شناسایی توالی کامل ژن هورمون رشد و آنالیز فیلوژنیک تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

- **ماهان سلمرودی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **علی شعبانی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **محمد پورکاظمی**: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥

تاریخ دریافت: دی ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: فروردین ١٣٩٦

چکیده

هورمون رشد یک پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای است که رشد توده بدنی و متابولیسم را در مهره‌داران کنترل می‌کند. در این تحقیق ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد با استفاده از تکنیک cDNA از هیپوفیز جداسازی شد و توالی نوکلئوتیدی آن به‌دست آمد. برای این منظور ابتدا غده هیپوفیز از چهار نمونه تاس‌ماهی استرلیاد بالغ را جدا نموده و استخراج RNA با استفاده از محلول BIOZOL انجام شد. سپس با استفاده از تکنیک cDNA و PCR توالی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد به‌دست آمد. نتایج نشان می‌دهد که ژن سنتزکننده هورمون رشد در تاس‌ماهی استرلیاد دارای توالی ٧٦٨ نوکلئوتیدی می‌باشد که دارای ٢٦ bp نوکلئوتید غیرترجمه‌ای در ناحیه ''٥ و ٩٨ bp نوکلئوتید غیرترجمه‌ای در ناحیه ''٣ خود بوده و توالی کد شونده‌ای با ٦٤٥ bp نوکلئوتید را دارد. هم‌چنین این ژن با کدون آغاز ATG در جایگاه ٢٦ شروع و با کدون TAG در جایگاه ٦٧٠ تمام می‌شود. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد بالاترین میزان همولوژی با سایر مهره‌داران را ابتدا با پستانداران (٦٤-٦٧ درصد)، پس از آن با مارماهی شکلان، دوزیستان و سپس با سایر ماهیان استخوانی دارد. شباهت بالای توالی پروتئین ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با دیگر گونه‌های پستاندار نشان می‌دهد که این ژن از یک ژن رشد اجدادی مشترک منشا می‌گیرد.

کلمات کلیدی: ژن هورمون رشد، cDNA، تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

مقدمه

دریای خزر به‌عنوان بزرگ‌ترین منبع ماهیان خاویاری از میان ۲۷ گونه تاس‌ماهی شکلان دارای ۶ گونه ارزشمند در دریای خزر و حوضه آبریز خود می‌باشد (Ruban و همکاران، ۲۰۱۱) و در گذشته عمده ذخایر ماهیان خاویاری با تولید ۸۰ الی ۹۰ درصد خاویار جهان در دریای خزر تولید می‌شد (Pourkazemi، ۲۰۰۶) که متاسفانه امروزه به‌دلیل صید غیرمجاز، از دست رفتن زیست‌گاه‌های تولیدمثل و انواع آلودگی‌ها ذخایر تاس‌ماهیان در خطر انقراض قرار گرفتند (Moghim و همکاران، ۲۰۰۶). تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) یکی از گونه‌های حوضه آبریز دریای خزر بوده و در رودخانه‌های منتهی به دریای خزر زیست می‌کند. کاهش چشمگیر جمعیت ماهیان خاویاری از یک سو و افزایش تقاضای خاویار و گوشت از سوی دیگر، اکثر کشورهای صادرکننده خاویار را بر این داشته که به سوی تولید خاویار از طریق پرورش ماهیان خاویاری روند. اما مشکلاتی از قبیل عدم آشنایی کامل باشرایط پرورشی ماهیان خاویاری و به‌خصوص سن بلوغ بالای این ماهیان از جمله موانع بر سر راه تولید خاویار به این شیوه می‌باشد.

هورمون رشد در محور هیپوفیزی سنتز می‌شود و دارای یک زنجیره پلی‌پپتیدی با دو باند دی سولفید درون مولکولی است (Yom Din و همکاران، ۲۰۰۸) و به شکل بارزی با خصوصیات تولیدمثلی جانوران مثل رشد، تولیدمثل و سازگاری اسمزی مرتبط است (Gomez و همکاران، ۱۹۹۸؛ McCormic، ۲۰۰۱). هم‌چنین هورمون رشد می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهم محرک رشد در آبزی‌پروری نقش ایفا نماید و برای رشد توده بدنی و تولیدمثل در ماهیان استخوانی و سازگاری اسمزی در ماهیان یوری هالین ضروری است (Zohar، ۱۹۸۹؛ Sciara و همکاران، ۲۰۰۶). در میان مهره‌داران، هورمون رشد برای رشد عادی الزامی است و در تنظیم بسیاری از فرایندهای آنابولیک موثر می‌باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۱). علاوه بر این پروتئین اصلی این هورمون از تحول تدریجی در طی زمان و تکامل محفوظ مانده است و اطلاعات بسیار ارزشمندی را در زمینه تغییرات پروتئینی و عملکرد هورمون رشد به ما می‌دهد (Yom Dinو همکاران، ۲۰۰۸).

