵. تاثیر رنگدانه لکانتین صورتی بر پوست اسکار سفید (*Astronotus ocellatus*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۱)، ۲۳-۳۱.

۲. لشکری، الف.ب.، اسلامی، ه.ر.، صالحی، ح.، ۱۳۹۶. عوامل موثر بر تولید و بازاریابی ماهیان زینتی استان البرز. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۱(۲)، ۱-۱۲.

3. Barman, H.K., Rasal, K.D. and Mondal, S., 2019. Status and prospects of gene editing and transgenic in fishes. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *79*(1), 292-299.

4. Chiang, C.Y., Chen, Y.L. and Tsai, H.J., 2014. Different visible colors and green fluorescence were obtained from the mutated purple chromoprotein isolated from sea anemone. *Marine biotechnology*, *16*(4) 436-446.

5. Chou CY, Horng LS, Tsai HJ., 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Research*, 10: 303–315.

6. Davies, G., 2014. Searching for GloFish®: aesthetics, ethics, and encounters with the neon baroque. *Environment and Planning A*, *46*(11), 2604-2621.

7. Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M. and Yan, T., 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, *308*(1) 58-63.

8. Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, Hotta Y, Eguchi G., 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Developmental Biology*, 192: 289–299.

9. Hwang, G., Müller, F., Rahman, M.A., Williams, D.W., Murdock, P.J., Pasi, K.J., Goldspink, G., Farahmand, H. and Maclean, N., 2004. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Marine Biotechnology*, *6*(5), 485-492.

10. Kawakami, K., 2007. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology*, *8*(1), p.S7.

11. Leggatt, R.A., 2018. Cold temperature tolerance of albino rainbow shark (Epalzeorhynchos frenatum), a tropical fish with transgenic application in the ornamental aquarium trade. *Canadian Journal of Zoology*, *97*(4), 376-378.

12. Murakami, Y., Horibe, T. and Kinoshita, M., 2019. Development of an efficient bioreactor system for delivering foreign proteins secreted from liver into eggs with a vitellogenin signal in medaka Oryzias latipes. *Fisheries Science*, 85(4), 677-685.

13. Rasal, K.D., Chakrapani, V., Patra, S.K., Ninawe, A.S., Sundaray, J.K., Jayasankar, P. and Barman, H.K., 2016. Status of transgenic fish production with emphasis

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]

on development of food fishes and novel color varieties of ornamental fish: implication and future perspectives. *Journal of Fisheries Sciences.com*, *10*(3), p.52.

14. Rezaei, M., Basiri, M., Hasani, S.N., Asgari, B., Kashiri, H., Shabani, A. and Baharvand, H., 2019. Establishment of a Transgenic Zebrafish Expressing GFP in the Skeletal Muscle as an Ornamental Fish. *Galen Medical Journal*, 8, p.1068.
15. Sefc, K.M., Brown, A.C. and Clotfelter, E.D., 2014. Carotenoid-based coloration in cichlid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *173*, 42-51.
16. Tonelli, F.M., Lacerda, S.M., Tonelli, F.C., Costa, G.M., de Franca, L.R. and Resende, R.R., 2017. Progress and biotechnological prospects in fish transgenesis. *Biotechnology Advances*, *35*(6), 832-844.
17. Wan, H., He, J., Ju, B., Yan, T., Lam, T.J. and Gong, Z., 2002. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Marine Biotechnology*, *4*(2) 146-154.
18. Westerfield, M., 2000. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th Edition, University of Oregon press.
19. Yuan, S. and Sun, Z., 2009. Microinjection of mRNA and morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, (27), p.e1113.
20. Zeng, Z., Liu, X., Seebah, S. and Gong, Z., 2005. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *234*(2) 387-392.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.4.5.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.4.47]