مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره سوم (پیاپی ۲۰) پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۱۹۶-۱۹۰

Original Article

ایجاد سازواره های ژنی جدید به منظور بیان ژن هورمون رشد شترمرغ در سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی

حسین فتح پور[۱]، عباس دوستی*[۲]، مریم قاسمی[۳]، حمیدرضا کبیری[۴]

[۱]دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، [۲] استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد،
[۳]کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، [۴] کارشناس، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: رشد مناسب شترمرغ به هورمون رشد آن و تغذیه بستگی دارد. هورمون رشد شترمرغ یک پلی پپتید است که موجب تحریک رشد و تکثیر سلول ها می شود. هدف از این مطالعه همسانه سازی و تولید دو سازواره ژنی به منظور بیان هورمون رشد شترمرغ در سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش، RNA از غده هیپوفیز شترمرغ تخلیص شد و cDNA آن به روش رونوشت برداری معکوس تهیه گردید. cDNA حاصل، به روش همسانه سازی T/A در پلاسمید TOPO کلون شد. سپس ساب کلونینگ cDNA هورمون رشد شترمرغ در وکتورهای pcDNA3.1 و pET32 انجام شد.

یافته ها: همسانه سازی cDNA هورمون رشد شترمرغ در پلاسمید TOPO با موفقیت انجام شد و روش های PCR و هضم اندونوکلئازی، صحت کلون سازی را تایید نمود. پس از ساب کلونینگ این cDNA، پلاسمید های نوترکیب، pcDNA3.1-*gh* و pET32-*gh* حاصل گردید و سازواره های حاصل توسط هضم آنزیمی تایید گردیدند.

نتیجه گیری: با استناد به نتایج به دست آمده در این مطالعه به نظر می رسد که سازه های ژنی تازه ساخته شده در این پژوهش می تواند به عنوان یک راهکار مناسب برای تولید صنعتی هورمون رشد شترمرغ مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: شترمرغ، هورمون رشد، همسانه سازی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹۳

مقدمه

رشد اولیه شترمرغ به وسیله تغذیه و هورمون رشد آن کنترل می شود. هورمون رشد در شترمرغ موجب افزایش سوخت و ساز چربی، متابولیسم کربوهیدرات، جذب پروتئین و تحریک رشد می گردد. این هورمون یک پلی پپتید ۱۹۱ اسید آمینه ای، تک رشته ای با وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلو دالتون می باشد (۱ و ۲). همچنین دارای ٤ رشته مارپیچ است که برای واکنش با گیرنده هورمون رشد ضروری می باشند (۳). ژن های کد کننده هورمون رشد *gh1* و *gh2* هستند که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۷ و در ناحیه های ۲٤-۲۲ قرار دارند. این ژن ها طولی برابر ۳-۲ کیلوباز داشته و دارای ۵ اگزون و چهار اینترون می باشند (٤). هورمون رشد توسط سلول های سوماتوتروپیک بخش قدامی غده هیپوفیز تولید، ذخیره و ترشح می شوند. ترشح این هورمون در غده هیپوفیز توسط پپتیدهای هورمونی آزاد کننده هورمون رشد (growth hormone-releasing hormone: GHRH) و بازدارنده هورمون رشد (growth hormone-inhibiting hormone: GHIH) تولید شده به وسیله هسته های ترشحی هیپوتالاموس تنظیم می شود. به طوری که فعالیت های

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

فیزیولوژیکی مانند فعالیت بدنی، تغذیه و خواب، ترشح این هورمون را تحریک و موادی مانند اسیدهای چرب آزاد از ترشح آن جلوگیری می نمایند (۵). هورمون رشد به طور مستقیم سرعت انتقال بسیاری از اسیدهای آمینه به داخل سلول‌ها را از طریق غشا افزایش می‌دهد. این امر موجب افزایش غلظت اسیدهای آمینه در داخل سلول و احتمالاً افزایش ساخت پروتئین می شود.