تاکنون مطالعات متعددی روی توالی نوکلئوتیدی cDNAهورمون رشد بسیاری از گونه‌های ماهیان صورت گرفته است (Nicoll و همکاران، ۱۹۸۷؛ Rentier و همکاران، ۱۹۸۹؛ Funkenstein و همکاران، ۱۹۹۱؛ Mahmoud و همکاران، ۱۹۹۶؛ Chen و همکاران، ۲۰۰۳). تحقیقات نشان می‌دهد استفاده مداوم از هورمون رشد در جیره آبزیان پرورشی موجب افزایش سرعت رشد شده و مدت زمان بلوغ را کاهش می‌دهد(Zohar، ۱۹۸۹). تولید هورمون رشد به‌خصوص هورمون رشد ماهیان خاویاری می‌تواند نقش موثری در رسیدن به این هدف داشته باشد، لذا شناسایی ژن هورمون رشد در ماهیان خاویاری و هم‌چنین تعیین توالی اسیدآمینه‌های آن علاوه بر اهمیت بنیادی، نقش بسیار مهمی در آبزی‌پروری و تولید خاویار داشته باشد.کاهش چشمگیر جمعیت ماهیان خاویاری از یک سو و افزایش تقاضای خاویار و گوشت این ماهیان از سوی دیگر، اکثر کشورهای صادرکننده خاویار را بر این داشته که به سوی تولید خاویار از طریق پرورش ماهیان خاویاری روند. اما مشکلاتی از قبیل عدم آشنایی کامل با شرایط پرورشی ماهیان از جمله موانع بر سر راه تولید خاویار به این شیوه می‌باشد. یکی از راه‌های کوتاه نمودن زمان تولید خاویار استفاده از هورمون رشد به منظور افزایش سرعت رشد و کاهش سن بلوغ در این ماهیان می‌باشد. ژن هورمون رشد به‌عنوان یک نشانگر طبیعی برای مطالعات ژنتیک تکاملی گونه‌های مختلف ماهی به‌دلیل برخورداری از توالی‌های حفاظت شده، طول کافی و وجود حداقل تشابه ساختمانی به‌کار می‌رود (Pinheiro و همکاران، ۲۰۰۸). از این رو می‌توان با مطالعه توالی و ساختار ژن هورمون رشد علاوه بر اهمیت بنیادی و کاربردی آن، اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکاملی مهره‌داران به‌دست آورد (Kocour and Kohlmann، ۲۰۱۱). هدف از این مطالعه شناسایی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد و کلونینگ آن در میزبان پروکاریوتی و تعیین جایگاه فیلوژنی این ماهی در مقایسه با سایر مهره‌داران با استفاده از توالی ژن رشد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی ژن رشد: در این مطالعه تمامی مراحل نمونه‌برداری وآزمایش‌های مولکولی درانستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در جوار سد سنگر رشت- استان گیلان انجام شد. ابتدا غده هیپوفیز از چهار نمونه تاس‌ماهی استرلیاد بالغ را جدا نموده و در نیتروژن مایع نگه‌داری گردید. استخراج RNA با استفاده از محلول BIOZOL انجام شده و کمیت وکیفیت mRNA به‌دست آمده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در مرحله اول از mRNA، cDNA تک رشته‌ای غیراختصاصی با استفاده از پرایمر Oligo(dT)۱۸ و روش RT_PCR ساخته شد. رشته مکمل cDNA نیز با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی شامل پرایمر پیش‌رونده "۳ -ATGGCATCAGGTCTGCTTCT-۵" و پرایمر معکوس "۳ -CTACAGAGTACAGTTGCTC-۵" مطابق با توالی ژن رشد سایر مهره‌داران ثبت شده در بانک ژن (NCBI) سنتز گردید. به‌منظور

تکثیر ژن هورمون رشد از طریق واکنش PCR طبق برنامه ℃ ۹۴ به مدت ۴ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۳۶ سیکل در دمای℃ ۹۴ به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ℃ ۵۸ به‌مدت ۳۰ ثانیه،℃ ۷۲ به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی ℃ ۷۲ به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس محصول به‌دست آمده ازطریق‌الکتروفورز ژل‌آگارز ۱/۵٪موردارزیابی‌قرار گرفت.

