

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: 14155-6116

تاریخ دریافت: دی 1395 تاریخ پذیرش: فروردین 1396

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 768 نوکلئوتیدی می‌باشد که دارای 26 bp نوکلئوتید غیرترجمه‌ای در ناحیه 5' و 98 bp نوکلئوتید غیرترجمه‌ای در ناحیه 3' خود بوده و توالی کد شونده‌ای با 645 bp نوکلئوتید را دارد. همچنین این ژن با کدون آغاز ATG در جایگاه 26 شروع و با کدون TAG در جایگاه 670 تمام می‌شود. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد بالاترین میزان همولوژی با سایر مهره‌داران را ابتدا با پستانداران (64-67 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 منشأ می‌گیرد.

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

مقدمه

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 با شرایط 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

دریای خزر به‌عنوان بزرگترین منبع ماهیان خاویاری از میان 27 گونه تاس‌ماهی شکلان دارای 6 گونه ارزشمند در دریای خزر و حوضه آبریز خود می‌باشد (Ruban و همکاران، 2011) و در گذشته عمده ذخایر ماهیان خاویاری با تولید 80 الی 90 درصد خاویار جهان در دریای خزر تولید می‌شد (Pourkazemi، 2006) که متأسفانه امروزه به‌دلیل صید غیرمجاز، از دست رفتن زیست‌گاه‌های تولیدمثل و انواع آلودگی-ها ذخایر تاس‌ماهیان در خطر انقراض قرار گرفتند (Moghimi و همکاران، 2006). تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) یکی



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 و کیفیت mRNA به‌دست آمده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در مرحله اول از cDNA، mRNA، cDNA تگ رشته‌ای غیراختصاصی با استفاده از پرایمر Oligo(dT)18 و روش RT-PCR ساخته شد. رشته مکمل cDNA نیز با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی شامل پرایمر پیش‌رونده "3'-5'ATGGCATCAGGTCTGCTTCT-CTACAGAGTACAGTTGCTC-5" 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 °C 94 به مدت 4 دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، °C 36 سیکل در دمای °C 94 به مدت 30 ثانیه، دمای °C 58 به مدت 30 ثانیه، °C 72 به مدت 45 ثانیه و بسط نهایی °C 72 به مدت 5 دقیقه انجام شد و سپس محصول به‌دست آمده از طریق الکتروفورز ژل آگارز 1/5% مورد ارزیابی قرار 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، 6-5 میکرولیتر از محلول حاوی ژن رشد تکثیر یافته داخل میکروتیوب به عنوان الگو (DNA template) ریخته شد و 21 میکرولیتر مخلوط مواد مورد نیاز در PCR به نسبت 2/5 میکرولیتر بافر PCR Buffer (10 x)، 2 میکرولیتر آغازگر، 1 میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت 2mM MgCl₂، 0/5 میکرولیتر dNTP با غلظت 200 μM، 0/2 میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلی-مرز (1 U/μl) و در نهایت به‌وسیله آب مقطر استریل به حجم نهایی 25 میکرولیتر رسانده شد. در این مرحله دمای بسط نهایی 30 دقیقه در نظر گرفته می‌شود تا با ایجاد انتهاهای چسبیده در دو انتهای ژن رشد، از آن برای الحاق به پلاسمید استفاده شود. در این آزمایش از پلاسمید PTZ57R/T (Fermentas, USA) به عنوان وکتور با طول 2886 bp استفاده گردید و به‌منظور کلونینگ به باکتری *E. coli* سویه Top10 (Invitrogen; 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 T4 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 5 میکرولیتر، آنزیم DNA 4 Ligase T با غلظت 2 میکرولیتر، پلاسمید PTZ57R/T با غلظت 3 میکرولیتر و بافر الحاق با غلظت 1 میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند و در دمای °C 4 به مدت یک شبانه روز (overnight) انکوباسیون گردید.

(Yom Din و همکاران، 2008) و به شکل بارزی با خصوصیات تولیدمثلی جانوران مثل رشد، تولیدمثل و سازگاری اسمزی مرتبط است (Gomez و همکاران، 1998؛ McCormic، 2001). همچنین هورمون رشد می‌تواند به عنوان یک عامل مهم محرک رشد در آبی‌پروری نقش ایفا نماید و برای رشد توده بدنی و تولیدمثل در ماهیان استخوانی و سازگاری اسمزی در ماهیان یوری هالین ضروری است (Zohar، 1989؛ Sciarra و همکاران، 2006). در میان مهره‌داران، هورمون رشد برای رشد عادی الزامی است و در تنظیم بسیاری از فرایندهای آنابولیک موثر می‌باشد (Xu و همکاران، 2001). 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 Din و همکاران، 2008).

