تولید جنینهای موشی کایمری حاصل از ترکیب جنین‌های تتراپلوییید و سلولهای بنیادی جنینی بیان کننده H2A.Z-EGFP

حسین بهاروند[☆★] M.Sc.، داود صبور B.Sc.[☆]، عادله طائی B.Sc.[☆]، کلاس ماتایی Ph.D.[★]

☆ پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

★ دانشگاه جان کورتین، دانشگاه ملی استرالیا، کانبرا، گروه زیست شناسی مولکولی

آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

پست الکترونیک: Email: baharvand50@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۲

* **هدف:** تولید جنین‌های موشی کایمری با استفاده از سلولهای بنیادی جنینی دستکاری شده ژنتیکی بیان کننده واریته هیستونی H2A.Z-EGFP و جنین‌های تتراپلوییید

* **مواد و روشها:** دو بلاستومر جنین‌های دو سلولی موش نژاد NMRI توسط دستگاه الکتروفیوژن با ولتاژها و زمانهای متفاوت در هم ادغام شدند. در بهترین حالت ادغام جنین‌های تتراپلوییید با سلولهای بنیادی جنینی رویان B1، مشتق از موش C57BL/6 که وکتور H2A.Z-EGFP به آن وارد شده بود و بیان کننده ژن مزبور بود، ترکیب (aggregate) شدند. ورود ژن مزبور به سلولهای بنیادی جنینی با الکتروپوراسیون بود. جنین‌های ترکیب شده در محیط T6 تا مرحله بلاستوسیست رشد یافتند.

* **یافته ها:** مقایسه میزان ادغام بلاستومرها با الکتروفیوژن و تکوین جنینهای تتراپلوئید نشان داد که با ولتاژ ۱۰۰ ولت از جریان مستقیم و زمان ۲۵ میلیونیم ثانیه، صددرصد جنین‌های دو سلولی در هم ادغام شدند و هشتاد و دو درصد جنین‌های تتراپلوییید تولیدی تا مرحله بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست رشد یافتند. ضمنا ۷۵درصد جنین‌ها با هم ترکیب شدند که ۴۲درصد بلاستوسیست‌ها دارای سلولهای بنیادی جنینی ترانسژنی بودند.

* **نتیجه گیری:** در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از جنین‌های تتراپلوییید و سلولهای بنیادی جنینی دستکاری شده ژنتیکی برای تولید بلاستوسیستهای ترانس ژنی استفاده نمود.

گل واژگان: جنین تتراپلوییید، ترکیب (aggregation)، سلولهای بنیادی جنینی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۲۳-۱۱۸

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی مشابه سلولهای اپی‌بلاست اولیه رفتار می‌کنند (۱). به طوری که همه سلولهای دودمانی خود جنین را به وجود می‌آورند و در بافتهای برون جنینی یعنی کیسه زرده، آمنیون و آلانتویس شرکت نمی‌کنند. اما اگر سلولهای بنیادی جنینی با جنین‌های قبل از بلاسیتوسیست ترکیب (aggregate) شوند، سلولهای بنیادی جنینی در مشتقات دودمانهای سلولی برون جنینی یعنی تروفوبلاست و اندودرم اولیه شرکت می‌کنند (۲، ۳).

خاصیت پرتوانی سلولهای بنیادی جنینی از نقطه نظر ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنها و حصول موشهای ترانس‌ژنی بسیار حائز اهمیت است، زیرا سلولهای بنیادی جنینی می‌توانند علاوه بر شرکت در سلولهای دودمانی سوماتیک در ایجاد سلولهای زاینده (germinal) موش کایمر حاصل نیز شرکت نمایند.