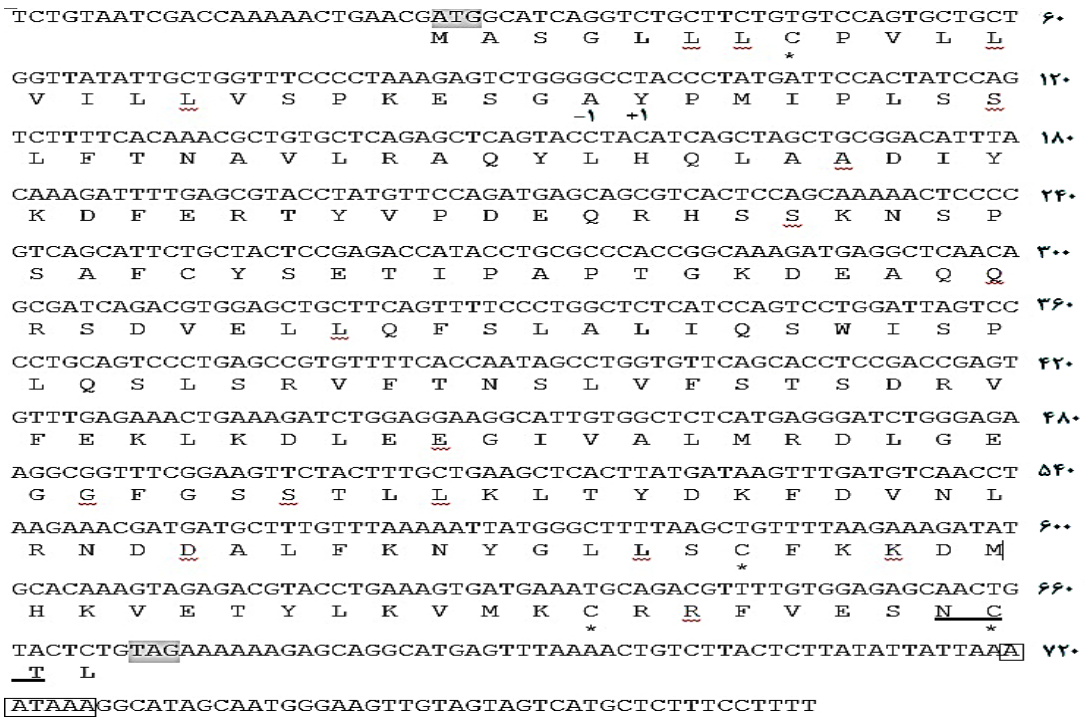
کلونینگ ژن رشد در باکتری: جهت به‌دست آوردن طول کامل ژن رشد، ژن تکثیر شده از طریق PCR به باکتری انتقال داده شد. در این مرحله ابتدا برای الحاق ژن رشد به پلاسمید، ۶-۵ میکرولیتر از محلول حاوی ژن رشد تکثیر یافته داخل میکروتیوب به عنوان الگو (DNA template) ریخته شد و ۲۱ میکرولیتر مخلوط مواد موردنیاز در PCR به نسبت ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR Buffer (۱۰ x)، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۱میکرولیتر کلریدمنیزیم با غلظت$Mgcl_2$ ۲mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت µM ۲۰۰، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلی‌مراز (۱ U/µl) و در نهایت به‌وسیله آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. در این مرحله دمای بسط نهایی ۳۰ دقیقه در نظر گرفته می‌شود تا با ایجاد انتهاهای چسبنده در دو انتهای ژن رشد، از آن برای الحاق به پلاسمید استفاده شود. در این آزمایش از پلاسمید PTZ57R/T (Fermentas, USA) به‌عنوان وکتور با طول bp ۲۸۸۶ استفاده گردید و به‌منظور کلونینگ به باکتری *E.coli* سویه Top۱۰ (Invitrogene; USA) انتقال داده شد. این وکتور خطی بوده و دارای جایگاه شروع همانندسازی، ژن β گالاکتوزیداز، یک پروموتور برای بیان ژن مذکور، جایگاه برش چندگانه درون ژن β گالاکتوزیداز و یک ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد.

الحاق ژن رشد به پلاسمید: الحاق ژن رشد با استفاده از آنزیم DNA T۴ Ligase (Fermentas, USA) به پلاسمید صورت گرفت. این آنزیم موجب تسریع در اتصال پیوندهای هیدروژنی بین بازهای آدنین در دو انتهای ژن رشد با بازهای تیمین در دو انتهای پلاسمید خطی می‌شود. مواد مختلف در الحاق شامل PCR Product ژن رشد با غلظت ۵ میکرولیتر، آنزیم DNA T۴ Ligase با غلظت ۲ میکرولیتر، پلاسمید PTZ۵۷R/T با غلظت ۳ میکرولیتر و بافر الحاق با غلظت ۱ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند و در دمای ℃۴ به‌مدت یک شبانه روز (overnight) انکوباسیون گردید.

انتقال پلاسمید به‌درون سلول‌های باکتری: به‌منظور استفاده از باکتری‌ها ابتدا ۲۰ میلی‌لیترسوسپانسیون حاوی باکتری را داخل یک فالکن ریخته و با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷-۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد سپس محلول رویی را دور ریخته و به پلت باکتریایی به‌میزان ۴ میلی‌لیتر $CaCl_2$ ۰/۱ مولار اضافه گردید. در این زمان سلول‌های باکتریایی منفذ دار شده و آماده پذیرش پلاسمید می‌باشند. به‌میزان ۵ میکرولیتر از محلول الحاق و ۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر سلول آماده شده به‌درون یک میکروتیوب منتقل شد و کاملاً با یکدیگر مخلوط گردید. در ادامه ابتدا به‌مدت نیم‌ساعت بر روی یخ قرار داده شد سپس به‌مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سلول‌های باکتریایی شوک گرمایی ببینند. این عمل موجب می‌شود تا میزان کارایی ورود پلاسمید به‌درون باکتری افزایش یابد و در نهایت ۳-۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در انتها محلول باکتری حاوی پلاسمید به محیط کشت LB جامد حاوی آمپی سیلین، xgal و IPTG با استفاده از یک پیپت پاستور وارد شده و کشت سفره‌ای داده شد (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹). پس از گذشت ۱۸ ساعت و رشد باکتری‌ها بر روی محیط کشت LB جامد، پلاسمید به‌منظور توالی‌یابی از محیط کشت باکتریایی‌خالص‌سازی شد. بدین‌منظور برای استخراج‌پلاسمید از کیت GF۱ساخت‌شرکت وی وانتیس (;Vivantis Malaysia) استفاده گردید. پس از جداسازی و تخلیص پلاسمیدهای حاصل از نمونه‌های کلون شده در باکتری، برای توالی‌یابی به شرکت بیونیر کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌هایcDNA با استفاده از نرم‌افزار GAP ۴ شباهت‌یابی و برای تعیین موقعیت Signal peptide cleavage site از برنامه Signal V ۱/۱ استفاده شد. توالی‌های متعددی از ژن هورمون رشد جانوران ثبت شده در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با توالی به‌دست آمده تاس‌ماهی استرلیاد با استفاده از نرم‌افزار Clustalw X مورد ارزیابی قرار گرفت و آنالیز فیلوژنی آن با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۴ انجام شد.

