جداسازی، شناسایی و کلونینگ ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در باکتری *E.coli*

فاطمه خشت زر[۱]، حسین ذوالقرنین[۱*]، بیتا ارچنگی[۱]، ابراهیم رجب زاده[۲]، احمد قاسمی[۳]

۱. گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳. مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱

چکیده

با توجه به اهمیت ژن هورمون رشد در آبزی پروری، در این پژوهش کلونینگ ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در وکتور pTZ57R/T مورد بررسی قرار گرفت. پس از خالص‌سازی محصول PCR توسط کیت QIAquick Gel Extraction، ژن هورمون رشد در وکتور pTZ57R/T قرار گرفت. محصول اتصال به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α انتقال گردید. از کلونی‌های سفید که نشان دهنده نوترکیب بودن باکتری حامل آنها بود، استخراج پلاسمید انجام شد. تأیید صحت کلون‌های به دست آمده در این پژوهش، با روش‌های PCR مستقیم و تعیین توالی انجام گرفت. cDNA هورمون رشد هامور معمولی دارای یک چارچوب باز خواندنی متشکل از ۶۱۵ نوکلئوتید و ۲۰۴ اسید آمینه است. وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده پروتئین هورمون رشد، به ترتیب برابر با ۲۳/۰۱۴ کیلو دالتون و ۶/۹ است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ژن هورمون رشد در وکتور pTZ57R/T با موفقیت کلون گردیده است و می‌توان از آن جهت بیان ژن هورمون رشد در وکتورهای بیانی و تولید پروتئین هورمون رشد استفاده کرد. مقایسه توالی ژن به دست آمده ئبا توالی ژن هورمون رشد هامور معمولی موجود در بانک ژنی شباهت بین آنها را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: هورمون رشد، کلونینگ ژن، هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، وکتور pTZ57R/T

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: zolgharnein@kmsu.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه با توجه به افزایش جمعیت کره زمین و کاهش ذخایر آبزیان به دلیل صید بی‌رویه و توسعه صنعت آبزی‌پروری، راهکارهایی جهت افزایش رشد ماهیان مورد توجه متخصصین قرار گرفته است. استفاده از زیست‌فناوری در افزایش رشد و تولید محصولات دریایی، یک امر ضروری است. هورمون رشد یکی از مهم‌ترین هورمون‌های پلی پپتیدی تولید شده توسط سلول‌های هیپوفیز پیشین است که رشد و متابولیسم مهره‌داران را تنظیم می‌کند. در ماهیان استخوانی، هورمون رشد یک هورمون پروتئینی تک پلی پپتیدی با وزن مولکولی تقریباً ۲۲ کیلودالتون همراه با حدود ۲۰۰ اسید آمینه است، که تنوع زیادی در اندازه نسبت به دیگر مهره داران نشان می‌دهد (Sciara *et al*., 2006). هورمون رشد هم‌چنین در دیگر فرایندهای فیزیولوژیکی مانند تولید مثل، تنظیم اسمزی، سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، عملکرد سیستم ایمنی، رفتار اجتماعی، توسعه غدد جنسی و اشتها نیز نقش دارد (Waters *et al*., 1999; Canosa *et al*., 2007). هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، یکی از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس به شمار می‌آید. هامورماهیان ارتباط نزدیکی با آب‌های مصبی و خوریات دارند. بالغین این ماهی، یوری‌هالین و یوری‌ترم می‌باشند و محل اصلی زندگی آن‌ها در آب‌های ساحلی می‌باشد (معاضدی، ۱۳۸۶).

از مطالعات انجام شده بر روی سایر گونه‌های ماهی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. Sekine و همکاران سال 1985، کلونینگ و بیان ژن هورمون رشد Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) را در باکتری *E. coli* مورد ارزیابی قرار دادند. نتیجه توالی کامل نوکلئوتیدی ژن هورمون رشد سالمون به ترتیب ۳۹ درصد و ۳۵ درصد با ژن هورمون رشد انسان و موش همولوگ بود. Peyush و همکاران سال 2000، cDNA هورمون رشد Barfin flounder (*Verasper moseri*) را کلون کردند. Venugopal و همکاران سال 2002، cDNA هورمون رشد سه گونه *Labeo rohita*، *Cirrhina mrigala* و *Catla catla* را توالی‌یابی، کلون و سپس در باکتری *E. coli* بیان کردند. این توالی‌ها ۹۶-۹۸ درصد با یکدیگر همولوگ بودند. Pinheiro و همکاران سال 2008، آنالیز توالی و کلونینگ cDNA هورمون رشد *Piaractus mesopotamicus* را ارزیابی کردند. Liu و همکاران سال 2011، ژن هورمون رشد (*Paralichthy lethostigma*) flounder Southern را تعیین توالی و کلون کردند، نتایج به دست آمده نشان داد که طول توالی cDNA، ۹۰۲ bp و شامل یک ناحیه 5́UTR و یک ناحیه ۱۹۸ bp از 3́UTR است. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای درباره کلونینگ ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی در خلیج فارس صورت نگرفته و این گونه از رشد خوبی برخوردار است، لذا در این مطالعه ژن کد کننده این ماهی کلون و توالی نوکلئوتیدی آن با توالی‌های ثبت شده از این ژن در بانک ژنی مقایسه شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه برداری و استخراج mRNA

