

TÁCH DÒNG GEN MÃ HÓA HORMONE SINH TRƯỞNG CÁ CHÉP (*CYPRINUS CARPIO*)

Thẩm Thị Thu Nga, Đặng Thị Thanh Hà, Nguyễn Thu Thúy

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Hormone sinh trưởng có vai trò quan trọng đối với động vật có xương sống. Hormone sinh trưởng tái tổ hợp có nguồn gốc từ người và động vật đã được sản xuất dùng trong nghiên cứu, y dược, nông nghiệp và thủy sản. Để phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen động vật, chủ yếu là tạo cá chuyển gen đồng loài có khả năng sinh trưởng nhanh và tạo protein tái tổ hợp bổ sung vào thức ăn trong nuôi trồng thủy sản, chúng tôi tạo dòng gen mã hóa hormone sinh trưởng cá chép (*Cyprinus carpio*). Việc tạo dòng được tiến hành dựa trên khuôn mRNA của gen hormone sinh trưởng cá. RNA tách từ não thủy thể cá chép sử dụng Trizol được dùng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp phiên mã ngược RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen ký hiệu M27000 trong GenBank. Sản phẩm của RT-PCR là một đoạn DNA có kích thước 648 bp được tạo dòng bằng vector pCR2.1 TOPO. Xác định trình tự của sản phẩm thu được và so sánh với trình tự mRNA trong GenBank cho thấy có sự tương đồng tới 99,38%. Gen cấu trúc mã hóa hormone sinh trưởng cá chép sẽ được nghiên cứu biểu hiện trong tế bào vi khuẩn và sau đó gắn với promoter β -actin cũng của cá chép để thiết kế tổ hợp gen chuyển tạo cá chuyển gen đồng loài.

Từ khóa: Cá chép (*Cyprinus carpio*), hormone sinh trưởng, mRNA, RT-PCR, tạo dòng

MỞ ĐẦU

Hormone sinh trưởng (Growth Hormone, GH) hay còn gọi là somatotropin là một polypeptide rất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của động vật có xương sống, nhất là trong giai đoạn đầu của sự phát triển. Từ khi GH được sử dụng trong y dược, chế biến thức ăn chăn nuôi, thủy sản, gen mã hóa GH đã được nghiên cứu trên nhiều loài động vật có vú và người. Những nghiên cứu về gen GH cá được bắt đầu từ những năm 1990 trên các đối tượng cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) (Bernardini *et al.*, 1999), cá hồi Đại Tây Dương (*Oncorhynchus kisutch*), cá hồi trắng chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Du *et al.*, 1992), cá rô phi (*Oreochromis hornorum*) (de la Fuente *et al.*, 1995), cá da trơn Ấn Độ (*Heteropneustes fossilis*) (Anathy *et al.*, 2001), cá chạch (*Misgurnus mizolepis*) (Nam *et al.*, 2001), cá tráp đầu to (*Megalobrama amblycephala*) (Li, 2003). Gen GH một số loài cá thuộc họ Cá Chép và cá da trơn gồm bốn intron và năm exon giống như GH chim và thú. Những gen này đã được tách dòng, đọc trình tự và biểu hiện trong hệ thống tế bào vi khuẩn, nấm men và trong phôi cá (Bai *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1996). GH tái tổ hợp của người và một số loài động vật bậc cao cũng đã được nghiên cứu và sản xuất với nhiều mục đích khác nhau. GH ở các loài cá