نتایج

توالی کامل ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد و توالی آمینواسید آن از طریق تکنیک cDNA به‌دست آمد (شکل۱). نتایج بیانگر آن است که ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد bp ۷۶۸ با bp ۲۵ در ناحیه ′۵ و bp ۹۸ در ناحیه ′۳ طول داشته و دارای توالی کد شونده bp ۶۴۵ است. این ژن با کدون آغاز ATG در جایگاه ۲۶ شروع و با کدون TAG در جایگاه ۶۷۰ تمام می‌شود. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد یک پپتید بالغ ۱۹۰ اسیدآمینه‌ای را ترجمه می‌کند. سیگنال‌پپتیدژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد دارای ۲۴ اسیدآمینه می‌باشد و موقعیت آن از ابتدای توالی تا نوکلئوتید ۹۵ تعیین شد. جایگاه پلی‌آدنیلاسیون، AATAAA، bp ۴۲ بالاتر از دنباله poly a شناسایی شد. جایگاه glycosylation در موقعیت ۱۸۷ در انتهای پپتید بالغ شناسایی شد. چهار اسیدآمینه سیستئین در موقعیت ۴۷، ۵۸۴، ۶۳۵، ۶۵۹ مشاهده شد.



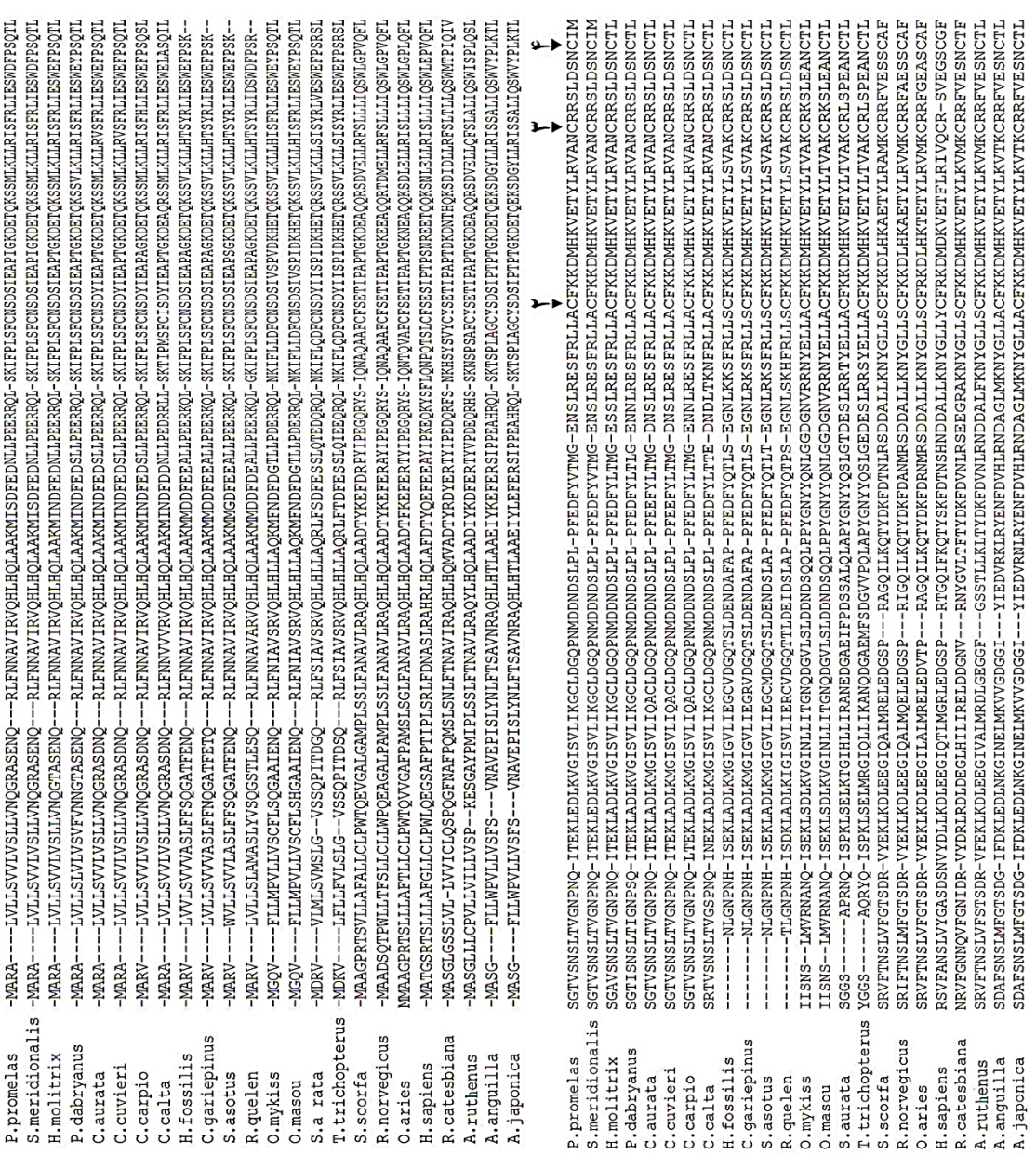
شکل ۱: توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه ژن هورمون رشد در تاس‌ماهی استرلیاد

شماره نوکلئوتید در کنار هر ردیف نشان داده شده است. اولین آمینواسید پپتید بالغ (Muture) با شماره ۱+ و آخرین اسیدآمینه سیگنال پپتید با شماره ۱- بر روی توالی مشخص شده است. کدون آغاز و کدون پایان با رنگ خاکستری علامت‌گذاری و محل پلی آدنیلاسیون در کادر سیاه مشخص شده است. چهار اسیدآمینه سیستئین که تشکیل‌دهنده باندهای دی سولفید ژن رشد می‌باشند با ستاره نشان‌دار شده‌اند و جایگاه گلیکوزیلاسیون با خط تیره مشخص است.