دو روش برای تولید جنین ترانس ژنی وجود دارد: ۱) تزریق مستقیم وکتور حاوی ژن مورد نظر به پیش هسته بوسیله دستگاه میکرواینجکشن؛ این روش به مهارتهای بالایی برای کار با دستگاه نیاز دارد و در ضمن هزینه آن زیاد است (۴، ۲) استفاده از سلولهای بنیادی جنینی؛ این روش به دو صورت قابل انجام است: (الف): تزریق مستقیم سلولهای بنیادی ترانس ژنی به داخل بلاستوسیست به وسیله دستگاه میکرواینجکشن. در این روش سلوهای بنیادی جنینی به داخل بلاستوسیست موشهای هم خون (inbred) تزریق می‌گردد. تعداد جنین‌های حاصل از چنین موشهایی کم است (۵، ۶). (ب): وارد کردن سلولهای بنیادی جنینی ترانس ژن به جنین‌های تتراپلوییید با استفاده از روش ترکیب جنینها. در این روش می‌توان از جنین موشهای نا هم خون (outbred) که قابلیت تولید جنین بیشتری را دارند و به راحتی زاد و ولد می‌کنند، استفاده کرد. در ضمن این روش نسبت به روشهای قبلی ارزانتر بوده و به مهارت زیادی نیاز ندارد (۴، ۵، ۶، ۷).

کایمرهای ترکیب شده، با ترکیب سلولهای بنیادی جنینی با جنینهای مرحله تسهیمی و رشد آنها تا مرحله بلاستوسیست در محیط آزمایشگاهی و سپس انتقال جنین حاصل به رحم صورت می‌گیرد.

لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا سلولهای بنیادی جنینی موش (رویان B1) را دستکاری ژنتیکی کرده و با ترکیب با جنینهای تتراپلوییدی از آن موش ترانس ژنی بسازیم. اما تا کنون موفق به تولید آن نشدیم. بنابراین این مقاله به شرح تولید جنینهای ترانس‌ژن حاصل می‌پردازد. حامل (vector) مورد نظر حاوی ژن H2A.Z بود که برای نشان دادن تجلی آن از EGFP (enchanced green fluorescence protein) (۸) استفاده شده بود.

در این وکتور، ژن EGFP با ژن H2A.Z پیوند خورده‌اند (fused). H2A.Z یک واریته هیستون H2A است که برای حیات درزوفیلا (۹) و تتراهایمنا (۱۰) ضروری است اما برای یوکاریوتهای ساده‌ای نظیر مخمر ضروری نیست (۱۱). احتمالا این واریته در پایداری کروماتین یا تا خوردگی (Folding) آن موثر می‌باشد (۱۲) و گفته می‌شود که نبود آن منجر به مرگ جنین پستانداران می‌شود (۱۳).

مواد و روشها

تهیه جنین‌های دو سلولی

با هورمون درمانی موش نژاد NMRI (انیستیتو پاستور ایران)، با هورمونهای PMSG(Intervet) و hCG (Organon) و دو روز پس از مشاهده پلاک واژنی، جنین‌های دو سلولی با فلاش لوله‌های رحمی به دست آمدند. این جنینها در محیط کشت T6 حاوی ۴ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) و در انکوباتور CO_2 ۵درصد تا مرحله بعد نگهداری شدند.

تولید جنین‌های تتراپلوییدی

به منظور تولید کایمر، از جنینهای تتراپلویید استفاده شد. این جنین‌ها با کمک الکتروفیوژن (BLS, CF, 150B) و با استفاده از ادغام دو بلاستومر جنین دو سلولی در هم و حصول جنین تتراپلویید ایجاد شدند. در مرحله اول ولتاژ و زمان پالس برای حصول بهترین حالت ادغام که در آن بیشترین میزان بلاستوسیست تتراپلویید و کمترین مرگ جنین روی دهد، مورد آزمایش قرار گرفت. برای این موضوع از ولتاژهای ۵۰ ولت و ۱۰۰ ولت و زمانهای ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلیونیوم ثانیه استفاده شد.