xương có 188 amino acid, cấu trúc phân tử có 2 cầu nối disulfide. Trong hệ thống nội tiết của cá, về hình thái cũng như về chức năng, não thủy thể phát triển hoàn chỉnh hơn so với các tuyến khác như tuyến giáp trạng, tuyến thượng thận. Mặc dù còn tương đối nguyên thủy, nhưng các chức năng sinh lý của chúng về cơ bản cũng giống như động vật bậc cao. Não thủy thể của cá tiết ra một loại kích tố sinh trưởng. Nếu cắt bỏ não thủy thể của cá con, không những tuyến sinh dục ngừng phát dục mà sự sinh trưởng của cá cũng bị ngừng trệ. Nếu tiêm dịch não thủy thể vào cơ thể cá thì có thể khôi phục lại sự sinh trưởng và phát dục của cá. Hormone sinh trưởng trước đây thường được sử dụng trong thủy sản làm tăng năng suất nuôi trồng. Cá được xử lý hormone sinh trưởng từ nhiều nguồn khác nhau bằng cách tiêm trực tiếp GH hoặc cho vào nước để thấm qua mang, đạt tốc độ sinh trưởng tăng nhanh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Não thủy thể được lấy từ cá chép dòng địa phương. Mẫu cá chép (*Cyprinus carpio*) được thu thập tại các vùng xung quanh Hà Nội. Để tách gen mã hóa hormone sinh trưởng tốt nhất, những cá thể

đang trong thời kỳ tăng trưởng và phát triển, có trọng lượng trung bình từ 300 g đến 600 g được chọn lọc. Mẫu sau khi thu thập được phân loại, chọn lọc dòng cá chép địa phương theo tiêu chuẩn của Nguyễn Văn Hào và Ngô Sỹ Vân (2001). Kích thích tố sinh trưởng được sản xuất từ não thùy thể tuyến thể giữa của cá. Đây là mô giàu mRNA làm nguồn nguyên liệu cho tạo dòng gen mã hóa GH. Cá được gây mê bằng Eugenol (0,1‰) trong nước trước khi được giải phẫu hộp sọ.

Cập môi (biomers.net, Đức) có trình tự:

F: 5'- CCCTGAGCGAAATGGCTAGA -3';

R: 5'- CCATCTACAGGGTGCAGTTGG -3'.

Trizol, bộ kit RT-PCR, vector tách dòng pCR2.1 TOPO của Invitrogen.

Phương pháp

RNA được tách theo phương pháp của Chomczynski và Sacchi (1987). Não thùy thể tươi lấy ngay sau khi mổ cá được sử dụng để tách RNA sử dụng Trizol (Invitrogen). Não thùy được nghiền nhỏ trong nitor lỏng cho mịn, hòa trong 0,5 ml Trizol (chia 2 lần) rồi chuyển vào ống eppendorf. Để dịch đồng thể này ở nhiệt độ phòng 5 phút để phân ly hoàn toàn các nucleoprotein. Để loại bỏ tạp chất cần thêm một bước ly tâm làm sạch mẫu. Dịch trên được bổ sung chloroform, lắc đều và ly tâm tách pha. RNA được giữ lại trong pha nước và thu lại bằng cách tủa với isopropanol. Cặn RNA được hòa tan trong nước cất vô trùng có xử lý bằng 0,1% DEPC (Diethyl pyrocarbonate) có tác dụng làm bất hoạt RNase. Mẫu được bảo quản ở -20°C.

Độ tinh sạch của RNA được kiểm tra bằng đo quang phổ và điện di theo phương pháp của Seidman và đồng tác giả (1997). RNA được trộn trong đệm tra mẫu được cung cấp cùng với thang RNA chuẩn chứa 95% formamide, 0,025% ethidium brommide và được biến tính ở 70°C trong 10 phút. Sau đó điện di trên gel 1% agarose trong đệm 10% MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid), 18% formaldehyde, với hiệu điện thế 5 V/cm gel. Kích thước RNA được so sánh với thang RNA High Range (MBI Fermentas).

Phản ứng RT-PCR sử dụng bộ kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Phản ứng RT-PCR được tối ưu với chu trình nhiệt của phản ứng: tổng hợp cDNA ở 50°C trong 30 phút, tiếp theo là phản ứng PCR ở 94°C trong 2 phút; 39 chu trình

gồm: 94°C, 20 giây, 55°C, 30 giây, 72°C, 1 phút và hoàn thành tổng hợp 72°C trong 10 phút. Sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel 1% (w/v) agarose và so sánh với thang DNA chuẩn 100 bp (MBI Fermentas).