جدول ۱: مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با سایر گونه‌های مهره‌دار

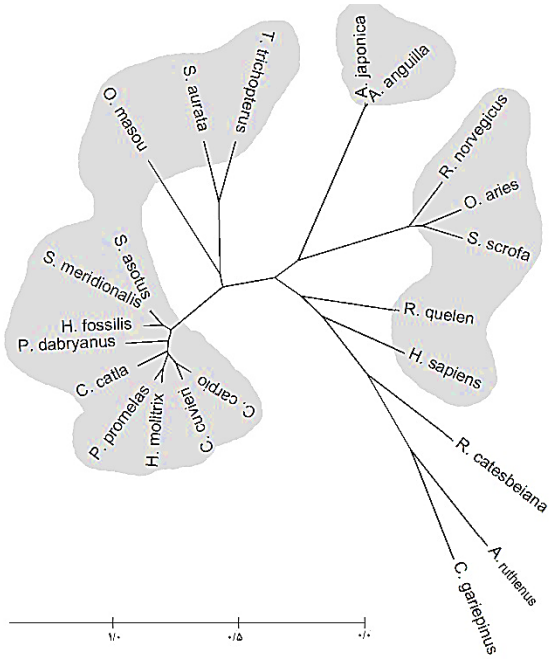
رده/راسته	گونه	شماره دسترسی بانک ژن	آمینواسید (٪)	نوکلئیک اسید (٪)
Anguiliformes	*Anguilla anguilla*	Ay۱۴۸۴۹۳	۶۳	۶۷
	Anguilla japonica	M۲۴۰۶۶	۶۲	۶۷
Cypriniformes	*Cyprinus carpio*	M۲۷۰۰۰	۴۵	۶۵
	Hypoththalmichtys mulitrix	X۶۰۴۷۵	۴۵	۶۸
	Carassius aurata	DQ۳۵۰۴۳۷	۴۶	۶۱
	Catla catla	AY۰۵۳۳۶۱	۴۷	۵۹
	Carassius cuvieri	AF۳۸۹۲۳۷	۴۶	۶۱
Perciformes	*Pimephales promelas*	AY۶۴۳۳۹۹	۴۴	۶۸
	Spaurus aurata	U۰۱۳۰۱	۳۸	۶۱
	Trichogaster trichopterus	Af۱۵۷۶۳۳	۳۷	۵۹
Salmoniformes	*Onchorhynchus mykiss*	M۲۴۶۸۳	۴۲	۶۵
	Onchorinchus masou	X۵۹۷۶۲	۴۳	۶۵
Amphibia	*Rana catesbiana*	S۵۲۰۲۷	۵۸	۶۷
Mammalia	*Ovis aries*	S۵۰۸۷۷	۶۴	۷۱
	Rattus norvegicus	V۰۱۲۳۷	۶۵	۷۱
	Sus scorfa	NM۲۱۳۸۶۹	۶۷	۷۱
	Homo sapiens	V۰۰۵۲۰	۴۸	۷۴
siluriformes	*Clarias gariepinus*	AF۴۱۶۴۸۸	۴۱	۷۴
	Heteropneustes fossilis	AF۱۴۷۷۹۲	۴۰	۶۷
	Silurus meridionalis	AF۵۳۰۴۸۱	۴۴	۶۹
	Silurus asotus	AY۱۵۷۴۹۶	۴۱	۶۸
	Rhamdia quelen	EF۱۰۱۳۴۱	۴۰	۷۲
Cobitinae	*Paramisgurus dabryanus*	DQ۳۵۰۴۳۲	۴۴	۵۹

توالی اسیدآمینه ژن رشد به‌دست آمده تاس‌ماهی استرلیاد با توالی‌های اسیدآمینه مشابه تعداد زیادی از گونه‌های مهره‌دار مقایسه شدونواحی‌که دارای اختلاف بودند به‌منظور ایجاد بیش‌ترین همولوژی میان گونه‌ها توسط خط تیره با یکدیگر هم‌ردیف شدند. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد بالاترین میزان همولوژی با سایر مهره‌داران را ابتدا با پستانداران (۶۷-۶۴٪)، پس از آن با مارماهی شکلان (۶۳٪) و دوزیستان (۵۸٪) و سپس با سایر ماهیان استخوانی دارد. نتایج نشان می‌دهد توالی‌های اسیدآمینه بالاترین همولوژی را در نواحی حفظ شده (conserve) اسیدآمینه سیستئین (cysteine) دارند. کم‌ترین میزان شباهت زمانی که توالی اسیدآمینه تاس‌ماهی استرلیاد با ماهی *Trichogaster trichopterus*(۳۷٪)صورت گرفت مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه توالی اسیدآمینه ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با توالی اسیدآمینه ژن رشد سایر گونه‌های مهره‌دار

چهار ناحیه حفظ شده اسیدآمینه سیستئین که در ساختار تمامی ژن‌های رشد حضور دارد با پیکان مشخص و شماره‌گذاری نشان داده شده است. توالی‌های اسیدآمینه ژن رشد هم‌ردیف شده با تاس‌ماهی استرلیاد از بانک ژن NCBI و مقالات چاپ شده به‌دست آمده است.



شکل ۳: دندروگرام برای ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد با ژن هورمون رشد سایر مهره‌داران

دندروگرام ترسیم شده به‌روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) مطالبق با توالی‌های بلاست شده ایجاد شد.