تاکنون مطالعات متعددی روی توالی نوکلئوتیدی cDNA هورمون رشد بسیاری از گونه‌های ماهیان صورت گرفته است (Nicoll و همکاران، 1987؛ Rentier و همکاران، 1989؛ Funkenstein و همکاران، 1991؛ Mahmoud و همکاران، 1996؛ Chen و همکاران، 2003). تحقیقات نشان می‌دهد استفاده مداوم از هورمون رشد در جیره آبیان پرورشی موجب افزایش سرعت رشد شده و مدت زمان بلوغ را کاهش می‌دهد (Zohar، 1989). 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 آبی‌پروری 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 خاویاری و به‌خصوص سن بلوغ بالای این 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 به عنوان یک نشانگر طبیعی برای مطالعات ژنتیک تکاملی گونه‌های مختلف ماهی به دلیل برخورداری از توالی‌های حفاظت شده، طول کافی و وجود حداقل تشابه ساختمانی به کار می‌رود (Pinheiro و همکاران، 2008). 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، 2011). 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 نمونه برداری و آزمایش‌های مولکولی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی

توالی‌یابی به شرکت بیونیر کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌های cDNA با استفاده از نرم‌افزار GAP 4 شباهت‌یابی و برای تعیین موقعیت Signal peptide cleavage site از برنامه Signal V 1/1 استفاده شد. توالی‌های متعددی از ژن هورمون رشد جانوران ثبت شده در بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با توالی به-دست آمده تاس‌ماهی استرلیاد با استفاده از نرم‌افزار Clustalw X مورد ارزیابی قرار گرفت و آنالیز فیلوژنی آن با استفاده از نرم-افزار MEGA 4 انجام شد.

نتایج

توالی کامل ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد و توالی آمینواسید آن از طریق تکنیک cDNA به‌دست آمد (شکل 1). نتایج بیانگر آن است که ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد 768 bp با 25 bp در ناحیه 5' و 98 bp در ناحیه 3' طول داشته و دارای توالی کد شونده 645 bp است. این ژن با کدون آغاز ATG در جایگاه 26 شروع و با کدون TAG در جایگاه 670 تمام می‌شود. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد یک پپتید بالغ 190 اسیدآمینوای را ترجمه می-کند. سیگنال پپتید ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد دارای 24 اسیدآمینو می‌باشد و موقعیت آن از ابتدای توالی تا نوکلئوتید 95 تعیین شد. جایگاه پلی‌آدنیلایسون، AATAAA، 42 bp بالاتر از دنباله poly a شناسایی شد. جایگاه glycosylation در موقعیت 187 در انتهای پپتید بالغ شناسایی شد. چهار اسیدآمینو سیستئین در موقعیت 47، 584، 635، 659 مشاهده شد.

```

TCTGTAATCGACCAAACTGAACGATGTCATCAGGCTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCT ۶۰
      M A S G L L L C P V L L
GGTTATATTGCTGGTTTCCCTAAAGAGTCTGGGGCCTACCTTATGATTCCACTATCCAG ۱۲۰
V I L L V S P K E S G A Y P M I P L S S
TCTTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGAGCTCAGTACCTACCTACCTAGCTAGCTGCGGACATTTA ۱۸۰
L F T N A V L R A Q Y L H Q L A A D I Y
CAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTTCCAGATGAGCAGCGTCACTCCAGCAAACTCCCTCC ۲۴۰
K D F E R T Y V P D E Q R H S S K N S P
GTCAGCATTTCTGCTACTCCGAGACCATACTGCGCCACCGGCAAGATGAGGGCTCAACA ۳۰۰
S A F C Y S E T I P A P T G K D E A Q Q
GCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAGTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCCTGGATTAGTCC ۳۶۰
R S D V E L Q F S L A L T I Q S W I S P
CCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTCACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGT ۴۲۰
L Q S L S R V F T N S L V F S T S D R V
GTTTGAGAACTGAAAGATCTGGAGGAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGAGA ۴۸۰
F E K L K D L E G I V A L M R D L G E
AGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTGCTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGTATGCAACCT ۵۴۰
G G G F G S S T L L K L T T Y D K F D V N L
AAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAAAATTATGGGCTTTTAAGCTGTTTTAAGAAAGATAT ۶۰۰
R N D D A L F K N Y G L L S C F K K D M
GCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAAGTGATGAAATGCAGACGTTTGTGGAGAGCAACTG ۶۶۰
H K V E T Y L K V M K C R R F V E S N C
TACTCTGTAGAAAAAAGAGCAGGCATGAGTTTAACTGTCTTACTCTTATATTATTATTA ۷۲۰
T L
ATAAAGGCATAGCAATGGGAAGTTGTAGTAGTCATGCTCTTTTCCTTTT