کشت سلولهای بنیادی جنینی

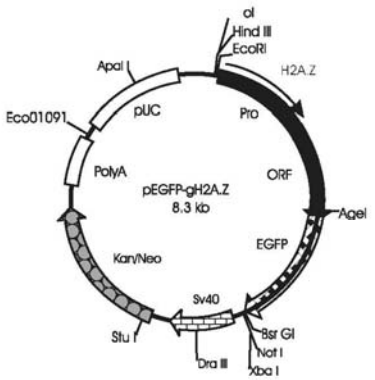
در این مطالعه از رده سلولهای بنیادی جنینی رویان B1 مشتق از موش نژاد C57BL/6 استفاده شد (۱۴). این سلولها به صورت تمایز نیافته بر فیبروبلاست‌های جنین موشی که تقسیم آنها با مایتویسین C-(Sigtma, M0503) متوقف شده بود کشت شدند. محیط کشت این سلولها شامل (DMEM, Gibco, 10829-018) Dulbecco's modified Eagle's medium همراه با افزودنیهای ۱۵درصد سرم جنین گاوی (FCS, Gibco, 16141-079) 0.1mM بتامرکاپتواتانول (Sigma, M7522) 2mM گلوتامین (Gibco, 15039-027) 0.1mM اسید آمینه غیرضروری (Sigma, M7145) و 1000iu/ml فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF, Chemonicon, ESGRO, ESG1107) بود.

جهت ورود ژنهای H2A.Z-EGFP به داخل سلولهای بنیادی جنینی از وکتور حاوی ژنهای H2A.Z-EGP (هدیه از دکتر David Tremethick، دانشگاه ملی استرالیا، کانبرا، استرالیا) استفاده شد (شکل ۱). این وکتور به وسیله آنزیم محدود کننده DarIII(Invitrogen) از حالت حلقوی به خطی تبدیل شد. سپس وکتور خطی توسط دستگاه الکتروپوریتور (Biorad, Gene pulser, Cuvette, 165-2088) وارد سلولهای مزبور گردید. در مرحله بعد، سلولهای بنیادی به مدت ۱۰ روز در محیط کشت سلولهای بنیادی حاوی G418(177µg/ml) (Geneticin, Gibco, 11811-031) روی فیبروبلاست‌های جنین موش MTK حاوی ژن Neo^r کشت شدند. G418 به عنوان انتخاب گر منفی، سلولهایی که وکتور حاوی ژن Neo^r به آنها وارد نشده است را می‌کشد. در طی مرحله انتخاب اول، هر روز محیط کشت تعویض می‌شد. در نهایت، در مرحله انتخاب دوم، در زیر میکروسکوپ فلورسنس، کلونی‌های سبز (شکل ۲)، انتخاب و مجددا کشت داده شدند. این کلونیها بیان کننده H2A.Z-EGFP بودند. با تکثیر مجدد این کلونی‌ها، سلولهای بیان کننده ژن مزبور به صورت خالص درآمدند.

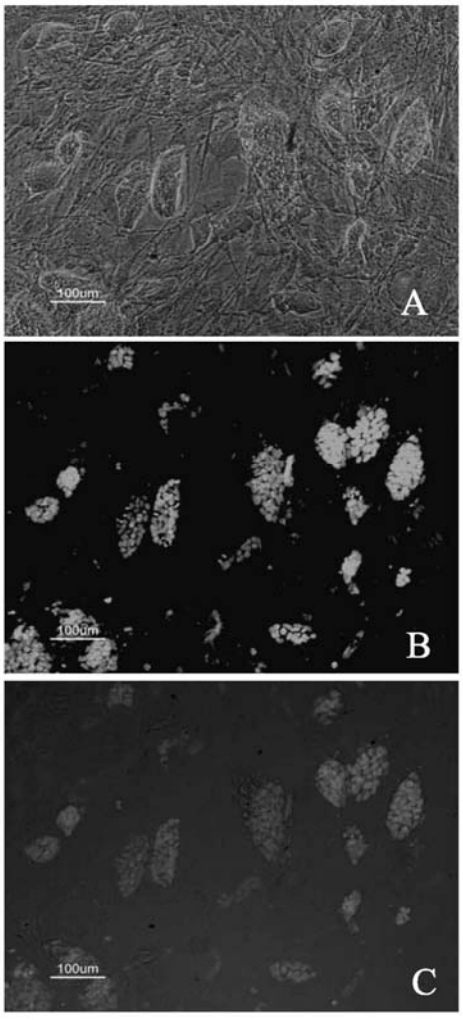
تهیه جنین‌های کایمر

برای تهیه جنین‌های کایمر، ابتدا پلیت مخصوص ترکیب جنینها با سلولهای ES به شکل ذیل تهیه شد. پس از قطره گذاری محیط کشت T6 در پتری دیش باکتریایی ۳۵ میلیمتری، روی قطرات با روغن معدنی پوشانیده شد. سپس بوسیله سوزن مخصوص در کف هر قطره حدود ۶ حفره به قطره ۳۰۰ میکرون و با عمق مناسب ایجاد گردید. پس از آماده شدن پلیتهای مخصوص در انکوباتور CO_2 قرار داده شدند تا pH=۷/۲-۷/۴ برای محیط کشت تثبیت گردد.