در این پژوهش، نمونه برداری با قایق صیادی از بندر بوشهر و با استفاده از تور ترال انجام شد. جهت جداسازی هیپوفیز، ماهیان صید شده (۵ ماهی) بلافاصله با ماده‌ی ۲- فنوکسی اتانول بی‌هوش شدند و جداسازی با وسایل تشریح استریل شده انجام شد. سپس، هیپوفیزهای جدا شده به میکروتیوب منتقل شدند و در تانک ازت قرار گرفتند. نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در مرحله بعد، نمونه‌های هیپوفیز از فریزر خارج و با ازت مایع لیز شدند. استخراج mRNA ، با استفاده از محلول Isol-RNA انجام شد. غلظت mRNA تخلیص

شده با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل eppendorf مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۲ سنتز cDNA

جهت سنتز cDNA از کیت Accupower ®Rocket Script™ استفاده شد. بدین منظور، ۴ میکرولیتر از نمونه RNA استخراج شده را درون یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته، ۲ میکرولیتر از آغازگر Qligo dT و ۱۴ میکرولیتر از آب تزریقی به آن اضافه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محتوای میکروتیوب به میکروتیوب زرد رنگ مربوط به خود کیت اضافه گردید. میکروتیوب چند ثانیه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، چرخه حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید. در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رشته‌ی cDNA سنتز می‌شود و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نهایی نیز فعالیت آنزیم رونوشت‌بردار معکوس متوقف می‌شود.

۲-۳ واکنش PCR

توالی آغازگرهای سفارش داده شده از شرکت مت بیون برای تکثیر ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی به صورت زیر است:

Forward: 5′- ATG GAC CGA GTC GTC CTC CTG- 3′

Reverse: 5′ - CTA CAG GGT ACA GTT GGC CTC- 3′

جهت انجام PCR برای تکثیر ژن هدف، ۱ میکرولیتر cDNA الگو، ۲/۵میکرولیتر PCR buffer (10X)، ۱/۵ میکرولیتر MgCl2 (50mM)، ۰/۸میکرولیترdNTP (10 mM) ، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۳ میکرولیتر Taq polymerase (5U/µl) و ۱۶/۹ میکرولیتر آب دوبار تقطیر با حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر با مرحله واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز و با انجام ۳۵ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله گسترش به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به پایان رسید. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد، باند مورد نظر با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction خالص‌سازی شد و برای تعیین توالی ارسال گردید.

۲-۴ کلونینگ ژن و استخراج پلاسمید

واکنش اتصال طبق دستورالعمل کیت InsTAclone ™ PCR Cloning Kit انجام شد و ژن هورمون رشد در وکتور pTZ57R/T کلون شد. ترکیبات واکنش بر اساس دستورالعمل کیت با هم مخلوط شدند. جهت انجام واکنش اتصال، ۴ میکرولیتر از محصول خالص شده PCR و ۳ میکرولیتر پلاسمید pTZ57R/T به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در محیط آزمایشگاه انکوباته شده و سپس روی یخ انتقال داده شدند. در مرحله بعد ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase و ۶ میکرولیتر 5X Ligation Buffer به آن‌ها اضافه شدند و بلافاصله ورتکس شده و سپس سانتریفیوژ شدند. مخلوط واکنش با آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس، میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه یخ‌ساز نگه داری شد. برای غیرفعال سازی آنزیم، مخلوط واکنش مدت ۱۰ دقیقه روی هات پلیت با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به روش انتقال شیمیایی، پلاسمید نوترکیب به سلول‌های میزبان (باکتری *E. coli* سویه DH5α) منتقل شد. در مرحله بعد، باکتری‌ها روی محیط کشت جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، X-gal و IPTG کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده

شدند. انتخاب کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب براساس تشکیل کلونی‌های آبی و سفید صورت گرفت. کلون‌های آبی رنگ، فاقد پلاسمید نوترکیب هستند؛ زیرا آنزیم بتاگالاکتوزیداز (lacZ) تولیدی آنها X-gal را به محصول رنگی هیدرولیز می‌کند. کلونی‌های سفید حاوی پلاسمیدهای نوترکیب هستند، زیرا با ورود قطعه DNA هدف به جایگاه کلونینگ، توالی کد کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز (lacZ) مختل شده و باکتری دیگر قادر به تجزیه X-gal نخواهد بود. جهت تأیید رشد باکتری‌های انتقال داده شده، از کلنی‌های سفید رنگ، کشت تک کلنی انجام شد. برای این منظور، چند پلیت محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG که از قبل تهیه شده بود، را از یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد بیرون آورده و در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند تا هم دما شوند و به باکتری‌ها شوک وارد نشود. سپس نوک لوپ را استریل کرده، یک کلنی سفید را برداشته، در پلیت جدید کشت چهار منطقه‌ای انجام شد. به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور معمولی قرار داده شد. از کلونی‌های سفید که نشان دهنده نوترکیب بودن باکتری حامل آنها بود، استخراج پلاسمید با استفاده از روش لیز قلیایی انجام شد(Sambrook and Russel, 2001). از ژل آگارز ۷/ . درصد برای الکتروفورز DNA پلاسمیدی استفاده شد. تأیید صحت کلون‌های به دست آمده با روش‌های PCR مستقیم و تعیین توالی انجام گرفت.

۲-۵ آنالیز ژن تکثیر شده

مقایسه توالی به دست آمده با داده‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار BLAST در NCBI انجام شد. ترجمه توالی نوکلئوتیدی به اسید آمینه‌های، با استفاده از نرم افزار MEGA 5 (Tamura *et al*., 2007) صورت گرفت. برای شناسایی توالی سیگنال پپتیدی از نرم افزار (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) و جهت جستجوی موتیف از نرم افزار (http://www.genome.jp/tools/motif/) استفاده شد. ویژگی‌های توالی پروتئینی بدست آمده با استفاده از برنامه Protparam مورد بررسی قرار گرفتند (ExPASY: http://www.expasy.ch/tools/). جهت بررسی و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای با تعدادی از توالی‌ها که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، از نرم افزار CLC Viewer 6 Sequence (Siepel and Haussler, 2004) استفاده شد.

۳. نتایج

۳-۱ تکثیر ژن هورمون رشد:

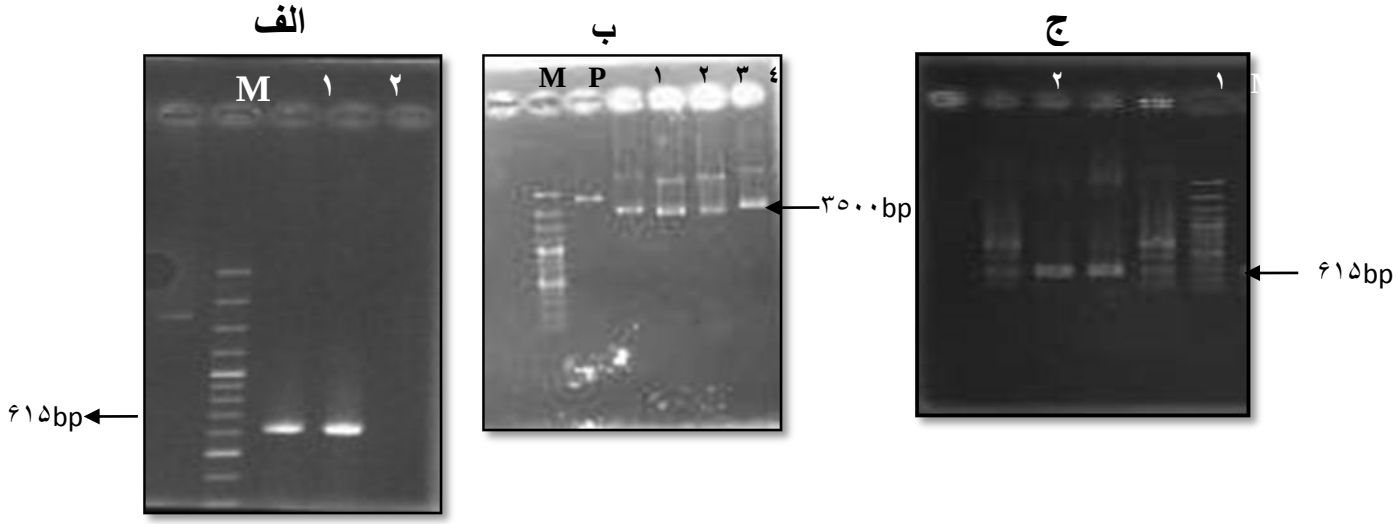
تکثیر ناحیه کد کننده ژن هورمون رشد ماهی هامور با PCR منجر به تکثیر قطعه‌ای اختصاصی شد که به صورت باندی با اندازه تقریبی bp ۶۱۵ در ژل آگارز ظاهر گردید (شکل۱(الف)). برای تأیید نهایی، محصول به دست آمده، تعیین توالی شد و توالی نشان داده شده به دست آمد (شکل۲).