```

شکل 1: توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینو ژن هورمون رشد در تاس‌ماهی استرلیاد

شماره نوکلئوتید در کنار هر ردیف نشان داده شده است. اولین آمینواسید پپتید بالغ (Mature) با شماره 1+ و آخرین اسیدآمینو سیگنال پپتید با شماره 1- بر روی توالی مشخص شده است. کدون آغاز و کدون پایان با رنگ خاکستری علامت‌گذاری و محل پلی آدنیلایسون در کادر سیاه مشخص شده است. چهار اسیدآمینو سیستئین که تشکیل‌دهنده باند‌های دی سولفید ژن رشد می‌باشند با ستاره نشان‌دار شده‌اند و جایگاه گلیکوزیلایسون با خط تیره مشخص است.

جدول 1: مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینو ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد با سایر گونه‌های مهره‌دار



رده/راسته	گونه	شماره دسترسی بانک ژن	امینواسید (%)	نوکلئیک اسید (%)
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i>	Ay148493	63	67
	<i>Anguilla japonica</i>	M24066	62	67
	<i>Cyprinus carpio</i>	M27000	45	65
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	X60475	45	68
Cypriniformes	<i>Carassius aurata</i>	DQ350437	46	61
	<i>Catla catla</i>	AY053361	47	59
	<i>Carassius cuvieri</i>	AF389237	46	61
	<i>Pimephales promelas</i>	AY643399	44	68
	<i>Spaurus aurata</i>	U01301	38	61
Perciformes	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Af157633	37	59
Salmoniformes	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	M24683	42	65
	<i>Onchorinchus masou</i>	X59762	43	65
Amphibia	<i>Rana catesbiana</i>	S52027	58	67
	<i>Ovis aries</i>	S50877	64	71
Mammalia	<i>Rattus norvegicus</i>	V01237	65	71
	<i>Sus scorfa</i>	NM213869	67	71
	<i>Homo sapiens</i>	V00520	48	74
	<i>Clarias gariepinus</i>	AF416488	41	74
siluriformes	<i>Heteropneustes fossilis</i>	AF147792	40	67
	<i>Silurus meridionalis</i>	AF530481	44	69
	<i>Silurus asotus</i>	AY157496	41	68
	<i>Rhamdia quelen</i>	EF101341	40	72
Cobitinae	<i>Paramisgurus dabryanus</i>	DQ350432	44	59

مارماهی شکلان (63%) و دوزیستان (58%) 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* (37%) صورت گرفت مشاهده شد (جدول 1 و شکل 2).

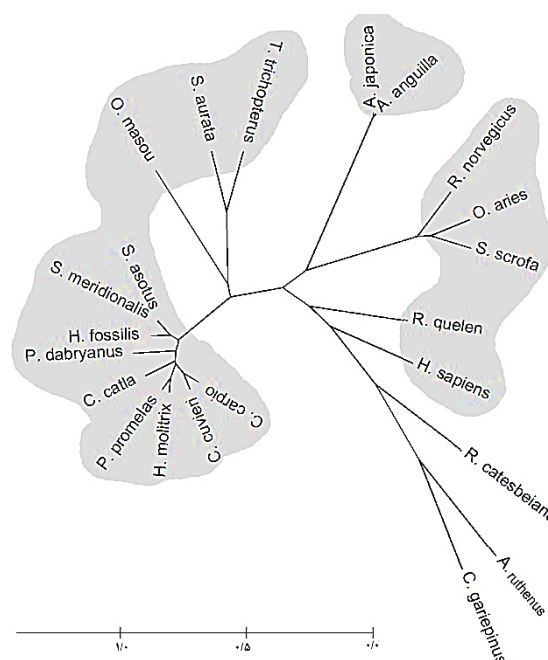
توالی اسیدآمینه ژن رشد به‌دست آمده تاس‌ماهی استرلیاد با توالی‌های اسیدآمینه مشابه تعداد زیادی از گونه‌های مهره‌دار مقایسه شد و نواحی که دارای اختلاف بودند به‌منظور ایجاد بیش‌ترین همولوژی میان گونه‌ها توسط خط تیره با یکدیگر هم‌ردیف شدند. ژن رشد تاس‌ماهی استرلیاد بالاترین میزان همولوژی با سایر مهره‌داران را ابتدا با پستانداران (64-67%) پس از آن با