به دنبال آن، جنین‌های تتراپلویید، تقسیم شده و به مرحله ۴ سلولی تکوین یافتند. در این مرحله پوشش زوناپلوسیدا توسط اسید تیرود حذف گردید و پس از شستشوی جنین‌ها، در هر حفره دو جنین چهار سلولی تتراپلویید و در بین آنها مانند ساندویچ ۱۵-۱۰ سلول بنیادی جنینی بیان کننده H2A.Z-EGFP قرار گرفت (شکل ۳). به دنبال آن سلولها در انکوباتور ۵درصد CO2 نگهداری شدند، بعد از گذشت چند ساعت سلولها و جنین‌ها در هم ترکیب (اگریگیت) شده و یک جنین تشکیل شد و روز بعد به مرحله بلاستوسیست رسیدند که بخش توده سلولی داخلی آنها از سلولهای بنیادی جنینی بوده و زیر میکروسکوپ فلورسنس (Nikon, TE2000) با فیلتر آبی مشاهده گردیدند.



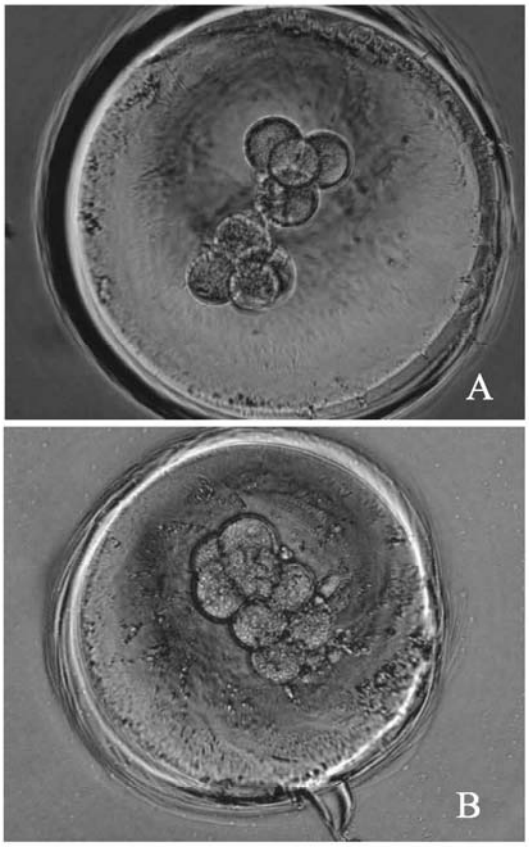
شکل ۱: وکتور حاوی ژنهای H2A.Z-EGFP و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک Neo^r



شکل ۲: کلونی‌های سلولهای بنیادی جنینی موشی رویان B1 بیان کننده H2A.Z-EGFP. کلونی‌ها با میکروسکوپ فاز کنتراست (A) میکروسکوپ فلورسنس (B) و ادغام دو نوع میکروسکوپ در هم (C)

بررسی آماری

میزان درصد ادغام، تکوین جنین‌ها با استفاده از آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۳: مدل ساندویچ ترکیب شدن، به طوری که سلولهای بنیادی بین دو جنین تتراپلوئید قرار گرفته‌اند (A) و در جنین‌ها در حال ادغام هستند (B). محل مشخص شده، سلولهای بنیادی جنینی را نشان می‌دهد.