۳-۲ کلونینگ ژن هورمون رشد

پس از رشد باکتری‌های ترانسفورم شده در پلیت‌هایی که در انکوباتور معمولی به مدت ۲۴ ساعت کشت شده بودند، کلونی‌ها به رنگ‌های سفید و آبی ظاهر شده بودند. کلنی‌های ترانسفورم شده به رنگ سفید و ترانسفورم نشده‌ها به رنگ آبی بودند. به منظور بررسی کلونینگ ژن در باکتری، استخراج پلاسمید حاوی ژن هورمون رشد از باکتری‌های ترانسفورم شده صورت گرفت و باندهای حاصل بررسی شدند (شکل۳(ب)). با توجه به اینکه پلاسمیدی که ژن هدف را دریافت کرده نسبت به پلاسمید فاقد ژن سنگین‌تر است، بر روی ژل آگارز کندتر حرکت کرده، در ناحیه عقب‌تری نسبت به پلاسمید فاقد ژن قرار می‌گیرد.

برای تأیید نهایی کلونینگ، واکنش PCR مستقیم با بهره گیری از پلاسمیدهای استخراج شده که دارای ژن

هدف بودند و پرایمرهای M13 PUC انجام شد. الگوی حرکتی قطعات حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز، نشان دهنده موفقیت آمیز بودن فرایند کلونینگ ژن هورمون رشد در وکتور pTZ57R/T است (شکل ۱-ج).