P.promelas	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
S.meridionalis	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
H.molitrix	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
P.dabryanus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
C.aurata	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
C.cuvieri	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
C.carpio	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
C.calta	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
H.fossilis	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
C.gariepinus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
S.asotus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
R.uelen	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
O.mykiss	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
O.masou	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
S.a.rata	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
T.trichopterus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
S.scorfa	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
R.norvegicus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
O.aries	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
H.sapiens	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
R.catesbiana	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
A.ruthenus	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
A.anguilla	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
A.japonica	-----IVLLSVVLSLVVQGRASDNQ-----RLEFNNAVIRVQHLHQLAAKMI SDFEDNLLPEERQJ--SKIFPLSCNSUSTEAPIGDGTQKSSMLKLIRISFRLESNDPFSQTL
P.promelas	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
S.meridionalis	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
H.molitrix	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
P.dabryanus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
C.aurata	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
C.cuvieri	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
C.carpio	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
C.calta	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
H.fossilis	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
C.gariepinus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
S.asotus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
R.uelen	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
O.mykiss	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
O.masou	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
S.aurata	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
T.trichopterus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
S.scorfa	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
R.norvegicus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
O.aries	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
H.sapiens	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
R.catesbiana	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
A.ruthenus	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
A.anguilla	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM
A.japonica	SGTVNSLTVGNPNQ--ITEKLEDLKVGISVLKICGLDQPNMDDNDSIPL--PFEDFYVTMG--ENSLRESFRLIACFKKDMHKVETYLIRVANCRRSLDSNCIM

شکل 2: 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 شمارگذاری نشان داده شده است. توالی‌های اسیدآمینه ژن رشد هم‌دیف شده با تاس‌ماهی استرلیاد از بانک ژن NCBI و مقالات چاپ شده به‌دست آمده است.





شکل 3: دندروگرام برای ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد با ژن هورمون رشد سایر مهره‌داران

دندروگرام ترسیم شده به روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) مطابق با توالی‌های بلاست شده ایجاد شد.

بحث

در این تحقیق برای نخستین بار توالی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد و توالی پروتئین آن شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد 24 اسیدآمینه اول در ابتدای توالی ژن هورمون رشد تاس‌ماهی استرلیاد سیگنال پپتید می‌باشد و جایگاه پلی آدنیلایسیون 49 bp بالاتر از کدون پایان در انتهای 3' توالی شناسایی شد. نتایج این بررسی نشان داد جایگاه پلی آدنیلایسیون تاس‌ماهی استرلیاد مشابه با جایگاه پلی آدنیلایسیون 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 (2006) با مطالعه بر ژن هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلوی (Odontesthes bonariensis) بیان داشتند که سیگنال پپتید این ماهی از 17 اسید آمینه تشکیل شده است و کوتاه‌تر از سیگنال پپتید آزادماهیان (22aa) و انسان (26aa) می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه Marins و همکاران (2003) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلوی (Odontesthes argentinensis) نشان داد 17 اسیدآمینه اول این ژن سیگنال پپتید و دارای دوجایگاه پلی آدنیلایسیون در انتهای 3' 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 (2000) بر ژن هورمون رشد ماهی فلاندر (Verasper moseri) نشان داد که این ماهی دارای سیگنال پپتیدی با 17