این کنترل انتقال اسیدهای آمینه مشابه اثر انسولین در کنترل انتقال گلوکز از غشای سلول‌ها می باشد. حتی زمانی که غلظت اسیدهای آمینه داخل سلول هم زیاد نمی‌شود، هورمون رشد ترجمه RNA را افزایش می‌دهد و بدین وسیله ریبوزوم‌های داخل سیتوپلاسم را وادار به افزایش ساخت پروتئین می‌نماید (٦ و٧). تجویز هورمون رشد در مدت ۳۰ الی ٦۰ دقیقه باعث افزایش اسیدهای چرب آزاد در خون (از منشاء بافت چربی) و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در کبد می‌گردد. به نظر می رسد که اثر هورمون رشد در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی ها بدون دخالت IGF-I انجام می‌گیرد. تجویز هورمون رشد انسانی، که با تکنیک نوترکیبی تهیه شده است، باعث افزایش توده بدون چربی بدن و کاهش در چربی بدن همراه با افزایش در میزان متابولیک و افت کلسترول پلاسما می‌شود (۹-۷).

تا قبل از کشف سنتز مصنوعی هورمون رشد به روش DNA نوترکیب، این هورمون برای کاربردهای درمانی از غده هیپوفیز اجساد استخراج می شد. از سال ۲۰۰۵ هورمون رشد نوترکیب در ایالات متحده آمریکا در دسترس قرار گرفت و برای کاربردهای صنعتی و درمانی مورد استفاده قرار می گیرند. هورمون رشد دارای کاربردهای درمانی و صنعتی می باشد. در صنعت از این هورمون برای افزایش قابلیت حیوانات اهلی استفاده می شود و موجب افزایش شیر و محصولات شیری در گاوهای شیرده می گردد (۱۰).

هدف از این مطالعه ایجاد دو سازواره ژنی جدید برای بررسی بیان ژن هورمون رشد شترمرغ در باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) می باشد.

مواد و روش ها

الف) استخراج RNA از بافت هیپوفیز: در این مطالعه پس از شکستن جمجمه شتر مرغ تازه کشتار شده، غده هیپوفیز از آن خارج گردید و بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. به منظور استخراج RNA از محلول RNX-Plus محصول شرکت سیناژن ایران استفاده شد. با استفاده از کیت مخصوص تهیه cDNA، ساخت شرکت فرمنتاز آلمان از روی RNA ی فراهم شده، مطابق دستورالعمل کیت، cDNA هورمون رشد شتر مرغ ساخته شد.

ب) طراحی پرایمر: به منظور تکثیر ژن هورمون رشد، طراحی پرایمر صورت گرفت. بدین صورت که ابتدا توالی هورمون رشد شترمرغ از بانک جهانی ژن (GenBank) گرفته شد. شماره ثبت ژن مورد استفاده AB028191 می باشد. بر اساس آن توالی پرایمر مشخص گردید. به منظور سهولت همسانه سازی در انتهای '۵ پرایمرهای Forward و Reverse به ترتیب سایت برش آنزیم های *BamHI* و *HindIII* قرار داده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی به صورت زیر می باشد. در زیر سایت برش آنزیم های مربوطه خط کشیده شده است:

Ost-GH-F: 5'-TCCTCGAGACAGAAATGGCTCC-3'
Ost-GH-R: 5'-CCATCCATGGAGATGGTGCAGTTGCTT-'3

ج) تکثیر cDNA هورمون رشد شترمرغ: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq و چند قطره روغن معدنی برای جلوگیری از تبخیر مواد و آلودگی (همه مواد ساخت شرکت سیناژن ایران) انجام شد.