شکل ۱. **الف**-الگوی حرکتی محصول PCR ژن هورمون رشد. M: مارکر استاندارد با وزن ۱۰۰ bp (Fermentase)، ۱ و ۲ باند ۶۱۵ bp محصول PCR با آنزیم Taq **ب**- الگوی حرکتی پلاسمیدهای استخراج شده (M: مارکر استاندارد با وزن ۱۰۰ bp (Fermentase)، P: پلاسمید، ۱ و ۴: پلاسمیدهای نوترکیب دریافت کننده ژن، ۲ و ۳: پلاسمیدهای فاقد ژن **ج**- تصویر الکتروفورز محصول PCR مستقیم کلون‌های نوترکیب (M: مارکر استاندارد با وزن ۱۰۰ bp (Fermentase)، ۱ و ۲: محصول PCR کلون-های نوترکیب ژن هورمون رشد)

```
  1 agaatgctct gagcagctga actcagacct gatccaccac agccagacct gatccaccag
 61 agccagacct gatcccagac cagccatgga ccgagtcgtc ctcctgctgt cagtagtgtc
121 tctgggtgtt tcctctcagc caatcacaga cggccagcgt ctgttctcca tcgccgtcag
181 cagagttcaa catctccacc tgcttgctca gagactcttc tccgactttg agagcactct
241 gcagacggag gagcagcgac agctcaacaa gatcttcctg caggacttct gtaactctga
301 ttacatcatc agccccatcg acaagcacga gacgcagcgc agctccgtgt tgaagctgtt
361 gtcgatctcc tatcggttgg tggagtcctg ggagttcccc agtcggtccc tgtccggagg
421 ttctgctccc agaaaccaga tttctcccaa actgtctgaa ttgaagaccg ggatcctgct
481 gctgatcagg gccaatcagg acggagcgga gctcttccct gacagctccg ccctccagct
541 ggctccttat gggaactatt atcagagtct gggcgccgac gagtcactgc gacgaacgta
601 cgaactgctg gcttgtttca agaaagacat gcacaaggtg gagacctacc tgacggtggc
661 taaatgtcga ctctctcctg aggccaactg taccctgtag tcccgcctct ccagtatgaa
721 gacacgctcc catgtggatg atgtaatgct gtgtgttctg tagtcccgcc cacatgtttt
781 ctgactctgc taattagcat tagcatttgt gttagccaca gtgttagcct gtgttcagtt
841 gtttgttgga gcaggtgtta ttatgatgac agccatcaac aggaggtgat gtcatactgt
901 caccatgtgt aataaagtgt gtgctgtgtt gcattcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

شکل ۲. توالی نوکلئوتیدی ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی

۳-۳ توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن هورمون رشد

cDNA هورمون رشد هامور معمولی یک چارچوب باز خواندنی، ۶۱۵ نوکلئوتید و ۲۰۴ اسید آمینه دارد.؛ تنها یک موتیف NCT (Asn-Cys-Thr) در توالی آمینو اسیدی در ناحیه C- انتهایی است که یک جایگاه بالقوه برای N-Linked glycosylation است. توالی سیگنال پپتیدی دارای ۱۷ اسید آمینه است. توالی آمینو اسیدی هامور معمولی با ۱۲ گونه از ماهیان مقایسه شد. توالی سیگنال پپتیدی این گونه کاملاً با گونه‌های *Epinephelus coioides* (Li *et al*., 2005)، *Epinephelus lanceolatus*، *Epinephelus awoara* و*Epinephelus akaar* مشابه بوده و با سایر گونه‌ها تنها در چند اسید آمینه متفاوت است (شکل۵). وزن مولکولی برابر ۲۳/۰۱۴ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک برابر با ۶/۹۰ برای این پروتئین محاسبه شد. برای تعیین موتیف قطعه ژن هورمون رشد، با وارد کردن توالی آمینو اسیدی به دست آمده از ماهی هامور معمولی در نرم افزار، تأیید شد که این ژن دو موتیف دارد. هم‌چنین تأیید شد که این ژن جزء "growth-hormone-like superfamily" است.

آنالیز تشابه cDNA هورمون رشد و توالی پروتئینی این گونه با برنامه BLAST در NCBI انجام شد. درصد تشابه گونه‌ها بر اساس Blast توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی گونه مورد مطالعه با سایر گونه‌ها در جدول (۱) آمده است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