اسیدآمینه در ابتدا توالی و یک جایگاه پلی آدنیلایسیون در انتهای 5' توالی خود می‌باشد. نتایج مطالعه Daniel و Ber (1992) بر ماهی (Tilapia nilotica) نشان داد این ماهی دارای یک جایگاه پلی آدنیلایسیون AATAAA در انتهای 3' خود می‌باشد که مشابه با جایگاه پلی آدنیلایسیون در گونه‌های آزادماهیان بوده و با جایگاه پلی آدنیلایسیون کپور ATATAA 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 1). نتایج حاصل از مطالعه Venugopal و همکاران (2002) در بررسی ژن هورمون رشد سه کپور ماهی هندی روو (Labeo rohita)، مریگال (Cirrhina mrigala) و کاتلا (Catla catla) نشان داد که این ماهیان دارای 4 اسیدآمینه سیستئین در توالی خود می‌باشند که در شکل‌گیری دو باند دی سولفید مولکول هورمون رشد نقش دارد. همچنین مطالعه Sekine و همکاران (1985) 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 (1992) بر سه ماهی کپور سرگنده (Hypophthalmichthys nobilis)، کپور علف‌خوار (Hypophthalmichthys molitrix) و کپور Ctenopharyngodon idella نشان داد که پروتئین ژن رشد این

ماهیان دارای پنج اسید آمینه سیستئین در توالی خود می‌باشند. نتایج حاصل از مقایسه موقعیت چهار اسید آمینه سیستئین در ژن رشد تاس ماهی استرلیاد با سایر گونه‌های مهره‌دار نشان می‌دهد که همگی در جایگاه‌های مشابهی بر روی توالی پروتئین قرار گرفته‌اند و به شدت حفظ شده‌اند. چهار اسید آمینه سیستئین دو باند دی سولفیدی را شکل می‌دهد که در ساختار مولکول پروتئین ژن رشد شرکت می‌کند و نقش بسیار مهمی در حفظ فعالیت‌های هورمون رشد ایفا می‌کند (Paladini و همکاران، 1981). نتایج نشان می‌دهد از آنجایی که موقعیت چهار اسید آمینه سیستئین بر روی توالی پروتئین ژن رشد تاس ماهی 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 تاس ماهی استرلیاد همانند پستانداران نقش بیولوژیکی مشابهی را ایفا می‌کنند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن رشد تاس ماهی استرلیاد دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت 187 می‌باشد (شکل 2). بررسی Marins و همکاران (2003) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره‌ای پهلوی (*Odontesthes argentinensis*) نشان داد که این ماهی تنها دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت 201^{Asn} می‌باشد. در مقابل نتایج مطالعه Pinheiro و همکاران (2008) بر ماهی آب شیرین پاکو (*Piaractus mesopotamicus*) نشان داد که ژن هورمون رشد این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون (¹⁷⁵Glyco و ¹²³Glyco) بر روی توالی پروتئین خود می‌باشد. همچنین Sekine و همکاران (1985) با بررسی ژن رشد ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) دریافتند که این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون (ASN131 و ASN185) 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 (1989) نشان داد آخرین سیستئین در انتهای توالی پروتئین ژن رشد و همیشه در ساختار جایگاه گلیکوزیلاسیون شرکت دارد که مطابق با نتایج به دست آمده برای تاس ماهی استرلیاد می‌باشد.

در این مطالعه ژن هورمون رشد تاس ماهی استرلیاد برای نخستین بار شناسایی و در باکتری *E. coli* کلون شد. نتایج بیانگر این است که ژن هورمون رشد تاس ماهی استرلیاد از کدون آغاز تا کدون پایان دارای توالی 645 bp می‌باشد و پروتئینی با 214 اسید آمینه را ترجمه می‌کند. همچنین نتایج نشان داد توالی پروتئین ژن رشد تاس ماهی استرلیاد ابتدا با پستانداران (67%)، پس از آن با مارماهیان (63%) و دوزیستان (58%) بیشترین همولوژی را دارد (جدول 1). اطلاعات در زمینه مکانیسم‌های مولکولی رشد و تولید مثل تاس ماهیان اندک است اما مشخص است که هورمون‌ها فاکتور مهمی در کنترل این فرایندها می‌باشند (Cao و Zhou، 2011). در زمینه ژن هورمون رشد تاس ماهیان اطلاعات بسیار کمی وجود دارد و تاکنون مطالعه‌ای بر روی ژن رشد تاس ماهی استرلیاد صورت نگرفته است. از این میان نتایج مطالعه Cao و همکاران (2011) بر تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد ژن رشد این ماهی دارای توالی 954 bp می‌باشد که 16 bp در ناحیه 5' و 296 bp در ناحیه 3' خود دارد و پروتئینی با 214 اسید آمینه را ترجمه می‌کند که مشابه با پروتئین به دست آمده برای تاس ماهی استرلیاد است. در