در ادامه واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۰

ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول نهایی PCR در ژل آگارز یک درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

د) همسانه سازی T/A : قطعه تکثیر یافته مربوط به cDNA هورمون رشد شترمرغ، با کمک تیغ اسکالپل از روی ژل بریده شد. استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل ساخت شرکت بیونیر کره جنوبی (Bioneer, Korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. محصول PCR تخلیص شده از ژل، به روش همسانه سازی T/A در پلاسمید تجاری TOPO ساخت شرکت اینویتروژن آمریکا (pCR8/GW/TOPO, Invitrogen) درج گردید.

ترانسفورماسیون شیمیایی محصولات اتصال (Ligation) با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد استریل، در باکتری *اشریشیا کلی* سویه Top10F انجام شد. با توجه به اینکه نشانگر انتخابی پلاسمید TOPO، ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی (اسپکتینومایسین) می باشد، باکتری های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اولیه حضور cDNA هورمون رشد شتر مرغ در باکتری های دستکاری شده، از کلنی های رشد یافته به روش جوشاندن، تخلیص DNA صورت پذیرفت و با پرایمرهای هورمون رشد شتر مرغ، واکنش PCR انجام شد. برای تایید صحت همسانه سازی T/A ژن هورمون رشد در پلاسمید تجاری TOPO، هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم های *BamHI* و *HindIII* انجام شد. کلنی های حاوی cDNA هورمون رشد برای آزمون های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ه) همسانه سازی cDNA هورمون رشد در وکتورهای بیانی: به منظور ساب کلونینگ cDNA هورمون رشد در وکتور های بیانی پروکاریوتی (pET32) و یوکاریوتی (pcDNA3.1) که به ترتیب ساخت شرکت های نوازن (Novagen, USA) و اینویتروژن (Invitrogen, USA) می باشند، ابتدا هر یک از این وکتورها با دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* برش داده شد تا به صورت خطی در آیند. همچنین وکتور TOPO حاوی cDNA هورمون رشد شتر مرغ نیز با آنزیم های *BamHI* و *HindIII* برش داده شد تا cDNA هورمون رشد از وکتور TOPO جدا گردد. محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید و قطعات مورد نظر شامل وکتور پروکاریوتی pET32، وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1 و قطعه cDNA هورمون رشد شتر مرغ با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Bioneer, Korea) جداسازی گردید.

در ادامه در دو واکنش جداگانه، اتصال cDNA هورمون رشد به هر یک از وکتورهای پروکاریوتی و یوکاریوتی انجام گرفت. واکنش گرهای مورد استفاده در واکنش اتصال شامل ۲ میکروگرم وکتور، ٦ میکروگرم cDNA هورمون رشد، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۲ واحد آنزیم T4 DNA Ligase در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، مخلوط گردیدند. واکنش گرها در دمای ١٤ درجه سیلیسیوس به مدت ٤ ساعت نگهداری شدند و ترانسفورماسیون شیمیایی محصولات اتصال، با استفاده از کلرید کلسیم یک دهم مولار سرد استریل، در باکتری *اشریشیا کلی* سویه Top10F انجام شد.

با توجه به اینکه نشانگر انتخابی وکتورهای pET32 و pcDNA3.1 ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی (آمپی سیلین) می باشد، باکتری های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرما گذاری شدند.

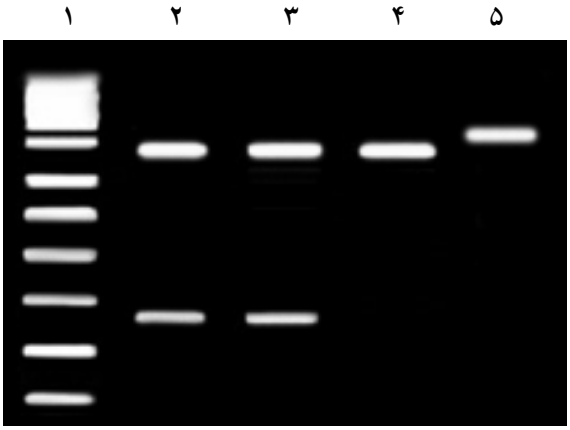
و) تایید ساب کلونینگ: تعدادی از کلنی های رشد یافته بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک، به صورت تصادفی (حدود ۱۰ کلنی) انتخاب و در محیط LB-Broth حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سیلیسیوس گرما گذاری گردیدند. با کمک سانتریفیوژ از باکتری های رشد یافته، رسوب گیری انجام شده و با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Bioneer, Korea)، پلاسمیدهای نوترکیب pET32 و pcDNA3.1 استخراج شدند. صحت

همسانه سازی نهایی با روش های PCR و هضم آنزیمی بررسی گردید.