Tách dòng gen bằng vector pCR2.1 TOPO và biến nạp vào tế bào DH5 α bằng sốc nhiệt. Sản phẩm RT-PCR được gắn với vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) và biến nạp vào tế bào khả biến DH5 α bằng sốc nhiệt. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường LB agar chọn lọc chứa X-Gal, IPTG và ampicillin 100 mg/ml. Các khuẩn lạc màu trắng được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng để tách chiết và tinh sạch plasmid.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu thập mẫu cá chép

Trong số 30 mẫu cá chép thu thập được chọn lọc, 9 mẫu đạt tiêu chuẩn về phân loại và được sử dụng cho nghiên cứu này để tách chiết RNA tổng số từ não thùy.

Tách RNA tổng số từ tuyến yên cá chép

Mẫu RNA tổng số thu được có hàm lượng RNA từ 3,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ đến 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tỷ số $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ trung bình đạt 1,82. Độ tinh sạch cao còn được thể hiện trên điện di agarose. Kết quả trên ảnh điện di cho thấy có ba băng kích cỡ phù hợp đặc trưng cho RNA (Hình 1).



Hình 1. RNA tổng số tách từ não thùy thể cá chép.

Thực hiện phản ứng RT-PCR nhân đoạn gen mã hóa GH cá chép

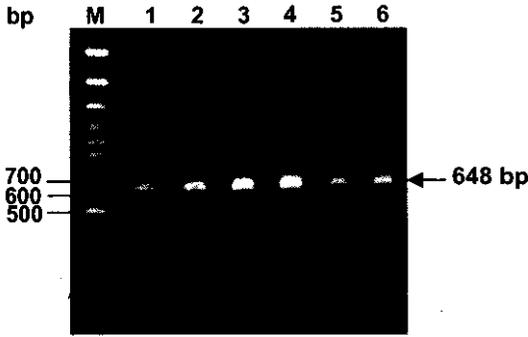
Thiết kế primer

Cập môi được thiết kế cho RT-PCR dựa trên trình tự mRNA cá chép (*Cyprinus carpio*) số đăng ký

M27000 trong GenBank. Kích thước đoạn gen cần khuếch đại: 648 bp.

Nhân gen bằng RT-PCR

Sản phẩm RT-PCR cho thấy xuất hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 650 bp, đúng theo lý thuyết (648 bp) (Hình 2).



Hình 2. Sản phẩm RT-PCR. M: Marker 100 bp; 1-6: Sản phẩm RT-PCR mẫu N₂, N₃, N₅, N₆, N₇, N₈.

Tinh sạch, tạo dòng sản phẩm RT-PCR để đọc trình tự

Tạo dòng sản phẩm RT-PCR

Những plasmid có kích thước lớn hơn plasmid được tách từ khuẩn lạc xanh có khả năng mang gen GH. Sự có mặt của gen GH được gắn với vector được kiểm tra bằng cách cắt với BamHI. Sản phẩm