یافته‌ها

درصد ادغام جنین‌های دو سلولی بعد از الکتروفیوژن و میزان تکوین جنین‌های تتراپلوئید در جدولهای ۱ و ۲ آمده است. در جدول شماره ۱ با ولتاژ ۵۰ ولت از جریان مستقیم و طی زمانهای ۱۰ تا ۵۰ میلیونیوم ثانیه (µsec) تکوین جنین‌های تتراپلوئید بررسی شد. بهترین نتایج در گروه ۴۰ میلیونیوم ثانیه دیده شد. زیرا ۵۹ درصد جنین‌های دو سلولی پس از الکتروفیوژن، ادغام موفقی داشتند و تکوین جنین‌های تتراپلوئید در گروه ۴۰ و ۵۰ میلیونیوم ثانیه به صورت معنی‌داری بهتر از گروههای دیگر بود ($P<0.05$).

در جدول شمارهٔ ۲ با ولتاژ ۱۰۰ ولت از جریان مستقیم در زمانهای ۱۰ تا ۵۰ میلیونیوم ثانیه ادغام و تکوین جنین‌های تتراپلوئید بررسی شد.

جدول ۱: تکوین جنین‌های دو سلولی ادغام شده تحت جریان مستقیم ۵۰ ولت

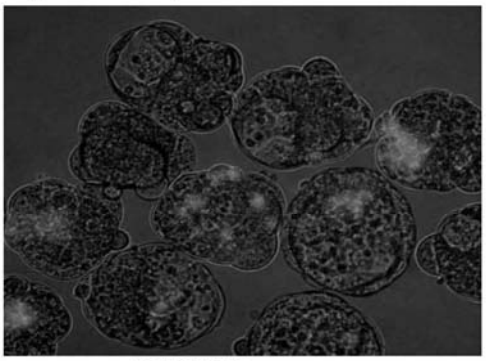
گروه / زمان		۰ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت	
Duration (µsec)	جنین ۲ سلولی	ادغام شده	دژنره	دو سلولی تترا پلوئید	M	M+۸+۴ سلولی	B	M+B	HgB	B+HgB
۱۰	۹	۳	۰	–	–	–	–	–	–	–
۲۰	۹	۲	۰	–	–	–	–	–	–	–
۳۰	۹	۲	۰	–	–	–	–	–	–	–
۴۰	۲۹	۱۷(۵۹)	۰	۸(۴۷)	۱۱(۶۵)	۱۲(۷۰)	۷(۴۱)	۸(۴۷)	۳(۱۸)	۱۱(۶۵)
۵۰	۲۸	۱۱(۳۹)	۰	۳(۲۷)	۴(۳۶)	۴(۳۶)	۱۱(۱۰۰)	۱۱(۱۰۰)	۲(۱۸)	۱(۷۳)

جدول ۲: تکوین جنین‌های دو سلولی ادغام شده تحت جریان مستقیم ۱۰۰ ولت

گروه / زمان		۰ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت	
Duration (µsec)	جنین ۲ سلولی	ادغام شده	دژنره	دو سلولی تترا پلوئید	M	M+۸+۴ سلولی	B	M+B	HgB	B+HgB
۱۰	۱۷	۹(۵۳)	۰	۴(۴۴)	۴(۴۴)	۶(۶۷)	۱(۱۱)	۲(۲۲)	۰	۳(۳۳)
۲۰	۸۲	۸۲(۱۰۰)	۰	۵۶(۶۸)	۶۳(۷۷)	۶۳(۷۷)	۶۶(۸۰)	۷۷(۹۳)	۲۷(۳۳)	۶۴(۷۸)
۲۵	۳۹	۳۹(۱۰۰)	۰	۲۴(۶۲)	۲۶(۶۷)	۲۷(۶۹)	۲۶(۶۷)	۳۶(۹۲)	۱۱(۲۸)	۳۲(۸۲)
۳۰	۳۹	۳۹(۱۰۰)	۰	۲۶(۶۷)	۲۶(۶۷)	۲۶(۶۷)	۲۵(۶۴)	۲۸(۷۲)	۱۲(۳۱)	۲۷(۶۹)
۴۰	۵۰	۵۰(۱۰۰)	۰	۲۸(۵۶)	۲۷(۵۴)	۳۲(۶۴)	۲۳(۴۶)	۳۵(۷۰)	۱۰(۲۰)	۳۶(۷۲)
۵۰	۱۰	۵(۵۰)	۵(۵۰)	۴(۸۰)	۳(۶۰)	۳(۳۰)	۱(۲۰)	۱(۲۰)	۰	۱(۲۰)