یافته ها

cDNA هورمون رشد شتر مرغ با موفقیت تهیه و تکثیر گردید. به منظور ایجاد همسانه ژن هورمون رشد، از روش همسانه سازی T/A محصول PCR در وکتور TOPO استفاده شد، که موجب تولید سازه TOPO-*gh* گردید. به منظور تایید صحت همسانه سازی ژن *gh* از آزمون های تاییدی PCR و هضم آنزیمی استفاده شد که واکنش PCR نمایان کرد که درصد زیادی از کلون های به دست آمده، دارای سازه TOPO-*gh* می باشند. هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم های *BamHI* و *HindIII* بر روی پلاسمیدهای تخلیص شده، نیز وجود قطعه ٦٧٢ جفت بازی مربوط به cDNA هورمون رشد شتر مرغ در وکتور TOPO را مشخص نمود (شکل ۱).

مراحل ساب کلونینگ cDNA هورمون رشد شتر مرغ در وکتور های بیانی پروکاریوتی (pET32) و یوکاریوتی (pcDNA3.1) با موفقیت انجام شد. انجام PCR بر روی



شکل ۱: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب TOPO-*gh* با آنزیم های *BamHI* و *HindIII*. ستون ۱) مارکر یک کیلو بازی فرمنتاز، ستون های ۲ و ۳) کلون های صحیح TOPO-*gh* بریده شده با آنزیم های *BamHI* و *HindIII* که وکتور *TOPO* با اندازه ۲۸۱۷ جفت باز و *cDNA* هورمون رشد شترمرغ با اندازه ٦٧٢ جفت باز مشخص است. ستون ٤) وکتور *TOPO* فاقد قطعه کلون شده. ستون ٥) کلون صحیح TOPO-*gh* بریده نشد.

وکتورهای نوترکیب pET32-*gh* و pcDNA3.1-*gh* نشان دهنده حضور cDNA هورمون رشد شتر مرغ در این وکتورها و صحت کلونینگ می باشد. تایید نهایی با روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های *BamHI* و *HindIII* که به ترتیب در پایانه های '٥ و '٣ cDNA هورمون رشد، تعبیه شده اند، انجام شد.

هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET32-*gh*، قطعاتی با اندازه های برابر ٥٩٠٠ جفت باز (وکتور pET32) و ٦٧٢ جفت باز (cDNA) روی ژل آگاروز نشان داد.

همچنین قطعات ٥٤٢٧ جفت باز (وکتور pcDNA3.1) و ٦٧٢ جفت باز (cDNA) حاصل هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pcDNA3.1-*gh* بود.

بحث

در این مطالعه ابتدا RNA کامل از هیپوفیز شتر مرغ تخلیص گردید و cDNA هورمون رشد تهیه شد. cDNA هورمون رشد شتر مرغ به روش همسانه سازی محصولات PCR (تکنیک همسانه سازی T/A) در وکتور TOPO کلون گردید و پلاسمید نوترکیب TOPO-*gh* حاصل شد. به منظور دستیابی به اهداف این تحقیق، cDNA هورمون رشد شتر مرغ از پلاسمید نوترکیب TOPO-*gh* خارج و در دو وکتور بیانی یوکاریوتی (pcDNA3.1) و پروکاریوتی (pET32) ساب کلون شد و وکتورهای نوترکیب pcDNA3.1-*gh* و pET32-*gh* تولید شدند.