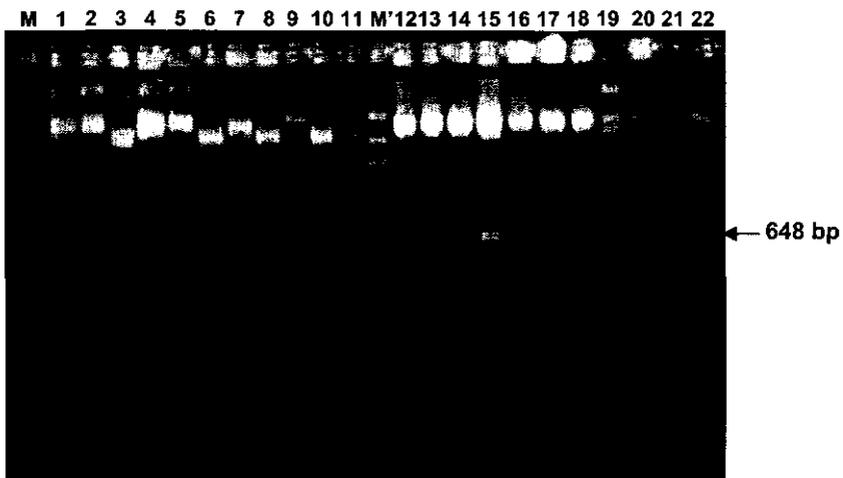
cắt cho hai băng có kích thước tương ứng với kích thước của vector và đoạn gen đã được chèn vào theo như tính toán (Hình 3).

Xác định trình tự DNA của sản phẩm RT-PCR

Plasmid sau khi được tinh sạch và kiểm tra sự có mặt của gen cần phân tích (plasmid 12, 13, 15, 16, 20), đã chọn plasmid 20 đọc trình tự. So sánh trình tự sản phẩm thu được (sau khi chỉnh sửa bằng phần mềm Chromast) với trình tự mRNA của gen GH trong GenBank (M27000 và AF332594) sử dụng phần mềm DNAMAN. Kết quả cho thấy trình tự thu được có độ tương đồng đến 99,38% (với M27000) và 87,04% (với AF332594). Trình tự amino acid suy diễn cũng được so sánh với trình tự amino acid trong GenBank. Kết quả cho thấy trình tự này hoàn toàn tương đồng với các trình tự đã có trong GenBank (Hình 5).

KẾT LUẬN

RNA tổng số tách từ não thùy thể cá chép được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa hormone sinh trưởng cá, sử dụng cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự M27000 trong GenBank. Sản phẩm RT-PCR có kích thước 648 bp đã được tách dòng bằng vector pCR2.1TOPO. Xác định trình tự sản phẩm gen tách dòng và so sánh với trình tự M27000 cho thấy có sự tương đồng là 99,38%. Trình tự amino acid suy diễn hoàn toàn tương đồng với các trình tự GH cá chép trong GenBank.