بهترین نتایج در گروه ۲۵ میلیونیوم ثانیه دیده شد. زیرا در این گروه علاوه بر اینکه صددرصد جنین‌های دو سلولی پس از الکتروفیوژن ادغام شدند، حدود ۸۲ درصد از جنین‌های تتراپلوئید نیز به مرحله بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست (HgB) رسیدند که بالاترین میزان تکوین جنین‌های تتراپلوئید را نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به نتایج موجود می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با ولتاژ ۱۰۰ ولت از جریان مستقیم و زمان (Duration) ۲۵ میلیونیوم ثانیه علاوه بر اینکه درصد موفقیت الکتروفیوژن صددرصد است، تکوین جنین‌ها تا ۹۶ ساعت پس از ادغام نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0.05$).

در مرحله ترکیب شدن نیز این نتایج به دست آمد: از ۹۸ جفت جنین چهار سلولی تتراپلوئید که با سلولهای بنیادی ترکیب شدند، روز بعد ۷۴ بلاستوسیست (۷۵درصد) ترکیب شده به دست آمد که از این تعداد ۴۲درصد آنها دارای سلولهای بنیادی جنینی ترانسژنی بودند. بخش بیان کننده H2A.Z-EGFP به صورت سبز مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴: بلاستوسیست‌های بیان کننده H2A.Z-EGFP. ناحیه سبز نشان دهندهٔ تجلی ژن مزبور است. تصویر با کمک میکروسکوپ فلورسنس و نور معمولی به طور هم‌زمان گرفته شده است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که علی‌رغم مزیت‌هایی که روش ترکیب شدن در تولید جنین کایمر با استفاده از سلولهای بنیادی ترانسژن و جنین تتراپلوئید دارد، و علی‌رغم بالا بودن درصد ادغام، تکوین و ترکیب شدن جنین‌ها، تولید جنین کایمر دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که یکی از مهمترین این محدودیتها درصد پایین موفقیت در تولد زنده جنین کایمر انتقال داده شده می‌باشد؛ چرا که دستکاریهایی که در تکوین جنین مزبور حاصل می‌شود اعم از تتراپلوئیدی نمودن جنین و وارد کردن توده سلولهای بنیادی به داخل بلاستوسیست و حذف پوشش زوناپلوسیدا سبب کاهش موفقیت در لانه‌گزینی جنین مزبور گشته و احتمال زنده متولد شدن جنین را پایین می‌آورد. این نتایج با نتایج به دست آمده از سایر محققین کاملا قابل مقایسه است (۱۵، ۱۶).

در مورد نقش جنین تتراپلوئید درتولید جنین کایمر باید گفت که تتراپلوئیدی بودن جنین از دو جنبه در بیولوژی تکوینی پستانداران مورد توجه می‌باشد. جنبه اول از نظر فنوتیپ و رشد ظاهری این جنین‌ها می‌باشد که با الگوی تکوین آنها ارتباط دارد. به طور طبیعی مشاهده تکوین جنین‌های تتراپلوئید به دلیل کاهش رشد طبیعی جنین و بلوکه شدن تکوین آن، در مراحل اولیه بارداری محدود می‌گردد.

رشد و تکوین پیش از لانه‌گزینی جنین‌های تتراپلوئیدی سبب تولید جنین‌هایی می‌شود که اندازه بلاستومر آنها بزرگتر و تعداد سلولهای آنها کمتر است (۱۷، ۱۸).

پس از انتقال این جنین‌ها به مادران رضایی در موش، مشاهده شد که این جنین‌ها توانستند حداقل تا نیمه‌های دوران بارداری یعنی روز دهم و در بعضی مواقع تا روز پانزدهم پیش بروند (۱۹)، در حالی که جنین‌های زنده دارای ناهنجاریهایی در تکوین قلب، سر و صورت و ستون فقرات بودند (۱۹، ۲۰).