با توجه به پیشرفت تکنیک های مولکولی، امروزه تولید بسیاری از پلی پپتیدها و پروتئین ها با روش های مهندسی ژنتیک انجام می شود. در کشور ما بسیاری از فرآورده های بیولوژیک نوترکیب از خارج کشور وارد می شوند و در زمینه تولید فرآورده های نوترکیب تحقیقات زیادی در کشور انجام نشده است. انجام تحقیقات در زمینه تولید پروتئین ها و داروها با روش های مهندسی ژنتیک سر آغازی برای تولید صنعتی و بی نیاز نمودن کشور از واردات این گونه محصولات و نیل به خود کفایی می باشد.

شتر مرغ به دلیل قدرت متابولیسمی بالا و تبدیل غذا به انرژی، رشد سریع، عمر مفید و طولانی و تولید مثل بالا به عنوان یکی

از پرندگان مهم در صنعت دام در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود و می توان پوست و گوشت آن ها را صادر کرد (۱۱). این پرنده به دلیل دارا بودن توانایی تولید گوشت کم چرب، روغن باکیفیت حاوی میزان بالای اسیدهای چرب غیر اشباع و با کیفیت، چرم مرغوب و نیز پرهای زیبای زینتی مورد توجه پرورش دهندگان شترمرغ قرار گرفته است (۱۲). با توجه به اهمیت تولید فراوردهای دامی، در دهه های اخیر راهکارها و تکنیک های متعددی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته است که میزان تولید فراورده های قابل عرضه به بازار فروش را در این دام ها افزایش دهد. یکی از این راهکارها تولید هورمون رشد نوترکیب و استفاده از آن به منظور تولید محصولات دامی در مزارع تولید دام در کشورهای پیشرفته می باشد.

کومانو (Komano) و همکاران در تحقیقی که در سال ۱۹۹۹ بر روی ژن هورمون رشد شترمرغ انجام دادند توانستند این ژن را کلون و تعیین توالی نمایند. بررسی های بیشتر نشان داد که بین هورمون رشد شترمرغ و حیواناتی مانند مرغ، بوقلمون و اردک شباهتی در حدود ۹۰٪ وجود دارد. همچنین مشخص شد که این ژن در بین انسان، موش، بز و گاو دارای تشابهی در حدود ۷۱٪ می باشد (۱۳).

در کشور ایران در سال ۲۰۱۲، دوستی (Doosti) و همکاران برای اولین بار موفق به همسانه سازی و توالی یابی ژن هورمون رشد شترمرغ در باکتری *اشریشیا کلی* شدند (٦). در این مطالعه با استفاده از روش RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) از روی RNA تخلیص شده از غده هیپوفیز شترمرغ و سپس با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی، cDNA کد کننده هورمون رشد تهیه شد و نیز با استفاده از روش همسانه سازی T/A، قطعه cDNA هورمون رشد همسانه سازی شد و در نهایت ساختار ژنی به دست آمده به باکتری *اشریشیا کلی* منتقل گردید.

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، cDNA هورمون رشد شتر مرغ با کاربرد تکنیک های مهندسی ژنتیک، تهیه شد. این cDNA در پلاسمید TOPO همسانه سازی و ذخیره گردید. با تولید سازواره TOPO-*gh*، امکان ساب کلونینگ هورمون رشد شتر مرغ در سایر سیستم های پروکاریوتی (انواع باکتری ها) و یوکاریوتی (مخمرها، گیاهان و جانوران) فراهم آمد. در ادامه همسانه سازی ژن هورمون رشد شتر مرغ در دو وکتور بیان شونده در سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی با موفقیت انجام شد. سازواره های pET32-*gh* و pcDNA3.1-*gh* که در این تحقیق، تولید شده اند برای تحقیقات آینده مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Crole MR, Soley JT. What prevents Struthio camelus and Dromaius novaehollandiae (Palaeognathae) from choking? A novel anatomical mechanism in ratites, the linguo-laryngeal apparatus. Front Zool. 2012; 9(1): 11.
2. Yi S, Bernat B, Pál G, Kossiakoff A, Li WH. Functional promiscuity of squirrel monkey growth hormone receptor toward both primate and non primate growth hormones. Mol Biol Evol. 2002; 19(7): 1083-1092.