Hình 3. Plasmid từ khuẩn lạc sau biến nạp và plasmid được cắt bằng BamHI. M: Marker 1 kb; 1-9: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng; 10-11: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh; M': Marker 100 bp; 12-20: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng cắt bằng BamHI; 21-22: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh cắt bằng BamHI.

```

TTN_M13      CCCTGAGCGAAATGGCTAGAGTATTAGTGCTATTGTGCGGTGGTGTCTGGTTAGTTTGTGG
M27000      CCCTGAGCGAAATGGCTAGAGTATTAGTGCTATTGTGCGGTGGTGTCTGGTTAGTTTGTGG
AF332594      -----

TTN_M13      TCAACCAGGGGAGAGCATCAGACAACCAGCGGCTCTTCAATAATGCAGTCATTCGTGTAC
M27000      TAAACCAGGGGAGAGCATCAGACAACCAGCGGCTCTTCAATAATGCAGTCATTCGTGTAC
AF332594      -----TCAGACAACCAGCGGCTCTTCAATAATGCAGTCATTCGTGTAC
                      *****

TTN_M13      AACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGAGGACAGCCTGTTGCCTG
M27000      AACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGAGGACAGCCTGTTGCCTG
AF332594      AACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGAGGACAGCCTGTTGCCTG
                      *****

TTN_M13      AGGAACGCAGACAACCTGAGTAAAATCTTCCCTCTGTCTTTCTGCAATTCTGACTACATTG
M27000      AGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTCCCTCTGTCTTTCTGCAATTCTGACTACATTG
AF332594      AGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTCCCTCTGTCTTTCTGCAATTCTGACTACATTG
                      *****

TTN_M13      AGGCGCTGCTGGAAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCTATGCTGAAGCTTCTTCGCATCT
M27000      AGGCGCTGCTGGAAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCTATGCTGAAGCTTCTTCGCATCT
AF332594      AGGCGCTGCTGGAAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCTATGCTGAAGCTTCTTCGCATCT
                      *****

TTN_M13      CTTTTACCTCATTGAGTCTGAGTCTGGGAGTTCCCTAGCCAGTCCCTGAGCGGAACCGTCTCAA
M27000      CTTTTACCTCATTGAGTCTGAGTCTGGGAGTTCCCAAGCCAGTCCCTGAGCGGAACCGTCTCAA
AF332594      CTTTTACCTCATTGAGTCTGAGTCTGGGAGTTCCCTAGCCAGTCCCTGAGCGGAACCGTCTCAA
                      *****

TTN_M13      ACAGCCTGACCGTAGGGAACCCCAACCAGCTCACTGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAATGG
M27000      ACAGCCTGACCGTAGGGAACCCCAACCAGCTCACTGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAATGG
AF332594      ACAGCCTGACCGTAGGGAACCCCAACCAGCTCACTGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAATGG
                      *****

TTN_M13      GCATCAGTGTGCTCATCCAGGCATGTCTCGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACT
M27000      GCATCAGTGTGCTCATCCAGGCATGTCTCGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACT
AF332594      GCATCAGTGTGCTCATCCAGGCATGTCTCGATGGTCAACCAAACATGGATGATAATGACT
                      *****

TTN_M13      CCTTGCCGCTGCCTTTTGAGGACTTCTACTTGACCATGGGGGAGAAACAACCTCAGAGAGA
M27000      CCTTGCCGCTGCCTTTTGAGGACTTCTACTTGACCATGGGGGAGAAACAACCTCAGAGAGA
AF332594      CCTTGCCGCTGCCTTTTGAGGACTTCTACTTGACCATGGGGGAGAAACAACCTCAGAGAGA
                      *****

TTN_M13      GCTTTCGTCTGCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAAGTGGAGACCTACTTGAGGG
M27000      GCTTTCGTCTGCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAAGTGGAGACCTACTTGAGGG
AF332594      GCTTTCGTCTGCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAAGTGGAGACCTACTTGAGGG
                      *****

TTN_M13      TTGCAAATTCAGGAGATCCCTGGATTCCAACCTGCACCCTGTAGATGG
M27000      TTGCAAATTCAGGAGATCCCTGGATTCCAACCTGCACCCTGTAGATGG
AF332594      TTGCAAATTCAGGAGATCCCTGGATTCCAACCTGCACCCTGTAGATGG
                      *****

```

Hình 4. So sánh trình tự đoạn gen đã tách dòng (TTN_M13) với trình tự mRNA GH cá chép trong GenBank (M27000, AF332594).

```

TTN_M13 aa      MARVLVLLSVVLVSLLVNQGGRASDNQRLFNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDSLLPEERR
M27000 aa      MARVLVLLSVVLVSLLVNQGGRASDNQRLFNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDSLLPEERR
AF332594_aa    -----SDNQRLFNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDSLLPEERR
AAK19527 aa    -----SDNQRLFNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDSLLPEERR
                *****

TTN_M13 aa      QLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETQKSSMLKLLRISFHLLIESWEFFPSQSLSGTVSNLSLT
M27000 aa      QLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETQKSSMLKLLRISFHLLIESWEFFPSQSLSGTVSNLSLT
AF332594_aa    QLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETQKSSMLKLLRISFHLLIESWEFFPSQSLSGTVSNLSLT
AAK19527 aa    QLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETQKSSMLKLLRISFHLLIESWEFFPSQSLSGTVSNLSLT
                *****

TTN_M13 aa      VGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLGDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGENNLRESFRL
M27000 aa      VGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLGDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGENNLRESFRL
AF332594_aa    VGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLGDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGENNLRESFRL
AAK19527 aa    VGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLGDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGENNLRESFRL
                *****

TTN_M13 aa      LACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL-----
M27000 aa      LACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL-----
AF332594_aa    LACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL-----
AAK19527 aa    LACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL-----
                *****