بحث

در این تحقیق برای نخستین‌بار توالی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد و توالی پروتئین آن شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد ۲۴ اسیدآمینه اول در ابتدای توالی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد سیگنال پپتید می‌باشد و جایگاه پلی آدنیلاسیون bp ۴۹ بالاتر ازکدون پایان در انتهای ’۳ توالی شناسایی شد. نتایج این بررسی نشان داد جایگاه پلی آدنیلاسیون تاس‌ماهی استرلیاد مشابه با جایگاه پلی آدنیلاسیون گونه‌های آزادماهیان AATAAA می‌باشد. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد سیگنال پپتید تاس‌ماهی استرلیاد یک ناحیه هیدروفوب بوده و همولوژی زیادی با سیگنال پپتید ژن رشد دیگر ماهیان دارد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد طول سیگنال پپتید در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد به‌طوری‌که Sciara و همکاران (۲۰۰۶)بامطالعه‌برژن‌هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلو (*Odontesthes bonariensis*) بیان داشتند که سیگنال پپتید این ماهی از ۱۷ اسید آمینه تشکیل‌شده است و کوتاه‌تر از سیگنال پپتید آزادماهیان (aa ۲۲) و انسان (۲۶aa) می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه Marins و همکاران (۲۰۰۳) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلو (*Odontesthes argentinensis*) نشان داد ۱۷ اسیدآمینه اول این ژن سیگنال پپتید و دارای دوجایگاه پلی آدنیلاسیون در انتهای ’۳ توالی پروتئین خود می‌باشد و بیان داشتند سیگنال پپتید این ماهی براساس نوع اسید آمینه تشکیل‌دهنده آن بسیار هیدروفوب و غیرقطبی است که مشابه نتایج به‌دست آمده برای سیگنال پپتید تاس‌ماهی استرلیاد بود. بررسی دیگری توسط Peyush و همکاران (۲۰۰۰) بر ژن هورمون رشد ماهی فلاندر (*Verasper moseri*) نشان داد که این ماهی دارای سیگنال پپتیدی با ۱۷ اسیدآمینه در ابتدا توالی و یک جایگاه پلی آدنیلاسیون در انتهای ’۵ توالی خود می‌باشد. نتایج مطالعه Ber و Daniel (۱۹۹۲) بر ماهی (*Tilapia nilotica*) نشان داد این ماهی دارای یک جایگاه پلی آدنیلاسیون AATAAA در انتهای ’۳ خود می‌باشد که مشابه با جایگاه پلی آدنیلاسیون در گونه‌های آزادماهیان بوده و با جایگاه پلی آدنیلاسیون کپور ATTAAA تفاوت دارد که مطابق با نتایج به‌دست آمده برای تاس‌ماهی استرلیاد می‌باشد.

بررسی توالی اسیدآمینه ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد نشان داد این پروتئین دارای چهار اسیدآمینه سیستئین در ساختار خود می‌باشد (شکل ۱). نتایج حاصل از مطالعه Venugopal و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی ژن هورمون رشد سه کپور ماهی هندی روهو (*Labeo rohita*)، مریگال (*Cirrhina mrigala*) و کاتلا (*Catla catla*) نشان داد که این ماهیان دارای ۴ اسیدآمینه سیستئین در توالی خود می‌باشند که در شکل‌گیری دو باند دی سولفید مولکول هورمون رشد نقش دارد. هم‌چنین مطالعه Sekine و همکاران (۱۹۸۵) در مقایسه

توالی آمینواسیدی ژن رشد ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*)، انسان (*Homo sapiens*) و موش (*Rattus norvegicus*) نشان داد که هر سه گونه دارای چهار اسیدآمینه سیستئین در جایگاه‌های مشابه می‌باشند و بیان داشت که چهار اسیدآمینه سیستئین در نگه‌داری فرم فعال ژن هورمون رشد نقش موثری دارد و همانند بسیاری از توالی‌های اسیدآمینه ژن رشد پستانداران حفظ شده است. در مقابل نتایج تحقیق Chang و همکاران (۱۹۹۲) بر سه ماهی کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) نشان داد که پروتئین ژن رشد این ماهیان دارای پنج اسیدآمینه سیستئین در توالی خود می‌باشند. نتایج حاصل از مقایسه موقعیت چهار اسیدآمینه سیستئین در ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با سایر گونه‌های مهره‌دار نشان می‌دهد که همگی در جایگاه‌های مشابهی بر روی توالی پروتئین قرار گرفته‌اند و به شدت حفظ شده‌اند. چهار اسیدآمینه سیستئین دو باند دی سولفیدی را شکل می‌دهد که در ساختار مولکول پروتئین ژن رشد شرکت می‌کند و نقش بسیار مهمی درحفظ فعالیت‌های هورمون رشد ایفا می‌کند (Paladini و همکاران، ۱۹۸۱). نتایج نشان می‌دهد از آن‌جایی‌که موقعیت چهار اسیدآمینه سیستئین بر روی توالی پروتئین ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد کاملاً برابر با جایگاه قرارگیری چهار سیستئین در توالی ژن رشد پستانداران است می‌توان این فرضیه را بیان داشت که باندهای دی سولفید در تاس‌ماهی استرلیاد همانند پستانداران نقش بیولوژیکی مشابهی را ایفا می‌کنند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت ۱۸۷ می‌باشد (شکل۲). بررسی Marins و همکاران (۲۰۰۳) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلو (*Odontesthes argentinensis*) نشان داد که این ماهی تنها دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت $Asn^{۲۰۱}$ می‌باشد. در مقابل نتایج مطالعه Pinheiro و همکاران (۲۰۰۸) بر ماهی آب شیرین پاکو (*Piaractus mesopotamicus*) نشان داد که ژن هورمون رشد این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون ($Glyco^{۱۲۳}$ و $Glyco^{۱۷۵}$) بر روی توالی پروتئین خود می‌باشد. هم‌چنین Sekine و همکاران (۱۹۸۵) با بررسی ژن رشد ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) دریافتند که این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون (ASN۱۳۱ و ASN۱۸۵) می‌باشد و بیان داشتند این جایگاه یک ویژگی ساختاری برای ژن هورمون رشد ماهیان می‌باشد و در ژن رشد پستانداران مشاهده نمی‌شود. نتایج Rentier و همکاران (۱۹۸۹) نشان داد آخرین سیستئین در انتهای توالی پروتئین ژن رشد و همیشه در ساختار جایگاه گیلکوزیلاسیون شرکت دارد که مطابق با نتایج به‌دست آمده برای تاس‌ماهی استرلیاد می‌باشد.