به دلیل توانایی بالقوه هورمون رشد به عنوان افزایش دهنده رشد در آبزی‌پروری، کلونینگ و بیان ژن هورمون رشد در شماری از ماهیان استخوانی صورت گرفته است (Peyush *et al*., 2000). هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به عنوان یکی از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس است، رشد خوبی دارد. در تحقیق حاضر، ژن هورمون رشد این گونه انتخاب شد و کلونینگ cDNA آن با استفاده از وکتور pTZ57R/T در باکتری *E. coli* سویه DH5α انجام گرفت. با استخراج پلاسمید، انجام کلونینگ با موفقیت مورد تأیید قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی، آمینو اسیدی و سیگنال پپتیدی ژن هورمون رشد این گونه بررسی شد. در این تحقیق، مقایسه توالی نوکلئوتیدی این گونه با سایر ماهیان انجام شد. توالی کد کننده cDNA هورمون رشد هامور معمولی bp ۶۱۵ بوده، با گونه‌های *E. lanceolatus*، *E. awoara* و *Acanthopagrus latus* به ترتیب ۹۹ درصد، ۹۷ درصد و ۸۹ درصد مشابه است. در تحقیق حاضر، ژن هورمون رشد گونه هامور معمولی خلیج فارس از نظر ساختار ژن و پروتئین کاملاً مشابه با *Epinephelus coioides* ثبت شده در بانک ژنی (Li *et al*., 2005) است. توالی پروتئینی هامور معمولی دارای ۲۰۴ اسید آمینه است؛ هم‌چنین گونه‌هایی که با آن‌ها هم‌ترازی صورت گرفت، نیز دارای ۲۰۴ اسید آمینه بودند. Pinheiro و همکاران در سال 2008، آنالیز توالی و کلونینگ cDNA هورمون رشد *Piaractus mesopotamicus* را ارزیابی کردند. طبق آنالیز، توالی پروتئینی گونه *P. mesopotamicus* دارای ۱۷۸ اسید آمینه بوده که ۱۰ اسید آمینه نسبت به *Ictalurus punctatus* و ۲۶ اسید آمینه نسبت به هامور معمولی کمتر است. هم‌چنین طی بررسی که Anathy و همکاران در سال 2001 روی گونه *Heteropneustes fossilis* انجام دادند، مشخص شد که توالی پروتئینی این گونه دارای ۲۰۰ اسید آمینه دارد سیگنال پپتید هامور معمولی دارای ۱۷ اسید آمینه است در حالی که، سیگنال پپتید کپورماهیان (Koren *et al*., 1989)، ماهی طلایی (Law *et al*., 1996)، *Labeo rohita* (Venugopal *et al*., 2002) و *Oncorhynchus keta* (Sekine *et al*., 1985) ۲۲ اسید آمینه دارد. نتایج

حاصل از آنالیز توالی پروتئینی نشان داد، هامور معمولی دارای یک جایگاه N-Linked glycosylation در ناحیه C- انتهایی است ؛ سایر گونه‌های مقایسه شده نیز دارای یک جایگاه هستند؛ هم‌چنین گونه‌های *Piaractus mesopotamicus* (Pinheiro *et al*., 2008)، *Paralichthys lethostigma* (Liu *et al*., 2011)، *Mugil platanus*، *Hemiramphus brasiliensis* (Meier *et al*., 2006) نیز دارای یک جایگاه بوده، در حالیکه در ماهی طلایی (Law *et al*., 1996)، کپورماهیان (Koren *et al*., 1989)، گربه ماهی‌ها (Lemaire *et al*., 1994) و *Oncorhynchus keta* (Sekine *et al*., 1985) دو جایگاه N-Linked glycosylation یافت شده است. یکی دیگر از ویژگی-های شاخص هورمون رشد، حضور اسید آمینه سیستئین است.

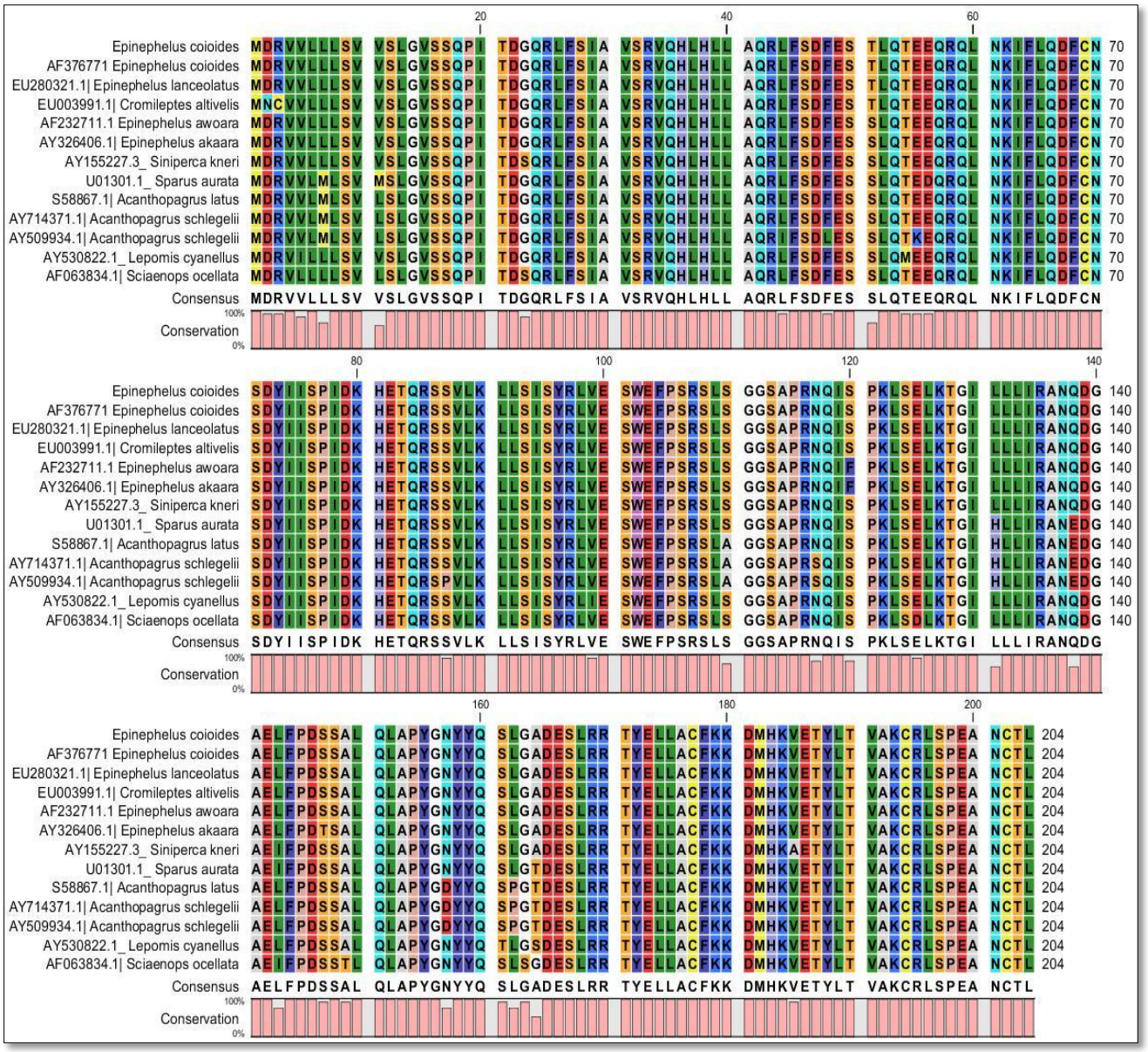
سیستئین‌ها می‌توانند باندهای دی‌سولفیدی تشکیل دهند که انطباق مولکول‌های پروتئینی را تحت تأثیر قرار دهند (Sekine *et al*., 1985). هورمون رشد هامور معمولی دارای چهار اسید آمینه سیستئین است. گونه-هایی که با آنها هم‌ترازی صورت گرفته، نیز دارای همین تعداد سیستئین می‌باشند به جز *Cromileptes altivelis* (Syaifudin *et al*., 2007) که ۵ سیستئین دارد. بر اساس ساختار پیشنهادی هورمون رشد، ۴ تا از این سیستئین‌ها در تشکیل باندهای دی‌سولفید شرکت می‌کنند. نقش احتمالی سیستئین پنجم ممکن است مجموعه‌های الیگومریک تشکیل دهد که بر refolding هورمون رشد تأثیر مناسبی بگذارد (Fine *et al*., 1993). طبق آنالیزها، ناحیه C- انتهایی دارای تشابه بالایی در میان ماهیان گوناگون می‌باشد و نقش کلیدی در ساختار و عملکردهای هورمون رشد ایفا می‌کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که قطعه ۶۱۵bp ژن هورمون رشد در وکتور pTZ57R/T کلون گردیده است و این پلاسمید جهت کلونینگ ژن هورمون رشد ماهی هامور معمولی مناسب می‌باشد. استفاده از روش کلونینگ برای تهیه پلاسمید نوترکیب، روشی مناسب می‌باشد. هم‌چنین پلاسمید حاوی ژن هورمون رشد توانایی حفظ ژن را داراست. سویه باکتریایی DH5α نیز می‌تواند برای تولید هورمون رشد نوترکیب در تحقیقات پایه و برنامه‌های کاربردی آبزی‌پروری در مقیاس بزرگ مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱. درصد تشابه گونه‌ها بر اساس Blast توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی

گونه ها	حداکثر تشابه	
	توالی نوکلئوتیدی	توالی پروتئینی
Epinephelus coioides	٪۱۰۰	٪۱۰۰
Epinephelus lanceolatus	٪۹۹	٪۱۰۰
Cromileptes altivelis	٪۹۸	٪۱۰۰
Epinephelus awoara	٪۹۷	٪۹۹
Epinephelus akaara	٪۹۷	٪۹۹
Siniperca kneri	٪۹۱	٪۹۸
Lepomis cyanellus	٪۹۰	٪۹۷
Sparus aurata	٪۹۰	٪۹۶
Sciaenops ocellata	٪۹۰	٪۹۶
Acanthopagrus latus	٪۸۹	٪۹۵
Acanthopagrus schlegelii	٪۸۹	٪۹۵
Acanthopagrus schlegelii	٪۸۹	٪۹۵

منابع

معاضدی، ج. ۱۳۸۶. تکثیر و پرورش مصنوعی ماهی هامور: بررسی مقدماتی ماهی هامور در قفس (در خوریات ماهشهر). گزارش سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، با شماره ثبت ۵/۲۲۷.



شکل ۵. هم‌ترازی توالی آمینو اسیدی هورمون رشد هامور معمولی با سایر گونه‌ها

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*). Bio.Sci, 3:315-324.

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

Fine, M., Sakal, E., Vashdi, D., Daniel, V., Levanon, A. and Lipshitz, O. 1993. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: Expression, purification, and determination of biological actity in vitro and in vivo. Gen. Comp. Endocrinol, 89: 51-61.

Guan, J. L., Machamer, C. E., Rose, J. K. 1985. Glycosylation allows cell surface transport of an anchored secretory protein. Cell, 42:489-96.

Koren, Y., Sarid, S., Ber, R. and Daniel, V. 1989. Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. Gene, 77: 309–315.

Law, M. S., Cheng, K. W., Fung, T. K., Chan, Y. H., Yu, K. L. and Chan, K.M. 1996. Isolation and characterization of two distinct growth

hormone cDNAs from the goldfish (*Carassius auratus*). Arch. Biochem. Biophys, 330: 19–23.
Lemaire, C., Writ, S. and Panyin, S. 1994. Giant catfish (*Pangasianodon gigas*) growth hormone-encoding cDNA cloning and sequencing by one sided polymarase chain reaction. Gene, 49:271–276.
Li, W. S., Chen, D., Wong, A. L. and Lin, H. R. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gen. Comp. Endocrinol, 144: 78-89.
Liu, B., Zang, X. N., Liu, S. M., Zhang, X. C. and Lei, J. L. 2011. Cloning, sequence characterization and phylogenetic analysis on full length cDNA of growth hormone from southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). TrFAS,11: 529-537.
Meier, K. M., Castano, C., Laurino, J., Levy, J. A. and Marins, L. F. 2006. cDNA cloning and phylogenetic analysis of growth hormone genes , expression and immunological characterization of pejerrey (Odontesthes bonariensis). Comp. Biochem. Physiol, 142: 284-292.
Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S. and Kawauchif, H. 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in Escherichia coli. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 82(13): 4306-4310.
Siepel, A. and Haussler, D. 2004. Combining phylogenetic and hidden Markov models in biosequence analysis. Comput. Biol, 11(2-3): 413-428.