```

Hình 5. So sánh trình tự amino acid suy diễn (TTN_M13) với các trình tự amino acid trong GenBank.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong lĩnh vực Khoa học Tự nhiên năm 2006.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anathy V, Venugopal TV, Koteeswaran R, Pandian TJ, Mathavan S (2001) Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). *J Biosci* 26(3): 315-324.

Bai J, Ma J, Jian Q, Li X, Luo J (1999) Cloning of cDNA for common carp *GH* and its expression in Prokaryocyte. *Chin J Biochem Mol Biol* 15(3): 409-412.

Bernardini S, Argenton F, Vianello S, Colombo L, Bortolussi M (1999) Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Gen Comp Endocrinol* 116: 261-271.

De la Fuente J, Martínez R, Estrada MP, Hernández O, Cabrera, E.; Garcia del Barco D, Lleonart R, Pimentel R, Morales R, Herrera F, Morales A, Guillén I, Piña JC (1995) Towards growth manipulation in tilapia (*Oreochromis* sp.) generation of transgenic tilapia with chimeric constructs containing tilapia growth hormone cDNA. *J Mar Biotechnol* 3: 216-219.

Chomczynsky P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Du SJ, Gong Z, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR, Hew CL (1992) Growth enhancement in Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology* 10: 176-181.

Li X (2003) Growth-hormone autotransgenic studies in Blunt-snout Bream (*Megalobrama amblycephala*), *PhD Dissertation*, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430027, China.

Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho KN, Kim CG, Kim DS (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Transgenic Res* 10(4): 353-362.

Nguyễn Văn Hào, Ngô Sỹ Vân (2001) *Cá nước ngọt Việt Nam*, tập 1: Họ Cá Chép (*Cyprinidae*). Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Seidman CE, Struhl K, Sheen J, Jessen T (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*. Bristol-Myers Squibb Seattle, Washington: 4.9.1-4.9.4.

Zhao X, Li J, Li R, Zhang S, Zhang Y, Yang Z (1996)

Amplification, cloning, and sequence comparison of the growth hormone gene for carp (*Cyprinus carpio*) by the polymerase chain reaction. *Chin J Biotechnol* 12(3): 161-167.

CLONING OF GENE ENCODING THE GROWTH HORMONE FROM COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Thâm Thị Thu Nga*, Dang Thi Thanh Ha, Nguyen Thu Thuy

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Growth hormone plays an important role on fish physiology and metabolism. Recombinant growth hormone of human and some animals have been produced for a variety of aims such as: research, medicine, agriculture and fishery. In order to produce transgenic fish, especially in autotransgenic strategy, which is considered a best method for exploiting transgene, and fish growth hormone for aquaculture, growth hormone gene from common carp (*Cyprinus carpio*) was cloned and sequenced. Total RNA extracted from common carp pituitary gland was used as template for reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). A pair of primers was designed base on M27000 sequence in GenBank Nucleotide Sequence Databases. RT-PCR product of 648 bp DNA, was cloned into pCR2.1 TOPO cloning vector. Its sequence showed 99.38% homology to the mRNA sequence in GenBank with accession number M27000. This structure gene will be expressed in *E. coli*, then be bound with common carp β -actin promoter to make "all fish" GH transgene construct for autotransgenic fish.

Keywords: Cloning, common carp (*Cyprinus carpio*), growth hormone, mRNA, RT-PCR

*Author for correspondence: Tel: 84-4-7568761, E-mail: ngatham@ibt.ac.vn