در این مطالعه ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد برای نخستین بار شناسایی و در باکتری *E.coli* کلون شد. نتایج بیانگر این است که ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد از کدون آغاز تا کدون پایان دارای توالی ۶۴۵ bp می‌باشد و پروتئینی با ۲۱۴ اسیدآمینه را ترجمه می‌کند. هم‌چنین نتایج نشان داد توالی پروتئین ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد ابتدا با پستانداران (۶۷٪)، پس از آن با مارماهیان (۶۳٪) و دوزیستان (۵۸٪) بیش‌ترین همولوژی را دارد (جدول ۱). اطلاعات در زمینه مکانیسم‌های مولکولی رشد و تولیدمثل تاس‌ماهیان اندک است اما مشخص است که هورمون‌ها فاکتور مهمی در کنترل این فرایندها می‌باشند (Caoو Zhou، ۲۰۱۱).در زمینه ژن هورمون رشد تاس‌ماهیان اطلاعات بسیار کمی وجود دارد و تاکنون مطالعه‌ای بر روی ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد صورت نگرفته است. از این میان نتایج مطالعه Cao و همکاران (۲۰۱۱) بر تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد ژن رشد این ماهی دارای توالی ۹۵۴ bp می‌باشد که ۱۶ bp در ناحیه '۵ و ۲۹۶ bp در ناحیه'۳ خود دارد و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را ترجمه می‌کند که مشابه با پروتئین به‌دست آمده برای تاس ماهی استرلیاد است. در تحقیق مشابهی مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۹) بر ژن هورمون رشد تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد که این ژن دارای توالی ۶۴۵ bp بوده و پروتئین آن از ۲۱۴ اسیدآمینه تشکیل شده است هم‌چنین با مقایسه پروتئین ژن رشد با پروتئین ژن رشد سایر گونه‌های مهره‌دار بیان نمودند ژن هورمون رشد تاس‌ماهی چینی بیش‌ترین همولوژی را با پستانداران و کم‌ترین شباهت از نظر توالی را با ماهیان استخوانی حقیقی دارد که مشابه نتایج به‌دست آمده برای تاس‌ماهی استرلیاد است. در بررسی دیگری که توسط Yom Din و همکاران(۲۰۰۸) برژن هورمون رشد تاس‌ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* صورت گرفت نشان داد که توالی نوکلئوتیدی این ژن در تاس‌ماهی روسی ۹۸۰ bp طول داشته و با کدون آغاز در جایگاه ۳۹ شروع شده و در جایگاه ۶۸۳ متوقف می‌شود. سپس برای بررسی عملکرد این ژن، میزان بیان آن‌ها را در تاس‌ماهیان روسی جوان نر و ماده ارزیابی و اثبات نمودند تفاوت معنی‌داری بین تاس‌ماهیان نر و ماده برای بیان ژن رشد تا سن پنج سالگی وجود ندارد. هم‌چنین مقایسه توالی آمینواسیدی این گونه با دیگر گونه‌های مهره‌دار را انجام داده و بیان داشتند که ژن رشد تاس‌ماهی روسی بیش‌ترین هم‌خوانی را با پستانداران(۷۰-۶۶٪) داشته، سپس مارماهی شکلان و دو زیستان (۶۱٪) و کم‌ترین هم‌خوانی (۴۷-۳۹٪) را با سایر ماهیان استخوانی داردکه با نتایج به‌دست آمده از ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد در این مطالعه مطابقت دارد. تاس‌ماهیان به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود مدل بسیار خوبی برای مطالعات تکاملی می‌باشند (Cao و Zhou، ۲۰۱۱). به‌همین دلیل مطالعه ژن‌های حفظ شده نظیر

ژن رشد در ماهیان خاویاری می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکامل این ماهی ارائه دهد.آنالیز فیلوژنی‌بیانگر این است که تاس‌ماهی استرلیاد یک گونه بسیار قدیمی بوده و از نظر ساختاری به پستانداران نزدیک‌تر از سایر گونه‌های ماهی است و شباهت بالای توالی پروتئین ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با دیگر گونه‌های پستاندار نشان می‌دهد که این ژن از یک ژن رشد اجدادی مشترک منشا می‌گیرد.

منابع

۱. **Ber, R. and Daniel, V., 1992.** Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from Tilapia nilotica. Gene. Vol. 113, pp: 245-250.

۲. **Cao, H. and Zhou, L., 2011.** Molecular biological study on hormones in Acipenseriformes. Hereditas (Beijing). Vol 33, pp: 707-712.