علاوه بر موارد فوق می‌توان از جنین‌های تتراپلوئید در جهت تولید جنین‌ها و موجودات کایمر استفاده کرد. نوزادهای به وجود آمده نمی‌توانند نقش سلولهای تتراپلوئید را در تکوین جنین به روشنی نشان دهند، اما ثابت شده است که این سلولها می‌توانند در تکوین ورشد سایر بافتها دخالت داشته باشند (۷).

همچنین مشخص شده است که سلولهای تتراپلوئید می‌توانند در رشد سلولهای دیپلوئید به عنوان پشتیبان عمل کنند ولی قادر به پشتیبانی و کمک در رشد و تکوین سایر بافتهای غیرجنینی نیستند. علاوه بر این قادرند سلولهای دیپلوئید را ودار کنند تا بافتهای جنینی نوزاد کایمر را به وجود آورند. با استفاده از این پدیده می توان جنین‌های کایمر را از راه ترکیب کردن سلولهای بنیادی جنینی دیپلوئید و بلاستوسیست‌های تتراپلوئید تولید کرد (۲).

دستگاه الکتروفیوژن با دادن پالس الکتریکی مستقیم در سطح مشترک غشاء دو بلاستومر روزنه‌های را ایجاد می‌کند که پس از آن پل‌هایی سیتوپلاسمی بین دو غشاء به وجود می‌آیند؛ این پل‌ها آرام آرام وسیعتر شده به طوری که یک تعادل سیتوپلاسمی بین دو بلاستومر به وجود می‌آید. تعداد و اندازه روزنه‌های اولیه زمان لازم برای ادغام کامل دو بلاستومر را تعیین می‌کند (۱۶). پس از حدود ۳۰-۱۵ دقیقه غشاء مشترک بین دو بلاستومر از بین رفته و در نتیجه دو بلاستومر دیپلوئید که پیش از این یک جنین دو سلولی را تشکیل داده بودند، تشکیل یک جنین تک سلولی تتراپلوئیدی را می‌دهند. جنین مزبور مجددا شروع به تسهیم می‌کند. از این پس همهٔ سلولهایی که از این جنین تک سلولی به وجود می‌آیند تتراپلوئید هستند (۱۶).

در مورد اهمیت سلولهای بنیادی جنینی در این مطالعه و نقش آنها در تولید موجود کایمر، محققین معتقدند که سلولهای بنیادی جنینی (ES) می‌توانند پس از تزریق به داخل یک بلاستوسیست یا پس از ترکیب شدن با بلاستومرهای جنینی در مراحل اولیه رشد رفتار طبیعی را از خود نشان دهند (۶). این سلولها به دلیل دارا بودن خاصیت پرتوانی می‌توانند پس از ورود به داخل جنین مرحله پیش از لانه‌گزینی جایگزین توده سلولی داخلی (ICM) شده و یا با این توده سلولی مخلوط شوند. از آنجایی که توده سلولی داخلی در نهایت جنین را به وجود می‌آورد، پس سلولهای بنیادی جدید قادر خواهند بود در ساخته شدن قسمتهایی از بدن موجودی که در آینده به وجود خواهد آمد نقش داشته باشند (۶).

برای اینکه بتوان حیوان ترانسژن داشت باید سلولهای بنیادی که وارد جنین مرحله پیش از لانه‌گزینی می‌شوند ترانسژن باشند، یعنی دارای یک یا چند ژن مازاد بر ژنهای ژنوم جاندار باشند. در این مطالعه از ژن H2A.Z-EGFP استفاده شده است. دانشمندان با استفاده از استخراج این ژن از عروس دریایی و کلون کردن آن در ژنوم موجوداتی نظیر E.Coil (۸)، Caenorhabditis elegans (۸)، مگس سرکه (۲۱، ۲۲)، گور خرماهی و موش (۲۳) توانستند بیان این ژن را در این موجودات از طریق تولید محصول این ژن یعنی پروتئین EGFP مشاهده کنند.