Syaifudin, M., Alimuddin, A., Widyastuti, U., Sudrajat, A.O., Sumantadinata, K. and Aliah, R. S. 2007. cDNA encoding growth hormone from humpback grouper (Cromileptes altivelis). BIOTROPIA, 14: 1-6.
Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol, 24: 1596-1599.
Venugopal, T., Anathy, V., Pandian, T. J., Gong, G. Z. and Mathavan, S. 2002. Molecular cloning of growth hormone-encoding cDNA of an Indian major carp (Labeo rohita) and its expression in Escherichia coli and zebrafish. Gen. Comp. Endocrinol, 125: 236–247.
from the mullet *Mugil platnus* (mugilomorpha, mugilidae) and the halfbeak *Hemiramphus brasiliensis* (atherinomorpha, hemiramphidae). Atlantica, Rio Grande, 28(2): 97- 102.
Peyush, P., Moriyama, S., Takahashi, A. and Kawauchi, H. 2000. Molecular cloning of growth hormone complementary DNA in Barfin Flounder (*Verasper moseri*). Mar. Biotechnol, 2: 21–26.
Pinheiro, J. S., Wolff, J. L. C., Araujo, R. C. and Hilsdorf, A. W. S. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Genet. Mol. Biol, 31:381-384.
Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd eds. Cold Spring Harbor Laborator Press, ISBN.978-087969577-4, New York, 2344 p.
Sciara, A. A., Rubiolo, J.A., Somoza, G. M. and Arranz, S. E. 2006. Molecular cloning

Waters, M. J., Shang, C. A., Behncken, S. N., Tam, S. P., Li, H., Shen, B. and Lobie, P. E. 1999. Growth hormone as a cytokine. Clin. Exp. Parmacol. Physiol, 26: 760–764.

Isolation, Identification and Cloning of growth hormone gene from *Epinephelus coioides* in *E. coli*

Kheshtzar, Fatemeh[1]., Zolgharnein, Hossein[1]*, Archangi, Bita[1]., Rajabzadeh. Ebrahim[2]., Ghasemi, Ahmad[3]

1 Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University, Khorramshahr, Iran

2 Department of Marine natural Source, Faculty of Marine natural Source, University, Khorramshahr, Iran

3 center of Biotechnology, university of Persian Gulf , Iran

Abstract

According to the role of the growth hormone gene in the aquaculture, in this research cloning growth hormone coioides (Epinephelus coioides) was evaluated in vector pTZ57R / T. After PCR product purification by kit QIAquick Gel Extraction, growth hormone gene was integrated into pTZ57R / T vector. Constructed vector was transferred in E. coli strain DH5α competent cells. The white colonies was recombinant bacteria, from that that plasmid extraction was performed. Cloning obtained conformed using with direct PCR and sequencing methods. Growth hormone cDNA from *E. coioide* has an open reading frame of 615 nucleotides and 204 amino acids respectively. The calculated molecular weight and predicted of isoelectric point of the growth hormone protein were 014/23 kDa and 9.6 respectively. The results of this study showe that growth hormone gene in pTZ57R / T vector successfully had been cloned and can be used to growth hormone gene expression and protein production. The omparition of gene sequencing with growth hormone gene from E. *coioides* in the GenBank was showed similarity between them .

Keywords: Growth hormone, cloning, Epinephelus coioides, pTZ57R/T vect

*Corresponding author, E-mail: zolgharnein@kmsu.ac.ir