3. Dayani Nia M, Karimipour M, Babapoor V, Shahgholian L, Doosti A. Cloning & sequencing sheep growth hormone gene of lori bakhtiari strain. J Vet Med Tabriz Branch Islamic Azad Uni. 2010; 1(13): 747-751. [In Persian]

4. Valinsky A, Shani M, Gootwine E. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. Anim Biotechnol. 1990; 1: 135-144.

5. Bartholomew EF, Martini F, Nath JL. Fundamentals of anatomy & physiology. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education Inc. 2009; pp: 616-617.

6. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Khodabahsh H. cDNA cloning and sequencing of ostrich growth hormone. Arch Biol Sci Belgrade. 2012; 64 (2): 445-449.

7. Darendeliler F. Safety of growth hormone treatment. J Clin Res Ped Endo. 2009; 11: 36-43.

8. Hull KL, Harvey S. Growth hormone therapy and quality of life: possibilities, pitfalls and mechanisms. J Endocrinol. 2003; 179(3): 311-333.

9. Yuen KC, Chong LE, Riddle MC. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. Diabet Med. 2013; 30(6): 651-663.

10. Miller JM, Hallager S, Monfort SL, Newby J, Bishop K, Tidmus SA, Black P, Houston B, Matthee CA, Fleischer RC. Phylogeographic analysis of nuclear and mtDNA supports subspecies designations in the ostrich (Struthio camelus). Conserve Genet. 2011; 12: 423-431.

11. Aganga AA, Aganga AO, Omphile UJ. Ostrich feeding and nutrition. Pakistan J Nutr. 2003; 2(2): 60-67.

12. Dalle Zotte A, Brand TS, Hoffman LC, Schoon K, Cullere M, Swart R. Effect of cottonseed oilcake inclusion on ostrich growth performance and meat chemical composition. Meat Sci. 2013; 93(2): 194-200.

13. Komano T, Takebe S, Taguchi Y, Sakai H. Cloning and Sequencing of cDNA that encodes ostrich growth hormone. Mem School Bost Kinki Uni. 1999; 5: 74-81.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 3, October 2014

Original Article

Generation of new gene constructs for expression of ostrich growth hormone gene in prokaryotic and eukaryotic systems

Hossein Fathpour[1], Abbas Doosti[2], Maryam Ghasemi[3], Hamidreza Kabiri[4]

[1]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[2]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[3]MS.c., Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[4]BS.c., Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Growth of ostrich depends to employment of growth hormone and proper nutrition. The ostrich growth hormone is a polypeptide that stimulates growth and cell reproduction. The aim of this study was to clone and generation of two new gene constructs for expression of ostrich growth hormone gene in prokaryotic and eukaryotic systems.

Materials & Methods: In this study, RNA was extracted from ostrich pituitary gland and cDNAs synthesized using RT-PCR method. These cDNAs were cloned into TOPO vector based on T/A method. Then, cDNA sub-clones of ostrich growth hormone were prepared on pcDNA3.1 and pET32 vectors.

Results: Cloning of ostrich growth hormone cDNA in TOPO vector was confirmed by PCR and endonuclease restriction digest. After sub-cloning of this cDNA, pcDNA3.1-*gh* and pET32-*gh* recombinant vectors were generated and the presence of genes were confirmed using restriction digestion.

Conclusion: According to the results, the new recombinant vectors generated in this study can serve as an effective approach for production of the ostrich growth hormone in commercial levels.

Keywords: Ostrich, Growth hormone (GH), Cloning.

Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +989133838830

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(3): 190-196.