۳. **Cao, H.; Zhou, L.; Zhang, Y.Z.; Wei, Q.W.; Chen, X.H. and Gui, J.F., 2011.** Molecular characterization of the growth hormone in Chinese sturgeon and its expression during embryogenesis and early larval stages. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 27, pp: 501-504.

۴. **Chang, Y.; Liu, C.; Huang, F. and Lo, T., 1992.** The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: Bighead carp, silver carp, and grass carp. Gen Comp Endocrinol. Vol. 87, pp: 385-393.

۵. **Chen, Y.; Wang, Y.; He, S. and Zhu, Z., 2003.** Cloning and Sequencing of the Growth Hormone Gene of Large Yellow Croaker and Its Phylogenetic Significance. Biochemical Genetics. Vol. 42, pp: 365-375.

۶. **Funkenstein, B.; Chen, T.T.; Powers, D.A. and Cavari, B., 1991.** Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. Gene. Vol. 103, pp: 243-247.

۷. **Gomez, J.M.; Loir, M. and Le Gac, F., 1998.** Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reprodution. Vol. 58, pp: 483-491.

۸. **Kocour, M. and Kohlmann, K., 2011.** Growth hormone gene polymorphisms in tench, Tinca tinca L. Aquaculture. Vol. 310, pp: 298-304.

۹. **Liu, H.; ZHANG, F.R.; YANG, D. and YU, L.N., 2009.** Structure and Evolutionary Analysis ofA cipenser sinensis G row th H orm one cDNA Sequences. Journal of Hydroecology. Vol 2, p: 5.

۱۰. **Marins, L.F.; Levy, J.F.; Folch, J.M. and Sanchez, A., 2003.** A growth hormone-based phylogenetic analysis of euteleostean fishes including a representative species of the Atheriniformes Order, *Odontesthes argentinensis*. Genetics and Molecular Biology. Vol. 26, No. 3, pp: 295-300.

۱۱. **McCormick, S.D., 2001.** Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. Am. Zool. Vol. 41, pp: 781-794.

۱۲. **Mahmoud, S.S.; Moloney, M.M. and Habibi, H.R., 1996.** Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. General and Comparative Endocrinology. Vol. 101, pp: 139-44.

۱۳. **Moghim, M.; Kor, D.; Tavakolieshkalak, M. and Khoshghalb, M.B., 2006.** Stock status of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) along the Iranian coast of the Caspian Sea. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, No. 1, pp: 99-107.

۱۴. **Nicoll, C.S.; Steiny, S.S. and King, D.S., 1987.** The primary structure of coho salmon growth hormone and its cDNA. General and Comparative Endocrinology. Vol. 68, pp: 387-399.

۱۵. **Paladini, A.C.; Pena, C. and Poskus, E., 1981.** Molecular biology of growt hormone. CRC Crit. Rev. Biochem. Vol. 15. pp: 25-56.

۱۶. **Peyush, P.; Moriyama, S.; Takahashi, A. and Kawauchi, H., 2000.** Molecular Cloning of Growth Hormone Complementary DNA in Barfin Flounder (*Verasper moseri*). Marine Biotechnology. Vol. 2, pp: 21-26.

۱۷. **Pinheiro, J.S.; Wolff, J.L.S.; Araújo, R.C. and Hilsdorf, A.W.S., 2008.** Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of Neotropical freshwater fish Pacu (Piaractus mesopotamicus). Genetics and Molecular Biology. Vol. 31, No. l, pp: 381-384.

۱۸. **Pourkazemi, M., 2006.** Caspian Sea Sturgeon Conservation and Fisheries: Past present and Future. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, No. 1, pp: 12-16.

۱۹. **Rentier-Delrue, F.; Swennen, D.; Philippart, J.C.; L'hoir, C.; Lion, M.; Benrubi, O. and Martial, J.A., 1989.** Tilapia Growth Hormone: Molecular Cloning of cDNA and Expression in Escherichia coli. Mary Ann Liebert. Vol. 8, No. 4, pp: 271-278.

۲۰. **Ruban, G.I.; Kholodova1, M.V.; Kalmykov, V.A. and Sorokin, P.A., 2011.** A review of the taxonomic status of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin). Journal of Applied Ichthyology. Vol. 27, pp: 470-476.

۲۱. **Sekine, S.; Mizukami, T.; Nishi, T.; Kuwana, T.; Saito, A.; Sato, M.; Itoh, S. and Kawauchif, H., 1985.** Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in Escherichia coli. Applied Biology. Vol. 82, pp: 4306-4310.

۲۲. **Sciara, A.A.; Rubiolo, J.A.; Somoza, G.M. and Arranz, S.E., 2006.** Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 142, pp: 284-292.

۲۳. **Venugopal, T.; Mathavan, S. and Pandian, T.J., 2002.** Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA ends strategy. J. Biosci. Vol. 27, No. 3, pp: 261-272.

۲۴. **Xu, B.; Moriyama, S.; Zhang, P.J. and Miao, H.Z., 2001.** The complete amino acid sequence of growth hormone and partial amino acid sequence of prolactin and somatolactin from sea perch (*Lateolabrax japonicus*). Aquaculture. Vol. 201, pp: 117-136.

۲۵. **Yom Din, S.; Hurvitz, A.; Goldberg, D.; Jackson K.; Levavi-Sivan, B. and Degani, G., 2008.** Cloning of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) growth hormone and insulin-like growth factor I and their expression in male and female fish during the first period of growth. Journal of Endocrinology. Vol. 31, pp: 201-210.

۲۶. **Zohar, Y., 1989.** Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth, and smoltification. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 7, pp: 395-405.