تحقیق مشابهی مطالعه Liu و همکاران (2009) بر ژن هورمون رشد تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد که این ژن دارای توالی 645 bp بوده و پروتئین آن از 214 اسید آمینه تشکیل شده است همچنین با مقایسه پروتئین ژن رشد با پروتئین ژن رشد سایر گونه‌های مهره‌دار بیان نمودند ژن هورمون رشد تاس ماهی چینی بیشترین همولوژی را با پستانداران و کمترین شباهت از نظر توالی را با ماهیان استخوانی حقیقی دارد که مشابه نتایج به دست آمده برای تاس ماهی استرلیاد است. در بررسی دیگری که توسط Yom Din و همکاران (2008) بر ژن هورمون رشد تاس ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* صورت گرفت نشان داد که توالی نوکلئوتیدی این ژن در تاس ماهی روسی 980 bp طول داشته و با کدون آغاز در جایگاه 39 شروع شده و در جایگاه 683 متوقف می‌شود. سپس برای بررسی عملکرد این ژن، میزان بیان آن‌ها را در تاس ماهیان روسی جوان نر و ماده ارزیابی و اثبات نمودند تفاوت معنی‌داری بین تاس ماهیان نر و ماده برای بیان ژن رشد تا سن پنج سالگی وجود ندارد. همچنین مقایسه توالی آمینو اسیدی این گونه با دیگر گونه‌های مهره‌دار را انجام داده و بیان داشتند که ژن رشد تاس ماهی روسی بیشترین همخوانی را با پستانداران (66-70%) داشته، سپس مارماهی شکلات و دوزیستان (61%) و کمترین همخوانی (39-47%) را با سایر ماهیان استخوانی دارد که با نتایج به دست آمده از ژن رشد تاس ماهی استرلیاد در این مطالعه مطابقت دارد. تاس ماهیان به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود مدل بسیار خوبی برای مطالعات تکاملی می‌باشند (Cao و Zhou، 2011). به همین دلیل مطالعه ژن‌های حفظ شده نظیر ژن رشد در ماهیان خاویاری می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکامل این ماهی ارائه دهد. آنالیز فیلوژنی بیانگر این است که تاس ماهی 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 تاس ماهی استرلیاد با دیگر گونه‌های پستاندار نشان می‌دهد که این ژن از یک ژن رشد اجدادی مشترک منشأ می‌گیرد.

منابع

1. Ber, R. and Daniel, V., 1992. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. Gene. Vol. 113, pp: 245-250.
2. Cao, H. and Zhou, L., 2011. Molecular biological study on hormones in *Acipenseriformes*. Hereditas (Beijing). Vol 33, pp: 707-712.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Funkenstein, B.; Chen, T.T.; Powers, D.A. and Cavari, B., 1991. Cloning and sequencing of the gilthead seabream



- bonariensis*) growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 142, pp: 284-292.
23. **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.
24. **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.
25. **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.
26. **Zohar, Y., 1989.** Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth, and smoltification. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 7, pp: 395-405.
- (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. Gene. Vol. 103, pp: 243-247.
7. **Gomez, J.M.; Loir, M. and Le Gac, F., 1998.** Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction. Vol. 58, pp: 483-491.
8. **Kocour, M. and Kohlmann, K., 2011.** Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture. Vol. 310, pp: 298-304.
9. **Liu, H.; ZHANG, F.R.; YANG, D. and YU, L.N., 2009.** Structure and Evolutionary Analysis of *Acipenser sinensis* Growth Hormone cDNA Sequences. Journal of Hydroecology. Vol. 2, p: 5.
10. **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.
11. **McCormick, S.D., 2001.** Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. Am. Zool. Vol. 41, pp: 781-794.
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **Paladini, A.C.; Pena, C. and Poskus, E., 1981.** Molecular biology of growth hormone. CRC Crit. Rev. Biochem. Vol. 15, pp: 25-56.
16. **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.
17. **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. 1, pp: 381-384.
18. **Pourkazemi, M., 2006.** Caspian Sea Sturgeon Conservation and Fisheries: Past present and Future. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, No. 1, pp: 12-16.
19. **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.
20. **Ruban, G.I.; Kholodova, 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.
21. **Sekine, S.; Mizukami, T.; Nishi, T.; Kuwana, T.; Saito, A.; Sato, M.; Itoh, S. and Kawauchi, H., 1985.** Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in Escherichia coli. Applied Biology. Vol. 82, pp: 4306-4310.
22. **Sciara, A.A.; Rubiolo, J.A.; Somoza, G.M. and Arranz, S.E., 2006.** Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes*