Fast و همکاران (۱۳) با وارد کردن وکتور حامل EGFP و پروموتر H2A.Z به داخل سلولهای بنیادی جنینی موش نژاد 129/ola توانستند موشهای ترانس ژن را تولید کنند و نشان دادند که H2A.Z نقش مهمی در تکوین ابتدایی جنین پستانداران دارد.

سعی ما در این مطالعه بر این فرض استوار بود که با وارد نمودن این ژن به جنین موش و تولید جنین ترانسژن، بتوان زمینه جدیدی را در تولید حیوانات ترانسژن ایجاد نمود و با وارد کردن ژنهای انسانی به جنین پستاندارانی نظیر موش و تولید موش ترانسژن بتوان در آینده عملکرد و رفتار این ژنهارا خارج از بدن و در عین حال در محیط in vivo بررسی کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نگارندگان مقاله از آقایان دکتر سعید کاظمی آشتیانی، دکتر عبدالحسین شاهوردی، دکتر احمد وثوق و خانم هانیه جعفری که در انجام مراحل مختلف این پژوهش همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Beddington RS, Robertson EJ: An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. Development. 1989; 105: 733-737
2. Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J: Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development. 1990; 110: 815-821
3. Rossant J, Spence A, Rossant J: Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. Trends Genet. 1998; 14: 358-363
4. Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A: No-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. Nature. 1993; 365: 87-89
5. Bishop J: Transgenic Mammals. Longman, England, 1999, 3-4
6. Joyner A.L, Nagy A, Rossant J: Gene targeting oxford university press, U.K, 1999,177-206
7. Lu T, Markert C.L: Manufacture of diploid / tetraploid chimeric mice. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77(10): 6012-6016
8. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W.W, Prasher D.C: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. science 1994; 263: 802-805
9. Van Daal A, Elgin SCR: A histone variant, H2AvD, is

esential in Drosophila melanogaster. Mol Biol Cell 1992; 3: 593-602
10. Liu X, Li B, Gorovsky MA: Essential and nonessential histone H2A variants in Tetrahymena thermophila. Mol Cell Biol 1996; 16: 4305-4311
11. Carr AM, Dorrington SM, Hindley J, Phear GA, Aves SJ, Nurse P: Aalysis of a histone H2A variant from fission yeast: Evidence for a role in chromosome stability. Mol Gen Genet. 1994; 245: 628-635
12. Clarkson MJ, Wells JRE, Gibson F, Saint R, Tremethick DJ: Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. Nature 1999; 399: 694-697
13. Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons I: Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. Curr Biol. 2001; 11: 1183-1187
14. Baharvand H, Matthaei KI: Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2004; 40: 76-81
15. Shimada H, Kaname T, Suzuki M, Hitoshi Y, Araki K, Imaizumi T, Yamamura K: P Comparison of ES Cell fate in sandwiched aggregates and Co-Cultured aggregates during Blastocyst formation by monitored GFP Expression. Mol Reprod and Devel 1999; 52: 376-382
16. Wassarman P.M, Depamphilis M.L, Mclaughlin K.J: Guide to techniques in mouse development. Academic Press Inc USA ,1993 919-929
17. Tarkowski A.K, Witkowska A, Opas J: Development of Cytochalasin in Binduced tetraploid and diploid / tetraploid mosaic mouse embryos .J Embryol Exp Morphol 1977; 41: 47-64
18. Henery C.C, Kaufman M.H: Relationship between Cell size and nuclear volume in nucleated ret blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos. J Exp Zool 1992; 261(4);472-478
19. Kaufman M.H, Webb S: Postimplantation development of tetraploid mouse embryos Produced by electrofusion. Development 1990; 110(4):1121-1132
20. Henery C.C, Bard J.B.L, Kaufman M.H: Tetraploidy in mice, embryonic Cell number, and the grain of The development map. Dev Biol 1992; 152(2): 233-241
21. Wang , Hazelreigg: Implications for bcd mRNA Localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis. Nature 1994; 369(6479): 400-403
22. Barthmaier, Fyrberg: Monitoring development and pathology of Drosophila indirect flight muscles using green fluorescent protein. Dev Biol 1995; 169 (2): 770-774
23. Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M: Green\Fluorescent protein as a marker in transgenic mice. Dev Growth Differ 1995; 37: 455-459